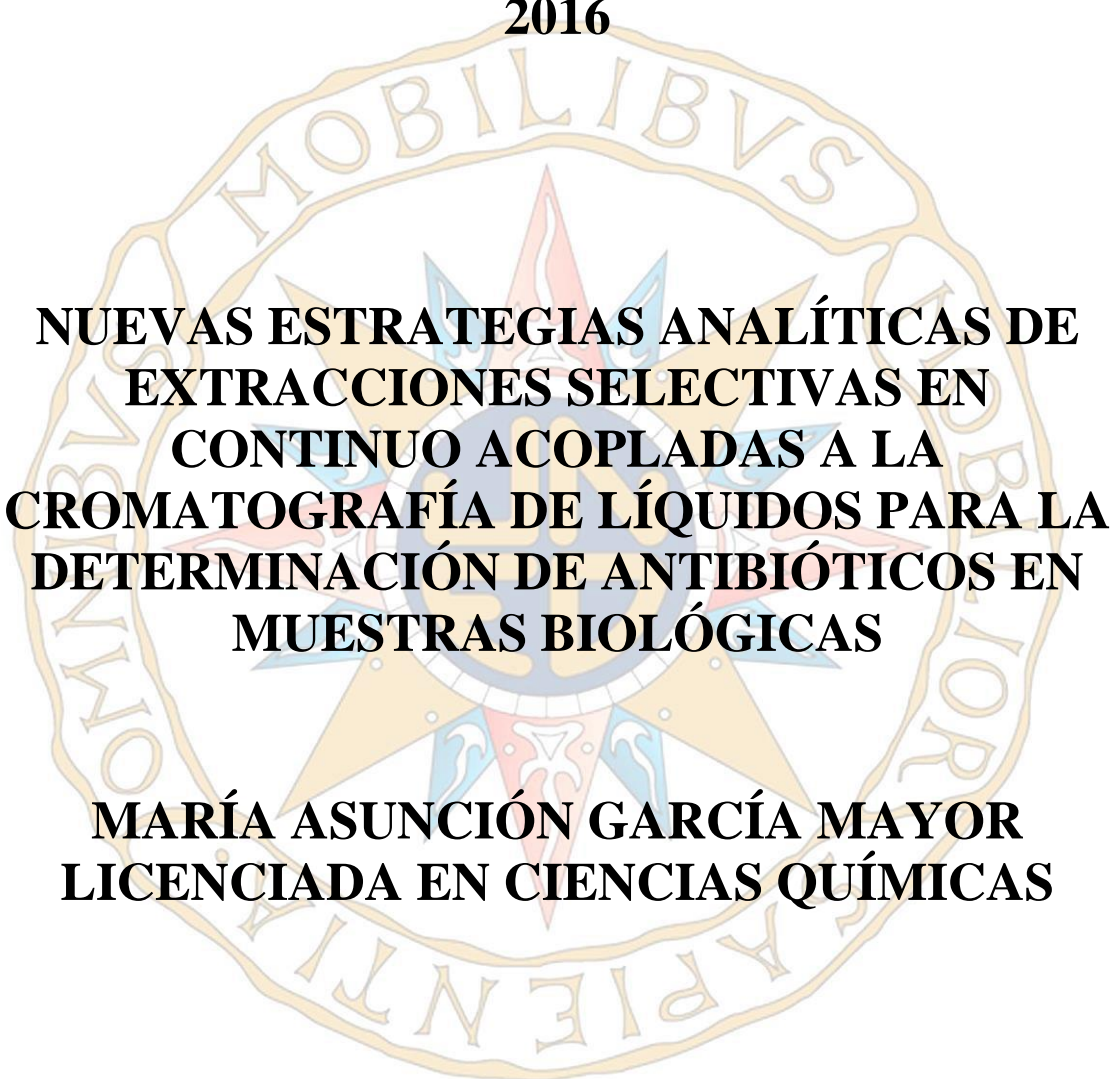


TESIS DOCTORAL

2016



**NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE
EXTRACCIONES SELECTIVAS EN
CONTINUO ACOPLADAS A LA
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**MARÍA ASUNCIÓN GARCÍA MAYOR
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

UNED

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO CIENCIAS ANALÍTICAS**

DIRECTORAS:

**PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO
ROSA MARÍA GARCINUÑO MARTÍNEZ**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**



**NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE
EXTRACCIONES SELECTIVAS EN
CONTINUO ACOPLADAS A LA
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**MARÍA ASUNCIÓN GARCÍA MAYOR
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DIRECTORAS:
PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO
ROSA MARÍA GARCINUÑO MARTÍNEZ**

PILAR FERNÁNDEZ HERNANDO Catedrática de Universidad, del Departamento de Ciencias Analíticas de la Universidad Nacional de Educación a Distancia

ROSA M^a 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: **“Nuevas estrategias analíticas de extracciones selectivas en continuo acopladas a la cromatografía de líquidos para la determinación de antibióticos en muestras biológicas”**, que constituye la memoria que presenta **Dña. M^a Asunción García Mayor** 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.: Pilar Fernández Hernando

Fdo.: Rosa M^a Garcinuño Martínez

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta memoria no puedo evitar mirar atrás y recordar a todas aquellas personas que de un modo u otro han tenido algo que ver en ella.

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis, la Dra. Pilar Fernández-Hernando y la Dra. Rosa M^a Garcinuño Martínez por su apoyo y ayuda prestada durante los años de realización de esta Tesis, especialmente estos últimos meses.

Quiero agradecer a todos los miembros del Departamento de Ciencias Analíticas de la UNED que hayan estado siempre dispuestos a echarme una mano cuando lo he necesitado, así como sus ánimos para que no decayera en los momentos difíciles. Senén, gracias por preguntarme cada poco tiempo “¿cómo va esa Tesis?”, esa frase me hacía recapacitar cuando se me había pasado por la cabeza tirar la toalla. Alejandrina, gracias por estar siempre ahí, dispuesta a echarme una mano cuando me hacía falta. Gema, gracias por haber sido mis manos en ocasiones; no sé qué habría hecho sin tu ayuda.

No puedo olvidarme de Pedro, quien hacía lo posible siempre por que yo tuviera mis muestras de leche cuando las necesitaba. He de agradecer al CERSYRA que me haya facilitado todas esas muestras.

También quiero agradecer a todas mis amistades sus ánimos y aliento constantes, y su aguante en algunas ocasiones.

A mis padres, siempre preocupados por que todo me saliera bien, siempre dándome buenos consejos y siempre confiando en mí, gracias.

Y a vosotros, Floren, Marta y Alberto, gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestra comprensión, por vuestro cariño..., en fin, por todo.

A mis padres

A mis hijos, Marta y Alberto

A Floren

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	21
1	ANTIBIÓTICOS.....	23
1.1	BREVE HISTORIA.....	23
1.2	GENERALIDADES.....	28
1.2.1	Clasificación	29
1.2.2	Mecanismos de acción.....	33
1.3	VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	35
1.4	MARCO LEGAL	39
2	ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS.....	45
2.1	GENERALIDADES.....	45
2.2	ESTRUCTURA QUÍMICA	47
2.2.1	Estructura de la eritromicina	48
2.3	CLASIFICACIÓN.....	49
2.4	USOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN	50
2.5	FARMACOCINÉTICA.....	54
2.6	RESISTENCIA MICROBIANA	56
2.7	PROBLEMÁTICA DEL EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS	58
2.8	INTERÉS ANALÍTICO	60
3	LECHE	61
3.1	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA LECHE.....	62
3.2	CONTROL DE LA CALIDAD DE LA LECHE.....	66
3.3	MASTITIS OVINA.....	68
3.4	LEGISLACIÓN	68
4	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE	71
4.1	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LIMPIEZA	72
4.1.1	Extracción líquido-líquido (LLE)	74
4.1.2	Extracción en fase sólida (SPE)	75
4.1.3	Dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD)	83
4.1.3.1	Elección del soporte sólido.....	85
4.1.3.2	Elección de los disolventes	86
4.1.4	Polímeros de impronta molecular	87
4.1.4.1	Síntesis de los polímeros de impronta molecular	94
4.1.4.2	Técnicas de preparación de los polímeros de impronta molecular	98
4.1.4.3	Caracterización de los polímeros de impronta molecular.....	100
4.1.4.4	Aplicaciones de los MIPs en Química Analítica	102

4.2	DETERMINACIÓN ANALÍTICA	111
4.2.1	Técnicas cromatográficas	114
4.2.2	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).....	116
II.	OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	127
III.	PARTE EXPERIMENTAL	133
1	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE COMPUESTOS MACRÓLIDOS DE LECHE DE OVEJA PARA SU DETERMINACIÓN CON HPLC-UV-DAD	135
	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS MACRÓLIDOS DE LECHE DE OVEJA Y OPTIMIZACIÓN DE SU SEPARACIÓN MEDIANTE HPLC-UV-DAD.....	141
	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS MACRÓLIDOS DE LECHE DE OVEJA MEDIANTE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN UNA FASE SÓLIDA PARA SU POSTERIOR DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC-UV-DAD	161
2	DESARROLLO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA COMPUESTOS MACRÓLIDOS	181
	DESARROLLO DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ERITROMICINA EN LECHE DE OVEJA	185
	DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPIRAMICINA EN LECHE DE OVEJA.....	213
IV.	DISCUSIÓN INTEGRADORA	245
V.	CONCLUSIONES.....	263
VI.	BIBLIOGRAFÍA	269

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

Ac: Anticuerpo

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AESA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

Ag: Antígeno

AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados

AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados

AGS: Ácidos Grasos Saturados

AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrilo

APCI: Ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico

APPI: Fotoionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*)

ARN: Ácido ribonucleico

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CCAE: Confederación de Cooperativas Agrarias de España

CEE: Comunidad Económica Europea

CERSYRA: Centro Regional de Selección y Reproducción Animal

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

DAD: Detector de diodos en serie (*Diode Array Detector*)

DOP: Denominación de Origen Protegida

EARS-Net: Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos Europea (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Net*)

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades

EDMA: Dimetacrilato de etilenglicol

EE.UU: Estados Unidos

ELISA: Inmunoensayo enzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

EMA: Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (*European Medicines Agency*)

EPA: Efecto Postantibiótico

EPRUMA: Plataforma Europea para el Uso Responsable de Medicamentos en Animales (*European Platform for the Responsible Use of Animal Medicines*)

ERY: Eritromicina

ESAC-Net: Red de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption Net*)

ESI: Ionización por electronebulización (*Electrospray Ionization*)

EtOAc: Acetato de etilo

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

FLD: Detección de fluorescencia (*Fluorescence Detection*)

GC: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)

GPCH: Guía de Prácticas Correctas de Higiene

HLB: Balance hidrofílico-lipofílico (*Hidrofilic-Lipofilic Balance*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPTLC: Cromatografía en capa fina de alta eficacia (*High performance Thin Layer Chromatography*)

IT: Trampa iónica (*Ionic Trap*)

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

IVER: Ivermectina

JOS: Josamicina

LC: Cromatografía de Líquidos (*Liquid Chromatography*)

LETRA Q: LEche cruda de vaca, TRAzabilidad y Qualidad

LLE: Extracción líquido-líquido (*Liquid Liquid Extraction*)

LMR: Límite Máximo de Residuo

LOQ: Límite de cuantificación (*Limit of quantitation*)

MA: 1-metiladenosina

MeOH: Metanol

MIP: Polímero de Impronta Molecular (*Molecular Imprinted Polymer*)

MISPE: Extracción en Fase Sólida empleando MIPs (*Molecular Imprinted Solid Phase Extraction*)

MMIP: Polímero de Impronta Molecular Magnético (*Magnetic Molecularly Imprinted Polymer*)

MRPL: Límite mínimo de funcionamiento exigido (*Minimum Required Performance Limits*)

MS: Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

MSPD: Dispersión de la matriz en una fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*)

NIP: Polímero no impreso (*Non Imprinted Polymer*)

NPEDMA: N-feniletilen diamina metacrilamida

OLE: Oleandomicina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

QqQ: Triple cuadrupolo

QuEChERS: *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*

RAM: Materiales de Acceso Restringido (*Restricted Access Materials*)

ROX: Roxitromicina

RSD: Desviación estándar relativa (*Relative Standard Deviation*)

SFC: Cromatografía de fluidos supercríticos (*Supercritic Fluids Chromatography*)

