


# TESIS DOCTORAL

2016



**ESTUDIO, DESARROLLO Y APLICACIÓN DE  
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS  
EN LECHE POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA PRESIÓN CON DETECCIÓN EN EL  
ULTRAVIOLETA (HPLC-UV)**

**BEATRIZ ELENA SOLEDAD RODRÍGUEZ  
LICENCIADA EN QUÍMICA**

**UNED**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO CIENCIAS ANALÍTICAS**

**DIRECTORES:  
JESÚS SENEN DURAND ALEGRÍA  
ROSA MARÍA GARCINUÑO MARTÍNEZ**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO, DESARROLLO Y APLICACIÓN DE  
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS  
EN LECHE POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA PRESIÓN CON DETECCIÓN EN EL  
ULTRAVIOLETA (HPLC-UV)**

**BEATRIZ ELENA SOLEDAD RODRÍGUEZ  
LICENCIADA EN QUÍMICA**

**DIRECTORES:  
JESÚS SENEN DURAND ALEGRÍA  
ROSA MARÍA GARCINUÑO MARTÍNEZ**





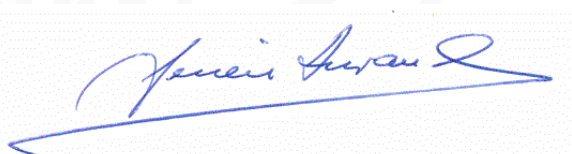
**JESÚS SENÉN DURAND ALEGRÍA**, Catedrático de Universidad, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

**ROSA M<sup>a</sup> GARCINUÑO MARTÍNEZ**, Profesor Contratado Doctor, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo aquí presentado bajo el título: “**Estudio, desarrollo y aplicación de polímeros molecularmente impresos para la determinación de antibióticos en leche por cromatografía líquida de alta presión con detección en el ultravioleta (HPLC-UV),**” que constituye la memoria que presenta **Dña. Beatriz Elena Soledad Rodríguez** para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Analíticas de la Facultad de Ciencias de la UNED. Asimismo, manifiestan que el trabajo descrito en la presente memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que autorizan su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Madrid, a 24 de Noviembre de 2015.



Fdo.: Jesús Senén Durand Alegría



Fdo.: Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, sin las cuales no hubiese sido posible la realización de este trabajo:

Al profesor Dr. Rafael Muñiz, por permitirme utilizar el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución así como las instalaciones y equipos del Laboratorio de Biología y Química de la Universidad Católica Andrés Bello.

A la profesora MSc. Antonietta Melone, del Departamento de Química de la Universidad Católica Andrés Bello, por sus valiosas sugerencias.

Al profesor Dr. Livio Revel-Chion de la Universidad Simón Bolívar por la atención que le ha brindado a mi trabajo y sus acertadas indicaciones.

Al profesor Dr. Jesús Senén Durand Alegría, por haberme dado la oportunidad de trabajar con su equipo de investigación así como por su valiosa asesoría y orientación desde el inicio y en el transcurso de este Doctorado.

También quiero agradecer muy especialmente a las Doctoras Pilar Fernández Hernando y Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez por sus valiosos comentarios, asesoría, paciencia y apoyo tanto durante la realización de esta Memoria como en el desarrollo de los artículos y presentación de los trabajos en el congreso.

A José del Carmen, quien en todo momento y durante todos estos años me ha brindado su apoyo, ayuda y comprensión incondicional, y a mis hijos, Beatriz Mariana y Pedro José, por su gran y desinteresada colaboración en todo momento.



# ÍNDICE GENERAL

---



RESUMEN.....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS .....	7
1.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	9
1.1.1. Penicilinas.....	10
Ampicilina.....	12
Amoxicilina.....	13
Oxacilina.....	15
Penicilina G (benzilpenicilina).....	16
1.2. Antibióticos macrólidos .....	17
Eritromicina.....	18
1.3 Usos y mecanismo de acción de los antibióticos.....	19
1.4 Reacciones adversas .....	23
2. PROBLEMÁTICA DEL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA.....	23
2.1. Antibióticos en la leche.....	26
2.2. Consecuencias del uso de antibióticos en animales.....	27
2.3. Legislación.....	27
3. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs).....	29
3.1 Síntesis de polímeros de impronta molecular.....	30
Moléculas molde o <i>template</i> .....	30
Monómeros funcionales.....	30
Entrecruzante.....	31
Iniciador.....	32
Disolvente porogénico o porogen.....	32
3.2 Proceso de preparación de los MIPs.....	33
Impresión covalente.....	33
Impresión no covalente .....	34
3.3 Mecanismo de la polimerización .....	35
Iniciación .....	35
Propagación .....	36
Terminación .....	36
3.4 Caracterización de los polímeros de impronta molecular.....	37
Caracterización química.....	37
Caracterización morfológica .....	38
Caracterización de los sitios de unión específica: isotermas de adsorción .....	39
3.5 Aplicaciones de los MIPs en Química Analítica.....	39
3.5.1 Aplicación de los MIPs como adsorbentes en extracción en fase sólida, SPE.....	40
4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	42
4.1. Preparación de la muestra.....	42
4.1.1. Empleo de MIPs.....	43
4.2 Métodos espectrofotométricos.....	45

4.3 Métodos inmunológicos .....	46
4.4 Biosensores.....	47
4.5 Otros métodos de detección.....	48
4.6 Métodos cromatográficos .....	48
4.6.1 Cromatografía de gases (GC) .....	48
4.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	49
5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	55
Exactitud.....	56
Precisión.....	57
Especificidad.....	57
Límite de detección.....	57
Límite de cuantificación.....	58
Linealidad.....	58
Rango.....	58
Robustez.....	58
Reproducibilidad.....	58
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>65</b>
III.A. DETERMINACIÓN DE ERITROMICINA EN MUESTRAS DE LECHE DE OVEJA.....	67
1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	71
1.1 Instrumentación y equipamiento .....	71
1.2 Reactivos .....	71
1.3. Disoluciones .....	71
1.4 Muestras .....	72
2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....	73
2.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular.....	73
2.2 Pretratamiento de las muestras de leche.....	73
2.3 Procedimiento cromatográfico de determinación y cuantificación de los antibióticos macrólidos.....	74
2.4 Optimización del método MISPE .....	74
2.5 Estudio de selectividad del método MISPE.....	74
3. RESULTADOS Y DISCUSION .....	76
3.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular.....	76
3.1.1 Síntesis y evaluación de los MIPs y NIPs .....	76
3.1.2 Optimización del MISPE.....	77
3.2 Análisis de las muestras de leche.....	79
3.3 Características analíticas del método .....	80
3.4 Estudio de selectividad .....	81
III.B. DETERMINACIÓN DE AMPICILINA EN MUESTRAS DE LECHE DE VACA .....	91
1. MATERIALES Y REACTIVOS .....	95
1.1 Instrumentación y equipamiento .....	95
1.2 Reactivos .....	95
1.3. Disoluciones .....	96



1.4 Muestras .....	97
<b>2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>99</b>
2.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular.....	99
2.1.1 Procedimiento de extracción de la molécula molde de los MIPs.....	100
2.1.2 Procedimiento de detección semicuantitativa/cualitativa de ampicilina en la disolución extractante .....	101
2.2 Caracterización de los polímeros sintetizados.....	102
2.3 Preparación y caracterización de los cartuchos de extracción en fase sólida. Metodología MISPE.....	102
2.4 Determinación de ampicilina en leche de vaca .....	105
2.5 Procedimiento cromatográfico de determinación y cuantificación de ampicilina .....	106
2.6 Estudio de selectividad del método MISPE.....	107
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>109</b>
3.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular.....	109
3.1.1 Síntesis de los MIPs y NIPs .....	109
3.1.2 Extracción de la molécula molde.....	112
3.2 Caracterización estructural de los polímeros sintetizados .....	112
3.2.1 Espectros IR de los componentes de la mezcla de polimerización .....	112
3.2.1 Espectros IR de los polímeros sintetizados.....	116
3.3 Caracterización analítica de los polímeros. Estudios de unión. Metodología MISPE.....	119
3.4 Metodología MISPE. Estudios de cuantificación de ampicilina.....	123
3.4.1 Determinación cromatográfica de ampicilina .....	123
3.4.2 Determinación del intervalo de linealidad para la ampicilina.....	124
3.4.3 Preparación y caracterización de cartuchos. Proceso MISPE (Uso de MIP3) .....	127
3.4.4 Proceso MISPE. Optimización de la composición del MIP.....	128
3.5 Determinación de ampicilina en muestras de leche .....	131
3.5.1 Desproteinización de la muestra .....	131
3.5.2 Extracción de la materia grasa.....	135
3.5.3 Extracción conjunta de grasa y de proteínas.....	137
3.6 Evaluación del método mediante adiciones estándar.....	143
3.7 Validación del método MISPE. Características analíticas .....	148
3.7.1 Intervalo de linealidad.....	148
3.7.2 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ) .....	150
Estudio de la preconcentración de la muestra .....	152
3.7.3 Precisión.....	160
3.7.4 Exactitud.....	161
3.7.5 Tiempo de vida del MIP.....	161
3.8 Estudio de selectividad del método MISPE.....	162
<b>III. CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>IV. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>223</b>
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMPICILINA.....	225
DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE AMPICILINA EN LECHE DE VACA COMPLETA PARA SU ANÁLISIS POR HPLC UTILIZANDO POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS EN CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	225



## SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACN: Acetonitrilo

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica

AMP: Ampicilina

Beta CC: Capacidad de Detección

C<sub>18</sub>: Octadecilsilano químicamente enlazado a Sílice Porosa

CC alfa: Límite de decisión

COVENIN: Comisión Venezolana de Normas Industriales

CV: Coeficiente de Variación

DAD: Arreglo de Diodo

DER: Desviación Estándar Relativa

DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva

EGDMA: Etilen Glicol Dimetacrilato

ERY: Eritromicina

FAO: Organismo de las Naciones Unidas para la Alimentación

FIR: Infrarrojo Lejano

FLD: Fluorescencia

FPT: Four-Plate Test (Prueba de las Cuatro Placas)

FT-IR: Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier

GV: Cromatografía de Gases

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IR: Infrarrojo

ISEC: Cromatografía de Exclusión Molecular Inversa

IVER: Ivermectina

JOS: Josamicina

*K<sub>d</sub>*: Constante cinética de desarrollo de la reacción

*K<sub>i</sub>*: Constante cinética de iniciación de la reacción

*K<sub>p</sub>*: Constante cinética de propagación de la reacción

LC-FDL: Cromatografía Líquida- Detección por Fluorescencia

LOD: Límite de Detección

LOQ: Límite de Cuantificación

MAA: Ácido Metacrílico

MIP: Polímero de Impronta Molecular

MIR: Infrarrojo Medio

MISPE: Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular)

MMA: Metacrilato de Metilo  
MMIP: Polímeros de Impronta Molecular Magnéticos  
MRL: Limite de Residuo Máximo  
MS: Espectroscopia de Masas  
NIP: Polímero No Impreso  
NIR: Infrarrojo Cercano  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe (Rápido, Fácil, Económico, Robusto, Seguro)  
R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación  
RMN: Resonancia Magnética Nuclear  
ROX: Roxitromicina  
RSD: Desviación Estándar Relativa  
SMIP: Spherical Molecular Imprinted Polymers (Polímeros de Impronta Esféricos)  
SPE: Extracción en Fase Sólida  
SPI: Espiramicina  
TFMAA: Ácido Trifluorometacrílico  
TLC: Cromatografía en Capa Fina  
TYL: Hemitartrato de tilosina  
UV: Ultravioleta  
 $\epsilon$ : Constante dieléctrica

Alcalosis hipo-potasémica: Aumento en la alcalinidad de los fluidos del cuerpo por pérdida de potasio

Anillo  $\beta$ -lactámico: Lactama de cuatro miembros, nombrada así porque el átomo de nitrógeno está unido al carbono  $\beta$  en relación con el carbonilo

Exantemas: Erupción cutánea que aparece en forma aguda

Gram-negativos: Bacterias que no se tiñen con la coloración de Gram

Gram-positivos: Bacterias que se tiñen con la coloración de Gram

Hipotónico: Solución con baja concentración de soluto

Reacciones de hipersensibilidad: Reacción excesiva de organismo a diversos agentes, que pueden ocasionar daños al organismo

*Template*: Molécula molde o plantilla

$\beta$ -lactamasa: Enzima producida por algunas bacterias responsable de la resistencia de éstas ante la acción de los antibióticos betalactámicos

# INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos .....	8
Tabla 2. Antibióticos beta-lactámicos y macrólidos usados en el ganado lechero (vaca, cabra, oveja) y sus límites máximos de residuos según la regulación de la <i>Unión Europea EU N° 37/2010</i> .....	28
Tabla 3.- Características analíticas típicas usadas en métodos de validación. ....	56
Tabla 4. Características de validación recomendadas de varios tipos de ensayos.....	59
Tabla 5. Recuperaciones de eritromicina (1 mL, 50 mg L <sup>-1</sup> ) obtenidas en los estudios de unión en diferentes disolventes: cloroformo, acetonitrilo y NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : ACN (70:30, pH 7). ....	77
Tabla 6. Características analíticas del método MISPE desarrollado. ....	81
Tabla 7. Estudio de selectividad. Porcentajes de recuperación obtenidos para los antibióticos macrólidos estudiados a tres niveles de concentración: Bajo nivel (JOS, SPI, IVER, TYL, 10 mg L <sup>-1</sup> y ERY, ROX, 100 mg L <sup>-1</sup> ), nivel medio (5:50 mg L <sup>-1</sup> ), nivel alto (2.5:25 mg L <sup>-1</sup> ). ....	82
Tabla 8. Composición de los polímeros sintetizados .....	110
Tabla 9. Composición molar de los polímeros sintetizados. ....	111
Tabla 10. Presencia o ausencia de ampicilina en las diferentes porciones. El signo negativo indica la no formación del complejo coloreado, y por tanto la ausencia de ampicilina en el extracto analizado. ....	120
Tabla 11. Presencia o ausencia de ampicilina en los diferentes eluatos en los polímeros impresos y no impresos MIP1-3 y sus correspondientes NIPs. ....	121
Tabla 12. Áreas de los picos obtenidas tras la medida de las disoluciones patrón. ....	124
Tabla 13. Análisis estadístico de la recta de calibración .....	126
Tabla 14. Resultados obtenidos en las diferentes eluciones, empleando el MIP3 en el proceso MISPE completo. Se muestra el valor medio de las dos determinaciones realizadas.....	128
Tabla 15. Porcentaje de ampicilina unido a los diferentes polímeros sintetizados. ....	129
Tabla 16. Recuperación de ampicilina obtenida tras la etapa de elución MISPE. Comparación entre MIPs y NIPs. ....	129
Tabla 17. Relación de unión MIP/NIP de los diferentes polímeros evaluados.....	130
Tabla 18. Resultados obtenidos de la ampicilina presente en los diferentes procedimientos de extracción utilizados.....	141
Tabla 19. Resultados de porcentajes de recuperación para los análisis realizados con adición de patrón (o estándar) con una muestra de leche de 5 gramos. ....	147
Tabla 20. Características del patrón sólido de ampicilina empleado para preparar la disolución madre. ....	148
Tabla 21. Áreas de pico obtenidas para las distintas concentraciones de ampicilina. ....	148
Tabla 22. Análisis estadístico de la recta de calibración .....	150
Tabla 23. Resumen del límite de detección y límite de cuantificación. ....	151
Tabla 24. Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE (MIP3) (100 % del analito). ....	157
Tabla 25. Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE 3 (80 % del analito) .....	158
Tabla 26. Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE 3 (120 % del analito).....	160
Tabla 27. Resumen de los valores obtenidos para las diferentes concentraciones del analito en la leche de vaca completa.....	161



# INDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructura química básica de las principales clases de antibióticos $\beta$ -lactámicos. La R representa las posiciones en las cuales se efectúan las sustituciones químicas en la síntesis de nuevos fármacos. ....	9
Figura 2. Estructura química básica de las penicilinas. ....	10
Figura 3. Ruta de degradación de la penicilina en condiciones ácidas y básicas. Tomado de <i>Deshpande, A. y cols. (2004)</i> . ....	11
Figura 4. Molécula de ampicilina. ....	13
Figura 5. Molécula de amoxicilina. ....	14
Figura 6. Molécula de oxacilina. ....	15
Figura 7. Molécula de bencilpenicilina (penicilina G) ....	16
Figura 8. Estructura química de la eritromicina. ....	19
Figura 9. Consecuencias de la exposición de una célula en crecimiento a antibióticos $\beta$ -lactámico. Tomado de <i>Talaro, K y col. (2002)</i> . ....	20
Figura 10. Síntesis de proteínas en el Ribosoma 50S bacteriano. ....	22
Figura 11. Monómeros funcionales típicos. ....	31
Figura 12. Entrecruzantes comúnmente empleados en la síntesis de polímeros de impronta molecular. ....	32
Figura 13. Principales pasos involucrados en la preparación de un polímero de impronta molecular. ....	33
Figura 14. Modelo de impresión covalente. ....	34
Figura 15. Modelo de impresión no covalente. ....	35
Figura 16. Procedimiento de extracción en fase sólida. ....	41
Figura 17. Recuperaciones de eritromicina obtenidas en las fracciones procedentes de la etapa de lavado, empleando diferentes disolventes, cuando se cargó en cartucho MISPE una disolución de 1 mL de eritromicina de 50 mg L <sup>-1</sup> en ACN. ....	78
Figura 18. Recuperaciones de eritromicina obtenidas en las fracciones procedentes de la etapa de elución, empleando diferentes disolventes y volúmenes cuando se cargó en cartucho MISPE una disolución de 1 mL de eritromicina de 50 mg/L en ACN. ....	79
Figura 19. Cromatogramas obtenidos para los 6 antibióticos macrólidos estudiados a un nivel de concentración de 50 mg L <sup>-1</sup> para ERY y ROX, 5 mg L <sup>-1</sup> para JOS, SPI, IVER y TYL: (a) Mezcla de patrones en acetonitrilo, (b) Eluato de muestra de leche obtenido tras el proceso MISPE desarrollado. Cromatogramas obtenidos a distintas longitudes de onda: (1) ERY y ROX a 210 nm; (2) SPI y JOS a 231 nm; (3) IVER a 254 nm y (4) TYL a 287 nm. ....	83
Figura 20. Preparación de los polímeros. ....	100
Figura 21. Desarrollo del color tras la reacción del compuesto FeCl <sub>3</sub> (medio ácido) y hexacianoferrato (III) de potasio con una disolución conteniendo ampicilina y una disolución blanco. ....	101
Figura 22. Preparación de las columnas MISPE. ....	102
Figura 23. Dispositivo a vacío, para llevar a cabo el proceso MISPE. ....	103
Figura 24. Acondicionamiento del polímero. ....	104
Figura 25. Carga del polímero con el antibiótico. ....	104
Figura 26. Lavado del polímero. ....	104
Figura 27. Elución del antibiótico de la columna MISPE. ....	105

Figura 28. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Dionex, Ultimate 3000) .....	106
Figura 29. Molienda y tamizado del polímero.....	111
Figura 30. Espectro FT-IR de la ampicilina. A) Procedente de la bibliografía (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds. SBDS. <a href="http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng">http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng</a> ), y B) obtenida en el laboratorio en esta investigación.....	113
Figura 31: Espectro FT-IR del etilenglicol dimetacrilato (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS). .....	114
Figura 32. Espectro FT-IR ácido metacrílico (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS). .....	115
Figura 33. Espectro FT-IR del metacrilato de metilo. (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS). .....	116
Figura 34. Espectro FT-IR para la ampicilina, MIP 3 antes del proceso de lavado/extracción de ampicilina (MIP 3 sin lavar) y después (MIP 3 lavado) y del NIP 3 .....	117
Figura 35. Espectros FT-IR de MIP 1, MIP 2 y MIP 3 tras el proceso de lavado/extracción de la molécula molde.....	118
Figura 36. Esquema del proceso de optimización de extracción con MISPE indicando los valores óptimos para cada una de las etapas implicadas.....	122
Figura 37. Cromatograma típico para la ampicilina .....	123
Figura 38. Curva de calibración de la ampicilina .....	125
Figura 39. Equipo de evaporación de la muestra.....	127
Figura 40. Esquema del proceso de análisis del antibiótico $\beta$ -lactámico utilizando el MISPE preparado con MIP 3. ....	131
Figura 41. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteización con 1 mL de ácido acético 1 N. ....	133
Figura 42. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteización con acetonitrilo. ....	134
Figura 43. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteización con una mezcla de ácido acético 1 N: acetonitrilo (2:8 v/v).....	135
Figura 44. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la eliminación de la grasa con hidróxido de sodio 0,5 M.....	136
Figura 45. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la eliminación de la grasa en frío. ....	137
Figura 46. Cromatograma obtenido para el eluato para la eliminación de la grasa con combinada con precipitación de proteínas y evaporación de la muestra con calor a 40 °C. ....	138
Figura 47. Cromatograma obtenido de la solución de elución con 2 mg Kg <sup>-1</sup> de ampicilina combinado con la extracción de grasas con precipitación de proteínas y adición de cloroformo. ....	139
Figura 48. Cromatograma obtenido de la solución de elución con 2 mg Kg <sup>-1</sup> de ampicilina combinado con la extracción de grasas en frío con precipitación de proteínas con ácido acético 1 N. ....	140
Figura 49. Esquema del proceso de extracción MISPE de la ampicilina de leche entera de vaca.....	142
Figura 50. Cromatograma obtenido del eluato de la leche sin fortificar con ampicilina (blanco) .....	144
Figura 51. Cromatograma obtenido para el eluato de la muestra enriquecido con 1 mL ampicilina de 2 ppm. ...	144
Figura 52. Cromatograma obtenido para leche fortificada con 1 mL de ampicilina 2 ppm, dividido en dos porciones y al que posteriormente se le añadió 1 mL de diluyente.....	145
Figura 53. Cromatograma obtenido para leche fortificada con 1 mL de ampicilina 2 ppm, dividido en dos porciones y al que posteriormente se le añadió 1 mL de ampicilina 2 ppm. ....	146
Figura 54. Curva de calibración de ampicilina. Rango de concentraciones comprendido entre 100-500 ppb.....	149
Figura 55. Cromatograma obtenido para 20 gramos de leche con adición de 0,4 mL de ampicilina 280 $\mu$ g Kg <sup>-1</sup> más 1 mL de ampicilina 280 $\mu$ g Kg <sup>-1</sup> al eluato. ....	152



Figura 56. Esquema del proceso de extracción de la ampicilina de la leche de vaca completa .....	154
Figura 57. Proceso de extracción en fase sólida para el análisis de ampicilina en leche de vaca completa, en concentraciones de $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .....	155
Figura 58. Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en leche).....	156
Figura 59. Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $3,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en leche). .....	157
Figura 60. Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $4,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en leche) .....	159
Figura 61. Porcentaje de recuperación de los distintos antibióticos estudiados aplicando el método MISPE (MIP3) específico para la ampicilina. ....	162



## RESUMEN

La leche es uno de los alimentos de mayor consumo a nivel mundial. Sin embargo, algunas enfermedades que afectan a los rumiantes pueden generar considerables pérdidas económicas a los productores de alimentos. Para controlar estas enfermedades se utilizan diferentes tipos de antibióticos y el uso de éstos ha generado la resistencia de los microorganismos contra algunos de los tratamientos. El uso de antibióticos en animales está sujeto a restricciones oficiales y los límites de residuos permitidos en la leche se encuentran en el orden de los  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . La presencia de antibióticos en la leche puede traer consecuencias indeseables a los consumidores, tales como el desencadenamiento de procesos alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, o desarrollo de organismos patógenos resistentes, en vista de lo cual deben realizarse análisis minuciosos antes de permitir su consumo. Por ello, es necesario disponer de técnicas de análisis de alta sensibilidad, para así detectar la presencia de trazas de antibióticos en el producto.

Actualmente, la determinación analítica de antibióticos se lleva a cabo empleando la cromatografía de líquidos de alta eficacia, y la cromatografía de gases, acopladas a distintos detectores (ultravioleta, electroquímico, masas...). Sin embargo, estas técnicas, por sí mismas, no proporcionan los límites de detección necesarios para cumplir con las exigentes regulaciones actuales, lo que hace que sea necesario el empleo de técnicas de concentración y/o limpieza previas a la separación y detección.

La leche, bien sea de vaca o de oveja, es una matriz biológica compleja, constituida por proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, entre otros, que a menudo afectan la separación y cuantificación analítica de los compuestos de interés. Por tanto, el análisis de un compuesto en una matriz compleja, como es la leche, frecuentemente requiere de una etapa de pre-tratamiento. Es la parte más lenta del proceso analítico y en la que se suelen cometer más errores, siendo considerada como el "cuello de botella" de los análisis químicos. Por este motivo, debe prestarse especial atención a la preparación de la muestra previa al análisis, en lo que se refiere a la extracción y preconcentración del analito o analitos de interés y a la limpieza de la misma.

La mayoría de los métodos existentes para la determinación de antibióticos en muestras de leche llevan implícita una etapa previa de tratamiento de la muestra, basada, generalmente en el uso de extracción líquido-líquido (*LLE, Liquid Liquid Extraction*) y extracción en fase sólida (*SPE, Solid Phase Extraction*), empleando diferentes tipos de adsorbentes para llevar a cabo la purificación de los extractos.

La mayoría de los adsorbentes utilizados para la SPE no tienen un comportamiento selectivo, reteniendo simultáneamente otros componentes presentes en la muestra, lo que impide alcanzar los límites de detección requeridos por la legislación vigente. En este sentido, la nueva tecnología de Polímeros de Impronta Molecular (*MIP, Molecularly Imprinted Polymers*) se está empleando

con éxito en la preconcentración y limpieza selectiva de distintos analitos. Esta técnica está basada en la creación de cavidades en una matriz polimérica altamente entrecruzada, que se corresponden con el tamaño y forma de la molécula molde (analito). El método conlleva la formación organizada de monómeros funcionales polimerizables alrededor de un analito de interés o molécula molde. Los complejos así formados quedan incorporados por polimerización a una matriz polimérica microporosa. La eliminación de la molécula molde deja grupos de monómeros funcionales en posiciones definidas en una disposición espacial que es complementaria a la estructura de la molécula molde original. Interacciones intermoleculares como enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo y de carácter iónico entre la molécula molde en una muestra en disolución y los grupos funcionales del MIP pueden conducir al proceso de reconocimiento específico molecular que causa la unión selectiva de la molécula molde o analito de interés.

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo de investigación se plantea solucionar dos problemas analíticos importantes, por un lado controlar la presencia de residuos de antibióticos y por otro minimizar el tratamiento de muestras en el análisis de productos lácteos. Así, esta Tesis se ha centrado en la optimización y puesta a punto de varios métodos analíticos para la determinación de antibióticos en muestras de leche haciendo uso de los polímeros de impronta molecular utilizados como fase adsorbente en cartuchos de extracción en fase sólida (*MISPE*, *Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*).

El trabajo experimental desarrollado puede dividirse en dos partes (A y B). La primera parte (A) se ha centrado en la determinación de un antibiótico de la familia de los macrólidos, la eritromicina, en muestras de leche de oveja. Se ha llevado a cabo la síntesis de varios polímeros de impronta molecular, utilizando diferentes procedimientos de polimerización, los cuales han sido convenientemente evaluados y caracterizados para ser utilizados como fase adsorbente en un sistema SPE.

El polímero que presentó los mejores resultados en lo que respecta a afinidad por la molécula de interés, eritromicina, ha sido empleado como sistema de extracción y limpieza selectiva del antibiótico seleccionado en muestras de leche de oveja. El método desarrollado fue validado en términos de linealidad, reproducibilidad, sensibilidad y límites de detección y cuantificación. El trabajo se finalizó evaluando la selectividad del MIP hacia la eritromicina, mediante un estudio de interferencias, en el que se trabajó con antibióticos macrólidos de estructura similar a la eritromicina. La detección analítica de la eritromicina se llevó a cabo utilizando la técnica de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con un sistema de detección UV-Vis con detector de diodos (DAD).

El desarrollo de la Parte A se ha llevado a cabo en colaboración con miembros del Grupo de Investigación del Departamento de Ciencias Analíticas de la UNED, GTyMAQ, el cual ha dado

lugar a un artículo, que actualmente ya ha sido publicado en la revista *Food and Chemistry Toxicology*, indexada en el *Journal Citation Reports (JCR)*, con un elevado índice de impacto, con lo que en esta memoria no se tratará en profundidad.

La segunda parte (B) de esta investigación también se ha llevado a cabo dentro del citado Grupo de Investigación, pero la parte experimental se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Biología y Química de la Facultad de Educación, de la Universidad Católica Andrés Bello en Caracas, Venezuela. La investigación se centra en el desarrollo de un nuevo sistema de tratamiento de muestra para la determinación del antibiótico ampicilina, de la familia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en muestras de leche de vaca. Se han sintetizado diversos polímeros de impronta molecular, variando los monómeros funcionales, sus concentraciones y la relación molar entre el monómero funcional y el entrecruzante. Como monómeros funcionales se utilizaron ácido metacrílico y metacrilato de metilo, como monómero entrecruzante se utilizó etilenglicol dimetacrilato, como solvente porogénico acetonitrilo, como molécula molde ampicilina y como iniciador peróxido de hidrógeno.

Los polímeros sintetizados fueron caracterizados físicamente por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), observándose que existe una semejanza en la estructura de la red entre el polímero de impronta molecular y el utilizado como blanco (polímero no impreso o NIP, Non Imprinted Polymer). Asimismo, se comprobó la polimerización con el entrecruzante por la aparición de la señal correspondiente al enlace del grupo C-O en todos los polímeros estudiados y la disminución de la señal correspondiente al enlace del grupo  $-C=C-$ .

La caracterización química de los polímeros se llevó a cabo mediante la evaluación de su capacidad para retener la molécula molde, empleándolos como fase adsorbente en el proceso de extracción en fase sólida.

Estos estudios demostraron que el polímero de impronta molecular obtenido utilizando como monómero funcional al ácido metacrílico y una relación monómero funcional/monómero entrecruzante de 1:5 presentó la mayor afinidad por la molécula molde. Se estudió también su afinidad hacia otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos con estructura similar a la ampicilina, como lo es la amoxicilina, la oxacilina y la penicilina G sódica, y se encontró que el MIP-ampicilina es prácticamente selectivo para el analito que fue sintetizado.

Finalmente, el polímero que presentó mayor afinidad con la ampicilina en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE), fue utilizado para la determinación de este compuesto en muestras reales de leche entera de vaca. Dada la complejidad de la matriz de la muestra, fue necesario llevar a cabo un tratamiento previo de la muestra, basado en la precipitación de proteínas y eliminación de la materia grasa empleando ácido acético y centrifugación en frío.

La determinación analítica de ampicilina se llevó a cabo, en ocasiones de forma cualitativa empleando el método basado en la formación del complejo coloreado azul de Prusia, y de forma cuantitativa, mediante la cromatografía líquida de alta resolución con detección en el ultravioleta (UV).

El método MISPE desarrollado fue validado en términos de linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y límites de detección y cuantificación.

Los resultados obtenidos mostraron que la columna MISPE desarrollada es capaz de preconcentrar el analito en la muestra hasta un total de 20 veces, retener al analito de la disolución y luego éste puede ser extraído de la misma, en concentraciones de 3,2., 4,0 y 4,8 ppb con un porcentaje de recuperación de alrededor del 100 %.

En estas condiciones, el límite de detección calculado siguiendo las directrices de la *Guidance for Industry de la FDA del 2001*, fue de 10,75  $\mu\text{g L}^{-1}$  y el límite de cuantificación de 35,83  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

En conclusión, se ha logrado obtener un polímero de impronta molecular, capaz de separar el analito de un extracto de leche entera de vaca, a la cual se le añadió cantidades conocidas de ampicilina. El método de análisis desarrollado para la determinación cuantitativa de la ampicilina presenta valores de linealidad, exactitud, precisión y límites de determinación y cuantificación que lo hacen apropiado para el análisis de la ampicilina en leche entera de vaca conteniendo valores menores al límite máximo permitido por la legislación vigente (4  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

## I. INTRODUCCIÓN

---





## 1. Características de los antibióticos

Los antibióticos son sustancias que se utilizan para tratar diversas infecciones tanto en humanos como en animales y tienen la propiedad de inhibir la proliferación de organismos infecciosos, en cuyo caso tendrán acción bacteriostática, o de eliminarlos, con lo cual se habla de acción bactericida. La acción antibacteriana de los antibióticos ocasiona un cambio en la capacidad de alimentarse y/o reproducirse de las células microbianas.

A nivel mundial se emplean diferentes tipos de antibióticos, siendo los más comunes los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos, los  $\beta$ -lactámicos y las sulfonamidas. En los últimos tiempos se ha ampliado el término para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan actividad bacteriana (*Stanier, R. 1996, Lilley, L. 1999*).

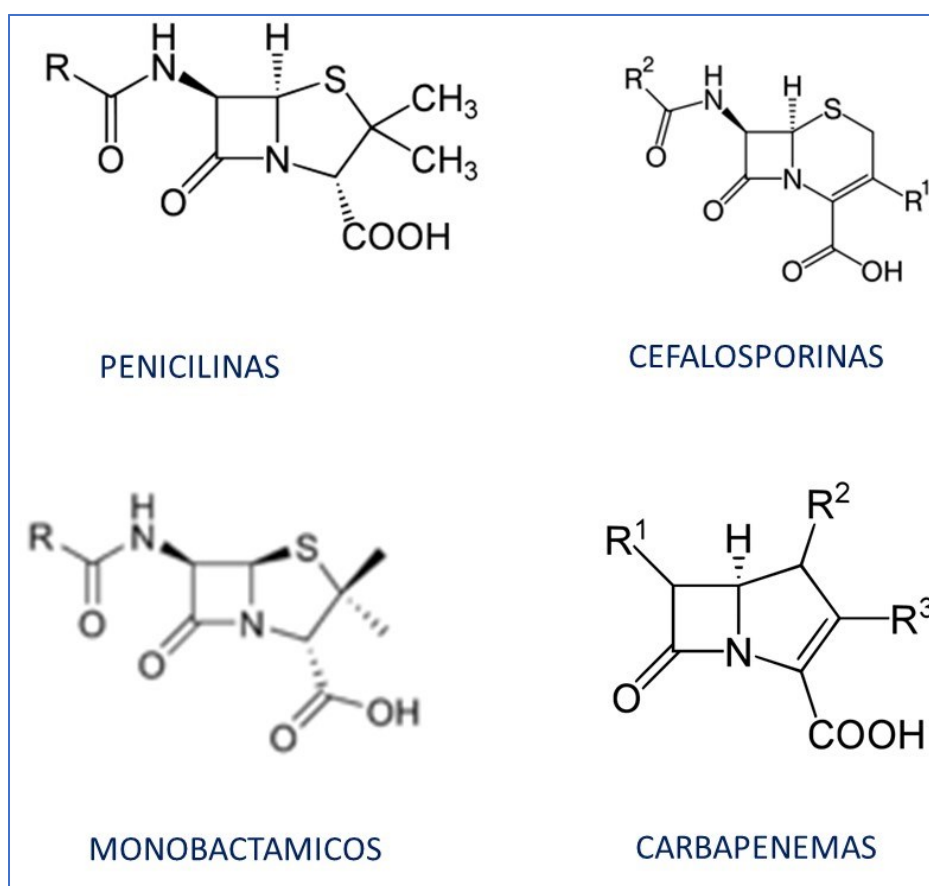
Dada la diversidad de antibióticos existentes, estos se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, según su origen, su modo de acción, su espectro de actividad, su estructura química, o incluso por generaciones (Tabla 1). En esta Tesis Doctoral se ha trabajado con antibióticos macrólidos y  $\beta$ -lactámicos, por lo que se dedicará especial atención a ambas familias en los siguientes apartados de la memoria.

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos

Según su origen	Según su modo de acción	Según su espectro de actividad	Según su estructura química	Por generaciones
<p>1. Derivados de aminoácidos: Cicloserina Cloranfenicol Penicilinas Cefalosporinas Gramicidina Tirocidina Bacitracina Polimixina Colistina Colistimetato Viomicina Capreomicina.</p> <p>2. Derivados de carbohidratos: Estreptomina Canamicina Neomicina Paromomicina Gentamicina Lincomicina Espectinomina</p> <p>3. Derivados del acetato y del propionato: Ácido fusídico Griseofulvina Macrólidos Poliénicos Tetraciclinas</p> <p>4. Otros: Novobiocina Puromicina Rifamicinas Ristocetina Estreptovarinas Vancomicina</p>	<p>1. Bacteriostáticos: Cloranfenicol Macrólidos Tetraciclina y sus derivados Doxiciclina</p> <p>2. Bactericidas: Amikacina Carbacefem Carbapenems Cefalosporinas Dibecacina Espectinomina Gentamicina Kanamicina Lincosaminas Monolactámicos Netilmicina Penicilina (dentro de los cuales están los <math>\beta</math>-lactámicos) Rifamicina Rifampicina Tobramicina Vancomicina</p> <p>3. Fungicidas: Anfotericina B Griseofulvina Nistatina</p> <p>4. Citostáticos: Adriamicina Daunomicina</p> <p>5. Antibióticos combinados</p>	<p>1. Espectro limitado: Penicilina Aminoglucósidos, aminociclotoles y polipéptidos: cocos gram negativos</p> <p>2. Amplio espectro: Tetraciclinas Cloranfenicol Macrólidos <math>\beta</math>-lactámicos Algunas cefalosporinas Quinolonas Carbapenémicos</p> <p>3. Espectro selectivo Carbenicilina, Piperacilina, Mezlocilina, Ticarcilina, Espectinomina, Imipenem, Tobramicina</p> <p>4. Activos frente a hongos: Poliénicos (como la anfotericina B, candidina, nistatina, tricomina) Amebicidas (fumagilina, paromomicina, puromicina)</p> <p>5. Antineoplásicos: Adriamicina Azaserina Mitomicina C Porfiromicinas Carcinofilina Sarcomicina Estreptonigrina Actinomocinas</p>	<p><math>\beta</math>-lactámicos</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Macrólidos</p> <p>Tetraciclinas</p> <p>Cloranfenicol y derivados</p> <p>Quinolonas</p> <p>Polipeptídicos</p> <p>Poliénicos</p> <p>Ansamicinas</p> <p>Antracoclinas</p> <p>Nucleósidos</p> <p>Glutarimida</p>	<p>1. Cefalosporinas de primera generación: Cefalotina, cefazolina y la cefalexina: activas contra la mayoría de las bacterias gram positivas y moderadamente eficaces contra las gram negativas</p> <p>2. Cefalosporinas de segunda generación: La Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol, cefactor, aumentan la actividad de las de primera generación sobre los estafilococos y son altamente eficaces contra las bacterias gram negativas</p> <p>3. Cefalosporinas de tercera generación: Aumentan la actividad frente a los microorganismos Gram-negativos</p> <p>4. Cefalosporinas de cuarta generación: Cefepima, puede poseer actividad antianaerobia</p>

## 1.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos constituyen una amplia familia de antibióticos que incluye diferentes grupos tales como penicilinas, cefalosporinas (de primera, segunda, tercera y cuarta generación), monobactamos, carbapenemos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (Marín, M. y col. 2003). La estructura química de estos antibióticos está definida por la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico, de ahí su nombre. Estos se presentan en la Figura 1 y constituyen la familia de medicamentos más ampliamente usada de entre los antibióticos disponibles, tanto en atención primaria y clínica como en veterinaria.



**Figura 1.** Estructura química básica de las principales clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La R representa las posiciones en las cuales se efectúan las sustituciones químicas en la síntesis de nuevos fármacos.

Para llevar a cabo la investigación de esta Tesis Doctoral se han utilizado antibióticos  $\beta$ -lactámicos pertenecientes al grupo de las penicilinas, pues ellos constituyen uno de los grupos de mayor importancia a nivel mundial. A continuación se tratan con detalle.

### 1.1.1. Penicilinas

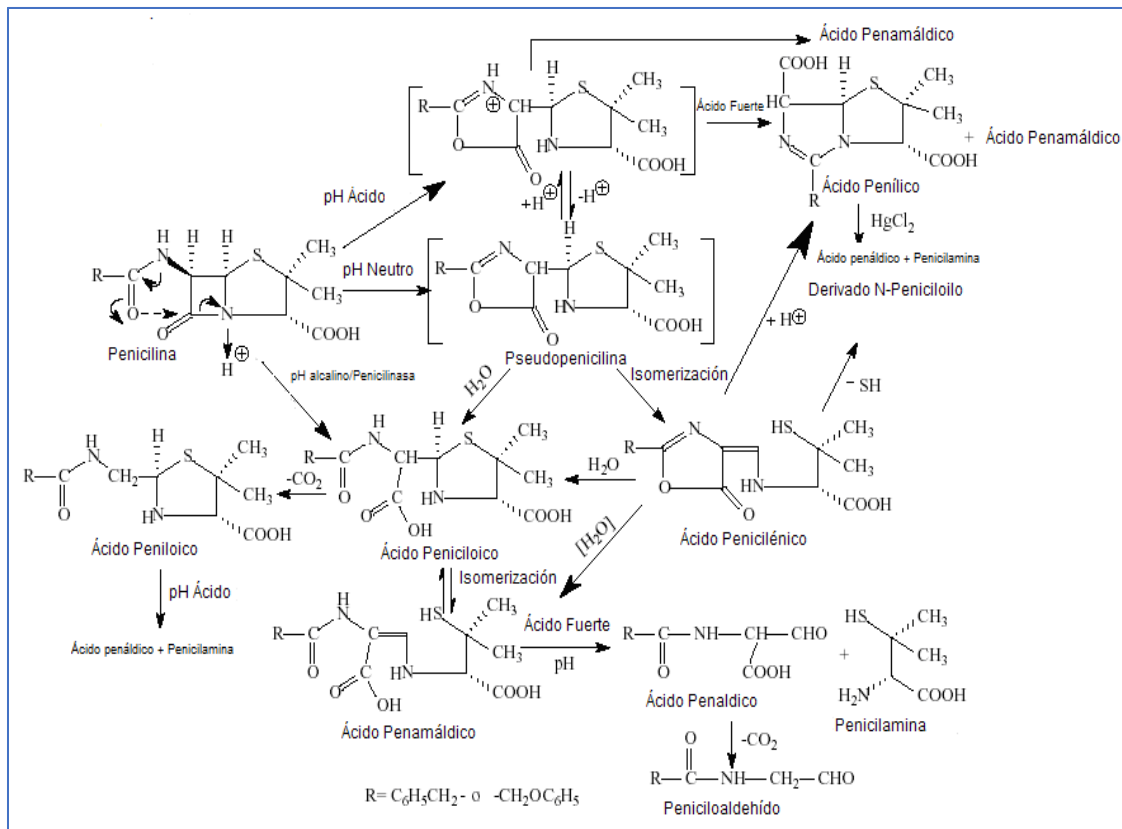
Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo  $\beta$ -lactámico y que es la que define sus propiedades. En la Figura 2, se presenta la estructura química básica de las penicilinas.



**Figura 2.** Estructura química básica de las penicilinas.

En el año 1928 Sir Alexander Fleming descubre la penicilina como resultado de estudios relacionados con estafilococos, los cuales se habían contaminado con un hongo del género *Penicillium*. A partir de 1939, comienzan las investigaciones relacionadas con la penicilina, y se observa la curación de ratones infectados originalmente con estreptococos, y a partir de este momento se extiende su aplicación a pacientes infectados con estafilococos, demostrándose incuestionablemente su actividad terapéutica.

En la Figura 3, se presenta el proceso de degradación de la penicilina en condiciones ácidas y básicas (Deshpande, A. y cols. 2004).



**Figura 3.** Ruta de degradación de la penicilina en condiciones ácidas y básicas. Tomado de *Deshpande, A. y cols. (2004)*.

Existe una gran diversidad de penicilinas, y estas se pueden clasificar en:

- Penicilinas naturales, entre las que se encuentran:

- Penicilina G acuosa, Procaínica, Clemizol, Benzatínica
- Penicilina V
- Fenitilina

- Penicilinas resistentes a betalactamasas:

- Meticilina
- Nafciclina
- Isoxazol penicilina, Cloxacilina, Dicloxacilina, Flucloxacilina, Oxacilina

- Aminopenicilinas

- Ampicilina
- Amoxicilina
- Bacampicina
- Ciclacilina
- Epicilina
- Hetacilina

- Pivampicina
- Talampicina
- Combinación con inhibidores de betalactamasas
  - Amoxicilina + ácido clavulámico
  - Ticarcilina + ácido clavulámico
  - Ampicilina + sulbactam
  - Piperacilina + tasabactam
- Carboxipenicilina
  - Carbenicillina
  - Ticarcilina
  - Indanil-carbenicilina
  - Carbecilina
- Ureidopenicilinas
  - Azlocilina
  - Mezlocilina
  - Piperacina
- Amidinopenicilinas
  - Amdinocilina
  - Pivamdinocilina

Actualmente el término *penicilina* se usa a menudo, en sentido genérico, para cualquiera de las variantes que derivan de la penicilina misma, en especial, la penicilina G o benzilpenicilina.

En esta investigación se ha trabajado con algunos de los antibióticos pertenecientes a esta familia, por ello se tratarán con detalle en los siguientes apartados de esta memoria.

## Ampicilina

La ampicilina es una amino-penicilina con actividad contra bacterias Gram positivas sensibles a la penicilina incluyendo *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp y *H. influenzae*. Sin embargo, muchas enterobacterias, *H. influenzae*, *salmonella* y *shiguella* producen  $\beta$ -lactamasas.

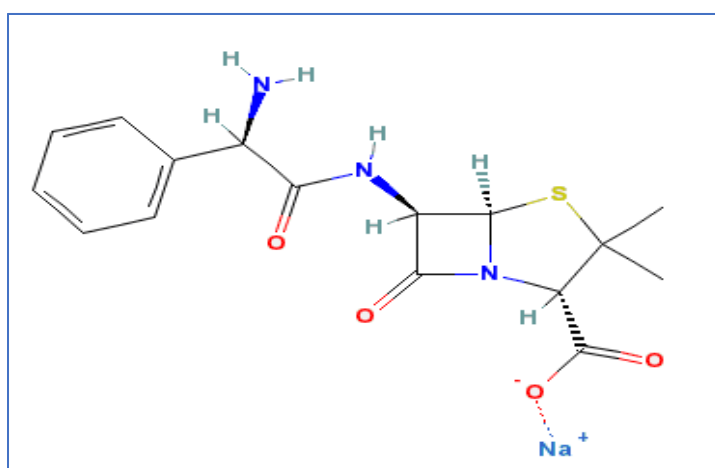
En general la ampicilina es un antibiótico de amplio espectro, utilizado en infecciones digestivas, infecciones del aparato respiratorio como por ejemplo la sinusitis y la bronquitis, infecciones urinarias, infecciones ginecológicas, infecciones de tejidos blandos, entre otras (*Guía de las*

*especialidades farmacéuticas en Venezuela, 2007*). Se utiliza en ganado bovino, ovino y caprino en infecciones genitourinarias, del tracto respiratorio, digestivo y problemas septicémicos causados por gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Es usada en vacas, ovejas y cabras en lactación, asociada con la cloxacilina en el tratamiento intramamario de infecciones subclínicas existentes y prevención de nuevas infecciones que puedan ocurrir durante el período de secado y que sean sensibles a la cloxacilina y ampicilina. Es ineficaz contra las *pseudomonas*, *enterobacter* y *proteus* indol positivos.

La ampicilina aparece en la bilis, sufre circulación enterohepática y se excreta en parte de las heces, sin embargo la mayor parte se excreta por los riñones.

La fórmula molecular de la ampicilina es  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  (anhidra) y su nombre químico es ácido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-fenilacetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico. Es un polvo cristalino, blanco, inodoro, poco soluble en agua y en metanol, e insoluble en benceno, cloroformo y tetracloruro de carbono.

La estructura de la molécula de ampicilina se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Molécula de ampicilina.

## Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de una aminopenicilina. Fue aprobada por primera vez en 1987. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos. No es estable frente a  $\beta$ -lactamasas, por lo que no debe usarse frente a infecciones por gérmenes productores de las mismas. Sin embargo, hay preparados comerciales con la adición de ácido clavulánico o sulbactam, que aumentan su estabilidad y amplían su espectro en esos casos. Por esto se emplea a menudo como primer medicamento en infecciones de diferente gravedad, tanto en

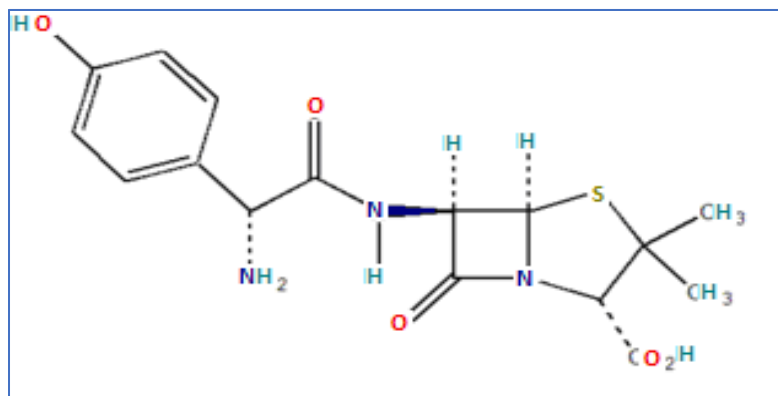
medicina como en veterinaria. Se utiliza por vía oral o parenteral, aunque la forma parenteral (intramuscular o intravenosa) no está aprobada en todos los países.

La amoxicilina es una aminopenicilina análoga a la ampicilina, con igual espectro antibacteriano y con mayor actividad contra determinadas especies microbianas, es empleada frecuentemente en los tratamientos para mastitis en vacas lecheras y para el control y tratamiento de enfermedades respiratorias, gastrointestinales, urogenitales e infecciones de piel y de tejidos blandos en bovinos, cerdos y equinos. Es importante determinar el período de descarte en leche para evitar riesgos toxicológicos.

Como todas las penicilinas puede provocar reacciones alérgicas severas o efectos secundarios como fiebre, náuseas, vómitos o diarrea.

La amoxicilina es un antibiótico  $\beta$ -lactámico, con fórmula molecular  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  (anhidra). Su nombre químico es: ácido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico. Es un sólido incoloro soluble en agua, metanol y etanol. Es insoluble en hexano, benceno, acetato de etilo y acetonitrilo. Es estable en disolución acuosa, a valores de pH comprendidos entre 3,5 – 6,0.

La estructura de la molécula de amoxicilina se muestra en la Figura 5



**Figura 5.** Molécula de amoxicilina.

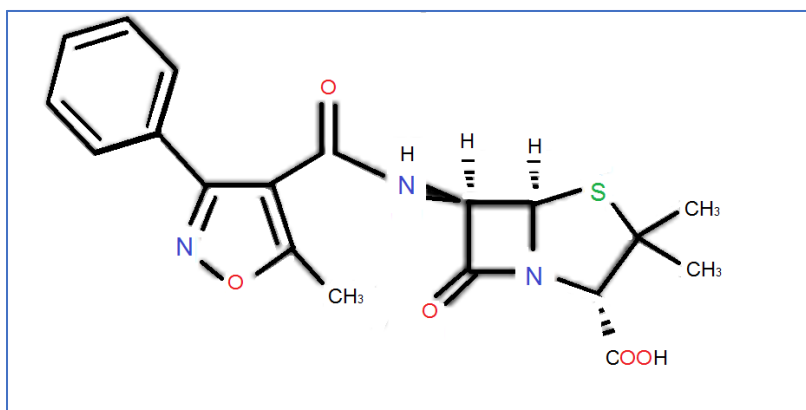


## Oxacilina

Es un antibiótico bactericida de amplio espectro, principalmente con acción contra gérmenes Gram-positivos, incluyendo cepas de estafilococo productoras de penicilinasas; es activo contra la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *estreptococo viridans*.

Está indicada en el tratamiento de infecciones respiratorias, genitourinarias, óseas, articulares, piel y tejidos blandos, ocasionadas por gérmenes susceptibles. Se emplea en animales productores de leche en la terapia de secado y en el control de la mastitis.

La fórmula química es  $C_{19}H_{18}N_3NaO_5S \cdot H_2O$  y su estructura se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Molécula de oxacilina

## Penicilina G (bencilpenicilina)

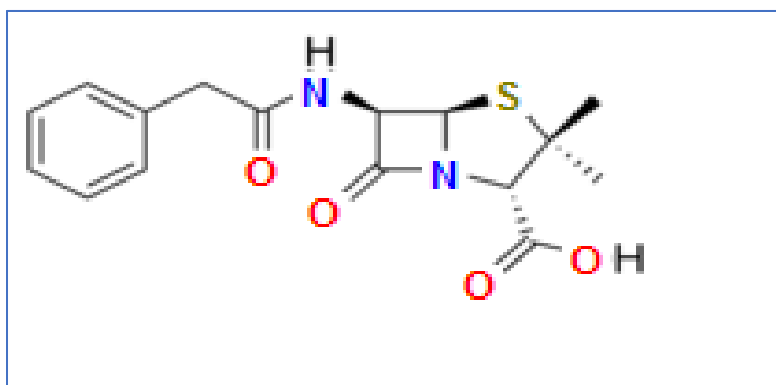
El término "penicilina" se usa a menudo en el sentido genérico para referirse a uno de los compuestos de más amplio espectro del grupo de las penicilinas en particular, penicilina G, también conocido como bencilpenicilina.

La penicilina G suele ser administrada por vía parenteral porque es inestable en el ácido clorhídrico del estómago. Debido a que el fármaco se administra parenteralmente, se pueden lograr altas concentraciones de penicilina G en tejidos con fenoximetilpenicilina. Estas concentraciones más altas se traducen en una mayor actividad antibacteriana.

Las indicaciones específicas para bencilpenicilina incluyen la celulitis, la endocarditis bacteriana, la gonorrea, la meningitis, la neumonía por aspiración, absceso de pulmón, la neumonía adquirida en la comunidad, la sífilis y la septicemia en niños. Se emplea en ganado vacuno, ovino, bovino, equino y porcino para tratar patologías tales como septicemias, laringitis, neumonías, bronconeumonías, nefritis, cistitis, metritis, adenitis equina, heridas infectadas, entre otras patologías.

Su fórmula molecular es  $C_{16}H_{18}N_2O_4S$  (anhidra) y su nombre químico: ácido 4-tia-1-azabicyclo (3.2.0) heptano-2-carboxílico,3,3-dimetil-7-oxo-6((fenilacetil)amino)-(2S-(2alfa, 5alfa, 6beta)). Es soluble en agua, metanol, dioxano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido. Es poco soluble en hexano, acetonitrilo y acetona e insoluble en tolueno, éter y cloroformo.

La estructura de la molécula de bencilpenicilina (penicilina G) se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Molécula de bencilpenicilina (penicilina G)

## 1.2. Antibióticos macrólidos

Los antibióticos macrólidos constituyen una familia de medicamentos naturales, semisintéticos y sintéticos, cuya estructura está caracterizada por la presencia de un gran anillo básico lactónico, una macrolactona (que da nombre al grupo) de 12 a 23 átomos de carbono, al que se une un azúcar aminado mediante enlaces glucosídicos. Las diversas sustituciones en dicho anillo han dado lugar a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos de carbono. De ahí su clasificación clínica más útil, que se indica a continuación:

- Macrólidos de 14 átomos
  - Eritromicina, oleandomicina, esporeamicina (naturales)
  - Claritromicina, roxitromicina, diritromicina, fluritromicina (semisintéticos)
- Macrólidos de 15 átomos
  - Azitromicina (semisintéticos)
- Macrólidos de 16 átomos
  - Espiramicina, josamicina, midecamicina, kitasamicina (leucomicina), tilosina, rosaramicina (naturales)
  - Rokitamincina, miocamicina (semisintéticos)

Los macrólidos son compuestos de carácter básico (son bases débiles), por la presencia de la agrupación dietilamino en el residuo de azúcar, que les concede capacidad para formar sales. Presentan poca solubilidad en agua, y tienen un aspecto cristalino e incoloro. Son estables en disoluciones neutras, pero en medio ácido se hidrolizan (por los enlaces glicosídicos) y en medio básico se saponifican los enlaces de lactona.

Los antibióticos macrólidos han sido empleados en medicina y veterinaria desde su descubrimiento en los años 50. Han sido utilizados en la Unión Europea como promotores del crecimiento en animales hasta el 1 de julio del año 1999, cuando la legislación prohibió el empleo de tilosina (antibiótico utilizado en veterinaria, pero no en humanos) como promotor del crecimiento, aunque continúa utilizándose con fines terapéuticos.

Tradicionalmente se ha considerado a los macrólidos como agentes bacteriostáticos, sin embargo pueden actuar también como bactericidas, en altas concentraciones y contra microorganismos susceptibles. Ejercen su actividad antimicrobiana al obstaculizar la vía de síntesis de proteínas en la bacteria, a nivel ribosómico, mediante la unión reversible a la subunidad 50S de los ribosomas. Los macrólidos que disponen de 14 y 15 átomos de C (eritromicina) se unen a la proteína L22 y actúan bloqueando el transporte del peptidil-RNA de

transferencia desde el lado dador (locus P) al aceptor (locus A); los que presentan un anillo de 16 átomos (espiramicina) se unen a la proteína L27 e impiden la formación de la cadena peptídica mediante la inhibición de la enzima que cataliza el enlace peptídico (peptidil transferasa). Este mecanismo de acción es compartido por otros grupos de antibióticos (por ejemplo, fenicoles o lincosaminas), por lo que pueden interferir con la acción de estos antimicrobianos.

Su efecto bactericida está relacionado con alteraciones de la pared celular provocadas por la disregulación de la síntesis proteica o la acumulación tóxica de aminoacil-ARN que induce la activación de autolisinas.

Son antibióticos de medio espectro que presentan actividad frente a cocos Gram-positivos y Gram-negativos, bacilos Gram-positivos y ciertos bacilos Gram-negativos como *Haemophilus*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *Moraxella*, *Eikenella* y *Brucella*. Son también activos sobre espiroquetas, algunos protozoos y algunas especies de *Rickettsia*, frente a *Chlamydia*, *Actinomyces* y ciertas especies de *Mycoplasma*, concretamente *M. pneumoniae* y *Ureaplasma*, pero no sobre *M. hominis*. La eritromicina posee una actividad elevada frente a *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, aunque en estos últimos años han ido apareciendo progresivamente resistencias frente a este último (Escobar, M. y cols. 1998).

La eritromicina es el antibiótico macrólido con el que se ha trabajado en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, por lo que se tratará en detalle a continuación.

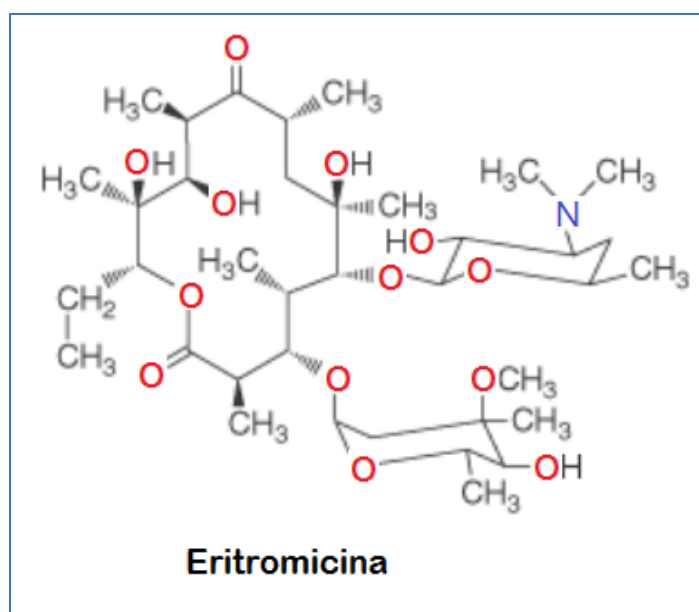
## Eritromicina

La eritromicina fue aislada por primera vez en el año 1952 por *Mc Guire, J. M y cols (1952)* en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythreus* obtenida en una muestra de suelo recogida en el archipiélago filipino. Su estructura fue determinada en 1957 por *Wiley, P. F y cols (1957)*. La molécula de eritromicina consta de una lactona de 14 átomos de carbono, denominada eritronólido, al que se une un amino azúcar, D-desosamina, en el C-5 y un azúcar neutro en el C-3 (L-clanidosa ó L-micarosa) como se muestra es la Figura 8. El complejo de eritromicina consta de seis moléculas denominadas eritromicina A, B, C, D, E y F. Excepto la eritromicina E y F, el resto son intermediarios de la síntesis de eritromicina A, que es la forma más activa frente a patógenos comunes (*Portillo, A. y col 2002*).

La eritromicina es el antibiótico macrólido más antiguo y aún el más importante, debido a que constituye una útil alternativa a la penicilina G. Es uno de los antibióticos disponibles más seguro. Es el fármaco más utilizado para las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, neumonía y difteria por *Legionella*, neumonía y conjuntivitis por *Chlamydia trachomatis* y para la angiomatosis bacillar. Hasta 1997, era el antibiótico alternativo a la amoxicilina; sin embargo, en las últimas recomendaciones de la Sociedad América del Corazón la eritromicina ha sido reemplazada por

los nuevos macrólidos azitromicina y claritromicina, cefalosporinas y clindamicina, debido a la intolerancia de ésta y a la dificultad de monitorización (debido a los impredecibles niveles en suero). (Omura, S. 2002). En la práctica veterinaria está indicada para los casos de infecciones producidas por *Staphylococcus* y *Streptococcus* (como primera opción) y *Corynebacterium sp.* *Mycoplasma sp.* *Escherichia Coli*, *Haemophylus sp.*

La eritromicina se absorbe rápidamente (mejorándose la absorción en ayunas) en la parte superior del intestino delgado; penetra y difunde en casi todos los tejidos, excepto en el encéfalo y líquido cefalorraquídeo. Penetra al líquido prostático y atraviesa la barrera placentaria, encontrándose también en la leche materna, donde llega a concentraciones que son aproximadamente el 50% de la plasmática; sin embargo, no es teratógena y alcanza, además, bajas concentraciones urinarias (2-5%). Se concentra fundamentalmente en el hígado y se excreta por la bilis (en concentraciones 10 veces mayores que las del plasma), aumentando su concentración de forma proporcional a las dosis administradas. La vida media normal es de 1,4 horas, pero las concentraciones en suero permanecen por 6 horas. La mayor parte de la droga es inactivada por desmetilación hepática; no es eliminada por diálisis peritoneal ni por hemodiálisis.



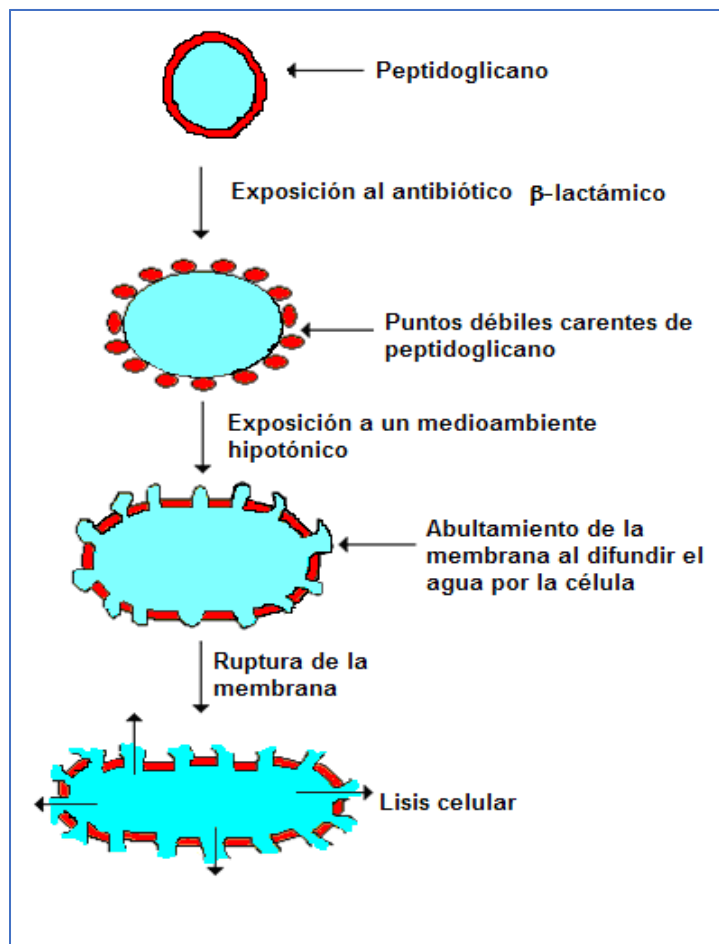
**Figura 8.** Estructura química de la eritromicina

### 1.3 Usos y mecanismo de acción de los antibióticos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, debido a su escasa toxicidad y amplio espectro de actividad, son compuestos muy útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico (Marin, M y col, 2003). Las vías de actuación contra las bacterias son las siguientes: (a) inhibición

de la biosíntesis de la pared celular; (b) inhibición de la síntesis de proteínas; (c) inhibición de la síntesis de ácido nucleico o (d) inhibición de la biosíntesis de ácido fólico (Talaro, K y col 2002).

Las paredes celulares de la mayoría de las bacterias contienen un cinturón rígido de peptidoglicano, el cual protege a la célula contra la ruptura desde medios ambientes hipotónicos. Las células activas deben sintetizar constantemente nuevos peptidoglicanos y transportarlos a un lugar adecuado en la cobertura de la célula. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas) se enlazan con las transpeptidasas, las enzimas requeridas para completar este proceso, causando que la célula desarrolle puntos débiles en los sitios de crecimiento y se haga frágil osmóticamente, por lo que en circunstancias normales, la diferencia de presión osmótica dentro de la célula comparada con la exterior, destruye la célula, como se muestra en la Figura 9. Es esencial notar que la mayoría de estos antibióticos son activos solo en células jóvenes en crecimiento, porque las células viejas inactivas o aletargadas no sintetizan el peptidoglicano (Talaro, K y col. 2002).



**Figura 9.** Consecuencias de la exposición de una célula en crecimiento a antibióticos  $\beta$ -lactámico. Tomado de Talaro, K y col. (2002).

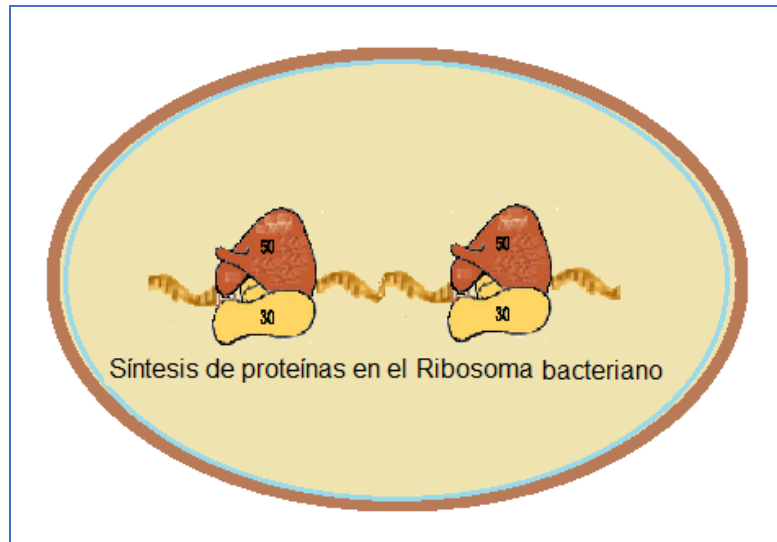
La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano, este está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente, como en los Gram-negativos o mediante un pentapéptido de glicina como en los Gram-positivos. Los  $\beta$ -lactámicos inhiben esta unión o transpeptidación, que es la última etapa de la síntesis de la pared celular. Debido a esto la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Es por esto que para que actúen los  $\beta$ -lactámicos, las bacterias deben encontrarse en la fase de multiplicación, pues es en ese momento cuando se sintetiza la pared celular. Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular gruesa y compuesta principalmente de dicha proteína, en cambio las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa de peptidoglucano.

El espectro de los  $\beta$ -lactámicos incluye bacterias Gram positivas, Gramnegativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. A lo largo de los años, su espectro se ha ido ampliando y se han incorporado nuevas moléculas que le dan mayor actividad frente a bacilos Gram-negativos, sin embargo la aparición de microorganismos resistentes a éstas ha limitado su empleo y eficacia en casos específicos.