SPE: Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPI: Espiramicina

TCP: 2,4,6-triclorofenol

TLC: Cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*)

TNT: 2,4,6-trinitrotolueno

TRIM: Trimetacrilato de trimetilpropano

TYL: Tilosina

UE: Unión Europea

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta presión (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*)

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta – visible

TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1: CLASIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS (SEGÚN ESTRUCTURA)	30
TABLA 2: CLASIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS (SEGÚN SU MODO DE ACCIÓN).....	32
TABLA 3: MACRÓLIDOS DE USO TERAPÉUTICO AISLADOS DE ESPECIES BACTERIANAS (PORTILLO, 2002)	46
TABLA 4: CLASIFICACIÓN DE LOS MACRÓLIDOS ATENDIENDO AL NÚMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO Y A SU ORIGEN (PORTILLO, 2002)	50
TABLA 5: CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI) DE MACRÓLIDOS FRENTE A CEPAS BACTERIANAS SENSIBLES	53
TABLA 6: LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMRS) DE ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS EN MUESTRAS DE LECHE PROCEDENTE DE CUALQUIER ESPECIE PRODUCTORA DE ALIMENTOS (REGLAMENTO CE 1181/2002 QUE MODIFICA EL ANEXO I DEL REGLAMENTO CEE 2377/90).....	59
TABLA 7: LECHE DE OVEJA. APORTE POR 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE	64
TABLA 8: LECHE DE OVEJA. APORTE POR 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE (ÁCIDOS GRASOS).....	65
TABLA 9: LECHE DE OVEJA. APORTE POR 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE (AMINOÁCIDOS).....	65
TABLA 10: LECHE DE OVEJA. APORTE POR 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE (HIDRATOS DE CARBONO)	66
TABLA 11: PRINCIPALES ADSORBENTES COMERCIALES EMPLEADOS EN SPE Y SUS APLICACIONES	79
TABLA 12: MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN EMPLEADOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE UNIÓN DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR.....	102
FIGURA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA TEIXOBACTINA	27
FIGURA 2: VÍAS DE TRANSMISIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE DE LOS ANTIBIÓTICOS USADOS EN VETERINARIA	37
FIGURA 3: ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES MACRÓLIDOS (A: OLEANDOMICINA, B: ESPIRAMICINA, C: JOSAMICINA, D: ROXITROMICINA, E: TILOSINA, F: IVERMECTINA)	48
FIGURA 4: ESTRUCTURA DE LA ERITROMICINA.....	49
FIGURA 5: PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	76
FIGURA 6: PROCESO DE EXTRACCIÓN MSPD	84
FIGURA 7: NÚMERO DE TRABAJOS RELACIONADOS CON LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (SOCIETY FOR MOLECULAR IMPRINTING).....	89
FIGURA 8: PROCESO DE PREPARACIÓN DE UN MIP	90
FIGURA 9: MONÓMEROS FUNCIONALES	92
FIGURA 10: ENTRECruzANTES.....	93
FIGURA 11: IMPRESIÓN MOLECULAR POR VÍA COVALENTE	95
FIGURA 12: IMPRESIÓN MOLECULAR POR VÍA NO COVALENTE	96
FIGURA 13: DESCOMPOSICIÓN DEL INICIADOR RADICALARIO 2,2'-AZO-BIS-ISOBUTIRONITRILLO (AIBN)	97
FIGURA 14: PROCESO MISPE (VASAPOLLO Y COL., 2011)	107
FIGURA 15: EQUIPO HPLC.....	117

I. INTRODUCCIÓN

1 ANTIBIÓTICOS

1.1 BREVE HISTORIA

Los antibióticos se consideran uno de los descubrimientos más importantes de la historia de la humanidad, aunque posiblemente se estuvieron utilizando desconocidamente mucho antes de su descubrimiento oficial. La utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de las infecciones se conoce desde la antigüedad. Durante siglos se han utilizado extractos de ciertas plantas medicinales o de los hongos que crecen en ciertos quesos para el tratamiento tópico de las infecciones y existen evidencias de la presencia de tetraciclinas en materiales provenientes de la civilización egipcia. Se ha descubierto también que muchas tribus y civilizaciones antiguas utilizaban barro o tierra para la curación de enfermedades, dado que el suelo es una de las principales fuentes de microorganismos productores de antibióticos.

En el siglo II d.C., Galeno revolucionó el tratamiento de las enfermedades incorporando sustancias existentes en la naturaleza para restaurar el balance perdido entre los “humores”, sustancias corporales cuyo desequilibrio se pensaba que era el origen de las enfermedades. En el siglo XIII surge en Inglaterra y Alemania la figura del “apotecario”, momento en que puede considerarse que se inicia el camino hacia la terapéutica moderna. En el siglo XVI, Paracelso propone que no es el conjunto de una prescripción lo que produce el efecto, sino sustancias específicas con funciones específicas a las que denominó “principios activos”, sugiriendo además los métodos para su extracción de las prescripciones. Paracelso fue también el primero en introducir el concepto de dosis, fundamental para comprender la diferencia entre los efectos deseados y los tóxicos de la mayoría de las sustancias.

Estas sustancias se utilizaban contra las enfermedades más difundidas, aquellas que eran contagiosas, pero no se agruparon en la categoría de enfermedades infecciosas hasta el siglo XIX, cuando hacia 1859, el químico francés, Louis Pasteur, sienta las bases de la “Teoría microbiana de la enfermedad”, la cual establece cuál es la verdadera causa de estas enfermedades, y por tanto, permite la búsqueda y aparición de agentes terapéuticos específicos. En los años siguientes, los estudios de Robert Koch, y los del propio Pasteur, permitieron describir las bacterias causantes de la mayoría de las enfermedades infecciosas.

La primera observación de lo que hoy en día se denomina efecto antibiótico fue realizada en París, en 1877, por Louis Pasteur, al descubrir que algunas bacterias saprofitas podían destruir gérmenes del carbunco (enfermedad conocida como antrax). Varias fueron las investigaciones sucesivas que se enfocaron en la búsqueda de nuevas sustancias capaces de destruir gérmenes nocivos, la mayoría sin conseguir grandes éxitos.

Paul Ehrlich, químico alemán de entre el siglo XIX y XX, dedicó parte de su investigación al estudio de la afinidad selectiva que presentaban ciertos colorantes que se unían de manera específica a determinados tejidos o bacterias. Él fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva, en reconocer las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, así como en estudiar la resistencia de parásitos a medicamentos y el papel de la terapéutica combinada para combatir dicha resistencia. Su objetivo era encontrar lo que se llamó "la bala mágica", una sustancia que permitiera la erradicación de un determinado microorganismo sin dañar los tejidos del huésped. Los experimentos de Ehrlich en la primera década del siglo XX condujeron a la síntesis de un compuesto derivado del arsénico al que denominó "salvarsán", el cual mataba a las espiroquetas causantes de la sífilis, pero no reaccionaba con el cuerpo humano. Éste fue el primer compuesto del grupo de las arsfenaminas, y primer triunfo importante de la quimioterapia planeada. Fue Ehrlich precisamente quien acuñó el término quimioterapia para referirse a la búsqueda y utilización de sustancias químicas con acción específica sobre los patógenos.

En 1889 Jean Paul Vuillemin, Jefe de la Cátedra de Historia Natural en la Facultad de Medicina de la Universidad de Nancy, en un trabajo titulado "Symbiose et antibiose", utiliza el término *antibiosis* (del Griego $\alpha\nu\tau\iota$ $\beta\iota\omicron\varsigma$: anti "contra" y bios "vida") para describir el hecho de que seres vivos sean capaces de producir sustancias que inactivan o matan a otros seres vivos con los cuales conviven. Más tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano.

La relación general entre un antibiótico y un organismo infeccioso es de antibiosis. Esta palabra se refiere a una asociación de dos organismos en la que uno es dañado o matado por el otro. La relación entre seres humanos y la enfermedad que ocasionan los gérmenes es de antibiosis. Si una persona es afectada por gérmenes y, si el ataque del germen es rechazado por las defensas del cuerpo, los gérmenes son los organismos dañados. Cuando el sistema inmunológico de una persona (actividad de

los leucocitos y producción de anticuerpos) no puede controlar la antibiosis a su propio favor, se usan los antibióticos para conseguirlo.

En la década de 1920, el bacteriólogo británico Alexander Fleming, del Hospital Saint Mary de Londres, encontró una sustancia llamada lisozima en ciertas secreciones corporales como las lágrimas o el sudor, y en ciertas plantas y sustancias animales. La lisozima presentaba una intensa actividad antimicrobiana, pero principalmente frente a bacterias no patógenas.

En 1928, este gran científico descubriría la penicilina, el arquetipo de los antibióticos. La penicilina es un derivado del hongo *Penicillium notatum*, y fue descubierta de manera accidental por A. Fleming en 1928. La particularidad de la penicilina era que pequeñas cantidades de la droga eran capaces de aniquilar a las bacterias en un cultivo, sobre todo, era capaz de matar a una bacteria asesina, *Staphylococcus aureus*, que infectaba la piel y a partir de allí invadía la sangre produciendo sepsis y muerte. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos. Sin embargo, hasta casi dos décadas después no se utilizó por primera vez la penicilina en humanos, después de que, en 1943, comenzara la producción comercial en Estados Unidos.

En 1930, Gerhard Domagk, trabajando con colorantes químicos, encontró una sustancia, Prontosil, que tenía efectos antibacterianos contra los estreptococos al administrársela a animales enfermos. Más adelante se descubrió que era el residuo de sulfonamida asociado al colorante el que presentaba las propiedades antibióticas. Esta fue la primera sustancia estable y sin toxicidad que se administró para combatir infecciones y significó el inicio de la era moderna de la terapéutica antimicrobiana.

En 1939, el bacteriólogo americano René Dubos, aisló un microorganismo del suelo, *Bacillus brevis*, que producía una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas, la llamó gramicidina, pero pudo utilizarse únicamente como agente de uso tópico, pues era demasiado tóxico para su utilización general.

El término antibiótico fue sugerido por primera vez al editor de Biologic Abstracts en 1941 por el Microbiólogo ambiental Americano Selman A. Waksman, para definir sustancias dotadas de actividad antibacteriana y extraídas de estructuras orgánicas vivas.

Los antibióticos producidos por las bacterias del suelo del grupo actinomicetos han resultado muy eficaces. Un ejemplo de este grupo es la estreptomicina, primer miembro de la familia de los aminoglucósidos, descubierta en 1943 por Selman A. Waksman, la cual es efectiva contra numerosas enfermedades infecciosas, incluidas algunas contra las que la penicilina no es eficaz, como la tuberculosis.

El microbiólogo de la Universidad de Yale, Paul Burkholder, en 1947, encontró en una muestra de suelo una sustancia que inhibía el crecimiento de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, el cloranfenicol, dando lugar a la aparición de los antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, su toxicidad limitó considerablemente su uso. Simultáneamente, Benjamín Duggar estudiaba un microorganismo que producía una sustancia dorada con propiedades antibióticas a la que llamó aureomicina, y que hoy conocemos como clortetraciclina, con una toxicidad significativamente menor que el cloranfenicol.

Del análisis de suelos también surge el descubrimiento de la eritromicina a partir de *Streptomyces erythreus* en 1952, y de la vancomicina a partir de *Streptococcus orientalis* en 1956.

El laboratorio de Howard Florey, en Oxford, logró aislar, en 1964, el principio activo del *Cephalosporium acremonium*, presente en muestras de agua de mar recogidas cerca de un desagüe cercano a la costa de Cerdeña, que ya había empezado a estudiar el italiano Giuseppe Brotzu en los años 40. Surge así la familia de las cefalosporinas.

La búsqueda de microorganismos presentes en la naturaleza y que tengan propiedades antibióticas exige su cultivo en el laboratorio, lo que deja fuera a aquellos microorganismos cuyo crecimiento no se puede propiciar en condiciones controladas, lo que supone el 99 % de todos los existentes. Esto ha propiciado que, posiblemente, la mayoría de las sustancias con estas características se descubrieran en la conocida como “edad dorada de la terapéutica antimicrobiana”.

Paralelamente al descubrimiento de antibióticos naturales se desarrolló la investigación en síntesis química de otros antibióticos. Por un lado se ha intentado conseguir productos semisintéticos, con nuevas propiedades, a partir de la modificación química del antibiótico natural conocido o de metabolitos microbianos y por otro, se han obtenido algunos antibióticos totalmente sintéticos, como la familia de

las fluoroquinolonas e incluso, hoy en día existen antibióticos sintetizados por técnicas de ingeniería genética.

En los últimos 25 años no se han comercializado nuevos antibióticos, debido, por un lado, al agotamiento de las fuentes naturales, y por otro, por la negativa de las farmacéuticas a investigar y comercializar nuevos productos sintéticos, ya que el proceso hasta su comercialización es tan largo que, no se puede asegurar que se vaya a recuperar el dinero invertido antes de que la adaptación de las bacterias haga inútil el antibiótico.

Sin embargo, en enero de 2015 se publicó en Nature el descubrimiento de un nuevo antibiótico, la teixobactina (Figura 1), obtenida a partir de *Eleftheria terrae* procedente de una muestra de suelo, y que ha mostrado alta toxicidad para microorganismos Gram +, como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis* o *Clostridium difficile*, siendo efectivo incluso frente a cepas resistentes de estos patógenos (Ling, 2015). Pero solo se ha probado en ratones y por vía intravenosa, por lo que los ensayos en humanos y para lograr una presentación más accesible llevarán unos 2 ó 3 años, más otros 2 ó 3 hasta que estén organizados los grupos de control y puedan comenzarse, por lo que no se espera que esté comercializado o en fase de aprobación hasta 2020-2022.

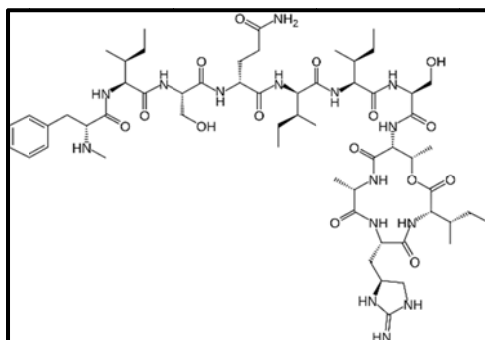


Figura 1: Estructura química de la teixobactina

Pero quizá, más importante que el descubrimiento de la teixobactina, es el método utilizado para conseguirla, ya que es capaz de engañar a las bacterias y hongos, haciéndoles creer que están creciendo en condiciones naturales y no en un medio de laboratorio. Se trata de un sistema multicanal de membranas semipermeables denominado iChip. Este sistema permite aprovechar bacterias que habitualmente no es posible cultivar, ampliando el rango de especies que pueden utilizarse para buscar nuevos antibióticos.

A partir de la generalización del empleo de los antibióticos en la década de 1950, el panorama de las enfermedades cambió de forma radical, de manera que enfermedades que habían sido primera causa de muerte, se volvieron mucho menos graves. Desde entonces se han conseguido distintas familias de antibióticos con variados, y cada vez más amplios, espectros de acción antibacteriana. Y sin embargo, a pesar de ello, las infecciones bacterianas continúan siendo un importante problema sanitario, en ocasiones difíciles de controlar y tratar, debido a la aparición cada vez más rápida de bacterias superresistentes.

Hasta el momento se han descrito en la bibliografía más de 3100 antibióticos, de los que aproximadamente 2400 proceden de microorganismos. Sin embargo, sólo unas docenas se han utilizado en medicina, debido, entre otros motivos, a que la mayoría de antibióticos carecen de toxicidad selectiva y son tóxicos casi en igual medida para el parásito y para el huésped.

1.2 GENERALIDADES

En general, se utiliza el término antibiótico para referirse a una sustancia orgánica producida por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos), que tiene la propiedad de inhibir la proliferación de organismos infecciosos (acción bacteriostática) o de eliminarlos (acción bactericida), independientemente de su origen natural o artificial.

Sin embargo, habría que distinguir entre los siguientes términos:

- ✓ *Antimicrobianos*: sustancias producidas sintética o naturalmente que se utilizan para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos, entre ellos bacterias, virus y hongos, y de parásitos, en particular protozoos (*Reglamento (CE) 1831/2003*).
- ✓ *Antibióticos*: antimicrobianos producidos por un microorganismo o derivados de éste que destruyen o inhiben el crecimiento de otros microorganismos (*Reglamento (CE) 1831/2003*).
- ✓ *Quimioterápicos*: antimicrobianos obtenidos de forma artificial, a partir de una preparación sintética.

1.2.1 Clasificación

Existen numerosos criterios para clasificar los antibióticos, por lo que existen múltiples clasificaciones, resultando muy difícil decidir cuál es la ideal. A continuación se muestran los más utilizados:

✓ *De acuerdo a su origen*

- Naturales. Producidos por microorganismos, por el metabolismo de hongos y bacterias.
- Semisintéticos. Producidos por microorganismos y modificados químicamente.
- Sintéticos. Fármacos de síntesis creados en el laboratorio.

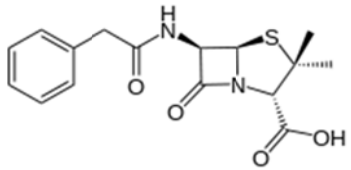
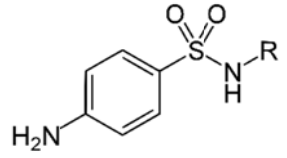
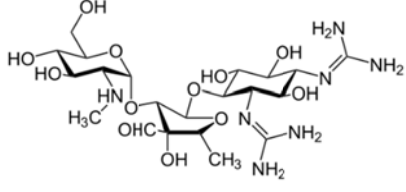
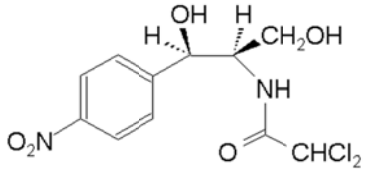
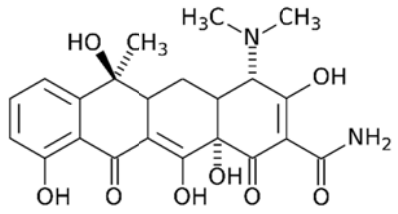
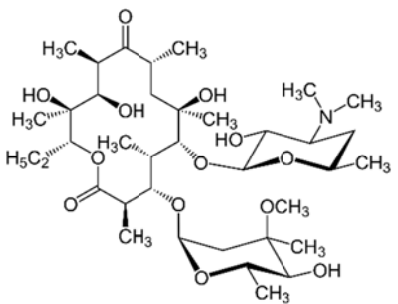
✓ *Según su espectro de actividad*

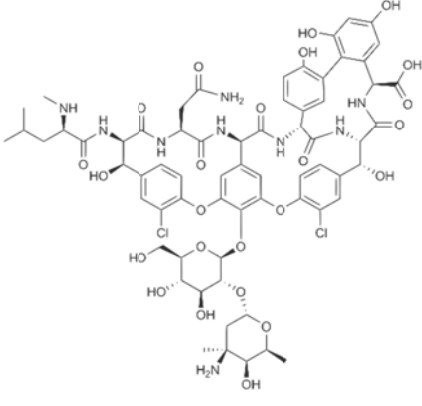
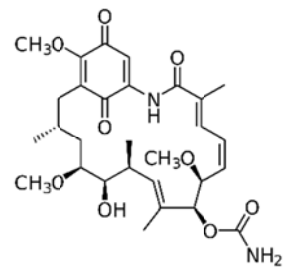
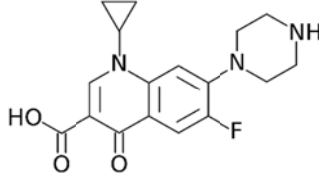
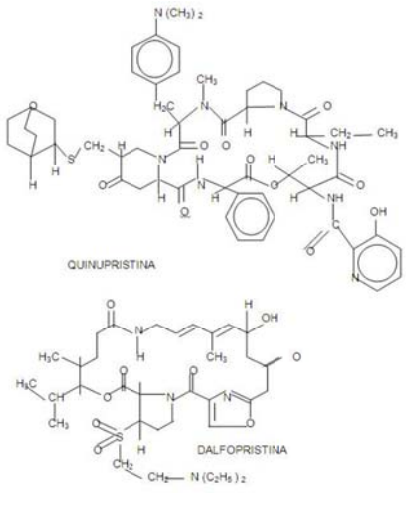
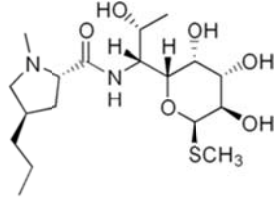
- Amplio espectro. Aquellos que afectan a multitud de bacterias.
- Bajo espectro. Aquellos que afectan solo a algunos tipos de bacterias.

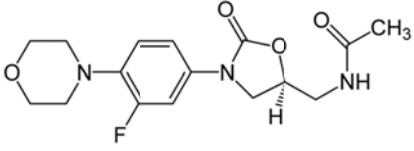
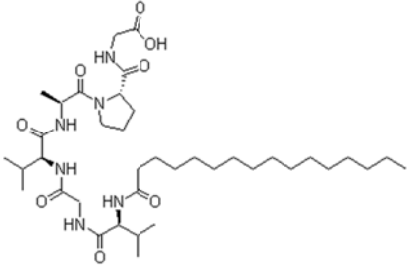
✓ *Por su estructura química*

Las familias de antibióticos según la estructura química que poseen, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Clasificación de antibióticos (según estructura)

<p>Beta-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas): contienen un anillo beta-lactámico</p>	
<p>Sulfonamidas: contienen el grupo sulfonamida</p>	
<p>Aminoglucósidos: contienen estructuras aminoazúcar</p>	
<p>Cloranfenicol: compuesto individual</p>	
<p>Tetraciclinas: contienen 4 anillos hidrogenocarbonados adyacentes</p>	
<p>Macrólidos: lactonas macrocíclicas con anillos de más de 8 miembros que se unen mediante enlaces glucosídicos a uno o varios azúcares neutros o básicos</p>	

<p>Glicopéptidos: carbohidratos unidos a un péptido formado por aminoácidos</p>	
<p>Ansamicinas: contienen un anillo aromático enlazado por una cadena alifática</p>	
<p>Quinolonas: contienen anillos aromáticos condensados con un grupo ácido carboxílico unido</p>	
<p>Streptograminas: combinación de dos moléculas pertenecientes a dos grupos estructuralmente distintos; el A, que son macrolactonas poliinsaturadas, y el B, que son hexadepsipéptidos cíclicos</p>	
<p>Lincosamidas: derivados alquílicos de prolina unidos a un derivado de octosa que lleva un grupo sulfuro</p>	

<p>Oxazolidinonas: tienen estructuras químicas únicas</p>	
<p>Lipopéptidos: contienen un lípido enlazado a un péptido</p>	

✓ *Por su modo de acción*

- Bacteriostáticos. Actúan inhibiendo el crecimiento de gérmenes nocivos.
- Bactericidas. Destruyen los gérmenes nocivos.

Esta clasificación no es exacta, ya que el que se produzca un efecto u otro depende del tipo de germen y de la concentración de antibiótico. En la tabla 2 se muestran las familias de antibióticos clasificadas según este criterio.

Tabla 2: Clasificación de antibióticos (según su modo de acción)

Bactericidas	Bacteriostáticos
<ul style="list-style-type: none"> • Beta-lactámicos • Aminoglucósidos • Glicopéptidos • Ansamicinas • Quinolonas • Estreptograminas • Lipopéptidos • Rifampicinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonamidas • Amfenicoles • Tetraciclinas • Macrólidos • Lincosamidas • Oxazolidinonas

✓ *Según el mecanismo de acción*

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular. Beta-lactámicos, glicopéptidos, cicloserina, bacitracinas, polipéptidos.
- Modificadores de la función de la membrana celular. Metabolismo del ácido fólico. Sulfamidas.
- Inhibidores de la síntesis proteica. Aminoglucósidos, anfenicoles, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas y estreptograminas.
- Inhibidores de la síntesis o función de los ácidos nucleicos. Replicación ADN/ARN. Rifampicina, quinolonas e imidazoles.

1.2.2 Mecanismos de acción

El éxito clínico del uso de antibióticos depende del tipo de antibiótico empleado. En general, los antibióticos actúan interfiriendo en diversos procesos metabólicos o reproductores esenciales para la supervivencia de los microorganismos. Actúan de forma selectiva en procesos vitales de la bacteria, pero que no lo son del huésped. Estos procesos están relacionados con la síntesis de la pared bacteriana, de las proteínas o de los ácidos nucleicos, o determinan la desestructuración de las membranas lipídicas que los separan del entorno. La actividad bactericida o bacteriostática depende del tiempo que el microbio esté expuesto a concentraciones superiores a la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI). El tiempo de exposición y el valor en el que debe exceder la concentración a la CMI para conseguir la erradicación microbiológica. Debido a que hay más de una familia de antibióticos que tienen un mismo mecanismo de actuación pueden aparecer las denominadas resistencias cruzadas.