Cuando los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se administran de forma intravenosa, suelen alcanzar rápidamente concentraciones plasmáticas elevadas. Poseen una amplia distribución corporal, con valores séricos y tisulares adecuados, incluyendo bilis y líquido sinovial. Como son sustancias poco lipofílicas, su penetración intracelular es escasa, no alcanzando casi nunca concentraciones mayores del 25 – 50 % de las concentraciones plasmáticas.

El metabolismo de la mayoría de  $\beta$ -lactámicos es casi nulo, manteniéndose en forma activa hasta su eliminación renal, es por ello que están indicados en las infecciones del tracto urinario. En algunos preparados predomina la excreción por vía biliar (cefoperazona, ceftriaxona). Muy pocos sufren metabolismo, como la desacetilación (cefalotina, cefotaxima) o la inactivación por las hidroxipeptidasas renales (imipenem).

Con respecto a los antibióticos macrólidos, éstos actúan al inhibir la síntesis proteica de los microorganismos sensibles, uniéndose reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano pero no a los ribosomas de células de mamíferos (*Gaynor, M y col., 2003., Kannan, K y col. 2011*) (Figura 10).



**Figura 10.** Síntesis de proteínas en el Ribosoma 50S bacteriano

Son activos contra microorganismos Gram-positivos tanto cocos (excepto estafilococos resistentes a meticiina y *Enterococcus spp.*) como bacilos (*Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Listeria*, *Rhodococcus equii*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*). Actúan también contra algunos microorganismos Gram-negativos (*Moraxella spp.*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus ducreyi*, *Gardnerella vaginalis*), microorganismos de crecimiento intracelular o yuxtacelular (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiaspp.*, *Legionella spp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*), y algunos protozoos son moderadamente sensibles (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Plasmodium*). La mayoría de los bacilos Gram-negativos (BGN), incluidos algunos microorganismos anaerobios (*Bacteroides spp.* y *Fusobacterium spp.*), son resistentes, entre otros motivos por impermeabilidad de la pared bacteriana a la difusión del macrólido (Cobos-Trigueros, y cols 2009).

Se han observado algunos mecanismos de resistencia de los microorganismos a estos antibióticos tales como impermeabilidad a la pared celular, inactivación enzimática bacteriana hidrolizando el anillo lactónico y alteración en el sitio de unión del antibiótico debido a mutaciones.

Los macrólidos generalmente son bacteriostáticos, sin embargo pueden ser bactericidas, dependiendo de factores tales como tipo de microorganismo, concentración del antibiótico y tiempo de exposición.



## 1.4 Reacciones adversas

Algunos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos pueden dar reacciones adversas. Así, por ejemplo, las penicilinas poseen menor toxicidad que cualquier otra droga. El efecto colateral más importante consiste en las reacciones de hipersensibilidad, que es el efecto adverso más frecuente y hace que las penicilinas sean la causa más común de alergia por drogas.

Las manifestaciones alérgicas incluyen rash maculopapular o urticarial, fiebre, broncoespasmo, enfermedad del suero, dermatitis exfoliativa, anafilaxia.

Lo más frecuente es la irritación local y el dolor en el sitio de la inyección. Si las concentraciones son muy altas puede dar tromboflebitis. Grandes dosis vía oral pueden dar trastornos gastrointestinales (diarrea, náuseas, vómitos) que son más frecuentes en las penicilinas de amplio espectro.

La meticiclina puede causar nefritis, la carbenicilina puede causar alcalosis hipo-potasémica y aumento de transaminasas en plasma. La ampicilina causa frecuentemente exantemas de naturaleza no alérgica.

Con relación a los macrólidos, por lo general son relativamente atóxicos, en ocasiones, los pacientes tratados con eritromicina presentan trastornos digestivos, náuseas, vómitos, anorexia, meteorismo, dolor epigástrico y diarreas.

La claditromicina, causa ocasionalmente náuseas, diarreas, dolor abdominal y cefalea y no debe indicarse en pacientes embarazadas.

La azitromicina puede causar intolerancia gastrointestinal y se ha observado erupciones, ictericia colestática y anomalías en las pruebas de función hepática.

## 2. Problemática del uso de los antibióticos en veterinaria

Los antibióticos comenzaron a utilizarse en veterinaria después de haber sido probada su eficacia en la salud humana. Se emplean en el tratamiento de los animales productores de alimentos para tratar o para prevenir las enfermedades. Así, durante años, los antibióticos se han utilizado a nivel mundial para el tratamiento de animales enfermos. Generalmente, en producción animal se coloca a un gran número de ellos en espacios reducidos, bien sea por razones medioambientales o económicas. Por ello, cuando un animal se enferma puede contagiar rápidamente a todos los animales cercanos a él, ocasionando serios problemas en la productividad, por lo que a menudo es más eficaz tratar a grupos enteros de animales, medicándolos a través del alimento o del agua (*Knobler, S. 2003*).

Una vez aplicado el medicamento y haberse curado el animal o grupo de animales, es necesario que se espere un tiempo determinado para poder destinar sus productos al consumo humano, conocido como periodo de supresión. Generalmente, el período de supresión para los animales productores de alimentos no deberá ser inferior a siete días para los huevos y la leche, 28 días para las carnes de aves de corral y mamíferos, grasa y menudillos incluidos, y 500 grados/día para las carnes de pescado (p.ej si la temperatura media del agua es de 10 °C, el tiempo de espera será al menos de 50 días) (*RD 109/1995 del 27 de enero*). Este período puede cambiar si el medicamento veterinario lo indica específicamente para las especies que trate.

Dado que la gran variedad de antibióticos existentes en la actualidad permite el tratamiento de infecciones bacterianas tanto de animales como de humanos, es necesario que se cumpla rigurosamente el período de supresión del medicamento en los animales productores de alimentos, para evitar así que los humanos ingieran el medicamento o sus metabolitos.

Uno de los problemas fundamentales del empleo de antibióticos en veterinaria es su uso a nivel subterapéutico (promoción de crecimiento, eficacia alimentaria y uso profiláctico). En los años 40 se descubrió que bajas concentraciones de antibióticos podían mejorar el índice de crecimiento en animales domésticos, y a partir de entonces, diversos compuestos antibacterianos se han venido utilizando ampliamente como promotores del crecimiento en producción animal.

Los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la microflora intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. También reducen la concentración de sustancias tóxicas que retardan el crecimiento y disminuyen la destrucción y competencia por nutrientes en el tracto gastrointestinal entre el huésped y la flora normal. Como consecuencia de ellas, hay una mejora en la productividad y una reducción en la mortalidad de los animales. (*Torres, C y cols., 2004, Prescott, J. y cols., 2000*).

Los antibióticos promotores del crecimiento se adicionan por lo general en el pienso de los pollos, pavos, cerdos y ganado vacuno en bajas concentraciones que se encuentran en un rango entre 2,5 y 125 mg Kg<sup>-1</sup> de pienso dependiendo del agente y de las especies tratadas.

*Torres, C., y col. (2002)*, señalan que debido a que a mediados de la década de los noventa se observaron cepas de microorganismos resistentes a diversos antibióticos, la Unión Europea decidió en 1999 prohibir el uso de espiramicina, tilosina, virginamicina y bacitracina, y continuar con la prohibición de la avoparcina, quedando disponibles como promotores de crecimiento la avilamicina, el flavofosfolipol, la monensina sódica y la salinomicina. Sin embargo, estos investigadores señalan que en Estados Unidos están autorizados como promotores del crecimiento, antibióticos que son utilizados en humanos como la penicilina, clortetraciclina,

eritromicina, estreptomina, bacitracina y espectinomicina, y antibióticos con estructuras similares a otros usados en humanos como la tilosina y virginiamicina.

A partir de enero de 2006 la Unión Europea prohibió el uso en alimentación animal de antibióticos promotores de crecimiento y solo está permitido añadirlos en los piensos con propósitos veterinarios. En Estados Unidos, el uso de antibióticos aún está aprobado y regulado de acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA), sin embargo la Veterinary Feed Directive (VFD) aprobada el 2 de junio del 2015, describe el proceso de autorización de uso de drogas VFD (medicamentos para animales destinados a ser utilizados en o sobre los piensos que requieren la supervisión de un veterinario con licencia). Además proporciona a los veterinarios en todos los estados un marco para la autorización del uso de antimicrobianos de importancia médica en la alimentación cuando sea necesario para los fines específicos de salud animal. Este hecho es precisamente lo que hace que su uso en alimentos para animales este causando que los seres humanos desarrollen enfermedades bacteriales e infecciones que no son tratables por los antibióticos comunes porque sus células han mutado para hacerse resistentes a los efectos de los antibióticos (Doyle, M. E. 2001).

El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en Venezuela es bastante extendido, en un estudio efectuado por Molero-Saras, G. y cols (2007), evaluaron residuos de enrofloxacin en canales de pollos procedentes de cuatro plantas beneficiadoras en el Municipio San Francisco, ubicado en el Estado Zulia y encontraron un uso generalizado de antibióticos y una preferencia por la enrofloxacin (51%). Esto es debido a su supuesta doble acción profiláctica (promotor de crecimiento) y terapéutica.

También encontraron niveles importantes de los metabolitos (enrofloxacin y ciprofloxacina) en dos de las cuatro plantas estudiadas, lo que sugiere el incumplimiento del tiempo de retiro del medicamento, previa salida de las aves al matadero. Por otra parte, Ríos-Fuenmayor, G. y cols (1992) hicieron un estudio para evaluar el uso de antimicrobiales tales como Lincospectin, Mecadox, Olaquinox y CSP-250 como promotores del crecimiento en cerdos de las razas Yorkshire y Landrace, para evaluar la tasa de crecimiento, y características cuantitativas y cualitativas del canal. Como resultado, encontraron que el grado de marmorización fue menor para las hembras, las cuales obtuvieron mayores pesos y rendimientos en cortes magros y menor porcentaje de recortes de grasa.

Con relación a la alimentación de terneros, Hernández, J. y cols (2007), estudiaron terneros para evaluar "in vivo" las repercusiones que tiene la adición de malato sódico sobre parámetros del medio interno, comparándolos con los resultados obtenidos al aplicar monensina sódica. Los autores encontraron que la utilización de malato sódico como alternativa a la monensina en raciones de terneros cuya base alimenticia es el alto consumo de pienso, se presenta como una

buena opción ante la futura prohibición del uso de los antibióticos, aun cuando señalan que se requieren mayores estudios.

## 2.1. Antibióticos en la leche

Los antibióticos representan el grupo más importante de factores inhibitorios externos en la leche. En la producción intensiva de ganado lechero, el problema que mayores pérdidas económicas produce es la mastitis, la cual es una enfermedad que algunos investigadores definen como un síndrome de etiología multifactorial, en la que están involucrados factores de higiene, manejo, prevención y sanidad. A pesar de los grandes avances tecnológicos en la industria lechera, y aún en las explotaciones con mayor tecnología e incluso en hatos donde se han logrado controlar microorganismos patógenos contagiosos causantes de mastitis, se presenta esta enfermedad. Este problema se hace más complejo debido a que las bacterias involucradas han desarrollado resistencia contra algunos de los tratamientos y el uso de los antibióticos está sujeto a restricciones oficiales.

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, y las principales causas de la enfermedad son la infección por bacterias invasoras u otros microorganismos (hongos y virus), a pesar de que el estrés y las lesiones físicas pueden causar la inflamación de la glándula. Entre las bacterias que pueden causar mastitis, se encuentra el *Streptococcus agalactiae*, sensible a antibióticos penicilínicos.

El objetivo de la terapia contra la mastitis es curar rápidamente la enfermedad, evitar el daño a la glándula y la diseminación de la infección, así como permitir la venta de leche libre de residuos. Se debe respetar estrictamente el tiempo de retiro de la leche para cada antibiótico, los cuales deberán estimarse para cada presentación comercial.

Las cualidades nutritivas de la leche y de los productos lácteos son ampliamente conocidas pero, desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original. Entre los aditivos alimentarios se encuentran los antibióticos en la categoría de conservadores.

Entre los antibióticos utilizados en los alimentos de origen lácteo, se encuentran: la nisina (usada en la conservación de quesos procesados), la cual destruye la membrana citoplasmática de *Clostridium* y bacterias butíricas, y la piramicina (empleada en la recubierta de quesos).

Para evitar que los antibióticos o sus metabolitos lleguen al consumidor, existen normativas de supresión del medicamento en los animales antes de la obtención de la leche. En el *Manual Merck de Veterinaria (2000)*, se indican diferentes períodos de supresión del fármaco y de

descarte de la leche para algunos antibióticos  $\beta$ -lactámicos, señalando que éstos varían dependiendo de la especie animal y del antibiótico.

## 2.2. Consecuencias del uso de antibióticos en animales.

El uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano, proporciona beneficios al consumidor, pues es posible encontrar más fácilmente proteínas de origen animal para su alimentación. No obstante, es posible que residuos de estos fármacos o sus metabolitos no sean eliminados del animal o de sus subproductos, y pasen a los seres humanos. Por otra parte, estos antibióticos pueden verse sin control como sustancias de desecho de las granjas agrícolas y ganaderas, lo que ocasionaría problemas de contaminación ambiental.

Dentro de las consecuencias indeseables se pueden citar:

- Desencadenamiento de procesos alérgicos
- Reacciones de hipersensibilidad
- Cambios en el comportamiento de la flora gastrointestinal
- Reducción en la síntesis de vitaminas en el hombre así como efectos tóxicos directos
- Residuos de antibióticos en concentraciones superiores a los límites permitidos, los cuales pueden dar lugar a problemas legales
- Imposibilidad de producir derivados lácteos debido a la inhibición de los procesos de fermentación por los antibióticos, interfiriendo en cultivos iniciadores de derivados lácteos, como por ejemplo en la fabricación de quesos y de yogurt
- Desarrollo de microorganismos patógenos resistentes
- Desarrollo de resistencias bacterianas tanto en los animales como en el hombre
- Problemas de contaminación ambiental.

La industria lechera debe ofrecer al consumidor un producto en óptimas condiciones de calidad, en tal sentido que la leche destinada al consumo humano debe estar libre de cualquier tipo de alteración, adulteración y contaminación.

## 2.3. Legislación

Los residuos de medicamentos en leche han originado discusiones relacionadas con la legislación sanitaria de los alimentos. Organismos internacionales tales como la FAO (*Organismo de las Naciones Unidas para la Alimentación*) y la OMS (*Organización Mundial de la Salud*), han establecido límites máximos de residuos (MRL, *Maximun Residues Limit*) de medicamentos presentes en la leche, con el propósito de evitar que se comercialice leche contaminada con estos compuestos en concentraciones mayores a las permitidas.

En la Tabla 2 se presentan los valores de MRL establecidos por la regulación de la *Unión Europea EU N° 37/2010* para algunos de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y macrólidos más utilizados, tanto en leche como en otros tejidos.

**Tabla 2.** Antibióticos beta-lactámicos y macrólidos usados en el ganado lechero (vaca, cabra, oveja) y sus límites máximos de residuos según la regulación de la *Unión Europea EU N° 37/2010*

Sustancia farmacológicamente activa	MRL ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) *				
	Leche (todas las especies)	Músculo (todas las especies)	Grasa (todas las especies)	Hígado (todas las especies)	Riñón (todas las especies)
<b>Antibióticos beta-lactámicos</b>					
Ampicilina	4	50	50	50	50
Amoxicilina	4	50	50	50	50
Bencilpenicilina (Penicilina G)	4	50	50	50	50
Cefapirina (suma de cefapirina y desacetilcefapirina) (Solo Bovinos)	60	50	50	-	100
Cefalexina (Solo Bovinos)	100	200	200	200	1000
Cloxacilina	30	300	300	300	300
Dicloxacilina	30	300	300	300	300
Oxacilina	30	300	300	300	300
<b>Antibióticos macrólidos</b>					
Eritromicina	40	200	200	200	200
Espiramicina (suma de espiramicina y neoespiramicina) (Solo Bovinos)	200	200	300	300	300
Tilmicosina	50	50	50	1000	1000
Tilosina	50	100	100	100	100

\* Cantidades máximas (MRL) de antiinfectivos permitidos en leche, músculo, grasa, hígado y riñón

En Venezuela, la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), creada en 1958, es el organismo encargado de programar y coordinar las actividades de normalización y calidad para la industria. Para llevar a cabo el trabajo de elaboración de normas, la COVENIN constituye Comités y Comisiones Técnicas de Normalización, donde participan organizaciones gubernamentales y no-gubernamentales.

En lo referente a la leche, la Norma venezolana COVENIN 903-93 define la leche cruda o "leche" sin otro calificativo, como "producto íntegro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e

ininterrumpido de vacas sanas. Deberá estar limpia y libre de materias o sustancias ajenas a su naturaleza tales como conservadores y colorantes”.

Con relación a las sustancias conservadoras, la Norma venezolana COVENIN 1200-81, las define como “aquellas tales como antisépticos, anti fermentadores, antibióticos bactericidas, preservativos, inhibidores, neutralizantes, etc., que tienen por finalidad conservar los alimentos, es decir impedir alteraciones (fermentación, enmohecimiento, putrefacción, etc.)”. En la Norma venezolana COVENIN 903-93 (LECHE CRUDA), se establece que la determinación de las sustancias conservadoras en la leche debe realizarse según la Norma Venezolana COVENIN 1200, y que dichas sustancias deben dar un resultado negativo en el análisis.

### 3. Polímeros de Impronta Molecular (MIPs)

Una tecnología emergente llamada impresión molecular, conduce a la elaboración de polímeros sintéticos altamente estables, llamados polímeros de impronta molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*), que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo debido a que los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero son complementarios al analito en la forma y posición de los grupos funcionales. Algunos de estos polímeros, tienen altas selectividades y constantes de afinidad, comparables con los sistemas de reconocimiento que ocurren naturalmente tales como anticuerpos monoclonales o receptores, los cuales los hacen especialmente adecuados como constituyentes en sensores químicos (biomiméticos) para la Química Analítica.

El reconocimiento molecular entre un receptor (anfitrión) y un sustrato (invitado) en una matriz conteniendo moléculas relacionadas estructuralmente requiere discriminación y enlazamiento; esto puede ocurrir solamente si los sitios enlazantes del anfitrión y las moléculas invitadas se complementan unas con otras en tamaño, forma, y funcionalidad química. Los sistemas biológicos, tales como enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno, y sistemas de hormona-receptor, demuestran propiedades de reconocimiento molecular que se han desarrollado por selección natural.

La impresión molecular es un método poderoso para preparar sitios de reconocimiento sintético con selectividad predeterminada para varias sustancias. En los últimos años el avance que ha experimentado esta tecnología ha sido muy grande, y se han publicado numerosos estudios utilizándolos con diferentes propósitos.

### 3.1 Síntesis de polímeros de impronta molecular.

La técnica de impronta molecular se basa en la síntesis de polímeros estables con propiedades de reconocimiento molecular hacia los compuestos para los cuales fueron generados. Para ello, es necesario que la polimerización se lleve a cabo en presencia del analito que se va a determinar (analito plantilla o molécula molde). Posteriormente, estos polímeros se utilizan para la separación de dicho analito y compuestos similares de una mezcla más o menos compleja de sustancias. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño y forma, al analito plantilla (*Piletsky, S.A. y col., 2002*).

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito plantilla. Para ello, se pone inicialmente en contacto un monómero adecuado y el analito con el fin de formar un complejo de pre-polimerización, al que posteriormente se le añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente (*porogen*) con el que se lleva a cabo la polimerización. Una vez obtenido el polímero, se extrae el analito plantilla, liberando los sitios de reconocimiento específico.

Entre los parámetros a optimizar en la síntesis de los polímeros generados por impresión molecular se encuentran: selección de la naturaleza y cantidad de monómero, iniciador, entrecruzante y porogen, la forma de iniciación de la polimerización, la metodología empleada así como la forma y el tamaño del analito plantilla, etc., que se tratarán en los siguientes apartados.

#### **Moléculas molde o *template***

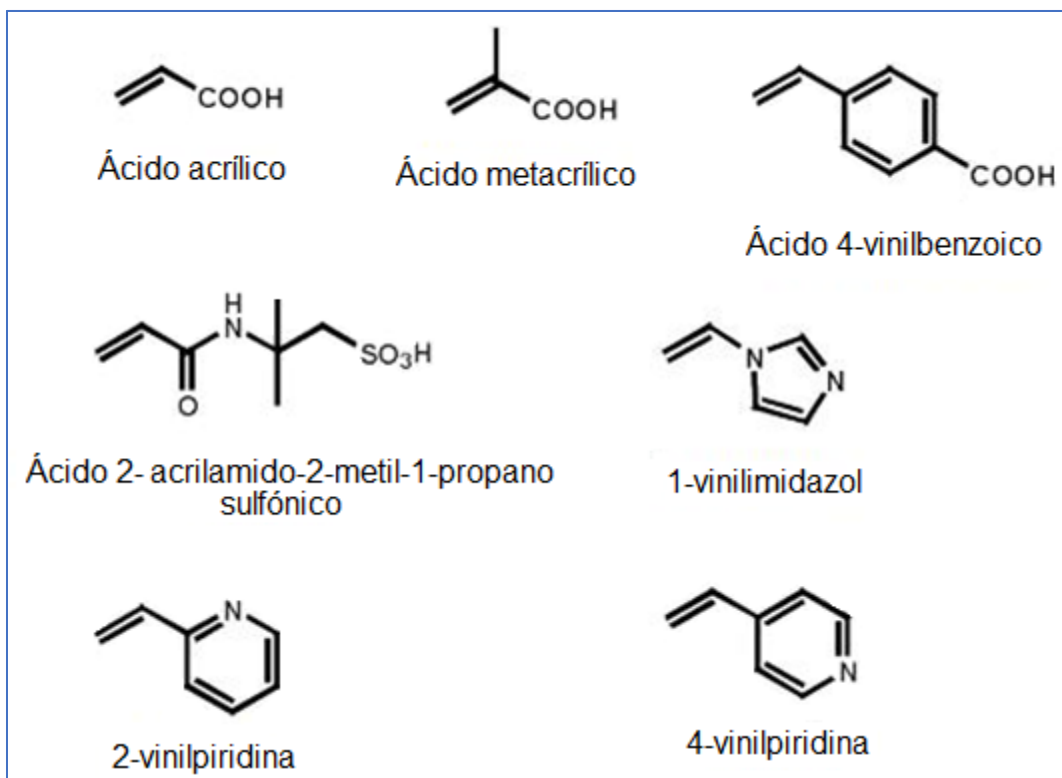
Existe una amplia variedad de compuestos que pueden ser utilizados en la preparación de un MIP; moléculas tales como drogas, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, hormonas, pesticidas, antibióticos, entre otros, han sido utilizadas exitosamente para la preparación de matrices de reconocimiento selectivo.

#### **Monómeros funcionales**

La selección del monómero más adecuado se debe realizar en función de las características y grupos funcionales del analito, con el que se debe formar un complejo de pre-polimerización estable. Además, es deseable que entre el analito y el monómero se den interacciones complementarias que aumenten la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas (*Sellergen, B., 2001*).



Los monómeros funcionales típicos usados en la preparación de MIPs son los ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido 4-vinilbenzoico), los ácidos sulfónicos (ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico) y bases heteroaromáticas débiles (2-vinilpiridina, 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol). Estos se presentan en la Figura 11.



**Figura 11.** Monómeros funcionales típicos.

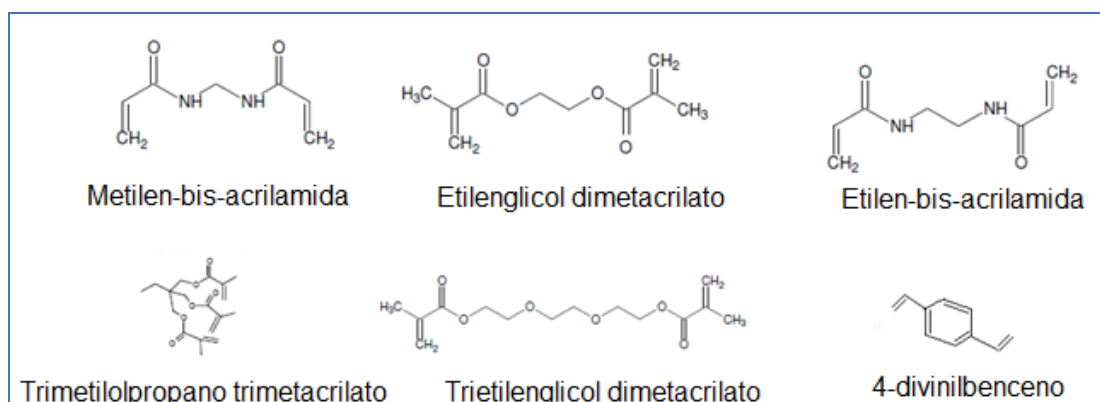
Para interacciones quelatantes de metales, se usa comúnmente un derivado del ácido iminodiacético. Otra posibilidad que ha sido utilizada es la de los polímeros preparados con una estrategia basada en polisiloxano, usando varios silanos como monómeros.

### Entrecruzante

La selectividad está altamente afectada por el tipo y cantidad de agente entrecruzante usado en la síntesis del polímero impreso. El entrecruzante es el responsable de la generación del polímero tridimensional, así como de la estabilización de los sitios de enlazamiento, y de proporcionarle la estabilidad mecánica a la matriz del polímero (Yan, H y col., 2006).

A pesar de existir un alto grado de agentes entrecruzantes, solo un número limitado de ellos son utilizados; la solubilidad del entrecruzante por sí mismo en la solución prepolimérica y la solubilidad de la especie molde monomerizada reduce el número de posibles alternativas.

Entre los entrecruzantes más utilizados se destacan el etilenglicol dimetacrilato, el 4-divinilbenceno, el trietilenglicol dimetacrilato, el trimetilolpropano trimetacrilato, el metilen-bis-acrilamida, el etilen-bis-acrilamida, entre otros (Figura 12).



**Figura 12.** Entrecruzantes comúnmente empleados en la síntesis de polímeros de impronta molecular

## Iniciador

Entre las moléculas iniciadoras, se utilizan entre otras el peróxido de benzoílo (PB), el azobisisobutironitrilo (AIBN), el peróxido de hidrógeno, el peróxido de acetilo, el peróxido de laurilo y el *t*-butil peracetato, en función del método de iniciación empleado, radiación ultravioleta o por acción del calor.

## Disolvente porogénico o porogen

El disolvente porogénico juega un papel importante durante el proceso de impresión molecular gobernando la fuerza de las interacciones no-covalentes aunado a su influencia en la morfología del polímero.

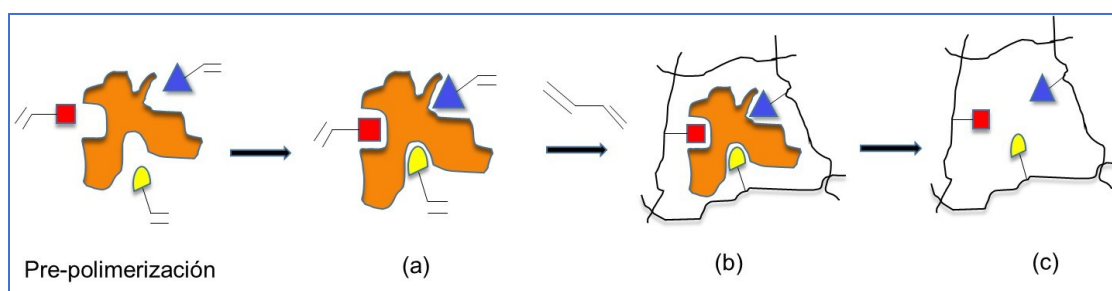
El porogen debe cumplir con ciertos requisitos: en primer lugar, la molécula molde, el iniciador, el monómero funcional y el entrecruzante deben ser solubles en el solvente porogénico. Además, éste debe ser capaz de producir grandes poros para asegurar las buenas propiedades de intercambio del polímero resultante. Por último, el disolvente porogénico debe ser de baja polaridad, para reducir las interferencias durante la formación del complejo entre la molécula a imprimir y el monómero, para que exista una alta selectividad del polímero.

Se puede asumir que mientras más polar sea el porógeno, más débil se hace el efecto de reconocimiento resultante como consecuencia de la influencia de la polaridad del solvente sobre las interacciones no covalentes. Los porógenos con los cuales se obtiene la mejor impresión, son aquellos de muy baja constante dieléctrica, tales como el tolueno y el diclorometano. Por

otra parte, también el porógeno influye la estructura de los polímeros preparados, siendo el tamaño del poro dependiente del tipo de porógeno utilizado. Por ejemplo, el acetonitrilo, con una constante dieléctrica de  $\epsilon = 36$ , conduce a polímeros con un mayor número de macroporos que el cloroformo que tiene una constante dieléctrica de  $\epsilon = 5$ .

### 3.2 Proceso de preparación de los MIPs

La preparación de un material molecularmente impreso involucra tres pasos principales (*van Nostrum, C. 2005., Komiyama, M y cols 2003., Yan, H y col. 2006*), los cuales se muestran en la Figura 13.



**Figura 13.** Principales pasos involucrados en la preparación de un polímero de impronta molecular.

En el paso (a) se realiza la mezcla o enlazamiento de uno o varios monómeros funcionales con la molécula molde o *template* (en anaranjado) en una cantidad adecuada de solvente o líquido de dispersión. En este paso se forma o bien un conjugado covalente (impresión covalente) o un agregado no covalente (impresión no covalente).

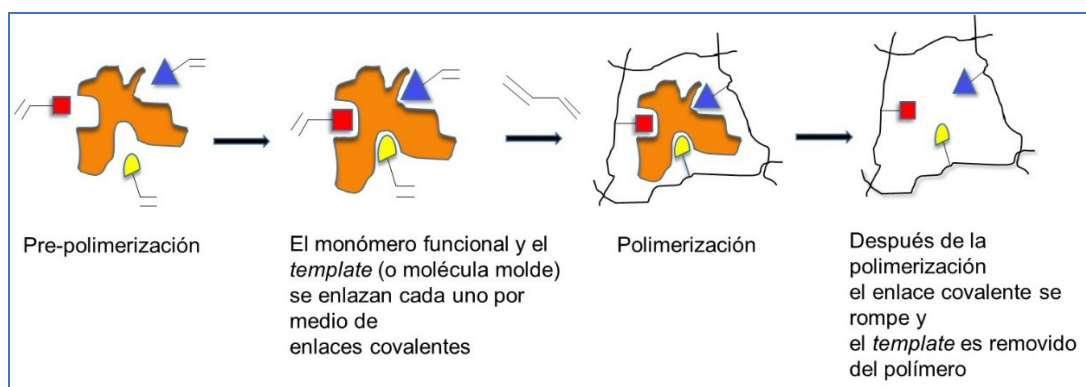
Posteriormente, en el paso (b) se efectúa la polimerización del monómero en presencia de un entrecruzante para preparar una red del polímero en la cual los monómeros funcionales se fijan alrededor de la molécula molde.

Por último en el paso (c) se procede a la eliminación de la molécula molde del sólido.

Como se describió anteriormente, el método de impresión molecular dependerá de la naturaleza del agregado formado entre el monómero funcional y el *template* (o molécula molde). A continuación se describen el modelo de impresión covalente y el modelo de impresión no covalente.

#### Impresión covalente

En este modelo la molécula molde se enlaza al monómero funcional por medio de enlaces covalentes. Una vez formado el polímero, se rompe el enlace covalente y se elimina la molécula molde, tal como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Modelo de impresión covalente

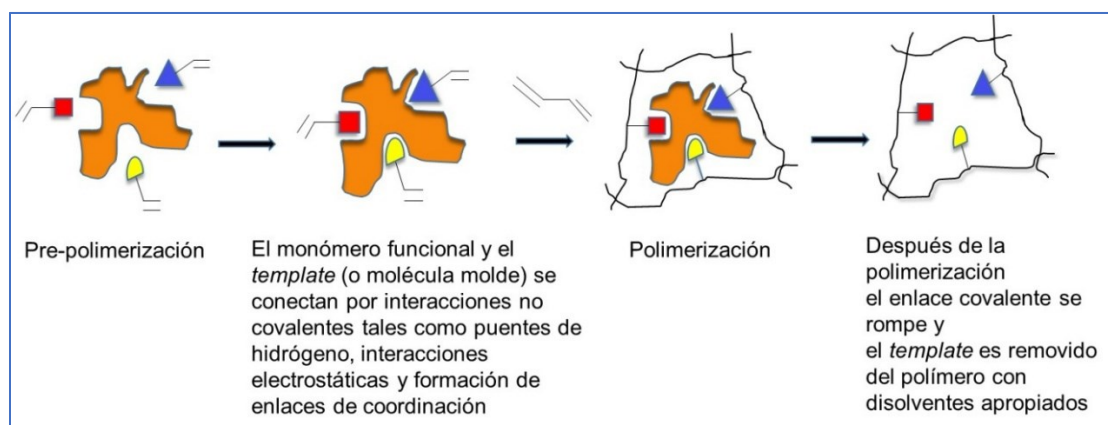
Los enlaces posteriores del analito al polímero impreso son los mismos enlaces covalentes.

Entre las ventajas de este tipo de impresión se encuentra que los conjugados monómero-*template* (o molécula molde) son estables, se puede controlar la estequiometría de la reacción, y debido a la estabilidad de los conjugados formados por enlaces covalentes, pueden emplearse en una amplia variedad de condiciones de polimerización tales como alta temperatura, alto o bajo pH, y disolventes altamente polares. Mientras que entre las desventajas se encuentra lo difícil de la síntesis del conjugado monómero-*template*, la limitación del número de enlaces covalentes reversibles disponibles, la dificultad de extracción del analito que en ocasiones requiere condiciones severas que pueden afectar la estructura del polímero, y el lento enlazamiento entre el analito y el polímero y su posterior extracción, ya que están involucrados la formación y ruptura de enlaces covalentes.

### Impresión no covalente

En este modelo, para conectar un monómero funcional con un *template*, se utilizan interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y formación de enlaces de coordinación. De esta forma el agregado puede obtenerse *in situ* simplemente por adición de los componentes a la mezcla de reacción. Después de la polimerización, se elimina la molécula molde extrayéndola del polímero con el solvente apropiado. Los enlaces posteriores del analito con el polímero ocurren mediante interacciones no covalentes.

En la Figura 15, se muestra el modelo de impresión no covalente.



**Figura 15.** Modelo de impresión no covalente

Las ventajas del modelo no-covalente es que no se necesita sintetizar un conjugado covalente monómero-*template* (o molécula molde). Este molde es eliminado fácilmente del polímero bajo condiciones suaves debido a que las interacciones no covalentes son enlaces débiles. Así mismo, ocurre un rápido enlazamiento entre el analito y el polímero y su posterior extracción. Por otra parte, entre sus desventajas se encuentra que las condiciones de polimerización deben ser escogidas cuidadosamente para maximizar la formación del agregado no covalente en las mezclas, y que la existencia de un gran exceso de monómeros funcionales (para desplazar el equilibrio y formar un agregado) frecuentemente proporciona sitios de enlazamiento no específicos, disminuyendo la selectividad del enlazamiento.

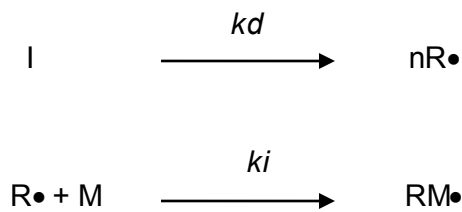
En general la impresión no covalente es más fácil de lograr y es aplicable a un amplio espectro de *templates* o moléculas molde, sin embargo, la impresión covalente es usualmente superior. La elección de uno de los dos métodos depende de la necesidad y situaciones de operación, tales como el tipo de compuesto a imprimir, la selectividad requerida del mismo, el coste y el tiempo requerido para la preparación.

### 3.3 Mecanismo de la polimerización

La polimerización implica la adición de radicales libres al doble enlace del monómero y se lleva a cabo mediante tres etapas bien diferenciadas: iniciación, propagación y terminación. (López, F. 2004)

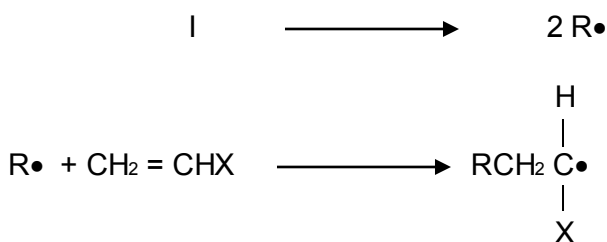
#### Iniciación

Esta fase involucra la creación del centro activo del radical libre y normalmente tiene lugar en dos pasos. El primero es la formación de radicales libres a partir del iniciador y el segundo es la adición de uno de estos radicales libres a una molécula del monómero:



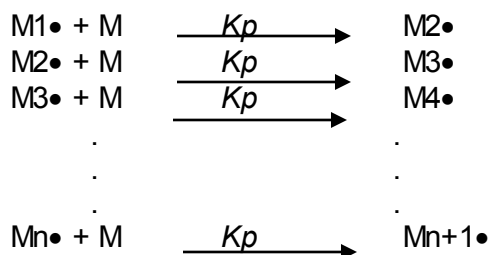
Donde I representa el iniciador, R• al radical libre formado en la descomposición del primero, M el monómero y,  $k_d$  y  $k_i$  las constantes de descomposición del iniciador y de iniciación respectivamente.

Los radicales se pueden generar mediante la descomposición térmica o fotoquímica de sustancias como peróxido de benzoílo (PB), azobisisobutironitrilo (AIBN), peróxido de benzoílo (Barson, C y cols 1998), ozonatos de alquenos (Cunliffe, D y cols 2001), ion ferroso en conjunto con peróxido de hidrógeno (Poornanadhan, A y cols, 1993), peróxido de hidrógeno en conjunto con hidrocloreuro de hidroxilamina (Kay, T y col. 1983), peróxido de hidrógeno (Gity Mir Mohamad Sadeghi, y cols. 2003., Singh, A., y cols. 2000., Uma Sankar N y col. 1955), tal como se muestra a continuación:



## Propagación

En esta etapa se van añadiendo moléculas de monómero al monómero radical formado en la etapa de la iniciación y la cadena va creciendo tal como se indica:

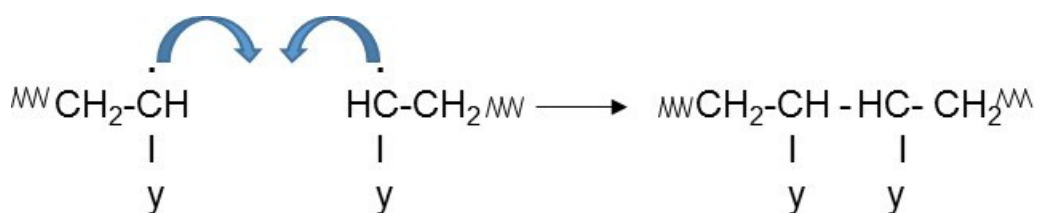


Siendo  $K_p$  la constante de propagación.

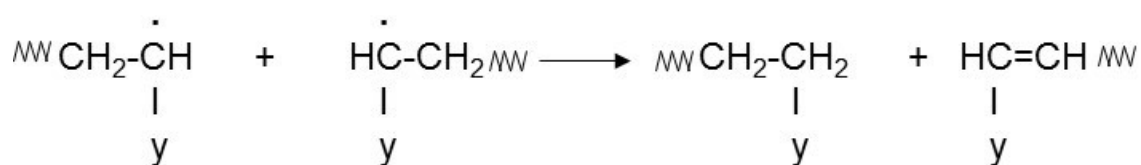
## Terminación

En esta etapa se termina el crecimiento de la cadena del polímero. Los dos mecanismos más comunes de la terminación implican la reacción bimolecular de las cadenas crecientes del

polímero. La combinación involucra el acoplamiento de dos cadenas crecientes para formar una sola molécula de polímero.



Alternativamente un átomo de hidrógeno puede ser abstraído de una cadena creciente por otro en una reacción conocida como desproporción.



Así se forman dos tipos de moléculas, una con un extremo saturado y la otra con un extremo insaturado; en este caso las cadenas tienen moléculas con fragmentos iniciadores solamente en un extremo, mientras la combinación da como resultado moléculas con fragmentos iniciadores en ambos extremos.

En general ocurren ambos tipos de reacciones de terminación pero en diferentes magnitudes, dependiendo del monómero y de las condiciones de polimerización.

Para evitar la terminación prematura de la reacción, ocasionada por el oxígeno disuelto en el sistema, se purga la mezcla de polimerización con nitrógeno, helio o argón.

### 3.4 Caracterización de los polímeros de impronta molecular

Los polímeros de impronta molecular son sólidos amorfos, de gran diversidad estructural, químicamente homogéneos e insolubles. La aplicación adecuada de estos polímeros requiere de una caracterización precisa de sus propiedades superficiales y estructurales. (*Cheremisinoff, N. 1996, Painter, P y cols 1996, Campbell, D. y cols., 2000., Seymour, R. y col., 2002*)

#### Caracterización química

Dentro de la caracterización química se encuentra: el análisis elemental, empleado para conocer en el polímero el porcentaje en masa de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno, Azufre, y otros elementos; la espectroscopia de adsorción Ultravioleta-Visible (UV-Vis), utilizada para conocer la relación estequiométrica de monómeros-molécula molde y el efecto que produce la adición de

entrecruzante en la etapa de prepolimerización; la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), que proporciona información cualitativa sobre la composición del polímero de impronta molecular, como por ejemplo, los grupos funcionales, así como la existencia de interacciones no-covalentes, como los puentes de hidrógeno y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), que proporciona información sobre los distintos carbonos presentes en la red polimérica y determina el número de dobles enlaces que quedan sin reaccionar en el polímero (grado de curación), así mismo se obtiene información de la mezcla de prepolimerización, sobre la estabilidad de los complejos monómero-molécula molde formados.

El empleo de la espectroscopia IR, permite identificar de una manera rápida y fácil los principales componentes de un compuesto orgánico (*Irvin, J y col., 1996; Allinger, M y cols, 1984; Morrison, R y col., 1998*), pues indica los diversos grupos funcionales que se encuentran en la molécula. De esta manera ayuda a conocer la estructura de un nuevo compuesto.

Al analizar por espectroscopia IR a los MIPs, se comparan las estructuras de los monómeros funcionales, los entrecruzantes, las moléculas molde, los polímeros de impronta molecular (tanto a los que se les ha extraído la molécula molde como a los que no), y a los polímeros no impresos (*Van, X y cols, 2009; Santos y cols, 2009; Zakaría, N y cols, 2009, Rong, F y cols, 2006; Songjun, Li y cols, 2008; Philip, J y cols, 2007; Liu, Z y cols, 2010*) y los diversos grupos funcionales presentes en las matrices poliméricas.

Los polímeros de impronta molecular utilizados en este trabajo de investigación fueron caracterizados utilizando la espectroscopia IR con transformada de Fourier. Con relación al análisis espectroscópico cabe señalar que la región del infrarrojo está comprendida entre las longitudes de onda de 700 a  $10^6$  nm, y tanto por razones instrumentales como por las características de interacción con la materia, esta región se divide en tres zonas: la NIR, (*Near InfraRed*) comprendida entre 700 y 2500 nm, que corresponde al infrarrojo cercano; la MIR, (*Middle InfraRed*), que va desde 2550 a 50000 nm, que corresponde al infrarrojo medio y la FIR (*Far InfraRed*), la comprendida entre 50000 y  $10^6$  nm, que corresponde al infrarrojo lejano.

Con relación al espectro protónico de RMN de las sustancias orgánicas, varios protones son magnéticamente equivalentes, por lo que el espectro es más simple. Los alcanos y grupos semejantes presentarán absorción en el campo alto mientras que un anillo aromático presentará absorción en el campo bajo. Analizando el número de señales y su desdoblamiento, se puede saber el compuesto que se tiene.

### **Caracterización morfológica**

Los métodos analíticos comúnmente usados para la caracterización morfológica de un polímero son: la porosimetría, por medio de la cual se obtiene información del área de superficie específica



( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ), el volumen de poro específico ( $\text{mL g}^{-1}$ ), la distribución del tamaño de poros, y del diámetro medio de los poros; la cromatografía de exclusión molecular inversa (ISEC, *Inverse Size Exclusion Chromatography*) que proporciona información sobre la arquitectura porosa del polímero de impronta molecular como fase estacionaria sobre la que se separan polímeros solubles de distribución de pesos moleculares conocidos; la microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic-force Microscopy*) que proporciona un perfil topográfico tridimensional cuantitativo de la superficie, también proporciona la diferencia entre la fase amorfa y la cristalina de un polímero semicristalino, y entre homopolímeros y copolímeros, y proporciona un estudio de las propiedades mecánicas. La microscopía electrónica de barrido, que da información sobre la morfología de las partículas poliméricas y de los macroporos superficiales, también proporciona información sobre si las partículas son granulares o esféricas, entre otras.

### **Caracterización de los sitios de unión específica: isotermas de adsorción**

Existen modelos matemáticos de isotermas de adsorción que se han aplicado a la caracterización de polímeros de impronta molecular. Estos modelos pueden ser discretos o de distribución continua. Entre los modelos discretos se encuentran los modelos de Langmuir y de Jovanovic y entre los modelos de distribución continua se encuentran el de Freundlich, Freundlich-Langmuir y Freundlich-Jovanovic.

### **3.5 Aplicaciones de los MIPs en Química Analítica**

Actualmente se han preparado MIPs específicos para proteínas, derivados de aminoácidos, azúcares y otros derivados, vitaminas, bases nucleótidas, pesticidas y productos farmacéuticos tales como la teofilina, la morfina, el diazepam, el naproxeno, el cortisol y la pentamidina, entre otros muchos compuestos.

Los MIPs han sido usados inicialmente como fase estacionaria en cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Recientemente, sin embargo, también han sido utilizados en cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*), en ensayos de enlazamiento heterogéneo y en sensores de afinidad biomiméticos.

Los polímeros de impronta molecular tienen la habilidad de reconocer las moléculas molde específicamente y han sido usados en diversas aplicaciones basadas en el reconocimiento molecular, tales como separación cromatográfica, imitadores de anticuerpos artificiales, extracciones en fase sólida y biosensores, teniendo una de las aplicaciones de mayor interés industrial, la separación de materiales.

*Li, Y y cols. (2006)*, señalan que la mayoría de los MIPs han sido preparados en solventes orgánicos menos polares por técnicas de polimerización a granel, sin embargo, los polímeros

obtenidos por este método deben ser sometidos a etapas de trituración, molienda y tamizado para producir partículas adecuadas para ser empaquetadas en columnas de HPLC, lo cual consume tiempo y conduce a cantidades moderadas de polímeros de impronta molecular útiles. Las partículas de polímero obtenidas son, en ocasiones, poco adecuadas para su uso como partículas de empaquetamiento de columnas de HPLC debido a su forma azarosa y la distribución de tamaño de partícula. Otros MIPs monolíticos han sido preparados por polimerización *in situ*. Sin embargo, esta es una columna de baja eficiencia y alta presión. Para superar estos problemas, se prepararon polímeros de impronta molecular esféricos (SMIPs, *Spherical Molecular Imprinted Polymers*) usando diferentes estrategias, tales como la polimerización por precipitación, la polimerización por suspensión, la polimerización por emulsión o la polimerización dentro de los poros de una cámara hecha de sílica, entre otras. Así, el método de hinchamiento en multi-pasos y la polimerización por suspensión permite mejorar el control de partículas del MIP y son accesibles para modificar las partículas con una capa hidrofóbica. Los SMIPs se usaron como fase estacionaria en HPLC después de un lavado sencillo y exhibieron mejores características de flujo y mayores capacidades de carga comparados con polímeros a granel ordinarios y polímeros monolíticos. Por otra parte, como los disolventes polares, especialmente el agua, pueden debilitar la interacción entre moléculas molde y los monómeros funcionales, la mayoría de los polímeros impresos no covalentemente son preparados en disolventes menos polares. Sin embargo, se necesita mayor investigación para extender el alcance del sistema acuoso, en el cual pueden realizarse los procesos de impresión.

### **3.5.1 Aplicación de los MIPs como adsorbentes en extracción en fase sólida, SPE**

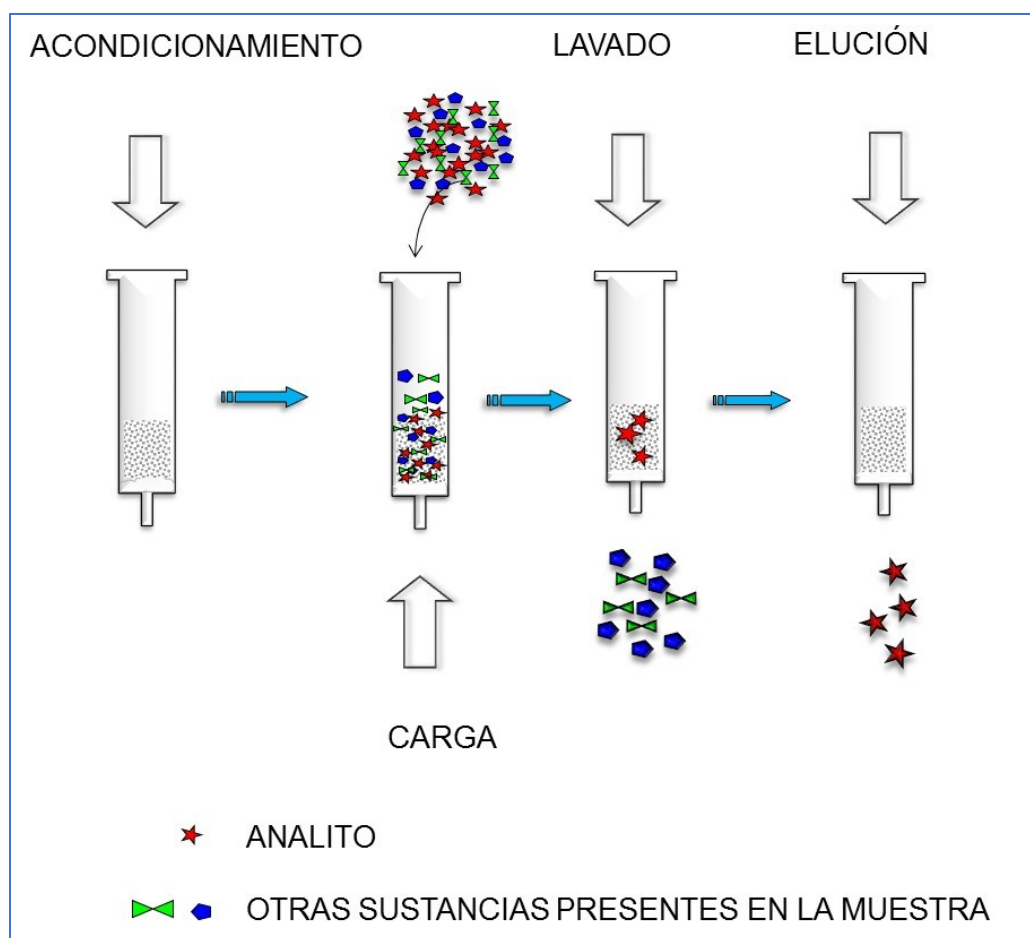
La extracción en fase sólida basada en polímeros de impronta molecular es una técnica utilizada para el análisis de muestras del medioambiente, alimentos y bioanalíticas, y se denomina con las siglas en inglés MISPE (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*).

El análisis de un determinado compuesto en mezclas complejas frecuentemente requiere diversos pasos de pretratamiento. Si el analito está presente en baja concentración, es necesario que éste sea concentrado para poderlo detectar por técnicas analíticas estándares. Además, si se trata de una muestra compleja de compuestos similares, es necesario un paso que involucre la limpieza de la misma.

La extracción en fase sólida es una técnica ampliamente utilizada para el pre-tratamiento de muestras, pues ésta es flexible y fácil de automatizar. Con ella pueden prevenirse muchos problemas asociados con la extracción líquido-líquido, tales como separación incompleta de fases, recuperaciones no cuantitativas, uso de equipos costosos y grandes cantidades de disolventes orgánicos. Consiste en percolar un volumen conocido a través de un adsorbente sólido empaquetado en un cartucho, columna o disco, bajo condiciones cuidadosamente controladas que favorecen la absorción preferencial del analito sobre los componentes de la

matriz. El analito es luego recuperado del adsorbente, extrayéndolo en un pequeño volumen de una mezcla de disolventes apropiada (Sellergen, B. 2001)

En la Figura 16 se presenta el procedimiento de extracción en fase sólida.



**Figura 16.** Procedimiento de extracción en fase sólida

Los MIPs pueden utilizarse directamente como columnas de extracción o como cartuchos y se combinan con los diferentes instrumentos de análisis; su alta afinidad y selectividad se traduce en menores límites de detección, tiempos de análisis más cortos e instrumentación más económica, lo que conduce a un uso más amplio de ellos.

Los pasos involucrados en el desarrollo de un nuevo protocolo de extracción en fase sólida basado en polímeros de impronta molecular son los siguientes: síntesis del material, ensayos para sus propiedades de reconocimiento, el desarrollo de un protocolo de extracción y la validación de este protocolo.

El uso de polímeros de impronta molecular combinados con la técnica de extracción en fase sólida permite el uso de protocolos tanto en ensayos fuera de línea como en protocolos automatizados acoplados a instrumentos analíticos.

## 4. Métodos analíticos para la determinación de antibióticos

La determinación de residuos de antibióticos en muestras de alimentos contaminados es un problema de salud pública a nivel mundial, debido a la necesidad de evitar la aparición de resistencia a esos antibióticos en el ser humano.

Para controlar la presencia de estos residuos, se destacan dos fases. La primera se conoce como la etapa de cribado en la cual se utilizan métodos cualitativos para determinar la presencia o ausencia de residuos por encima de los LMR, y en la segunda fase, se confirma y cuantifica el analito presente en la muestra.

Los primeros métodos utilizados para la detección de residuos de antibióticos son los microbiológicos, enzimáticos o inmunoenzimáticos, entre otros. Posteriormente, para cuantificar la cantidad del analito en la muestra es necesario utilizar métodos cuantitativos, y entre las técnicas analíticas más utilizadas se encuentran los métodos cromatográficos, con diferentes tipos de detección, tales como con detección ultravioleta (UV), electroquímica, fluorescente (FLD) o por espectrometría de masas (MS). La mayor parte de los estudios coinciden en que la dificultad del análisis de antibióticos radica en la extracción y limpieza de los analitos de la matriz de muestra.

En esta sección se va a exponer una revisión de los métodos más ampliamente utilizados hasta el momento para la determinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y macrólidos.

### 4.1. Preparación de la muestra

En general, la metodología empleada en el análisis de muestras en las cuales se requiere el análisis de residuos comprende diversas etapas que incluyen la extracción del analito o analitos de la muestra, una etapa de limpieza o *clean-up* para eliminar una parte importante de los interferentes, y si es necesario, la concentración del extracto obtenido para el análisis y finalmente, la detección sensible y selectiva del analito o analitos de interés.

La preparación de la muestra *puede* ser la etapa más laboriosa de un método, y se utilizan diferentes estrategias para extraer los residuos y realizar el *clean-up* de la muestra, siendo las técnicas más empleadas la extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, dispersión de matriz en fase sólida, el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe), entre otros. Señalan Pacheco-Silva, E y cols. (2014), en una revisión efectuada de trabajos publicados en los últimos años de análisis de residuos de medicamentos veterinarios en muestras de leche, huevos y otras matrices, que el método de extracción más empleado es la extracción líquido-líquido utilizando acetonitrilo como disolvente, seguido de una etapa de *clean-*

up utilizando extracción en fase sólida para permitir la cuantificación de residuos, generalmente, por cromatografía.

Hasta la fecha, se han utilizado con éxito distintos tipos de adsorbentes para la preconcentración de compuestos orgánicos, pero la mayoría de los adsorbentes utilizados no son selectivos reteniendo simultáneamente otros compuestos presentes en la muestra.

Por todo ello, se siguen desarrollando sistemas de tratamiento de muestra, alternativos a los métodos clásicos ya existentes, para la determinación de residuos de antibióticos, como son los basados en el empleo de polímeros de impresión o impronta molecular, capaces de preconcentrar de forma selectiva los antibióticos de muestras de leche, a la vez que proporcionan una limpieza de la muestra.

A continuación se describe una revisión de las aplicaciones de los MIPs en el tratamiento de la muestra para la determinación de antibióticos en muestras de leche.

#### 4.1.1. Empleo de MIPs

La posibilidad de utilizar los MIPs para la extracción en fase sólida se ha evaluado para diversas sustancias, como por ejemplo el tamoxifeno (*Rashid, B. A. y cols., 1997*), el fenuron o el isoproteron (*Martín-Esteban, A. y cols., 2001*).

*Zhang, X, y cols (2010)*, desarrollaron un método rápido y selectivo utilizando el campo magnético de polímeros impresos molecularmente (MMIP) como adsorbente para la extracción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos a partir de muestras de leche. El MMIP fue preparado con la penicilina V potásica como molécula plantilla, ácido metacrílico, como monómero funcional, dimetacrilato de etileno como agente de reticulación y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como componente magnético. Los resultados experimentales mostraron que el MMIP presentaba una gran afinidad y selectividad hacia la penicilina V potásica y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos estructuralmente relacionados.

*Kowalski, D. y cols (2011)*, desarrollaron un método en el cual el cloranfenicol puede ser eficientemente pre-concentrado en un sistema de inyección en flujo a través de un reactor empaquetado con polímeros de impronta molecular, y la determinación se hizo en HPLC con detección UV; en condiciones óptimas el límite de detección para la muestra de 100 mL con pre-concentración en línea fue de  $0,66 \text{ mg L}^{-1}$ .

*Rodríguez, E. y cols. (2011)* describieron un método simple basado en la extracción con polímeros de impronta molecular y extracción en fase sólida (MISPE) combinada con cromatografía líquida con detección por fluorescencia (LC-FLD) para la determinación de residuos de fluoroquinolonas (FQ) en alimentos para bebés. El método implica la extracción de la muestra con una solución de ácido o-fosfórico (50 mM, pH 3,0) / ACN (20:80, v / v) y la limpieza

de la muestra mediante la carga de los extractos en cartuchos de MIP. En condiciones óptimas del MISPE se obtuvieron recuperaciones de FQ en el rango de 92 a 106 %, con RSD menores del 8 %. La validación del método se realizó de acuerdo con la Decisión 2002/657 / CE, en términos de linealidad, exactitud, precisión, selectividad, límite de decisión ( $cc\alpha$ ) y capacidad de detección ( $\beta cc$ ). El método propuesto se aplicó con éxito para el análisis de alimentos infantiles de diferentes composiciones adquiridos en supermercados y farmacias locales. Los resultados no mostraron presencia de cantidades residuales de FQ en las muestras analizadas por encima de los límites de decisión del método ( $cc\alpha$  entre 5 -151  $\mu g Kg^{-1}$ ).

*Van Royen, G y cols. (2014)* desarrollaron y evaluaron un polímero de impronta molecular para la detección y limpieza de bencil-penicilina en leche. Se comparó la unión específica de la bencil-penicilina al MIP con la unión no específica, utilizando un NIP. Validaron con éxito el método empelando extractos de leche enriquecida con bencil-penicilina. Cuando emplearon disoluciones del analito en acetonitrilo, las recuperaciones utilizando MISPE se encontraron entre 90-95 % mientras que con acetonitrilo fueron de 70-80 %. El LOD y el LOQ para la aplicación MISPE en muestras de leche fueron de 0,51 y 1,02  $mg Kg^{-1}$ , respectivamente.

Por otra parte, *Urraca, J., y cols. (2014)* describieron la síntesis de polímeros de impronta molecular para la extracción selectiva (MISPE) de seis antibióticos del grupo de las FQ (enrofloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, danofloxacina, sarafloxacina y norfloxacina), a partir de muestras de músculo de pollo y su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con fluorescencia (FLD) o detección de espectrometría de masas (MS). El MIP preparado usando enoxacina como molécula molde, una mezcla de ácidos metacrílico y ácido trifluorometacrílico como monómeros funcionales y etilenglicoldimetacrilato como el monómero entrecruzante, mostró las mejores propiedades de reconocimiento a las FQ que los otros polímeros estudiados. Las partículas esféricas del MIP se prepararon utilizando perlas de sílice como soporte. Los polímeros se empaquetaron en cartuchos de extracción en fase sólida, de forma que el método MISPE-HPLC optimizado permitió la extracción de los antibióticos a partir de muestras acuosas seguido de un lavado selectivo con acetonitrilo/agua (0,005 % de TFA, pH -3,0), 20:80 (v / v). La elución se llevó a cabo con ácido trifluoroacético (5 %) en metanol. Las condiciones óptimas del MISPE condujeron recuperaciones de las FQ en muestras de músculo de pollo que oscilaron entre 68-102 % y las precisiones en el orden de 3-4% (RSD, n = 18). El método fue validado de acuerdo con la *Decisión 2002/657/CE*, en términos de linealidad, exactitud, precisión, selectividad, límite de decisión ( $cc\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $\beta cc$ ) por HPLC - FLD y HPLC -MS / MS. Los límites de detección mejoraron en el análisis por HPLC -MS / MS y oscilaron entre 0,2-2,7  $\mu g Kg^{-1}$  (S / N = 3) para todos las FQs probadas.

## 4.2 Métodos espectrofotométricos

Tanto los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como los macrólidos son incoloros y no tienen cromóforos con propiedades de adsorción significativas en el UV. Es por ello que para determinar estos antibióticos usando espectrofotometría es necesario basarse en derivados adecuados para obtener los compuestos coloreados que puedan medirse en el rango visible del espectro.

Haciendo una revisión de diferentes métodos que utilizan la espectrofotometría para la determinación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se han encontrado algunos ejemplos a destacar. *Smith, J., y cols (1967)*, y *Baker, W. L. (1989)* desarrollaron métodos espectrofotométricos con sales de cobre. *El-Obeid H. A., y cols (1999)*, estudiaron un método colorimétrico utilizando reacciones con ácido ascórbico, *Prasad, P., y cols. (2000)* desarrollaron un método basado en la formación de un complejo azul de metileno-antibiótico aniónico.

*Salem, H., y cols (2002)* desarrollaron un método basado en la oxidación selectiva de los antibióticos tanto con Ce (IV) como con Fe (III) en medio ácido, *Okoye, N y cols (2007)* y *Farhadi, K y cols (2002)* investigaron un método basado en la formación del complejo de azul de Prusia. Sin embargo, estos métodos espectrofotométricos sólo se aplicaron al análisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en formas puras o en preparaciones farmacéuticas.

*Smith, J., y cols (1967)* desarrollaron un método basado en la medición espectrofotométrica a 320 nm de un compuesto formado por la degradación ácida de la penicilina a 75 °C en presencia de una solución *buffer* de pH 5,2 y trazas de sales de cobre. Por su parte, *Baker, W. L (1989)* desarrolló un procedimiento para la determinación de penicilinas basado en la reducción de Cu (II) y la determinación de Cu (I) usando neocuproina.

*El-Obeid H. A., y cols (1999)* desarrollaron un método colorimétrico selectivo para la determinación de ampicilina, amoxicilina, cefalexina, cefadroxilo y cefaclor en preparaciones farmacéuticas, basado en la medición del color cuando los productos de la degradación alcalina de estos agentes reaccionan con el ácido ascórbico.

Un método espectrofotométrico de extracción para la determinación de algunos antibióticos betalactámicos como el cefaclor, la ampicilina y la amoxicilina usando azul de metileno como reactivo analítico, fue desarrollado por *Prasad, P., y col (2000)*. Este método está basado en la formación de un complejo azul de metileno-antibiótico aniónico extraíble en cloroformo, cuando se hace reaccionar un antibiótico  $\beta$ -lactámico con un exceso de azul de metileno a pH 9,5.

Por otra parte, *Okoye, N., y cols (2007)* describieron el desarrollo y aplicación de un método espectrofotométrico sensible para la determinación de ceftriaxona, cefotaxima y cefurexima (antibióticos cefalosporínicos ampliamente utilizados en la práctica química). La hidrólisis ácida de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos produce el peniciloaldehído como producto último de



degradación. Este compuesto tiene un grupo aldehído funcional que es capaz de convertir el Fe (III) a Fe (II), y el último reacciona con el hexacianoferrato (III) para formar el complejo de azul de Prusia.

Al revisar algunos trabajos relacionados con la determinación espectrofotométrica de los antibióticos macrólidos, cabe mencionar que *Rachidi, M., y cols (2007)* desarrollaron un método basado en la formación de un par iónico entre el antibiótico y un complejo inorgánico de (Mo (V)-tiocianato) seguido por su extracción con dicloroetano. El complejo formado es de color naranja y exhibe su máxima absorbancia a 469 nm. Por otra parte, *Amin, A., y cols. (1996)*, determinaron eritromicina y sus ésteres en formulaciones farmacéuticas basándose en la formación de un complejo coloreado azul, formado con violeta genciana en medio alcalino y midiendo la absorbancia a 633 nm. Con este método los autores lograron determinar concentraciones comprendidas entre 2,5-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de eritromicina en la solución final.

*Rattapolaveechai, R., y cols (2007)* desarrollaron un método espectrofotométrico simple y rápido para analizar eritromicina en un preparado farmacéutico por medición directa en el UV a 285 nm en combinación con el método de adición de estándar.

*El Sheikh, R., y cols. (2013)* desarrollaron tres métodos espectrofotométricos para la determinación de espiramicina en forma pura y en formulaciones farmacéuticas. Los dos primeros métodos se basaron en la formación de un complejo entre el fármaco y el quinalizarin (método A) y el rojo de alizarina S (método B), con máximos de absorbancia en 568 y 527 nm, respectivamente. El tercer método se basó en la reducción de Fe (III) por la espiramicina en medio ácido y la posterior interacción de Fe (II) con ferricianuro para formar el azul de Prusia, que presenta un máximo de absorción a 760 nm.

### 4.3 Métodos inmunológicos

Los Inmunoensayos son pruebas que usan complejos de anticuerpo y antígeno (también denominados inmunocomplejos) para medir la presencia de un analito específico en una muestra. Como ejemplos significativos se muestran inmunoensayos enzimáticos y un ensayo bioluminiscente

#### ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

En el método ELISA, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, el antígeno o anticuerpo se marca con una enzima. La reacción enzimática permite el desarrollo de un producto cromático o fluorescente, cuya concentración puede cuantificarse espectrofotométricamente y relacionarse con la concentración del analito.



*Huet, A., y cols (2006)*, determinaron simultáneamente por este método antibióticos del tipo FQ en riñones, productos marinos, huevos y músculo. Por otra parte, *Kumar, K., y cols. (2004)* adaptaron dos kits disponibles comercialmente para el ensayo de ELISA utilizados para determinar residuos de tilosina o tetraciclina en carne y leche, para determinar ultra trazas de estos antibióticos en aguas superficiales y profundas. *Salas, P., y cols (2013)*, determinaron residuos de antibióticos betalactámicos en muestras de leche de 60 vacas mediante un ensayo inmunoenzimático marca <sup>®</sup>SNAP (Betalactam) tratadas contra mastitis, utilizando anticuerpos para caseína de leche de vaca almacenados dentro de las microceldas, en un inmunoensayo competitivo indirecto (ELISA). Por otra parte, *Zhang, Y., y cols (2013)* determinaron tilosina por medio de un ensayo inmunosorbente de enzima enlazada en leche.

#### Inmunoensayo bioluminiscente

*Nilson, L (1984)*, presentó un método bioluminiscente para determinar gentamicina en suero, basado en el efecto dependiente de la dosis del agente sobre la acumulación de ATP extracelular en la *Escherichia coli.*, por otra parte, *Pellinen, T., y cols (2002)*, optimizaron el análisis para la detección de trazas de tetraciclina en pescados, utilizando cepas bioluminiscentes de la *E. coli* K-12.

## 4.4 Biosensores

Una mejora tecnológica de los métodos de detección ha sido el desarrollo de biosensores, los cuales constituyen un dispositivo analítico en el cual un material biológico, capaz del reconocimiento químico específico, está en contacto íntimo con un transductor fisicoquímico para dar una señal eléctrica.

En años reciente se han desarrollado biosensores para el análisis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y en ellos, frecuentemente se utilizan enzimas como el componente biológico debido a su alta especificidad para ciertos substratos. Se cuantifica el producto enzimático mediante una serie de mecanismos como por ejemplo la temperatura, el cambio en el pH o la detección óptica. A pesar de la alta especificidad y selectividad alcanzadas por las enzimas, los biosensores con enzimas son a veces poco prácticos, porque la enzima puede ser inestable, costosa, requiere un cofactor o son difíciles de purificar. Se han desarrollado algunos biosensores para el análisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por ejemplo se ligó el ácido 7-aminocefalosporánico a la glucosa-oxidasa como sitio de enlazamiento de la proteína para la penicilina G usando un transductor amperimétrico (*Setford, S., y cols., 1999*). *Möhrle, V., y cols (2007)* describieron un biosensor microbiano basado en la célula, asignando una respuesta de luminiscencia a los macrólidos naturales o químicamente modificados, independientemente de su actividad biológica.