Los tipos de mecanismos de acción se pueden resumir en los siguientes puntos:

✓ *Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana*

Las bacterias poseen una pared externa rígida constituida por al menos dos capas de una estructura glucoproteica denominada peptidoglucano, que les da

forma y confiere resistencia osmótica, y les permite mantener su integridad cuando infectan al hombre. Esta estructura no está presente en las células de los mamíferos. En la síntesis de este compuesto participan al menos 30 enzimas. Varias clases de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano por bloqueo directo del lugar catalítico de alguna enzima, o mediante la formación de complejos con determinados sustratos. Es el caso de los betalactámicos, los glucopéptidos o la fosfomicina.

✓ *Inhibición de la síntesis proteica*

La mayoría de los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico, las cuales pueden formar parte del centro de decodificación, del centro de formación de enlaces peptídicos o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado. Dentro de este grupo se encuentran los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos y cetólidos. Los ribosomas bacterianos son diferentes de los ribosomas eucarióticos.

✓ *Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos*

Algunos antibióticos (quinolonas y rifamicinas) actúan directamente sobre las enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos nucleicos. Sin embargo, otros (sulfamidas y trimetoprima) inhiben la síntesis de ácido fólico, necesario para la producción de nucleótidos, en el caso de aquellos microorganismos que no son capaces de obtenerlo del entorno y necesitan sintetizarlo.

✓ *Actuación sobre la membrana externa de bacterias gramnegativas o sobre la membrana citoplasmática*

Los microorganismos gramnegativos también poseen una capa de peptidoglucano, pero más fina que la de los grampositivos, disponiendo además de una membrana exterior de composición asimétrica. La lámina interna de esta membrana está constituida por fosfolípidos, mientras que la externa contiene un lípido glucosilado especial denominado lipopolisacárido o endotoxina. Varios derivados de naturaleza lipopeptídica (polimixinas, colistina) tienen la capacidad de insertarse en las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de la membrana externa y provocando la muerte rápida de la

bacteria. Este mecanismo de acción es completamente distinto al de otros antibióticos y, por tanto, no hay resistencia cruzada.

La daptomicina, lipopéptido aniónico, sólo es activa frente a bacterias grampositivas. Su mecanismo de acción consiste en su inserción en la membrana citoplasmática formando brechas por las que la célula pierde iones K^+ y otros elementos esenciales, induciéndole la muerte.

Existen algunos otros antibióticos que combinan más de un modo de actuación, como los nitroimidazoles.

En general, los antibióticos son tóxicos para las bacterias pero inocuos para el hombre, poseyendo un amplio margen terapéutico (relación entre la dosis eficaz y la dosis tóxica).

Cuando las dosis y tiempos de tratamiento no son los correctos, los microorganismos modifican sus procesos adaptándose a la presencia del antibiótico y volviéndose resistentes.

1.3 VÍAS DE TRANSMISIÓN

Los antibióticos constituyen el grupo de fármacos que se prescribe con mayor frecuencia, tanto en medicina como en veterinaria.

En el ser humano los antibióticos se utilizan con fines:

- ✓ *Terapéuticos*. Para el tratamiento de infecciones sistémicas, circulatorias, respiratorias, urogenitales, gastrointestinales, oftálmicas, de tejidos blandos, esqueléticas y tópicas.
- ✓ *Profilácticos*. Para la prevención de infecciones en sujetos sanos o enfermos (Bohoyo, 2005).

A los animales se les suministran antibióticos con tres fines posibles:

- ✓ *Terapéutico*. Como tratamiento de una infección existente.

- ✓ *Profiláctico*. Para prevenir una infección cuando se está realizando un procedimiento determinado y mientras éste dure.
- ✓ *Como promotores del crecimiento*. Son administrados durante largos períodos de tiempo, en concentraciones subterapéuticas, para que actúen modificando cuantitativa y cualitativamente la microflora bacteriana del tubo digestivo; de esta manera se consigue una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas, dando lugar a un mayor aprovechamiento de los nutrientes y por tanto, un considerable aumento de peso.

El uso de los antibióticos en veterinaria comenzó en la década de los 50, con la utilización de oxitetraciclina y clortetraciclina como aditivos en los piensos. Posteriormente se utilizaron muchos otros antibióticos de esta manera con el fin de promover el crecimiento de animales destinados a la producción de alimentos. Se estima que, en la década de los 80, al menos un 60% de todos los animales productores de alimentos para el hombre fue expuesto a antibióticos en algún momento de su vida. Si a esto se añade que no se respetaban los tiempos de retirada del antibiótico, el riesgo de encontrar residuos de los mismos en productos alimenticios finales era muy alto (*Di Corcia y Nazzari, 2002*).

El empleo de antibióticos, tanto en el ser humano como en veterinaria, en diferentes dosis y con períodos de tratamiento variables, unido a las diferentes rutas que pueden seguir tras su administración hace que sea muy complicado hacer una valoración exacta de la concentración en que se pueden encontrar en el medio ambiente y por tanto, de los riesgos que puede entrañar su presencia.

Los antibióticos administrados a los seres humanos llegan, tras su expulsión junto con sus metabolitos y a través de la red de alcantarillado, a la Estación de Tratamiento de Aguas Residuales, en la que, dependiendo de su estructura química y por tanto de su afinidad y posibilidad de formar enlaces, pueden seguir tres vías de degradación o transmisión:

- ✓ Antibióticos o metabolitos que pueden ser mineralizados por los microorganismos presentes.
- ✓ Aquellos que son más o menos resistentes y son lipofílicos o presentan la posibilidad de formar algún otro tipo de enlace. Quedarán retenidos en los

lodos. Si estos lodos se utilizan posteriormente en la agricultura, los antibióticos pasarán a los campos, y si tienen cierta capacidad de movilidad, podrán llegar a las aguas subterráneas y, por filtración, a arroyos cercanos.

- ✓ Aquellos antibióticos o metabolitos que son persistentes, que presentan alta polaridad y dificultades para enlazarse. Continuarán en las aguas de salida de la planta de tratamiento, alcanzando el medio acuático.

Algunos de los antibióticos suministrados a los animales se absorben poco en el tracto intestinal, se eliminan a través de las heces a elevadas concentraciones, y pasan a formar parte del estiércol que, al utilizarse en los campos de cultivo como abono, hará que acaben en el suelo, con el consiguiente riesgo posterior de pasar a aguas subterráneas y superficiales (Figura 2). Otros antimicrobianos se absorben a nivel intestinal, pero sus metabolitos pueden ser eliminados por la orina. Como consecuencia, la práctica de incorporar los purines como fertilizantes favorece aún más la dispersión de estas sustancias en el medio ambiente (*Sarmah, 2006*).

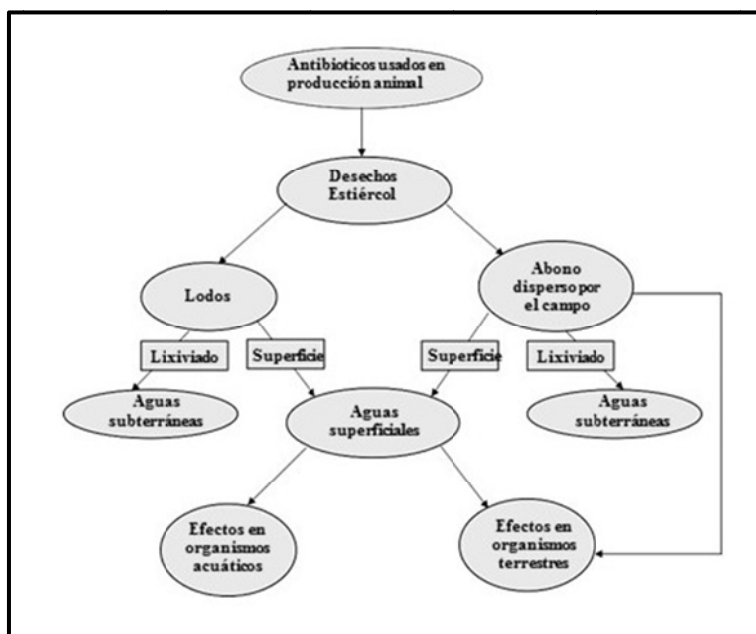


Figura 2: Vías de transmisión en el medio ambiente de los antibióticos usados en veterinaria

Los suministrados a animales destinados al consumo humano, pueden permanecer en forma de trazas en los productos alimenticios (carne, leche, huevos...), incorporándose al organismo humano a través de la cadena alimentaria.

En general, se puede pensar que las concentraciones de los antibióticos que pudiera haber repartidas por el medio son tan bajas que no tendrían por qué causar

problemas. Sin embargo, si se tiene en cuenta que los vertidos pueden ser localizados (los lodos o el estiércol se extienden en un campo de cultivo de unas pocas hectáreas, o las aguas residuales de un hospital van a parar a una pequeña planta de tratamiento o a algún pequeño arroyo o lago), y que el consumo de algunos antibióticos ha llegado a ser sorprendentemente alto y sin respetar los tiempos de tratamiento, las concentraciones de los mismos que se pueden hallar en determinadas zonas y alimentos pueden ser superiores a las que cabría esperar.

Además, algunos antibióticos han sido utilizados como aditivos directamente sobre el alimento destinado a consumo humano, sobre todo a la leche, con el fin de prolongar su frescura.

Los antibióticos podrían considerarse armas que crea la propia naturaleza para establecer y mantener el equilibrio en los ecosistemas microbianos, por lo que uno de los factores que influye en este equilibrio es la resistencia que presentan los microorganismos. Una variación en la cantidad de antibióticos a la que están expuestos dará lugar a mutaciones que ocasionarán la selección genética de las bacterias más fuertes y más nocivas. Este desarrollo de resistencias por parte de algunos microorganismos, además de ser un efecto irreversible, se ve favorecido por la exposición a bajas concentraciones del antibiótico durante largos periodos de tiempo.

El empleo indiscriminado de antibióticos puede venir acompañado de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del germen causante de la infección, y la más importante de todas, la aparición de microorganismos antibiótico-resistentes que da lugar a la necesidad cada vez mayor de buscar nuevas drogas.

La presencia de residuos de antibióticos en alimentos es muy problemática. Así, por ejemplo, las carnes contaminadas con residuos de antibióticos utilizadas para la obtención de productos fermentados, pueden dar lugar a cultivos anómalos y fallos de los iniciadores. Asimismo, la presencia de estos residuos en leche puede inhibir o alterar el crecimiento de los microorganismos necesarios para la fabricación de queso y/o yogur (*Grunwald, 2003*). Además, los residuos de antibióticos podrían llegar incluso a alterar el desarrollo de la flora microbiana contaminante, lo que podría ocasionar el enmascaramiento de algunos agentes patógenos durante el control bacteriológico de los alimentos.

Las trazas de antibióticos que llegan al organismo humano a través de los alimentos pueden fomentar la aparición de bacterias resistentes en el hombre. Este es el mismo efecto que se produce cuando el hombre consume directamente los antibióticos de forma incorrecta, es decir, en dosis no adecuadas, sin respetar los tiempos de tratamiento, o cuando realmente no son necesarios. El consumo inadecuado de antibióticos por parte de los animales fomenta la aparición en éstos de cepas resistentes que por diferentes vías de transmisión, y en especial a través de los alimentos, también pueden llegar al ser humano.

Las dosis deben ser siempre terapéuticas, ya que los laboratorios farmacéuticos realizan los ensayos y estudios cinéticos necesarios para garantizar, con la dosis que propongan, los niveles del fármaco óptimos para eliminar la bacteria, así como que, tras el consumo del antibiótico, se produzca la metabolización del mismo, dando lugar a su eliminación.

1.4 MARCO LEGAL

Los antibióticos son uno de los agentes farmacológicos peor usados, tanto en medicina humana como veterinaria, ya que son administrados muchas veces de forma irracional y en dosis inadecuadas. Su empleo indiscriminado se acompaña de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del germen causal, y una de las más importantes, la aparición de gérmenes antibiótico-resistentes, lo cual genera la necesidad cada vez mayor de nuevas drogas.

En la década de los cincuenta, se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo y se identificó el factor de crecimiento en dichos extractos como residuos de clortetraciclina. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antimicrobianos y para diversas especies animales, y desde entonces, la adición de antibióticos en pequeñas dosis al pienso de los animales de abasto ha venido siendo una práctica habitual para mejorar las producciones y disminuir su coste (*Dibner y Richards, 2005*). Sin embargo, no se tuvo en cuenta el efecto que el consumo de estos «factores nutricionales» (como se les consideraba en un principio) pudiera tener sobre la resistencia bacteriana. A finales de los sesenta, tras relacionar la aparición de un brote de salmonelosis en humanos con el tratamiento de terneras con antibióticos, surgieron las primeras voces

de preocupación sobre el incremento de la resistencia y la posible relación con el consumo de antibióticos como promotores del crecimiento. En 1969 se publicó el informe británico Swann (*Swann y col., 1969*), donde se alertaba del posible riesgo de selección de bacterias resistentes en animales que pudieran posteriormente pasar al ser humano. Dicho informe recomendaba que no se utilizaran como promotores de crecimiento antimicrobianos que pudieran emplearse en medicina humana, o antimicrobianos que causaran resistencias cruzadas.

En 1970, en la entonces CEE, se publicó la *Directiva 70/524* sobre los aditivos en la alimentación animal. Con ella se estableció que sólo se podían emplear como promotores del crecimiento aquellos antimicrobianos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, que fueran activos frente a bacterias Gram-positivas y que no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en la carne. Se decidió eliminar como promotores aquellos antimicrobianos que también fueran utilizados en la medicina humana o animal.

Su aplicación durante los años posteriores fue poniendo de manifiesto la necesidad de revisar todas las normas sobre los aditivos; además, gracias a los avances tecnológicos y científicos han ido apareciendo nuevos tipos de aditivos; todo esto llevó a que el Parlamento Europeo publicara en 2003 el *Reglamento nº 1831/2003* que deroga la anterior Directiva y establece un procedimiento comunitario para la autorización de la comercialización y uso de los aditivos para alimentación animal e introduce normas de vigilancia y etiquetado de los aditivos. Se establece además que “la comercialización y la utilización como aditivos para la alimentación animal de antimicrobianos distintos de los coccidiostáticos y los histomonóstatos, sólo podrá efectuarse hasta el 31 de diciembre de 2005; a partir del 1 de enero de 2006, estas sustancias se eliminarán del registro”.

Los antibióticos que se han empleado en los últimos años en la UE como promotores del crecimiento animal han sido: avoparcina (glucopéptido con estructura similar a la vancomicina de uso en humanos), tilosina y espiramicina (macrólidos con estructura similar a la eritromicina de uso en humanos), virginamicina (estreptogramina con estructura similar a quinupristín-dalfopristín de reciente inclusión en el arsenal terapéutico humano), avilamicina (con estructura similar a la everninomicina, antibiótico para uso en humanos), bacitracina, flavofosfolipol, monensina y salinomicina. De esta lista han ido suprimiéndose paulatinamente, desde 1997 hasta

2005, año en el que, como se ha dicho en el párrafo anterior, la Unión Europea prohíbe el empleo de antibióticos para la promoción del crecimiento.

A partir de 2006, y como consecuencia de esta prohibición, en Europa se ha registrado un gran descenso en la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento. Sin embargo, una gran cantidad de los antibióticos producidos a nivel mundial están todavía destinados a usos veterinarios, aunque sea con fines terapéuticos, lo que conlleva la presencia de residuos en los alimentos de origen animal.

Ya en 1990, la Comunidad Europea (*Reglamento 2377/90/EC*) estableció los llamados límites máximos de residuos (LMR) para aquellas sustancias farmacológicas activas que se utilizan en los medicamentos veterinarios que se suministran a animales productores de alimentos. Se define como la concentración aceptable de una sustancia en los tejidos comestibles de un animal (músculos, hígado, riñones, grasa, leche, miel y huevos), que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para su salud. Actualmente, la norma básica que recoge y regula los procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal es el *Reglamento (CE) nº 470/2009*. De forma complementaria a éste, se publica el *Reglamento (UE) nº 37/2010* que recoge los LMRs de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal. Los valores de los LMRs en los diferentes tejidos reflejan la cinética de la disminución de su concentración, teniendo en cuenta todas las fuentes de alimento, las condiciones de uso del medicamento, la viabilidad de los tiempos de espera derivados y la disponibilidad de métodos analíticos adecuados para su determinación.

A fin de proteger la salud pública, se establece el tiempo de espera, que es el período de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal. De este modo se garantiza que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos de residuos de sustancias activas (*Directiva 2004/28/CE*). Es decir, el plazo de tiempo que debe transcurrir desde el último tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales para poder consumir su carne o hasta la recogida de sus productos (leche, huevos). Estos tiempos se determinan en función del perfil cinético de la eliminación de los fármacos.

El Codex Alimentarius y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (*Food and Drug Administration-FDA*) también disponen de una lista con los LMR autorizados para productos alimenticios de origen animal.

Las crisis internacionales surgidas en los años 90 en Inglaterra, por la aparición del mal de las vacas locas y en Bélgica por la existencia de dioxinas en pollos, han llevado a que la sanidad y la nutrición animal sean cuestiones primordiales en la Unión Europea. Para garantizar el alto grado de seguridad alimentaria que reclaman los consumidores, en el año 2000 se publicó el *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*. En él se programa la creación de un Organismo Alimentario Europeo independiente (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, AESA), que se convierta en punto de referencia científico para el conjunto de la Unión, y se planifica la actualización de la legislación en vigor en ese momento. Se espera que la aplicación de todas las medidas propuestas en este Libro Blanco posibilite una organización más coordinada e integrada de la seguridad alimentaria dirigida a lograr el máximo nivel posible de protección de la salud.

El uso masivo e inapropiado que se ha hecho durante años de los antibióticos ha dado lugar a un rápido incremento de cepas multirresistentes. Esto constituye una amenaza hasta el punto de que infecciones comunes y lesiones menores pueden volver a resultar letales, sobre todo para los pacientes más vulnerables. Según el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), creado en 2004 para luchar contra las enfermedades transmisibles y otras amenazas graves para la salud, alrededor de 25.000 pacientes mueren cada año en la Unión Europea debido a una infección causada por bacterias multirresistentes. Además, en los últimos 50 años se ha frenado el desarrollo de nuevos antibacterianos. Según la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA), creada en 1993 (*Reglamento (CEE) nº 2309/93*) para coordinar los recursos científicos que las autoridades competentes de los Estados miembros pongan a su disposición para la evaluación y supervisión de medicamentos, la disponibilidad de nuevos antibióticos para tratar bacterias que ya son multirresistentes es muy escasa en la actualidad.

En Europa, existen además dos redes oficiales que vigilan la evolución del consumo de antibióticos: European Surveillance of Antimicrobial Consumption Net (ESAC-Net) y European Antimicrobial Resistance Surveillance Net (EARS-Net). Ésta última tiene como objetivo reducir la resistencia a antibióticos elaborando bases de datos globales que permitan evaluar y comparar la resistencia a antibióticos en los distintos países

Europeos a lo largo del tiempo, así como facilitar la adopción de nuevas directrices en cuanto al uso de antibióticos.

En el año 2005 se creó la Plataforma Europea para el Uso Responsable de Medicamentos en Animales (EPRUMA), con el objetivo de promover el uso responsable de medicamentos en animales en la Unión Europea.

El Parlamento Europeo aprobó el 11 de diciembre de 2012 una resolución (*Resolución 2012/2041 (INI)*) en la que propone medidas para combatir las bacterias resistentes a los tratamientos antimicrobianos. Es necesario un uso prudente de este tipo de sustancias, fomentando la dosificación controlada, así como la investigación de nuevos tratamientos. El uso correcto de estas sustancias reduciría la exposición inadecuada a los antimicrobianos tanto en la medicina humana y veterinaria, como en la ganadería, la agricultura, la acuicultura y la horticultura, para lo cual es necesario mejorar la educación y la formación de médicos, farmacéuticos, veterinarios y ganaderos, así como ampliar la información para el público general sobre el daño causado por el uso incorrecto de antimicrobianos. El informe insiste en que son necesarios más esfuerzos para controlar el uso de los antibióticos en la medicina humana y veterinaria y rechaza "rotundamente el uso profiláctico sistemático de antimicrobianos en el sector ganadero", destacando que sectores como la ganadería y la acuicultura deben centrarse en la prevención de enfermedades a través de una buena higiene, instalaciones adecuadas y buenas prácticas en la cría de animales, así como mediante estrictas medidas de bioseguridad, en lugar de recurrir al uso profiláctico de antibióticos.

El 30 de abril de 2014 la OMS emitió su primer informe sobre la resistencia a los antibióticos, basándose en datos de 114 países. En él alerta de la necesidad de tomar medidas importantes para mejorar la prevención de infecciones y de cambiar la forma de producir, prescribir y usar los antibióticos ante la grave amenaza para la salud pública que están generando las resistencias bacterianas, que hacen que algunos de estos fármacos más habituales sólo funcionen en la mitad de los casos. Se ha detectado que está muy extendida la resistencia a los antibióticos carbapenémicos, último recurso en algunas infecciones potencialmente mortales, a las fluoroquinolonas, una de las clases de antibacterianos más utilizada, a las cefalosporinas de tercera generación, también último recurso en el tratamiento de la gonorrea, y a la mayoría de los antibióticos utilizados habitualmente. Aunque algunos países ya han comenzado a tomar medidas para solucionar el problema, es necesaria una mayor aportación de los

países y de todas las personas. Entre estas medidas se encuentran la prevención de las infecciones mediante una mayor higiene, el acceso al agua potable, el control de las infecciones en centros sanitarios y la vacunación, con el objeto de reducir la necesidad de antibióticos. A los profesionales sanitarios y farmacéuticos, les aconsejan mejorar la prevención y el control de las infecciones, prescribir y dispensar antibióticos solo cuando sean verdaderamente necesarios y para tratar la enfermedad en cuestión.

Según datos de la Red Europea de Vigilancia de las Resistencias a Antibióticos (*EARS-Net*), España es uno de los países europeos que presenta mayores tasas de resistencia a antibióticos, y los españoles se hallan entre los ciudadanos europeos más dados al consumo de antibióticos, lo que favorece enormemente la aparición de resistencias.

A la vista de la situación actual, y teniendo en cuenta que en las últimas décadas se ha ralentizado considerablemente el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, se constituyó, en noviembre de 2014, una Red Nacional para el Descubrimiento de Nuevos Antibióticos, en la que participan 23 organismos públicos y privados del sector sanitario, con el objetivo de impulsar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. Su propuesta se encamina a la búsqueda de antibióticos con actividad específica para cada patógeno, y de esta manera, encontrar tratamientos de precisión para las infecciones.

2 ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS

2.1 GENERALIDADES

Los antibióticos macrólidos fueron descubiertos en 1942 por Gardner y Chain (*Gardner and Chain, 1942*) cuando observaron que un microorganismo descubierto como un contaminante accidental de un medio agar, producía una sustancia antibiótica, a la que llamaron proactinomicina (*Korzybski, y col., 2013*). Años más tarde se comprobó que era la picromicina, primer antibiótico de este grupo, que empezó a usarse como tal en 1951, cuando Brockman y Henckel (*Brockman and Henckel, 1951*) lograron aislarla de una cepa de *Streptomyces felleus*. Posteriormente, Manuel Alexander McGuier y sus colaboradores (*McGuier y col., 1952*), extraen la eritromicina, antibiótico tipo del grupo, de los productos metabólicos de una cepa del *Streptomyces erythreus*, encontrado originalmente en una muestra de tierra recolectada en el archipiélago de las Filipinas. Desde ese año, a partir de diversas especies de *Streptomyces* y de otros organismos, se han ido consiguiendo otros antibióticos del grupo. El análisis de estas sustancias obtenidas de fuentes naturales ha dado lugar a la investigación en síntesis de nuevos compuestos que han ido completando este grupo de antimicrobianos.