## 4.5 Otros métodos de detección

Se han desarrollado las técnicas de detección de cribado (*screening methods*), las cuales son relativamente simples, rápidas y no costosas que permiten que un gran número de muestras sean analizadas con alta confiabilidad. Los límites de detección típicos (LOD, *Limits of Detection*) de los ensayos de detección disponibles comercialmente usados para detectar antibióticos  $\beta$ -lactámicos en leche están entre 5 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Oka, H., y cols, 1995).

La mayoría de los ensayos de detección están basados en la inhibición microbiana. Estos utilizan cepas de bacterias sensibles a antibióticos como ampicilina, penicilina G, cloxacilina, entre otros, con organismos ensayo como por ejemplo *Bacillus stearothermophilus var.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (Gatica, C., y col. 2007). Este tipo de ensayo utiliza un disco cargado con la muestra que va a ser analizada, el cual es colocado sobre una placa con agar que contiene la cepa de la bacteria sensible al antibiótico, que se incuba por un periodo de tiempo específico, dependiendo de la especificidad del ensayo. Si las zonas alrededor del disco están libres de crecimiento bacteriano, la muestra contiene antibiótico. Estos bioensayos son efectivos para detectar residuos de antibióticos, pero presentan susceptibilidad a sustancias interferentes que pueden conducir a falsos positivos.

La *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30- NF 25) (2007)*, describe ensayos iodométricos para distintos antibióticos penicilínicos y sus dosis para los cuales la titulación iodométrica es particularmente adecuada. Para ello se coloca una cantidad conocida del patrón y se le añade hidróxido de sodio, posteriormente se le agrega HCl y el yodo, valorándose con tiosulfato de sodio y utilizando almidón como indicador.

## 4.6 Métodos cromatográficos

En la determinación de antibióticos con fines cualitativos o cuantitativos, los métodos cromatográficos son los más utilizados debido a su especificidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y sensibilidad. Dentro de las técnicas cromatográficas utilizadas, se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y la Cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*).

### 4.6.1 Cromatografía de gases (GC)

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, son compuestos poco volátiles, con una elevada polaridad y termolábiles, lo que hace que en el análisis de estos por medio de la cromatografía de gases sea necesaria la preparación de derivados volátiles que puedan ser llevados a la fase gaseosa después de la inyección (Hishita, C., y cols., 1971). En este orden de ideas, Meetschen, U., y col.

(1990) metilaron con diazometano, los residuos de bencilpenicilina, oxacilina, cloxacilina, y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos en leche. Los residuos fueron extraídos de la leche con acetonitrilo, y fueron cuantificados utilizando un método de cromatografía de gases capilar. Similarmente, para la cuantificación de los antibióticos macrólidos por cromatografía de gases, también es necesaria la preparación de derivados que permitan su determinación y cuantificación (*Takatsuki, K., y cols., 1987*).

#### 4.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Esta técnica es la más utilizada para la determinación de antibióticos, incluyendo  $\beta$ -lactámicos y macrólidos. La separación cromatográfica se realiza utilizando diferentes tipos de columnas y con sistemas de detección acoplados al cromatógrafo tales como detector de diodos (DAD), detector de fluorescencia o espectrómetro de masas, entre otros.

La cromatografía líquida de alta resolución tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos a ser analizados se disuelven en un solvente adecuado, y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente, pudiendo ser cromatografiados sin descomposición o sin la necesidad de preparar compuestos volátiles, mediante un proceso de derivatización.

Al desarrollar un método analítico hay que tener en cuenta la columna utilizada, el material, las dimensiones, el filtro, el tipo de partícula, la forma, el diámetro del poro, y el rango de pH recomendado para el uso de la columna así como para la estabilidad de los compuestos a analizar. Existe un uso extendido de los procedimientos analíticos por HPLC, así como una diversidad de columnas comerciales.

Con relación a los parámetros de operación deben definirse la secuencia de los blancos de inyección, sistemas estándar adecuados y las muestras, así como las velocidades de flujo, temperaturas, la preparación de la fase móvil y su gradiente, incluyendo el orden o la adición de los reactivos y los métodos de desgasificación y filtración.

Existe una gran diversidad de procedimientos analíticos por HPLC. A continuación se resumen los aspectos más importantes de algunos trabajos de investigación que han utilizado la separación cromatográfica por HPLC para la determinación de antibióticos en leche.

Un método cuantitativo para el análisis de residuos de sulfadiazina y sulfadimidina en leche fue desarrollado por *Alawi, M., y col. (1981)*. El método se basó en un paso de extracción sencillo y cuantificación mediante HPLC con detección electroquímica. La separación cromatográfica se llevó a cabo empleando una columna en fase reversa (RP-C2) y un extractor acuoso. Señalan estos autores que con este sistema analítico pueden detectarse concentraciones de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Las recuperaciones de sulfonamidas de la leche estaban entre 94,4 % y 110 % en el rango de concentración de 0,01 – 1,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de muestra.

Por otra parte, *Moats, W y col. (1995)* describieron un método modificado utilizando HPLC para la determinación de antibióticos de tetraciclina en leche. En este método, los autores eliminaron las proteínas usando 5 mL de leche con 1 mL de HCl 1 N y 15 mL de acetonitrilo. Del filtrado obtenido (12 mL) se evaporó la capa de agua resultante de la adición de hexano y cloruro de metileno. Se concentró el extracto cerca de 1 mL sin degradación significativa de las tetraciclinas y se filtraron los concentrados. Para los análisis, emplearon una columna de Polymer Laboratories PLRP-S con una fase móvil de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,02 M y decanosulfonato de sodio-acetonitrilo 0,01 M, 72 + 28 para la oxitetraciclina y tetraciclina, y 68 + 32 para la clortetraciclina. El volumen de inyección fue de 200  $\mu\text{L}$  con detección UV a 380 nm. Las recuperaciones promedio fueron mayores al 80 % con límites de detección de 2- 4 ppb.

Para la determinación simultánea de residuos de amoxicilina y ampicilina en leche de bovinos cruda y procesada, *Luo, W y cols. (1997)* desarrollaron un método analítico por HPLC usando detección por fluorescencia. Alícuotas de leche cruda o procesada (5 mL) se diluyeron hasta 40 mL con una disolución tampón o *buffer* de 0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 4,5), y las proteínas solubles se precipitaron mediante la adición de tungstato de sodio y ácido sulfúrico seguido por centrifugación. Para concentrar los residuos de los analitos, se hizo pasar el sobrenadante a través de un cartucho de extracción de fase sólida  $\text{C}_{18}$ . Con el empleo de este cartucho fue posible extraer la amoxicilina y la ampicilina, las cuales posteriormente se mezclaron con salicilaldehído para formar derivados fluorescentes, que fueron luego analizados con cromatografía líquida y detección de fluorescencia. Las recuperaciones promedio de amoxicilina y ampicilina para muestras dopadas con 5, 10, y 20  $\text{ng mL}^{-1}$  fueron mayores del 80 %, con coeficientes de variación (CV) menores del 5 %. Los límites de detección (LOD) cuantificación (LOQ) para la amoxicilina fueron de 1,1 y 2,4  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente. El LOD y LOQ para la ampicilina fueron de 1,0 y 1,7  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente.

*Skudar, K y cols (1999)* prepararon polímeros molecularmente impresos para la penicilina V y la oxacilina, e investigaron sus propiedades de reconocimiento tanto en la fase acuosa como en la orgánica. Los polímeros de impronta molecular resultantes demostraron ser eficientes para distinguir entre diferentes penicilinas (penicilina V, penicilina G y oxacilina).

*Faría, J y cols (2000)* desarrollaron una metodología para la extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por HPLC. Extrajeron la penicilina G de la leche cruda agregándole una mezcla de fosfato ácido de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) 0,01 M y metanol, y posteriormente centrifugando la muestra. El sobrenadante fue inyectado en un HPLC provisto de una columna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  a temperatura ambiente, utilizando una disolución tampón de fosfato 0,01 M,

pH 7- metanol (65: 35 v/v) como fase móvil y fue detectada a 230 nm. Obtuvieron una recuperación de 87,06 %, un coeficiente de variación de 4,99 % y una sensibilidad de 0,1 µg mL<sup>-1</sup>.

*Ghidini, S y cols (2002)* señalaron que la detección de residuos antimicrobianos en leche se realiza usualmente en dos pasos: primero se utiliza un método microbiano, enzimático o basado en un receptor como herramienta para investigar si hay antibióticos presentes y posteriormente las muestras encontradas positivas son confirmadas por un método químico. El método confirmatorio debe ser capaz de detectar la molécula presente en la muestra y realizar su determinación cuantitativa. Usualmente la técnica adoptada como método confirmatorio para residuos de antibióticos es la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, acoplada con un detector ultravioleta (HPLC-UV), sin embargo tiene limitaciones como su baja sensibilidad y selectividad, por lo que necesita muchos pasos de purificación. Señalaron los autores que la *Comisión de Decisión de la EU 93/256* establece que los métodos basados solamente en análisis cromatográfico sin el uso de una detección espectrométrica molecular no son adecuados para usarlos como métodos confirmatorios. Por esto la cromatografía líquida acoplada con espectrómetro de masas (HPLC-MS) debería representar una herramienta altamente sensible y selectiva para detectar residuos de antibióticos en leche sin la necesidad de muchos pasos de purificación. Los autores desarrollaron y validaron un método rápido basado en HPLC-MS/MS y analizaron 53 muestras de leche de bovinos que fueron encontradas positivas mediante un ensayo microbiano.

*Jevinova, P y cols (2003)* compararon la sensibilidad del método de difusión de disco, el ensayo Four-plate test (FPT), y el método HPLC para la determinación de residuos de oxitetraciclina en leche. Para ello recolectaron muestras simples de seis vacas con mastitis las cuales fueron tratadas, intramamariamente con oximicoína durante 5 días. Se analizó la presencia de residuos del antibiótico en muestras de leche tomadas a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas después de la administración de la droga. El mayor promedio de concentración fue de 195,68 mg Kg<sup>-1</sup> de oxitetraciclina, y fue detectado por el método de HPLC el último día de terapia (5 días después de la administración de la droga). Usando el ensayo microbiológico con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 en muestras de leche antes de la primera administración de la droga (0 h) se detectaron dos positivos. Cuando las mismas muestras fueron probadas con la membrana de diálisis se obtuvieron resultados negativos. Como puede observarse de los resultados de este estudio, muestras de leche que resultaron positivas a la presencia de antibióticos mediante el empleo del método de HPLC y en las cuales las concentraciones de residuos del antibiótico excedieron los MRLs, no siempre produjeron los mismos resultados a través del ensayo de difusión de agar con *Bac. stearothermophilus*.

*Gomis, D. y cols (2004)* describieron un método para la determinación simultánea de espiramicina y josamicina en leche mediante HPLC en fase reversa. La extracción de los antibióticos se llevó a cabo usando una extracción líquido-líquido. Posteriormente se trató con ciclohexa-1,3-diona en *buffer* de acetato de amonio (pH 7,0) durante 60 min a 90 °C. El derivado fue pasado sobre una columna de octadecilsilano a 45 °C. La separación se realizó usando una fase móvil consistente en una mezcla de acetonitrilo-metanol-*buffer* fosfato (pH 6,0). La detección por fluorescencia se efectuó empleando 375 nm como longitud de onda de excitación y 450 nm como longitud de onda de emisión. El método mostró linealidad entre 50 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Las recuperaciones fueron cerca del 90 % y el límite de detección fue 8 y 13  $\mu\text{g L}^{-1}$  para la espiramicina y la josamicina, respectivamente.

*García-Mayor, M. y cols. (2006)*, desarrollaron un método simple y sensible mediante HPLC-DAD, para la determinación simultánea de siete macrólidos (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, josamicina, espiramicina, tilosina e ivermectina) en leche de oveja. Optimizaron las condiciones de operación de la columna, fase móvil, temperatura y velocidad de flujo, para proporcionar la mejor resolución de esos analitos. La extracción de los residuos de antibióticos involucró el tratamiento de muestras libres de proteínas con una combinación de hidróxido de sodio concentrado y acetato de etilo. Fue necesario realizar la eliminación de la grasa por hidrólisis alcalina. Las recuperaciones obtenidas de cada antibiótico fueron entre 55-77 %, con desviaciones estándar relativas en el rango de 1-6,5 %. El límite de cuantificación fue de 72,4  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para la ivermectina, 48,3  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para la roxitromicina, y 24,1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para la eritromicina, oleandomicina, espiramicina, josamicina y tilosina. El procedimiento fue usado exitosamente en la determinación del multiresiduo de esos macrólidos a niveles por debajo de las concentraciones máximas de las concentraciones legalmente permitidas en muestras de leche de oveja.

*Brito, R., y col. (2006)* desarrollaron un método cromatográfico para analizar residuos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en leche. Las muestras de leche fueron enriquecidas con las disoluciones estándar de antibiótico y luego se desproteinizaron. El extracto se limpió en cartuchos  $\text{C}_{18}$  para la extracción en fase sólida, los antibióticos se eluyeron con acetonitrilo: agua (50:50 v/v) y fueron modificados con anhídrido acético y una solución de 1-metilimidazol conteniendo  $\text{HgCl}_2$ . El análisis cromatográfico se realizó en una columna  $\text{C}_{18}$  usando una fase móvil compuesta de tampón fosfato y acetonitrilo (pH 6,5) en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y la detección se efectuó a 325 nm. El método fue selectivo para la ampicilina G, la penicilina y la penicilina V, el último utilizado como estándar interno. El promedio de recuperación para la ampicilina y la penicilina G fue de 60,0- 104,9% y de 82,7-109,2%, respectivamente, con coeficientes de variación del 11,1% al 24,6% y del 2,1% al 25,2%, lo que indica exactitud y precisión. El límite de detección encontrado fue de 4,0  $\text{mg L}^{-1}$  para la ampicilina y de 3,0  $\text{mg L}^{-1}$  para la penicilina G.

Un método fue desarrollado por *Vinod, K., y cols (2010)* para la estimación simultánea de sulbactam y cefoperazona en forma de dosis y en plasma usando ornidazol como estándar interno. Utilizaron una columna de hexilo phenomenex fenil (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) y un sistema de gradiente de fase móvil compuesta por *buffer* acetonitrilofosfato (fosfato de sodio, 20 mM) (65:35 v/v) pH 3,5 ajustado con ácido fosfórico. La validación del método se llevó en términos de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, resistencia y límite de detección y cuantificación. Se encontraron rangos lineales entre 10 - 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para el sulbactame y 10 - 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para la cefoperazona. El límite de detección y cuantificación de sulbactame fue de 50 ng mL<sup>-1</sup> y 300 ng mL<sup>-1</sup> y para la cefoperazona de 50 ng mL<sup>-1</sup> y 400 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Señalaron los autores que el método desarrollado se puede utilizar para el análisis de rutina de estas drogas en el plasma, así como para laboratorios de control de calidad.

*Roca, M., y cols. (2011)* evaluaron el efecto de tratamientos térmicos de los residuos de  $\beta$ -lactámicos en leche, para calcular los parámetros cinéticos de la degradación de estos antibióticos en leche y para desarrollar modelos de predicción para estimar las pérdidas de concentración de estos compuestos en los tratamientos convencionales de calor lácteos. Para ello, emplearon método cuantitativo de HPLC para calcular las pérdidas en concentraciones de 10 antibióticos  $\beta$ -lactámicos en leche con diferentes combinaciones de temperatura y tiempo. El aumento de la temperatura de 60 °C a 100 °C disminuyó la vida media de amoxicilina (372 a 50 min), ampicilina (741 a 26 min), cloxacilina (367 a 46 min), y la penicilina G (382 a 43 min). Estos aumentos de la temperatura causaron una mayor degradación de las cefalosporinas, que fue acompañada de una disminución de los tiempos de vida media para llegar a valores muy bajos, por ejemplo, 4, 5 y 6 minutos de cefoperazona, cefurexima y cefapirina, respectivamente. Los tratamientos térmicos a altas temperaturas y largos tiempos (por ejemplo, 120 °C durante 20 minutos) dieron lugar a una mayor degradación de  $\beta$ -lactámicos, con porcentajes cercanos al 100% para el caso de cefoperazona y cefurexima. Por el contrario, cuando la leche se sometió a tratamientos térmicos a temperaturas más bajas y tiempos cortos (por ejemplo, 72 °C durante 15 segundos), la degradación de  $\beta$ -lactámicos en leche no superó el 1% para los 10 antibióticos probados.

*Mei-Ratliff, Y (2012)* determinó el antibiótico oxitetraciclina en muestras de leche comercial a las que le añadió el analito, limpiándolo y concentrándolo por medio de columnas de extracción en fase sólida y posteriormente cuantificando al analito por HPLC equipado con un detector UV. El método fue exitosamente utilizado para determinar concentraciones de oxitetraciclina a 50  $\mu$ g g<sup>-1</sup>, mostrando una DER de 18 % y un porcentaje de error de -1%.

*Ángeles, J y cols. (2012)* desarrollaron y validaron un método por HPLC para la determinación de rifaximina en leche de vaca, utilizando metanol y acetato de amonio como fases móviles, una columna C<sub>18</sub> y un detector UV. Se observó una linealidad del método con valores de R<sup>2</sup> de 0,99,



un porcentaje de recuperación cercano al 54 %, una alta especificidad y las sustancias interferentes no afectaron el análisis. El límite de detección fue de 30 ng mL<sup>-1</sup> y el límite de cuantificación fue de 150 ng mL<sup>-1</sup>.

*Cámara, M y cols. (2013)* determinaron simultáneamente nueve antibióticos β-lactámicos en leche de oveja. Utilizando un HPLC con detector de diodos lograron determinar ampicilina, bencilpenicilina, cefalexina, cefazolina, cefoperazona, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina y fenoximetilpenicilina. La muestra fue desproteínizada con acetonitrilo, centrifugada y luego sometida a extracción y limpieza mediante SPE. Las recuperaciones de los antibióticos estudiados se encontraron en el rango de 79-96 % con desviaciones estándar relativas entre 0,5-4,9 %, los límites de cuantificación estuvieron en el rango de 3,4-8,6 µg Kg<sup>-1</sup>, lo cual es menor a los límites de residuo máximo establecidos por la Unión Europea para los antibióticos estudiados, haciendo que el método sea adecuado para análisis de rutina.

*Tona, G y col. (2014)*, investigaron los niveles de tetraciclina en leche de vaca, leche de cabra, grasa de mantequilla, queso suave y muestras de yogurt, utilizando métodos estándares para su detección y cuantificación por HPLC, encontrando promedios de : 0,0032 ± 0,0018 ppm (leche de vaca), 0,0040 ± 0,0011 ppm (leche de cabra), 0,0020 ± 0,0008 ppm (grasa de mantequilla), 0,0080 ± 0,0034 ppm (queso suave) y 0,0019 ± 0,0008 ppm (yogurt), revelando esto que el procesamiento de la leche de vaca no eliminó la tetraciclina. Los niveles de los residuos del antibiótico fueron menores a los MRL de 0,1 ppm establecidos por la Unión Europea, por lo que eran seguros para el consumo humano.

*Arroyo-Manzanares, N y cols. (2014)*, presentaron dos tratamientos de muestra (microextracción líquido-líquido dispersiva, DLLME, y QuEChERS), para la determinación de 9 sulfonamidas en muestras de leche, y mostraron que son métodos alternativos útiles para la limpieza de muestras complejas. Fueron evaluados y comparados en términos de eficiencia, sensibilidad y precisión usando HPLC con detección de fluorescencia empleando un paso previo de derivatización con fluorescamina. Obtuvieron recuperaciones comprendidas entre el 90,8 al 104,7 % y 83,6 a 104,8 % para DLLME y QuEChERS respectivamente. Los límites de detección fueron menores a 1,21 µg L<sup>-1</sup> y 2,73 µg L<sup>-1</sup> para DLLME y QuEChERS, respectivamente. La precisión, en términos de repetibilidad y precisión intermedia fue menor al 10 % en todos los casos.

Es evidente, por tanto, que los métodos cromatográficos son los más efectivos para la determinación cuantitativa de este tipo de antibióticos. Sin embargo, en ocasiones, tal y como se ha comentado ya en esta memoria, estas técnicas no proporcionan los límites de detección necesarios para cumplir con las exigentes regulaciones actuales lo que hace que sea necesario el empleo de técnicas de preconcentración previas al análisis cromatográfico.



## 5. Validación de Métodos Analíticos

Una vez que se ha desarrollado un método analítico es necesario constatar que el mismo pueda ser utilizado con confianza en cualquier laboratorio a nivel mundial y que sus resultados sean fiables. Para ello es necesario llevar a cabo la validación del método desarrollado.

En la USP 30, en el capítulo referente a la “*Validación de Métodos Compendiados*”, se define validación como:

*“Validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de funcionamiento del método cumple los requisitos propuestos por las aplicaciones analíticas”.*

A través de un sistema de validación se recogen y analizan las evidencias que sustentan la completa eficiencia de un método analítico. Frecuentemente se utiliza el análisis estadístico, como por ejemplo el análisis de regresión lineal y la desviación estándar relativa (DER) de los datos de los métodos de validación, para demostrar la validez del mismo (*Miller, J y col. 2002*).

Los procedimientos estadísticos para el análisis de los datos de validación deben determinarse antes de comenzar cualquier estudio de validación, así como el procedimiento seguido, incluyendo la cantidad de datos adquiridos y el criterio usado para determinar la aceptabilidad del procedimiento analítico.

También se incluyen los equipos, instrumentos y aparatos que son utilizados en los métodos de análisis a los cuales es importante evaluar para determinar las variaciones potenciales que pueden ocurrir durante el desarrollo del análisis, además de su calibración y mantenimiento preventivo periódico.

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. Señala la Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) en su *Guía para la validación de métodos analíticos para constituyentes activos, productos químicos para la agricultura y la veterinaria (2004)*, que el objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que el procedimiento, cuando se aplica adecuadamente, produce resultados que se ajustan al propósito del método.

Las características típicas de ejecución que deberían considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.-** Características analíticas típicas usadas en métodos de validación.

Características analíticas usadas en los métodos de validación
Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Linealidad
Rango
Robustez
Reproducibilidad

Estas características representativas se expresan en términos de parámetros analíticos, que son los siguientes:

### **Exactitud**

La *exactitud* se define como el acercamiento de los resultados experimentales obtenidos, al valor verdadero. Se expresa como el porcentaje de recuperación por el ensayo de cantidades conocidas adicionadas al analito.

En el caso de un ensayo de una droga o un determinado compuesto, la exactitud puede determinarse aplicando el método analítico a un analito de pureza conocida (utilizando por ejemplo un estándar de referencia) o por comparación de los resultados del método con aquellos de un segundo método, bien caracterizado, cuya exactitud ha sido bien establecida o definida.

Cuando se trata del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe ensayarse en muestras (de la materia prima o del producto) a la que se ha añadido cantidades conocidas de impurezas.

Se calcula la exactitud como el porcentaje de recuperación por el ensayo de la cantidad añadida conocida del analito en la muestra, o como la diferencia entre el promedio y el valor aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza.

Los documentos ICH (*International Conference on Harmonization: Informe de Seguridad de la Conferencia Internacional de Armonización*) recomiendan que la exactitud debe ensayarse usando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo un rango especificado (esto es, tres concentraciones y tres réplicas de cada concentración).

## Precisión

La *precisión* de un método analítico se refiere al grado de concordancia entre los resultados individuales de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetitivamente a muestras múltiples o a una muestra homogénea.

La precisión del método, se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión de un método analítico se determina ensayando un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea para calcular estadísticamente los estimados válidos de desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

Los documentos IHC recomiendan que la repetibilidad debería ensayarse usando un mínimo de nueve determinaciones cubriendo el rango especificado para el procedimiento (esto es tres concentraciones y tres réplicas de cada concentración o usando un mínimo de seis determinaciones a 100 % de la concentración del análisis).

## Especificidad

El documento IHC, define *especificidad* como la habilidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que se espera que estén presentes, así como impurezas, productos de degradación, y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico puede ser compensada por otro procedimiento analítico de soporte. Otras autoridades internacionales (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*; AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*) han preferido el término “selectividad” reservando “especificidad” para aquellos procedimientos que son completamente selectivos.

## Límite de detección

El *límite de detección* es un parámetro de prueba límite. Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas.

En la *Guidance for Industry, (FDA, 2011)*, en relación al límite de detección (LOD), se calcula primeramente la altura del pico en el límite de detección ( $Y_{LOD}$ ) como 3 veces la desviación estándar. Posteriormente estos valores de altura del pico, son usados para calcular las concentraciones asociadas con estas alturas del pico. Los valores calculados expresados en términos de la concentración de la solución deben convertirse a la concentración efectiva en la matriz.

## Límite de cuantificación

El *límite de cuantificación* es un parámetro para ensayos cuantitativos de bajos niveles de compuestos en matrices de muestras, tales como impurezas en muestras activas o productos de degradación en productos terminados. Es la concentración de muestra en un analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.

En la Guidance for Industry, (FDA, 2011), para determinar el límite de cuantificación (LOQ), se calcula primeramente la altura del pico para el límite de cuantificación ( $Y_{LOQ}$ ) como 10 veces la desviación estándar y posteriormente estos valores son usados para calcular las concentraciones asociadas con estas alturas del pico. Los valores calculados expresados en términos de la concentración de la solución deben convertirse a la concentración efectiva en la matriz.

## Linealidad

Es la habilidad del método para obtener resultados en la prueba proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado que resultan directamente o mediante una transformación matemática bien definida. Generalmente se expresa en términos alrededor de la pendiente de regresión lineal, calculada de acuerdo a una relación matemática establecida de los resultados obtenidos de la prueba al analizar muestras de concentración variable al analito.

## Rango

Es el intervalo entre el nivel más alto y más bajo del analito en el que se ha demostrado que puede ser determinado con exactitud, precisión y linealidad, tal y como lo indica el método. Normalmente se expresa en las mismas unidades que los resultados de la prueba en el método analítico.

## Robustez

Es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un índice de su confiabilidad durante su uso.

## Reproducibilidad

Es el grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba obtenidos por el análisis de una misma muestra bajo una variación de las condiciones normales de prueba, tales como diferentes

laboratorios, analistas, ensayos, temperaturas, lotes de reactivos, días, etc. Es una medida de la reproducibilidad de los datos de la prueba bajo las condiciones operacionales normalmente esperadas de laboratorio a laboratorio y de analista a analista.

La evaluación o no de los parámetros arriba mencionados dependerá del tipo de información que se quiera obtener de dicha validación, es decir del objetivo perseguido. Según la *Food and Drug Administration (FDA) (2000)*, en “*Guidance for Industry*”, se tienen distintas características de validación para varios tipos de ensayos.

La siguiente tabla es un resumen de las características de validación que deberían ser verificadas durante una validación de diferentes procedimientos analíticos.

**Tabla 4.** Características de validación recomendadas de varios tipos de ensayos.

Tipo de ensayo /Características	Identificación	Ensayo para Impurezas		Prueba. Disolución (Medición solamente, Contenido/Potencia)	Ensayos específicos
		Cuantitativo	Límite		
Exactitud	-	+	-	+	+4
Precisión-Repetibilidad	-	+	-	+	+4
Precisión-Precisión Intermedia	-	+1	-	+1	+4
Especificidad	+2	+	+	+5	+4
Límite de Detección	-	-3	+	-	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-	-
Linealidad	-	+	-	+	-
Rango	-	+	-	+	-
Reproducibilidad	-	+	-3	+	+4

**NOTA:**

- Significa que esta característica no es usualmente evaluada

+ Significa que esta característica es usualmente evaluada.

1 En casos donde la reproducibilidad ha sido realizada la precisión intermedia no es necesaria.

2 Carencia de especificidad para un procedimiento analítico puede ser compensada por la adición de un segundo procedimiento analítico.

3 Puede ser necesaria en algunos casos.

4 Puede no ser necesaria en algunos casos

5 Carencia de especificidad para un ensayo para liberación puede ser compensada por un ensayo de impurezas.



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---





En la actualidad se utilizan antibióticos para combatir las enfermedades de los animales de granja y mejorar su crecimiento. Esto ha originado que se detecte su presencia a niveles traza en muestras de alimentos tales como la leche de vaca.

Debido a su negativo impacto en la salud humana, distintos organismos oficiales en los últimos años han establecido niveles máximos permisibles de algunos de ellos. Así, la Unión Europea en su *Reglamento del Consejo 90/2377/CEE* establece una máxima concentración permitida de antibióticos macrólidos y  $\beta$ -lactámicos en leche.

La necesidad de controlar la presencia de estos antibióticos a niveles de  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  en productos alimentarios tales como leche y sus derivados, requiere disponer de métodos analíticos sensibles y selectivos capaces de alcanzar los límites requeridos por la legislación vigente (*Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, Commission of the European Communities, 2002*).

En la actualidad, los métodos de análisis más empleados para la determinación de estos compuestos son los métodos cromatográficos (HPLC, CG) con distintos detectores.

La leche completa de vaca es una matriz biológica compleja, conformada entre otros por proteínas, carbohidratos y ácidos grasos que a menudo afectan la separación de los compuestos de interés analítico, dado que se incrementa el ruido en la línea base e imposibilita la determinación de niveles trazas de los analitos. Además, los componentes de la matriz de la muestra alimentaria pueden reducir considerablemente la vida de las columnas de separación y dañar las distintas partes de la instrumentación cromatográfica.

La acertada elección del método de preparación de las muestras, el modo de separación y la técnica empleada para la detección del analito pueden proporcionar un apoyo significativo a los problemas asociados con la determinación y cuantificación de antibióticos macrólidos y  $\beta$ -lactámicos en muestras complejas de alimentos como la leche.

Las técnicas clásicas de extracción hoy en día empleadas, como la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida usando adsorbentes de sílica, presentan una serie de problemas: tiempos y volúmenes elevados para lograr unas recuperaciones reproducibles, y falta de selectividad. En este sentido, el empleo de los polímeros de impresión o impronta molecular como rellenos en los cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE) está mostrando unas cualidades prometedoras como adsorbentes destinados a la extracción de compuestos específicos.

El estado actual del tema justifica plenamente el que el objetivo prioritario de este trabajo de investigación se centre en la búsqueda de nuevas estrategias y alternativas a los métodos de tratamiento de muestra tradicionales ya existentes, para el desarrollo de metodologías sencillas, rápidas y de bajo coste, que permitan la determinación de antibióticos macrólidos y  $\beta$ -lactámicos

en muestras de leche de diferente procedencia (vaca y oveja), y que puedan aplicarse en análisis de rutina en cualquier laboratorio o industria lechera.

Los diferentes métodos de tratamiento de muestra se basarán en el empleo de polímeros de impronta molecular selectivos para el antibiótico eritromicina (ERY), del grupo de los macrólidos, y para el antibiótico ampicilina (AMP), del grupo de los  $\beta$ -lactámicos. Serán utilizados como soportes sólidos en el proceso de extracción en fase sólida, optimizando los procesos de extracción, para su posterior cuantificación mediante la técnica de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector UV-Visible.

Para alcanzar estos propósitos, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un polímero de impronta molecular selectivo para el antibiótico eritromicina.
- Sintetizar y evaluar diferentes MIPs para la eritromicina (ERY-MIPs) y sus correspondientes polímeros no impresos, empleando diferentes estrategias de polimerización.
- Desarrollar la metodología de extracción en fase sólida utilizando el polímero de impresión molecular como adsorbente (MIPSPE) para la extracción selectiva de ERY en muestras de leche de oveja, empleando como técnica de medida la cromatografía de líquidos (HPLC-DAD).
- Desarrollar un polímero de impronta molecular selectivo para el antibiótico ampicilina.
- Sintetizar diferentes MIPs para la ampicilina (AMP-MIPs) y sus correspondientes polímeros no impresos (AMP-NIPs), empleando diferentes monómeros y relaciones molares.
- Caracterizar estructuralmente los AMP-polímeros sintetizados, empleando la técnica IR-TF.
- Caracterizar y evaluar analíticamente los AMP-polímeros, utilizándose en la fase adsorbente de un proceso de extracción en fase sólida convencional.
- Desarrollar la metodología de extracción en fase sólida utilizando el polímero de impresión molecular como adsorbente (MIPSPE) para la extracción selectiva de AMP en muestras de leche de vaca, empleando como técnica de medida la cromatografía de líquidos (HPLC-UV).
- Validar las metodologías desarrolladas, ERY-MISPE y AMP-MISPE, llevando a cabo estudios de linealidad, exactitud, precisión, y sensibilidad en las condiciones óptimas.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---



### III.A. DETERMINACIÓN DE ERITROMICINA EN MUESTRAS DE LECHE DE OVEJA

---

“OCURRENCE OF ERYTHROMYCIN RESIDUES IN SHEEP MILK. VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD”.

M. A. García-Mayor, G. Paniagua-González, B. Soledad-Rodríguez, R. M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando, J. S. Durand-Alegría.

***Food and Chemical Toxicology* (2015) 78: 26-32**



En este trabajo de investigación se ha llevado a cabo el desarrollo y puesta a punto de una metodología de tratamiento de muestra para la determinación del antibiótico eritromicina (ERY) en muestras de leche de oveja. Se han empleado polímeros de impresión molecular, los cuáles han sido utilizados como fase adsorbente de un proceso convencional de extracción en fase sólida.

Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de varios polímeros de impronta molecular específicos para este antibiótico utilizando diferentes condiciones de síntesis.

Posteriormente, mediante la caracterización estructural y pruebas de fijación/elución, se seleccionó el polímero más efectivo para ser utilizado en un proceso de extracción en fase sólida, de forma selectiva hacía el analito de interés, la eritromicina.

Tras obtener las condiciones óptimas de fijación y elución se desarrolló el método para la determinación de eritromicina en muestras de leche de oveja. Dada la complejidad de la matriz de la muestra seleccionada, fue necesario llevar a cabo un paso previo de desproteinización de la misma, mediante la adición de una mezcla de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : ACN (3:2, pH 7) y acetonitrilo (un volumen total de 4 mL).

Se llevó a cabo un estudio de interferencias, en el que se estudió la especificidad del MIP considerado como óptimo frente a otros antibióticos de la misma familia de los macrólidos y estructuralmente similares, tales como tilosina, espiramicina, josamicina, roxitromicina e ivermectina. Los resultados obtenidos revelaron que el polímero utilizado presenta una gran especificidad hacía la eritromicina, puesto que las recuperaciones obtenidas para el resto de los compuestos estudiados fueron menores del 35 %, en todos los casos.

El método completo desarrollado fue validado empleando muestras de leche de oveja libre de antibióticos suplementada, en términos de exactitud, precisión, linealidad, y límite de cuantificación. Se obtuvieron recuperaciones mayores del 95 % a tres niveles de concentración, con valores de desviación estándar menores del 2 %. Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad ofrecieron recuperaciones comprendidas entre 91,2-99,7 %, con desviaciones estándar menores del 5 %, en todos los casos. El método desarrollado es lineal en el intervalo 24 - 965  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . El límite de cuantificación obtenido fue de 24,1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , por debajo del límite máximo de residuos de ERY establecido por la legislación (40  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

El desarrollo experimental de esta parte de la Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en colaboración con miembros del Grupo de Investigación del Departamento de Ciencias Analíticas de la UNED, el cual ha dado lugar a un artículo, que actualmente ya ha sido publicado en la revista *Food and Chemistry Toxicology*, indexada en el *Journal Citation Reports* (JCR), con un elevado índice de impacto, con lo que en esta memoria no se tratará en profundidad.





## 1. MATERIALES Y REACTIVOS

### 1.1 Instrumentación y equipamiento

Los distintos equipos, instrumentos y materiales utilizados en la parte experimental de este trabajo se detallan a continuación:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Agilent Technologies modelo 1200, provisto de una bomba cuaternaria, auto muestreador, y detector de diodos (Agilent Technologies)
- Columna C18 Prontosil (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)
- Lámpara ultravioleta, Vilber Lourmat CN-6T
- Baño de agua controlado por Termostato Digiterm 3000542
- pH metro Metrohm 654
- Extractor Soxhlet con dedales de extracción de celulosa
- Mortero de vidrio
- Tamices CISA de 200-355  $\mu$ m, Afora
- Sistema de vacío para SPE de 20 puertos
- Sistema de control de vacío, Selecta
- Cartuchos vacíos de SPE de 3 mL de capacidad con polietileno fritado,

### 1.2 Reactivos

Los distintos reactivos que se han utilizado para el desarrollo de esta investigación y su procedencia se detallan a continuación.

- Ácido metacrílico, Merck
- Etilenglicol dimetacrilato, Merck
- 2-2'-azobisisobutironitrilo (AIBN), Fluka
- Eritromicina, Sigma Aldrich
- Hemitartrato de tilosina, Sigma Aldrich
- Espiramicina, Sigma Aldrich
- Josamicina, Sigma Aldrich
- Roxitromicina, Sigma Aldrich
- Ivermectina, Sigma Aldrich
- Fosfato monobásico de sodio, Sigma Aldrich
- Hidróxido de sodio, pureza > 99 %, Merck
- n-hexano, pureza > 99 %, Merck
- Metanol, grado HPLC, Scharlab
- Acetonitrilo, grado HPLC, Scharlab
- Agua ultrapura, resistividad de 18  $M\Omega \cdot cm$ , (sistema de agua Milli Q, Millipore Ibérica)

### 1.3. Disoluciones

#### Disolución patrón de eritromicina

La disolución patrón de eritromicina se preparó diariamente disolviendo la cantidad apropiada de eritromicina en la cantidad adecuada del diluyente, en función del ensayo realizado.

### **Disolución de fosfato monobásico de sodio 25 mM a pH 7 con acetonitrilo**

Se preparó una mezcla de fosfato monobásico de sodio 25 mM a pH 7 con acetonitrilo (70:30 v/v).

### **Fase móvil para el proceso cromatográfico**

- Se preparó disolviendo 5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 500 mL de agua con calidad Milli-Q y se utilizó hidróxido de sodio para ajustar el pH a 7. La solución fue filtrada a través de un filtro de membrana celulósica de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### **1.4 Muestras**

Las muestras utilizadas en esta parte de la Tesis Doctoral que se presenta son muestras de leche de oveja, recolectadas en el mismo estado de lactación de las hembras y proporcionadas por el CERSYRA, Centro Regional de Selección Animal y de Reproducción en Valdepeñas (Ciudad Real, España). Las muestras se refrigeraron y transportaron al laboratorio y se congelaron a - 20 °C hasta su posterior utilización.

## 2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Los procedimientos analíticos desarrollados en esta parte de la Tesis Doctoral que se presenta se describen a continuación.

### 2.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular, MIPs, y sus correspondientes polímeros no impresos, NIPs, han sido sintetizados mediante polimerización “en bloque” empleando radiación ultravioleta.

Para la síntesis de los MIPs,  $2 \times 10^{-2}$  mmol de eritromicina fueron disueltos en 7 mL de acetonitrilo en un tubo de vidrio de 25 mL e introducidos en un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Seguidamente se agregaron 2,0 mmol del monómero funcional (ácido metacrílico), 10 mmol del entrecruzante (etilenglicol dimetacrilato), y 5,1 mmol del iniciador de radicales 2-2'-azobisisobutironitrilo. La mezcla se purgó con nitrógeno durante 10 minutos. El tubo de vidrio se colocó bajo luz ultravioleta a 235 nm a 5 °C durante 3 h (MIP 1), o en un baño de agua con temperatura controlada por termostato a 65 °C durante 5 horas (MIP 2). El polímero monolítico obtenido fue triturado en un mortero de vidrio y tamizado hasta obtener partículas de tamaño comprendido entre 200 - 355  $\mu\text{m}$ , adecuadas para la evaluación del MIP mediante un proceso SPE. Finalmente, el template o molécula molde y los compuestos no polimerizados fueron eliminados por extracción en Soxhlet con 80 mL de metanol durante 25 h, hasta que no se detectó la presencia de eritromicina en los extractos recogidos. La determinación analítica se realizó mediante HPLC-DAD. Los polímeros no impresos (NIPs) fueron preparados bajo condiciones idénticas excepto por la adición del analito, que actúa como molécula molde.

### 2.2 Pretratamiento de las muestras de leche

Las muestras de leche de oveja se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron calentando a 35 °C durante 5 minutos. Una alícuota de 1 mL de leche homogeneizada fue fortificada con la cantidad adecuada de eritromicina, mezclada con agitación manual y mantenida a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir el equilibrio del macróido con la matriz de la muestra de leche. Se añadió una mezcla de 4 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : ACN (3:2, pH 7) y simultáneamente 1 mL de acetonitrilo para precipitar las proteínas. La muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 1200 rpm y filtrada antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción en fase sólida.

### 2.3 Procedimiento cromatográfico de determinación y cuantificación de los antibióticos macrólidos

La separación cromatográfica de los analitos se realizó en una columna Prontosil C 18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), utilizando un programa de gradiente con la fase móvil, combinando el disolvente A (disolución buffer fosfato 25 mM, pH 7) con el disolvente B (acetonitrilo) como sigue: 50 % B (3 minutos) a 1 mL min<sup>-1</sup>, 58 % B (8 minutos) a 1,2 mL min<sup>-1</sup> y 70 % B (20 minutos) a 1,5 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura de la columna se mantuvo a 60 °C, el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L y todos los compuestos se eluyeron en 30 minutos. Las longitudes de onda del detector UV se fijaron a 210 nm para la eritromicina y roxitromicina, a 231 nm para josamicina y espiramicina, a 254 nm para ivermectina y a 287 nm para la tilosina. La cuantificación se efectuó utilizando una calibración externa y midiendo el área de los picos.

### 2.4 Optimización del método MISPE

Se llevaron a cabo estudios de unión de los polímeros sintetizados (MIP 1 y MIP 2) en diferentes disolventes con la finalidad de seleccionar el polímero más adecuado para ser utilizado como adsorbente en el método MISPE para la determinación selectiva de eritromicina.

Para ello, una cantidad de 200 mg de polímero impreso y no-impreso se empaquetó separadamente en cartuchos vacíos de SPE de 3 mL entre dos fritas (longitud de 65 mm y 10 mm de diámetro). Para favorecer el paso de flujo a través de los cartuchos, éstos se colocaron en una caja de alto vacío, la cual cuenta con capacidad para 20 cartuchos y trabaja a un flujo de 0,7-1,0 mL min<sup>-1</sup>. Los cartuchos MISPE fueron acondicionados con 3x2 mL de metanol y 3x2 mL de acetonitrilo. La etapa de la carga se llevó a cabo empleando 1 mL de muestra de leche previamente desproteinizada. Previo al paso de elución, se eliminó la grasa añadiendo 6x1 mL de hexano. Se eluyó el analito usando 3x2 mL de metanol con 0.5 % de ácido acético. Los eluatos fueron evaporados a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 40 °C. El residuo fue redisolto con un volumen adecuado de la mezcla de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM a pH 7: acetonitrilo (70:30 v/v) y se analizó por HPLC-DAD utilizando el método descrito anteriormente. Finalmente, el polímero fue regenerado haciendo pasar a su través 3x2 mL de metanol y 3x2 mL de acetonitrilo, quedando así preparado para el siguiente ensayo.

### 2.5 Estudio de selectividad del método MISPE

Se ha llevado a cabo un estudio de la selectividad del método MISPE desarrollado. Para ello, se han realizado ensayos para determinar el comportamiento del MISPE frente a otros antibióticos de la familia de los macrólidos y de estructura similar a la eritromicina, tales como josamicina, espiramicina, roxitromicina, ivermectina y hemitartrato de tilosina.

Para los estudios de interferencia, se evaluaron las recuperaciones de los antibióticos macrólidos a tres niveles de concentración: nivel bajo (josamicina, espiramicina ivermectina y tilosina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y, eritromicina y rositromicina a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), nivel medio ( $5:50 \text{ mg L}^{-1}$ ), y nivel alto (2,5:  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se describen los resultados obtenidos en las diferentes etapas de este trabajo de investigación cuyo objetivo fundamental es desarrollar sistemas alternativos de tratamiento de muestra para la determinación de residuos de antibióticos macrólidos, basados en el empleo de polímeros de impresión molecular (MIPs) capaces de preconcentrar y extraer de forma selectiva los antibióticos de esta familia de muestras de leche.

#### 3.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular

##### 3.1.1 Síntesis y evaluación de los MIPs y NIPs

En esta investigación se ha llevado a cabo la síntesis de 2 polímeros de impresión molecular, MIPs, mediante la técnica de polimerización en bloque e impresión no covalente, utilizando luz ultravioleta en frío (MIP 1), o en un baño de agua con temperatura controlada a 65 °C (MIP 2), siguiendo el procedimiento analítico que se ha descrito en el apartado 2.1 de Procedimientos de la parte experimental.

Se empleó la estrategia de polimerización en bloque ya que es la más sencilla y no requiere de material específico. Como resultado de la polimerización, se obtiene un monolito o bloque (de ahí su nombre), que ha de triturarse y tamizarse hasta obtener partículas de diferente tamaño, dependiendo de la posterior aplicación del polímero. Se usó una alta relación molar de molécula molde: entrecruzante (1:500) para obtener un alto grado de entrecruzamiento y una adecuada rigidez en la matriz del polímero para producir cavidades específicas del tamaño y forma adecuada para preservar la memoria impresa. Se escogió el ácido metacrílico como monómero funcional debido a su habilidad ampliamente reconocida de formar enlaces de hidrógeno y porque el enlazamiento y eliminación de la molécula molde puede realizarse bajo condiciones moderadas.

El disolvente juega un papel importante en la morfología final del polímero, siendo responsable del diámetro del poro e influenciando el reconocimiento de un analito específico. En este trabajo se ha seleccionado acetonitrilo como disolvente porógeno ya que además de ser un buen disolvente de la eritromicina, no interfiere en la formación de puentes de hidrógeno.

Los correspondientes blancos o polímeros no impresos (NIPs) fueron preparados bajo las mismas condiciones pero sin añadir el analito plantilla, con el objetivo de ser utilizados como control.

Con la finalidad de seleccionar el MIP más adecuado para ser utilizado como adsorbente en el proceso SPE, se llevaron a cabo estudios de unión en diferentes disolventes, tales como

cloroformo, acetonitrilo y mezcla  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN (70:30) at pH 7. Estos estudios se llevaron a cabo mediante el procedimiento que se describe en el apartado 2.4, empleando disoluciones de 1 mL de eritromicina con una concentración de 50 mg/L. Las recuperaciones de eritromicina son calculadas como la diferencia entre la cantidad de analito total cargada en el cartucho SPE y la cantidad de analito presente en las fracciones recogidas tras el proceso de carga. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 5.** Recuperaciones de eritromicina (1 mL, 50 mg L<sup>-1</sup>) obtenidas en los estudios de unión en diferentes disolventes: cloroformo, acetonitrilo y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : ACN (70:30, pH 7).

POLÍMERO	RECUPERACIONES ERY (%)		
	Cloroformo	ACN	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : ACN (70:30, pH 7)
NIP1	10 ± 0,9	12 ± 1,7	16 ± 0,7
MIP1	18 ± 1,2	78 ± 1,5	24 ± 3,2
NIP2	9 ± 1,4	4 ± 0,7	9,5 ± 3,1
MIP2	29 ± 0,8	96 ± 1,1	38 ± 1,5

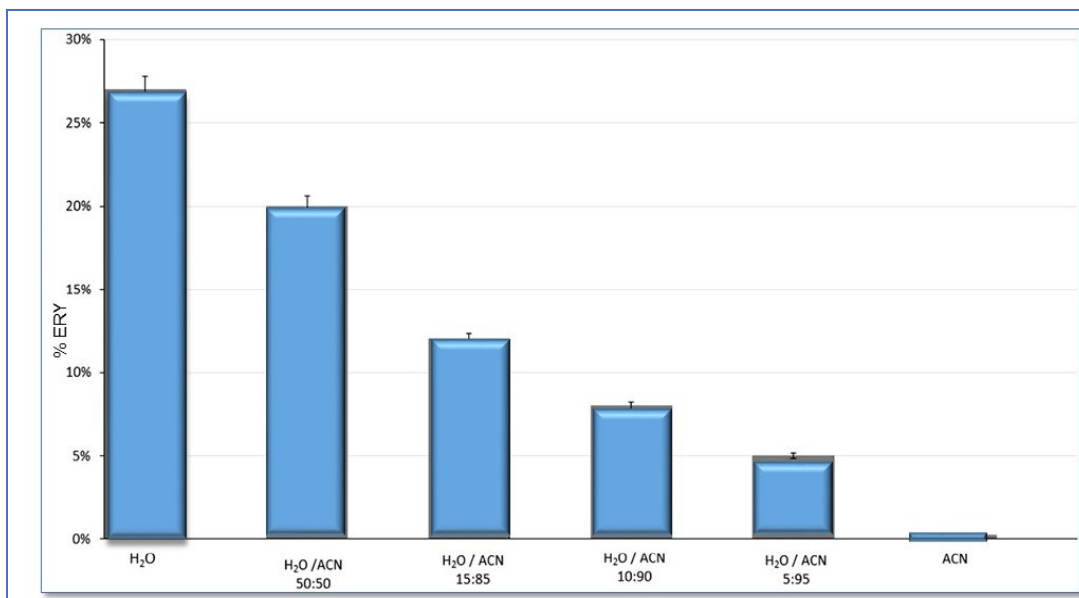
En general, el MIP 2 mostró mejores propiedades de reconocimiento que el MIP 1 en todos los disolventes estudiados y la unión en acetonitrilo proporcionó los mejores resultados, dando una recuperación de eritromicina de 78 % para el MIP 1 y de 96 % para el MIP 2. Las bajas recuperaciones obtenidas para los NIPs (12 % para NIP 1 y 4 % para MIP 2) indicaron que las interacciones entre la molécula molde y los MIPs fueron principalmente específicas, y se seleccionó el MIP 2 como el sorbente óptimo para ser usado en el método de análisis de eritromicina por MISPE.

### 3.1.2 Optimización del MISPE

Para obtener la mejor selectividad y recuperación en el procedimiento MISPE se optimizaron los pasos de lavado y elución.

En primer lugar se optimizó la etapa de lavado, para eliminar las interacciones no específicas. Para ello, se emplearon disoluciones de 1 mL de eritromicina con una concentración de 50 mg/L, y se evaluaron diferentes disolventes de lavado, tales como  $\text{H}_2\text{O}$  y mezclas  $\text{H}_2\text{O}$ /ACN, en distintas proporciones (50-100%), empleando diferentes volúmenes, hasta un máximo de 6 mL. La Figura 17 muestra que los mejores resultados fueron obtenidos cuando el lavado se hizo con acetonitrilo, dando pérdidas de eritromicina menores al 1 %, lo que implica que la eritromicina

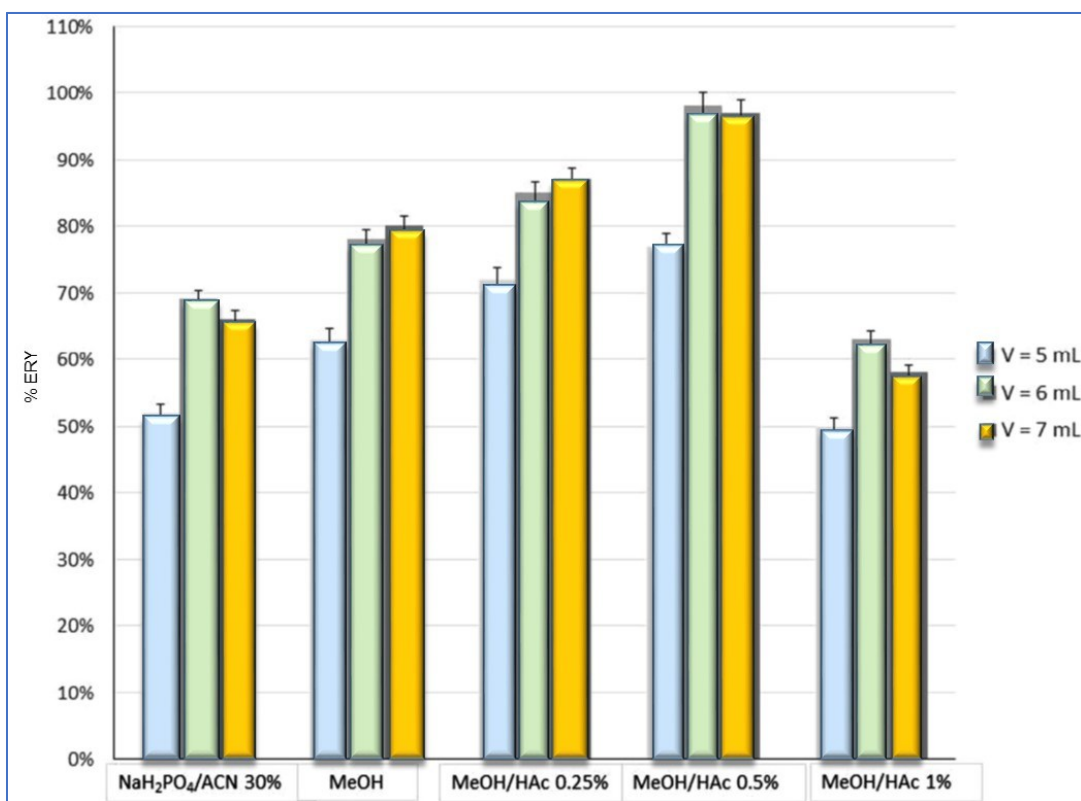
fue retenida completamente en el MIP. Por otra parte, la eritromicina es altamente soluble en agua, cuando la proporción de agua decreció en la disolución de lavado, se retuvo más eritromicina en el cartucho. El volumen óptimo de lavado fue 6 mL de acetonitrilo. Estos resultados demuestran que el MIP exhibió alta afinidad por la eritromicina y confirmó que la adsorción de este compuesto fue debida a los sitios de enlazamientos impresos y no a enlazamiento no específico



**Figura 17.** Recuperaciones de eritromicina obtenidas en las fracciones procedentes de la etapa de lavado, empleando diferentes disolventes, cuando se cargó en cartucho MISPE una disolución de 1 mL de eritromicina de 50 mg L<sup>-1</sup> en ACN.

El siguiente paso fue la optimización de la etapa de elución. Por ello, para asegurar una completa extracción del analito adsorbido por la columna MISPE, es necesario encontrar el eluyente apropiado. La mezcla de metanol con diferentes proporciones de ácido acético ha sido ampliamente utilizada para eluir al analito dado que el ácido acético puede competir con el analito para la funcionalidad del monómero y deteriora los enlaces iónicos que se forman entre ellos. Basados en esta premisa y tomando en consideración que la eritromicina no es estable a pH ácido, se evaluó la eficacia de varios disolventes para la elución de eritromicina, incrementando su polaridad, tales como NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: ACN, 70:30 a pH 7, metanol y metanol conteniendo diferentes porcentajes de ácido acético (0,25., 0,5 y 1 %), así como diferentes volúmenes (5-7 mL). La Figura 18 muestra los resultados obtenidos en términos de porcentaje de recuperación de eritromicina, calculados como la diferencia entre la cantidad total de eritromicina cargada en el cartucho MISPE y la cantidad medida en los eluatos obtenidos tras el proceso de elución





**Figura 18.** Recuperaciones de eritromicina obtenidas en las fracciones procedentes de la etapa de elución, empleando diferentes disolventes y volúmenes cuando se cargó en cartucho MISPE una disolución de 1 mL de eritromicina de 50 mg/L en ACN.

Como puede observarse, con el uso del disolvente menos polar (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: ACN, 70:30 v/v a pH 7) se obtuvo una baja elución de eritromicina (52 %). Los resultados mostraron que la presencia de ácido acético en el disolvente de elución proporcionó las mayores recuperaciones, encontrándose que el disolvente óptimo para la elución fue 0.5 % de ácido acético en metanol, y se necesitó un volumen de 6 mL (2x3 mL) para completar la elución de eritromicina del cartucho. Las interacciones iónicas pueden ser afectadas por la alteración de la fuerza iónica del disolvente y solamente disolventes polares son capaces de competir con la eritromicina por los sitios de enlazamiento permitiendo la rápida desorción del analito enlazado.

### 3.2 Análisis de las muestras de leche

La leche es una matriz altamente compleja que contiene una gran variedad de compuestos (proteínas, azúcares, lípidos, entre otros), que pueden interferir en la eficiencia de preconcentración y recuperación de eritromicina en SPE. Por lo tanto, antes del procedimiento MISPE, se requiere un pre-tratamiento para la eliminación de proteínas de las muestras de leche para evitar bloqueos en el MIP.

En esta etapa de la investigación se estudiaron algunos disolventes o mezclas de disolventes como agentes de precipitación, tales como acetonitrilo, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: acetonitrilo (3:1, 3:2 v/v)

modificando los valores de pH (5, 6, 7) y también fueron evaluados diferentes volúmenes de esas disoluciones (3, 4, 5, 6 mL). Los mejores resultados de precipitación de proteínas se obtuvieron cuando se utilizó una mezcla de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : acetonitrilo (4 mL, 3:2 v/v) a pH 7 más 1 mL de acetonitrilo. Después del paso de precipitación de las proteínas, la muestra de leche estuvo lista para ser analizada por el método MISPE descrito en el apartado 2.4 de Procedimientos, incluyendo el paso adicional de eliminación del contenido de materia grasa y evitar así las interferencias en la determinación.

La eliminación de la materia grasa se llevó a cabo antes de la etapa de lavado y el uso de n-hexano proporcionó extractos limpios y recuperaciones de eritromicina mayores al 95 %. Se alcanzaron resultados óptimos con 6x1 mL de hexano. Se observó que la eliminación de la grasa actuó como un paso de lavado, siendo innecesario un lavado adicional con acetonitrilo, permitiendo que el paso de elución se llevara a cabo inmediatamente después.

El procedimiento de elución óptimo se alcanzó con una mezcla de MeOH/ácido acético conteniendo 0.5 % de ácido acético (3x2 mL). Después que el procedimiento MISPE fue completado, se recogieron los eluatos, se llevaron a sequedad y se reconstituyeron en un volumen de 1 mL en una mezcla de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM a pH 7,0: acetonitrilo (70:30 v/v). Finalmente la eritromicina en el extracto lácteo fue detectada por HPLC-DAD.

### 3.3 Características analíticas del método

Se realizó la validación del método MISPE propuesto para evaluar la exactitud y precisión, su rango lineal y el límite de cuantificación (LOQ), usando muestras de leche fortificadas.

Se evaluó la exactitud, calculando la recuperación obtenida para la eritromicina en el procedimiento MISPE empleando 1 mL de muestra de leche enriquecida a tres niveles de concentración: nivel bajo ( $24,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), nivel medio ( $48,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), y nivel alto ( $482,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Los residuos obtenidos fueron analizados por HPLC-DAD por triplicado. Las recuperaciones obtenidas fueron mayores a 95 % y sus correspondientes desviaciones estándar relativas (RSD) fueron menores al 2 %. La repetibilidad intra e inter día, fue determinada en ensayos por triplicado a niveles de fortificación de  $48,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y  $482,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Las recuperaciones intra-día se encontraron en el rango de 91,2 % a 99,7 % con RSD menores a 2,2 %; para la repetibilidad inter-día las recuperaciones se encontraron en el rango de 92,2 % hasta 98,8 % con RSD menores a 5 %. La linealidad del método con HPLC-DAD se probó en el rango de 24 – 965  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . La curva de calibración fue obtenida preparando mezclas de leche fortificadas por triplicado, conteniendo concentraciones de eritromicina en el rango de trabajo y mostró linealidad ( $y = 0,23 C + 12,36$ ) con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0,9994$ . El límite de cuantificación, calculado como la concentración más baja que es posible cuantificar con un valor de RSD por debajo del 5 %, fue  $24,1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . La Tabla 6 muestra un resumen de las características analíticas.

Los resultados demostraron que la metodología propuesta MISPE-HPLC es sencilla de llevar a cabo y fue exitosamente aplicada para la determinación de eritromicina en leche de oveja a niveles por debajo del límite máximo de residuo establecido por la Unión Europea ( $40 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ).

**Tabla 6.** Características analíticas del método MISPE desarrollado.

Antibiótico	% Recuperación			Inter-día (%)		Intra-día (%)		LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
	Bajo nivel	Medio nivel	Alto nivel	Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
				482,6	48,3	482,6	48,3	
ERY	99,0 $\pm$ 1,7	98,9 $\pm$ 0,9	98,9 $\pm$ 0,7	98,8 $\pm$ 5,0	92,2 $\pm$ 3,4	99,7 $\pm$ 0,8	91,2 $\pm$ 2,2	24,1

### 3.4 Estudio de selectividad

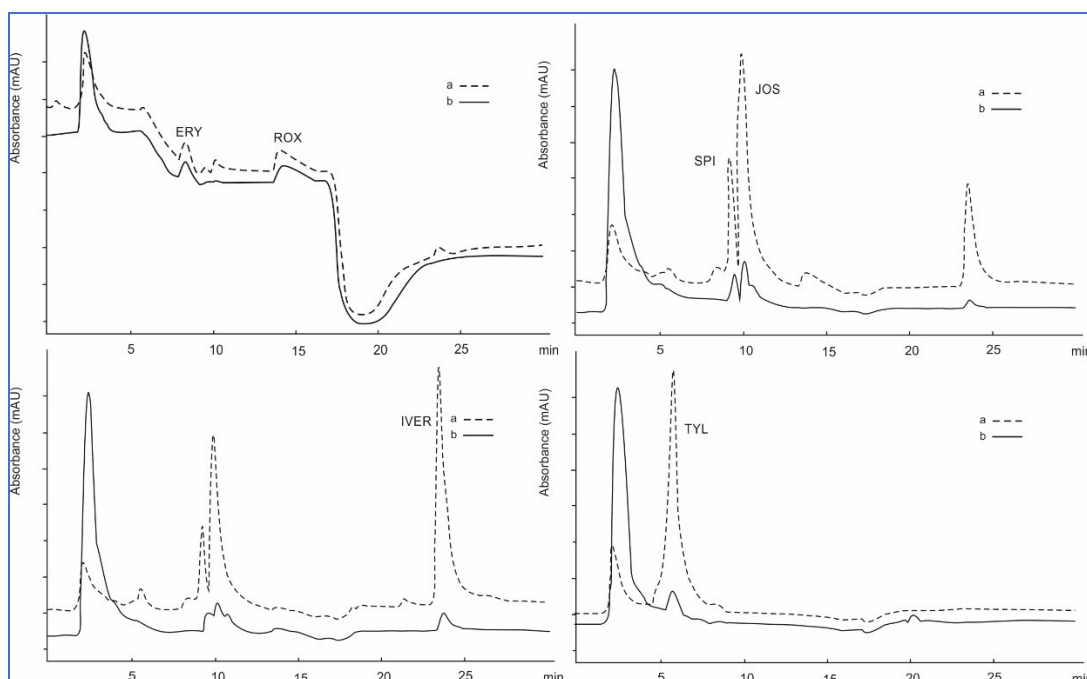
La técnica de impresión molecular permite el diseño de nuevos materiales artificiales de reconocimiento específico. Después de la eliminación de la molécula molde, el MIP muestra una alta selectividad hacia la molécula impresa debido al ordenamiento de los grupos funcionales de las unidades del monómero alrededor de la molécula impresa. Para verificar la selectividad del MISPE hacia la eritromicina, se examinaron otros antibióticos macrólidos con estructuras químicas similares como moléculas competitivas: josamicina, espiramicina, roxitromicina, ivermectina y hemitartrato de tilosina. Para los estudios de interferencia, se ensayó la recuperación de los macrólidos a tres niveles de concentración por el procedimiento MISPE desarrollado: nivel bajo (josamicina, espiramicina, ivermectina y hemitartrato de tilosina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y eritromicina y roxitromicina a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), nivel medio ( $5:50 \text{ mg L}^{-1}$ ) y nivel alto ( $2,5:25 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las recuperaciones obtenidas para josamicina, espiramicina, ivermectina y hemitartrato de tilosina se encontraron entre 15 y 35 %, mientras que para la eritromicina y roxitromicina fueron mayores a 98 y 85 % respectivamente. La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos, en términos de porcentaje de recuperación, calculados como la diferencia entre la cantidad de analito inicial adicionada y la cantidad detectada en los eluatos.

**Tabla 7.** Estudio de selectividad. Porcentajes de recuperación obtenidos para los antibióticos macrólidos estudiados a tres niveles de concentración: Bajo nivel (JOS, SPI, IVER, TYL, 10 mg L<sup>-1</sup> y ERY, ROX, 100 mg L<sup>-1</sup>), nivel medio (5:50 mg L<sup>-1</sup>), nivel alto (2.5:25 mg L<sup>-1</sup>).

Antibiótico	% Recuperación	% Recuperación	% Recuperación
	Bajo nivel	Medio nivel	Alto nivel
ERY	98,3 ± 1,8	98,6 ± 1,2	98,1 ± 0,9
ROX	88,3 ± 2,6	88,7 ± 5,5	84,7 ± 3,2
SPI	35,3 ± 7,4	30,3 ± 1,5	27,3 ± 0,6
JOS	34,3 ± 3,8	35,3 ± 2,5	32,3 ± 4,9
IVER	28,4 ± 1,2	21,0 ± 3,1	28,1 ± 1,2
TYL	14,2 ± 3,3	19,3 ± 5,1	24,3 ± 0,6

La selectividad específica exhibida para la roxitromicina se debe a que ésta tiene una estructura más similar a la eritromicina que los otros antibióticos macrólidos estudiados, sin embargo no hubo interferencia durante la determinación cromatográfica debido a la diferencia entre los tiempos de retención de ambos compuestos. Los resultados demostraron que la columna MIP-SPE exhibió selectividad específica para la eritromicina en presencia de otros compuestos estructuralmente relacionados.

La Figura 19 muestra los cromatogramas obtenidos en el estudio de selectividad a diferentes longitudes de onda para poder determinar cuantitativamente los 6 macrólidos estudiado.



**Figura 19.** Cromatogramas obtenidos para los 6 antibióticos macrólidos estudiados a un nivel de concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> para ERY y ROX, 5 mg L<sup>-1</sup> para JOS, SPI, IVER y TYL: (a) Mezcla de patrones en acetonitrilo, (b) Eluato de muestra de leche obtenido tras el proceso MISPE desarrollado. Cromatogramas obtenidos a distintas longitudes de onda: (1) ERY y ROX a 210 nm; (2) SPI y JOS a 231 nm; (3) IVER a 254 nm y (4) TYL a 287 nm.

#### 4. Conclusiones

En este trabajo de investigación se ha desarrollado una metodología de extracción en fase sólida empleando polímeros de impresión molecular (MISPE), para la determinación del antibiótico eritromicina en muestras de leche de oveja.

La selectividad del MISPE ha sido evaluada en presencia de otros antibióticos pertenecientes a la familia de los antibióticos macrólidos, que tienen estructuras similares a las de la ERY, mostrando que el método propuesto es altamente selectivo, y que la reactividad cruzada que presentan estos compuestos es insignificante. El polímero sintetizado mostró buena selectividad y elevada capacidad de reconocimiento para ERY, permitiendo también la extracción del antibiótico ROX, sin reactividad cruzada.

El polímero se ha utilizado para más de 200 ensayos sin ninguna señal de degradación, lo que permite afirmar que éste posee gran estabilidad.

El método desarrollado implica una simplificación y un ahorro de tiempo considerable en el tratamiento de la muestra, ya que es posible la eliminación del contenido graso de las muestras durante el procedimiento MISPE, evitando una etapa previa de lavado.

El procedimiento MISPE desarrollado posee la suficiente sensibilidad como para permitir la determinación de ERY a niveles de concentración por debajo de los límites exigidos por la UE, que establece un límite máximo de residuos de 40 mg kg<sup>-1</sup> de ERY en leche de oveja.