El término *macrólido* fue inicialmente propuesto por Woodward para referirse a antibióticos que contenían en su estructura macrociclos de lactona, aunque actualmente dicho término se utiliza en un sentido más amplio y abarca desde monolactonas carbocíclicas hasta lactonas más complejas que contienen en su esqueleto nitrógeno amínico, amídico, anillos de oxazol o de tiazol (*Omura, 2002*).

En 1953, se descubrió la kitasamicina o leucomicina en Japón. En 1954, se obtuvo la oleandomicina del *Streptomyces antibioticus* y la espiramicina del *Streptomyces ambofaciens*. Más tarde se conocieron la josamicina, del *Streptomyces narbonensis*, variedad *josamyceticus*, y la midecamicina, del *Streptomyces mycarofaciens*. Luego vinieron otros fármacos, con mayor absorción y más larga semivida, como la roxitromicina o la diritromicina, un profármaco de la diritromicilamina, ambos derivados semisintéticos de la eritromicina. Rokitamicina es el más activo de los macrólidos de 16 átomos en desarrollo clínico y tiene como excepción una acción bactericida frente a *Staphylococcus aureus*.

La tabla 3 muestra los macrólidos más importantes y las bacterias que los producen.

Tabla 3: Macrólidos de uso terapéutico aislados de especies bacterianas (Portillo, 2002)

Antimicrobiano	Microorganismo productor	Referencia
Eritromicina A	<i>Streptomyces erythreus</i> (reclasificada como <i>Saccharopolyspora erythrea</i>)	McGuire y col. 1952
Oleandomicina	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Sobin y col. 1954
Espiramicina	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Pinnert-Sindico y col. 1954
Josamicina	<i>Streptomyces narbonensis</i>	Osono y col. 1967
Midecamicina	<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	Niida y col. 1971
Rosaramicina	<i>Micromonospora rosaria</i>	Wagman y col. 1972
Leucomicina	<i>Streptoverticillium kitasatoensis</i>	Hata y col. 1953
Tilosina	<i>Streptomyces fradiae</i>	McGuire y col. 1961

La claritromicina y azitromicina (semisintéticos) han mostrado una actividad antimicrobiana superior a la eritromicina, además de minimizar los efectos secundarios.

Se ha aislado una gran cantidad de macrólidos de fuentes naturales, la mayoría de los cuales, más de 800, se han obtenido a partir de actinomicetos. Sin embargo, también pueden ser producidos por otros géneros bacterianos, por ejemplo a partir de mixobacterias se han obtenido alrededor de 100 y unos 40 a partir de otras bacterias. Otros organismos vivos también son productores de macrólidos, se han aislado alrededor de 200 a partir de hongos, 3 a partir de líquenes y 70 de algas. Unas 700 lactonas macrocíclicas se han obtenido a partir de plantas, aunque mayoritariamente son taninos o alcaloides; hay cerca de 200 compuestos producidos por invertebrados no insectos, la mayoría con citotoxicidad; los insectos producen unos pocos macrólidos simples y los vertebrados producen alrededor de 30 compuestos, obtenidos principalmente a partir de los lípidos de la piel superficial de los caballos. En total, se conocen más de 2000 compuestos macrólidos con una actividad biológica importante y variada, ya que pueden actuar como antivirales, antibacterianos, antifúngicos, antihelmínticos, fitotóxicos, insecticidas, antitumorales e inmunosupresores. Algunos de ellos pueden ser producidos por dos o más clases de organismos (Omura, 2002).

2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

Su estructura está caracterizada por la presencia de un gran anillo básico lactónico, una macrolactona (que da nombre al grupo) que puede tener de 8 a 62 átomos de carbono, al que se pueden unir azúcares aminados mediante enlaces glucosídicos. Las diversas sustituciones en dicho anillo han dado lugar a los macrólidos conocidos hasta ahora, siendo los de 14, 15 y 16 átomos de carbono los principales grupos utilizados como antibióticos de uso clínico.

Los macrólidos puros son incoloros y, en general, cristalinos. 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. Entre otras propiedades químicas presentan: poca solubilidad en agua, tienen aspecto cristalino blanco, son bases débiles que se inactivan en medio ácido, de ahí que se presenten en forma de sales o ésteres que son más resistentes a los ácidos.

Entre las propiedades químicas de los macrólidos destacan la basicidad (son bases débiles), por la presencia de la agrupación dietilamino en el residuo de azúcar, que les concede capacidad para formar sales; poca solubilidad en agua; aspecto cristalino e incoloro; estables en disoluciones neutras, pero en medio ácido se hidrolizan (por los enlaces glicosídicos) y en medio básico se saponifican los enlaces de lactona.

Algunos de los enlaces glicosídicos proporcionan cierta polaridad local a la molécula que está estrechamente relacionada con su afinidad por los ribosomas u otros sitios enlazantes.

La figura 3 muestra la estructura de algunos antibióticos macrólidos.

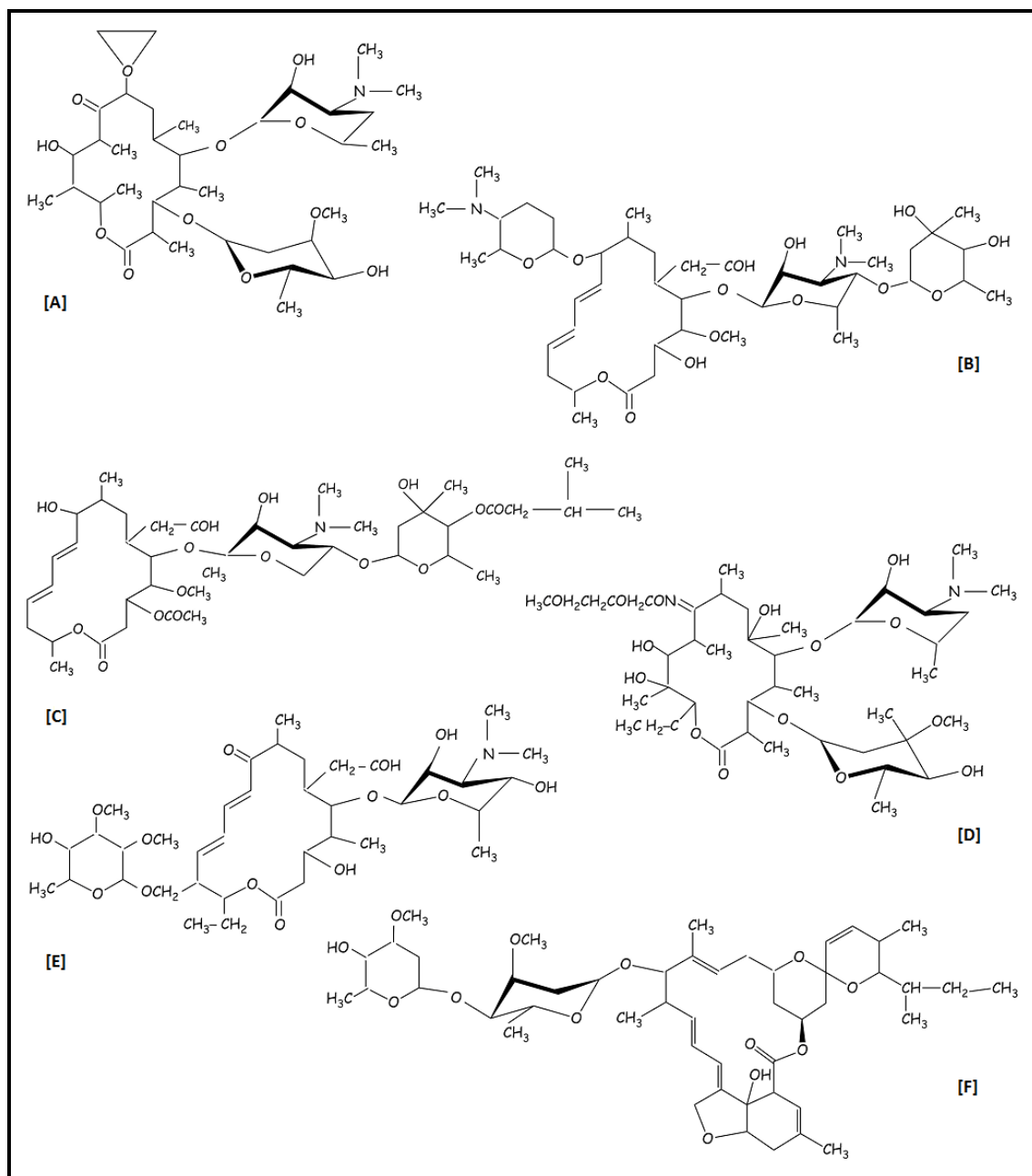


Figura 3: Estructura de los principales macrólidos (A: oleandomicina, B: espiramicina, C: josamicina, D: roxitromicina, E: tilosina, F: ivermectina)

2.2.1 Estructura de la eritromicina

La estructura de la eritromicina fue determinada en 1957 por Wiley y colaboradores. 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 en la figura 4. 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, 2002*).

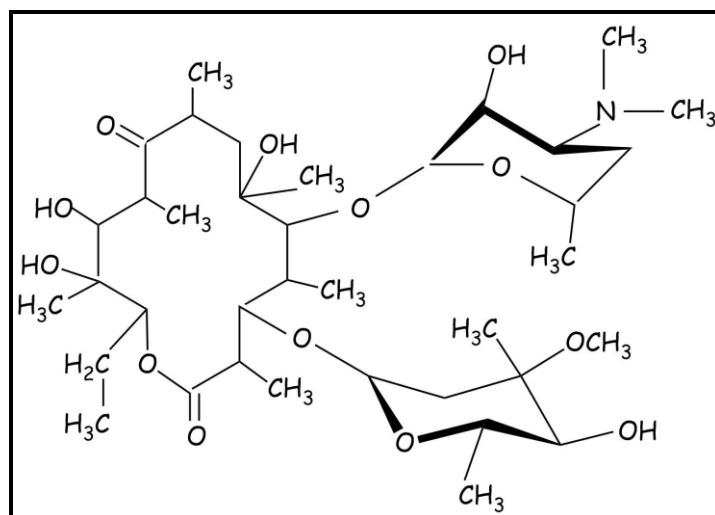


Figura 4: Estructura de la eritromicina

Los macrólidos naturales no siempre muestran las características químicas y propiedades biológicas deseables. Por ello, se han intentado mejorar mediante transformación química, modificando parte del anillo lactónico o los azúcares enlazados. Se ha ido buscando mejorar su espectro de actividad, posibles apariciones de resistencias, su farmacocinética o su toxicidad.

Su estructura básica se ha modificado mediante la introducción de nuevos grupos funcionales que permiten mejorar las propiedades farmacológicas y microbiológicas de los antibióticos, así como la adición de varios ésteres. Posteriormente, para obtener nuevos derivados se recurrió a técnicas de ingeniería genética, modificando sus vías biosintéticas (mutasíntesis). Con la utilización de ADN recombinante se lograron nuevos antibióticos híbridos en cultivos de *Saccharopolyspora erythraea* genéticamente manipulados. La combinación de estas técnicas de genética molecular con otras de química orgánica ha permitido obtener un número creciente de antibióticos macrólidos semisintéticos. Con estos nuevos macrólidos se han conseguido mejorar la actividad antimicrobiana y diversos aspectos farmacocinéticos, disminuyendo los efectos adversos, así como el número y la importancia de las interacciones farmacológicas.

2.3 CLASIFICACIÓN

La clasificación más útil de los antibióticos macrólidos es la basada en el tamaño del anillo de lactona, que constituye el núcleo de todas las moléculas de esta familia de compuestos, y hace que presenten diferentes tipos de actividad biológica. Los que

tienen actividad antibacteriana y han podido ser utilizados en medicina humana o veterinaria son aquellos que tienen un anillo lactónico con 14, 15 ó 16 átomos de carbono. En la tabla 4 se muestra esta clasificación diferenciándose además aquellos que son producidos naturalmente y los que se han obtenido por modificación de los anteriores.

Los dos grupos de mayor importancia para la medicina veterinaria son los de 14 y 16 átomos.

Tabla 4: Clasificación de los macrólidos atendiendo al número de átomos de carbono y a su origen (Portillo, 2002)

ANILLO LACTÓNICO DE 14 ÁTOMOS		ANILLO LACTÓNICO DE 15 ÁTOMOS	ANILLO LACTÓNICO DE 16 ÁTOMOS	
Naturales	Semisintéticos	Semisintéticos	Naturales	Semisintéticos
Eritromicina Oleandomicina Esporeamicina	Claritromicina Roxitromicina Diritromicina Fluritromicina	Azitromicina	Espiramicina Josamicina Midecamicina Leucomicina o Kitasamicina Tilosina Rosaramicina Ivermectina	Rokitamciina Miocamicina

2.4 USOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, 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 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.