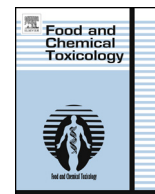
Este trabajo constituye un avance significativo en la simplicidad y eficiencia para la evaluación del riesgo potencial de la exposición a residuos de eritromicina en una matriz compleja como es la leche de oveja.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Occurrence of erythromycin residues in sheep milk. Validation of an analytical method



M.A. García-Mayor<sup>a</sup>, G. Paniagua-González<sup>a</sup>, B. Soledad-Rodríguez<sup>b</sup>,  
R.M. Garcinuño-Martínez<sup>a,\*</sup>, P. Fernández-Hernando<sup>a</sup>, J.S. Durand-Alegría<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance, Madrid 28040, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, Venezuela

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 October 2014

Accepted 27 December 2014

Available online 28 January 2015

#### Keywords:

Erythromycin

Molecularly imprinted solid-phase

extraction

Sheep milk

HPLC-DAD

### ABSTRACT

The paper describes a new and selective analytical sample treatment for quantitative extraction and preconcentration of erythromycin in presence of other macrolide antibiotics in sheep milk samples. The methodology is based on the use of a molecularly imprinted polymer (MIP) employed as solid phase extraction sorbent (MISPE). The synthesized material by bulk polymerization using erythromycin (ERY) as template was evaluated as solid phase extraction sorbent, in a novel sample treatment technique that can be coupled to high-performance liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD). MIP selectivity was studied for other macrolide antibiotics with similar structures, such as tylosin (TYL), spiramycin (SPI), josamycin (JOS), roxithromycin (ROX) and ivermectin (IVER) getting recoveries for these interferences lower than 35%, for all cases except for ROX, which recoveries were around 85%. The variables affecting the molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure were optimized to select the best conditions of selectivity and sensitivity to determine ERY at concentration levels established by EU legislation in sheep milk. Under the selected experimental conditions, quantification limit was 24.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Recoveries were higher than 98%, with RSDs between 0.7% and 2%. The proposed MISPE-HPLC method was validated and successfully applied to ERY analysis in sheep milk samples.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Erythromycin (ERY) is a representative of macrolide antibiotics produced by *Saccharopolyspora erythraea*. It has an antimicrobial spectrum similar to or slightly wider than of penicillin and is often prescribed for people who have an allergy to it (Blasi, 2004; Mills et al., 2005). This macrocyclic antibiotic contains in the structure a 14-membered lactone ring with ten asymmetric centers and two sugars (L-cladinose and D-desosamine), making it a compound very difficult to produce via synthetic methods (Mazzei et al., 1993; Stephenson et al., 1994). Due to its biological effect against *Mycoplasma* and Gram-positive bacteria, ERY is extensively applied in veterinary practice, being, sometimes, administered as feed additives or via drinking water in order to prevent the outbreak of diseases and also in cases of disease, for dehydration or to prevent losses during transportation. Unfortunately, these applications of antibiotics and the lack of observance of the withdrawal time after treatment in animals have led to the presence of antibiotic residues in foods, which is potentially hazardous for human health (Forti

and Scortichini, 2009). The presence of ERY residues in foodstuff may cause toxic effects on consumers, especially in the most vulnerable risk groups, such as infants (Rodríguez et al., 2010). The use of this antibiotic and similar compounds may result to antibiotic resistance in treatment animal and humans, who can be affected by allergic reaction. For this reason, legislation regarding the control of antibiotic residues in live animals and animal products is given in Council Directive 96/23/EC (European Commission, 1996). In the context of this directive, details for methods and their performance criteria are described in Commission Decision 2002/657/EC (European Commission, 2002). The EU Council regulation 2377/90 provides the Community procedure for the establishment of maximum residue limits (MRLs) of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (European Commission, 1990). Due to limitations established by EU for ERY in milk, rapid sensitive and selective analytical procedures for ERY analysis are required. Nowadays, chromatography techniques, such as high-performance liquid chromatography coupled to diode-array (HPLC/DAD) (García et al., 2006; Xiachang et al., 2009) or mass spectrometry (HPLC/MS/MS) detectors (Liu et al., 2010; Wang and Leung, 2007), have been used to determine ERY levels in milk samples. However, due to the complex nature of this sample matrix and, in general of alimentary samples, the development of efficient pretreatments for clean-up and preconcentration is necessary in order to reduce the

\* Corresponding author. C/Senda del Rey n° 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 398 73 66; fax: 0034913986697.

E-mail address: [rmgarcinuño@ccia.uned.es](mailto:rmgarcinuño@ccia.uned.es) (R.M. Garcinuño-Martínez).



interferences and improve accuracy and precision in the analysis. In that regard, the application of molecular imprinting technology in the design of new, efficient and selective methods to achieve these objectives in food applications is constantly increasing (Beltrán et al., 2014; Granja et al., 2009). Much of the current research in the molecular imprinting field, for ERY determination, is concentrated on solid phase extraction (SPE) (Ezhova et al., 2011). In addition to the existing advantages of SPE, for example compared with liquid/liquid extraction (LLE) as low solvent consumption and the possibility of automation, molecularly imprinted-solid phase extraction (MISPE) technology offers predetermined selectivity for analytes of interest and the possibility of different MIP configurations, which is well suited for analytical chemistry. In this sense, different MIP formats to apply in SPE, such as nanoparticles (Kou et al., 2011, 2012), materials by sol-gel (Zhaohui et al., 2010) or polymer based on carbon nanotubes (Lian et al., 2012) have been developed for ERY determination.

The aim of this paper was the synthesis of a novel molecularly imprinted functional material and its application as SPE sorbent for the quantitative extraction of ERY in sheep milk samples. The selectivity of the ERY-polymer with respect to other macrolide antibiotics was evaluated. The determination of ERY was carried out in sheep milk samples by HPLC-DAD. This kind of milk sample comes from La Mancha region in Spain, and is used to produce the prestigious *Manchego cheese* which is granted Protected Designation of Origin (PDO) status by the European Union.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Reagents and solutions

Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and methacrylic acid (MAA) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 2-2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) from Fluka (Buchs, Switzerland). Commercial antibiotic standards (erythromycin, tylosin hemitartrate, spiramycin, josamycin, roxithromycin, ivermectin) and sodium phosphate monobasic were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Sodium hydroxide and n-hexane (purity > 99%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents used were of analytical grade or better. Ultra-pure water (18.2 M $\Omega$  cm quality) was obtained using a Milli Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

Stock standards solutions of individual compounds at 1 g L<sup>-1</sup> were prepared every 3 months by exact weighing of the powder and dissolved in 10 mL of methanol of HPLC-grade from Scharlab (Barcelona, Spain), which were then stored at 4 °C in the dark. A standard solution of each macrolide antibiotic (500 mg L<sup>-1</sup>) were prepared by diluting the stock solution with acetonitrile (ACN) of HPLC-grade from Scharlab, and also stored at 4 °C in the dark. The working standard solution at adequate concentration of ERY was daily prepared by appropriate dilution of the mentioned solution with the dilution mixture NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM at pH 7/acetonitrile (70:30). Aqueous solvent of the mobile phase was made by dissolving 5 g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 500 mL of Milli-Q water and sodium hydroxide was used to adjust the pH at 7. Subsequently, the solution was filtered through a 0.45  $\mu$ m cellulosic membrane filter.

### 2.2. Instrumentation

HPLC analysis was performed on an Agilent Technologies model 1200 series liquid chromatographic equipped with an Agilent 1290 quaternary pump, auto sampler, and photo-diode array detector (Agilent Technologies, Germany). An ultraviolet lamp (Vilber Lourmat CN-6T) and a Digiterm 3000542 thermostat-controlled waterbath (Selecta, Barcelona, Spain) were used to provide the polymerization process. All pH readings were made with a Metrohm 654 pH meter. Template extraction was performed using a soxhlet extractor

system with cellulose extraction thimbles. Imprinted and control polymers were ground in a glass mortar (Aldrich, Madrid, Spain) and then passed through CISA standard sieves (200–355  $\mu$ m) (Afora, Madrid, Spain). SPE was performed using a 20-Port Vacuum SPE manifold System (Supelco, Spain) with vacuum control-press pump (Selecta). Empty SPE cartridges (Supelco) of 3 mL of capacity with polyethylene frits were used to pack the solid phase.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Milk samples pretreatment protocol

Several fresh morning milk samples from different sheep in the same stage of lactation were collected from CERSYRA, a Regional Centre of Animal Selection and Reproduction in Valdepeñas (Ciudad Real, Spain). The samples were transported to the laboratory and stored at -20 °C until use.

The protocol used for pretreatment of spiked milk samples is detailed below. Milk samples were allowed to thaw at room temperature and homogenized by heating at 35 °C for 5 min. An aliquot of 1 mL of homogenized milk was spiked with the desired amount of ERY, mixed by manual shaking and maintained at room temperature for 20 min to allow the equilibration of the macrolide with the milk matrix. Mixture of 4 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN (3:2, pH 7) and 1 mL ACN were added simultaneously to precipitate the proteins. Sample was then centrifuged for 15 min at 1200 rpm and filtered with a fold filter before the application of extraction procedure.

#### 2.3.2. Synthesis of molecularly imprinted polymer

For preparation of MIPs, 2  $\times$  10<sup>-2</sup> mmol of ERY was dissolved in 7 mL of ACN in a 25 mL glass tube and sonicated during 10 minutes. The functional monomer (MAA, 2.0 mmol), the cross-linker (EGDMA, 10.0 mmol) next, the radical initiator (AIBN, 5.1 mmol) were added. This mixture was purged with nitrogen for 10 min. The glass tube was then placed in a thermostat-controlled waterbath at 65 °C for 5 h, or under UV light at 235 nm at 5 °C for 3 h. The monolithic polymers obtained were crushed and sieved in a glass mortar to obtain particles with sizes of 200–355  $\mu$ m, suitable for SPE evaluation. Finally, the template and non-polymerized compounds were removed by soxhlet extraction with MeOH (80 mL) for 25 h, until no ERY was detected by HPLC-DAD. Non-imprinted polymers (NIPs) were prepared under identical conditions except for the addition of the analyte.

#### 2.3.3. Chromatographic conditions

Chromatographic separation of the analytes was performed on a Prontosil C18 (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) HPLC column from Scharlab. A gradient program was used with the mobile phase, combining solvent A (25 mM phosphate buffer solution, pH 7) and solvent B (acetonitrile) as follows: 50% B (3 min) at 1 mL min<sup>-1</sup>, 58% B (8 min) at 1.2 mL min<sup>-1</sup> and 70% B (20 min) at 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The column temperature was kept at 60 °C. The injection volume was 20  $\mu$ L, and all the compounds eluted within 30 min. The UV detector wavelengths were set at 210 nm (ERY, ROX), 231 nm (JOS, SPI), 254 nm (IVER) and at 287 nm (TYL). Quantification was performed using external calibration and peak area measurements.

#### 2.3.4. MISPE procedure

An amount of 200 mg of dry imprinted and non-imprinted polymer was packed separately into empty SPE cartridges of 3 mL between two frits (length of 65 mm and i.d. 10 mm). MISPE steps were carried out at 0.7–1.0 mL min<sup>-1</sup> on a vacuum manifold for 20 cartridges. MISPE cartridges were conditioned with 3  $\times$  2 mL of MeOH and 3  $\times$  2 mL of ACN prior to extraction. Then, 1 mL of milk sample previously pre-treated, following the procedure described in section 2.3.1 to erase the proteins, was loaded. When the sample loading was completed, prior to the elution step, the removal of fat was



carried out adding  $6 \times 1$  mL of hexane. Then, the target analyte was eluted using  $3 \times 2$  mL MeOH with 0.5% acetic acid. Elutes were evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at  $40^\circ\text{C}$ . The residue was re-dissolved with the adequate volume of mixture  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM (pH 7)/acetonitrile (70:30) and they were analyzed by HPLC using the method described above. Finally, the polymer was regenerated by passing  $3 \times 2$  mL of MeOH and  $3 \times 2$  mL of ACN for the next assay.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers

Two non-covalent MIPs were synthesized by “bulk” polymerization using ERY as template to obtain a suitable MISPE for selective extraction of ERY. MIPs synthesis were carried out with the same ratios of template to monomer and cross-linker (1:100:500), but the polymerization process was allowed to proceed either under UV light (MIP1) or in a thermostat-controlled waterbath (MIP2). The corresponding NIPs were also synthesized.

A sufficient mechanical stability and a high degree of cross-linking of the polymer are certainly required for chromatography applications to obtain good separations. On that basis, a high molar ratio of template/cross-linker (1:500) was used in order to obtain a high degree of cross-linking and adequate rigidity in the polymer matrix to produce specific cavities of the correct size and shape and to preserve the imprinted memory. MAA was chosen as functional monomer due to its widely recognized ability to form hydrogen bonds, and because the binding and removal of the molecule template can be performed under mild conditions. The nature of the solvent polymerization or porogen is a very important factor to consider in the synthesis of MIPs. The porogen plays an important role in the final polymer morphology, being the one responsible of the pore diameter and influencing the recognition of the specific analyte. Usually, the non-covalent MIPs synthesis should be performed in aprotic and apolar solvents to avoid disabilities in the ionic interactions and hydrogen bonds between target and the functional monomer. For this reason, and taking into account that ERY is soluble in acetonitrile, this was the porogen selected for MIPs preparation. In regards to the polymerization method, it has influence in the morphology as well as the specific recognition characteristics of the polymer. Two different polymerization procedures were carried out: UV-initiated photopolymerization (235 nm) at  $5^\circ\text{C}$  for 3 h (MIP1) and thermally initiated polymerization in a thermostat-controlled waterbath at  $65^\circ\text{C}$  for 5 h (MIP2). The polymers obtained as bulk solids were ground with a glass mortar and sieved to obtain particles in the adequate size range, suitable for MISPE evaluation. Finally, polymers were extracted in a Soxhlet apparatus to remove the template, and the washed MIP solutions were analyzed by HPLC to check the absence of ERY in MIP materials.

The corresponding blank or non-imprinted polymers were prepared under the same conditions without the use of template to act as control.

Binding studies in different solvents for both synthesized polymers (MIP1 and MIP2) were carried out in order to select the most suitable polymer to act as sorbent for a selective solid phase extraction for ERY determination. The MIP applicability was evaluated following the procedure described in Section 2.3.4. For that, different loading solvents were tested: chloroform, ACN and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN (70:30) at pH 7, 1 mL of  $50\text{ mg L}^{-1}$  ERY standard solution, prepared in each solvent mentioned above. Then, a washing step using ACN ( $3 \times 2$  mL) was carried out. The quantitative recovery of ERY was evaluated by the no bound analyte onto the MIP, and calculated as the difference between ERY total amount loaded onto the cartridge initially, and collected ERY in the fractions from the loading and washing steps. Table 1 summarizes the recoveries obtained for

**Table 1**

Comparison of MISPE recoveries obtained for ERY standard solution ( $1\text{ mL}$ ,  $50\text{ mg L}^{-1}$ ) from binding studies in different loading solvents: chloroform, ACN and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN (70:30, pH 7).

Polymer	ERY recoveries (%)		
	Chloroform	ACN	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN (70:30, pH 7)
NIP1	$10 \pm 0.9$	$12 \pm 1.7$	$16 \pm 0.7$
MIP1	$18 \pm 1.2$	$78 \pm 1.5$	$24 \pm 3.2$
NIP2	$9 \pm 1.4$	$4 \pm 0.7$	$9.5 \pm 3.1$
MIP2	$29 \pm 0.8$	$96 \pm 1.1$	$38 \pm 1.5$

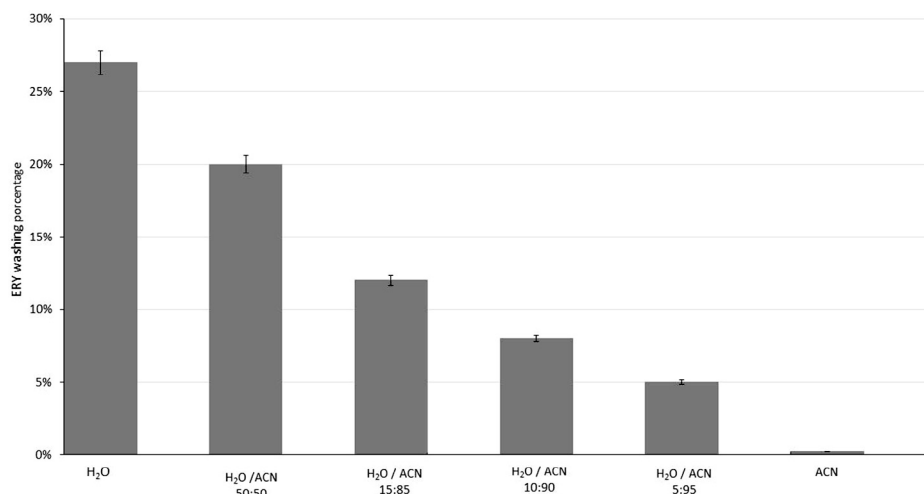
the different solvents assayed. In general, MIP2 showed better recognition properties than MIP1 in all solvents tested. When chloroform or  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN (70:30) at pH 7 were used, recoveries were lower than 40% for both, MIP1 and MIP2. Binding from ACN provided the best results, being 78% for MIP1 and 96% for MIP2. These results are according to the fact that generally the MIP exhibits better molecular recognition in the solvent used as a porogen during polymerization. The low recoveries obtained for NIPs (lower than 16%) indicated that the interactions between the template and MIPs were mainly specific. In case of NIP2, recovery in ACN was lower than 4%. Therefore, it can be concluded that ACN provides maximal interactions between ERY molecules and the binding sites in synthesized MIPs and also that, MIP2 exhibits a higher imprinting effect toward the analyte than MIP1. Then, MIP2 was selected as optimum sorbent for use in further experiments for the development of an off-line MISPE for ERY.

#### 3.2. MISPE optimization

The functionality of ERY-MIP2 was confirmed in these previous binding studies and its performance was compared with NIP2 simultaneously under identical conditions to prove the nonspecific binding.

To obtain the best selectivity and recovery in the MISPE procedure, using MIP2, key factors influencing SPE efficiency, such as washing and elution steps were optimized. First washing step was tested using several solvents to wash off the non-specifically adsorbed compounds:  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN mixtures at increasing ACN proportions (50–100%) up to 6 mL ( $3 \times 2$  mL). Fig. 1 shows the results obtained when 1 mL of ERY standard solution at  $50\text{ mg L}^{-1}$  in ACN was loaded onto the cartridge. The best results were obtained when the washing solvent used was ACN. As can be seen, losses of ERY were less than 1%, which imply that ERY was completely retained on the MIP. On the other hand, as ERY is highly soluble in water, when the proportion of water decreased in the washing solution, most of the ERY was retained in the cartridge. Therefore, a volume of 6 mL of ACN was used as optimum washing conditions. These results demonstrated that the MIP exhibited high binding affinity for ERY, and confirmed that the adsorption of this compound was due to imprinted binding sites and not to nonspecific binding.

To ensure a complete extraction of the adsorbed analyte from MISPE column is necessary to find out the appropriate eluent. It is a long-established principle that a mixture of methanol with different proportions of acetic acid is usually used to elute the analyte because acetic acid can compete with the analyte for the functionality of the monomer and impair the ionic bonds formed between them. Based on these premises, and taking into consideration that ERY is not stable at acid pH, the efficacy of various solvents for the elution of ERY was evaluated to optimize this technique for quantitative accuracy and to confirm the nature of specific interactions between the target molecule and the binding sites. The solutions examined were  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :ACN, 70:30 at pH 7, MeOH and MeOH

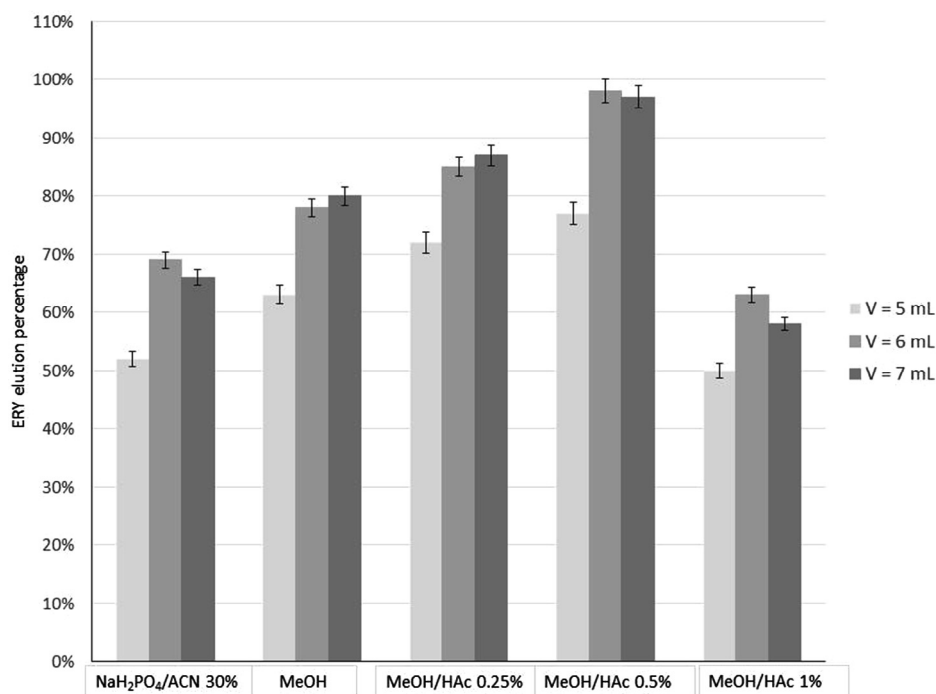


**Fig. 1.** Percentages of ERY obtained in all fractions collected from washing step using different washing solvents (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/ACN mixtures) when ERY standard solution was loaded onto the cartridge (1 mL of 50 mg L<sup>-1</sup> in ACN).

containing different percentages of acetic acid (0.25, 0.5 and 1%), and different volumes (5, 6, and 7 mL) were assayed. Fig. 2 illustrates the effect of solvent polarity on elution efficacy in terms of quantitative recoveries of ERY in MIP. Recoveries were calculated from the fractions collected from elution step with respect to the total amount of ERY load onto the cartridges. As a general trend, an increase in the elution efficacy can be seen with increasing solvent polarity. With the use of less polar solvent (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN, 70:30 at pH 7) a low elution of bound ERY (52%) was obtained.

The results showed that the presence of acetic acid in the elution solvent provided higher recoveries than pure MeOH and by increasing the content of acetic acid up to 0.5%, extraction recoveries increased slightly to reach a value of 98%. However, when a higher

amount of acetic acid was used, elution efficacy decreased considerably. One percent acetic acid allowed extraction of only 63% of ERY. This observation can be explained due to the fact that ERY is degraded at increasingly acidic pH. These studies revealed that the optimum elution solvent was 0.5% acetic acid in MeOH, and a volume of 6 mL (2 × 3 mL) was necessary for the complete elution of ERY from the cartridge. The results suggest that ERY was bound to the binding sites through hydrogen bonds and ionic interactions which cannot be disrupted through apolar solvents or solvents with low polarity. It can be claimed that these ionic interactions may be affected by the alteration of the ionic strength of the solvent, and only polar solvents are able to compete with ERY for the binding sites allowing the rapid desorption of bound analyte.



**Fig. 2.** Elution percentages of ERY in MISPE for different solutions: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN (70:30, v/v), MeOH and MeOH at 0.25, 0.5, 1% in acetic acid. Several volumes of elution solvent (5–7 mL) were tested. The studies were developed with 1 mL of ERY standard solution at 50 mg L<sup>-1</sup> in ACN.

### 3.3. Milk samples analysis

Milk is a highly complex matrix containing a great variety of compounds (proteins, sugars, lipids ...) that can interfere in the preconcentration efficiency and recovery of ERY in SPE. Therefore, prior to MISPE procedure, a pre-treatment for proteins removal from the milk samples was required in order to avoid blockages in the MIP. For this study, several precipitating solvents or mixtures were studied: ACN, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN (3:1, 3:2) modifying pH value (5, 6, 7). Different volumes of these solutions (3, 4, 5, 6 mL) were also tested. When the precipitation process was performed with ACN or NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN, it was observed that the samples remained with protein residues, offering the best results of the mixture 3:1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN, at pH 7. In any case, the precipitation process yield was better when 5 mL of solvent were added. Higher amounts of solvent did not involve an improvement in the process. These studies provided clear guidance to the choice of a suitable precipitation solvent for proteins. Then, precipitation proteins was produced more extensively when a mixture of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:ACN (4 mL, 3:2) at pH 7 plus 1 mL of ACN was used. After the proteins precipitation step, milk sample was ready to be analyzed by the above described MISPE procedure, including an additional step to remove the fat content and so avoid fat interferences in the determination.

Fat removal was carried out before the washing step, and was optimized taking into account a previous research (García et al., 2006). For that study two different solvents (n-hexane and 0.5 M NaOH) were examined varying the volume of them within the range 6–8 mL. When 0.5 M NaOH was used at all volumes tested, the complete removal of fat was not allowed. The samples after the complete MISPE procedure showed a fat residue which prevented their correct HPLC-DAD analysis. The use of n-hexane provided clean extracts, and ERY recoveries were higher than 95%. The optimum results were achieved with 6 × 1 mL of hexane. Increasing the volume of solvent until 8 mL did not show a significant yield improvement. It was observed that fat removal acted as washing step, being unnecessary an additional washing with ACN, allowing the elution step to be carried out immediately.

Optimal eluting performance, as it was reported in section 3.2, was achieved with MeOH:acetic acid mixture containing 0.5% of acetic acid (3 × 2 mL). After a MISPE procedure was completed, the eluents collected were taken to dryness and reconstituted in a volume of 1 mL in NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM at pH 7.0/acetonitrile (70:30) mixture. Finally ERY in the milk extracts was detected by HPLC-DAD.

### 3.4. Analytical performance

Validation of the proposed method was performed to evaluate the accuracy and precision of the MISPE protocol, its linear range and limit of quantification (LOQ), by using spiked milk samples in all work performed. Results were summarized in Table 2. The accuracy was evaluated by calculating the recovery obtained for ERY in MISPE procedure of 1 mL of spiked milk samples at three concentration levels: low level (24.2 µg kg<sup>-1</sup>), medium level (48.3 µg kg<sup>-1</sup>) and high level (482.6 µg kg<sup>-1</sup>). Obtained residues were analyzed by HPLC-DAD in triplicate. Recoveries were higher than 95% and their corresponding relative standard deviations (RSD) were less than 2%. The intra-day repeatability and inter-day reproducibility were

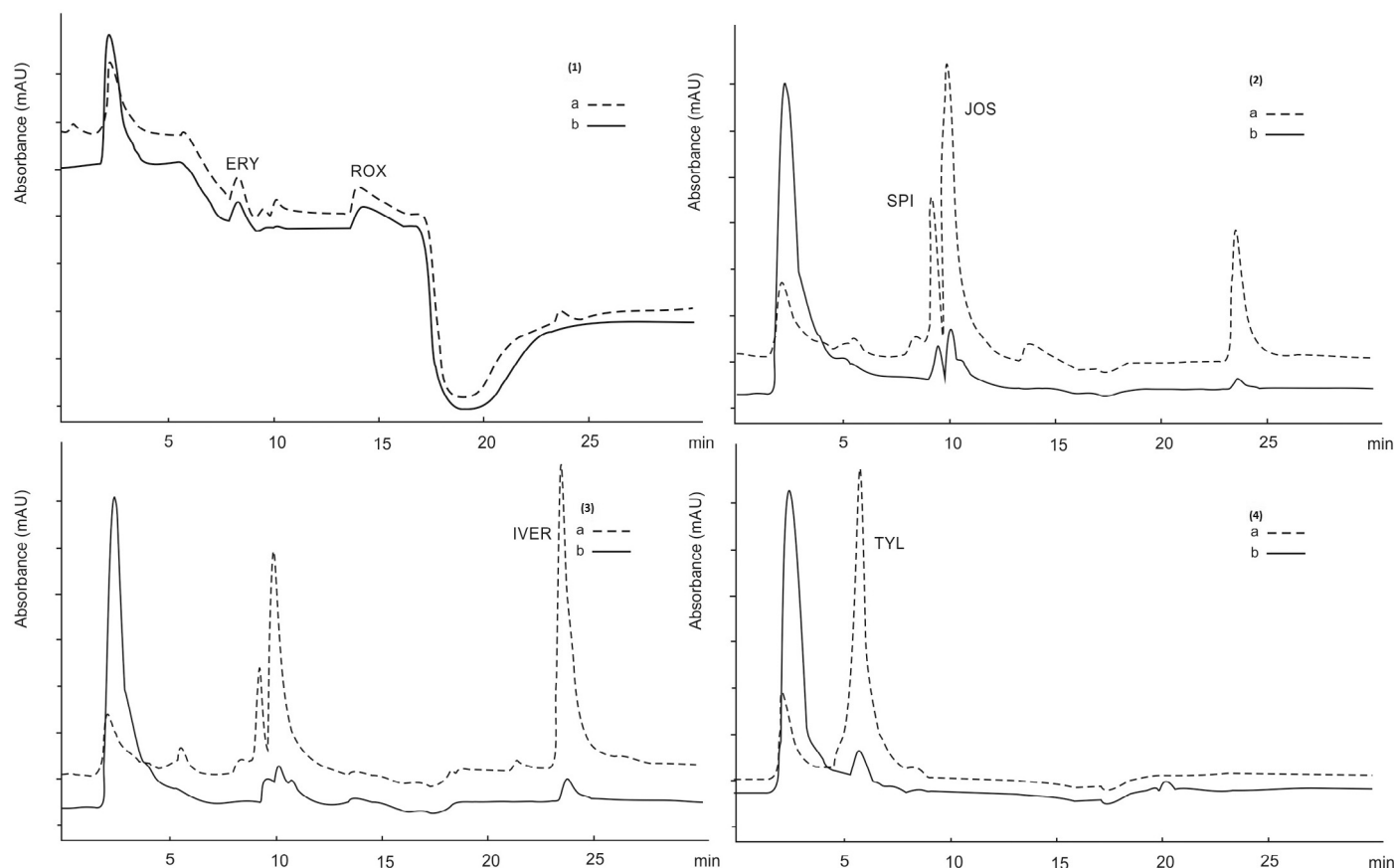
determined in triplicate assays at 48.3 µg kg<sup>-1</sup> and 482.6 µg kg<sup>-1</sup> spiking levels. Intra-day recoveries ranged from 91.2% to 99.7% with RSDs less than 2.2%; for the inter-day repeatability, recoveries ranged from 92.2% to 98.8% with RSD less than 5%. The linearity of the method with HPLC-DAD detection was tested in the range of 24–965 µg kg<sup>-1</sup>. Calibration curve was obtained by preparing spiked milk samples in triplicate, containing concentrations of ERY in that working range. The calibration curve obtained ( $y = 0.23 C + 12.36$ ) showed linearity, with correlation coefficient  $R^2 = 0.9994$ . The limit of quantification, calculated as the lowest concentrations with RSD below 5%, was 24.1 µg kg<sup>-1</sup>. The results demonstrated that the optimized MISPE-HPLC methodology proposed is easily and successful applied for determination of ERY in sheep milk at levels lower than the maximum residue limit established by the European Union (40 µg kg<sup>-1</sup>).

### 3.5. Selectivity study

The molecular imprinting technique allows the designing of new artificial materials of specific recognition. After removal of template molecule, MIP shows a high selectivity to the imprinted molecules due to the arrangement of the functional groups of the monomer units around the print molecules. In order to verify the selectivity of MISPE toward ERY, other macrolide antibiotics with similar chemical structures as competitive molecules: josamycin (JOS), spiramycin (SPI), roxithromycin (ROX), ivermectin (IVER) and tylosin hemitartrate (TYL) were examined. For interference studies, recoveries of macrolide antibiotics at three concentration levels were tested by the MISPE procedure developed: low level (JOS, SPI, IVER, TYL at 10 mg L<sup>-1</sup> and ERY, ROX at 100 mg L<sup>-1</sup>), medium level (5:50 mg L<sup>-1</sup>), high level (2.5:25 mg L<sup>-1</sup>). Fig. 3 shows the chromatograms obtained in selectivity study at different wavelengths (a) for a standard mixture of the six macrolides studied and (b) for a milk sample spiked under the established MISPE method. Table 3 shows the results obtained in terms of percentages of recovery, calculated as the fractions collected from elution step with respect to the total amount of each compound load onto the cartridge. Recoveries obtained for JOS, SPI, IVER and TYL were between 15 and 35%, while for ERY and ROX were higher than 98 and 85%, respectively. The results were consistent according to the structures. The polymer showed higher adsorption capacity toward ERY than toward the other macrolide antibiotics studied due to this compound acting as molecule template during the synthesis. On the other hand, the polymer also exhibited specific selectivity for ROX which has a structure more similar to ERY compared to the other compounds assayed, being the most possible interfering compound that can significantly affect clean-up efficiency. Although MIP for ERY demonstrated to be also selective for ROX, no interference was produced during chromatographic determination due to the difference between the retention times of both compounds. In the binding process, many specific recognition sites with respect to the template were generated on the ERY-MIP surface, so the template was strongly bound by the imprinted polymer; all recoveries always were higher than 95%. The results demonstrated that the MIP-SPE column exhibited specific selectivity for ERY in the presence of other structurally related compounds.

**Table 2**  
Analytical characteristics of the optimized MISPE-HPLC method for the ERY determination. All measures were average of three replicates.

% Recovery		Intra-day recovery (%)		Intra-day recovery (%)		Regression equation	LOQ (µg kg <sup>-1</sup> )
Low level 24.2 µg kg <sup>-1</sup>	Medium level 48.3 µg kg <sup>-1</sup>	High level 482.6 µg kg <sup>-1</sup>	Spiking level 48.3 µg kg <sup>-1</sup>	482.6 µg kg <sup>-1</sup>	Spiking level 48.3 µg kg <sup>-1</sup>	Concentration working range (24–965 µg kg <sup>-1</sup> ) $y = 0.23C + 12.36$ $R^2 = 0.9994$	24.1
99.0 ± 1.7	98.9 ± 0.9	98.9 ± 0.7	98.8 ± 5.0	92.2 ± 3.4	99.7 ± 0.8		
					91.2 ± 2.2		



**Fig. 3.** Chromatograms obtained for the six antibiotic macrolides studied at concentrations of 50 mg L<sup>-1</sup> ERY, ROX and 5 mg L<sup>-1</sup> JOS, SPI, IVER and TYL. (a) For an ACN standard mixture (b) MISPE extracted sheep milk. Chromatograms were obtained at the wavelength corresponding to each analyte studied: (1) ERY and ROX at 210 nm; (2) SPI and JOS at 231 nm; (3) IVER at 254 nm and (4) TYL at 287 nm.

**Table 3**

Macrolides recoveries at three concentration levels. Low level (JOS, SPI, IVER, TYL at 10 mg L<sup>-1</sup> and ERY, ROX at 100 mg L<sup>-1</sup>), medium level (5:50 mg L<sup>-1</sup>), high level (2.5:25 mg L<sup>-1</sup>), (n = 3).

Antibiotic	% Recovery		
	Low level	Medium level	High level
ERY	98.3 ± 1.8	98.6 ± 1.2	98.1 ± 0.9
ROX	88.3 ± 2.6	88.7 ± 5.5	84.7 ± 3.2
SPI	35.3 ± 7.4	30.3 ± 1.5	27.3 ± 0.6
JOS	34.3 ± 3.8	35.3 ± 2.5	32.3 ± 4.9
IVER	28.4 ± 1.2	21.0 ± 3.1	28.1 ± 1.2
TYL	14.2 ± 3.3	19.3 ± 5.1	24.3 ± 0.6

#### 4. Conclusion

A reliable molecularly imprinted solid-phase extraction methodology for ERY antibiotic determination has been developed. MISPE selectivity was tested in the presence of the other antibiotics belonging to the family of macrolide antibiotics, which have similar structure to ERY, showing that the proposed method is thought to be highly selective. Cross-reactivity of these compounds was negligible. Synthesized polymer showed good selectivity and high adsorption capacity for ERY, also allowing the successful recovery of ROX without cross-reactivity. Moreover, polymer has been used for more than 200 assays without any degradation signals, which ensures high stability. The developed method involves a simplification, and time savings, of the sample treatment because the fat content of the milk samples can be removed on line during the MISPE

procedure. HPLC combined with the MISPE procedure has led to a good sensitivity methodology that allows determination of ERY at levels below limits required by the UE, who establishes a maximum residue limit of 40 µg kg<sup>-1</sup> of ERY in sheep milk. This work constitutes a significant advance in the simplicity and efficiency for the assessment of the potential risk of exposure to erythromycin residues in complex matrix such as sheep milk.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

#### Acknowledgements

Authors thank financial support from the Comunidad Autónoma de Madrid and European funding from FEDER program (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL), and of the Regional Centre of Animal Selection and Reproduction (CERSYRA) for supplying sheep milk samples.

#### References

- Beltrán, M.C., Althaus, R.L., Berruga, M.I., Molina, A., Molina, M.P., 2014. Detection of antibiotics in sheep milk by receptor-binding assays. *Int. Dairy J.* 34, 184–189.

- Blasi, F. 2004. A typical pathogens and respiratory tract infections. *Eur. Respir. J.* 24, 171–182.
- European Commission, 1990. Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union* L224.
- European Commission, 1996. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Union* L125, 10.
- European Commission, 2002. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002. *Off. J. Eur. Union* L221, 8.
- Ezhova, N.M., Garkushina, I.S., Pisarev, O.A., 2011. Molecularly imprinted hydrophilic polymer sorbents for selective sorption of erythromycin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 47, 635–639.
- Forti, A.F., Scortichini, G., 2009. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637, 214–219.
- García, M.A., Garcinuño, R.M., Fernández, P., Durand, J.S., 2006. Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *J. Chromatogr. A* 1122, 76–83.
- Granja, R., Montes, A., Zucchetti, R., Montes, R., Patel, R., González, A., 2009. Determination of erythromycin and tylosin residues in honey by LC/MS/MS. *J. AOAC Int.* 92, 975–980.
- Kou, X., Geng, L.Y., Lei, J.D., Ma, J.H., Su, K.G. 2011. Preparation of molecularly imprinted nanoparticles for erythromycin and their adsorption characteristics. *Chin. J. Process Eng.* 3, 021.
- Kou, X., Lei, J., Geng, L., Deng, H., Jiang, Q., Zhang, G., et al., 2012. Synthesis, characterization and adsorption behavior of molecularly imprinted nanospheres for erythromycin using precipitation polymerization. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12, 7388–7394.
- Lian, W., Liu, S., Yu, J., Xing, X., Li, J., Cui, M., et al., 2012. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin. *Biosens. Bioelectron.* 38, 163–169.
- Liu, Y., Wang, H., Yang, H., Guo, Q., Shi, H., Yan, L. 2010. Determination erythromycin residues in milk by LC-MS-MS. *Food Res. Dev.*, 2, 048.
- Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., Periti, P., 1993. Chemistry and mode of action of the macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 1–9.
- Mills, G.D., Oehley, M.R., Arrol, B.A., 2005. Effectiveness of  $\beta$  lactam antibiotics compared with antibiotics active against atypical pathogens in non-severe community acquired pneumonia: meta-analysis. *BMJ* 330, 1–7.
- Rodríguez, E., Navarro Villoslada, F., Moreno-Bondi, M.C., Marazuela, M.D., 2010. Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 605–613.
- Stephenson, G.A., Stowell, J.G., Toma, P.H., Dorman, D.E., Greene, J., Byrn, S.R.J., 1994. Solid-state analysis of polymorphic, isomeric, and solvated forms of dirithromycin. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 5766–5773.
- Wang, J., Leung, D. 2007. Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, 21, 3213–3222.
- Xiachang, Q., Changfa, C., Jiangchao, Q., Ju, C., Yingping, Z., Siliang, Z., 2009. Determination of the erythromycin components in fermentation broth by HPLC. *Food Ferment. Ind.* 7, 058.
- Zhaohui, Z., Li, L., Lihua, N. 2010. Preparation of erythromycin-imprinted solid-phase extraction material by sol-gel method and the selective adsorption. *Acta Polymer. Sin.* 6, 677–683.



### III.B. DETERMINACIÓN DE AMPICILINA EN MUESTRAS DE LECHE DE VACA

---

“EFFECTIVE DETERMINATION OF AMPICILLIN IN COW MILK USING A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS SORBENT FOR SAMPLE PRECONCENTRATION”

B. Soledad-Rodríguez, A. Gallego-Picó, R. M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando, J. S. Durand-Alegría

***Food Chemistry*** (enviado julio 2015)





En esta parte de la Tesis Doctoral se ha desarrollado un método de extracción del antibiótico ampicilina en muestras de leche de vaca utilizando polímeros de impronta molecular empaquetados en columnas o cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE).

Se ha llevado a cabo la síntesis de varios polímeros de impronta molecular, variando la naturaleza y proporciones del monómero utilizado en la mezcla de polimerización. Los polímeros sintetizados se han caracterizado estructuralmente y se ha evaluado la eficiencia de los mismos. El MIP que ha ofrecido los mejores resultados en lo que respecta a la especificidad para el analito de interés, ampicilina, se seleccionó como óptimo y se utilizó para la determinación de dicho analito en muestras de leche de vaca.

Las muestras de leche, previo análisis MISPE, y dada la complejidad de las mismas, fueron tratadas para eliminar las proteínas y materia grasa.

El método desarrollado fue validado en términos de exactitud, precisión, linealidad, y límites de detección y cuantificación. Las características analíticas del método desarrollado demostraron que fue necesario preconcentrar las muestras un total de 20 veces para poder determinar niveles de concentración de ampicilina por debajo de los establecidos como MRL para dicho antibiótico.

Esta investigación será íntegramente desarrollada a lo largo de las secciones siguientes de esta Memoria de Investigación. La publicación de la misma está ya enviada a la revista *Food Chemistry*, revista indexada en el *Citation Index*, con un alto índice de impacto. En este momento, estamos a la espera de la respuesta del Editor.



## 1. MATERIALES Y REACTIVOS

### 1.1 Instrumentación y equipamiento

Los distintos equipos, instrumentos y materiales utilizados en la parte experimental de este trabajo se detallan a continuación:

- Lámpara UVS-54. Mineralight®Lamp, USA
- Equipo de ultrasonido, Sonicor, 110-120 V, 50- 60 Hz. 2,8 Amp. Modelo SC-150 T
- Balanza de precisión, Ohaus, Adventure
- Centrifugadora. Digisystem Laboratory Instruments Inc
- pH metro Hanna Instruments Inc
- Sistema de purificación de agua Milli-Q. Millipore
- Termómetro Digital. PATOS, Tipo K, DE-305
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución. Dionex. Ultimate 3000, provisto de una columna analítica de acero inoxidable, de 4,0 x 250 mm rellena con material C<sub>18</sub> (Octadecilsilano químicamente enlazado a sílica porosa)
- Espectrómetro para IR. Nicolet, modelo 380. Operado con transformada de Fourier
- Super Mixer N° 1290. Labline Instruments, INC
- Bomba de vacío. Gast Manufacturing, INC
- Mortero de porcelana
- Tamiz. Endecotts en acero inoxidable con tamaño de apertura de 300 micras. Especificación ASTM E 11
- Tubos de ensayo de vidrio con rosca y tapa de baquelita 20 mL
- Tubos de vidrio para centrifuga. Kimax, 15 mL
- Pipetas volumétricas de volumen variable
- Pipetas serológicas de volumen variable
- Micropipetas de volumen variable. Pipetman Ultra
- Jeringas plásticas. 6, 10 y 20 mL
- Desecador
- Filtros. Sartorius Minisart de 0,45 µm para HPLC
- Balones aforados de 10, 20, 50, 100, 200 y 1000 mL
- Filtro de membrana 0,45 µm para fase móvil
- Equipo para filtración por membranas
- Papel de filtro Whatman N° 1

### 1.2 Reactivos

Los distintos reactivos que se han utilizado para el desarrollo de esta investigación y su procedencia se detallan a continuación.

- Ampicilina, Grado USP, Spedar
- Penicilina G, Inyectable, Pfizer
- Oxacilina, Inyectable, Genven
- Amoxicilina, USP, Spedar
- Ácido metacrílico, Advance Scientific and Chemical Inc
- Metacrilato de Metilo, Advance Scientific and Chemical Inc
- Etilen Glicol dimetacrilato, Advance Scientific and Chemical Inc
- Metanol, pro análisis. FLUKA: Riedel-de-Haën
- Metanol, grado HPLC, ACS, Espectrofotometría, Burdick & Jackson

- Acetonitrilo, grado HPLC, ACS, Espectrofotometría, Burdick & Jackson
- Peróxido de Hidrógeno al 30 %, Pro análisis. PERDROGEN®
- Etanol Absoluto, Pro análisis. Riedel-de-Haën
- Ácido Acético, FLUKA Riedel-de-Haën
- Nitrógeno Gaseoso, AGA
- Cloruro férrico, Riedel-de-Haën
- Hexaciano ferrato (III) de potasio, Riedel-de-Haën
- HCl 0,1 N, Fixanal, Riedel-de-Haën
- Hidróxido de potasio, Merck
- Hidróxido de sodio, Pro análisis. Merck
- Agua destilada, Sistema de destilación de agua
- Agua desionizada, Resistividad de  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
- Fosfato monobásico de potasio, Riedel-de-Haën.

### 1.3. Disoluciones

#### Disolución patrón de ampicilina

La disolución patrón de ampicilina se preparó disolviendo 100 mg de ampicilina en 100 mL de agua: acetonitrilo en diferentes proporciones, en función del ensayo realizado (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, v/v).

#### Disolución de fosfato monobásico de potasio 0,05 M a pH 5,0

Se preparó disolviendo 13,6 g de fosfato monobásico de potasio en 2000 mL de agua y se ajustó el pH a  $5,0 \pm 0,1$  con una disolución de KOH al 45 % (p/p). Esta disolución se ha empleado como para preparar las disoluciones de ampicilina empleadas en los estándares del calibrado.

#### Fases móviles para el proceso cromatográfico

- **Para la determinación de ampicilina.** Se preparó una mezcla de agua, acetonitrilo, fosfato monobásico de potasio 1 M y ácido acético 1 M (909:80:10:1 v/v).
- **Para la determinación de amoxicilina.** Se preparó una mezcla de fosfato monobásico de potasio 0,05 M a pH 5,0 y acetonitrilo (96: 4 v/v).
- **Para la determinación de oxacilina.** Se preparó una mezcla de 1,9 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 700 mL de agua desionizada, se añadió 300 mL de acetonitrilo y 100 mL de metanol.
- **Para la determinación de penicilina G.** Se preparó una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (65:35:1 v/v).

Todas las disoluciones fueron filtradas previamente utilizando una membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ .

## **1.4 Muestras**

Las muestras, utilizadas en esta parte de la Tesis Doctoral que se presenta, son muestras de leche de vaca, leche entera, adquiridas en un potrero en Higuerote (Estado Miranda, Venezuela). Las vacas no recibieron tratamiento con antibiótico dentro de las últimas cuatro semanas. Las muestras se refrigeraron y transportaron al laboratorio, se dividieron en alcuotas de 100 mL, se colocaron en frascos de vidrio y se congelaron hasta su posterior utilización. Las muestras fueron mantenidas a -20 °C.



## 2. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Los procedimientos analíticos desarrollados a lo largo de esta Tesis Doctoral se describen a continuación

### 2.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular, MIPs, y sus correspondientes polímeros no impresos, NIPs, han sido sintetizados mediante polimerización “en bloque” empleando radiación ultravioleta.

Para la síntesis de los MIPs, se preparó una disolución de 0,0100 g de ampicilina en 10 mL de acetonitrilo y se mezcló en un vortex sometiéndola a agitación en un baño de ultrasonidos a una temperatura de 50 °C hasta su completa disolución. Seguidamente se agregaron los monómeros funcionales, ácido metacrílico y/o metilmetacrilato, según el caso. Se mezcló en vortex durante 1 minuto y se sometió a agitación en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Posteriormente se agregó etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) y peróxido de hidrógeno al 30 %. Los compuestos se mezclaron en el vortex durante 1 minuto y nuevamente se sometieron a agitación en el baño de ultrasonidos durante 2 minutos. La mezcla se purgó con nitrógeno durante 5 minutos, se cerró el frasco y selló con *plastifilm*. La mezcla de polimerización se sometió a la acción de una lámpara UV a una temperatura de 28 °C durante 24 horas. Durante este periodo de tiempo, se produce la polimerización. Una vez formado el polímero, éste se extrajo del tubo de ensayo mediante una espátula y agua destilada, se colocó en un mortero, se trituroó y se tamizó en húmedo con un tamiz de acero inoxidable de tamaño de poro de 300 µm. Se filtró para eliminar el líquido y se lavó con etanol y posteriormente con metanol. El polímero se dejó secar en campana, y se guardó hasta su uso.

Los pasos seguidos para la obtención del MIP se presentan en la Figura 20.



Figura 20. Preparación de los polímeros

Los polímeros no impresos, NIPs, o blancos, se han sintetizado simultáneamente, siguiendo el mismo procedimiento experimental descrito, pero sin adicionar a la mezcla de polimerización la molécula molde, la ampicilina.

### 2.1.1 Procedimiento de extracción de la molécula molde de los MIPs

La extracción de la molécula molde, ampicilina, se llevó a cabo mediante un proceso de calentamiento al baño María, a una temperatura de 55 °C. Para ello, se pesó aproximadamente una cantidad de 500 mg del polímero sintetizado y se colocó en un vaso de precipitado, se le agregó 25 mL de una mezcla metanol-ácido acético 1 M (9:1 v/v), y se calentó al baño María, como se ha descrito anteriormente, durante un tiempo de 2 horas. La mezcla se filtró, con objeto de separar el polímero de la disolución extractante, empleando un sistema de filtración a vacío, papel de filtro y embudo. Finalmente, se evaluó la disolución proveniente de este filtrado para constatar la presencia de la ampicilina, utilizando el método espectrofotométrico basado en el desarrollo del complejo azul de Prusia, que se desarrollará posteriormente.

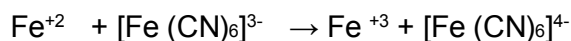


Este procedimiento de extracción se repitió tantas veces como fue necesario hasta la no detección de ampicilina en la disolución extractante, lo que indicaría que en el polímero no está presente la molécula molde. Por último, el MIP se secó en campana y se colocó en un bote cerrado en un desecador hasta su uso.

### 2.1.2 Procedimiento de detección semicuantitativa/cualitativa de ampicilina en la disolución extractante

El método espectrofotométrico usado para tal fin consiste en el desarrollo del complejo azul de Prusia, método rápido y económico que ha sido empleada para cuantificar antibióticos en preparaciones farmacéuticas (*El-Obeid H. A., y cols. (1999), Salem H, y col. (2002), Okoye, N y cols. (2007) Farhadi, K y cols. (2002)*). El procedimiento se describe a continuación:

A 2 mL del filtrado (disolución conteniendo ampicilina), se le agregó 1 mL de HCl 0,1 M, en un tubo de centrifuga de 15 mL. La disolución se calentó a 60 °C durante 30 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,03 M y 0,25 mL de hexacianoferrato (III) de potasio 0,008 M. La aparición de un color azul intenso indica la presencia de la ampicilina. El producto de la hidrólisis del anillo β-lactámico del antibiótico es capaz de convertir el Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>, y este último reacciona con el hexacianoferrato (III) para dar el complejo coloreado. La reacción es la siguiente:



La Figura 21 muestra el color del complejo formado en presencia de ampicilina, así como la no aparición de color azul en una disolución blanco, o en ausencia de ampicilina.



**Figura 21.** Desarrollo del color tras la reacción del compuesto FeCl<sub>3</sub> (medio ácido) y hexacianoferrato (III) de potasio con una disolución conteniendo ampicilina y una disolución blanco.

## 2.2 Caracterización de los polímeros sintetizados

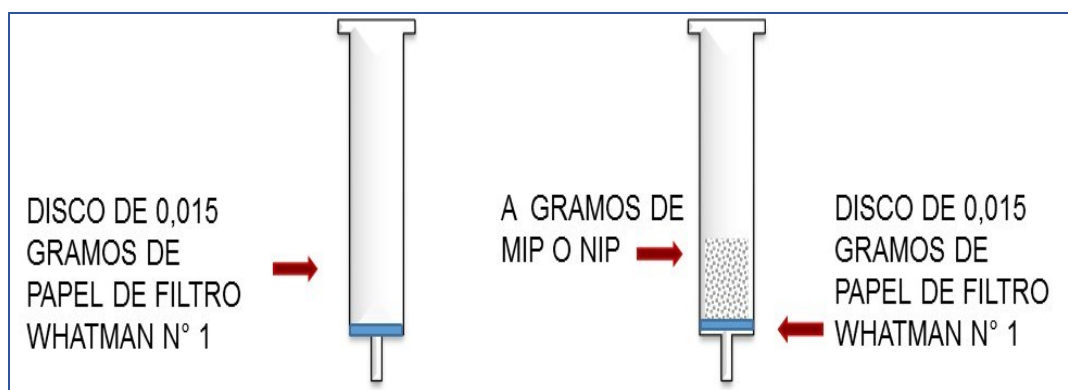
La caracterización estructural de los polímeros sintetizados se llevó a cabo mediante el empleo de un equipo Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).

El polímero preparado fue mezclado en mortero de ágata con KBr sólido puro y seco, utilizando una relación en peso de 1:100 (muestra: KBr), posteriormente se prensó y la pastilla obtenida se colocó en el portamuestras para muestras del espectrómetro. Los espectros fueron obtenidos usando un rango espectral de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  y con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## 2.3 Preparación y caracterización de los cartuchos de extracción en fase sólida. Metodología MISPE

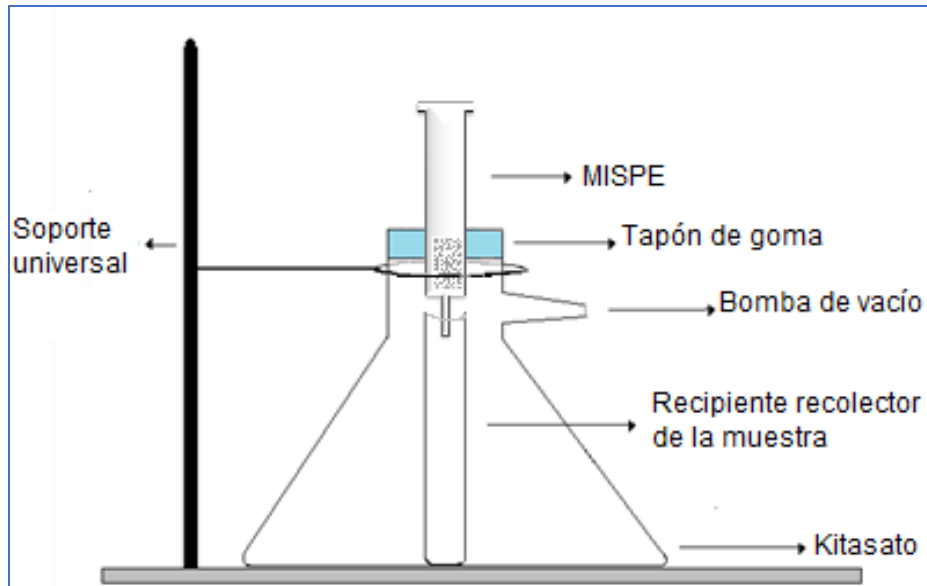
Los polímeros sintetizados se empaquetaron en el interior del cuerpo de jeringas de plástico de 6 mL, obteniendo así lo que denominamos columnas MISPE, columnas de extracción en fase sólida conteniendo como adsorbente, el polímero sintetizado.

Para la preparación de las columnas MISPE, se pesaron 0,250 g del polvo tamizado del MIP que fueron empaquetados en el cuerpo de la jeringa. Para evitar la salida del polímero en el extremo inferior de la misma, se colocó un disco de papel de filtro Whatman N° 1 con tamaño de poro de 11  $\mu\text{m}$ . Para evaluar si la ampicilina era retenida por el papel de filtro, se preparó una columna con un disco de papel de filtro de 0,015 gramos y se trató en forma idéntica a las columnas que contenían los polímeros. En la Figura 22 se muestra la preparación de las columnas.



**Figura 22.** Preparación de las columnas MISPE

Las columnas así preparadas se acoplan a un sistema de vacío (Figura 23), para proceder a la caracterización analítica del MIP, utilizando dichos cartuchos de forma similar a la utilizada en la extracción en fase sólida convencional (MISPE).

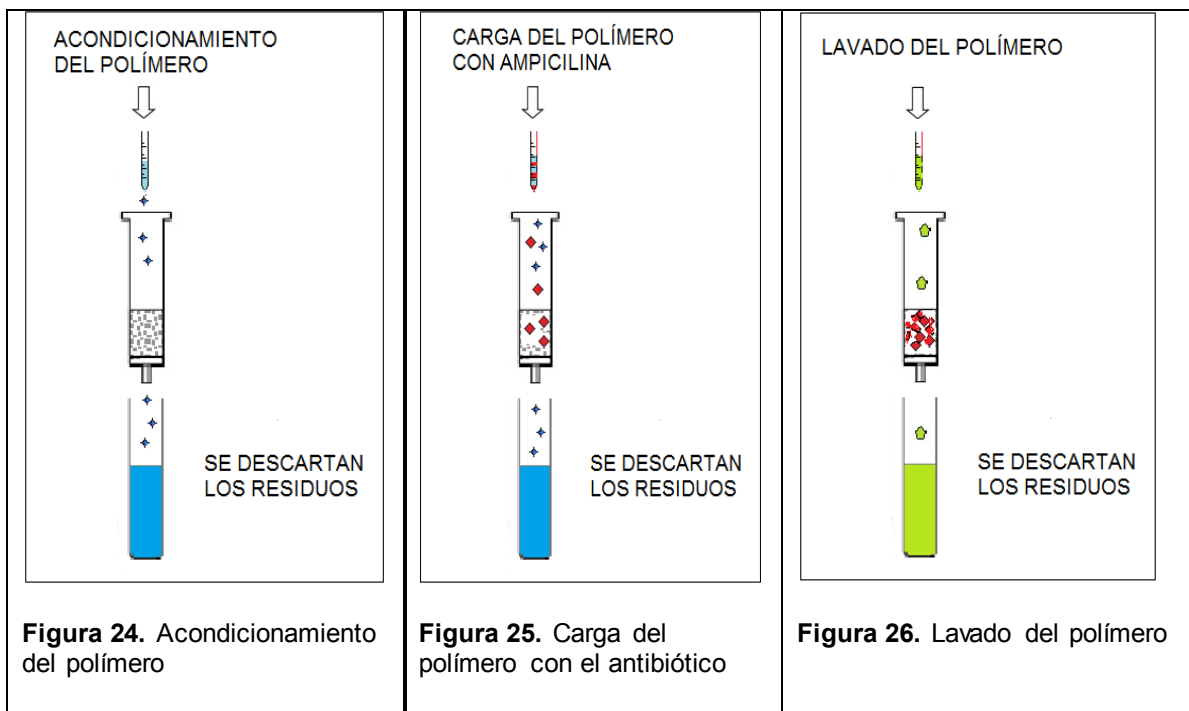


**Figura 23.** Dispositivo a vacío, para llevar a cabo el proceso MISPE.

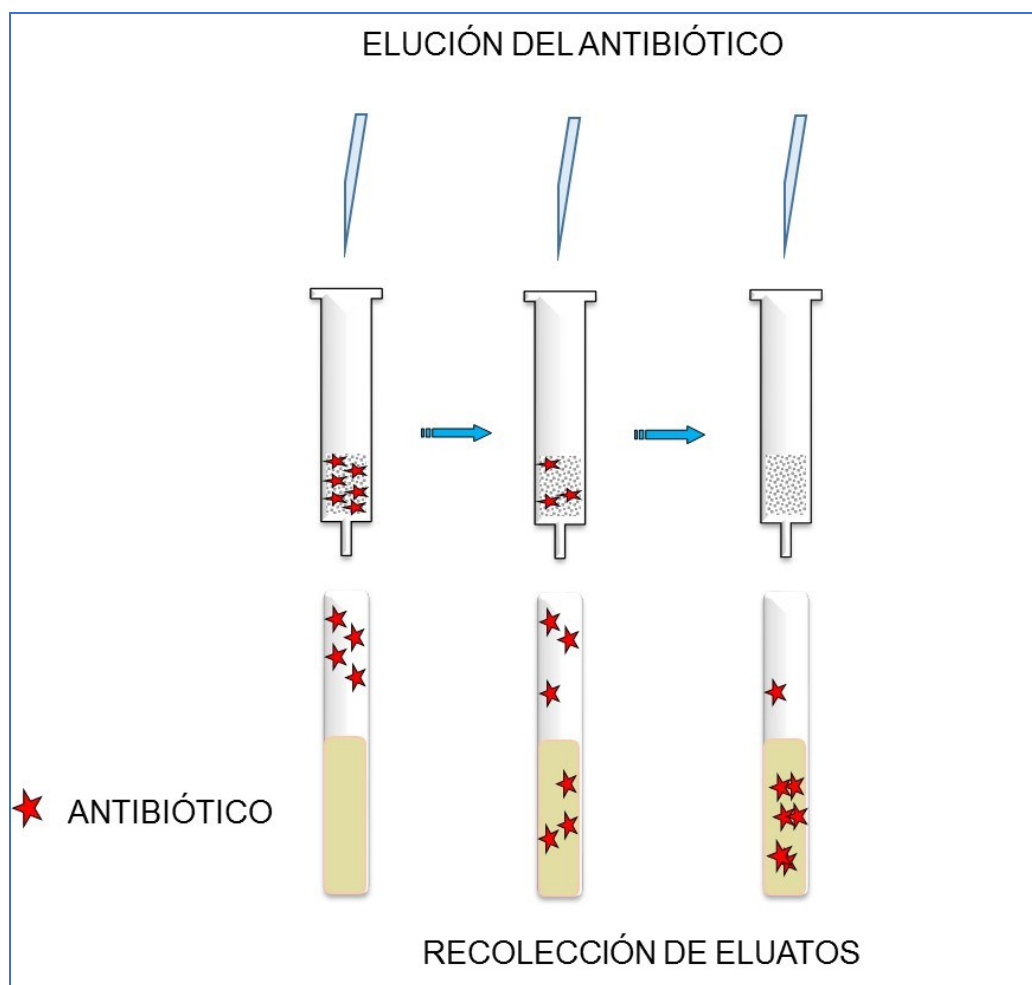
Los pasos a seguir en este procedimiento se muestran en las Figuras 24-26, y son los siguientes: acondicionamiento, carga, lavado y elución.

Las columnas fueron acondicionadas previamente con un volumen de 2x2 mL de la mezcla de dilución de la ampicilina (acetonitrilo: metanol, 8:2 v/v) o un volumen de 2x2 mL de acetonitrilo, según la experiencia. Una vez acondicionados los polímeros, las columnas se cargaron con 1 mL de la solución de ampicilina de 200 ppm y de 100 ppm preparadas a partir de una disolución patrón de ampicilina de 1000 ppm aforada con metanol (Figuras 21-24).

Después de cargado el antibiótico en las columnas de MISPE, estas fueron lavadas con dos porciones de 2 ml del diluyente (acetonitrilo: metanol, 8:2 v/v), o 2 mL de acetonitrilo según la experiencia), con la finalidad de eliminar las interacciones no específicas. Los extractos procedentes de los lavados se recogieron para su análisis evaluando si existía formación del complejo de azul de Prusia (Figura 18), y así determinar la presencia o ausencia de ampicilina.



Al finalizar el lavado de los polímeros, el analito se eluye con tres porciones de 3 mL de la fase móvil utilizada en la determinación cromatográfica (formada por mezclas de metanol: ácido acético 1 N (9:1 v/v), o de metanol: ácido acético concentrado (198,8:1,2 v/v). El procedimiento se hizo por triplicado. En la Figura 27 se muestra el proceso de elución.



**Figura 27.** Elución del antibiótico de la columna MISPE.

## 2.4 Determinación de ampicilina en leche de vaca

A una cantidad de 5 gramos de leche de vaca entera, previamente descongelada en nevera y agitada hasta homogeneización, se le añade 1 mL de ampicilina de concentración 2 ppm, preparada a partir de una disolución patrón de ampicilina en acetonitrilo. Se centrifuga en frío durante 10 min a 600 rpm con la finalidad de eliminar la grasa. Se toma el sobrenadante y se le añade 1 mL de ácido acético 1 N para precipitar las proteínas. La mezcla se vuelve a enfriar a 4 °C durante 5 minutos y se centrifuga. Se tomó el sobrenadante y se le añade 1 mL de acetonitrilo y 1 mL de cloroformo. Se mezcla en vortex, se enfría a 4 °C (5 minutos), y se centrifuga. El sobrenadante se pasa por el MISPE. Se efectuó la limpieza de la columna con 4 porciones de 1 mL de acetonitrilo. El analito de interés se extrajo con 3 porciones de 2 mL cada una empleando una mezcla de metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v). El eluato se evaporó con nitrógeno hasta sequedad y el residuo obtenido se redisolvió en 1 mL de mezcla diluyente.

Las porciones resultantes fueron filtradas a través de filtros Sartorius Minisart de 0,45  $\mu\text{m}$ , y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos para su cuantificación-siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

## 2.5 Procedimiento cromatográfico de determinación y cuantificación de ampicilina

El análisis cuantitativo de ampicilina se llevó a cabo mediante la inyección de un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de muestra en una columna analítica de acero inoxidable, de 4,0 x 250 mm rellena con material  $\text{C}_{18}$  (octadecilsilano químicamente enlazado a sílica porosa), dispuesta en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Figura 28).



**Figura 28.** Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Dionex, Ultimate 3000)

Las condiciones en las que se ha llevado a cabo la separación cromatográfica se basan en el método publicado en la *United States Pharmacopeia and National Formulary (2007)*, y se detallan a continuación:

- Fase móvil: Se utilizó una mezcla de agua, acetonitrilo, fosfato monobásico de potasio 1 M y ácido acético 1 N (909: 80: 10: 1 v/v). Posteriormente se filtró con un filtro Whatman de 0,45  $\mu\text{m}$ , para evitar cualquier obstrucción en el HPLC.
- Diluyente: Para la preparación de la disolución patrón de ampicilina, se utilizó el siguiente diluyente: Se mezcló 10 mL de fosfato monobásico de potasio 1 M con 1 mL de ácido acético 1 M y se diluyó con agua destilada hasta 1000 mL.

- Preparación del estándar de ampicilina: Se disolvió una cantidad de 0,1033 g de ampicilina USP al 96,78 %, en 100 mL de disolución diluyente, se agitó y se sometió a ultrasonido para lograr la disolución completa. Se usó esta disolución inmediatamente después de ser preparada.

El proceso cromatográfico se ha llevado a cabo haciendo uso del modo de elución en isocrático, empleando la fase móvil antes mencionada, a una velocidad de flujo de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Antes de su inyección, las muestras fueron filtradas a través de filtros de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ . La cuantificación de ampicilina se llevó a cabo midiendo la absorción de luz UV-Visible en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 254 nm, considerado la medida del área de pico del analito.

## 2.6 Estudio de selectividad del método MISPE

Se ha llevado a cabo un estudio de la especificidad del método MISPE desarrollado, en el que se ha empleado el MIP3 como sorbente sólido. Para ello, se han realizado ensayos para determinar el comportamiento del MISPE frente a otros antibióticos de la familia de los betalactámicos y de estructura similar a la ampicilina, como son amoxicilina, oxacilina y penicilina G sódica.

Los experimentos llevados a cabo se han realizado aplicando el método MISPE completo, tal y como se describe en el apartado de 2.5 de Procedimientos, pero en este caso dopando la muestra con una concentración de 2 ppm de cada uno de los cuatro antibióticos objeto de estudio, cuya estructura química posee grupos similares a los de la ampicilina.





### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Como ya se ha mencionado anteriormente el objetivo fundamental de este trabajo de investigación es desarrollar sistemas alternativos de tratamiento de muestra para la determinación de residuos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, basados en el empleo de polímeros de impresión molecular (MIPs) capaces de preconcentrar y extraer de forma selectiva los antibióticos de esta familia de muestras de leche.

El trabajo se ha dividido en diferentes etapas, cuyos resultados y discusión se describen a continuación:

#### 3.1 Preparación de los polímeros de impresión molecular

##### 3.1.1 Síntesis de los MIPs y NIPs

En esta investigación se ha llevado a cabo la síntesis de 6 polímeros de impresión molecular, MIPs, mediante la técnica de polimerización en bloque e impresión no covalente, utilizando radiación con luz ultravioleta en frío, siguiendo el procedimiento analítico que se ha descrito en el apartado 2.1 de Procedimientos de la parte experimental.

La polimerización en bloque fue la primera estrategia empleada para sintetizar polímeros de impresión molecular y hoy día sigue siendo la más utilizada, ya que es la más sencilla y no requiere de material específico. Como resultado de la polimerización, se obtiene un monolito o bloque (de ahí su nombre), que ha de triturarse y tamizarse hasta obtener partículas de diferente tamaño, dependiendo de la posterior aplicación del polímero.

La primera etapa para preparar un polímero de impresión molecular es seleccionar el monómero apropiado para dar múltiples interacciones con la molécula molde (analito). En este caso, el antibiótico ampicilina es la molécula molde. Su estructura contiene grupos amina (N-H) y grupos carbonilo (CO), susceptibles de formar enlaces de hidrógeno con el monómero funcional. En este caso, se han seleccionado como monómeros funcionales, el ácido metacrílico (MAA) y el metilmetacrilato (MMA).

El disolvente donde tiene lugar la polimerización juega un papel importante en el éxito de la síntesis del polímero, puesto que además de disolver la molécula molde y el monómero funcional, actúa de porogen, y es el que le confiere la estructura "física" al polímero, puesto que influye en la porosidad del mismo, y por tanto, en la facilidad para el acceso y el reconocimiento del analito en la matriz polimérica formada. Cuanto más baja sea la constante dieléctrica del disolvente o porogen, más se acentuarán las fuerzas de unión entre la molécula molde y el monómero funcional. En este trabajo se ha seleccionado acetonitrilo como disolvente porógeno, que además

de ser un buen disolvente de ambos reactivos, no interfiere en la formación de puentes de hidrógeno.

Para conseguir una buena selectividad se requiere un alto grado de entrecruzamiento, por lo que se hace necesaria la selección del entrecruzante adecuado, cuya reactividad ha de ser similar a la del monómero funcional. El etilenglicol dimetacrilato, EGDMA, se ha utilizado en esta síntesis, dado que es uno de los entrecruzantes más utilizados cuando se emplea MAA o MMA como monómero funcional, puesto que ofrece muy buenas propiedades de reconocimiento así como una adecuada estabilidad térmica y mecánica (Wulff, G., 1972)

La síntesis de los polímeros se llevó a cabo disolviendo la molécula a imprimir, ampicilina, en acetonitrilo, para proceder posteriormente a la formación del complejo monómero-molécula molde. Para ello, y con objeto de conseguir un MIP altamente selectivo para ampicilina, se evaluó la posibilidad de utilizar como monómero funcional ácido metacrílico, metil metacrilato o una mezcla de ambos en diferentes proporciones. Una vez formado el complejo se procedió a añadir el entrecruzante, y como iniciador de la reacción de polimerización, un agente que produjera radicales por medio de calor o luz ultravioleta, utilizándose en este caso peróxido de hidrógeno. Para evitar la inhibición de la reacción de polimerización por el oxígeno presente en la disolución, se purgó la mezcla con nitrógeno durante 5 minutos. Como resultado de la polimerización se obtuvo un sólido color blanco, que fue triturado y tamizado hasta obtener las partículas del tamaño adecuado para la preparación de los cartuchos de extracción en fase sólida.

Las cantidades de cada uno de los reactivos de la mezcla de polimerización se indican en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Composición de los polímeros sintetizados

Polímero	Ampicilina (gramos)	Monómero funcional		Entrecruzante EGDMA (mL)	Iniciador H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)
		MAA (mL)	MMA (mL)		
MIP 1	0,0100	0	0,27	2,70	0,22
MIP 2	0,0100	0,12	0,13	2,70	0,22
MIP 3	0,0100	0,24	0	2,70	0,22
MIP 4	0,0100	0,24	0	1,10	0,22
MIP 5	0,0100	0,24	0	0,54	0,22
MIP 6	0,0100	0,24	0	0,27	0,22

La relación molar de estas cantidades se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Composición molar de los polímeros sintetizados.

Polímero	Ampicilina	Monómero funcional		Entrecruzante EGDMA
		MAA	MMA	
1	1	--	100	500
2	1	50	50	500
3	1	100	--	500
4	1	100	--	200
5	1	100	--	100
6	1	100	--	50

Los NIPs o polímeros blancos fueron preparados siguiendo el mismo protocolo pero sin añadir el analito plantilla, con el fin de establecer una comparativa en los diferentes procesos de caracterización de los polímeros.

El siguiente paso fue la fragmentación y el tamizado del polímero (Figura 29) hasta conseguir un tamaño de partícula adecuado. Así, se recuperó el polímero del tubo de ensayo y se trituró empleando un mortero de porcelana, tal y como se indica en el apartado 2.1. de Procedimientos. El polímero fue finamente dividido y tamizado por un tamiz con diámetro de poro de 300  $\mu\text{m}$ , lo suficientemente grande como para ser empleado como soporte sólido. El polímero particulado se lavó con etanol y posteriormente con metanol, se filtró y se secó, manteniéndose en el desecador hasta el siguiente paso, la extracción de la molécula impresa.



Figura 29. Molienda y tamizado del polímero.

### 3.1.2 Extracción de la molécula molde

Por último, fue necesario extraer la molécula impresa, o molécula molde original, del polímero formado. Este proceso se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.1. de Procedimientos.

La ampicilina se extrajo por calentamiento del MIP inmerso en un reactivo extractante al Baño María. Como reactivo extractante se probó metanol con diferentes porcentajes de ácido acético, encontrándose que la mezcla de metanol: ácido acético 1 N (9:1 v/v), fue la que dio mejores resultados. La adición del ácido acético se debe a que pequeñas cantidades de este ácido favorecen la extracción de la ampicilina. En las disoluciones de extracción/lavado se determina la presencia o ausencia de ampicilina, utilizando el método espectrofotométrico basado en el desarrollo del complejo azul de Prusia, con objeto de comprobar la eficiencia de la extracción y así garantizar que el polímero está libre de analito, quedando sólo los huecos selectivos de igual tamaño y forma que dicho analito. El proceso de extracción se realiza tres veces consecutivas para asegurar que se ha eliminado toda la ampicilina de la matriz polimérica. De esta forma, el polímero molecularmente impreso para ampicilina queda preparado para ser empaquetado en los cartuchos de extracción en fase sólida y llevar a cabo estudios de unión con dicho analito.

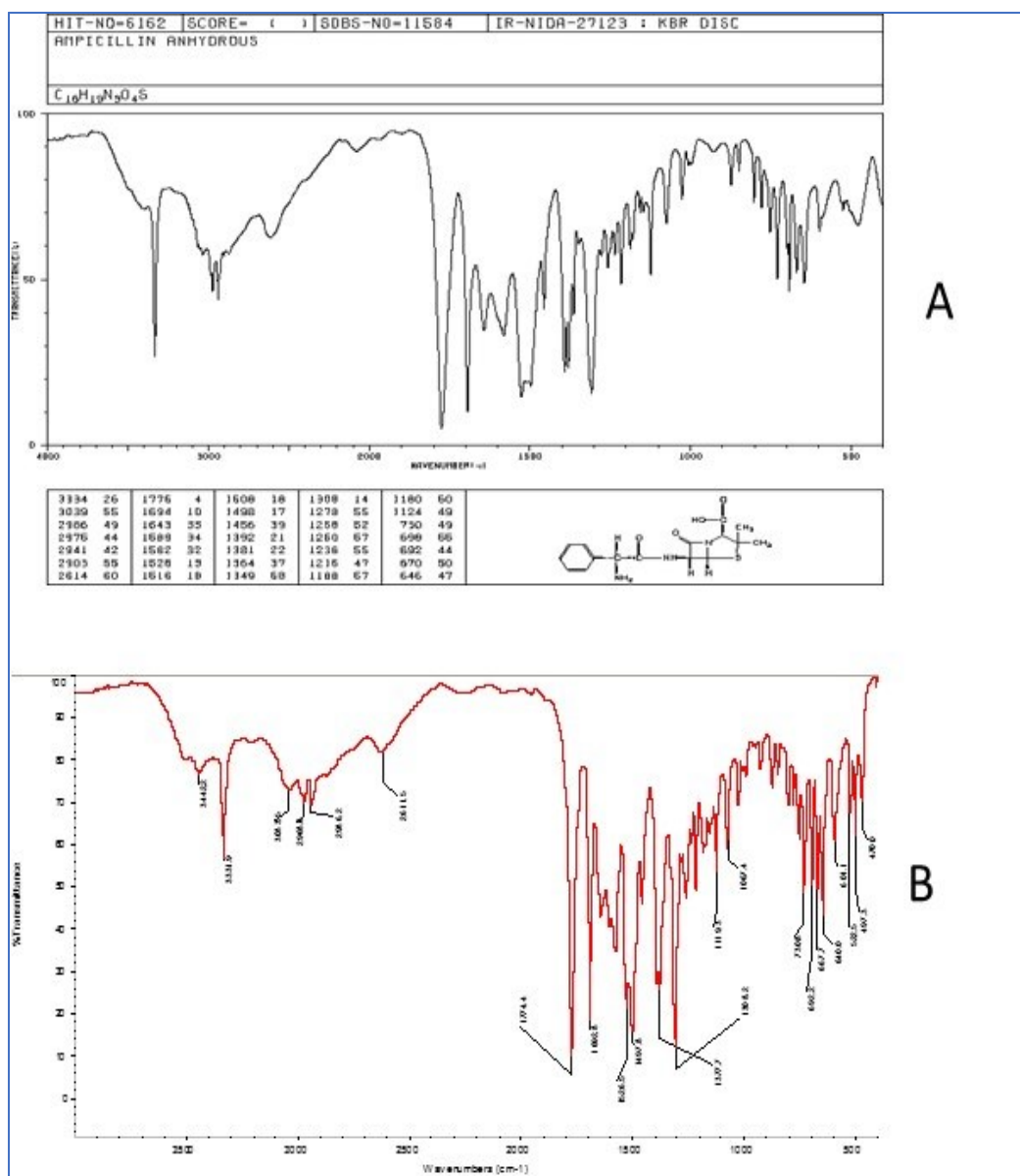
Los polímeros blancos o no impresos, NIPs, fueron sometidos a los mismos procedimientos experimentales descritos anteriormente. Cabe señalar que el tamaño de los NIPs 5 y 6 fue menor al tamaño de poro del papel de filtro empleado (11  $\mu\text{m}$ ) por lo que fueron obtenidos al secar el líquido proveniente del proceso de polimerización.

## 3.2 Caracterización estructural de los polímeros sintetizados

Con la finalidad de evaluar los diferentes polímeros sintetizados, se realizaron los espectros FT-IR tanto de los compuestos puros como de los polímeros molecularmente impresos (MIPs) y sus correspondientes bancos (NIPs), y se compararon con los espectros encontrados en la bibliografía.

### 3.2.1 Espectros IR de los componentes de la mezcla de polimerización

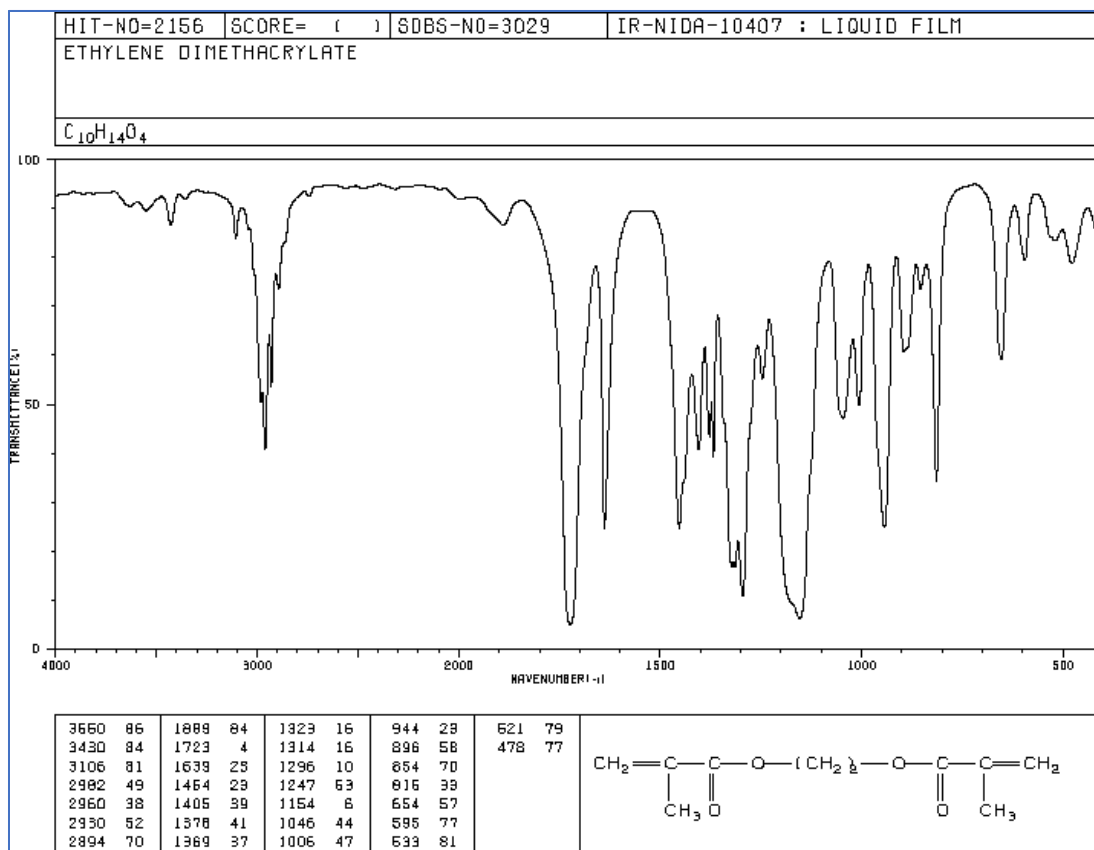
Se muestran a continuación los espectros de IR característicos de los compuestos empleados en la síntesis. Se han obtenido de la bibliografía con objeto de compararlos con los obtenidos en el laboratorio. En la Figura 30 se presenta el espectro FT-IR de la ampicilina obtenido de la fuente bibliográfica (A) y el espectro obtenido en el laboratorio en esta investigación (B).



**Figura 30.** Espectro FT-IR de la ampicilina. A) Procedente de la bibliografía (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds. SBDS. [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng)), y B) obtenida en el laboratorio en esta investigación.

En ambos espectros se observan cerca de  $3300\text{ cm}^{-1}$  los picos característicos del grupo amino (N-H), alrededor de los  $3000\text{ cm}^{-1}$  el pico correspondiente al anillo aromático, en el rango de los  $1700\text{--}1790\text{ cm}^{-1}$  se presentan las vibraciones correspondientes al grupo carbonilo (C=O) y sobre los  $1400\text{ cm}^{-1}$  se observa el pico correspondiente al grupo ciano (C-N).

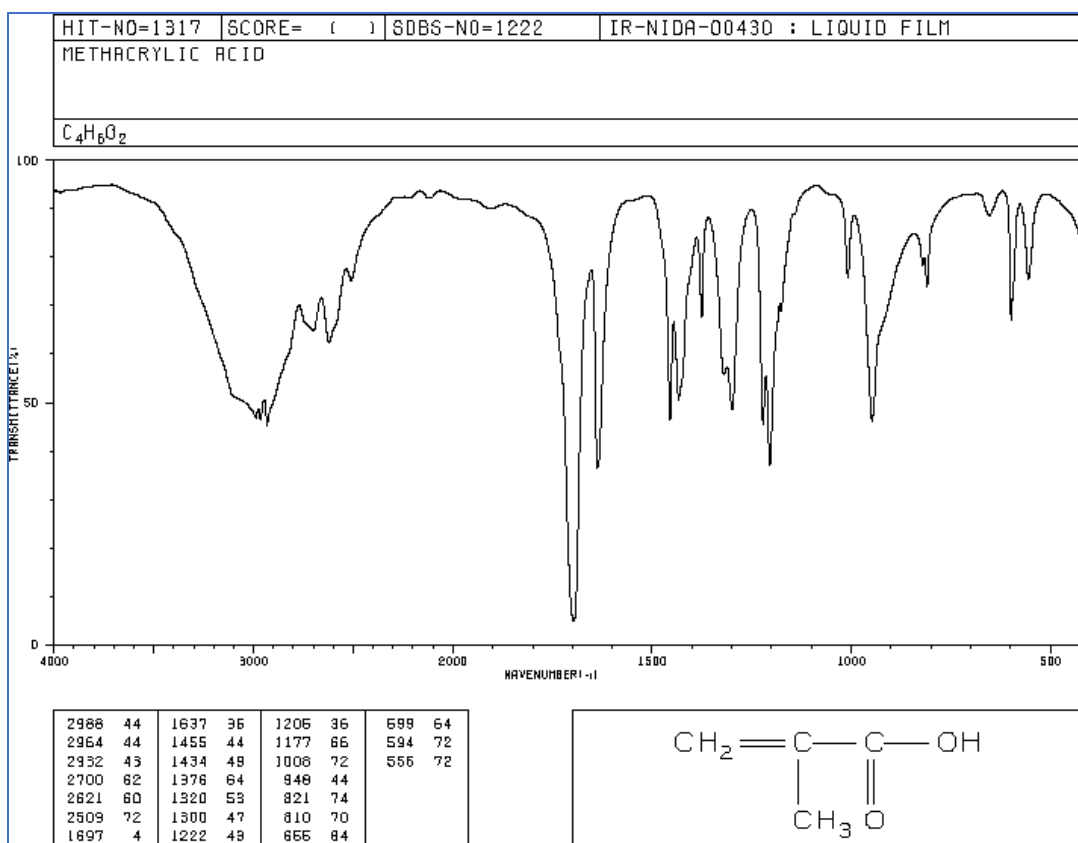
En la Figura 31 se presenta el espectro FT-IR del etilenglicol dimetacrilato, EGMDA, el cual fue utilizado como monómero entrecruzante.



**Figura 31:** Espectro FT-IR del etilenglicol dimetacrilato (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS).

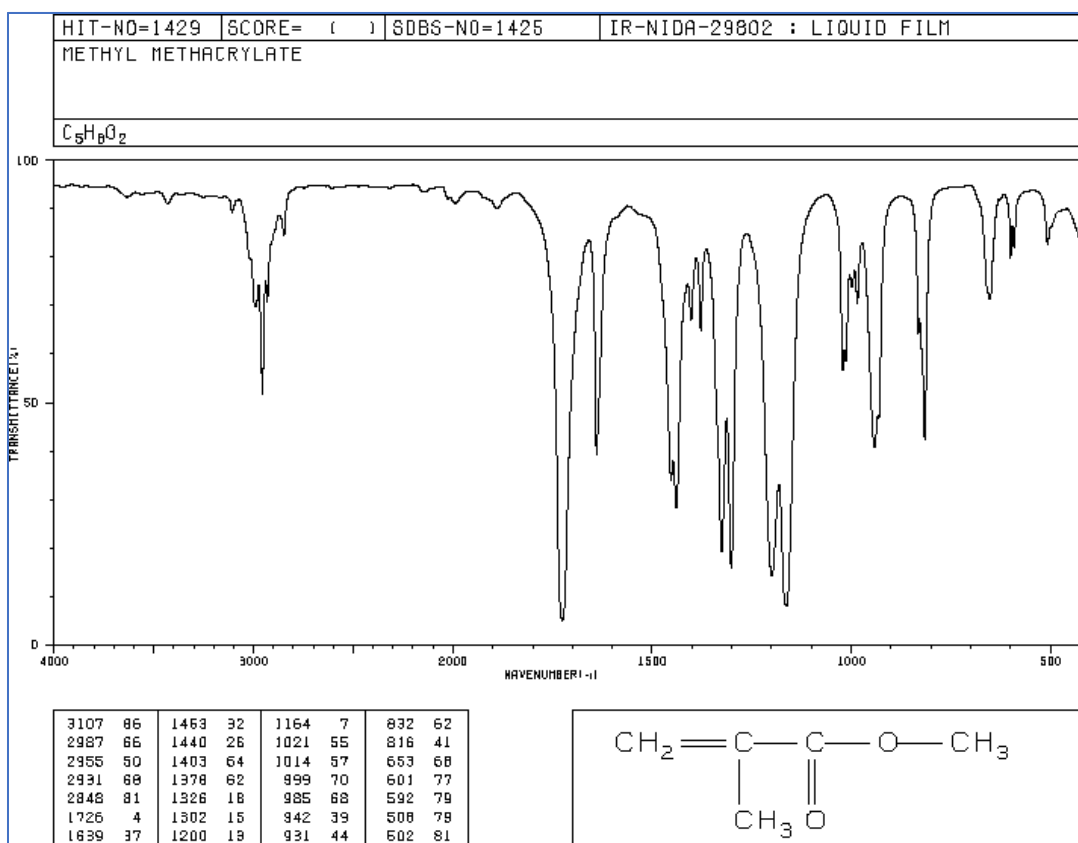
En este espectro se observan a 3000 cm<sup>-1</sup>, el pico correspondiente al enlace C-H; alrededor de 1700 cm<sup>-1</sup> el pico correspondiente al grupo C=O; alrededor de los 1600 cm<sup>-1</sup> el pico correspondiente al enlace C=C; entre 1100 y 1200 cm<sup>-1</sup> una banda ancha correspondiente al enlace -C-O-C- y sobre los 900 cm<sup>-1</sup> se observa el pico correspondiente al -C-H deformado de los alquenos.

En la Figura 32 se presenta el espectro FT-IR del ácido metacrílico. En este espectro se observa sobre los 3000 cm<sup>-1</sup> una banda ancha correspondiente a la vibración de la banda del grupo -OH del ácido carboxílico (COOH), en 1690 cm<sup>-1</sup> se presenta la señal característica del grupo C=O y sobre los 1637 cm<sup>-1</sup>, la señal correspondiente al grupo C=C; en los 949 cm<sup>-1</sup> se observa la banda del grupo -OH (COOH).



**Figura 32.** Espectro FT-IR ácido metacrílico (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS).

En la Figura 33 se presenta el espectro FT-IR del metacrilato de metilo. Se observa en el espectro en los 1690 cm<sup>-1</sup> el pico correspondiente al grupo C=O, sobre los 1637 cm<sup>-1</sup> el pico del C=C, y en los 3000 cm<sup>-1</sup> un pico correspondiente a los enlaces C-H.



**Figura 33.** Espectro FT-IR del metacrilato de metilo. (Fuente: Spectral Database for Organic Compounds SBDS).

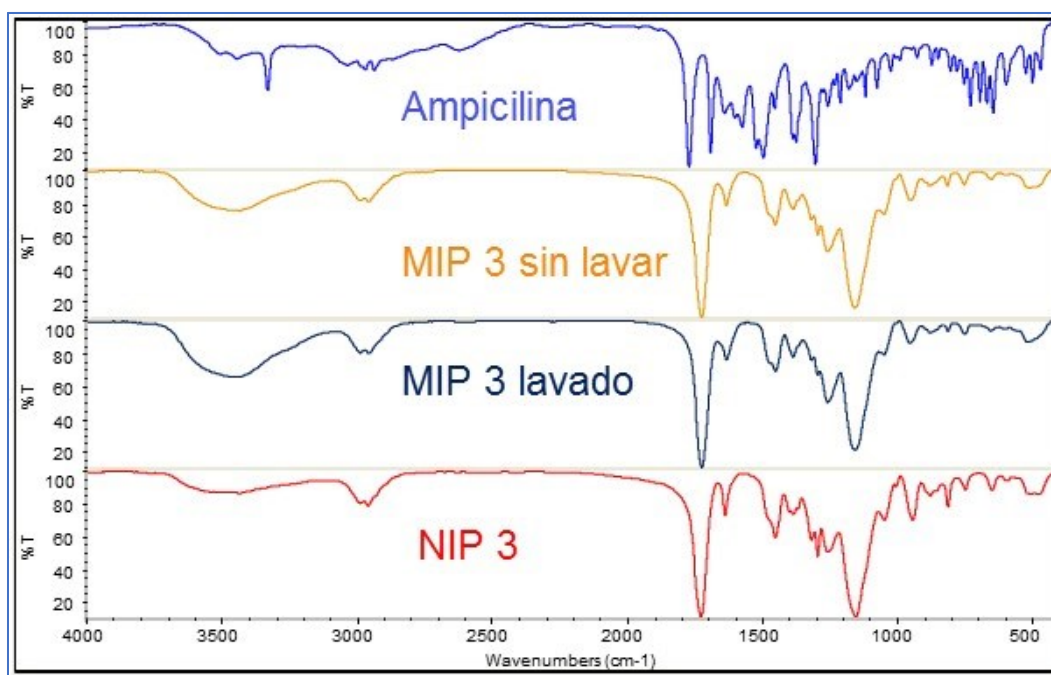
### 3.2.1 Espectros IR de los polímeros sintetizados

De igual forma, se realizaron los espectros IR de los polímeros sintetizados, tanto MIPs como NIPs, siguiendo el procedimiento experimental que se detalla en el apartado 2.2 de Procedimientos.

Hay que indicar que tanto en los MIPs como en los NIPs estudiados se presenta una banda ancha entre 1100 -1200 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al enlace -C-O-C- del etilenglicol dimetacrilato. No se observa en los 900 cm<sup>-1</sup> el pico correspondiente al -C-H deformado de los alquenos y son muy pequeños los picos en 1600 cm<sup>-1</sup> correspondientes al -C=C-. Sin embargo, si se encuentra presente el pico característico del -C=O sobre los 1700 cm<sup>-1</sup>.

Inicialmente, se llevó a cabo la comparación de los espectros IR del MIP y NIP con objeto de ver si presentaban algún tipo de diferencia estructural. La Figura 34 muestra el espectro de ampicilina y el del MIP-3, antes y después del proceso de lavado/extracción del analito, así como el de su correspondiente polímero no impreso.





**Figura 34.** Espectro FT-IR para la ampicilina, MIP 3 antes del proceso de lavado/extracción de ampicilina (MIP 3 sin lavar) y después (MIP 3 lavado) y del NIP 3

Se puede observar en todas ellas que los espectros FT-IR tanto del polímero control no impreso (NIP) como del polímero de impronta molecular son similares, lo que indica la similitud en la estructura de la red polimérica formada.

En los espectros FT-IR anteriores, se observan las absorciones debidas a la vibración del OH carbonílico ( $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ ), la banda correspondiente al grupo carbonílico ( $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ ), la del C-O ( $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$ ), y las vibraciones de los enlaces C-H ( $\sim 756$ ,  $\sim 1390$ ,  $\sim 1460$  y  $\sim 2956 \text{ cm}^{-1}$ ). En  $2990$  y  $2956 \text{ cm}^{-1}$ , aparecen las vibraciones del enlace C-H. La banda en  $1454 \text{ cm}^{-1}$  probablemente se debe a la presencia de  $-\text{CH}_2-$ , y la banda en  $1389 \text{ cm}^{-1}$  puede deberse a la presencia de grupos  $\text{CH}_3$ .

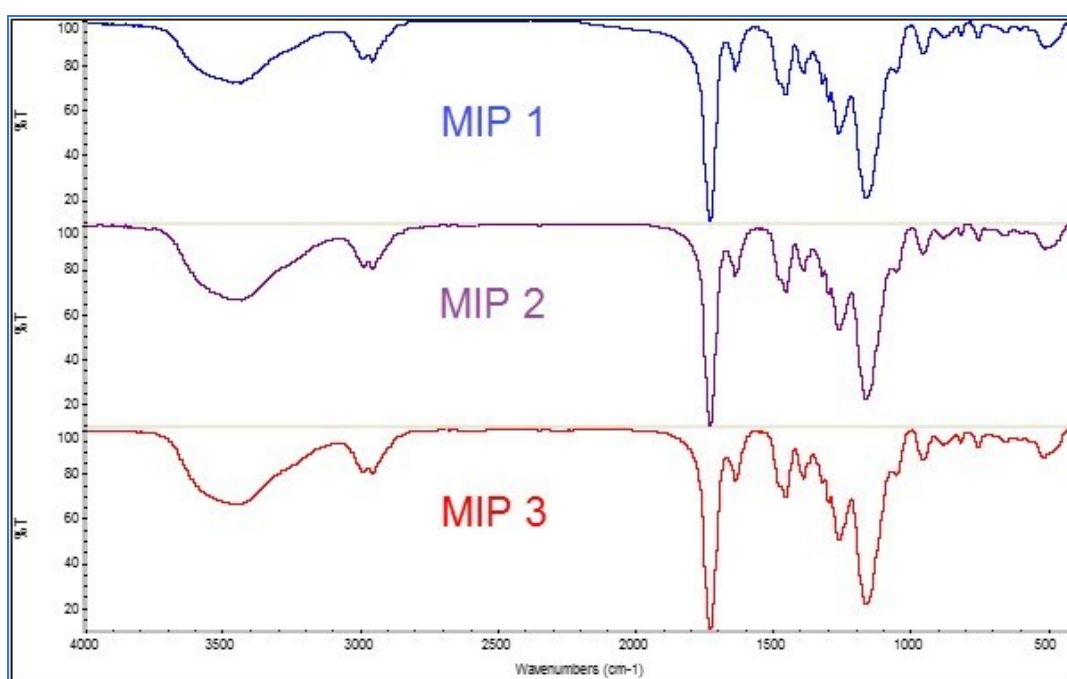
Asimismo, se puede ver similitud entre el espectro de la ampicilina y el MIP 3 sin lavar, principalmente en los enlaces C-N y C-C ( $500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ). Después del lavado, los espectros del MIP se hacen comparables con el NIP (polímero blanco), lo cual indica que toda la molécula molde fue eliminada del MIP 3 sin lavar. Todas las señales sugieren que el AMP-MIP fue exitosamente sintetizado.

Resultados similares fueron obtenidos por Santos, W y cols (2009), quienes encontraron que el espectro IR del MIP sin lavar fue muy similar al del MIP lavado, indicando que tienen estructuras similares. En los polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de 4-aminofenol, en un MIP preparado usando Boc-L-Phe-OH como molécula molde Li, S y cols (2008) también encontraron que existe similitud tanto en el espectro de la molécula molde como

del precursor. Después de lavar, el espectro del MIP se hizo comparable al del NIP; y en MIPs sintetizados basados en 1-vinil-2-pirrolidona como monómero y divinilbenceno como entrecruzante, *Pereira, E y cols (2014)* encontraron que el espectro FT-IR para todos los MIPs son bastante similares entre sí, dado que todos fueron sintetizados basados en el mismo monómero y entrecruzante y tampoco hubo diferencia significativa entre los MIPs y los NIPs.

Se llevó a cabo también la comparación de los espectros de IR de los MIP sintetizados con diferentes monómeros funcionales como son el MIP 1, MIP 2 y MIP 3, tras el proceso de extracción/lavado de la molécula molde. El MIP 1 fue preparado utilizando metacrilato de metilo, en el MIP 3 el monómero funcional fue el ácido metacrílico y en el MIP 2 se utilizó la mezcla de ambos monómeros.

En la Figura 35 se presentan los espectros FT-IR de estos polímeros.



**Figura 35.** Espectros FT-IR de MIP 1, MIP 2 y MIP 3 tras el proceso de lavado/extracción de la molécula molde

En los tres polímeros se observa una banda ancha entre  $1100 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace  $-C-O-C-$  del monómero utilizado como entrecruzante (etilenglicol dimetacrilato).

Además, se observó, en todos ellos, sobre los  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , la banda ancha correspondiente a la vibración del enlace del  $-CH$  (COOH), con mayor o menor intensidad.

### 3.3 Caracterización analítica de los polímeros. Estudios de unión. Metodología MISPE.

La caracterización analítica de los polímeros se llevó a cabo mediante estudios de unión polímero-analito empleando cartuchos de extracción MISPE conteniendo los polímeros sintetizados. Para ello, se utilizaron a modo de cartucho, para colocar los polímeros sintetizados, el cuerpo de jeringas de plástico de 6 mL, a los cuales se les colocó papel de filtro Whatman N° 1, con tamaño de poro de 11  $\mu\text{m}$  en el extremo inferior, para evitar la salida del polímero. Los cuerpos de las jeringas se empaquetaron con diferentes cantidades de polímero, y se utilizaron de manera similar a los cartuchos utilizados en la técnica de extracción en fase sólida convencional. Los pasos a seguir para conseguir un MISPE adecuado son los correspondientes al procedimiento de extracción en fase sólida: acondicionamiento, carga, lavado y elución.

Se comprobó, primeramente que el filtro no producía ningún tipo de retención del analito. Para ello, se hizo pasar una solución de 1 mL de 200 ppm de ampicilina por la jeringa de plástico conteniendo solamente un disco de papel Whatman N° 1 de 0,0150 gramos. La presencia o ausencia de ampicilina en el eluato recogido se determina mediante el método fotométrico con azul de Prusia (*norma española: UNE 34-231-81*). Los resultados obtenidos indican que el filtro no retiene al analito, puesto que no hubo formación de complejo en ninguno de los casos.

#### Acondicionamiento

Para que el polímero se una selectivamente a la molécula a analizar, es necesario acondicionar previamente el cartucho del MISPE, utilizando un disolvente cuya polaridad sea inferior al disolvente utilizado en el proceso de elución. Con la finalidad de obtener la mezcla de acondicionamiento más adecuada se efectuaron diferentes ensayos utilizando acetonitrilo y mezclas acetonitrilo: metanol (8:2 v/v). Finalmente, los mejores resultados se consiguieron cuando se acondicionaron los cartuchos con dos porciones de 2 mL de acetonitrilo.

#### Carga

Con la finalidad de favorecer las interacciones entre el analito y las cavidades específicas existentes en el polímero, se utilizó para la carga del analito un sistema de disolventes similar al utilizado para el acondicionamiento. De esta forma la ampicilina queda unida específicamente al polímero impreso molecularmente. El estudio de la concentración de la ampicilina en la etapa de carga se llevó a cabo empleando los polímeros 1, 2 y 3 (MIP1, MIP2, MIP 3, y sus correspondientes NIPs). Para ello, se empaquetaron 0,500 gramos de polímero en los cartuchos o cuerpos de jeringa, se acondicionaron con 2x2 mL de acetonitrilo y se cargaron con 1 mL de una disolución patrón de 100 ppm de ampicilina en acetonitrilo: metanol (9: 1 v/v). Se procedió a una etapa de lavado con 2x2 mL de acetonitrilo, para posteriormente eluir con una mezcla

metanol: ácido acético 1 N (9: 1 v/v) (2x2mL). Los eluatos obtenidos en cada una de las etapas son sometidos al método fotométrico de la formación del complejo coloreado azul de Prusia, con objeto de determinar la ausencia o presencia de ampicilina en los mismos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Presencia o ausencia de ampicilina en las diferentes porciones. El signo negativo indica la no formación del complejo coloreado, y por tanto la ausencia de ampicilina en el extracto analizado.

Polímero	Acondicionamiento	Carga 1mL/100 ppm	Lavado	
			Porción 1	Porción 2
MIP 1	-	-	+	+
NIP 1	-	-	+	+
MIP 2	-	-	+	+
NIP 2	-	-	+	+
MIP 3	-	-	-	-
NIP 3	-	-	-	+

En los diferentes experimentos realizados se observó que el MIP era capaz de retener ampicilina en el momento de la carga y de soltarla en los lavados. Esto pareció ocurrir en mayor grado que en el NIP, lo que permite inferir que los polímeros de impronta molecular parecen ser más específicos a la ampicilina que sus correspondientes polímeros no impresos.

Sin embargo, de los tres polímeros estudiados, se observó que el MIP 3 es el que ofrece un mayor grado de reconocimiento a la ampicilina, dado que, a la vista de los resultados obtenidos, una vez que el MIP ha retenido la ampicilina, ésta no es eliminada en el proceso de lavado. Este polímero sólo contiene ácido metacrílico como monómero funcional. Por este motivo, se escogió el ácido metacrílico como monómero funcional para la preparación de los polímeros 4, 5 y 6, variando la cantidad de entrecruzante, y que serán evaluados con posterioridad.

### Lavado

La aplicación de una adecuada etapa de lavado es necesaria para eliminar los compuestos que no se han retenido específicamente en el MIP. La optimización del disolvente de lavado se llevó a cabo determinando la ausencia o presencia de ampicilina en los lavados de los polímeros impresos obtenidos según el procedimiento descrito a continuación:

Se empaquetaron 0,3000 g de los polímeros impresos y sus respectivos polímeros no impresos en los cuerpos de jeringas utilizados como cartuchos de extracción. Los polímeros se acondicionaron con 2x2 mL de acetonitrilo y se cargaron con 1 mL de disolución de ampicilina (100 ppm) en acetonitrilo: metanol (9:1 v/v). Posteriormente se procedió al lavado de los cartuchos evaluando la acción del acetonitrilo y de la mezcla acetonitrilo: metanol en distintas

proporciones. Tras los lavados, la etapa de elución se llevó a cabo empleando metanol: ácido acético 1 N (9: 1 v/v) (2x2mL), en todos los casos. Una vez recogidas las muestras procedentes del proceso de carga y de lavado, se siguió el procedimiento descrito para el desarrollo del complejo de azul de Prusia y se evaluó si se formaba o no el complejo. Los resultados mostraron que el analito no se desprende (o se desprende en menor proporción) lavando el polímero dos veces con un volumen de 2 mL de acetonitrilo puro.

## Elución

Una vez lavados los cartuchos, se procedió a extraer la ampicilina retenida en ellos. Es necesario que el disolvente o mezcla de disolventes utilizado para el proceso de elución, sea de alta polaridad para que pueda romper las interacciones específicas producidas entre el analito y el MIP. Con la finalidad de tener un sistema de disolventes que fuese similar a la mezcla utilizada en el análisis de la ampicilina por el método utilizado en la USP 30, se seleccionó para la elución la mezcla metanol: ácido acético. Con objeto de evaluar la eficacia de dicha mezcla se probaron diferentes porcentajes de cada uno de los componentes de la misma. Para ello, se empaquetaron los polímeros impresos y sus correspondientes NIPs en los cartuchos de extracción. Los polímeros se acondicionaron y cargaron empleando las condiciones optimizadas hasta el momento. Posteriormente se procedió a la elución del analito, recogiendo 3 eluatos de 3 mL de cada uno para todas las mezclas de elución probadas. Una vez recogidos los eluatos, se siguió el procedimiento de detección de ampicilina descrito para la formación del complejo de azul de Prusia. Los resultados obtenidos muestran que con la mezcla metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v) se logró la elución de la ampicilina en los MISPE estudiados, y únicamente fueron necesarias dos eluciones de 3 mL, dado que en la última elución el resultado fue negativo, es decir, no hubo formación del complejo coloreado.

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos en esta etapa de elución.

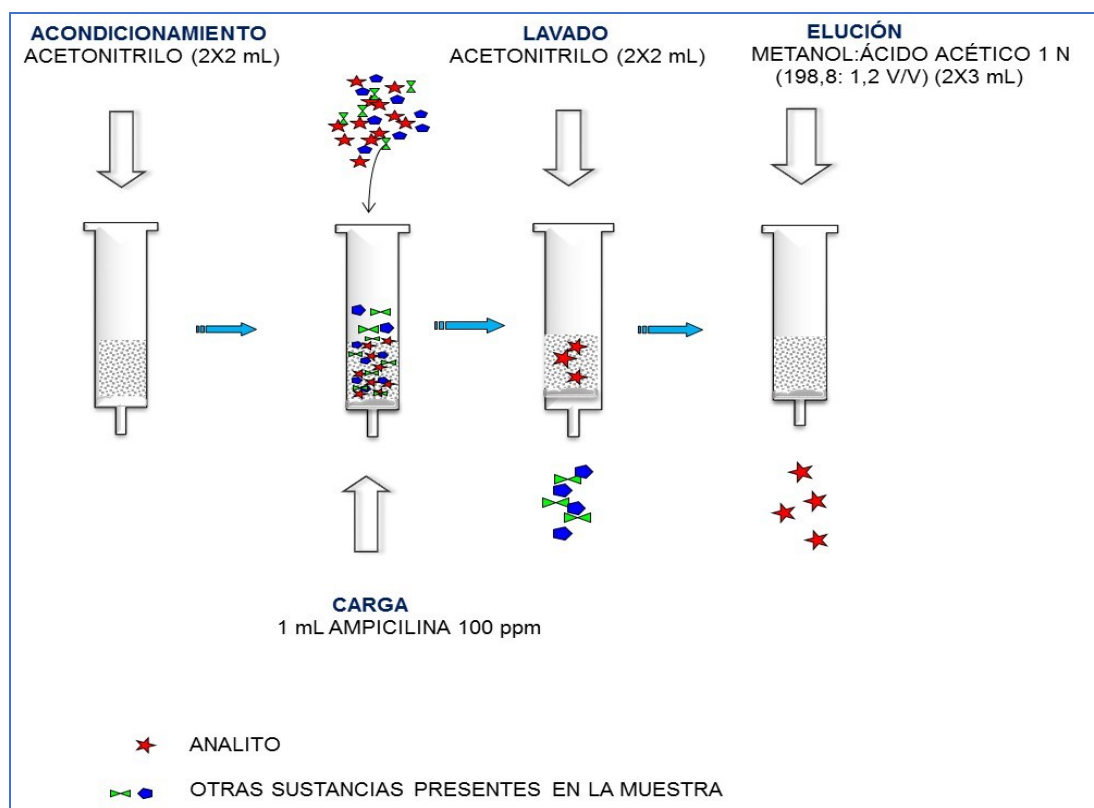
**Tabla 11.** Presencia o ausencia de ampicilina en los diferentes eluatos en los polímeros impresos y no impresos MIP1-3 y sus correspondientes NIPs.

Polímero	Extracción		
	Eluato 1	Eluato 2	Eluato 3
MIP 1	+	-	-
NIP 1	+	+	-
MIP 2	-	+	-
NIP 2	-	+	-
MIP 3	+	+	-
NIP 3	+	+	-

Los resultados obtenidos de los estudios de unión realizados empleando el proceso MISPE permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

- El MIP3 es el que ofrece un mayor grado de reconocimiento a la ampicilina, siendo las condiciones MISPE óptimas las que siguen a continuación:
- El mejor acondicionamiento del polímero en los cartuchos MISPE para un óptimo enlazamiento del analito al MIP se obtuvo utilizando una cantidad de 4 mL de acetonitrilo (2x2 mL).
- La cantidad adecuada de ampicilina para la carga del cartucho MISPE fue de 1 mL de una disolución de una concentración de 100 ppm.
- El lavado de los polímeros de impronta molecular una vez que se han cargado con el antibiótico debe efectuarse con acetonitrilo (2x2 mL).
- La mezcla de disolventes para la extracción de la ampicilina de los polímeros de impronta molecular con la cual se obtiene la mejor extracción de la molécula molde es metanol: ácido acético 1 N (198,8:1,2 v/v) (2x3 mL).

En la Figura 36 se muestra un esquema conteniendo cada una de las etapas seguidas en el proceso de optimización de extracción MISPE, así como las condiciones óptimas para cada una de ellas.



**Figura 36.** Esquema del proceso de optimización de extracción con MISPE indicando los valores óptimos para cada una de las etapas implicadas

### 3.4 Metodología MISPE. Estudios de cuantificación de ampicilina.

Hasta el momento se han realizado experimentos empleando cantidades elevadas de ampicilina, del orden de 100 ppm. Sin embargo, la realidad es que las concentraciones de este antibiótico que se pueden encontrar en los alimentos son mucho menores, del orden de 100 veces menos. Por ello, y basándonos en los estudios ya realizados que acabamos de presentar, se llevó a cabo la optimización del proceso MISPE empleando concentraciones de ampicilina del orden de 1-2 ppm, y empleando como técnica de cuantificación la cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección ultravioleta.

#### 3.4.1 Determinación cromatográfica de ampicilina

La determinación de ampicilina, por cromatografía de líquidos, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.5 de los Procedimientos.

Dado que el equipo de HPLC del que se disponía está acoplado a un detector de UV-Vis, fue necesario determinar previamente la longitud de onda óptima de absorción de la ampicilina. Para ello se realizó el espectro de absorción de la ampicilina, evaluando una disolución patrón de concentración conocida (8 ppm), realizada disolviendo la ampicilina en el diluyente (preparado disolviendo 10 mL de fosfato monobásico de potasio 1 M, 1 mL de ácido acético 1 M en un litro de agua), variando la longitud de onda desde 230 nm hasta 270 nm con intervalos de 5 nm. La longitud de onda óptima se observó a 254 nm.

En la Figura 37 se presenta el cromatograma típico para la ampicilina, en las condiciones de operación anteriormente descritas: modo isocrático, empleando como fase móvil una mezcla agua, acetonitrilo, fosfato monobásico de potasio 1 M y ácido acético 1 N (909: 80: 10: 1 v/v), a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. Como puede observarse en la figura, se encontró un pico bien definido a un tiempo de 8,5 min.

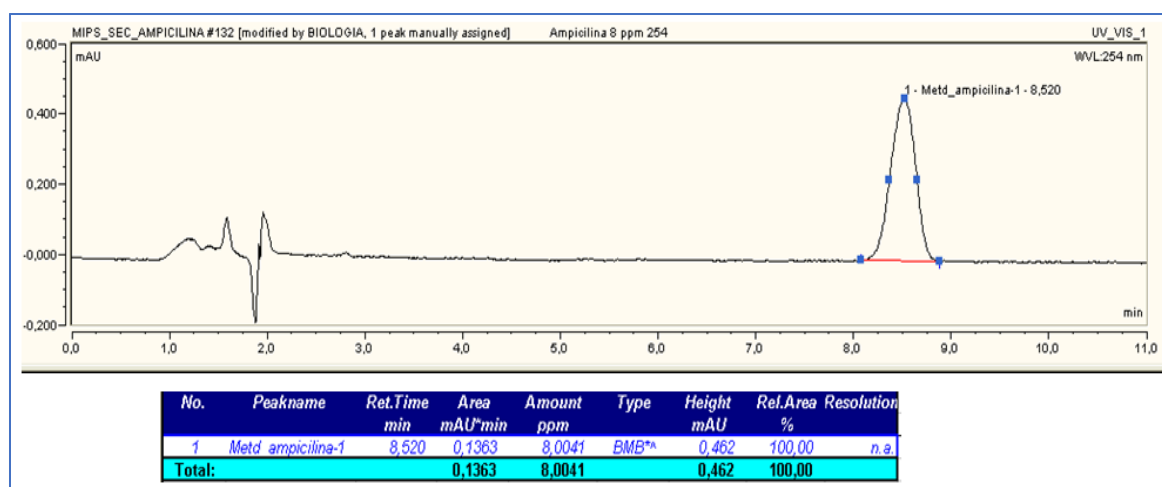


Figura 37. Cromatograma típico para la ampicilina

### 3.4.2 Determinación del intervalo de linealidad para la ampicilina

Tras haber realizado la determinación cromatográfica de la ampicilina, se estudió el intervalo de linealidad de este analito. Para ello, se prepararon disoluciones patrón de ampicilina de concentración conocida, a partir de una solución patrón preparada disolviendo 0,1033 g de ampicilina USP al 96,78 %, en 100 mL de diluyente, comprendidas entre 2 y 10 ppm, y se analizaron en el cromatógrafo de líquidos el mismo día de su preparación.

Los resultados obtenidos del área bajo la curva para las diferentes concentraciones estudiadas se presentan en la Tabla 12. Son utilizados para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

**Tabla 12.** Áreas de los picos obtenidas tras la medida de las disoluciones patrón.

Disolución	Área del pico mAU*min
2 ppm	0,0334
4 ppm	0,0685
6 ppm	0,1030
8 ppm	0,1356
10 ppm	0,1703

En la Figura 38, se muestra una imagen del pico de la ampicilina y de la curva de calibración



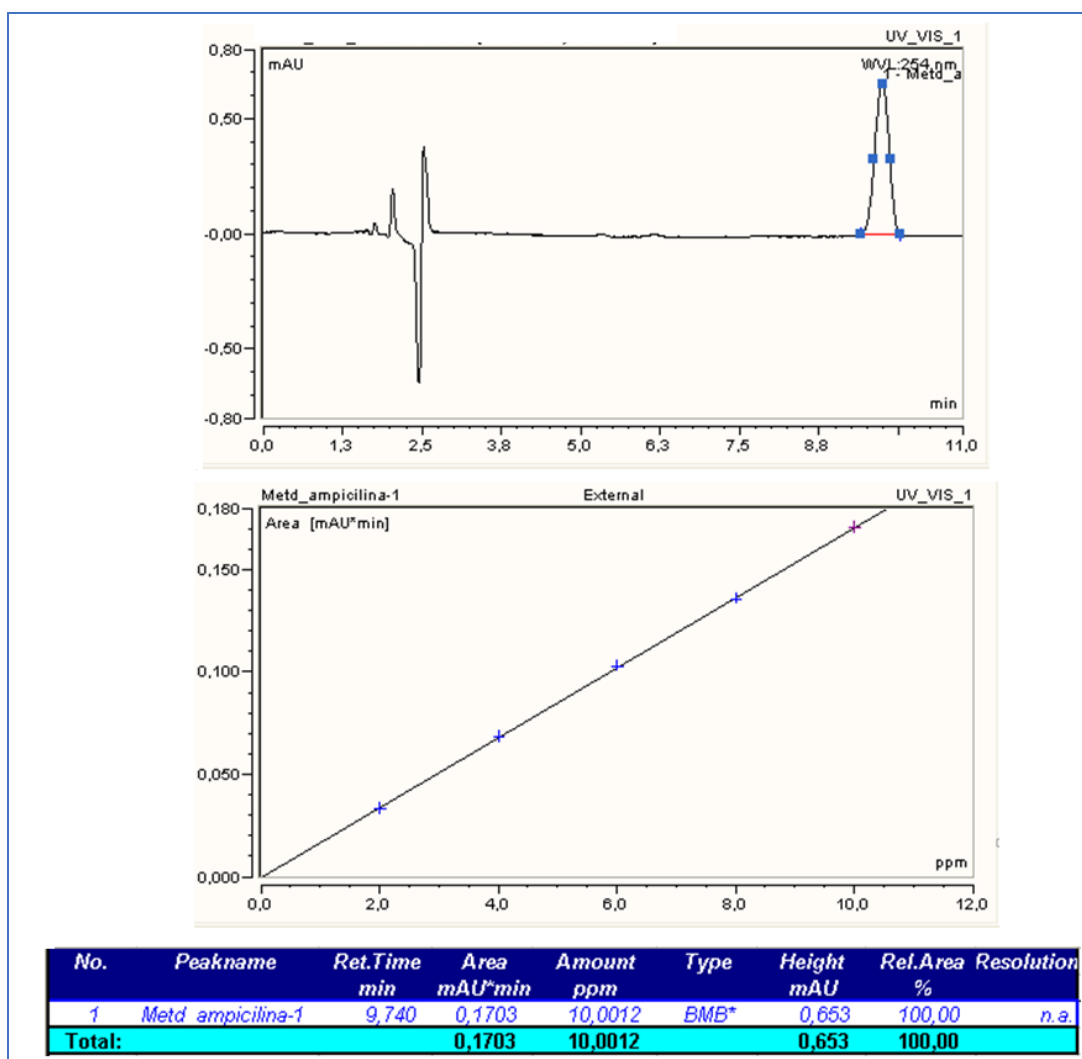


Figura 38. Curva de calibración de la ampicilina

Se aplicaron los métodos estadísticos para el cálculo del coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada en el origen. Se realizó la estimación lineal del método utilizando la hoja de cálculo de Microsoft® Office Excel, versión 2010 (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*) para encontrar la regresión y la linealidad. El rango lineal se determinó como el intervalo de concentración en el cual se cumple la linealidad, con la precisión y exactitud requerida por el método.

La ecuación de la recta y el coeficiente de determinación obtenido fueron:

$$y = 0,017 x - 0,0001; \quad R^2 = 0,9999$$

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) han sido calculados siguiendo las directrices de la *Guidance for Industry (FDA, 2011)*. Para calcular el límite de cuantificación (LOQ), primero se calcula la altura del pico para el límite de cuantificación ( $Y_{LOQ}$ ) como 10 veces

la desviación estándar y posteriormente estos valores son usados para calcular las concentraciones asociadas con estas alturas del pico.

El análisis estadístico se encuentra detallado en la Tabla 13

**Tabla 13.** Análisis estadístico de la recta de calibración

Parámetro	Descripción	Valor
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación	0,99985795
Pendiente		0,017045
Desviación Estándar de la pendiente		0,0001173
Ordenada		-0,00011
Desviación Estándar de la ordenada		0,000778053
sy/x	Desviación estándar de la regresión	0,000741845
Estadístico F	Fischer	21116,8038
SC Reg.	Suma de los cuadrados de regresión	0,01162128
df	Grados de libertad	3
SC Res.	Suma de los residuales al cuadrado	1,651E <sup>-06</sup>

Los valores obtenidos para  $Y_{LOD}=0,00211553$  y  $Y_{LOQ} = 0,00730845$

Al aplicar la fórmula para el cálculo de LOD y LOQ se obtiene:

$$LOD = (Y_{LOD} - ordenada) / pendiente$$

$$LOQ = (Y_{LOQ} - ordenada) / pendiente$$

Sustituyendo los valores en la ecuación se tiene el valor correspondiente al límite de detección y al límite de cuantificación:

$$LOD = (Y_{LOD} - (-0,00011)) / 0,017045 = 0,131 \text{ mg L}^{-1}$$

$$LOQ = (Y_{LOQ} - (-0,00011)) / 0,017045 = 0,435 \text{ mg L}^{-1}$$

La bondad de la regresión se mide con el estadístico F. El cálculo del programa de estimación lineal arroja un valor de 21116,8; el valor tabulado para  $F(3,3) = 9,277$  para  $P < 0,05$ . Como el valor calculado es mayor al valor tabulado, la correlación lineal es altamente significativa.

### 3.4.3 Preparación y caracterización de cartuchos. Proceso MISPE (Uso de MIP3)

Dado que el MIP3 es el que ofrece un mayor grado de reconocimiento a la ampicilina, en principio se comenzó la investigación empleando este MIP y su correspondiente NIP, y se aplicaron las condiciones de reconocimiento optimizadas y descritas anteriormente.

Así, los cartuchos MISPE se prepararon empaquetando 350 mg de MIP3 y su correspondiente NIP, y se conectaron a un sistema a vacío para el desarrollo de las distintas etapas SPE. Las columnas fueron acondicionadas previamente con dos porciones de 2 mL de acetonitrilo. Una vez acondicionados los polímeros, las columnas se cargaron con 1 mL de la solución de ampicilina de 2 ppm (aforada con acetonitrilo) o de 1 ppm (aforada con diluyente), preparada a partir de una disolución patrón de ampicilina de 1000 ppm (aforada con diluyente), según el caso. Después de cargado el antibiótico en las columnas MISPE, estas fueron lavadas con dos porciones de acetonitrilo, con la finalidad de eliminar las interacciones no específicas. Al finalizar el lavado de los polímeros, estos fueron eluidos con tres porciones de 2 mL del sistema de dilución metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v). El procedimiento se hizo por triplicado.

Con objeto de evaluar la eficiencia del MIP a estos niveles de concentración, se cuantificaron todas y cada una de las porciones o eluatos obtenidos tras cada ensayo realizado (carga, lavado y elución), mediante la cromatografía de líquidos. Para efectuar el análisis cromatográfico fue necesario proceder a la evaporación de los eluatos a sequedad, empleando una corriente de nitrógeno y la redisolución del extracto obtenido en 1 mL de la que hemos denominado disolución diluyente. La evaporación se realizó a 30 °C y a una presión de 0 - 5 psi. Para ello se utilizó la infraestructura que se muestra la Figura 39.



**Figura 39.** Equipo de evaporación de la muestra

En la Tabla 14 se presenta la recuperación de ampicilina obtenida en los tres extractos de elución ensayados, tras haber llevado a cabo el proceso MISPE completo, cuando se realizó la carga con 1 mL de ampicilina de 2 ppm.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos en las diferentes eluciones, empleando el MIP3 en el proceso MISPE completo. Se muestra el valor medio de las dos determinaciones realizadas.

Extracción	ppm ampicilina	% Recuperación
1ª – 2 mL	1,7216	86
2ª – 2 mL	0,4006	20
3ª – 2 mL	0	0

Como se puede observar, entre la 1ª y la 2ª extracción se obtiene la totalidad del analito con recuperaciones del 86% en la primera y del 20% en la segunda 2ª, con lo que no es necesario llevar a cabo una tercera extracción. Por tanto, puede considerarse como óptima una elución de 2 porciones de 2 mL.

### 3.4.4 Proceso MISPE. Optimización de la composición del MIP

Con la finalidad de mejorar los porcentajes de unión de la ampicilina al MIP seleccionado hasta el momento como óptimo (MIP3), se pensó en variar la composición de la matriz polimérica. El MIP3 contiene únicamente ácido metacrílico como monómero funcional, por ello, se llevó a cabo la síntesis de tres polímeros más (MIP4-6), en los que se modificó la cantidad de entrecruzante utilizado en la mezcla de polimerización, tal y como se detalla en el apartado 2.1. de *Procedimientos*.

La evaluación comparativa de los MIPs 3-6 y sus correspondientes NIPs se detalla a continuación. Los estudios se realizaron empleando cartuchos empaquetados con 0,350 g de polímeros impresos y sus respectivos polímeros no impresos, acoplados al sistema de vacío. Los polímeros se acondicionaron con 5 porciones de 2 mL de acetonitrilo y se cargaron con 1 mL de una disolución de ampicilina de 2 ppm. Las columnas MISPE se lavaron con 2x2 mL de acetonitrilo y finalmente la etapa de extracción se llevó a cabo empleando 2 volúmenes de 3 mL cada una de la mezcla metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v). Las fracciones recogidas tras cada etapa fueron evaporadas hasta sequedad, de forma controlada, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente, los residuos se redisuelven en la disolución diluyente para la determinación de ampicilina por HPLC-UV. En la Tabla 15 se recogen los resultados correspondientes a los estudios de unión, es decir, la cantidad de ampicilina que se ha unido al MIP de forma específica después de haber llevado a cabo la etapa de lavado.

**Tabla 15.** Porcentaje de ampicilina unido a los diferentes polímeros sintetizados.

Polímero	Monómero/Entrecruzante	% Ampicilina unido
MIP 3	1:5	100,00
MIP 4	1:2	50,49
MIP 5	1:1	22,33
MIP 6	1:0,5	17,60

Como puede observarse, el mayor porcentaje de unión se da cuando se emplea el MIP3, y éste disminuye según va disminuyendo la cantidad de entrecruzante que contiene la matriz polimérica. Estos resultados evidencian la importancia de una adecuada proporción de los diferentes reactivos que conforman la matriz polimérica. La integridad estructural del complejo de pre-polimerización y, por lo tanto la obtención de cavidades bien definidas en la red polimérica, depende directamente de la naturaleza y de la cantidad de entrecruzante empleado. Este entrecruzante confiere estabilidad mecánica y térmica al polímero sintetizado y proporciona la porosidad adecuada para garantizar la accesibilidad del analito a las cavidades generadas.

En la Tabla 16 se presentan las cantidades de ampicilina obtenidas en el proceso de elución, es decir, la cantidad total de ampicilina recuperada, y se establece una comparación entre el MIP y el polímero no impreso. No se evaluaron los NIPs de los polímeros 4, 5 y 6, pues el tamaño del poro obtenido era muy pequeño, lo que imposibilitó el análisis.

**Tabla 16.** Recuperación de ampicilina obtenida tras la etapa de elución MISPE. Comparación entre MIPs y NIPs.

Polímero	% Ampicilina
MIP1	61,27
NIP1	0,34
MIP2	24,03
NIP2	0,84
MIP3	96,69
NIP3	0,64
MIP4	62,33
MIP5	24,95
MIP6	35,80

En la Tabla 17 se presenta la relación MIP/NIP en cada uno de los polímeros.

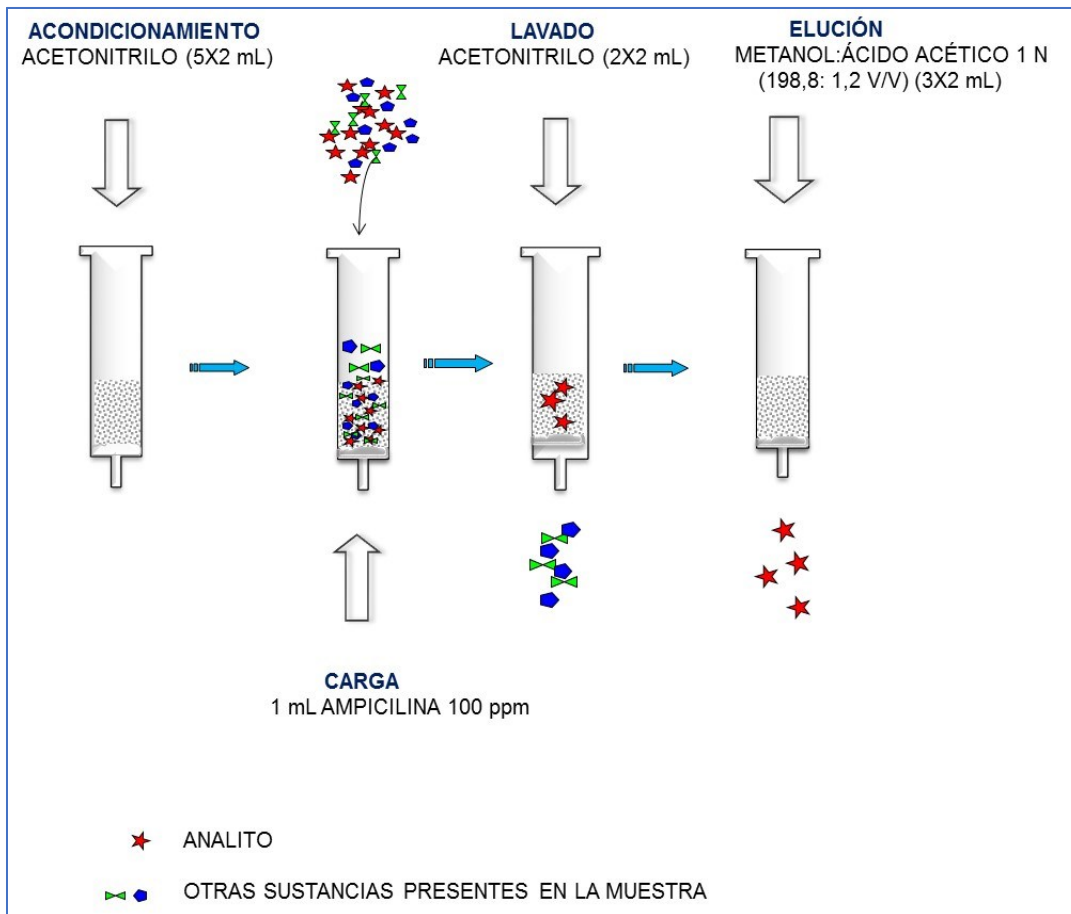
**Tabla 17.** Relación de unión MIP/NIP de los diferentes polímeros evaluados

Polímero	Relación de extracción MIP/NIP
1	180,2
2	28,8
3	151,9

Como ya se había deducido previamente, el MIP3 presenta el mejor reconocimiento hacia la molécula utilizada como molécula molde. Este polímero de impronta molecular fue preparado utilizando una relación 1:5 de monómero: entrecruzante, empleando ácido metacrílico como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como reactivo entrecruzante. Mientras que con relación a los polímeros preparados utilizando ácido metacrílico como monómero funcional pero disminuyendo la proporción del entrecruzante (MIPs 4-6), la capacidad de retención del polímero disminuye según disminuye la cantidad de entrecruzante, y el tiempo de análisis aumenta considerablemente.

A partir de los resultados obtenidos, se observa que el porcentaje de recuperación cuando se emplea el MIP3 es el más alto, indicando esto la mayor afinidad de este polímero sintetizado por la molécula molde. Por todo ello, se eligió el MIP3 como soporte óptimo para llevar a cabo la aplicación del método, y así poder realizar la determinación de ampicilina en muestras de leche de vaca.

A modo de resumen, la Figura 40 recoge las condiciones óptimas de extracción de ampicilina con el MISPE desarrollado empleando el MIP3 como soporte sólido.



**Figura 40.** Esquema del proceso de análisis del antibiótico  $\beta$ -lactámico utilizando el MISPE preparado con MIP 3.

### 3.5 Determinación de ampicilina en muestras de leche

Una vez caracterizados los cartuchos de extracción en fase sólida con polímeros de impresión molecular, y habiendo seleccionado el MIP óptimo, se procedió a la aplicación del método a la determinación de ampicilina en muestras de leche entera de vaca.

En primer lugar, y dado el alto contenido proteico y de materia grasa de la leche entera, se llevó a cabo la desproteinización y eliminación de la grasa de las muestras previo al proceso MISPE. A continuación se describe la optimización de estos procesos.

#### 3.5.1 Desproteinización de la muestra

La precipitación de las proteínas se evaluó empleando diferentes disolventes, tales como ácido acético y acetonitrilo.

#### A. Precipitación con ácido acético

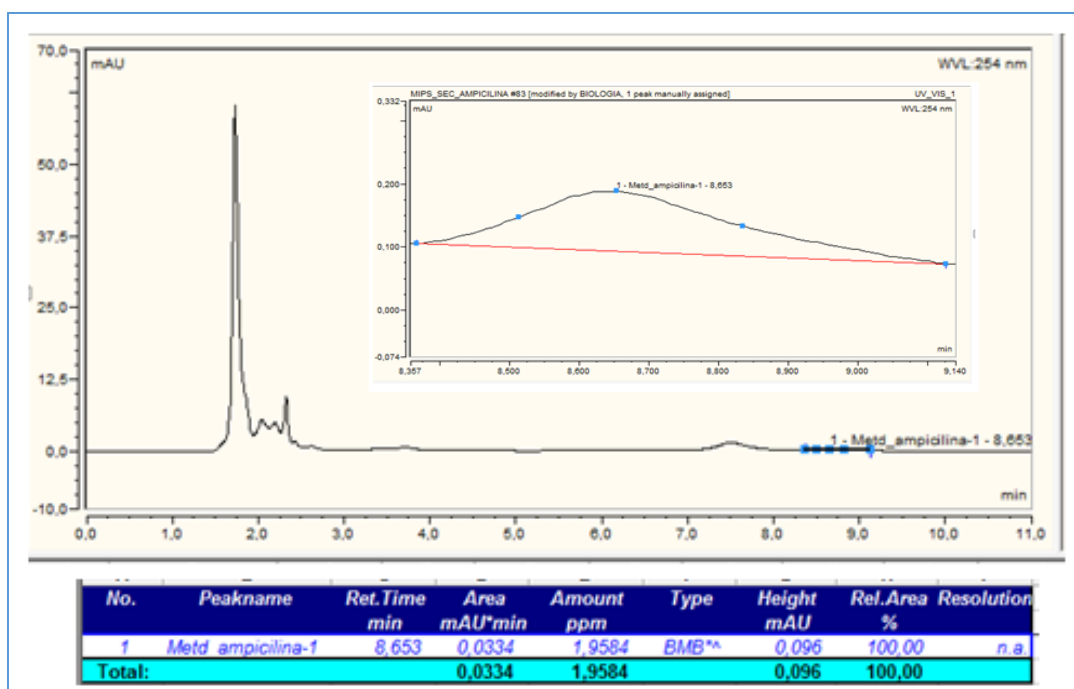
A una muestra de 5 mL de leche entera de vaca previamente descongelada en nevera y agitada hasta homogeneización, se le añadió 1 mL de ampicilina de concentración 2 ppm preparada a partir de una solución patrón de ampicilina. Seguidamente se le adicionó 1 mL de ácido acético 1 N, con la finalidad de precipitar las proteínas, se dejó estabilizar durante 20 minutos para permitir la interacción del disolvente con la muestra y facilitar la remoción de las proteínas. La muestra se centrifugó por 10 minutos a 6000 rpm, y se extrajo el sobrenadante conteniendo el analito con una Pipeta Pasteur y se cargó en una columna MISPE para la preconcentración de la muestra y el procedimiento de aislamiento del antibiótico.

El cartucho se empaquetó con 350 mg de MIP3, acoplado al sistema de vacío. El polímero se acondicionó siguiendo el procedimiento previamente optimizado (acetonitrilo 5x2mL) y se procedió a cargar la muestra desproteïnizada, dejándola estabilizar durante 2 minutos. Posteriormente se lavó el cartucho con acetonitrilo (2x2 mL) y se recogieron los lavados para su análisis. La elución del analito se llevó a cabo empleando una mezcla metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v). Los lavados y los eluatos se evaporan de forma controlada (corriente de N<sub>2</sub>, presión 1-2 bares) hasta total sequedad para finalmente redissolver los residuos en la disolución diluyente para la determinación de ampicilina por HPLC-UV. El ensayo se realizó por duplicado.