Los macrólidos se suelen utilizar en el tratamiento de:

- ✓ Infecciones respiratorias: se suele elegir ERY para tratar infecciones causadas por bacterias intracelulares.

- ✓ Otitis media y faringitis: en infecciones estreptocócicas y causadas por *Arcanobacterium haemolyticum* en pacientes alérgicos a penicilina.
- ✓ Infecciones de piel y partes blandas: causadas por *S. pyogenes*, cepas de *S. aureus* sensibles y *C. tetani* en pacientes alérgicos a penicilina.
- ✓ Infecciones gastrointestinales: para el tratamiento de la gastroenteritis.
- ✓ Infecciones genitales: producidas por *N. gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*.

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, impidiendo el fenómeno de la traslocación. No se unen a proteínas ribosomales de células de mamíferos. Los macrólidos que disponen de 14 y 15 átomos de C, como la eritromicina, se unen a la proteína L₂₂ y actúan bloqueando el transporte del peptidil-ARN de transferencia desde el lado dador (*locus P*) al receptor (*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.

Generalmente son bacteriostáticos, aunque pueden ser bactericidas dependiendo del microorganismo, de las concentraciones de antibiótico, del tiempo de exposición o de la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias durante el ataque del antibiótico.

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.

Ejercen su efecto sólo en los microorganismos que se encuentran en proceso de replicación.

Son antibióticos de medio espectro que presentan actividad frente a cocos grampositivos y gramnegativos, bacilos grampositivos y ciertos bacilos gramnegativos 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, 1998).

La potencia antimicrobiana de un antibiótico se valora en función de los siguientes parámetros de actividad *in vitro*:

- ✓ Concentración inhibitoria mínima (CMI): concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en 10^5 unidades formadoras de colonias en 1 mL de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación.
- ✓ Concentración bactericida mínima (CBM): concentración mínima capaz de destruir 10^5 unidades formadoras de colonias en 1 mL de medio de cultivo tras 18-24 horas de incubación.
- ✓ Efecto postantibiótico (EPA): inhibición del crecimiento bacteriano que se mantiene durante un tiempo determinado tras la exposición de un microorganismo a un antibiótico (Laosa, 2004).

En la tabla 5 se detalla la actividad antibacteriana de varios antibióticos macrólidos frente a especies bacterianas sensibles.

La eritromicina es el antibiótico macrólido más antiguo y aún es el más importante, debido a que constituye una útil alternativa a la penicilina G. Es uno de los antibióticos disponibles más seguro. En la práctica veterinaria está indicada para los casos de infecciones producidas por *Staphylococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (como primera opción) y *Corynebacterium sp.*, *Mycoplasma sp.*, *Escherichia Coli*, *Haemophilus sp.*

Tabla 5: Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de macrólidos frente a cepas bacterianas sensibles

	CMI (mg/L)				
	Eritromicina	Claritromicina	Diritromicina	Roxitromicina	Azitromicina
<i>S. aureus MS</i>	0,06-0,25	0,03-0,25	0,06-0,25	0,06-0,25	0,06-0,5
<i>S. pneumoniae</i>	0,01-0,06	0,01-0,03	0,01-0,06	0,03-0,06	0,03-0,12
<i>S. pyogenes</i>	0,01-0,03	0,01-0,03	0,03-0,1	0,03-0,1	0,03-0,12
<i>H. influenzae</i>	0,5-4	1-8	2-8	1-8	0,25-1
<i>B. catarrhalis</i>	0,03-0,25	0,03-0,25	0,12-0,25	0,12-1	0,03-0,06
<i>B. pertussis</i>	0,01-0,03	0,01-0,03	0,03	0,01-0,03	0,01-0,03
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,06-1	0,06-0,5	0,5-4	0,12-1	0,03-0,06
<i>C. jejuni</i>	0,06-1	0,12-1	0,12-1	0,25-4	0,03-0,5
<i>H. pylori</i>	0,12-0,25	0,03-0,06	0,25-0,5	0,12-0,25	0,25
<i>B. burgdoferi</i>	0,03-0,16	0,02-0,06	ND	0,02-0,12	0,02-0,04
<i>Listeria spp.</i>	0,13-0,25	0,03-0,13	1-8	0,13-0,5	0,25-1

Posee actividad elevada frente a *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae*. A pesar de la aparición de resistencia de estos gérmenes en los últimos años, es un antibiótico de alternativa en pacientes alérgicos a penicilina. Su actividad frente a otros gram positivos es variable. *S. aureus* meticilino-resistente usualmente es resistente a eritromicina y muchas cepas de *S. aureus* meticilino sensible, por lo que en general no son de primera línea para tratar infecciones estafilocócicas severas. Son resistentes un alto porcentaje de *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.* y alrededor de 20 % de *Clostridium spp.* y cocos anaerobios. Tienen actividad frente a algunos bacilos gram negativos: *M. catarrhalis*, *Neisseria spp.*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus ducrey* y *Campylobacter jejuni*. También es activa frente a *Treponema pallidum* y *Gardnerella vaginalis*, aunque no es apropiada para tratar las vaginosis bacterianas porque se inactivaría en el medio ácido de la vagina. *H. influenzae* tienen un alto nivel de resistencia. Tiene buena actividad frente a gérmenes de crecimiento intracelular o poco sensibles a otros antibióticos: *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.*, *Ureaplasma urealyticum* y algunas rickettsias.

La eritromicina ejerce su acción bacteriostática al inhibir la síntesis proteica uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas, evitando así el crecimiento bacteriano.

La eritromicina es el fármaco de elección 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 nuevos macrólidos como azitromicina y claritromicina, cefalosporinas y clindamicina, debido a su intolerancia por el organismo y a la dificultad de su monitorización (Omura, 2002).

La roxitromicina es menos activa in vitro que la eritromicina frente a la mayoría de los microorganismos, con excepción de Legionella, ante la que presenta el doble de actividad. Es una alternativa para tratar empíricamente las neumonías adquiridas en la comunidad, ocasionadas por patógenos típicos y atípicos.

La espiramicina posee mayor actividad que otros macrólidos frente a *Toxoplasma gondii*. Se usa para la profilaxis de la transmisión vertical de la toxoplasmosis cuando la madre adquiere la infección aguda en el curso del embarazo. No cura al feto infectado pero reduce el riesgo de transmisión a 50 %. Es un antibiótico de alternativa de otros macrólidos en infecciones comunitarias del tracto respiratorio inferior. Sin embargo, su actividad antibacteriana es sensiblemente inferior a la de la eritromicina.

La espiramicina posee actividad bacteriostática, inhibiendo la síntesis proteica por su unión a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, y actividad bactericida a concentraciones elevadas.

2.5 FARMACOCINÉTICA

Aunque las diferencias entre macrólidos en cuanto a la actividad antibacteriana son pequeñas, las diferencias farmacocinéticas y la biodisponibilidad sí son importantes. Los macrólidos clásicos (oleandomicina, claritromicina, miocamicina) tienen una buena y rápida absorción digestiva, que no se altera por la presencia de alimentos. Los nuevos macrólidos (roxitromicina, claritromicina, azitromicina) son estables en medio ácido, por lo que se absorben por vía oral, superando así el principal problema de la eritromicina, su inestabilidad en el medio ácido del estómago. La administración de estos antibióticos durante, o inmediatamente después de las comidas, reduce su biodisponibilidad en un 25 – 50 %, aumentando también el tiempo de absorción, y por tanto el tiempo que tarda en alcanzarse la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$). La baja biodisponibilidad por vía oral de la eritromicina base es mejorada por los nuevos

compuestos: es del 30-60% con eritromicina (dependiendo del éster y de la ingesta de alimento), del 37% con azitromicina, del 55% con claritromicina, del 60% con espiramicina o josamicina, del 80% con miocamicina y del 90% con roxitromicina. Los macrólidos son solubles en lípidos y se ionizan poco, por lo que se distribuyen bien en casi todos los tejidos, salvo en el sistema nervioso central. Los macrólidos de 14 y 16 átomos de carbono proporcionan generalmente mayores concentraciones tisulares que concentraciones en plasma, debido a su elevada liposolubilidad, y los niveles en los tejidos persisten durante largo tiempo. Atraviesan la barrera placentaria y están presentes en la leche materna, donde alcanzan concentraciones que son aproximadamente el 50 % de la plasmática. Los diferentes macrólidos muestran marcadas diferencias en la distribución tisular y en la concentración sérica.

Los macrólidos se metabolizan en el hígado por la acción del sistema microsomal hepático, siendo la tasa de excreción urinaria baja y excretándose fundamentalmente por el tracto biliar; alcanzan en la bilis concentraciones mayores a las plasmáticas. Aunque sufren reabsorción intestinal, se eliminan principalmente a través de las heces y, en menor proporción, por la orina, principalmente por filtración glomerular, entre 2 % y 5 % de la dosis oral, y entre 15 % y 20 % de la dosis intravenosa. Los niveles altos en sangre parecen estar asociados con un incremento de su excreción renal.

La eritromicina sigue una farmacocinética similar a los antibióticos de su grupo. La eritromicina base se inactiva por el jugo gástrico, pero para aumentar su biodisponibilidad se presenta en forma de sales (etilsuccinato, estolato, estereato). 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 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 (concentraciones 10 veces mayores que las de plasma), aumentando las concentraciones 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.

La roxitromicina es estable en medio ácido y se absorbe bien por vía digestiva. Tiene una biodisponibilidad de 70 % y una vida media de 12 horas, lo que permite administrarla 1 o 2 veces diarias.

La espiromicina se absorbe por vía oral de forma incompleta, presentando una biodisponibilidad del 33 % al 39 %. Su administración con alimentos reduce esta biodisponibilidad aproximadamente en un 50 %. Alcanza altas concentraciones en tejidos como los pulmones, bronquios, amígdalas y el tejido pélvico femenino. Atraviesa la placenta y se distribuye en la leche materna. El 80 % de una dosis se elimina en la bilis y entre el 4 % y el 14 % se excreta vía renal. Tiene una vida media de 5,5 horas.

2.6 RESISTENCIA MICROBIANA

El consumo de forma masiva con fines terapéuticos de los antibióticos, en bastantes ocasiones innecesario o cuestionable, desemboca en la aparición de resistencias microbianas. El problema se agrava con su utilización de forma profiláctica (antes de que aparezca la infección para prevenirla) y con el uso indiscriminado como promotores del crecimiento en animales. La utilización de antibióticos en el tratamiento de catarros y otras infecciones virales contra las que los antibióticos no tienen efecto, elimina las bacterias sensibles y permite el desarrollo de otras resistentes. Su utilización en animales ha supuesto la aparición de resistencias generalizadas y la contaminación de productos alimentarios con bacterias resistentes, como las del género *Salmonella* o *Campylobacter*. Se ha puesto de manifiesto que, además, puede producirse la transferencia al hombre de cepas resistentes en animales, bien directamente, o bien a través de la cadena alimentaria.

La primera vez que se detectó resistencia a macrólidos fue a mediados de los años 50, poco después del desarrollo de la eritromicina, con *Staphylococcus aureus*. Posteriormente se han ido detectando otras especies resistentes, por ejemplo la resistencia de *Campylobacter coli* a macrólidos se cree que es debida al empleo de tilosina y virginiamicina como promotores del crecimiento en el cerdo. La aparición de nuevas resistencias puede reducir considerablemente la utilidad clínica de este grupo de antibióticos.

La resistencia de los microorganismos a los macrólidos puede deberse a diferentes mecanismos y puede ser natural o inducible.

Los microorganismos pueden presentar los siguientes mecanismos de resistencia (Caballero, 2009):

- ✓ Resistencia intrínseca. Mecanismo natural de las enterobacterias mediante el cual el macrólido no atraviesa la membrana bacteriana debido a una reducción de su permeabilidad.
- ✓ Modificación del ARN Ribosomal. Se modifica la diana sobre la que actúa el antibiótico, impidiendo que éste se fije a la bacteria. Puede ser inducible o constitutivo.
- ✓ Bomba de flujo. Se desarrolla a través de una bomba que expulsa activamente al antibiótico del interior bacteriano. Es específico en contra de los macrólidos de 14 y 15 átomos.
- ✓ Modificación enzimática. Se ha planteado que las enterobacterias producen una estearasa que modifica, por hidrólisis, la estructura química de los macrólidos.