Como resultado final se obtuvo una recuperación media de ampicilina de 101,5 %. Sin embargo, a pesar de que se obtuvo un resultado elevado, el perfil cromatográfico no se consideró aceptable, como puede verse en la Figura 41.

Se puede observar que el pico obtenido es muy pequeño, muy ancho y con poca altura. Este pico puede apreciarse mejor al hacer un acercamiento tal como se muestra en la Figura 41.





**Figura 41.** Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteínización con 1 mL de ácido acético 1 N.

Con el fin de mejorar la respuesta cromatográfica del analito se realizó un ensayo de desproteínización disminuyendo la cantidad de ácido acético utilizado. Se siguió el mismo procedimiento anterior pero se varió el volumen de ácido acético 1 N a 0,5 mL. En este caso se obtuvo una recuperación mucho más pequeña, del orden del 11 %, y el perfil cromatográfico no mejoró.

#### B. Precipitación con acetonitrilo

Dado que el proceso de precipitación de proteínas con 1 mL de ácido acético 1 N dio buenos resultados pero con un pico muy ancho y de poca altura, se evaluó la posibilidad de precipitar las proteínas agregando solo acetonitrilo. De esta forma se pretendía mejorar la altura y base del pico de la ampicilina.

Para ello se agregó a 5 mL de leche entera de vaca (la cual se descongeló en nevera y se agitó hasta homogeneización), 1 mL de ampicilina de concentración 2 ppm preparada a partir de una solución patrón de ampicilina y la alícuota fue aforada con acetonitrilo. Se mezcló en vortex durante 1 minuto, y a la solución resultante se le añadió 4 mL de acetonitrilo con la finalidad de precipitar las proteínas. Posteriormente la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm, y los tubos de centrifuga se mantuvieron en nevera a 4 °C durante 20 minutos más. Se recogió el sobrenadante y éste se cargó en el cartucho MISPE, previamente acondicionado, al igual que en el proceso anterior. Seguidamente se procedió a lavar el cartucho y eluir el analito en las

mismas condiciones ya descritas. Los elutatos son evaporados a sequedad, redisoluertos en la disolución diluyente y analizados por HPLC-UV.

Como resultado de este ensayo, se puede observar en la Figura 42, que la altura del pico y su ancho no presenta mejoría, así como tampoco la cantidad de ampicilina recuperada (15%).

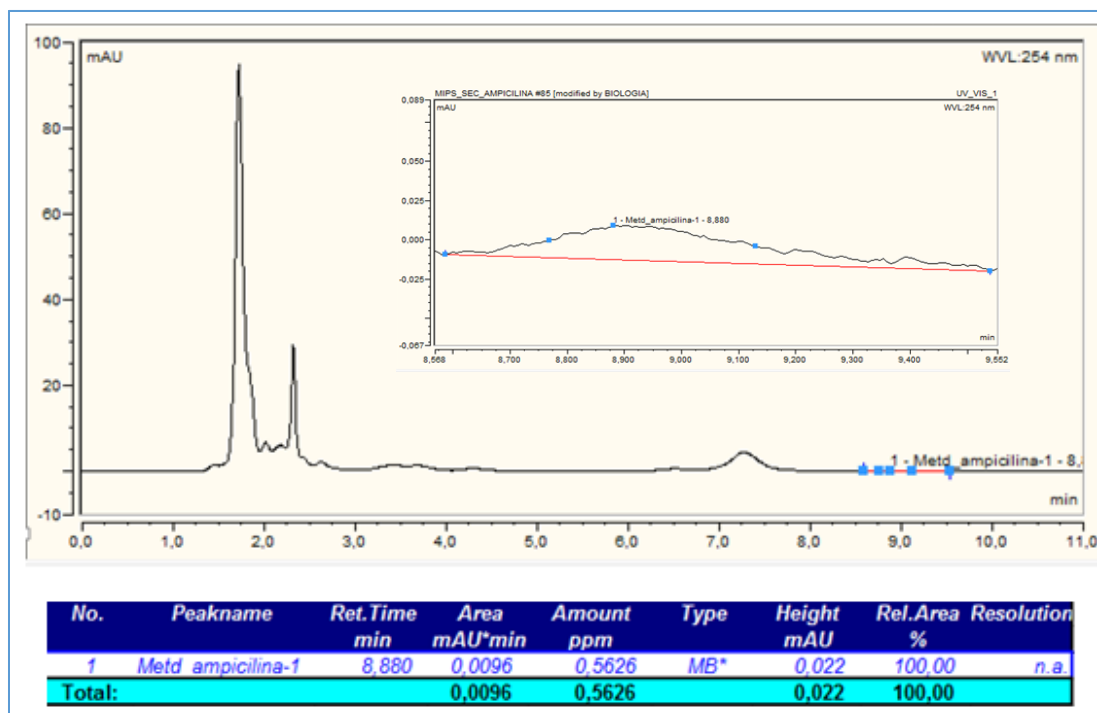
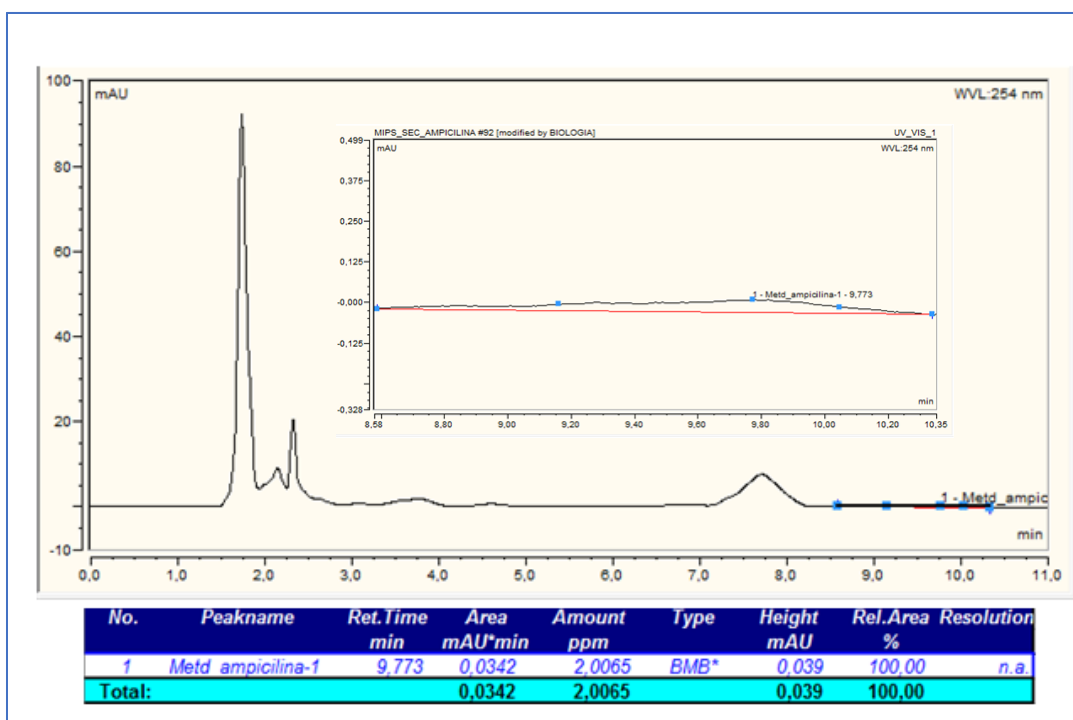


Figura 42. Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteinización con acetonitrilo.

C. Precipitación con una mezcla de ácido acético: acetonitrilo

En este ensayo se llevó a cabo la desproteinización de la muestra, exactamente en las mismas condiciones anteriormente descritas para los otros tratamientos de desproteinización, pero en este caso, utilizando un volumen de 1 mL de una mezcla de ácido acético 1 N: acetonitrilo (2:8 v/v).

En la Figura 43 se muestra el cromatograma obtenido, siendo la recuperación de ampicilina de un 89 %. A pesar del alto porcentaje de recuperación, el perfil cromatográfico sigue siendo inadecuado.



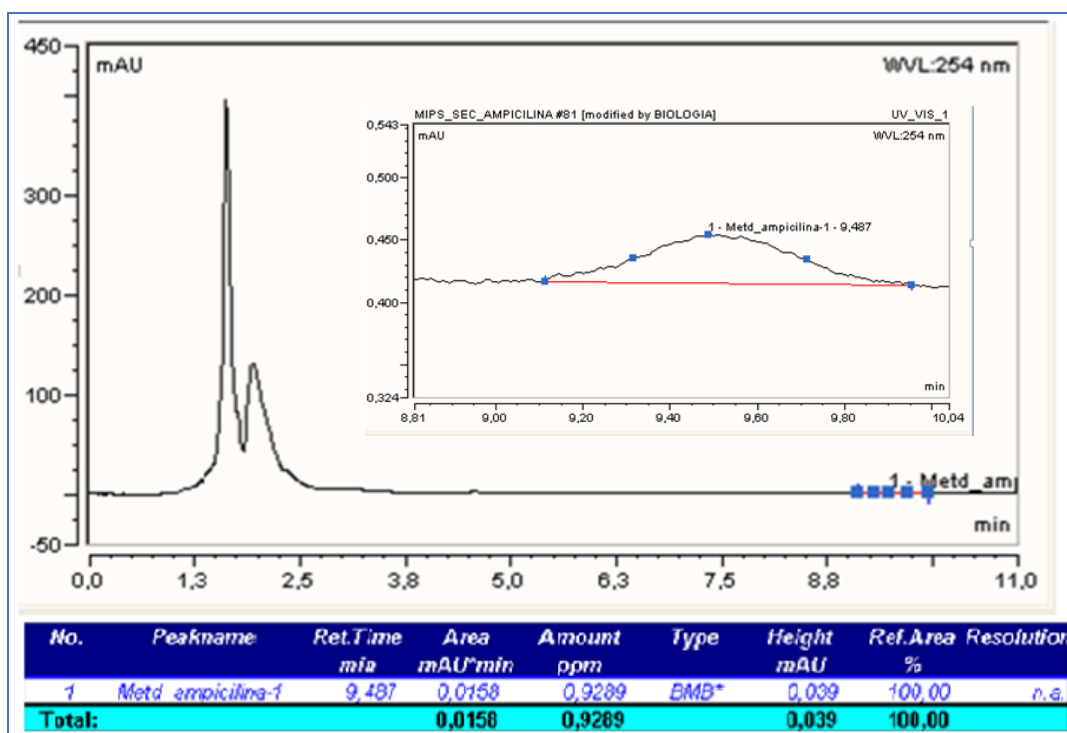
**Figura 43.** Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la desproteínización con una mezcla de ácido acético 1 N: acetonitrilo (2:8 v/v).

### 3.5.2 Extracción de la materia grasa

Hasta el momento, el perfil cromatográfico obtenido no es demasiado bueno, puede ser debido a que la muestra contiene un elevado contenido en materia grasa que no ha sido eliminado. Por ello, se evaluaron diferentes procedimientos para tratar de conseguir su eliminación.

#### A. Extracción con hidróxido de sodio 0,5 M

Para llevar a cabo la extracción de la grasa de la muestra, lo que se hizo fue tratar de llevar a cabo una limpieza *on-line* dentro del propio cartucho. Para ello, se agregó a 5 gramos de leche entera de vaca completa previamente descongelada en nevera y agitada hasta homogeneización, 1 mL de ampicilina de concentración 2 ppm preparada a partir de una solución patrón de ampicilina y aforada con acetonitrilo. Se centrifugó y la solución sobrenadante se pasó por el MISPE, se lavó con 5 porciones de 1 mL de una disolución de hidróxido de sodio 0,5 M. Se llevó a cabo la elución empleando metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v) (3x2 mL). Se evaporó a sequedad y se redisolvió en 1 mL del diluyente, previo análisis por HPLC-UV. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 44.



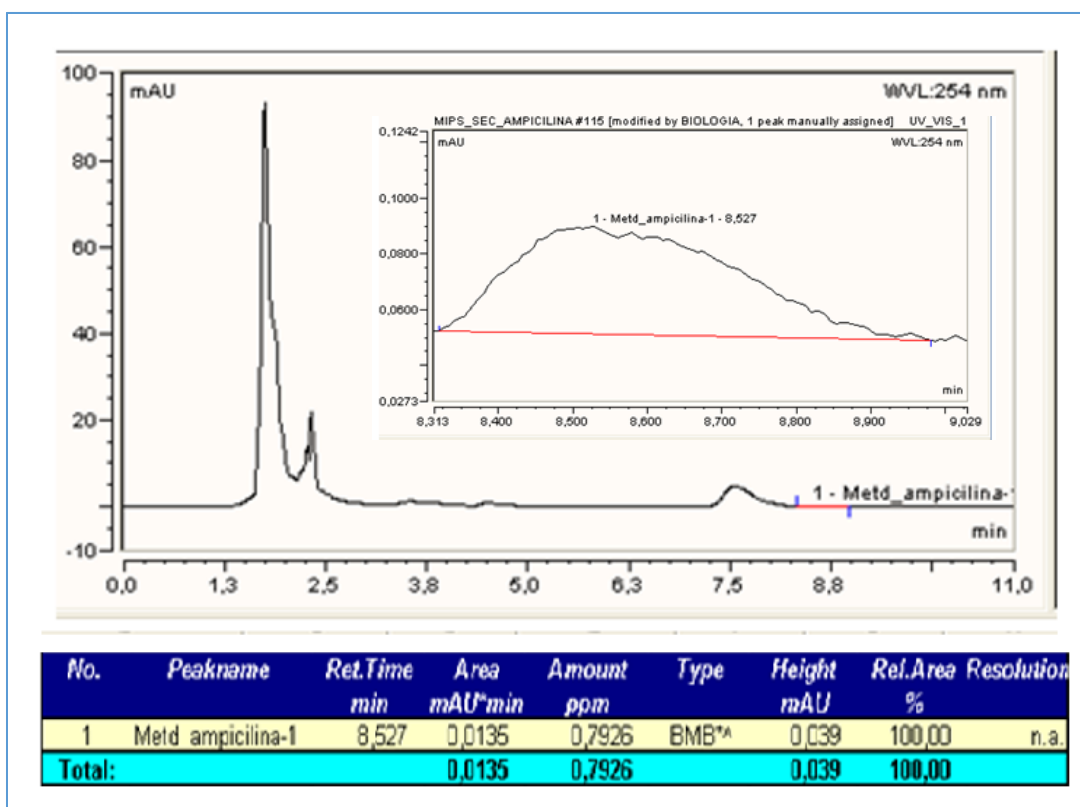
**Figura 44.** Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la eliminación de la grasa con hidróxido de sodio 0,5 M

La recuperación de ampicilina obtenida es de un 34 %. A la vista de los resultados, puede verse que este procedimiento no es conveniente para el análisis cromatográfico. Es evidente que se produce una pérdida del analito durante el proceso de lavado, y el perfil cromatográfico tampoco es adecuado.

#### B. Extracción en frío

En el siguiente ensayo, se evaluó la posibilidad de eliminar la grasa centrifugando la leche dopada con ampicilina en frío. Para ello, se pesó 5 gramos de leche, se le añadió 1 mL de solución de ampicilina de concentración 2 ppm preparada en diluyente, se colocó a 4 °C durante 20 minutos, se centrifugó, se recogió el sobrenadante y se le añadió 0,5 mL de ácido acético 1 N. La mezcla se evaporó hasta 1 mL, se le añadió 2 mL de acetonitrilo, se enfrió nuevamente y se centrifugó. Se recogió el sobrenadante y se pasó por el MISPE, siguiendo los procedimientos de acondicionamiento, lavado y elución descritos anteriormente. El procedimiento se hizo por duplicado.

La Figura 45 muestra los resultados obtenidos. En este cromatograma se observa que el pico obtenido es muy ancho y de poca altura. Con relación al porcentaje de recuperación del analito, este es de un 41 %.



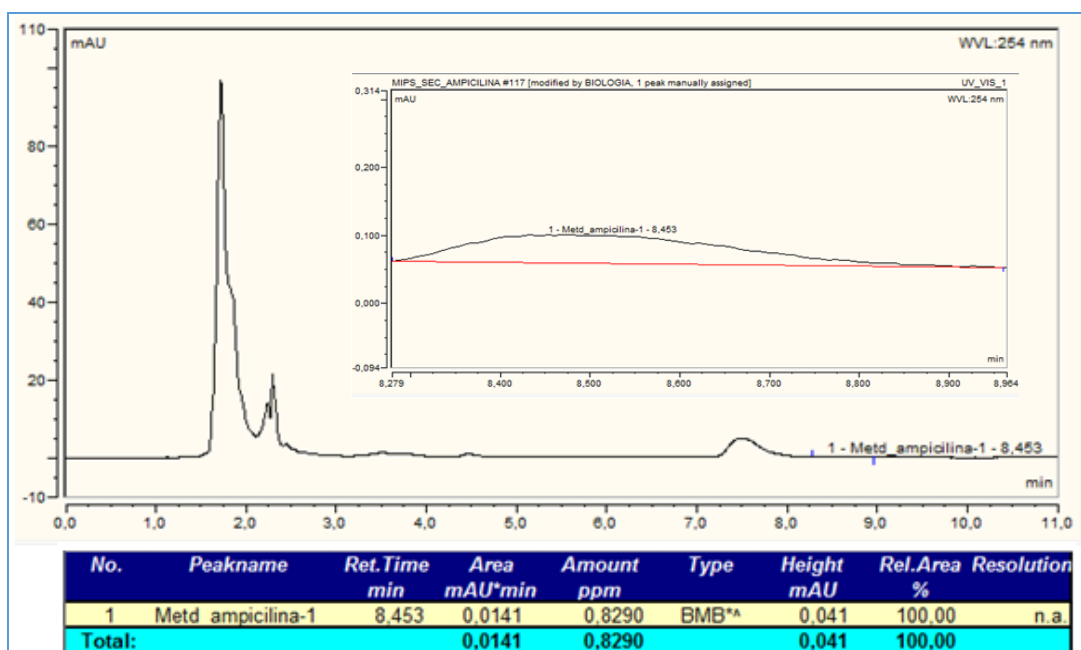
**Figura 45.** Cromatograma obtenido para el eluato de ampicilina tras la eliminación de la grasa en frío.

Los resultados obtenidos utilizando solamente el proceso de extracción de la grasa con frío, no arrojan un buen porcentaje de recuperación del analito, así como tampoco se observa una buena señal cromatográfica de la ampicilina. Por ello se barajó la posibilidad de emplear un tratamiento conjunto para la eliminación de la grasa y las proteínas.

### 3.5.3 Extracción conjunta de grasa y de proteínas

#### A. Con temperatura a 40°C

Se evaluó la posibilidad de extraer la grasa de la muestra con centrifugación en frío (4 °C) y posteriormente la desproteínización de la misma empleando ácido acético 1 N. Para ello, a un volumen de 5 gramos de muestra de leche entera de vaca dopada en las mismas condiciones anteriores, se la dejó enfriar a 4 °C durante 10 min. Se añadió 0,5 mL de ácido acético 1 N para precipitar las proteínas, se centrifugó y se evaporó el sobrenadante hasta 1 mL colocándola en baño de María a 40 °C, se añadió 1 mL de acetonitrilo para completar la precipitación, se centrifugó la solución y se pasó por el MISPE. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 46.



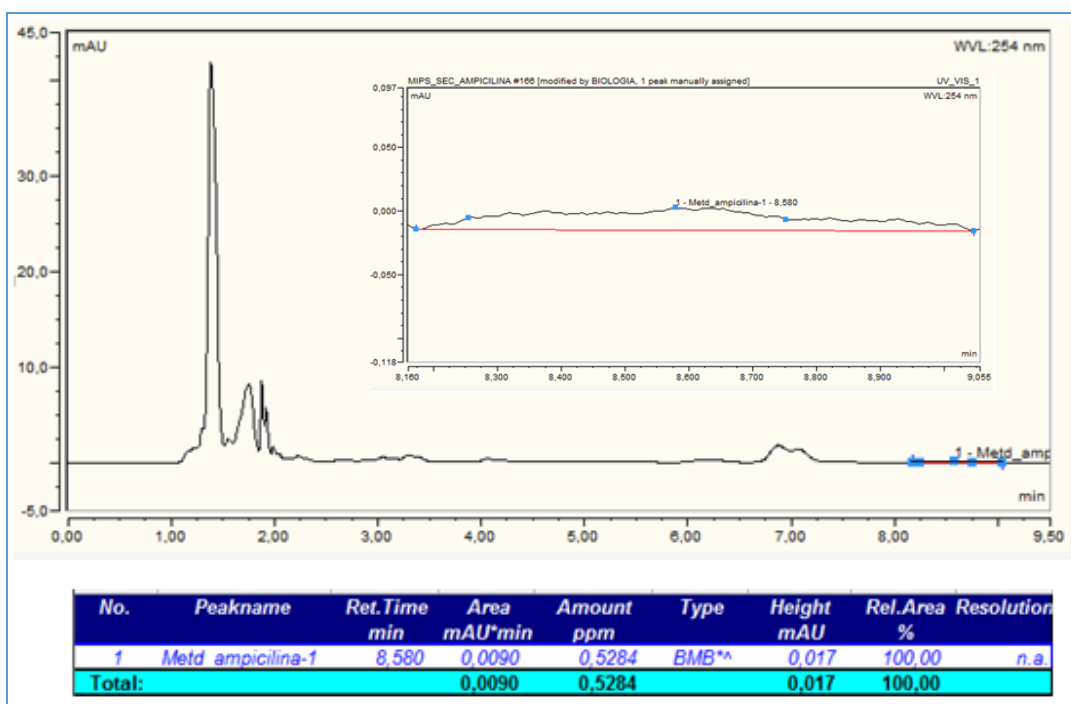
**Figura 46.** Cromatograma obtenido para el eluato para la eliminación de la grasa con combinada con precipitación de proteínas y evaporación de la muestra con calor a 40 °C.

El porcentaje de recuperación obtenido con este procedimiento fue de 41,4 % y tal como se muestra en el cromatograma, no se obtuvo resultados satisfactorios con este procedimiento en lo que se refiere al perfil cromatográfico de la señal.

**B. Precipitación de proteínas con ácido acético y eliminación de la materia grasa con cloroformo**

Se evaluó la posibilidad de eliminar la grasa por medio de la centrifugación en frío, la posterior precipitación de proteínas con ácido acético 1 N, seguida por la precipitación con acetonitrilo y por último la limpieza de la muestra con cloroformo. Una vez efectuados todos estos pasos, se efectuó el análisis de la ampicilina utilizando la columna MISPE con el procedimiento descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos con este procedimiento se muestran a continuación en la Figura 47:



**Figura 47.** Cromatograma obtenido de la solución de elución con 2 mg Kg<sup>-1</sup> de ampicilina combinado con la extracción de grasas con precipitación de proteínas y adición de cloroformo.

El porcentaje de recuperación obtenido es de un 26,42 % y no se observa que el pico de la ampicilina haya mejorado en lo que respecta a la altura y anchura.

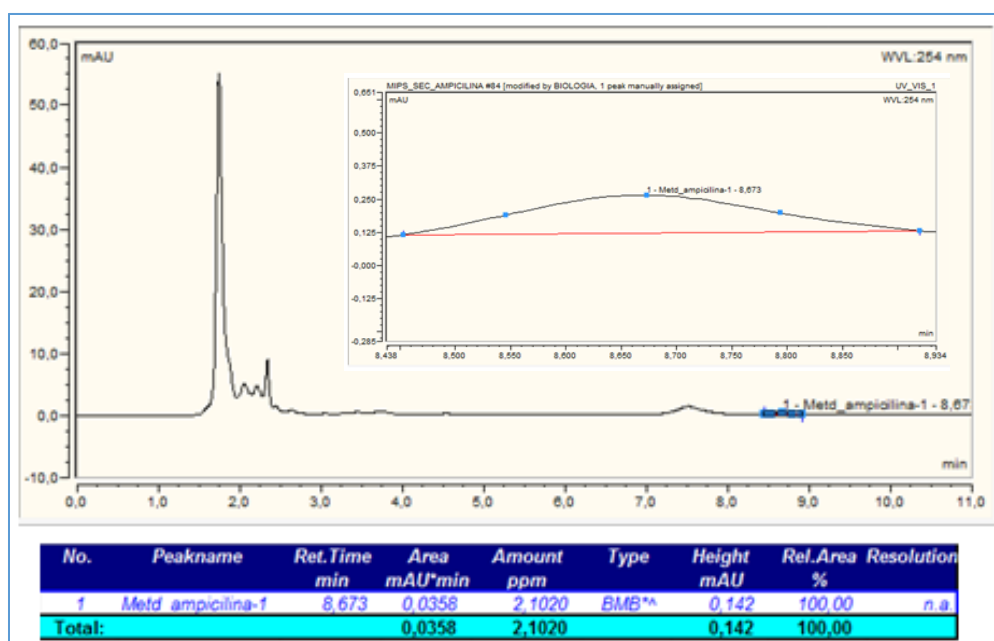
### C. Centrifugación en frío y adición de ácido acético

Se evaluó la posibilidad de eliminar la grasa por medio de la centrifugación en frío y la posterior precipitación de proteínas con ácido acético 1 N

A una muestra de 5 mL de leche entera de vaca previamente descongelada en nevera y agitada hasta homogeneización, se le añadió 1 mL de ampicilina de concentración 2 ppm preparada a partir de una solución patrón de ampicilina. Seguidamente se le adicionó 1 mL de ácido acético 1 N, con la finalidad de precipitar las proteínas, se dejó estabilizar en el refrigerador durante 20 minutos para permitir la interacción del solvente con la muestra y facilitar la eliminación de las proteínas. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm, quedando en la parte superior la grasa, y las proteínas precipitadas en el fondo. Se extrajo la grasa por succión con ayuda de una jeringa y el sobrenadante conteniendo el analito se colectó con una Pipeta Pasteur y se cargó en una columna MISPE para la preconcentración de la muestra y el procedimiento de aislamiento del antibiótico.

El cartucho se empaquetó con 350 mg de MIP, acoplado al sistema de vacío. El polímero se acondicionó siguiendo el procedimiento previamente optimizado (acetonitrilo 5x2 mL) y se

procedió a cargar la muestra desproteinizada, dejándola estabilizar durante 2 minutos. Posteriormente se lava el cartucho con acetonitrilo (2x2 mL) y se recogen los lavados para analizarlos. Para la elución del analito se utilizó mezcla metanol: ácido acético 1 N (198,8: 1,2 v/v) recogiendo los eluatos. Los lavados y los eluatos se evaporan de forma controlada (corriente de N<sub>2</sub>, presión: 1-2 bares) hasta total sequedad para finalmente redisolver los residuos en la disolución diluyente para la determinación de ampicilina por HPLC-UV. El ensayo se realizó por duplicado y se obtuvo una recuperación de ampicilina de 105 %. En la Figura 48 se muestra el cromatograma obtenido. De entre los procedimientos ensayados es el que dio los mejores resultados, en cuanto a recuperaciones y perfil cromatográfico.



**Figura 48.** Cromatograma obtenido de la solución de elución con 2 mg Kg<sup>-1</sup> de ampicilina combinado con la extracción de grasas en frío con precipitación de proteínas con ácido acético 1 N.

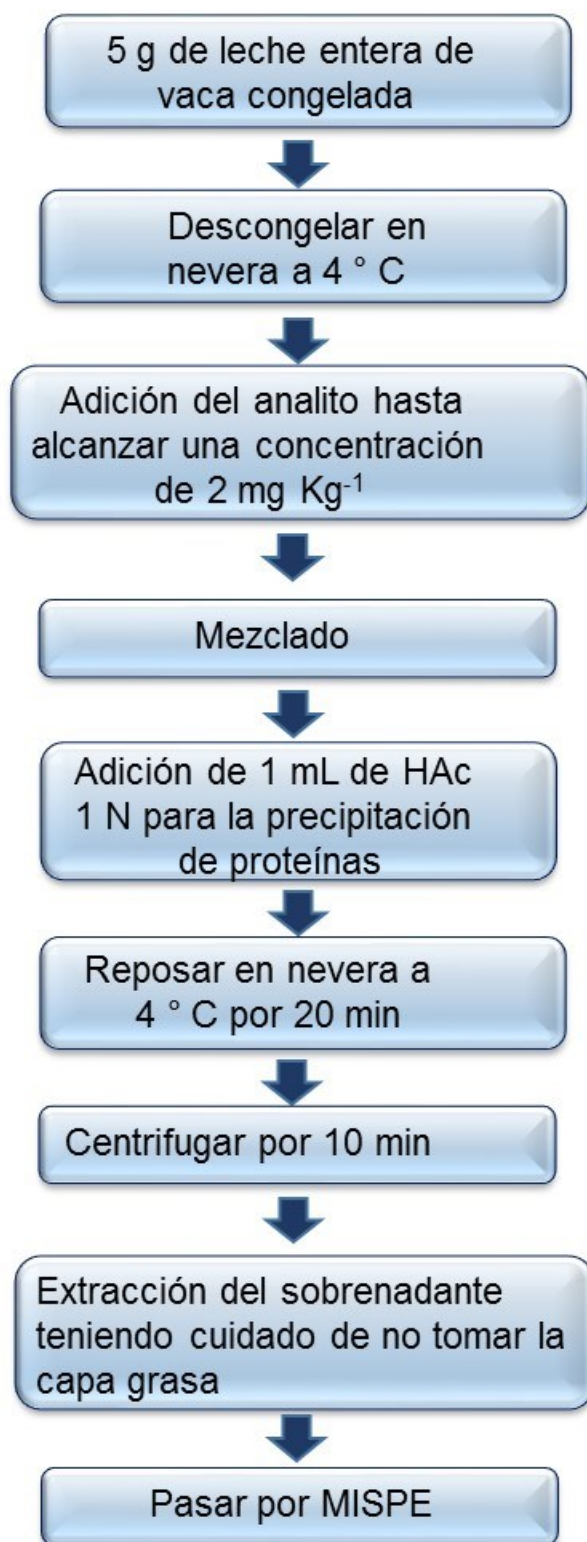
En la Tabla 18 se presentan los resultados obtenidos de los diferentes procedimientos de extracción utilizados



**Tabla 18.** Resultados obtenidos de la ampicilina presente en los diferentes procedimientos de extracción utilizados

Procedimiento	% Recuperación
Eliminación de proteínas (1 mL ácido acético 1 N)	101,5
Eliminación de proteínas (0,5 mL ácido acético 1 N)	11,5
Eliminación de proteínas (acetonitrilo)	15,1
Eliminación de proteínas (1 mL mezcla ácido acético: acetonitrilo 2:8 v/v)	88,5
Eliminación de grasa (5x1 mL NaOH 0,5 M)	33,6
Eliminación de grasa en frío	41,3
Extracción conjunta de grasa (4 °C) y proteínas (0,5 mL ácido acético 1 N) y evaporación de la muestra con calor (40 °C)	41,4
Precipitación de proteínas con ácido acético 1 N y eliminación de grasa con cloroformo	26,4
Eliminación de grasa y proteínas	105,0

Finalmente, en la Figura 49 se resume el proceso MISPE con el cual se logra limpiar la muestra objeto de análisis.



**Figura 49.** Esquema del proceso de extracción MISPE de la ampicilina de leche entera de vaca.

### 3.6 Evaluación del método mediante adiciones estándar

La determinación de ampicilina en leche de vaca se evaluó mediante la realización de ciertos ensayos utilizando adiciones estándar de concentración conocida de ampicilina.

El método se evaluó empleando 5 gramos de leche entera de vaca, a la que se sometió al proceso MISPE completo, descrito en el apartado 3.5 (Figura 49). Partiendo de esta muestra, se prepararon los siguientes ensayos:

- Un blanco de muestra, el cual consistió en 5 gramos de leche de vaca sin ampicilina. El eluato obtenido se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 1 mL de disolvente (Figura 50).
- Muestra 1, constituida por 5 gramos de leche de vaca sin ampicilina. El eluato obtenido después de la evaporación con nitrógeno gaseoso se enriqueció con 1 mL de ampicilina de concentración de 2 ppm (Figura 51).
- Muestra 2, constituida por 5 gramos de leche de vaca enriquecida con 1 mL de ampicilina de concentración de 2 ppm. El eluato obtenido se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se reconstituyó con 1 mL de diluyente, posteriormente se dividió en dos porciones a las cuales se le adicionó 1 mL de diluyente (Figura 52).
- Muestra 3, constituida por 5 gramos de leche de vaca enriquecida con 1 mL de ampicilina de concentración de 2 ppm. El eluato obtenido se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se reconstituyó con 1 mL de diluyente, posteriormente se dividió en dos porciones a las cuales se le adicionó 1 mL de la solución de ampicilina de concentración 2 ppm (Figura 53).

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos:

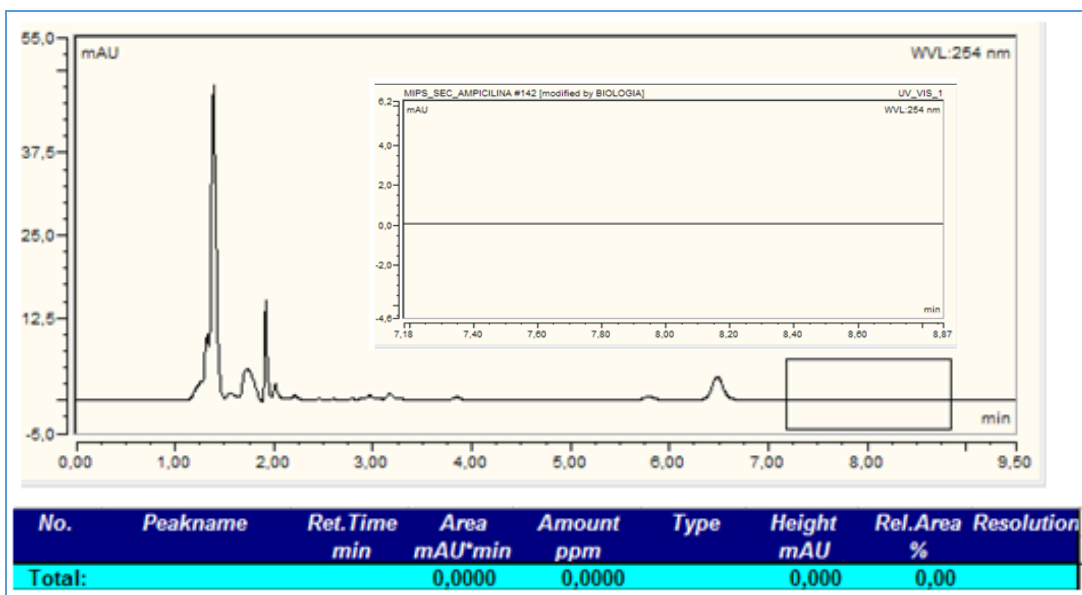


Figura 50. Cromatograma obtenido del eluato de la leche sin fortificar con ampicilina (blanco)

En este cromatograma se puede apreciar que no existe señal de ampicilina en el intervalo de tiempo comprendido entre los 7 y los 8 minutos

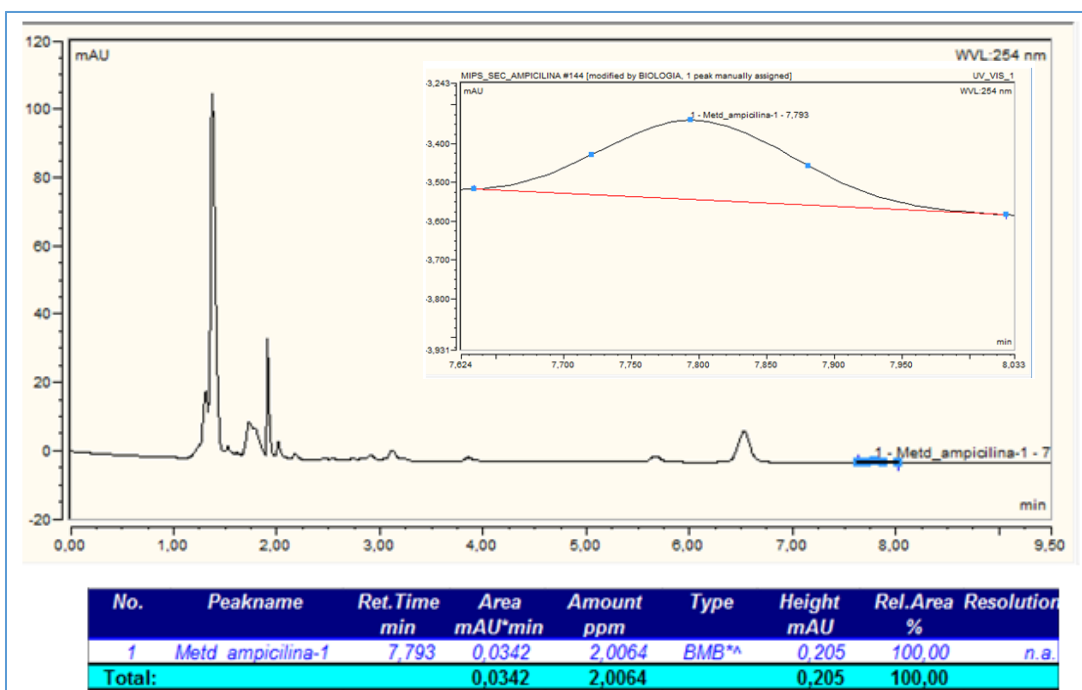
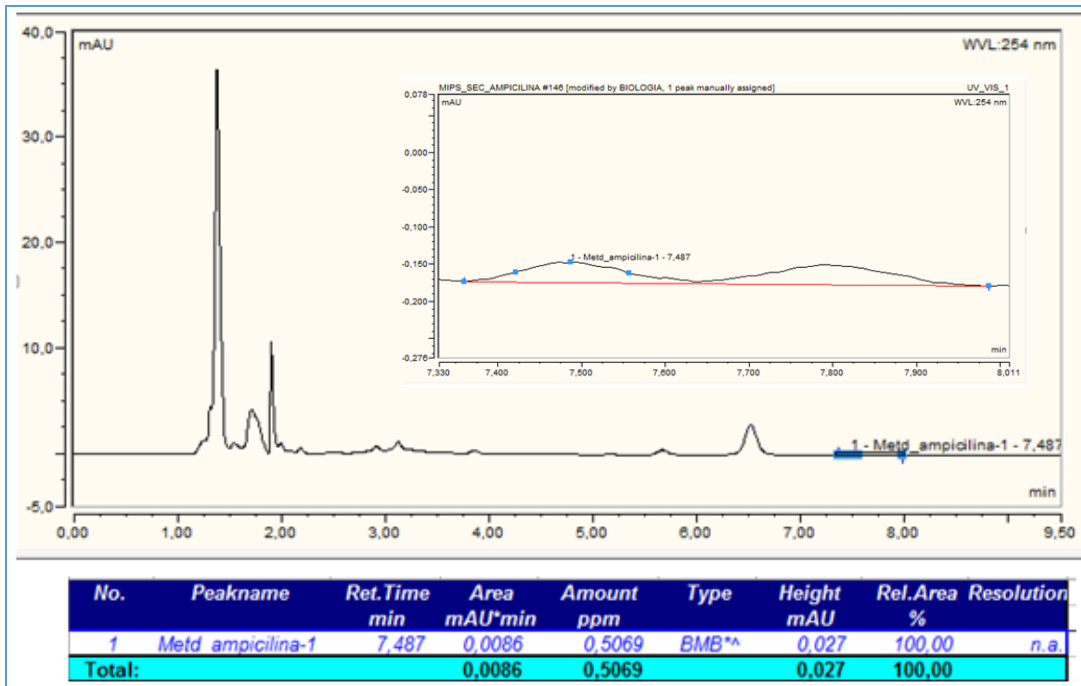


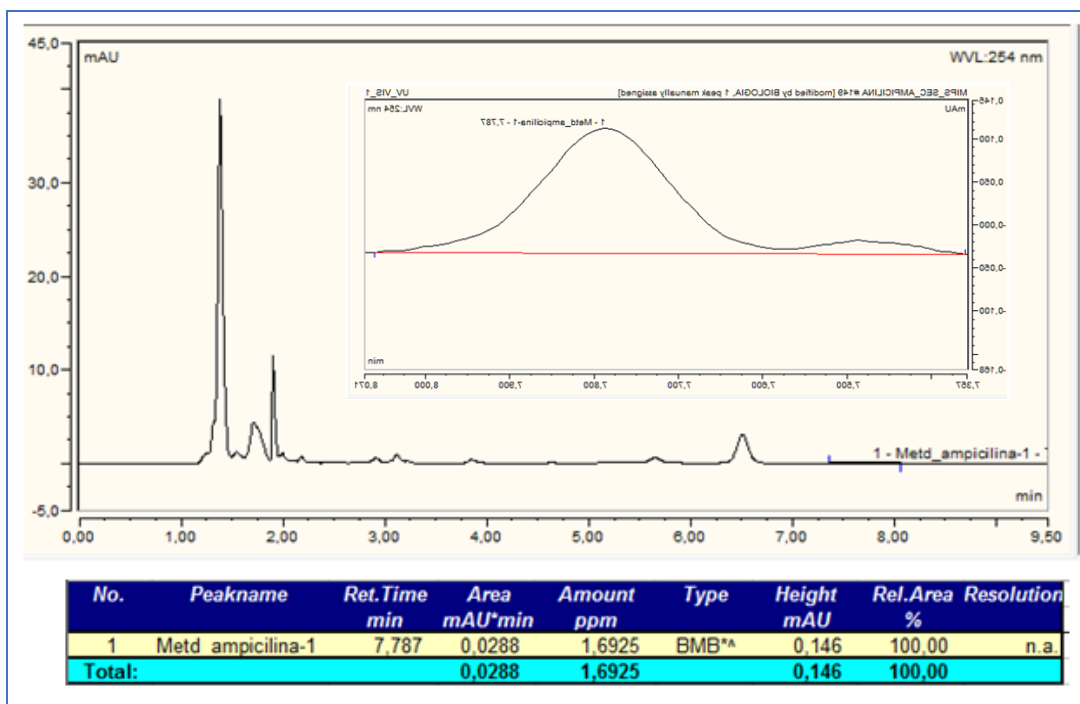
Figura 51. Cromatograma obtenido para el eluato de la muestra enriquecido con 1 mL ampicilina de 2 ppm.

La señal de la ampicilina aparece en el intervalo de tiempo comprendido entre los 7 y los 8 minutos.



**Figura 52.** Cromatograma obtenido para leche fortificada con 1 mL de ampicilina 2 ppm, dividido en dos porciones y al que posteriormente se le añadió 1 mL de diluyente.

En este cromatograma se puede apreciar que aparece la señal de ampicilina en el intervalo de tiempo comprendido entre los 7 y los 8 minutos, sin embargo el pico se observa con un desdoblamiento.



**Figura 53.** Cromatograma obtenido para leche fortificada con 1 mL de ampilina 2 ppm, dividido en dos porciones y al que posteriormente se le añadió 1 mL de ampilina 2 ppm.

En este cromatograma se puede apreciar que la señal de ampilina en el intervalo de tiempo comprendido entre los 7 y los 8 minutos, y corresponde a la ampilina proveniente de la elución en el MISPE más la ampilina de la solución patrón.

Es evidente la distorsión en el pico de la ampilina al pasar por el MISPE.

Los porcentajes de recuperación para los distintos análisis realizados se presentan en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Resultados de porcentajes de recuperación para los análisis realizados con adición de patrón (o estándar) con una muestra de leche de 5 gramos.

<b>Muestra</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup> ampicilina teóricos</b>	<b>mg Kg<sup>-1</sup> ampicilina promedio obtenido</b>	<b>% de recuperación</b>
Blanco	0	0	0
Muestra 1. Leche no enriquecida. Eluato enriquecido con AMP 1 mL 2 ppm	2,000	2,086	104,9
Muestra 2. Leche enriquecida con 1 mL ampicilina	0,666	0,519	77,9
Muestra 3. Leche enriquecida con 1 mL AMP. Eluato enriquecido con AMP 1 mL 2 ppm	1,666	1,661	99,7

Se puede observar en los análisis realizados que hay un incremento en la señal del analito, así como un buen porcentaje de recuperación.

### 3.7 Validación del método MISPE. Características analíticas.

Una vez optimizadas todas las variables del proceso de extracción en fase sólida con polímeros de impresión molecular, se ha llevado a cabo la validación del método mediante el estudio de las características analíticas. Así, la validación del método desarrollado se llevó a cabo en términos de linealidad, exactitud, precisión y límite de detección y cuantificación.

#### 3.7.1 Intervalo de linealidad

La linealidad del método se define como la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de analito. Para establecer la linealidad se realizó una curva de calibrado empleando disoluciones patrón de ampicilina comprendidas entre 100-500 ppb. En la Tabla 20 se presentan los gramos de ampicilina utilizados y la concentración de la disolución patrón usada en la preparación de la disolución madre de ampicilina a partir de la cual se prepararon las disoluciones empleadas en la realización del calibrado.

**Tabla 20.** Características del patrón sólido de ampicilina empleado para preparar la disolución madre.

Patrón ampicilina	
Pureza de estándar %	96,78
Peso de la muestra g	0,1033
Peso de la ampicilina pura	0,0999
ppm de la solución concentrada	999,7

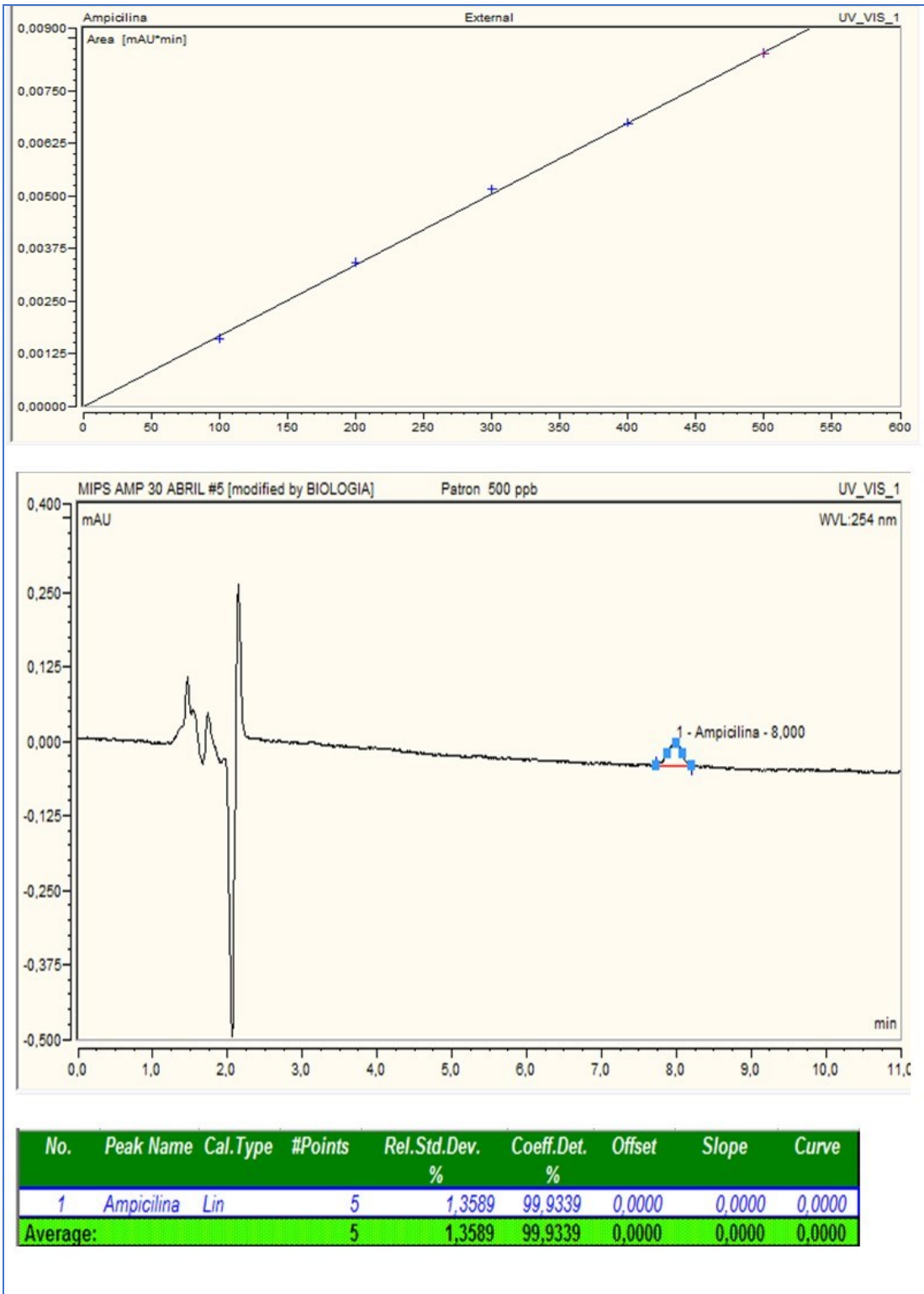
La cuantificación se llevó a cabo midiendo las áreas de pico de cada una de las distintas concentraciones de analito, utilizando el *Software Chromeleon 6.8*. Así, se obtuvieron los valores que se presentan en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Áreas de pico obtenidas para las distintas concentraciones de ampicilina.

Muestra	Área del pico mAU*min
100 ppb	0,0016
200 ppb	0,0034
300 ppb	0,0051
400 ppb	0,0067
500 ppb	0,0084

La curva de calibración obtenida por el *software Chromeleon 6.8* se muestra en la Figura 54.





**Figura 54.** Curva de calibración de ampicilina. Rango de concentraciones comprendido entre 100-500 ppb.

A partir de los resultados obtenidos, tras un análisis de regresión lineal, se calculó la recta de calibrado y su coeficiente de determinación.

$$y = -3 \times 10^{-5} x + 0,0000169; \quad R^2 = 0,9996$$

Al analizar la estimación lineal de la curva de calibración de la ampicilina utilizando los datos obtenidos en la curva de calibración y empleando la función de estimación lineal del programa Microsoft® Office Excel, versión 2010 (*Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA*), se obtiene los siguientes valores:

**Tabla 22.** Análisis estadístico de la recta de calibración

Parámetro	Descripción	Valor
R <sup>2</sup>	Coficiente de determinación	0,99961501
Pendiente		0,0000169
Desviación Estándar de la pendiente		1,9149E <sup>-07</sup>
Ordenada		-3E <sup>-05</sup>
Desviación Estándar de la ordenada		6,35085E <sup>-05</sup>
sy/x	Desviación estándar de la regresión	6,0553E <sup>-05</sup>
Estadístico F	Fischer	7789,36364
SC Reg.	Suma de los cuadrados de regresión	2,8561E <sup>-05</sup>
df	Grados de libertad	3
SC Res.	Suma de los residuales al cuadrado	1,1E <sup>-08</sup>

El estadístico F es una medida global de la bondad de la regresión, y el cálculo del programa de estimación lineal arroja un valor de 7789,36. El valor tabulado para para F (3,3) = 9,277 para P < 0,05. Como el valor calculado es mayor al valor tabulado, la correlación lineal es altamente significativa.

### 3.7.2 Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

Siguiendo las directrices de la *Guidance for Industry, FDA, 2011*, se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Para calcular el límite de cuantificación (LOQ), primero se calcula la altura del pico para el límite de cuantificación (Y<sub>LOQ</sub>) como 10 veces la desviación estándar y posteriormente estos valores son usados para calcular las concentraciones asociadas con estas alturas del pico.

El límite de detección se calcula a partir de los valores obtenidos para:

$$Y_{LOD} = 0,00015166 \quad \text{y} \quad Y_{LOQ} = 0,00057553$$

Al aplicar la fórmula para el cálculo de LOD y LOQ se tiene:

$$LOD = (Y_{LOD} - \text{ordenada}) / \text{pendiente}$$

$$LOQ = (Y_{LOQ} - \text{ordenada}) / \text{pendiente}$$

Sustituyendo los valores en la ecuación se tiene el valor correspondiente al límite de detección y al límite de cuantificación:

$$LOD = (Y_{LOD} - (-3E^{-05})) / 0,0000169 = 10,749 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$LOQ = (Y_{LOQ} - (-3E^{-05})) / 0,0000169 = 35,830 \mu\text{g L}^{-1}$$

Estos valores estimados de LOD y LOQ están expresados en términos de la concentración de la disolución ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y no en términos de la concentración en la matriz. Dado que la matriz es agua, estos valores se pueden considerar equivalentes a  $\mu\text{g Kg}^{-1}$

En la Tabla 23 se presenta un resumen de los valores obtenidos.

**Tabla 23.** Resumen del límite de detección y límite de cuantificación.

Parámetro	Valor ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
Límite de Detección (LOD)	10,75	10,75
Límite de Cuantificación (LOQ)	35,83	35,83

El máximo valor permitido por la legislación para la ampicilina en leche de vaca es de  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y el valor obtenido del límite de detección es de  $10,75 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y del límite de cuantificación de  $35,83 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para la recta de calibración, es por ello que se evidencia la necesidad de efectuar la concentración de la muestra para poder aplicar el método desarrollado.

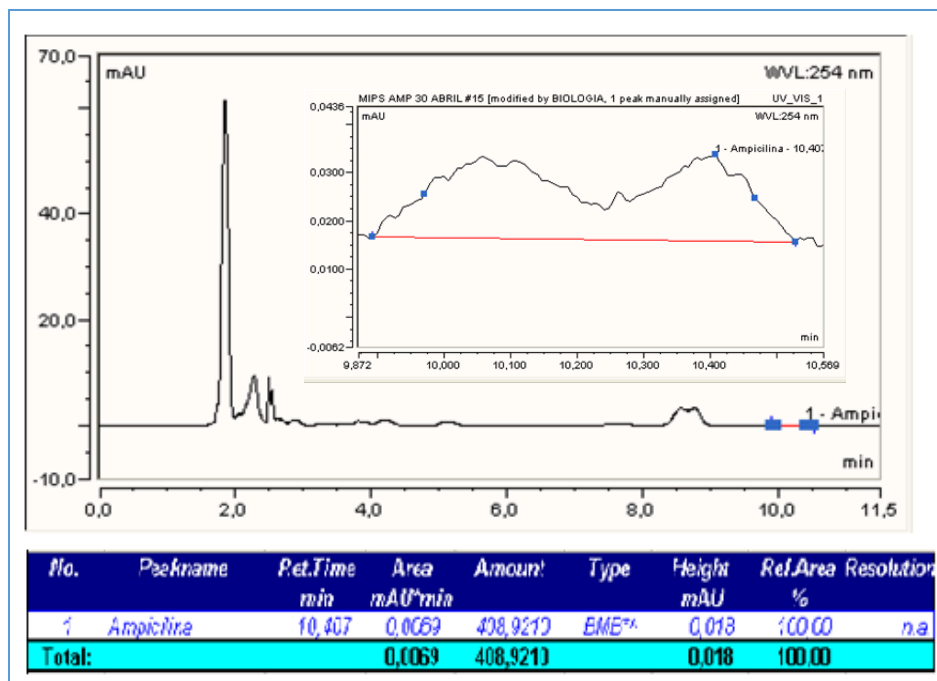
Por otra parte, hasta el momento, en los ensayos MISPE realizados habíamos utilizado 5 gramos de muestra suplementada con 1 mL de una disolución de 2 ppm de ampicilina, esta concentración es 500 veces mayor a los  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$  permitidos por la legislación, es por ello que surge la necesidad de establecer un nuevo esquema para la extracción de ampicilina de leche entera de vaca.

## Estudio de la preconcentración de la muestra

Se preparó una solución patrón de ampicilina de 280 ppb. Si se aumenta la cantidad de muestra a utilizar, hasta un total de 20 gramos (y se enriquece con 0,4 mL de disolución de ampicilina de 280 ppb), una vez aplicado el proceso MISPE y obteniendo un residuo final de 1 mL, sería posible determinar valores de concentración del orden de  $5,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Dado que el límite máximo de residuo que está permitido es de  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , se consideró adecuada esta cantidad de muestra, con el objeto de utilizar un valor cercano a éste ( $5,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) para evaluar la respuesta cromatográfica de la matriz. Así, al concentrar la muestra (20 gramos de muestra enriquecidos con 0,4 mL de disolución de ampicilina de 280 ppb) da como resultado que los ppb presentes en 1 mL del eluato fueron  $112 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Después de concentrado el eluato, y para trabajar en la parte media alta de la curva de calibración, se añadió 1 mL de la solución patrón de ampicilina de 280 ppb, dando una concentración final de ampicilina en la muestra de  $392 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Por todo lo expuesto anteriormente, y con la finalidad de establecer un esquema para la extracción de ampicilina en niveles de concentración de  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , en muestras de leche entera de vaca, a partir de este momento se trabajará con 20 gramos de leche y con la curva de calibración cuyo rango lineal está comprendida entre  $100\text{-}500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

En la Figura 55 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos en el análisis y se puede observar en este cromatograma, la señal distorsionada de la ampicilina con un tiempo de retención de 10,3 minutos.

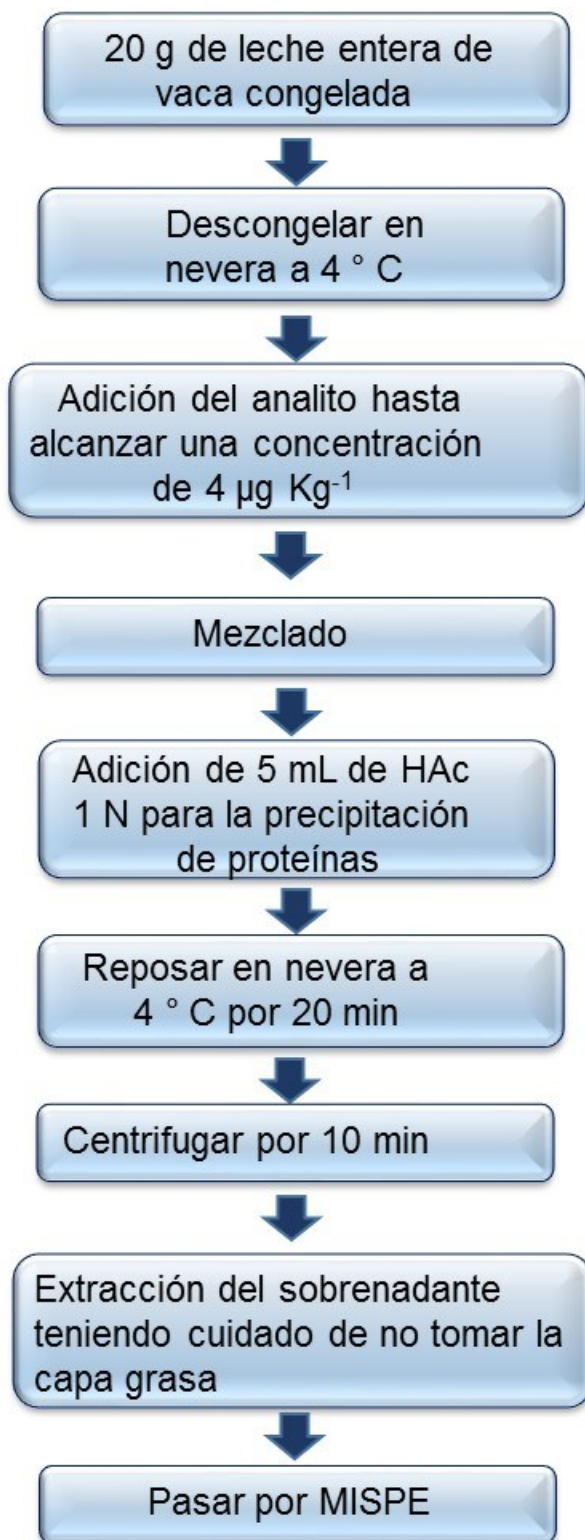


**Figura 55.** Cromatograma obtenido para 20 gramos de leche con adición de 0,4 mL de ampicilina 280  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  más 1 mL de ampicilina 280  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  al eluato.

Se aprecia en este cromatograma el incremento de la señal de la ampicilina al añadir una solución patrón al eluato.

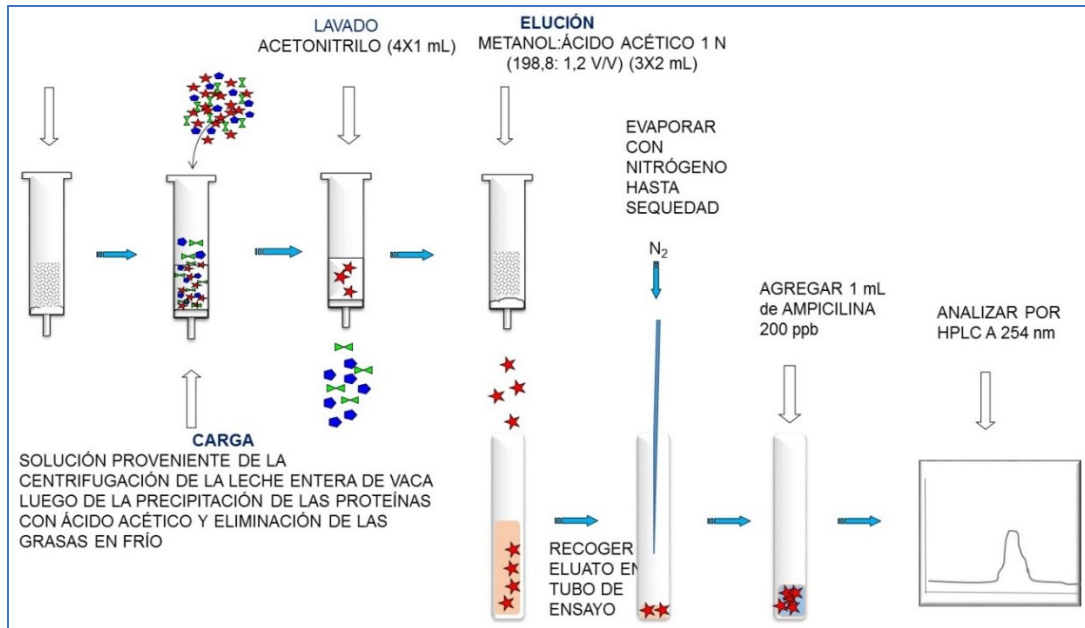
El porcentaje de recuperación obtenido a partir de los análisis realizados fue de 107,7 % indicando que es posible efectuar este procedimiento para el análisis de ampicilina presente en leche completa de vaca, en cantidades cercanas al límite de residuo máximo permitido de 4  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de este analito en leche completa de vaca.

Con los resultados obtenidos se propone el siguiente procedimiento para el análisis de una muestra de leche entera de vaca conteniendo un límite máximo de residuo de ampicilina de 4  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , quedando demostrada la posibilidad de utilizar el MIP seleccionado (MIP3) en un sistema de extracción en fase sólida (MISPE) para preconcentrar la muestra hasta un total de 20 veces.



**Figura 56.** Esquema del proceso de extracción de la ampicilina de la leche de vaca completa

El proceso de extracción en fase sólida, proceso MISPE con el cual se logra limpiar y preconcentrar la muestra objeto análisis, se plantea en el procedimiento que se recoge en la Figura 57.



**Figura 57.** Proceso de extracción en fase sólida para el análisis de ampicilina en leche de vaca completa, en concentraciones de  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

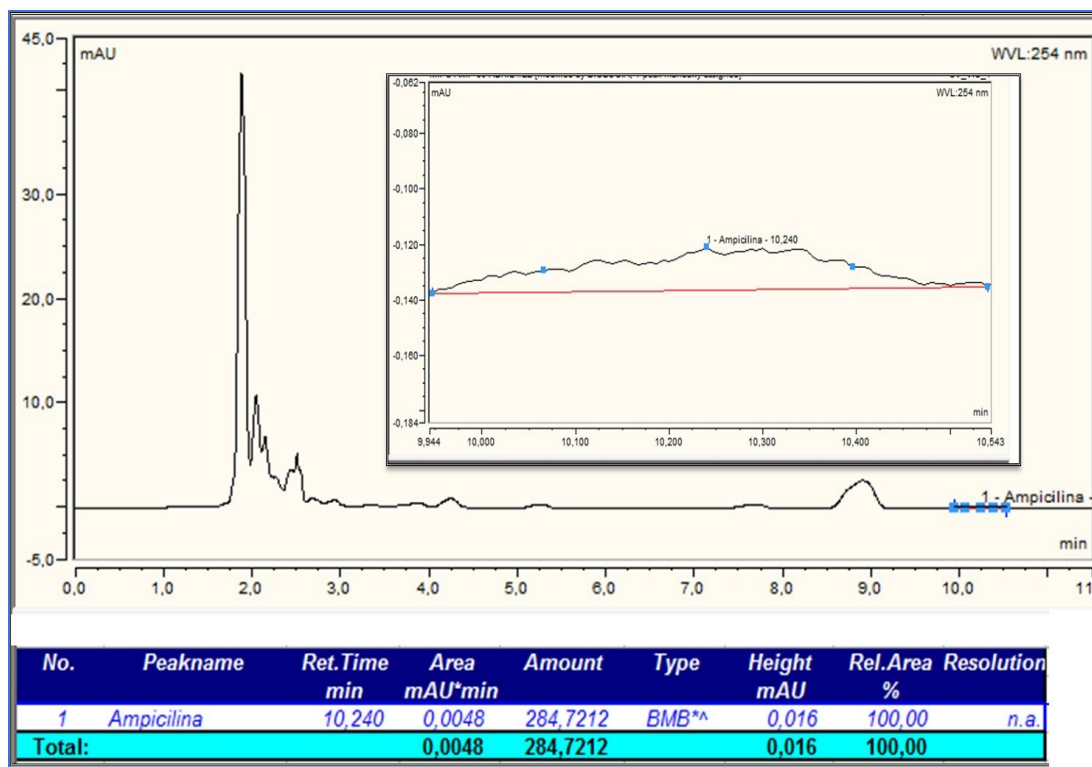
Este procedimiento será el utilizado para la validación del método analítico. Se utilizarán 20 gramos de muestra de leche, que será enriquecida con la cantidad de analito adecuada para obtener una concentración final de 3,2, 4,0 y  $4,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$  correspondientes al 80, 100 y 120 %, respectivamente, de la concentración establecida como límite máximo permitido en leche entera de vaca.

A continuación se presentan los resultados de los cromatogramas obtenidos de la carga y extracción de la solución de ampicilina en la leche de vaca al pasar por los cartuchos de extracción (MISPE).

#### Concentración 100 % ( $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ )

En la Figura 58 se presentan los resultados arrojados por el cromatógrafo para los cinco análisis realizados, utilizando la leche completa de vaca con una concentración de ampicilina de  $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ .

1.



**Figura 58.** Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en leche).

Los resultados obtenidos de los análisis realizados con relación a la cantidad de ampicilina en la solución resultante de la extracción del analito en la columna del polímero de impronta molecular bajo estudio, se presentan en la Tabla 24.

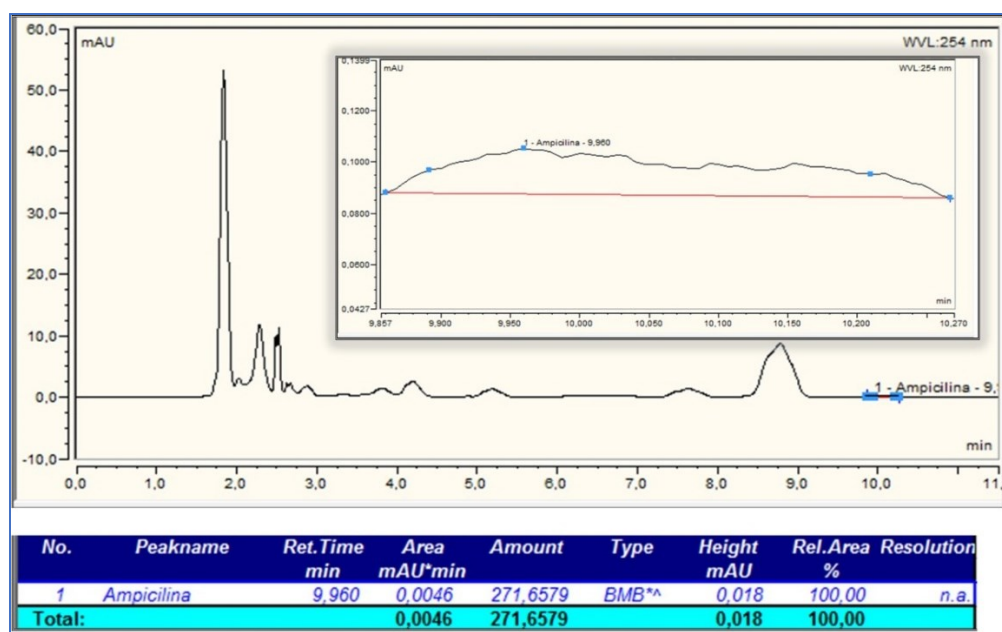


**Tabla 24.** Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE (MIP3) (100 % del analito).

Muestra	$\mu\text{g Kg}^{-1}$ Ampicilina
Primera extracción	285,2
Segunda extracción	304,3
Tercera extracción	284,7
Cuarta extracción	251,5
Quinta extracción	273,9
Promedio	279,9
Desviación Estándar	19,3
DER	6,9
Valor teórico de la muestra más estándar	282,8
Porcentaje de recuperación	99,0
% Error	1,01

### Concentración 80 % ( $3,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ )

Se procedió a analizar los cromatogramas obtenidos del cartucho MISPE estudiados utilizando el *software Chromeleon 6.8*, para una concentración del analito de  $3,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Se utilizó una solución patrón de ampicilina de 202 ppb. El valor teórico que debe tener la solución a evaluar en el cromatógrafo es de  $266,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . En la Figura 59, se presentan los resultados arrojados por el cromatógrafo para los cinco análisis realizados.

**Figura 59.** Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $3,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en leche).

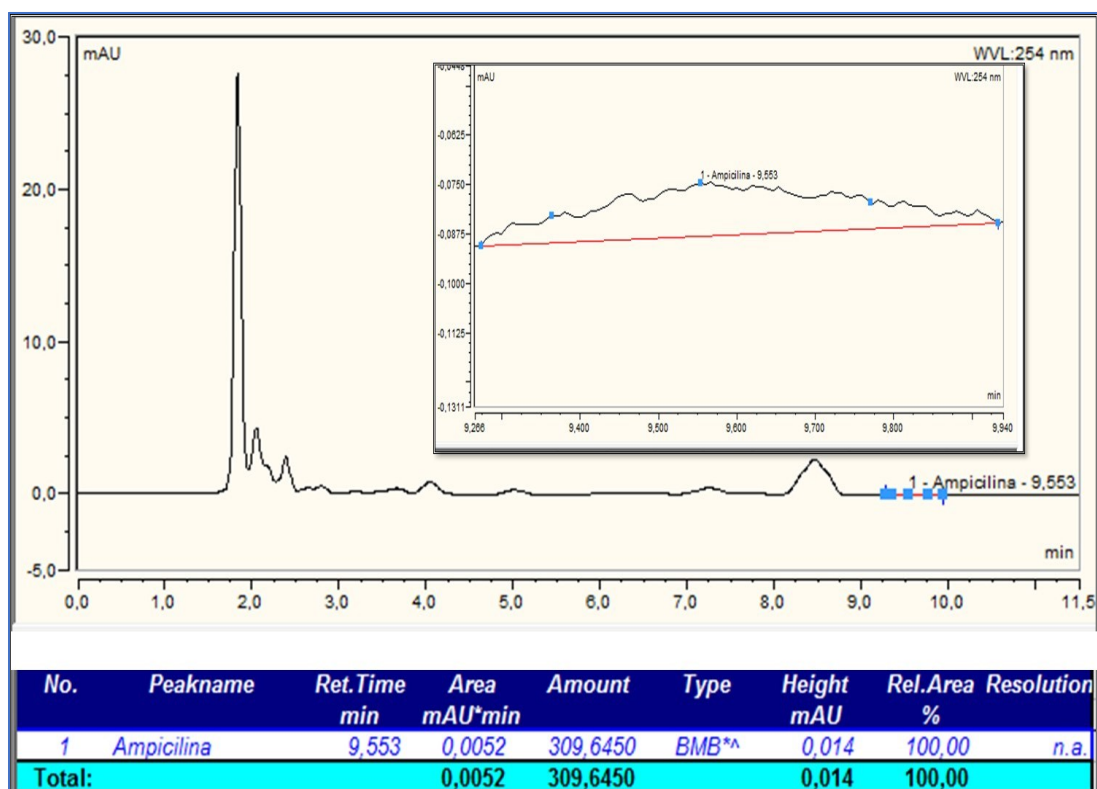
Los resultados obtenidos de los análisis realizados con relación a la cantidad de ampicilina en la solución resultante de la extracción del analito en la columna del polímero de impronta molecular bajo estudio, se presentan en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE 3 (80 % del analito)

Muestra	$\mu\text{g Kg}^{-1}$ Ampicilina
Primera extracción	271,7
Segunda extracción	266,3
Tercera extracción	272,7
Cuarta extracción	310,1
Quinta extracción	278,9
Promedio	279,9
Desviación Estándar	17,5
DER	6,2
Valor teórico de la muestra más el estándar	266,6
Porcentaje de recuperación	104,9
% Error	-4,98

#### Concentración 120 % ( $4,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ )

Se procedió a analizar los cromatogramas obtenidos del cartucho MISPE estudiados utilizando el *software Chromeleon 6.8*, para una concentración del analito de  $4,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Se utilizó la solución de ampicilina de 202 ppb empleada anteriormente. El valor teórico que debe tener la solución a evaluar en el cromatógrafo es de:  $298,9 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . En la Figura 60, se presentan los resultados arrojados por el cromatógrafo para los cinco análisis realizados.



**Figura 60.** Análisis cromatográfico de las soluciones provenientes de la extracción del cartucho MISPE con la solución patrón de ampicilina ( $4,8 \mu\text{g Kg}^{-1}$  en leche)

Los resultados obtenidos de los análisis realizados con relación a la cantidad de ampicilina en la solución resultante de la extracción del analito en la columna del polímero de impronta molecular bajo estudio, se presentan en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Cantidad de ampicilina en ppb en la solución resultante de la extracción del analito en la columna MISPE 3 (120 % del analito)

Muestra	$\mu\text{g Kg}^{-1}$ Ampicilina
Primera extracción	309,6
Segunda extracción	321,9
Tercera extracción	288,2
Cuarta extracción	296,6
Quinta extracción	302,6
Promedio	303,8
Desviación Estándar	12,8
DER	4,2
Valor teórico de la muestra más el estándar	298,9
Porcentaje de recuperación	101,6
% Error	- 1,61

### Intervalo

El rango del procedimiento analítico desarrollado se encuentra entre 3,2 y 4,8  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de ampicilina en leche completa de vaca.

### **3.7.3 Precisión**

La precisión del método analítico desarrollado se ha evaluado en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad, a tres niveles de concentración, 3,2., 4,0 y 4,8  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , los cuales representan respectivamente, el 80, 100 y 120 % del valor máximo de residuo permitido. Para conseguir detectar estos niveles, se ha utilizado 20 g de muestra, a la que se le ha adicionado 0,4 mL de 202 ppb de ampicilina, y se le ha sometido al procedimiento MISPE completo detallado en el apartado 2.3 de procedimientos. La repetibilidad se ha evaluado realizando 5 ensayos idénticos en el mismo día y se han obtenido valores de desviación estándar relativa (RSD) menores del 7 % (Tabla 26).

La reproducibilidad del método se ha determinado en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero llevando a cabo el experimento en días distintos. La reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (RSD) resultó 6,2., 6,9 y 4,2 %, para los niveles bajo, medio y alto respectivamente. La Tabla 27 recoge los resultados obtenidos en estos ensayos.

**Tabla 27.** Resumen de los valores obtenidos para las diferentes concentraciones del analito en la leche de vaca completa.

	Concentración de ampicilina		
	Nivel bajo (80 %) (3,2 µg Kg <sup>-1</sup> en la muestra de leche)	Nivel medio (100 %) (4,0 µg Kg <sup>-1</sup> en la muestra de leche)	Nivel alto (120 %) (4,8 µg Kg <sup>-1</sup> en la muestra de leche)
Valor teórico de ampicilina en el extracto concentrado (µg Kg <sup>-1</sup> )	266,6	282,8	298,9
Valor experimental promedio (µg Kg <sup>-1</sup> )	279,9	279,9	303,8
Desviación Estándar	17,5	19,3	12,8
DER	6,2	6,9	4,2
Exactitud	-4,9	1,0	-1,6
Porcentaje de recuperación	104,9	98,9	101,6

% Recuperación		
Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
104,9 ± 6,2	98,9 ± 6,9	101,6 ± 4,2

### 3.7.4 Exactitud

El porcentaje de error obtenido en los análisis efectuados para las tres concentraciones evaluadas (3,2., 4,0 y 4,8 µg Kg<sup>-1</sup>), se encuentra en -4,98., 1,01 y -1,61 %, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de -20 hasta 10 % establecidos por la (*Guidance for Industry, FDA, 2011*) para análisis con concentración del analito superiores a 100 µg Kg<sup>-1</sup> indicando esto una buena exactitud del método.

### 3.7.5 Tiempo de vida del MIP

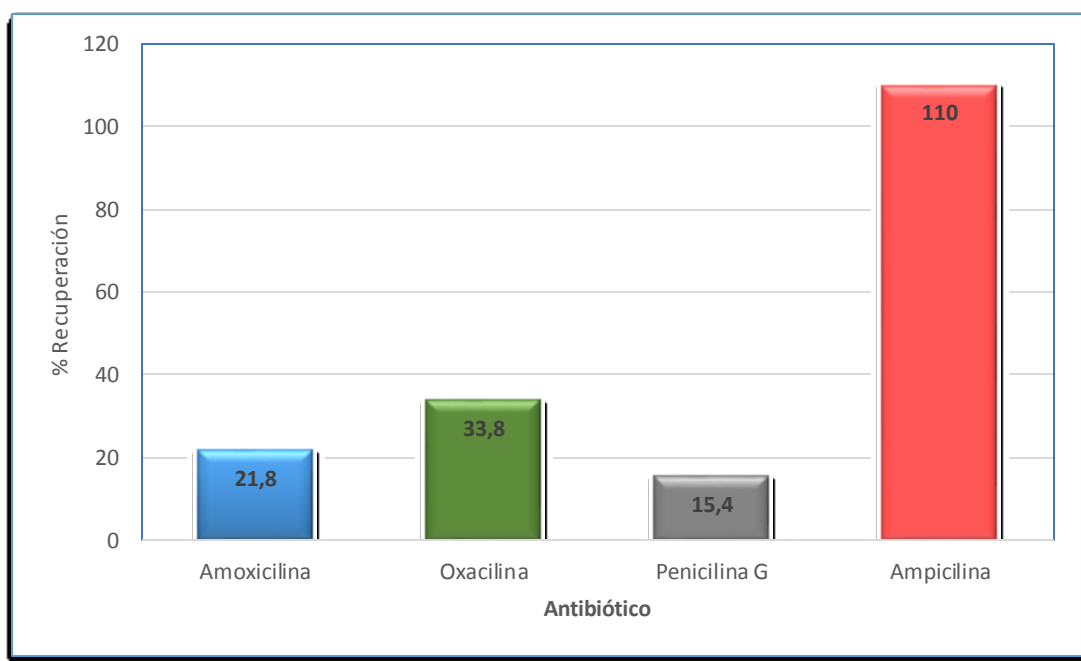
Desde su síntesis, el polímero ha permanecido estable e inalterable, y se han realizado más de 500 análisis, sin que haya perdido su capacidad de reconocimiento de la molécula de ampicilina.

### 3.8 Estudio de selectividad del método MISPE

En la última parte de este trabajo de investigación se ha llevado a cabo un estudio de la especificidad del método MISPE desarrollado. Para ello, se han realizado ensayos para determinar el comportamiento del MISPE (MIP3) frente a otros antibióticos de estructura similar.

Los experimentos llevados a cabo se han realizado aplicando el método MISPE (MIP3), tal y como se describe en el apartado 2.6 de Procedimientos, pero en este caso dopando la muestra con una concentración de 2 ppm de cada uno de los 4 antibióticos objeto de estudio, cuya estructura química posee grupos similares a los de la ampicilina. Los antibióticos utilizados en este ensayo, de forma conjunta son amoxicilina, oxacilina, penicilina G sódica y ampicilina.

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 61, donde se puede observar que se obtiene la mayor recuperación para el caso de la ampicilina, y recuperaciones menores del 33 % para el resto de los antibióticos estudiados, demostrando que el MIP3 sintetizado exhibió una elevada selectividad específica para la ampicilina en presencia de otros compuestos relacionados estructuralmente.



**Figura 61.** Porcentaje de recuperación de los distintos antibióticos estudiados aplicando el método MISPE (MIP3) específico para la ampicilina.

### III. CONCLUSIONES

---





Los resultados obtenidos en la investigación recogida en esta memoria han permitido cumplir los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, en cuanto al desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de los antibióticos eritromicina y ampicilina en muestras de leche de oveja y vaca, respectivamente. Las conclusiones más relevantes referidas a cada una de estas partes se resumen a continuación:

#### Parte A. Determinación de eritromicina en leche de oveja

- Se ha puesto a punto una nueva metodología de tratamiento de muestra para la determinación de eritromicina, antibiótico de la familia de los macrólidos, en muestras de leche de oveja, empleando un polímero de impresión o impronta molecular (MIPs) como fase adsorbente en una columna de extracción en fase sólida (MISPE) mediante HPLC-DAD.
- Se han sintetizado diferentes MIPs mediante un proceso de polimerización en bloque, no covalente, y empleando diferentes metodologías de polimerización (radiación UV y temperatura).
- Los polímeros sintetizados fueron utilizados como fase selectiva adsorbente en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE). Se llevó a cabo la caracterización analítica de los polímeros, para lo que se optimizaron las etapas de acondicionamiento, carga, lavado y elución en el proceso de extracción MISPE.
- Se llevó a cabo la validación del método MISPE desarrollado. La curva de calibración obtenida mostró una linealidad en el intervalo estudiado de 24-965  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  con un coeficiente de determinación de  $R^2=0,9994$ . El límite de cuantificación (LOQ) fue de 24,1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , por debajo del límite establecido por la Unión Europea (40  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ).
- Se llevó a cabo un estudio de selectividad del MIP seleccionado, aplicando el proceso MISPE conjuntamente a la eritromicina y a antibióticos de la misma familia y de estructura similar (josamicina, espiramicina, roxitromicina, ivermectina y tilosina). El polímero seleccionado presentó recuperaciones menores del 35 % para todos los antibióticos estudiados, excepto para la eritromicina y roxitromicina, cuyo reconocimiento fue

alrededor de 98 y 85%, respectivamente, lo que indica que el polímero es selectivo para el analito que se ha sintetizado y para el analito más estructuralmente semejante a él.

- El método de tratamiento de muestra desarrollado (MISPE-eritromicina) ha resultado ser rápido y selectivo para la determinación de eritromicina en leche de oveja en niveles de concentración por debajo del límite máximo de residuos permitido por la legislación vigente, suponiendo una alternativa que ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de tratamiento de muestra para este tipo de matrices.

#### Parte B. Determinación de ampicilina en leche de vaca

- Se ha puesto a punto una nueva metodología de tratamiento de muestra para la determinación de ampicilina, antibiótico de la familia de los betalactámicos, en muestras de leche de vaca, empleando un polímero de impresión o impronta molecular (MIPs) como fase adsorbente en una columna de extracción en fase sólida (MISPE) mediante HPLC-UV.
- Se han sintetizado diferentes MIPs, variando la composición de la mezcla polimérica (monómero funcional y porcentajes de los componentes), así como sus correspondientes polímeros no impresos o blancos (NIPs), mediante un proceso de polimerización en bloque, no covalente, y empleando radiación UV.
- Se ha llevado a cabo la caracterización estructural de los polímeros sintetizados mediante FT-IR. Al comparar los espectros FT-IR del polímero de control no impreso (NIP) con los del polímero impreso (MIP) se puede observar bastante similitud en sus formas, lo cual indica que existe una semejanza en la estructura de la red de ellos.
- En los espectros FT-IR obtenidos se observa la disminución de los picos correspondientes al  $-C=C-$ , y la presencia del pico correspondiente al  $-C-O-$  presente en la molécula del monómero entrecruzante.
- Los polímeros sintetizados fueron utilizados como fase selectiva adsorbente en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE). Se llevó a cabo la caracterización analítica de los polímeros, para lo que se optimizaron las etapas de acondicionamiento, carga, lavado y elución en el proceso de extracción MISPE.

- Los polímeros de impronta molecular desarrollados utilizando ácido metacrílico como monómero funcional mostraron mayor selectividad a la ampicilina que los polímeros desarrollados utilizando metacrilato de metilo o la mezcla de metacrilato de metilo y ácido metacrílico.
- Al disminuir la proporción del entrecruzante en la síntesis polimérica se obtienen partículas muy pequeñas de polímero, lo que lo hace difícil la manipulación de éste, además de suponer un aumento considerablemente del tiempo de análisis.
- Los estudios de unión del antibiótico a los distintos polímeros impresos sintetizados demostraron una gran retención y posterior elución hacia la ampicilina, utilizando el polímero de impronta molecular 3 (MIP3)
- Se llevó a cabo un estudio de selectividad del MIP3, aplicando el proceso MISPE conjuntamente a la ampicilina y a antibióticos de la misma familia y de estructura similar (amoxicilina, oxacilina y penicilina G). El polímero de impronta molecular 3 no presentó reconocimiento a antibióticos  $\beta$ -lactámicos distintos a la ampicilina, lo que indica que es selectivo para el analito que se ha sintetizado.
- El MISPE fue evaluado para la extracción y limpieza del analito en muestras de leche entera de vaca las cuales fueron suplementadas con ampicilina.
- Es necesario que las muestras de leche sean desproteinizadas y desgrasadas como paso previo a la extracción y limpieza del analito en el MISPE, para lo que se llevó a cabo un proceso conjunto de extracción de la grasa en frío y precipitando las proteínas con ácido acético 1N.
- Se utilizó el método de adición de un patrón de referencia para obtener una mejor señal del analito a bajas concentraciones.
- Los resultados obtenidos indican que se puede extraer la ampicilina con un 90-100% de recuperación de una matriz compleja como la leche de vaca y analizar la muestra por HPLC-UV.
- Se llevó a cabo la validación del método MISPE desarrollado. La curva de calibración obtenida mostró una linealidad en el intervalo estudiado de 100-500 ppb con un

coeficiente de determinación de  $R^2= 0,9996$ , con una precisión del 6-7%. El límite de detección (LOD) calculado en términos de concentración del analito en la solución, fue de  $10,75 \mu\text{g L}^{-1}$  y el límite de cuantificación (LOQ) fue de  $35,83 \mu\text{g L}^{-1}$ .

- Con los resultados obtenidos se propone el siguiente procedimiento para el análisis de muestras de leche entera de vaca, quedando demostrada la posibilidad de utilizar el MIP seleccionado (MIP3) en un sistema de extracción en fase sólida (MISPE) para preconcentrar la muestra hasta un total de 20 veces, pudiendo alcanzar los límites así establecidos por la legislación vigente ( $4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ).
- Para las tres concentraciones evaluadas correspondientes al 80 %, 100 % y 120 % del límite máximo de residuo (MRL) de ampicilina en la leche completa de vaca permitido por la Unión Europea, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 104,9 %, 98,9 % y 101,6 %, respectivamente, lo que indica una muy buena recuperación del analito con el método de extracción desarrollado.
- El método de tratamiento de muestra desarrollado (MISPE-ampicilina) ha resultado ser rápido y selectivo para la determinación de ampicilina en leche entera de vaca, obteniendo extractos libres de interferencias en las muestras ensayadas, suponiendo una alternativa que ofrece ventajas frente a los métodos convencionales de tratamiento de muestra para este tipo de matrices.

#### IV. BIBLIOGRAFÍA

---



Ángeles, J., Ávila, S., Rosiles, R y Fuentes, V. (2012). Detección de Rafaximina en la Leche de vacas lecheras utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). *Revista Científica, FCV-LUZ*, XXII (2):112-119.

Allinger, M. P., Cava, D. C., De Jong, C. R., Johnson, N. A., Lavel, N., Stevens, C. Organic Chemistry. Segunda Edición. Editorial Reverté, S.A. España, 1984.

Alawi, M., Rüssel, H. (1981). Determination of sulphonamides in milk by HPLC with electrochemical detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 307 (5): 382-384.

American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>ava</sup> Edición. USA. 1998

Amin, A y Issa, Y (1996). Selective spectrophotometric method for the determination of erythromycin and its esters in pharmaceutical formulations using gentian violet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14 (11): 1625-1629

Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., y García-Campaña, A. 2014. Alternative simple treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 143 (15) : 459 - 464.

APVMA GL69 (2004). Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. October.

AOAC (1999) International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. Microbiology Guidelines: Journal of AOAC International 82 (2).

AOAC International. (2002). Appendix D. Guidelines for collaborative study. Procedures to validate characteristics of a method of analysis.

Baker, W. L. (1989). Spectrophotometric determination of penicillates in penicillin's. *Analyst*. 114 (9): 1137-1139.

Barson, C., Bevington, J., Flint, N. (1999). Further study of 1, 4-diphenylbuta-1, 3-diene as an additive during the radical polymerization of methyl methacrylate. *European Polymer Journal*. 35 (11): 1935-1938

Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S., de la Pezuela, C. (1998). Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst*. 123 :135R–150R.

Bravo, J., Garcinuño, R., Fernández, P., Durand, J. S. 2007. A new molecularly imprinted polymer for the on-column solid-phase extraction of diethylstilbestrol from aqueous samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 388 (5-6) : 1039-1045.

Brito, R., Junqueira, R. 2006. Determination of beta-lactamic residues in milk by high performance liquid chromatography. *Brazilian archives of biology and technology*. 49: 41-46

Cámara, M., Gallego-Picó, A., Garcinuño, RM., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, JS., Sánchez, PJ. 2013. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chem*. 141 (2): 829-34

Carter, G., Wise, D. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. Wiley-Blackwell, 85-86. 2004.

Campbell, D. Pethrick, R., White, J. Polymer characterization: physical techniques. Stanley Thornes, Ltd. United Kingdom. 2000.

Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Validation of Chromatographic Methods. 1994.

Cheremisinoff, N. Polymer characterization: laboratory techniques and analysis. Noyes Publications, USA. 1996.

Ciardelli, G., Cioni, B., Cristallini, C., Barbani, N., Silvestri, D., Giusti, P. 2004. Acrylic polymeric nanospheres for the release and recognition of molecules of clinical interest. *Biosensors and Bioelectronics*. 20: 1083-1090

Cobos-Trigueros, N, Ateka, O., Pitart, C., Vila, J. 2009. Macrólidos y cetólidos. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 27. (7): 412-418. [Consultado el día 4 de octubre de 2014]. <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-macrolidos-cetolidos-13140303>

COVENIN 903-93. NORMA VENEZOLANA, Leche cruda

COVENIN 1200-81. NORMA VENEZOLANA. Leche Cruda. Determinación de sustancias conservadoras.

Cunliffe, D., Lockley, J., Ebdon, J., Rimmer, S., Palasz, P., Emmett, S. (2001). Emulsion polymerization of methyl methacrylate initiated by alkene ozonates. *Polymer*. 42 (23): 9329-9333

Cywinski, P., Sadowska, M., Danel, A., Buma, W., Brouwer, A., Wandelt, B. (2007). Fluorescent, molecularly imprinted thin-layer films based on a common polymer. *Journal of Applied Polymer Science*. 105 (1): 229 - 235



de La Rosa, M., Prieto, J. Microbiología para ciencias de la salud, conceptos y aplicaciones. Elsevier. 2003.

Deshpande, A., Baheti, K., Chatterjee, N. (2004). Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current Science*, 87 (12): 1684-1695

Doyle, M. E. Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Food Research Institute. University of Wisconsin-Madison. 2001.

Eatsman, C., Goodrich, S., Gartner, I., Mueller, A. (2004) Imprinted polymers in wastewater treatment. Symposia Papers Presented Before the Division of Environmental Chemistry American Chemical Society. Anaheim, CA March 28 – April 1.

El-Obeid H. A., Gad-Kariem E. A., Al-Rashood K. A., Al-Khamees H. A., El-Shafie F. S., Bawazeer G. A. M. 1999. A selective colorimetric method for the determination of penicillins and cephalosporins with  $\alpha$ -aminoacyl functions. *Analytical letters*. 32 (14): 2809-2823.

El Sheikh, R., Gouda, A. y Khalil, K. 2013. Sensitive and selective spectrophotometric determination of spiramycin in pure form and in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4 (6): 2234-2243.

Escolar, M., Azanza J.R, Sádaba B, Honorato J. Macrólidos y lincosaminas. Servicio de Farmacología Clínica. Clínica Universitaria de Navarra. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona, 1998

EU Nº 37/2010 (Comisión Regulatoria de la Unión Europea).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1997. Validation of Analytical methods for food control. Viena. Austria.

Farhadi, K., Ghadamgahi, S., Maleki, R., Feridoun, S. (2002) Spectrophotometric determination of selected antibiotics using Prussian blue reaction. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 49 (6): 993-997.

Faría, J., Allara, M., Arenas, L., Marquez, E. (2000). Extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Revista Científica*. FCV. LUZ. X (3): 212-221.

Food and Drug Administration. 2000. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).

Food and Drug Administration. 2011. Guidance for Industry. Studies to evaluate the metabolism and Residue Kinetics of veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies. VICH GL49. U.S Department of Health and Human Services. Center of Veterinary Medicine. September 15. [Consultado el día 18 de julio de 2011]. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207942.pdf>

Food and Drug Administration, 2015 FDA Regulation to Help Ensure Judicious Use of Antibiotics in Food-Producing Animals. [Consultado el día 20 de septiembre de 2015]. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/JudiciousUseofAntimicrobials/>

Fraser, C., Aiello, S., Mays, A., Amstutz, H. El manual Merck de Veterinaria, 5ª edición, Océano Grupo Editorial S.A., Barcelona (España). 2000.

García-Mayor, M., Garcinuño, R., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, J. (2006) Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *Journal of Chromatography A*. 1122, (1-2): 76-83.

Gatica, C., Gesche, E. (2007) Método de las 5 placas para la detección de residuos de Antibacterianos en Leche. *Rev. Cient.* 17 (3): 231-238

Gaynor, M y Mankin, A. 2003. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3: 949-961

Ghidini, S., Zanardi, E., Varisco, G., Chizzolini, R. (2002) Prevalence of molecules of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk in Lombardia and Emilia Romagna (Italy). *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*. XXII: 245 - 252

Gomis, D., Ferreras, A., Álvarez, M., García, E. (2004) Determination of Spiramycin and Josamycin in Milk by HPLC and Fluorescence Detection. *Journal of Food Science*. 69 (5): C415-C418.

Gonzalez, G., Fernandez, P., Durand, J.S. (2009). A MIP-based flow-through fluoroimmunosensor as an alternative to immunosensors for the determination of digoxin in serum samples. *Anal Bioanal Chem*. 394: 963–970

Guía de las especialidades farmacéuticas en Venezuela. XXXª Edición. Caracas, Venezuela. 2007.

Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición (Quantitative Chemical Analysis. Sixth Edition). Editorial Reverté. España. 2003.

Hernández, J., Castillo, C., Méndez, J., Vázquez, P., Pereira, V., Llana, J., López, M., Benedito, J. (2007) Comparación del Efecto de la Adición de Malato vs Monensina Sobre Parámetros Bioquímicos en Terneros en Crecimiento. *Rev. Cient.* (Maracaibo), Oct., 17 (5): 514-520.

Hishita, C., Mays, D., Garolafo, M. (1971) Gas Chromatographic determination of penicillin's. *Analytical Chemistry*. 43 (11): 1530-1533.

Huet, A., Charlier, A., Tittlemier, S, Singh, G, Benrejeb, S, Delahaut, P. (2006) Simultaneous Determination of (Fluoro)quinolone Antibiotics in Kidney, Marine Products, Eggs, and Muscle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (8): 2822-2827

International Conference on Harmonization (IHC): Informe de Seguridad de la Conferencia Internacional de Armonización.1995

Jevinova, P., Dudrikova, E., Sokol, J., Nagy, J., Mate, D., Pipova, M., Cabadaj, R. (2003) Determination of oxytetracycline residues in milk with the use of HPLC method and two microbial inhibition assays. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 47: 211-216

Kannan, K y Mankin, A. 2011. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1241: 33-47

Kay, T., Rodríguez, F. (1983) Polymerization of acrylamide using the hydrogen peroxide-hydroxylamine couple. *Journal of Applied Polymer Science*. 28 (2): 633 - 646

Knobler, S. (2003). The resistance phenomenon in microbes and infectious disease vectors: implications for human health and strategies for containment: workshop summary. National Academies Press.

Komiyama M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. Molecular imprinting: From fundamentals to applications. Wiley-Vch. Alemania, 2003.

Korolkovas, A., Burckhalter, J., Granados, R., Bosch, J. Compendio esencial de química farmacéutica. Reverté. 1983.

Kowalski, D., Poboży, E., y Trojanowicz, M. (2011) Flow-Injection Preconcentration of Chloramphenicol Using Molecularly Imprinted Polymer for HPLC Determination in Environmental Samples. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. 2011, 143416 doi:10.1155/2011/143416

- Kumar, K., Thompson, A., Singh, A., Chander, Y., Gupta, S. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *J. Environ. Qual.* 33: 250-256.
- Li, S.; Huang, X.; Zheng, M.; Li, W, y Tong, K. (2008). Molecularly Imprinted Polymers: Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular Recognition. *Sensors*, 8: 2854-2864
- Li, Y., Fu, Q., Zhang, Q., He, L. (2006). Preparation and Evaluation of Uniform-size (-)-Ephedrine imprinted Polymeric Microspheres by Multi-step Swelling and Suspension Polymerization. *Analytical Sciences*. 22: 1355-1360.
- Liu, Z., Bucknall, D., Allen, M. (2010). Absorption performance of iodixanol-imprinted polymers in aqueous and blood plasma media. *Acta Biomaterialia*. 6: 2003-2012.
- Lilley, L, Aucker, R, Lake, R., Gómez del Campo, R. Farmacología en enfermería. Elsevier. España. 1999.
- López, F. Fundamentos de Polímeros. VI Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Venezuela. 2004.
- Luo, W., Hansen, E., Ang, C., Deck, J., Freeman, J., Thompson, J. (1997) Simultaneous Determination of Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Milk by HPLC with Fluorescence Detection. *Agric. Food Chem.* 45 (4): 1264 -1268.
- Marín, M., Gudiol, F (2003) Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21 (1): 42-55
- Martín-Esteban, A., Turiel, E., Stevenson, D. (2001) Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides. *Chromatographia*. 53 (1): S434-S437.
- McGuire, J. M., Bunch, R. L., Anderson, R. C., Boz, H. E., Flynn, E. H., Powell, E. H., y Smith, J. W (1952). "Ilotycin", a new antibiotic. *Antibiotic Chemother.* 2: 281-283.
- Meetschen, U., Petz, M. (1990). Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. *J. Assoc Off Anal Chem*. May-Jun. 73(3): 373-9.
- Mei-Ratliff, Y. (2012). Determination of the Antibiotic Oxytetracycline in Commercial Milk by Solid-Phase Extraction: A High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Experiment for Quantitative Instrumental Analysis. *Journal of Chemical Education*. 89 (5): 656-659
- Miller, J y Miller, J. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición. Prentice Hall. Madrid. España. 2002.

Mir Mohamad Sadeghi, G., Morshedian, J., Barikani, M. (2003) The effect of initiator-to-monomer ratio on the properties of the polybutadiene-ol synthesized by free radical solution polymerization of 1, 3-butadiene. *Polymer international*. 52 (7): 1083-1087

Moats, W y Harik-Khan, R. 1(995). Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. *Journal of agricultural and food chemistry*. 43 (4): 931-934

Möhrle, V., Stadler, M y Eberz, G. 2007. Biosensor-guided screening for macrolides. *Anal Bioanal Chem*. 388: 1117-1125

Molero-Saras, G, Pérez-Arevalo, M, Sanchez-Villalobos, A. (2007). Residuos de Enrofloxacin en canales de pollos procedentes de cuatro plantas beneficiadoras, Municipio San Francisco, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.*, 17 (4): 412-416.

Moore, G., Nygren, O. (2004). The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals- Penicillins. National Institute for Working Life & Author, Stockholm, Sweden [Consultado el día 25 de marzo de 2013]: [http://www.inchem.org/documents/kemi/kemi/ah2004\\_06.pdf](http://www.inchem.org/documents/kemi/kemi/ah2004_06.pdf)

Morrison, R. y Boyd, R. Química Orgánica. Quinta edición. Addison Wesley Longman de México S.A. de CV. 1998.

Nilsson, L. (1984) Correlation of bioluminescent assay of gentamicin in serum with agar diffusion assay, latex agglutination inhibition card test, enzyme immunoassay, and fluorescent immunoassay. *Journal of clinical microbiology*. 396-439.

Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K., Macneil, J.D. Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. *AOAC International*, Arlington, USA. 1995. 77-120.

Okoye, N., Godwin, I., Ukwueze, N., Okoye, F. (2007). Spectrophotometric determination of some cephalosporin antibiotics using Prussian blue reaction. *Scientific Research and Essay*. 2 (8): 342-347.

Oliver, A. (2004). Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. Resistencia a carbapenemas y *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22: 259-61.

Ōmura, S. (2002). Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice (2nd Ed.). Boston: Academic Press. [ISBN 0-12-526451-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-526451-8).

Ozaki, Y., McClure, F., Christy, A. Near Infrared spectroscopy in food science and technology. Wiley-Interscience. 2007.

Pacheco-Silva, E., Rodrigues de Souza, J y Dutra Caldas, E. 2014. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Quim. Nova*, 37 (1): 111-122

Painter, P., Coleman, M., Irvin, J., Fernandez-Berridi, M. Fundamentals de ciencia de polímeros: un texto introductorio. CRC Press. 1996.

Pellinen, T., Bylund, G., Virta, M., Niemi, A., Karp, M. (2002). Detection of traces of tetracyclines from fish with a bioluminescent sensor strain incorporating bacterial luciferase reporter genes. *J. Agric Food Che.* 50 (17): 4812-4815.

Pereira, E., Cáceres, C., Rivera, F., Rivas, B y Sáez, P. (2014). Preparation of molecularly imprinted polymers for diphenylamine removal from organic gunshot residues. *Journal of the Chilean Chemical Society.* 59 (4): 2731-2736.

Philip, J., Buchweishaija, J., Mkyula, L., Ye, L (2007) Preparation of Molecularly Imprinted Polymers Using Anacardic Acid Monomers Derived from Cashew Nut Shell Liquid. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (22): 8870–8876

Piletsky, S. A. y Turner, A. P. F. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis*, 2002, 14 (5): 317–323.

Poornanandhan. A., Rajalingam. P., Radhakrishnan. G. (1993). Polymer-supported redox catalysts for polymerization. *Polymer.* 34 (7) : 1485-1489

Portillo Barrio A. Mecanismos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en streptococcus y enterococcus. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja, 2002

Primo, E. Química Orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Tomo III. Editorial Reverté, S.A. España, 1995.

Prescott, J., Baggot, J. y Walker, R. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Tercera edición. Wiley-Blackwell. USA. 2000.

Prasad, P., Gupta. S. (2000). Extraction-spectrophotometric determination of certain-beta-lactam antibiotics with methylene blue. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 62 (4): 261-266.

Rashid, B. A, Briggs, R., Hay, J., Stevenson, D. (1997) Preliminary evaluation of a Molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of tamoxifen. *Analytical Communications.* 34. 303-305.

Rachidi, M., Elharti, J., Digua, K y Cherrah, Y. 2007. New Spectrophotometric Method for Azithromycin Determination. *Analytical Letters*. 39 (9): 1917-1926.

Rattanapoltaveechai, R., Vongkom, W, Suntornsuk, W y Suntornsuk, L (2007). Simple and Rapid Spectrophotometric Method for the Analysis of Erythromycin in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Food and Drug Analysis*. 15 (1): 10-14

B.O.E. Real Decreto 109 sobre medicamentos veterinarios. Boletín Oficial del Estado Nº 53 de 27 de enero de 1995 (Ref. [BOE-A-1995-5654](#)).

Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, (DOCE L 224/1990).

Ríos-Fuenmayor; G., Huerta- Leidenz, N., Rincón, E., Wilhelm, E., Aguirre-Suárez., J. (1992). Uso de antimicrobiales como promotores del crecimiento en cerdos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 9: 259 - 270

Rivas, K, Rivas, M, Dávila, E., Rodríguez, M. (2002). Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina*. 25 (2): 142-153.

Roca, M., Villegas, L., Kortabitarte, M., Althaus, R., Molina M (2011). Effect of heat treatments on stability of  $\beta$ -lactams in milk. *Journal of Dairy Science*. 94 (3): 1155-1164.

Rodríguez, E, Moreno-Bondi, M., Marazuela, M. 2011 Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. *Food Chemistry*. 127 (3): 1354 - 1360

Rong, F., Feng, X., L., P., Yuan, C., Fu, D. (2006). Preparation of molecularly imprinted microspheres by photo-grafting on supports modified with iniferter. *Chinese Science Bulletin*. 51 (21): 2566- 2571.

Salas, P., Calle, S., Falcón, N., Pinto, C y Espinoza, J. 2013. Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. *Rev. investig. vet. Perú* 24 (2): 252-255. [Consultado el día 22 de julio de 2014]: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172013000200017&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172013000200017&script=sci_arttext)

Salem, H. (2004). Selective spectrophotometric determination of phenolic  $\beta$ -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations. *Analytica chimica acta*. 515 (2): 333-341

Salem, H., Saleh, G. (2002) Selective spectrophotometric determination of phenolic beta-lactam antibiotics. *J Pharm Biomed Anal*. 28(6): 1205-13.

Samanidou, V., Nisyriou, S. (2008) Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. *Journal of Separation Science* 31: 2068 - 2090

Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Landchipa, P., Zegarra, R. (2004). Antibióticos sistémicos en dermatología. Primera parte:  $\beta$ -lactámicos, Carbapenems, Aminoglucósidos, Macrólidos. *Dermatología Peruana*. 14 (1): 7- 20.

Santos, W., Lima, P., Tarley, C., Kubota, L. (2009) Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (5): 820-825

Seymour, R. y Carraher, C. Introducción a la química de los polímeros. Editorial Reverté, S.A. España. 2002.

Sellergen, B., Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in analytical Chemistry, Elsevier, Ámsterdam, 2001, Capítulo 5

Serrano, M., Durántez, M. (1998). Antibióticos Monobactámicos. *Medicine*. 7, (88): 4128-4134.

Setford, S. J., Van Es, R. M., Blankwater, Y. J., Kroger, S. (1999) Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid  $\beta$ -lactam quantification in milk. *Analytica Chimica Acta*. 398: 13-22.

Shimizu, K. (2002). Characterization of MIPs using heterogeneous bending models. Symposium San Francisco California, Vol 723

Singh, A., Ma, D., Kaplan, D. (2000). Enzyme-Mediated Free Radical Polymerization of Styrene. *Biomacromolecules*, 1 (4): 592 -596

Skoog, D., Leary, J. Análisis Instrumental. Cuarta Edición. McGraw-Hill. México. 1998.

Skudar, K., Brüggemann, W., Ramström, O. (1999). Selective recognition and separation of  $\beta$ -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers. *Anal. Commun*, 36: 327-331.

Smith, J., de Grey, G., Patel, V. (1967). The spectrophotometric determination of ampicillin. *Analyst*. 92: 247-252.

Songjun Li, Xing Huang, Mingxia Zheng, Wuke Li, Kejun Tong. (2008). Molecularly Imprinted Polymers: Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular Recognition. *Sensors*. 8: 2854-2864

Spectral Database for Organic Compounds SBDS [Consultado el día 16 de junio de 2010]: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng)



Sreenivasan, K. (2002). Molecularly imprinted polymer as storage medium for an analyte. *Bioseparation*. 10 (6): 395-398.

Stanier, R, Villanueva, J, Guerrero, R. Colaborador Julio R. Villanueva, Microbiología. Segunda Edición. Editorial Reverté, S.A. 1996.

Takatsuki, K., Ushizawa, I y Shoji, T.1987. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring. *J Chromatogr*. 1987. 391(1): 207-217

Talaro, K. y Talaro, A. Foundations in microbiology. McGraw-Hill, New York, USA. 2002.

Tona, G y Olusola, A. (2014). Determination of tetracycline antibiotic residue in dairy products sold in Ogbomoso, South-Western Nigeria. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. 4 (1): 136-140

Torres, C., Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit*. 16 (2): 109-112.

Uma Sankar Nandi, Santi R. Palit. (1955). Hydrogen peroxide as initiator in vinyl polymerization in homogeneous system. I. Kinetic studies. *Journal of Polymer Science*. 17 (83): 65-78.

United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30- NF 25). 2007. 30th Edición. Monografías Oficiales. United States Pharmacopeial convention, INC. Rockville, MD. USA.

Urraca, J; Castellari, M; Barrios, C; Moreno-Bondi, M. 2014. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1343: 1-9.

Van Dyck, K., Robberecht, H., Van Cauwenbergh, R., Deelstra, H., Arnaud, J., Willemyns, L., Benijts., F., Centeno, J., Taylor, H., Soares, M., Bastos, M., Ferreira, M., D'Haese, P., Lamberts, L., Hoenig, M., Knapp, G., Lugowski, Moens, L., Riondato, J., Van Grieken, R., Claes, M., Verheyen, R., Clement L., Uytterhoeven, M. (2000). Spectrometric determination of silicon in food and biological samples: an interlaboratory trial. *J. Anal. At. Spectrom*. 15: 735 -741.

Van Nostrum, C. (2005). Molecular imprinting: A new tool for drug innovation. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2 (1): 119-124.

Van Royen, G., Dubruel, P y Daeseleire, E. (2014). Development and evaluation of a molecularly imprinted polymer for the detection and *clean-up* of benzylpenicillin in milk. *Journal of agricultural and food Chemistry*. 62 (35): 8814 - 8821.

Vinod, K., Dharuman, J., Karuna, A. (2010). RP-HPLC Method development and validation for simultaneous estimation of sulbactam and cefoperazone in dosage form and in plasma. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1 (4): 87.

Wang, X., Wang, L., He, X., Zhang, Y., Chen, L (2009). A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition. *Talanta*. 78: 327-332.

Wiley, P. F., Gerzon, K., Flynn, E. H., Sigal, M. V. Jr., Weaver, O., Quarck, U. C., Charrette, R. R., y Monahan, R. (1957). Erythromycin. X. Structure of erythromycin. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 6062-6070.

Wulff G, Sarhan A. (1972) Use of polymers with enzyme analogues structures for the resolution of enantiomers. *Angewandte Chemie International Edition in English* 11: 341-344

Xingliang, S., Shoufang, X., Lingxin, C., Yingqin, W y Hua, X. (2014). Recent advances in molecularly imprinted polymers in food analysis. *Journal of Applied Polymer Science*. 131 (16): 40766

Yan, H., Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *Int J. Mol. Sci.* 7: 155-178.

Zakaria, N., Yusof, N., Haron, J., Abdullah, A. (2009). Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for 2, 4-dinitrophenol. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 354-365.

Zhang, H., Song, T., Zong, F., Chan, T., Pan, C. (2008). Synthesis and Characterization of molecularly imprinted polymers for phenoxyacetics acids. *Int J Mol Sci*. 9: 98-106.

Zhang, X., Chen, L., Xu, Y., Wang, H., Zeng, Q., Zhao, Q., Ren, N., Ding, L. (2010). Determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 12/2010; 878 (32): 3421-6.

Zhang, YH Qi, JX Liu, y JP Wang. 2013. Heterologous immunoassay for screening macrolide antibiotics residues in milk based on the monoclonal antibody of tylosin. *Food and Agricultural Immunology*. 24 (4): 419-431.

## ANEXO I

---

PUBLICACIONES



Manuscript Number:

Title: EFFECTIVE DETERMINATION OF AMPICILLIN IN COW MILK USING A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS SORBENT FOR SAMPLE PRECONCENTRATION

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: ampicillin; milk; HPLC; MISPE

Corresponding Author: Dr. Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño, Dr

Corresponding Author's Institution: Facultad de Ciencias, UNED

First Author: Beatriz Soledad Rodriguez

Order of Authors: Beatriz Soledad Rodriguez; Alejandrina Gallego-Picó, Dr; Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño, Dr; Pilar Fernández-Hernando, Dr; Jesús S Durand Alegría, Dr

Abstract: The aim of this study was to prepare molecularly imprinted polymers (MIPs) with ampicillin (AMP) and to evaluate the feasibility of these materials for being used as solid phase extraction sorbent for the selective preconcentration and determination of AMP in cow milk samples. MIPs were synthesized by bulk polymerization using methacrylic acid or methyl methacrylate as monomer and ethylene glycol dimethacrylate as cross-linker at different ratios. Characterization of the MIPs were carried out by Fourier-transform infrared spectrometry. The variables affecting the molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure were optimized. AMP recoveries were higher than 98%, and RSD less than 7 %. A preconcentration factor of 20 was reached, which was sufficient to determine AMP at levels allowed by the EU (4 µg kg<sup>-1</sup>) in cow milk. The selectivity of the AMP-MIP was evaluated in presence of other structurally related β-lactam antibiotics (amoxicillin, oxacillin, penicillin G)

**Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez**

Profesor Contratado Doctor

Dpto. Ciencias Analíticas



*Food Chemistry*  
Editorial Office

Madrid, 5- June -2015

Dear Editor,

Please, find enclosed the paper entitled “EFFECTIVE DETERMINATION OF AMPICILLIN IN COW MILK USING A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS SORBENT FOR SAMPLE PRECONCENTRATION”, to be considered for publication in *Food Chemistry*.

This paper describes the development of an HPLC-UV method for the selective and effective preconcentration and determination of AMP using a MIP as SPE sorbent in cow milk samples.

The developed method allows the quantification of AMP in complex samples as milk at the concentration levels required by legislation. It is the first time until now that a selective MIP for preconcentration of AMP has been synthesized and applied to milk samples, offering an alternative for AMP determination using a simple instrumentation present in most common analytical laboratories.

I hope to hear from you.

With my best wishes,

Dra. Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño

C/ Senda del Rey n<sup>o</sup> 9  
28040, Madrid

Tel: 00 34 91 398 73 66  
Fax: 00 34 91 398 83 79

[rmgarcinuno@ccia.uned.es](mailto:rmgarcinuno@ccia.uned.es)  
<http://www.uned.es/dpto-ciencias-analiticas>

## Highlights

A MISPE method has been used for selective preconcentration of AMP from cow milk

HPLC with UV detection was used for the quantification of ampicillin

MIPs have been synthesized and characterized by binding and FT-IR studies

The method allows AMP determination in milk at concentrations required by legislation

1 **EFFECTIVE DETERMINATION OF AMPICILLIN IN COW MILK USING A**  
2 **MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS SORBENT FOR SAMPLE**  
3 **PRECONCENTRATION**

4

5 B. Soledad-Rodríguez <sup>a</sup>, A. Gallego-Picó <sup>b</sup>, R. M. Garcinuño-Martínez\* <sup>b</sup>, P. Fernández-  
6 Hernando <sup>b</sup>, J. S. Durand-Alegría <sup>b</sup>

7

8 <sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Universidad Católica Andrés Bello, Caracas,  
9 Venezuela

10 <sup>b</sup> Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance,  
11 28040 Madrid, Spain

12

13 **\*Corresponding author:**

14 Rosa M<sup>a</sup> Garcinuño Martínez

15 Telephone number: 00 34 913987366

16 E-mail address: rmgarcinuno@ccia.uned.es

17

18

19

20



## 21 **Abstract**

22 The aim of this study was to prepare molecularly imprinted polymers (MIPs) with ampicillin  
23 (AMP) and to evaluate the feasibility of these materials for being used as solid phase extraction  
24 sorbent for the selective preconcentration and determination of AMP in cow milk samples. MIPs  
25 were synthesized by bulk polymerization using methacrylic acid or methyl methacrylate as  
26 monomer and ethylene glycol dimethacrylate as cross-linker at different ratios. Characterization  
27 of the MIPs were carried out by Fourier-transform infrared spectrometry. The variables affecting  
28 the molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure were optimized. AMP  
29 recoveries were higher than 98%, and RSD less than 7 %. A preconcentration factor of 20 was  
30 reached, which was sufficient to determine AMP at levels allowed by the EU ( $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in cow  
31 milk. The selectivity of the AMP-MIP was evaluated in presence of other structurally related  $\beta$ -  
32 lactam antibiotics (amoxicillin, oxacillin, penicillin G).

33  
34  
35

36 *Keywords:* ampicillin; milk; HPLC; MISPE

37  
38

## 39 **1. Introduction**

40

41 Ampicillin (AMP) is a  $\beta$ -lactam antibiotic that belongs to the group of penicillins. It is semi-  
42 synthetic, broad-spectrum, acid stable and orally absorbed antibiotic that inhibits bacterial  
43 synthesis and is normally used for the treatment of common bacterial infections both in humans  
44 and animals (Marín and Gudiol, 2003). In 1999, the European Union (EU) has forbidden the use  
45 of antibiotics as additives in animal feed, but they are still in use in other countries.

46 Different agencies worldwide are working in relation to the regulation of veterinary drug  
47 residues in food of animal origin, and constantly making revisions to existing regulations (BU  
48 Council Regulation 2377/90) and monitoring programs (BU Council Directive 96/23/EC). EU  
49 maximum residue limits (MRLs) established for AMP is  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  in muscle, fat, liver and  
50 kidney and  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$  in milk (EU N° 37/2010). The low concentrations allowed require the  
51 development of high sensitive and selective analytical methods. Currently, a large number of  
52 researchers are working hard on improving the analytical methodology for the determination of  
53 these compounds (Ángeles et al. 2012, Cámara et al. 2013, Tona, and Olusola, 2014, Song et al.  
54 2014). Microbial assays were the earliest methods used for the detection of antibiotic residues as  
55 screening methods (Gatica and Gesch 2007) and they are still widely used. These methods may  
56 demand a few minutes, hours, or even an entire night inoculation, which is the case of most  
57 commonly, developed methods (Pikkemaat 2009, Cháfer-Pericás, Maquieira and Puchades,  
58 2010). Standardized methods recommended by Association of Analytical Communities (AOAC)  
59 to determine antibiotic residues in food are based on high performance liquid chromatographic  
60 (LC) methods coupled to different detectors. Many author have reported the determination of  
61  $\beta$ -lactam antibiotics by LC using diode array (Bailón-Pérez et al. 2009, Cámara et al 2013),  
62 fluorescence (Benito-Peña et al 2005, Roca et al. 2010) and mass spectrometry detectors (Sijun  
63 et al. 2007., Kantiani et al. 2009), using different procedures for sample preparation. Since the  
64 residues of ampicillin in food samples are usually very low, a pre-concentration step is required  
65 in most cases to enhance the efficiency and sensitivity of instrumental analysis. Solid phase  
66 extraction (SPE) is the most common technique used for sample enrichment. However, the main  
67 problems associated with the use of commercially available SPE cartridges for the determination  
68 of antibiotics in food matrices are the lack of selectivity and the low recoveries obtained. These

69 limitations can be overcome by using molecularly imprinted polymers (MIPs) as selective  
70 sorbents in SPE (MISPE) cartridges for analyte preconcentration and clean-up of the sample.

71 Molecular imprinting is a technique that provides polymers with specific recognition properties  
72 because the recognition sites within the polymer matrix are complementary to the analyte in the  
73 shape and position of functional groups. These sites in the polymer provide the capacity for  
74 specific rebinding with the template. MIPs can be selective for a particular analyte or group of  
75 analytes and allow the pre-concentration of these analytes and the removal of the interfering  
76 compounds from the sample matrix. The low cost of synthesis and the fact that MIPs are  
77 reusable and have high stability to harsh chemical conditions are some of the advantages of the  
78 use of MIPs as SPE sorbents. However, molecularly imprinted polymers are amorphous solids,  
79 with great structural diversity. Proper application of these polymers requires an accurate  
80 characterization of surface and structural properties (Campbell, Pethrick and White 2000,  
81 Seymour and Carraher 2002). There are different methods for the characterization of polymers  
82 among which infrared (IR) spectroscopy is the most important, whereby the main components of  
83 an organic compound can be quickly and easily identified, and informs about the various  
84 functional groups found in the molecule. Thus, it helps to know the structure of a new  
85 compound. There are many articles in the literature dealing with the use of IR spectroscopy to  
86 compare the structures of monomers, crosslinking and template of molecularly imprinted  
87 polymer and molecularly non imprinted polymers (NIPs) (Philip et al. 2007, Li et al. 2008,  
88 Santos et al. 2009, Zakaria et al. 2009, Liu et al., 2010, Guo et al., 2013, Bai et al., 2014, Zhao et  
89 al., 2014).

90 The main goal of this work was to evaluate the feasibility of various MIPs, synthesized varying  
91 monomer-crosslinker ratio, for being used as a selective solid phase extraction sorbent for the

92 efficient selective preconcentration and determination of AMP in cow milk samples. This study  
93 involves the formation of a molecular complex between functional monomers and a molecule  
94 that acts as a template (ampicillin) in an appropriate solvent, followed by polymerization in the  
95 presence of a cross linker. The characterization of synthesized polymers was carried out using  
96 Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry. The selectivity of the AMP-MIP was evaluated  
97 in presence of other structurally related  $\beta$ -lactam antibiotics (amoxicillin, oxacillin, penicillin  
98 G). Finally, the MIP was successfully applied to the clean-up and preconcentration of AMP in  
99 cow milk samples using HPLC-UV detection. Although some MIPs for  $\beta$ -lactam antibiotics  
100 have been studied (Zhang et al. 2010, Junfa et al. 2010) no specific MIP for ampicillin has been  
101 synthesized and no applications to milk samples were previously reported.

102

## 103 **2. Materials and Methods**

### 104 *2.1. Reagents and solutions*

105 HPLC-grade solvents used were acetonitrile, supplied by Burdick & Jackson, (Muskegon Mi,  
106 USA), ethanol supplied by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and methanol, supplied by  
107 Burdick & Jackson AH230 (Muskegon Mi, USA). Potassium dihydrogen phosphate, monobasic  
108 potassium phosphate, and analytical grade acetic acid was acquired from Riedel-de-Haën.  
109 (Seelze, Germany). Hydrogen peroxide 30 % was obtained from PERDROGEN<sup>®</sup> Sigma-  
110 Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA) and  
111 ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) were purchased from Advance Scientific and  
112 Chemical Inc. (Florida, USA). Research Pharmaceutical (Bogotá, Colombia), sodic penicillin G  
113 was supplied by Pfizer Laboratories (Caracas, Venezuela), supplied solid stock standard of  
114 ampicillin and amoxicillin and oxacillin was supplied by Genven Laboratories (Caracas,

115 Venezuela). Ultra-pure water (18.2 MΩ cm quality) was obtained using a Milli-Q water system  
116 (Millipore, Bedford, MA, USA).

117 Stock standard solutions of each β-lactam antibiotic at 1 gL<sup>-1</sup> were prepared weekly by weighing  
118 the exact amount of powder dissolving in 100 mL of diluent (water: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M: acetic acid 1  
119 N, 989:10:1 v/v) and stored at 4 °C in the dark following the method of United States  
120 Pharmacopeia and National Formulary (2007). The working standard solution of AMP at an  
121 adequate concentration was prepared daily by the appropriate dilution of the mentioned stock  
122 standard solution with the diluent.

123 Mobile phase for chromatographic analyses was made mixing water, acetonitrile, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M  
124 and acetic acid 1 N (909:80:10:1 v/v). The solution was filtered through a 0.45 μm cellulosic  
125 membrane filter before being used in the chromatographic system.

126

## 127 *2.2. Synthesis of molecularly imprinted polymers*

128 Ampicillin molecularly imprinting polymers (MIPs) were prepared by the technique of bulk  
129 polymerization, according with non-covalent approach, using methacrylic acid (MAA) or  
130 methyl methacrylate (MMA) as functional monomers, ethylene glycol dimethacrylate  
131 (EGDMA) as crosslinking monomer, acetonitrile (ACN) as porogen and hydrogen peroxide as  
132 initiator. Polymers were synthesized using different template/monomer/crosslinking ratios. Table  
133 1 shows the molar composition of these polymers. For all MIPs, 0.010 grams of ampicillin (2.2  
134 mM) was dissolved in acetonitrile (10 mL) in a glass tube and briefly vortexed at 50 °C, until  
135 completely dissolved. Then, an appropriated monomer was added to AMP solution and mixed  
136 in vortex for 1 minute and in ultrasonic bath for 5 minutes. EGDMA and hydrogen  
137 peroxide (2% v/v) were added and mixed in vortex for 1 minute and in ultrasonic bath for 2

138 minutes. Polymerization solutions were purged with nitrogen for 3 minutes and the flasks were  
139 sealed before placing at 28° C under an UV light (UVS-54 lamp, Mineralight®Lamp, USA) for  
140 24 hours. The obtained polymers were removed from the test tube using a spatula and distilled  
141 water and were placed in a mortar, crushed and sieved wet with a stainless steel sieve pore  
142 size of 300 µm. Then, polymers were filtered to remove the liquid and washed with ethanol and  
143 subsequently with methanol. The template was extracted with methanol-acetic acid 1 N (9:1 v/v)  
144 in a water bath at 55°C for 6 hours. The presence of AMP in extracted solvent was tested by  
145 HPLC. The procedure was repeated until no more template molecule could be detected.  
146 Finally, MIPs were air dried and placed in a desiccator until use. For comparative purposes, non-  
147 imprinted polymers (NIPs) were prepared under similar conditions without the addition of the  
148 template molecule during the polymerization procedure.

149

### 150 2.3. *Chromatographic conditions*

151 The chromatographic analyses were performed using a Dionex Ultimate 3000 LC System  
152 (Germering, Germany), equipped with a isocratic pump (ISO-3100SD), a column compartment  
153 (Column Over TCC-3000) and a Ultimate 3000 (VWD-3100) variable wavelength detector.  
154 Samples injections were carried out manually using a 20 µL loop mounted on an injection valve  
155 (Rheodyne 8125, USA). Control system and data acquisition were carried out by Dionex LC  
156 software (Chromeleon Version 6.80). AMP determination was carried out on a stainless steel  
157 analytical column (5 µm particle size, 4 cm x 250 mm i. d.) packed with C-18 material  
158 (Acclaim® 120), at a flow rate of 1.5 mL/min at room temperature, using the method described  
159 in United States Pharmacopeia and National Formulary (2007). The mobile phase was water,  
160 acetonitrile, 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1 N acetic acid (909: 80: 10:1 v/v). The detection wavelength was

161 254 nm. Chromatographic conditions for the separation of all analytes was similar to the  
162 conditions for AMP determination, except for the column temperature, it was kept at 30 °C. All  
163 compounds were eluted within 11.5 min. Quantification was performed using external  
164 calibration and peak area measurements.

165

#### 166 *2.4. Molecularly imprinted polymers FT-IR characterization*

167 The infrared spectra of polymers were recorded using a Nicolet 380 Fourier transform IR  
168 spectrometer (Thermo Electron Corporation, USA). The polymer was mixed with pure and dry  
169 solid KBr, prepared and inserted in the pad holder shown in the spectrometer, using a spectral  
170 range of 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$  and resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

171

#### 172 *2.5. Milk samples pre-treatment protocol*

173 Fresh morning milk samples from different cows were collected from paddocks at Higuero,   
174 (Estado Miranda, Venezuela). Cows had not received antibiotic treatment within the last 4  
175 weeks. The samples were refrigerated and transported to the laboratory, and then stored at -20 °C  
176 until use. The protocol used for pretreatment of spiked milk samples is detailed below. Milk  
177 samples were allowed to thaw in refrigeration and homogenized. An amount of 20 grams of  
178 homogenized cow milk was spiked with the desired amount of AMP, mixed by manual shaking  
179 for 1 min and maintained at 4 °C in the refrigerator for 20 min to allow the equilibration of the  
180 antibiotic with the milk matrix. Acetic acid 1 N (5 mL) was added to precipitate the proteins and  
181 placed in a refrigerator for 20 minutes to allow the interaction of the solvent with the sample and  
182 facilitate proteins and fat removal. The mixture was then centrifuged for 10 min at 6000 rpm,  
183 resulting on a top layer of fat and a solid protein precipitation at the bottom. Fat was extracted

184 by suction with the aid of a syringe and the supernatant containing the analyte was collected  
185 using a Pasteur Pipette and loaded onto MISPE column for preconcentration sample and  
186 antibiotic isolation procedure.

### 187 *2.6. MISPE procedure*

188 An amount of 350 mg of dry imprinted polymer was packed into syringes of 10 mL using a  
189 Whatman N° 1 disc paper at the end of the syringe. MISPE cartridges were firstly conditioned  
190 with 5×2 mL of acetonitrile prior to extraction. Then, 20 g of a spiked milk sample previously  
191 pre-treated, following the procedure described in section 2.5 to erase fat and proteins, was  
192 loaded. When the sample loading was completed, MISPE cartridge was washed with 2×2 mL of  
193 acetonitrile. Then, target analyte was eluted using 3×2 mL of MeOH: acetic acid 1 N (99.4:0.6  
194 v/v). Sample extracts were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 30 °C and  
195 re-dissolved in 1 mL of diluent (water: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M: acetic acid 1 N, 989:10:1 v/v). The  
196 reconstituted sample was then analyzed by HPLC using the method described above. Finally, the  
197 MISPE cartridge was washed with 3×3 mL of deionized water and regenerated by passing 5×2  
198 mL of ACN before the next assay.

199

### 200 *2.7. Validation of analytical method*

201 Validation of the developed analytical method was carried out analyzing the following  
202 parameters: linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification  
203 (LOD) using spiked milk samples under the optimized MISPE conditions. For the study of the  
204 linearity, a calibration curve with antibiotic solutions in a concentration range of 100 to 500 ppb  
205 (µg/L) was prepared, evaluating the correlation coefficient and the equation of the line. The  
206 accuracy and precision tests were based on the analysis of quality control standards for AMP at



207 three concentration levels (high, medium and low) within the established range. Five replicates  
208 for each concentration level were prepared. The accuracy was evaluated by means of recovery  
209 (measure of the effectiveness of the extraction process) assays and was verified by the relative  
210 standard deviation (RSD) of the series of measurements. The precision was evaluated in terms of  
211 repeatability (intra-day precision) and reproducibility (inter-day precision) on the basis of 5  
212 determinations for each of the studied concentrations of the antibiotic. The RSD percentages of  
213 the data were calculated. The sensitivity of a method is the ability to discriminate small  
214 differences in analyte concentration and was evaluated by the LOD and the LOQ. The LOD is  
215 the minimum amount of analyte that can be detected but not necessarily quantified and can be  
216 distinguished from a white analyzed under the same condition. The LOQ is defined as the  
217 minimum amount of analyte required to obtain a significant result that can be distinguished with  
218 a known probability of a white analyzed under the same condition with precision and accuracy.  
219 LOD and LOQ were determined based on a signal-to-noise ratio of 3 ( $S/N = 3$ ) and 10  
220 ( $S/N = 10$ ), respectively, according to the FDA Guidance for Industry, 2011.

221

### 222 **3. Results and Discussion**

223

#### 224 *3.1. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers*

225 In the preparation of MIPs, there are many factors that have to be considered since they would  
226 influence morphology, properties and performance of the polymers. In this work, several  
227 parameters including the type of functional monomer and the molar ratio of the template, the  
228 functional monomer and the crosslinker were studied to obtain a suitable MISPE for selective  
229 extraction of AMP. For this purpose, six non-covalent molecularly imprinted polymers were

230 synthesized by “bulk” polymerization using AMP as template, two different reagents as  
231 functional monomer (MAA and MMA), and different ratios of functional monomer and  
232 crosslinker (Table 1). MIPs synthesis were carried out following the procedure described in  
233 section 2.2. The corresponding NIPs were also synthesized, to act as control.

234 Firstly, it was evaluated the possibility of using a mixture of functional monomers. Then, three  
235 polymers (Polymers 1-3) using as functional monomers MAA, MMA or a mixture and fixing  
236 crosslinking agent ratio were prepared. The recognition properties of the polymers were  
237 investigated following the MISPE procedure described in section 2.6, optimizing general  
238 parameters for SPE, including type and amount of loading solvents, washing solution and eluent.  
239 Acetonitrile and acetonitrile:methanol at different ratios were assayed as conditioning, loading  
240 and washing solutions. Methanol-acetic acid 1 N mixtures were evaluated as eluents. From the  
241 obtained results, it was found that acetonitrile used as conditioning, loading and washing solvent  
242 provided the higher differences between MIP and NIP cartridges in terms of recovery, and  
243 worked more efficiently under the following conditions: conditioning (5x2 mL), loading (1 mL)  
244 and washing (2x2 mL), for the three polymers tested. The use of 3x2 mL of MeOH: acetic acid 1  
245 N (99.4:0.6 v/v) was necessary to ensure the complete extraction of AMP from the MISPE  
246 column. These results evidence that MIPs exhibit the best molecular recognition in the  
247 polymerization solvent (Tokonami et al, 2009) Figure 1 shows the binding data of MIPs and  
248 NIPs obtained in these assays. The amount of AMP bound to MIP or NIP was calculated by the  
249 difference between AMP total amount initially loaded onto the cartridge and the amount of AMP  
250 present in the extracts from loading and washing steps. It was observed low AMP recoveries for  
251 MIP1 and MIP2 (39 and 4 %, respectively) and their corresponding NIPs (19 and 3 %,  
252 respectively). MIP 3 (MIP containing 100 % MAA) provided the highest selectivity binding to

253 AMP, obtaining a recovery of 100 %, and from NIP3 was obtained a recovery of 7.2 %. The  
254 great difference between the amount of analyte bound to MIP3 and NIP3 exhibits high specific  
255 interactions between the template and the MIP. Therefore, MAA was used as monomer for  
256 further experiments. According to the literature, methacrylic acid has usually been adopted as  
257 functional monomer since carboxyl group functions as a hydrogen donor and a hydrogen  
258 acceptor at the same time, and the imprinted molecules interact, during both the imprinting  
259 procedure and the rebinding, with the polymer via non-covalent interactions (ionic, hydrophobic  
260 and hydrogen bonding), and are easily reversed facilitating the removal of the template molecule  
261 from the network after polymerization (Hongyuan, Y and Kyung H, 2006).

262 The mechanical stability and integrity of the polymer matrix are important in the design of a SPE  
263 sorbent. These factors, characteristic of the network, are depend on the crosslinking ratio.

264 The degree of crosslinking plays an important role in the mechanical stability and integrity of the  
265 polymer matrix and also the molar ratio of the functional monomers to the crosslinker must be  
266 taken into consideration, since the functional cavities must be sufficiently spaced to allow the  
267 individual binding pockets to swell. If the amount of the crosslinking is too little, the template  
268 cavities formed in the polymer will be too close to each other, creating a larger, less recognitive  
269 pore (Pichon and Chapuis-Hugon, 2008). Therefore, a series of polymer with different  
270 crosslinking ratio using MAA as functional monomer were prepared in order to get an  
271 appropriate polymer to act as selective SPE sorbent for AMP determination (Polymers 3-6, Table  
272 1). Binding experiments were carried out in terms of AMP recoveries. From the obtained results,  
273 it was found than an increment of crosslinker in the polymerization mixture provides higher  
274 binding percentage (Table 2). Then, MIP3 with higher crosslinking ratio (MAA/EGDMA 1:5)  
275 presented the best recognizing properties, yielding the highest percentage of recovery of the

276 antibiotic, since a high amount of crosslinker enables the microcavities to maintain three-  
277 dimensional structure complementary in both shape and chemical functionality to that of the  
278 template after removal of the template, and thus, the functional groups are held in an optimal  
279 configuration for rebinding the template, allowing the receptor to 'recognize' the original  
280 substrate (Hongyuan, Y and Kyung H 2006).

281

### 282 *3.2 FT-IR analysis of the polymers*

283 The FT-IR spectra of the synthesized MIPs and NIPs were recorded in the range of 500–  
284 4000  $\text{cm}^{-1}$  by KBr pellet method. Figure 2 shows the FT-IR spectra of the Polymers 1, 2 and 3  
285 after removal of the template (MIP washed). The three polymers show a broad band  
286 between 1100 -1200  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the stretching vibrations of -C-O-C- that could be  
287 attributed to the link of the monomer and cross-linker EGDMA. The sharp peak at 1730  $\text{cm}^{-1}$  is  
288 the characteristic peak of C=O stretch, due to C=O vibration of EGDMA. The broad peak at  
289 the range of 3300–3700  $\text{cm}^{-1}$  was related to the stretching vibrations of O—H. MIP3 shows a  
290 broadband between 2850 and 2900  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to C—H stretch (presence of COOH).  
291 This band decreases in MIP1 and MIP2 according to the amount of MAA, being the lowest in  
292 MIP1, synthesized only with MMA. As MIP3 was synthesized only with MAA as functional  
293 monomer, the COOH group is evident.

294 The FT-IR spectrum depicted in Figure 3 show the comparison of the MIPs containing different  
295 crosslinking:monomer ratio (MIP3-6). The profile of the spectrum was similar for all the  
296 polymers.

297 However, it was noted that the proportion of cross-linking decreases, when there is an increasing  
298 signal of the band corresponding to CH (COOH) at 3000  $\text{cm}^{-1}$ .

299 Figure 4 shows FT-IR spectra of ampicillin, MIP3 after and before removal the template (washed  
300 and unwashed, respectively) and NIP3. It can be seen that spectrum of MIPs and NIP are similar,  
301 indicating similarity in the structure of the network. In the IR spectrum, there are absorptions due  
302 to OH stretch of carbonyl ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ), stretch of the carbonyl group ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ),  
303  $\text{CO stretch}$  ( $1260\text{ cm}^{-1}$ ), and vibration CH ( $756$ ,  $1390$ ,  $1460$  and  $2956\text{ cm}^{-1}$ ).  
304 In  $2990$  and  $2956\text{ cm}^{-1}$ , are the stretching vibrations of CH band at  $1454\text{ cm}^{-1}$  appears to be  
305 due to  $-\text{CH}_2-$ , and the band in  $1389\text{ cm}^{-1}$  may be due to  $\text{CH}_3$ . Likewise, it was also identified  
306 similarities between the spectrum of template and MIP3 unwashed mainly in the CN and  
307 CC bonds ( $500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ). After washing, the spectra of the MIP are comparable to the NIP  
308 (white polymer), which indicates that the entire template was removed from the MIP unwashed.  
309 This similitude was found in all polymers evaluated. All signals suggested that AMP-MIPs were  
310 successfully synthesized. Similar results were obtained by Santos et al. (2009), they found that  
311 the IR spectrum of unleached-MIP was very similar to that of the leached-MIP, indicating  
312 molecular structure similarity. In molecularly imprinted polymers for the selective recognition of  
313 4-aminophenol, Li et al (2008) also found that exists similarity in both the spectra of template  
314 and the precursor, in a MIP prepared using Boc-L-Phe-OH as a template. After washing, the  
315 spectrum of the MIP becomes comparable to that of the blank polymer, and Pereira et al (2014),  
316 in MIPs synthesized based in 1-vinyl-2-pyrrolidone as monomer and divinylbenzene as  
317 crosslinker, found in general, that the FT-IR spectra for all the MIPs are very similar each to  
318 other, consistent with the fact that all the products were synthesized based on same monomer and  
319 crosslinker, and also there were no significant difference between MIPs and NIPs.

320

321

### 322 3.3. MISPE optimization for milk analysis

323 The functionality of AMP-MIP3 was confirmed in these previous binding studies and its  
324 performance was compared with NIP3 simultaneously under identical conditions to prove the  
325 nonspecific binding. To obtain the best selectivity and recovery in the MISPE procedure, using  
326 MIP3, key factors influencing SPE efficiency, such as washing and elution steps were optimized.  
327 Milk is a highly complex matrix containing a great variety of compounds as proteins, sugars,  
328 lipids, that can interfere in the pre - concentration efficiency and recovery of AMP in SPE.  
329 Therefore, prior to the MISPE procedure, a pre-treatment for proteins and fat removal from the  
330 milk samples was required in order to avoid blockages in the MIP. Acetic acid 1N, acetonitrile  
331 and acetic acid 1 N:acetonitrile mixture using different volumes were tested for protein  
332 precipitant. The use of acetic acid resulted in a broad AMP peak, and recoveries of 11.5 % and  
333 100 % were obtained when 0.5 and 1 mL were used, respectively. To improve the profile  
334 chromatographic of the peak, acetonitrile was used. Low AMP recovery (15 %) and similar peak  
335 width were obtained. The mixture acetic acid 1 N: ACN (2:8 v/v) provided recoveries around 89  
336 % but not improved the analytical signal. On basis of these results, an additional step for fat  
337 removal was assayed after all the precipitation solvents tested, before AMP extraction, to  
338 improve the analytical response. Different organic solvents, such as acetonitrile or chloroform  
339 was used at different temperatures and also it was tried the MISPE washed with NaOH 0.5 M.  
340 Results were not fully satisfactory in any cases, since profile chromatographic of the peak did not  
341 improved notably nor AMP recovery (lower than 15 %). Then, only acetic acid 1N was used for  
342 protein precipitation, and it was studied the influence of the volume and temperature on AMP  
343 recovery. Using 5 mL of acetic acid and leaving the mixture at 4°C during 20 minutes resulted on  
344 a upper fat layer that was removed using a syringe and a solid protein precipitation at the bottom,

345 leaving in the middle the solution containing the analyte, that was directly placed onto MISPE  
346 column. MISPE procedure above described was applied and quantitative recovery (100 %) and a  
347 narrow peak were obtained under these conditions.

348

#### 349 *3.4. Analytical performance*

350 The analytical performance of the developed MISPE methodology was validated by the  
351 determination of linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ, using spiked samples. The  
352 linearity of the method with HPLC-UV detection was tested in a range of 100-500 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). The  
353 calibration curve obtained ( $y = -3\text{E}^{-05} x + 0.0000169$ ) showed linearity, with correlation  
354 coefficient  $R^2 = 0.9996$ . In order to achieve the detection of the maximum level of residues  
355 allowed for AMP in cow milk ( $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a preconcentration step was necessary. Thus,  
356 different volume of spiked milk sample was loaded onto the MISPE column. Using 20 mL of  
357 sample was enough to achieve quantify concentrations around MRL in the calibration curve  
358 obtained, reaching a preconcentration factor (PCF) defined as the concentration ratio of the  
359 analyte in the final extract ready for its determination and in the initial solution, of 20. The  
360 accuracy was evaluated by calculating the recovery obtained for AMP under MISPE optimized  
361 conditions using 20 mL of spiked milk samples at three concentration levels corresponding to 80,  
362 100 and 120 % of MRL established by EU ( $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ): low level ( $3,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), medium level  
363 ( $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and high level ( $4,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Residues obtained were analyzed by HPLC-UV in  
364 quintuplicate. Recoveries were higher than 95% and their corresponding relative standard  
365 deviations (RSD) were less than 7 %. The limit of detection and the quantification limit for the  
366 solution, calculated as Guidance for Industry of FDA (2011) were 10.7 and 35.8 ( $\mu\text{g/L}$ ).

367

### 368 3.5. Selectivity study

369 The molecular imprinting technique allows the design of new artificial materials of specific  
370 recognition. After removal of template molecule, MIP shows a high selectivity to the imprinted  
371 molecules due to the arrangement of the functional groups of the monomer units around the  
372 imprinted molecules. In order to verify the selectivity of MISPE toward AMP, other  $\beta$ -lactam  
373 antibiotics with similar chemical structures as competitive molecules: amoxicillin (AMOX),  
374 oxacillin (OXA), and penicillin G (PEN-G) were examined. For interference studies, recoveries  
375 of  $\beta$ -lactams antibiotics at concentration levels of 1 ppm were tested by procedure developed for  
376 the MISPE. The values found were 21.8 % for AMOX, 33.3 % for OXA and 15.4 % for PEN-G  
377 and for AMP 110 %. The results demonstrated that the MIP-SPE column exhibited specific  
378 selectivity for AMP in the presence of other structurally related compounds.

379

### 380 4. Conclusion

381 An HPLC-UV method for the selective and effective preconcentration and determination of  
382 AMP using a MIP as SPE sorbent has been developed. Several MIPs have been synthesized and  
383 characterized by binding and FT-IR studies. The optimal MIP has been used as sorbent of SPE  
384 (MISPE) column and applied for the selective preconcentration of AMP from cow milk samples.  
385 Molecular recognition specificity of the MIP using structurally similar compounds exhibited a  
386 highest selective rebinding to AMP. The developed method allows the quantification of AMP in  
387 complex samples as milk at the concentration levels required by legislation. It is the first time  
388 until now that a selective MIP for preconcentration of AMP has been synthesized and applied to  
389 milk samples, offering an alternative for AMP determination using a simple instrumentation  
390 present in most common analytical laboratories.



391

392 **Acknowledgements**

393 Authors thank Comunidad Autónoma of Madrid and European funding from FEDER programme  
394 (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL).

395

396

397 **References**

398

399 Ángeles, J., Ávila, S., Rosiles, R & Fuentes, V. (2012). Detección de Rafaximina en la leche de  
400 vacas lecheras utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). *Revista*  
401 *Científica*, FCV-LUZ, XXII (2), 112-119.

402

403 Bai, J.-W., Zhong, F.-C., Liu, X.-Y & Zhang, J.-H. (2014). Preparation and evaluation of  
404 magnetic imprinted polymers for 2, 4, 6-trinitrotoluene by surface imprinting. *Polym. Int.*,  
405 *63*, 1487–1493.

406

407 Bailón-Pérez, M., García-Campaña, A., del Olmo-Iruela, M., Gámiz-Gracia, L. & Cruces-  
408 Blanco, C. (2009). Trace determination of 10 beta-lactam antibiotics in environmental  
409 and food samples by capillary liquid chromatography. *J Chromatogr A*. *1216* (47), 8355-  
410 61.

411

412 Benito-Peña, E, Moreno-Bondi, M., Orellana, G., Maquieira, A. & van Amerongen, A., (2005).  
413 Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of beta-  
414 lactam antibiotics. *J Agric Food Chem*, *53* (17), 6635-42.

415

416 Cámara, M., Gallego-Picó, A., Garcinuño, RM., Fernández-Hernando, P., Durand-Alegría, JS.,  
417 & Sánchez, PJ. (2013). An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of  
418 nine  $\beta$ -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chem*. *141* (2), 829-834.

419  
420 Campbell, D. Pethrick, R. & White, J. Polymer characterization: physical techniques. Stanley  
421 Thornes, Ltd. United Kingdom. (2000). 67-107.  
422  
423 Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A. & Puchades, R. (2010). *Trends in Analytical Chemistry*. 29  
424 (9), 1038-1049.  
425  
426 COMMISSION REGULATION 508/1999/EC. Amending Annexes I–IV to Council Regulation  
427 (EEC) No 2377/90 laying down Community procedure for the establishment of  
428 maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal  
429 origin. *Off. J Eur. Commun. L224*, 16. (1999).  
430  
431 Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Decisión de la Comisión 2002/657/EC, relativa a la  
432 aplicación de la Directiva 96/23/EC en cuanto al funcionamiento de los métodos  
433 analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE número L221, 17/8/2002.  
434  
435 EU Nº 37/2010 (Comisión Regulatoria de la Unión Europea)  
436  
437 Food and Drug Administration. (2011). Guidance for Industry. Studies to evaluate the  
438 metabolism and Residue Kinetics of veterinary Drugs in Food-Producing Animals:  
439 Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies. VICH GL49. U.S  
440 Department of Health and Human Services. Center of Veterinary Medicine. September  
441 15.  
442 <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207942.pdf>  
443  
444  
445 Gatica, C & Gesche, E. (2007). Método de las 5 placas para la detección de residuos de  
446 Antibacterianos en Leche. *Rev. Cient.* 17 (3), 231-238. Available in:  
447 <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000300004&lng=es&nrm=iso)  
448 [22592007000300004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000300004&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0798-2259.  
449

450 Guo, L. J., Qu, J. R., Miao, S. S., Geng, H. R. & Yang, H. (2013). Development of a molecularly  
451 imprinted polymer for prometryne clean-up in the environment. *J. Sep. Science.* 36, 3911-  
452 3917.

453

454 Hongyuan, Y & Kyung H. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly  
455 Imprinted Polymer. *Int. J. Mol. Sci.* 7, 155-178.

456

457 Junfa, Y., Zihui, M., Mingjun, D., Cong, L., Maoyong, S. & Hailin, W. (2010). Pseudo-template  
458 molecularly imprinted polymer for selective screening of trace  $\beta$ -lactam antibiotics in  
459 river and tap water. *Journal of Chromatography A.* 1217, (33), 5420-5426.

460

461 Kantiani, L., Farré, M., Sibum, M., Postigo, C., López de Alda, M., & Barceló, D. (2009).  
462 Fully Automated Analysis of  $\beta$ -Lactams in Bovine Milk by Online Solid Phase  
463 Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Anal.*  
464 *Chem.*, 81 (11), 4285–4295.

465

466 Li, S.; Huang, X.; Zheng, M.; Li, W, & Tong, K. (2008). Molecularly Imprinted Polymers:  
467 Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular  
468 Recognition. *Sensors*, 8, 2854-2864.

469

470 Liu, Z., Bucknall, D. & Allen, M. (2010). Absorption performance of iodixanol-imprinted  
471 polymers in aqueous and blood plasma media. *Acta Biomaterialia*, 6, 2003 -2012.

472

473 Marín, M & Gudiol, F. (2003). Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21(1),  
474 42-55.

475

476 Pereira, E., Cáceres, C., Rivera, F., Rivas, B & Sáez, P. (2014). Preparation of molecularly  
477 imprinted polymers for diphenylamine removal from organic gunshot residues. *Journal of*  
478 *the Chilean Chemical Society.* 59 (4), 2731-2736.

479

480 Philip, J., Buchweishaija, J., Mkyula, L & Ye, L. (2007). Preparation of Molecularly Imprinted  
481 Polymers Using Anacardic Acid Monomers Derived from Cashew Nut Shell Liquid. *J.*  
482 *Agric. Food Chem.*, 55 (22), 8870-8876.  
483

484 Pichon, V & Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective  
485 determination of environmental pollutants--a review. *Anal Chim Acta.* 622 (1-2), 48-61.  
486

487 Pikkemaat, M. (2009). Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in  
488 slaughter animals. *Anal Bioanal Chem.* 395 (4), 893–905.  
489

490 Roca, M., Castillo, M., Marti, P., Althaus, R., & Molina, M. (2010). Effect of Heating on the  
491 Stability of Quinolones in Milk. *J. Agric. Food Chem.* 58 (9), 5427–5431.  
492

493 Santos, W., Lima, P., Tarley, C., & Kubota, L. (2009). Synthesis, characterization and kinetics of  
494 catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-  
495 aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 20 (5) [cited 2010-09-22], 820-825.  
496

497 Sellergren, B. & Lanza, F. Molecularly imprinted polymers: An-made mimics of antibodies and  
498 their applications in analytical chemistry. *Techniques and instrumentation in analytical*  
499 *chemistry*, vol. 23. Cap 15. Elsevier. Amsterdam, (2001), 355-373.  
500

501 Seymour, R. & Carraher, C. Introducción a la química de los polímeros. Editorial Reverté, SA.  
502 España. (2002), 121-179.  
503

504 Sijun, Z., Haiyang, J., Xuelian, L., Tiejun, M., Cun, L., & Jianzhong, S. (2007). Simultaneous  
505 Determination of Trace Levels of 10 Quinolones in Swine, Chicken, and Shrimp Muscle  
506 Tissues Using HPLC with Programmable Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.*  
507 55 (10), 3829-3834.  
508

509 Song, X., Xu, S., Chen, L., Wei, Y. and Xiong, H. (2014), Recent advances in molecularly  
510 imprinted polymers in food analysis. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, 40766.

511  
512 Tokonami, S., Shiigi, H. & Nagaoka, T. (2009). Review: Micro- and nanosized molecularly  
513 imprinted polymers for high-throughput analytical applications. *Analytica Chimica Acta*.  
514 *641*, 7-13.  
515  
516 Tona, G & Olusola, A. (2014). Determination of tetracycline antibiotic residue in dairy products  
517 sold in Ogbomoso, South-Western Nigeria. *International Journal of Food, Agriculture*  
518 *and Veterinary Sciences*. *4* (1), 136-140.  
519  
520 United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 30-NF 25). Vol 2. Rockville, MD:  
521 United States Pharmacopeia Convention. (2007), 1410.  
522  
523 Yan, H & Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted  
524 Polymer. *Int J. Mol. Sci.* *7*, 155-178.  
525  
526 Zakaria, N., Yusof, N., Haron, J & Abdullah, A. (2009). Synthesis and evaluation of a  
527 molecularly imprinted polymer for 2, 4-dinitrophenol. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 354-365.  
528  
529 Zhang X, Chen L, Xu Y, Wang H, Zeng Q, Zhao Q, Ren N & Ding L. (2010). Determination of  
530  $\beta$ -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction  
531 coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of*  
532 *Chromatography B*, *878* (32), 3421–3426.  
533  
534 Zhao, C., Dai, J., Zhou, Z., Dai, X., Zou, Y., Yu, P., Zou, T., Li, C. & Yan, Y. (2014). One-pot  
535 method for obtaining hydrophilic tetracycline-imprinted particles via precipitation  
536 polymerization in ethanol. *J. Appl. Polym. Sci.* *131*, 40071- 40081.  
537  
538  
539  
540

541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
  
566  
  
567  
  
568  
  
569  
  
570  
  
571  
  
572

**FIGURE CAPTIONS**

Figure 1. Binding experiments in terms of AMP recoveries comparing the use of different functional monomer during polymerization process.

Figure 2. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional monomers (MIP1: MMA, MIP2: MAA/MMA, 1:1, MIP3: MAA) after template removal.

Figure 3. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional monomers:crosslinker ratio after template removal.

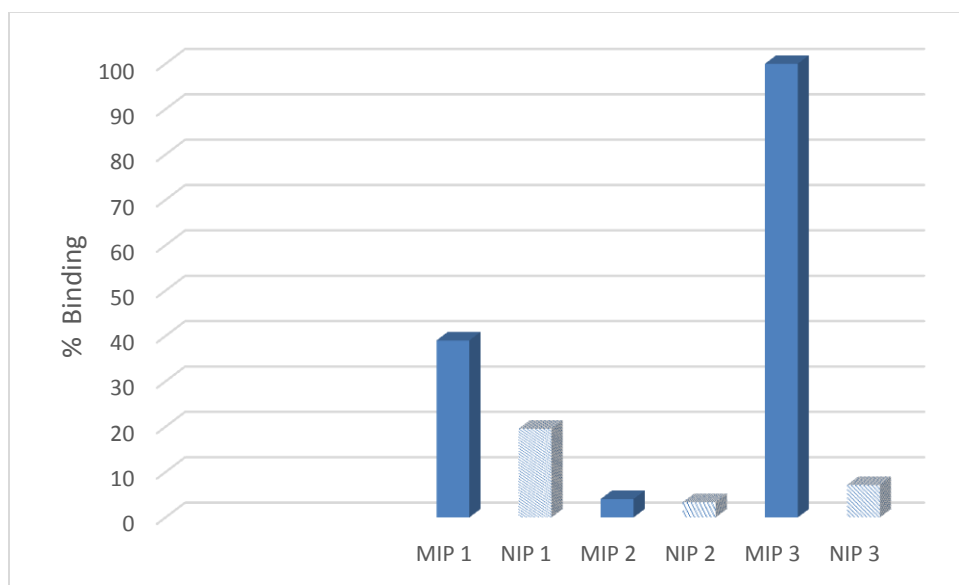
Figure 4. FT-IR spectra of ampicillin, MIP3 after and before removal the template (washed and unwashed, respectively) and NIP3.

Table 1. Composition of the synthesized molecularly imprinted polymers (molar ratio).

Table 2. Binding studies in terms of AMP recoveries from a series of polymer containing different degree of crosslinker.

573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590

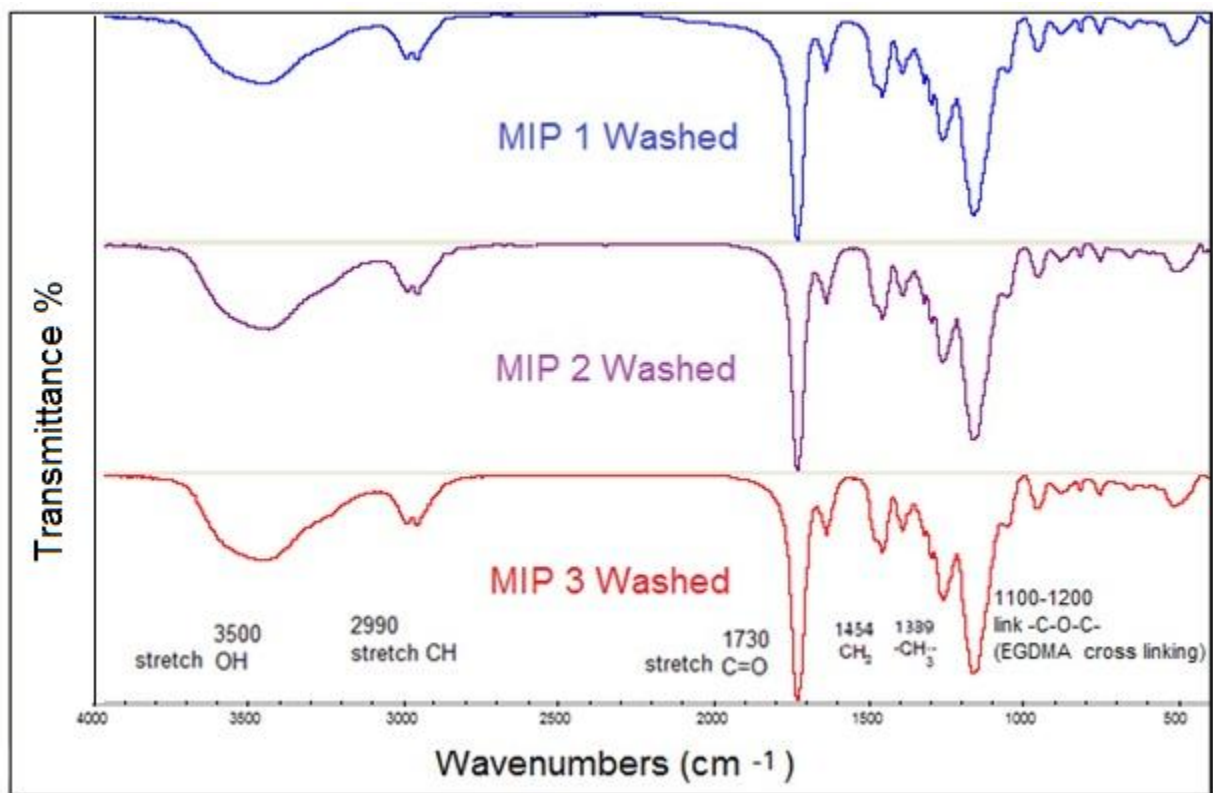
### FIGURES



591  
592  
593  
594  
595  
596  
597

Figure 1. Binding experiments in terms of AMP recoveries comparing the use of different functional monomer during polymerization process.

598  
599

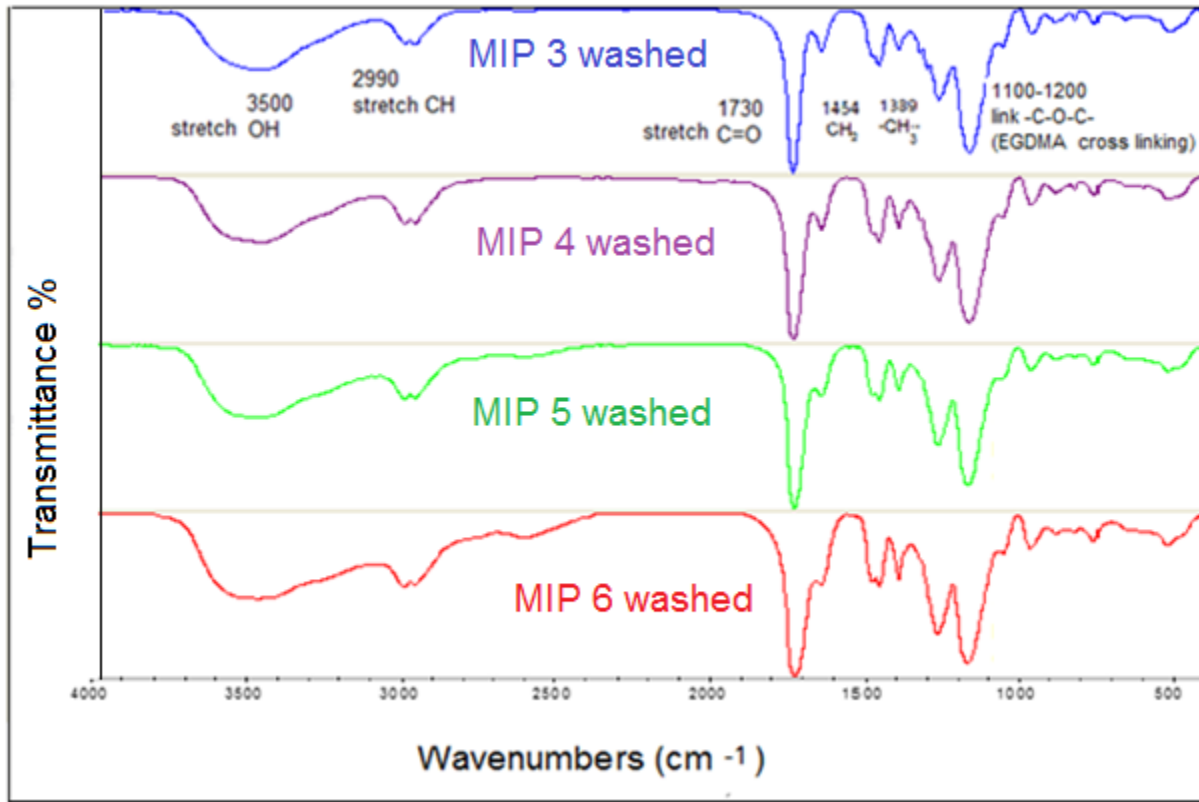


600  
601 Figure 2. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional monomers  
602 (MIP1: MMA, MIP2: MAA/MMA, 1:1, MIP3: MAA) after template removal.  
603

604  
605



606



607

608

609 Figure 3. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional  
610 monomers:crosslinker ratio after template removal.

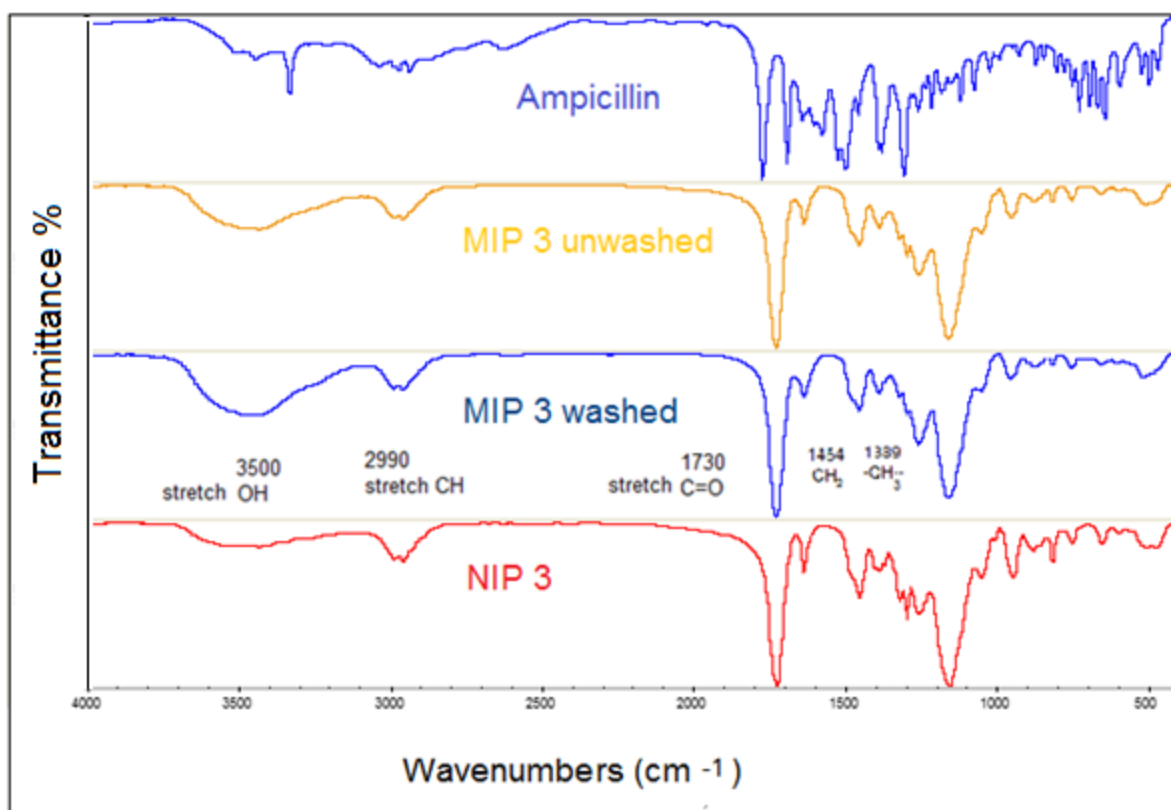
611

612

613

614

615



616  
 617 Figure 4. FT-IR spectra of ampicillin, MIP3 after and before removal the template (washed and  
 618 unwashed, respectively) and NIP3.

619  
 620  
 621  
 622  
 623  
 624  
 625  
 626  
 627  
 628

## TABLES

Table 1. Composition of the synthesized molecularly imprinted polymers (molar ratio).

Polymer code	Template	Functional monomer		Crosslinker EGDMA
		MAA	MMA	
1	1	--	100	500
2	1	50	50	500
3	1	100	--	500
4	1	100	--	200
5	1	100	--	100
6	1	100	--	50

Table 2. Binding studies in terms of AMP recoveries from a series of polymer containing different degree of crosslinker.

Polymer	Monomer/Crosslinker ratio	Binding %
MIP 3	1:5	100.00
MIP 4	1:2	50.49
MIP 5	1:1	22.33
MIP 6	1:0.5	17.60

1 Table 1. Composition of the synthesized molecularly imprinted polymers (molar ratio).  
2

Polymer code	Template	Functional monomer		Crosslinker EGDMA
		MAA	MMA	
1	1	--	100	500
2	1	50	50	500
3	1	100	--	500
4	1	100	--	200
5	1	100	--	100
6	1	100	--	50

3

4

5

1 Table 2. Binding studies in terms of AMP recoveries from a series of polymer containing  
2 different degree of crosslinker.

3

4

Polymer	Monomer/Crosslinker ratio	Binding %
MIP 3	1:5	100.00
MIP 4	1:2	50.49
MIP 5	1:1	22.33
MIP 6	1:0.5	17.60

5

6

7

8

9

10

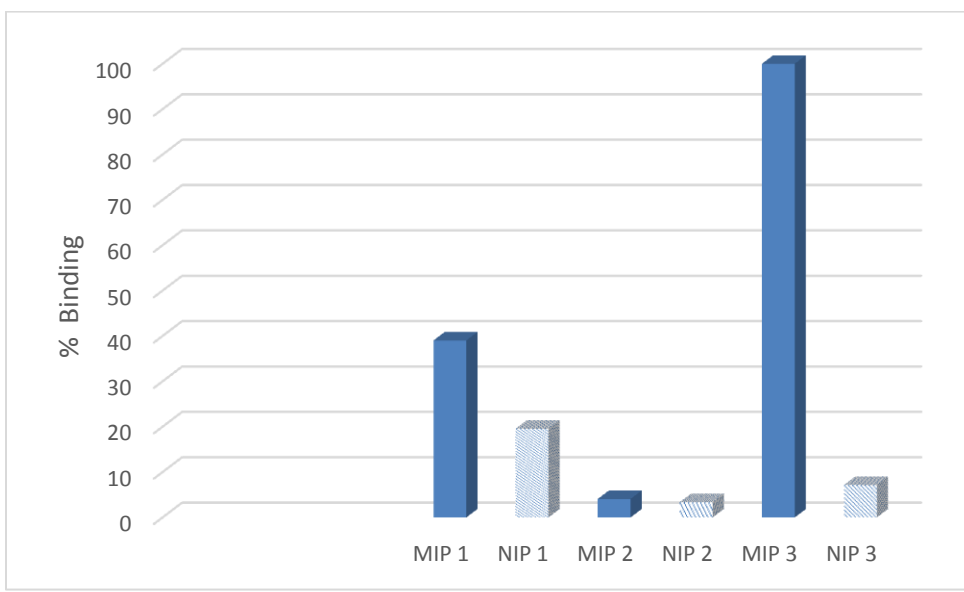
11

12

13

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

**FIGURE 1**



13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

Figure 1. Binding experiments in terms of AMP recoveries comparing the use of different functional monomer during polymerization process.

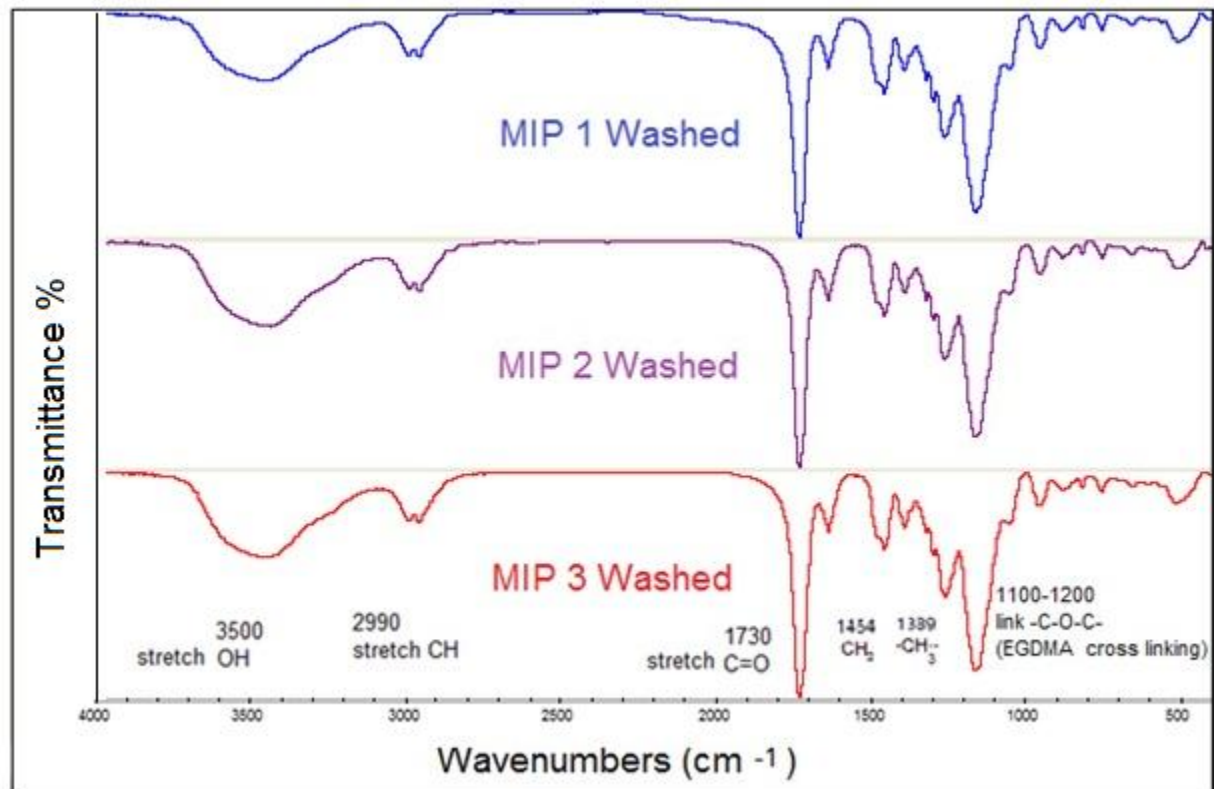
1 **FIGURE 2**2  
34  
5  
6  
7  
8

Figure 2. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional monomers (MIP1: MMA, MIP2: MAA/MMA, 1:1, MIP3: MAA) after template removal.

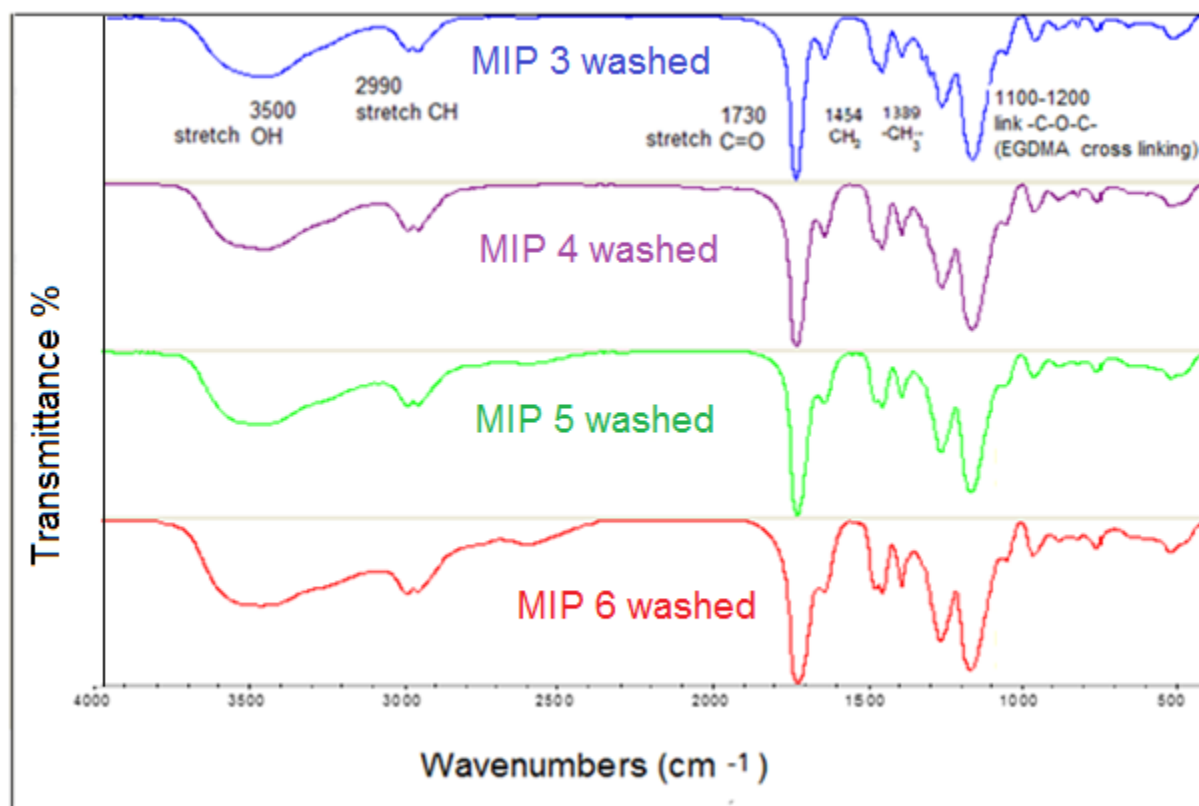
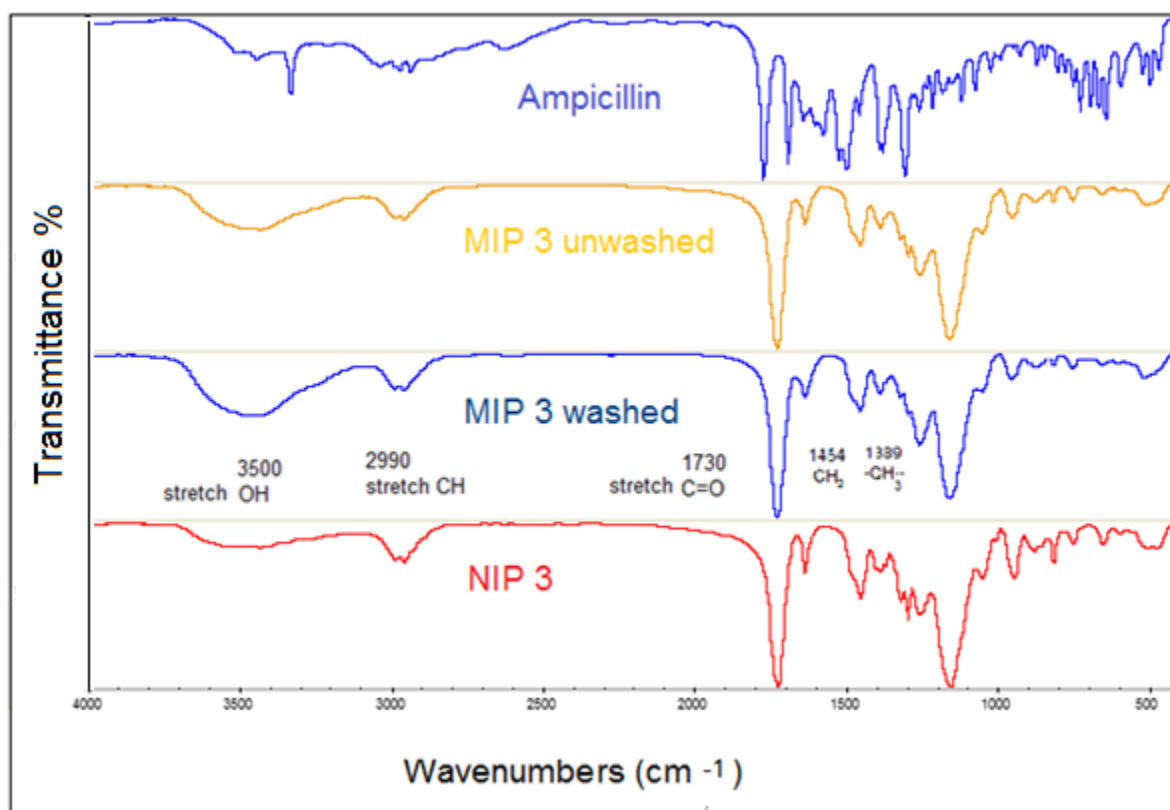
1 **FIGURE 3**2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
1011  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

Figure 3. Comparison of FT-IR spectra of MIPs synthesized using different functional monomers:crosslinker ratio after template removal.



1 **FIGURE 4**2  
3  
4  
5

6

7 Figure 4. FT-IR spectra of ampicillin, MIP3 after and before removal the template (washed and  
8 unwashed, respectively) and NIP3.

9

10

11

12

13

14

15



## ANEXO II

---

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS



---

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMPICILINA.**

Soledad, B., Garcinuño, R., Fernández, P y Durand, J. S.

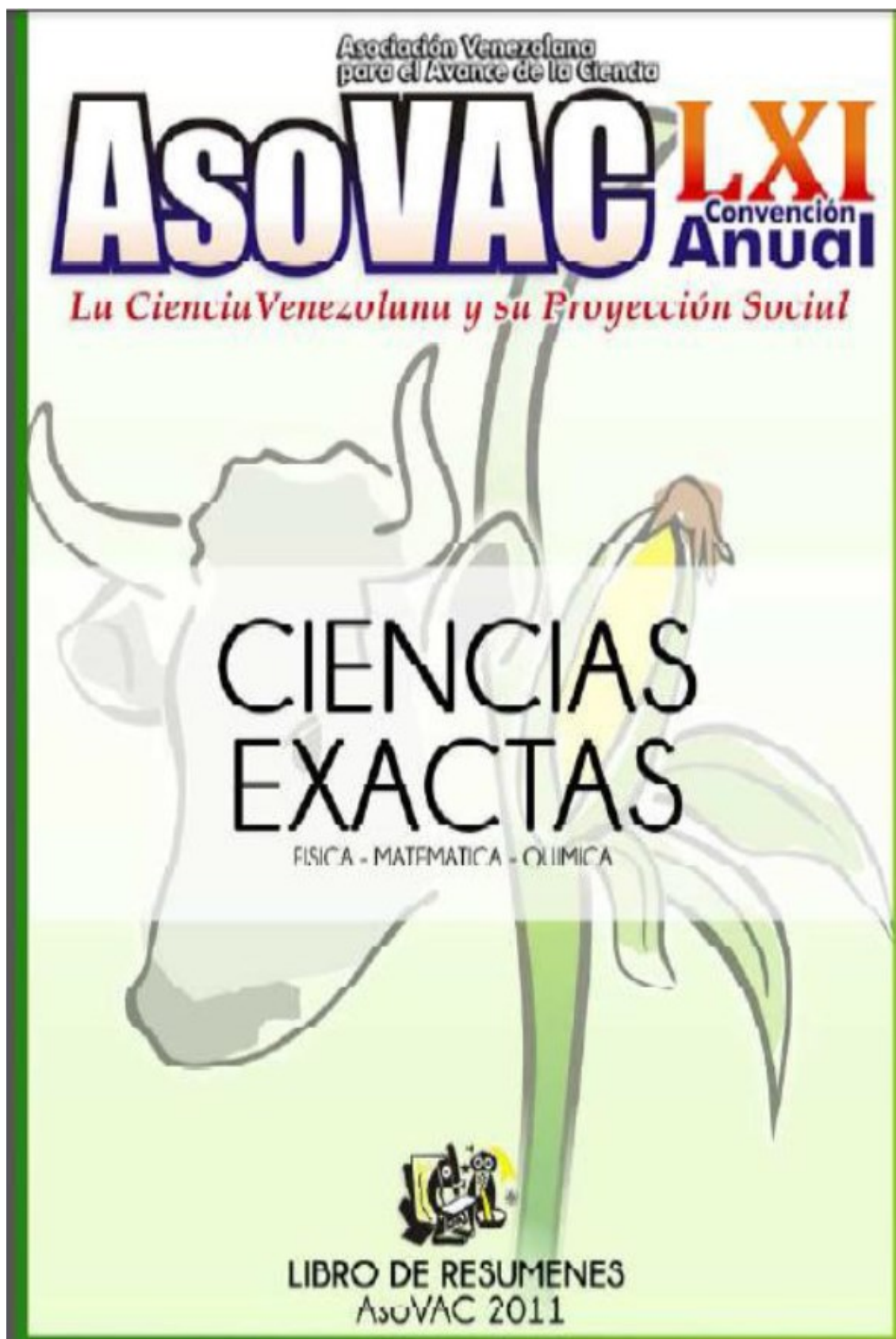
**LXI Convención anual ASoVAC.** *Acta Científica Venezolana*. Maracay, Venezuela. Noviembre. (2011)

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE AMPICILINA EN LECHE DE VACA COMPLETA PARA SU ANÁLISIS POR HPLC UTILIZANDO POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS EN CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Soledad, B., Garcinuño, R., Fernández, P y Durand, J. S.

**LXI Convención anual ASoVAC.** *Acta Científica Venezolana*. Maracay, Venezuela. Noviembre. (2011).









Bruzual mostró que se compone principalmente de  $\beta$ -cariofileno (33,70%) y  $\gamma$ -elemeno (23,52%). El óxido de cariofileno se encontró presente en las muestras de Cocorote, Sucre y Bruzual en una composición relativa de 0,44%, 1,11% y 1,83% siendo este componente químico el responsable de inhibir completamente el crecimiento fúngico; por otro lado el hecho de que las tres diferentes muestras tengan en común felandreno como uno de sus componentes en un porcentaje de 0,64% hasta 2,12% le da a todas un poco de un olor blando, especiado, aromático y picante, dicho componente químico es el mismo terpeno predominante en la pimienta. El análisis del componente principal de los datos de concentración del total de compuestos mostró diferencias en la composición química de acuerdo al origen geográfico, la distancia entre estas aéreas de recolección podría ser una de las causas de esta variabilidad debido a la falta de intercambio genético entre estas malezas; otra de las posibles causas de esta variación en la composición química es la composición del suelo, el clima, la incidencia de la luz solar, las prácticas culturales, infección de la maleza y las técnicas de cosechas.

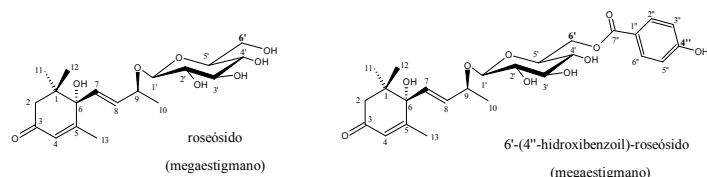
Palabras clave: aceite esencial, cariofileno, *Hyptis suaveolens*, mastranto.

### ASILAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL 6'-(4''-HIDROXIBENZOIL)-ROSEÓSIDO A PARTIR DE *Ourotea polyantha* Engl. (Ochnaceae) Y SU EFECTO SOBRE LA GLUCOSA 6-FOSFATASA

(Isolation and characterization of 6'-(4''-hydroxybenzoyl)-roseoside from *Ourotea polyantha* Engl. (Ochnaceae) and its effect on glucose-6-phosphatase) J. Bermúdez,<sup>1</sup> M. Rodríguez,<sup>1</sup> S. Duque,<sup>2</sup> F. González-Mujica<sup>2</sup> y M. Hasegawa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 47102. Caracas, Venezuela  
<sup>2</sup> Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 5058. Caracas, Venezuela

maria.rodriguez@ciens.ucv.ve y freddygonzalezmujiaca@gmail.com

El aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios provenientes de plantas y el estudio de su posible efecto biológico es de especial importancia. En el presente trabajo se purificó un norsequiteno que no había sido descrito anteriormente, del tipo megastigmano, que presenta un porcentaje de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa menor que la floricina. En el proceso de purificación del compuesto mencionado se utilizó la cromatografía contracorriente, con el sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ -*n*-BuOH-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ ; (4:0,5:3:2; v/v/v), seguida de cromatografía en columna, empleando la mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH; (98:2; v/v). Utilizando los espectros de MS, UV-Vis, IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, DEPT-135, HMQC, HMBC, COSY y NOESY identificamos al compuesto aislado como 6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido. Los efectos del megastigmano aislado sobre la glucosa 6-fosfatasa se ensayó utilizando microsomas intactos y rotos con 5 mM de glucosa 6-fosfato como sustrato; se usó 50  $\mu\text{M}$  floricina como control positivo. A 0,2 mM de 6'-(4''-hidroxibenzoil)-roseósido produjo una inhibición del 13,7%, en comparación al 27,8% de inhibición obtenido con floricina, de la enzima en microsomas intactos sin afectar la actividad cuando los microsomas se rompen mediante el uso de histonas, resultados que sugieren que el compuesto afecta al transportador T1 de la glucosa 6-fosfatasa. Vale la pena mencionar que el compuesto roseósido ejerció una inhibición del 58,5% de la enzima en los microsomas intactos, sugiriendo que la presencia de el sustituyente 4''-hidroxibenzoil ejerce un efecto negativo en la actividad biológica.



Palabras Claves: Hidroxibenzoil, *Ourotea polyantha* Engl. Glucosa Fosfatasa

### SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMPICILINA

(Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers for ampicillin identification)

B. Soledad<sup>1</sup>, R. Garcinuño<sup>2</sup>, P. Fernández<sup>2</sup>, J.S. Durand<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Universidad Católica Andrés Bello

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Educación a Distancia, España  
 bsoledad@ucab.edu.ve

Existe un marcado interés en la búsqueda de productos de elevada calidad para la alimentación humana, sin embargo los productos empleados para mejorar la calidad de los alimentos pueden dar lugar a la aparición de residuos que resultan altamente nocivos para la salud, motivando esto la utilización adecuada de métodos analíticos existentes, así como la implantación de nuevas tecnologías de análisis para su detección. La presencia de antibióticos en alimentos puede traer

consecuencias indeseables tales como el desencadenamiento de procesos alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, desarrollo de organismos patógenos resistentes, por lo que su análisis es de vital importancia. En este trabajo se sintetizaron y evaluaron diferentes polímeros molecularmente impresos para la identificación de ampicilina, utilizando diversas proporciones de ácido metacrílico y metacrilato de metilo como monómeros funcionales, etilenglicol dimetacrilato como monómero entrecruzante y ampicilina como molécula molde, mediante polimerización por el modelo de impresión no covalente. Los polímeros desarrollados fueron caracterizados por espectroscopia FT-IR. Se evaluó la capacidad de los polímeros de retener la molécula molde, desarrollando cartuchos MISPE y analizando el extracto obtenido por HPLC. Se concluye que el polímero molecularmente impreso utilizando como monómero funcional al ácido metacrílico presentó la mayor afinidad por la molécula molde. En la medida en que se disminuyó la proporción del monómero entrecruzante, la capacidad de retención del polímero disminuye y el tiempo de análisis aumenta considerablemente. En la caracterización de los polímeros por espectroscopia FT-IR, se observa que existe una semejanza en la estructura de la red entre el polímero molecularmente impreso y el utilizado como blanco (polímero no impreso), asimismo se obtuvo la polimerización con el entrecruzante por la aparición del pico C-O en todos los polímeros estudiados y la disminución del enlace  $\text{C}=\text{C}$ .

Palabras clave: Polímeros molecularmente impresos (MIPs), ampicilina, HPLC.

### DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE AMPICILINA DE LECHE DE VACA COMPLETA PARA SU ANÁLISIS POR HPLC UTILIZANDO POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS COMO CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

(Development of an extraction system of ampicillin in whole cow's milk for analysis by HPLC using molecularly imprinted polymer cartridges as solid phase extraction)

B. Soledad<sup>1</sup>, R. Garcinuño<sup>2</sup>, P. Fernández<sup>2</sup>, J.S. Durand<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Católica Andrés Bello

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Educación a Distancia, España  
 bsoledad@ucab.edu.ve

La extracción en fase sólida basada en polímeros molecularmente impresos es una nueva técnica utilizada para el análisis de muestras del medioambiente, de alimentos y bioanalíticas y se denomina con las siglas en inglés MISPE (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction). El análisis de un compuesto en mezclas complejas frecuentemente requiere diversos pasos de pre-tratamiento. Si el analito está presente en baja concentración, es necesario que este sea concentrado para poderlo detectar por técnicas analíticas estándares. Por otra parte, si este está presente en una mezcla compleja de compuestos similares, es necesario un paso que involucre su limpieza. La leche completa de vaca es una matriz biológica compleja, conformada por proteínas, carbohidratos, ácidos grasos que a menudo afectan la separación de los compuestos de interés analítico y que por otra parte pueden reducir considerablemente la vida de las columnas cromatográficas, dañar los inyectores, detectores y otras partes del equipo cromatográfico. Por este motivo es necesario hacer un enfoque especial en la preparación de muestras en lo que se refiere a la extracción y limpieza de las mismas. En este trabajo se sintetizó un polímero molecularmente impreso para la identificación de ampicilina utilizando una relación 1:5 monómero: entrecruzante, empleando ácido metacrílico como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato como monómero entrecruzante y se utilizó para desarrollar un sistema de extracción de ampicilina en leche completa de vaca. El MISPE fue evaluado para la extracción y limpieza del analito en muestras de leche de vaca completa las cuales fueron suplementadas con ampicilina, para lo que es necesario que las muestras de leche sean desproteinizadas como paso previo a la extracción y limpieza del analito. Los resultados obtenidos indican que se puede extraer la ampicilina de manera satisfactoria de una matriz compleja como la leche de vaca y analizar la muestra por HPLC.

Palabras clave: Polímero molecularmente impreso (MIP), ampicilina, HPLC.

### FIABILIDAD DE SISTEMAS DE DETECCIÓN CON SENSORES

(Reliability of detection systems with sensors)

L. Manganiello<sup>1</sup>, C. Vega<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Químicas - CIQ, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Campus de Bárbula, Valencia, Venezuela

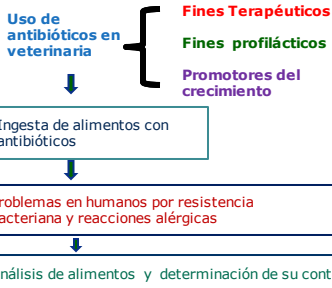
<sup>2</sup> Instituto de Matemáticas y Cálculo Aplicado - IMYCA, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Campus de Bárbula, Valencia, Venezuela  
 lmanganiello@uc.edu.ve; vega.cristobal@gmail.com

Para determinar la fiabilidad de los sistemas de detección con sensores en concentraciones cerca del límite de detección se realizó un estudio quimiométrico simple de 100 muestras estándar en niveles de concentración diferente a fin de identificar las respuestas correctas de falsos positivos y falsos negativos. Las señales de los sensores fueron filtradas mediante ondículas con el método LDM-



B. Soledad<sup>1</sup>, R.M. Garcinuño<sup>2</sup>, P. Fernández<sup>2</sup>, y J.S. Durand<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup>UCAB. Facultad de Ingeniería. Dpto. Química. Montalbán. Caracas.  
<sup>2</sup>UNED. Facultad de Ciencias. Dpto. Ciencias Analíticas. C/ Senda del Rey, 9; 28040 Madrid.

## Introducción



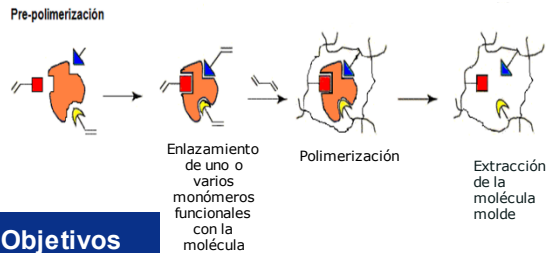
## Análisis de alimentos

En matrices complejas, es necesario el uso de técnicas de tratamiento de la muestra que tengan alta especificidad y sensibilidad

La extracción en fase sólida con polímeros de impronta molecular ofrecen esta posibilidad (MISPE)

**MIP**  
**Polímeros que poseen propiedades de reconocimiento molecular**

## Pasos principales para preparar un polímero de impronta molecular

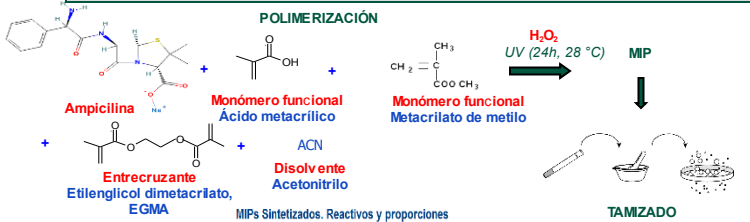


## Objetivos

- Desarrollo de un polímero molecularmente impreso o de Impronta Molecular (MIP) específico para el antibiótico utilizado como molécula molde.
- Este objetivo se puede dividir en otros más concretos:
- Síntesis y evaluación de diferentes MIPs empleando monómeros funcionales de distinta naturaleza.
  - Evaluación de la eficiencia de unión y elución de los MIPs sintetizados.
  - Preparación de cartuchos MISPE (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction).

## Desarrollo Experimental

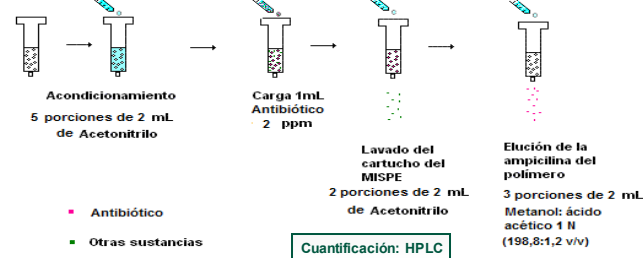
### Síntesis de los polímeros de impronta molecular



Polímero	Molécula a imprimir Ampicilina (gramos)	Monómero funcional Ácido metacrílico (mililitros)	Monómero funcional Metacrilato de metilo (mililitros)	Entrecruzante Etilenglicol dimetacrilato (mililitros)	Disolvente Acetonitrilo (mililitros)	Iniciador Peróxido de hidrógeno al 30% (mililitros)
MIP 1	0.0100	0	0.27	2.7	10	0.22
NIP 1	0	0	0.27	2.7	10	0.22
MIP 2	0.0100	0.12	0.13	2.7	10	0.22
NIP 2	0	0.12	0.13	2.7	10	0.22
MIP 3	0.0100	0.24	0	2.7	10	0.22
NIP 3	0	0.24	0	2.7	10	0.22
MIP 6	0.0100	0.24	0	1.1	10	0.22
NIP 6	0	0.24	0	1.1	10	0.22
MIP 9	0.0100	0.24	0	0.54	10	0.22
NIP 9	0	0.24	0	0.54	10	0.22
MIP 12	0.0100	0.24	0	0.27	10	0.22
NIP 12	0	0.24	0	0.27	10	0.22

NIP: Polímero no impreso utilizado como control y sintetizado bajo las mismas condiciones que el MIP pero sin molécula molde

## Método MSPE



Columna Octadecilsilano químicamente enlazado a sílica porosa

Fase móvil: agua, acetonitrilo, fosfato monobásico de potasio 1 M y ácido acético 1 N (90: 10: 1 v/v)

Diluyente: 10 mL de fosfato monobásico de potasio 1 M / 1 mL de ácido acético 1 N. Dilución con agua destilada hasta 1000 mL

Detección UV a  $\lambda$ : 254 nm

## Resultados

### Análisis por HPLC

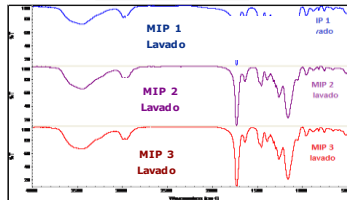
Recuperaciones de ampicilina en los MIPs estudiados

Polímero	Porcentaje de recuperación
MIP 1	61.27
MIP 2	24.03
MIP 3	96.69
MIP 6	62.33
MIP 9	24.95
MIP 12	35.80

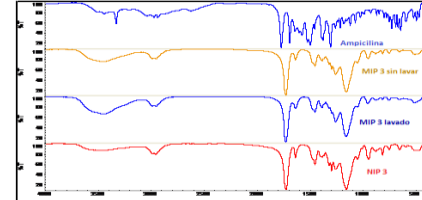
Relación de recuperaciones MIP/NIP

Polímero	Extracción ppm
MIP 1/NIP 1	180.2
MIP 2/NIP 2	28.8
MIP 3/NIP 3	151.9

### Análisis FT-IR



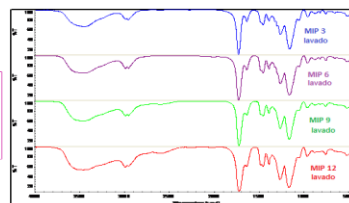
### Análisis FT-IR MIP 3



Recuperación de antibióticos betalactámicos con el MIP 3

Antibiótico	% Recuperación
Amoxicilina	16.5
Oxacilina	22.0
Penicilina G sódica	18.9
Ampicilina	96.7

MIP 3 no mostró afinidad por amoxicilina, oxacilina, y penicilina G



- Espectros FT-IR del MIP y NIP → Similares → Similitud en la estructura de la red
- Absorbancias:
  - Vibraciones de C-H (756, 1390, 1460 y 2956  $cm^{-1}$ )
  - Vibraciones de tensión del C-H → 2990 y 2956  $cm^{-1}$
  - Banda en 1454  $cm^{-1}$  → Probable -CH<sub>2</sub>-
  - Banda en 1389  $cm^{-1}$  → Probable -CH-
- Pico C=O en todos los polímeros → Polimerización del entrecruzante
- ↓ del enlace -C=C. También en espectros NIR
- Similitud entre espectro del *template* y el precursor (MIPs sin lavar) en C-N y C-C (500-1600  $cm^{-1}$ )
- Después del lavado, espectros MIP y NIP son comparables → *Template* eliminado del precursor

## Conclusiones

- El MIP3 desarrollado utilizando ácido metacrílico como monómero funcional mostró mayor afinidad hacia la ampicilina que el polímero desarrollado utilizando metacrilato de metilo o la mezcla de metacrilato de metilo y ácido metacrílico.
- Los MIPs fueron empaquetados en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE) y estos fueron evaluados y caracterizados, encontrándose las condiciones de acondicionamiento, carga, lavado y elución adecuadas para el análisis de la ampicilina.



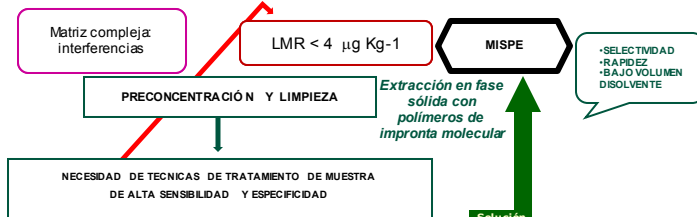
# DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE AMPICILINA EN LECHE DE VACA COMPLETA PARA SU ANÁLISIS POR HPLC UTILIZANDO POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS EN CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

B. Soledad<sup>1</sup>, R.M. Garcinuño<sup>2</sup>, P. Fernández<sup>2</sup>, y J.S. Durand<sup>2</sup>.  
<sup>1</sup> UCAB. Facultad de Ingeniería. Dpto. Química. Montalbán. Caracas.  
<sup>2</sup> UNED. Facultad de Ciencias. Dpto. Ciencias Analíticas. C/ Senda del Rey, 9; 28040 Madrid.

## Introducción



## Problemática en la determinación de ampicilina en leche de vaca

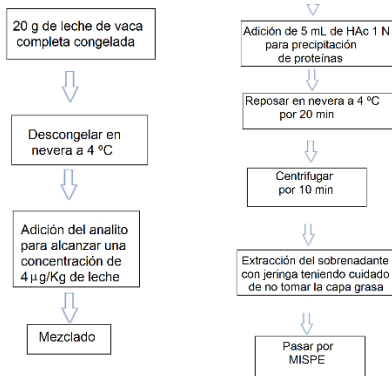


## Objetivos

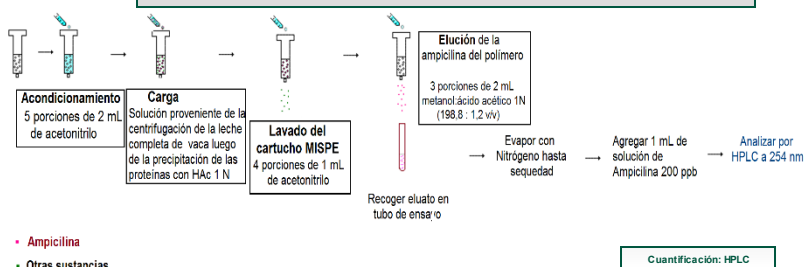
Desarrollo y validación de un método de extracción en fase sólida utilizando cartuchos MISPE para la pre-concentración de muestras para la determinación de ampicilina en leche de vaca completa, empleando la técnica de la cromatografía de líquidos (HPLC-UV)

## Desarrollo Experimental

### Proceso de extracción de la ampicilina



### Método MISPE



Columna *Octadecilsilano* químicamente enlazado a sílica porosa  
 Fase móvil: agua, acetonitrilo, fosfato monobásico de potasio 1 M y ácido acético 1 N 909: 80: 10: 1 v/v)  
 Diluyente: 10 mL de fosfato monobásico de potasio 1 M con 1 mL de ácido acético 1 N y se diluyó con agua destilada hasta 1000 mL  
 Detección UV a 254 nm

## Resultados

### Validación del método por HPLC

#### Resumen de los valores obtenidos para las diferentes concentraciones del analito

Concentración de Ampicilina	3.2 ppb	4 ppb	4.8 ppb
En la solución de elución (1 mL)	64.6	80.8	96.6
En el patrón añadido	202.0	202.0	202.0
Total esperado	266.6	282.8	298.6
Promedio obtenido	279.9	279.9	303.8
DER	6.2	6.9	4.2
Porcentaje de recuperación	104.98	98.99	101.51

DER: Desviación Estándar Relativa

### Características analíticas del método

Característica	Valores
Linealidad	$y = 0.0000169x - 3E^{-06}$ , $R^2 = 0.9996$
Precisión	DER: 6.2; 6.9 y 4.2 para 3.2; 4 y 4.8 ppb respectivamente
Exactitud	Porcentaje de error: 4.98, 1.01 y 1.61 % para 3.2; 4 y 4.8 ppb respectivamente
Especificidad	No posee afinidad frente a amoxicilina, oxacilina, penicilina G sódica y tosilito de sultamicilina
Tiempo de vida	Más de 500 análisis desde su síntesis

LOD: Límite de Detección LOQ: Límite de Cuantificación

Límite de detección y límite de determinación para la solución (Curva de calibración)

Parámetro	Valor (µg/L)
Límite de Detección (LOD)	10,75
Límite de Cuantificación (LOQ)	35,83

Pico del patrón de la ampicilina 8 ppm

Ejemplo del cromatograma de la solución de elución de la ampicilina

Curva de calibración ampicilina ppb

Es necesaria la concentración de la muestra y adición de un patrón conocido para el análisis  
 20 gramos de leche → 1 mL de solución de inyección en HPLC + 200 ppb patrón

## Conclusiones

- El método desarrollado es lineal en las concentraciones de trabajo, tiene buena precisión y exactitud, adecuado porcentaje de recuperación para las tres concentraciones evaluadas (cercasas al 100 % del LMR).
- El cartucho MISPE es específico para la ampicilina. Con relación al límite de determinación, se logró determinar cantidades de 3.2 ppb en la leche de vaca completa, cantidad esta que se encuentra en un 80 % al valor máximo de residuo permitido.