Además se pueden producir resistencias cruzadas entre los diferentes macrólidos, siendo más frecuentes entre los que poseen 14 ó 15 átomos de C en su anillo. E incluso se han detectado casos de resistencia cruzada entre los macrólidos y otros grupos como las lincosamidas y las estreptograminas (Leclercq, 1991).

Las primeras resistencias a eritromicina por parte de estreptococos b-hemolíticos del grupo A (*S. pyogenes*) fueron descritas en Japón. En Finlandia, a partir de 1989, se observó un aumento de cepas de *S. pyogenes* resistentes a la eritromicina. También se ha incrementado la resistencia de los neumococos, detectándose en un 29 % de las cepas en Francia (gran consumidor de macrólidos), en un 6,5 % en Gran Bretaña, y en España el porcentaje depende de la población considerada, siendo del 20 – 30 % en la población infantil, y del 15 – 20 % en la población adulta. Otras cepas que han desarrollado resistencias a la eritromicina son: *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphilococo aureus*, estreptococos del grupo B y *S. viridans*. Las resistencias a la eritromicina se van desarrollando de forma escalonada y a tasas iguales o menores que las resistencias a las penicilinas naturales.

2.7 PROBLEMÁTICA DEL EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS

La Penicilina G fue el primer antibiótico utilizado en veterinaria (1947). Desde entonces el empleo de los antibióticos se ha convertido en una práctica habitual. Los antibióticos se usan en los animales productores de alimentos para tratar o para prevenir las enfermedades y también a nivel subterapéutico. Se administran por distintas vías: oral, intravenosa, intramamaria o intrauterina. En teoría, todas estas vías pueden dar lugar a la aparición de residuos en los alimentos de origen animal como leche, carne o huevos. Se estima que aproximadamente un 1 % de los alimentos contienen residuos de antibióticos a baja concentración.

Los tratamientos terapéuticos se emplean en animales que están enfermos, pero además, desde el descubrimiento en los años 40 de que bajas concentraciones de antibióticos podían mejorar el índice de crecimiento en animales domésticos, se han venido utilizando ampliamente estos agentes antibacterianos como promotores del crecimiento en producción animal.

Esto ha conducido a un incremento de la resistencia de bacterias de origen animal y humano, particularmente de bacterias Gram (-) (*Salmonella* spp. y *Escherichia coli*) (Anadón, 2007).

Por estas razones, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana, comportando una serie de riesgos:

- ✓ *Problemas sanitarios*: El consumo de productos animales que contengan residuos de antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa una dosis equivalente. Los efectos tóxicos son, en general, poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades, pero pueden producir reacciones alérgicas en individuos sensibles.

Otro efecto peligroso es, desde el punto de vista sanitario y como ya se ha visto, el desarrollo de resistencias bacterianas, que se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre. La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que están siendo tratados o están consumiendo antibióticos con el alimento. Otra vía de

transmisión más general sería el consumo o manipulación de productos de origen animal, como la leche, los huevos y la carne, que contengan flora resistente a antibióticos. La leche generalmente se pasteuriza y aunque es poco probable que contenga bacterias resistentes puede tener residuos de antibióticos por haber recibido el ganado tratamientos terapéuticos con estos compuestos.

- ✓ *Problemas tecnológicos:* Los residuos de antibióticos dan lugar a fermentaciones anormales y fallos en los iniciadores de los productos cárnicos fermentados. La presencia de estos residuos en la leche puede inhibir el crecimiento de los microorganismos requeridos para la fabricación de queso o yogur.

La legislación de la Unión Europea, en lo que se refiere al contenido de fármacos de uso veterinario en los alimentos obtenidos de animales tratados con dichos fármacos, exige que no contengan residuos que puedan constituir una amenaza para la salud del consumidor.

Así se definen los Límites Máximos de Residuos (LMR o MRL en inglés) como:

“El contenido de un determinado producto veterinario que se considera admisible en un producto alimenticio; este límite se basará en el tipo y en la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana” (Molina, 2005).

La tabla 6 muestra los LMRs de eritromicina y tilosina en muestras de leche.

Tabla 6: Límites Máximos de Residuos (LMRs) de antibióticos macrólidos en muestras de leche procedente de cualquier especie productora de alimentos (Reglamento CE 1181/2002 que modifica el anexo I del Reglamento CEE 2377/90)

LMRs DE MACRÓLIDOS EN LECHE ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ o ppb)	
<i>Eritromicina</i>	40
<i>Tilosina</i>	50

Antes de emplear cualquier medicamento en veterinaria, en animales productores de alimentos, éstos deben ser autorizados por la Unión Europea; todas las sustancias

farmacológicas activas que contengan deben ser sometidas a una evaluación de seguridad y residuos para, posteriormente, ser incluidas en la Regulación (*Directiva 96/23/CEE, Reglamento UE 2377/90*).

La evaluación de residuos de acuerdo al *Reglamento 2377/90* es llevada a cabo por el *Comité de Productos Médicos para Uso Veterinario* de la *Agencia Europea del Medicamento*, compuesto por un comité de expertos en residuos y seguridad.

2.8 INTERÉS ANALÍTICO

El estudio de la presencia de residuos de antibióticos macrólidos en muestras de alimentos ha quedado ya de manifiesto que tiene un claro interés desde el punto de vista analítico y de la seguridad alimentaria.

Las muestras de alimentos, y en especial las de leche de oveja, son complejas, y requieren tratamientos específicos que permitan su limpieza, eliminando las posibles sustancias interferentes, y al mismo tiempo, la extracción de los analitos de la forma más selectiva y cuantitativa posible. Es imprescindible un buen método de tratamiento de la muestra para obtener unos extractos óptimos para el análisis posterior mediante las técnicas instrumentales adecuadas, ya que el resultado de la extracción de los analitos de la matriz va a condicionar el éxito del análisis.

Por otra parte, los límites máximos permitidos por la legislación obligan al empleo de métodos que sean suficientemente sensibles y selectivos, ya que se requieren muy bajos límites de detección.

Además, el hecho de que se puedan encontrar varios antibióticos con estructuras similares simultáneamente en la misma muestra, conduce a la necesidad de utilizar técnicas que permitan su separación cuantitativa, además de su detección.

Todo esto justifica la necesidad de desarrollar nuevos métodos de tratamiento de muestra que permitan la extracción de los analitos presentes en muestras complejas y en concentraciones por debajo de los límites que establece la legislación, así como de poner a punto métodos instrumentales que permitan su separación y determinación analítica.

3 LECHE

Según el Código Alimentario Español se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. Mediante tratamientos tecnológicos adecuados se pueden obtener, a partir de la leche, los denominados derivados de la leche:

- ✓ Nata, producto rico en materia grasa separado de la leche por reposo o por centrifugación.
- ✓ Mantequilla, producto graso obtenido por procedimiento mecánico (batido) de la leche o nata higienizadas.
- ✓ Quesos, producto fresco o madurado obtenido por separación del suero, después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, nata, suero de mantequilla o de sus mezclas.
- ✓ Sueros lácteos, líquidos formados por parte de los componentes de la leche que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos. Son, suero del queso, suero de mantequilla y suero en polvo.
- ✓ Caseína, la materia proteica separada por procedimientos tecnológicos autorizados de las demás proteínas de la leche desnatada.
- ✓ Requesón, producto obtenido precipitando por el calor, en medio ácido, las proteínas que existen en el suero del queso para formar una masa blanda.

El consumo de leche proporciona al organismo un mayor refuerzo inmunológico. Otros países, como Francia, Italia o Grecia, cuentan con una larga tradición de productos elaborados con leche de oveja, y un alto consumo de quesos y otros derivados, como el yogur y la ricota, que además poseen propiedades anti-cancerígenas y menos colesterol. Sin embargo, en España, la leche de oveja y sus derivados, a excepción del queso, no están muy presentes en la dieta, aunque poco a poco va aumentando su producción y su consumo.

Hay que resaltar las propiedades beneficiosas de la leche y sus derivados en una dieta saludable, dado que son la principal fuente de calcio y de vitaminas A, B, y D, además de las propiedades del yogur como alimento probiótico, es decir que aporta bacterias beneficiosas a la flora intestinal.

La leche de oveja posee características ventajosas para producir queso, yogur y otros productos y, a la vez, aporta beneficios para la nutrición de las personas, por tener el doble de grasa y de proteína respecto de la leche de vaca, además de ser más digestiva que ésta.

Cuanto mejor sea la alimentación de las ovejas (más forraje aparezca en la dieta de los animales), el producto lácteo final va a contener una mayor proporción de ácidos grasos beneficiosos para la salud humana, que permiten reducir el colesterol y disminuir el riesgo de contraer cáncer, por ejemplo.

El verdadero queso roquefort está hecho con leche de oveja y tiene denominación de origen en Francia. También el feta, de los griegos, y el pecorino, de los italianos. Dicen que “Se pueden encontrar quesos de oveja en cada vallecito de Europa”. En España, uno de los quesos más conocidos y valorados es el Queso Manchego, elaborado con leche de oveja de raza manchega.

Existen dos variedades de oveja manchega: una blanca, con las mucosas despigmentadas, que es la más numerosa, y otra negra, con manchas claras en cabeza y partes distales de su anatomía. Sin embargo, no existe diferencia en la calidad de la leche que producen. Estas ovejas son sometidas a un control morfológico y sanitario muy estricto.

El Consejo Regulador es el órgano encargado de vigilar el uso de la Denominación de Origen Protegida, velando por que los quesos amparados por ella cumplan los requisitos de calidad y procedencia establecidos en sus especificaciones técnicas de calidad.

3.1 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA LECHE

Dejando a un lado que su principal componente, casi un 84 %, es el agua, podemos decir que la leche tiene tres componentes: la grasa, los hidratos de carbono y la proteína. A diferencia de la leche de vaca o de cabra, la leche de oveja es la que más grasa tiene, más de un 6 %, en comparación con las anteriores que no alcanzan el 4 %. Sin embargo esta grasa posee un alto contenido en triglicéridos de cadena media, más fácilmente digeribles, y que estimulan el metabolismo y reducen el tamaño de las células adiposas de nuestro cuerpo así como los niveles de colesterol. La leche de oveja es también la que más proteína tiene, concretamente un 5,29 %. Destaca frente

a las de vaca, con un 3,06 % y la de cabra con un 3,70 %. Y por último, en cuanto a los hidratos de carbono, la leche de oveja contiene un 4,7 %, todo ello lactosa, al igual que la leche de vaca. La leche de cabra es un poco inferior, un 4,2 %. Centrándonos ya en la leche de oveja, son el calcio y el potasio los minerales más presentes en su composición. En una ración de 100 gramos, encontramos 183 y 182 mg respectivamente. Pero también están presentes otros minerales, como el hierro (0,07 mg), el yodo (5 mg), el magnesio (11 mg), el zinc (0,43 mg), el selenio (0,9 mg), o el sodio (30 mg). El Palmítico C16 (1,41 g) y el Oleico C18 (1,28 g) son los ácidos grasos mayoritarios. Y entre los aminoácidos destaca en mayor medida el ácido glutámico (998 mg), pero también la Prolina o la Leucina, en torno a los 500 mg (GAG, 2014).

Las tablas 7 a 10 muestran el contenido mineral y de vitaminas, así como los ácidos grasos, aminoácidos e hidratos de carbono presentes en la leche de oveja.

En el momento de su venta, según el Código Alimentario Español, la leche de oveja debe reunir las siguientes características:

- ✓ Materia grasa, como mínimo 7 % en peso.
- ✓ Lactosa, como mínimo 4,6 % en peso.
- ✓ Proteínas, como mínimo 4,7 % en peso.
- ✓ Cenizas, como mínimo 1 % en peso.
- ✓ Extracto seco magro, como mínimo 10,3 % en peso.
- ✓ Acidez, expresada en ácido láctico, como máximo 0,3 g por 100 mL de leche.
- ✓ Impurezas macroscópicas, como máximo grado 1.
- ✓ Prueba de la reductasa microbiana con azul de metileno, más de dos horas.

El Queso Manchego se define, según la Fundación Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego, como “queso de pasta prensada elaborado con leche de oveja de la raza manchega, con una maduración mínima de 30 días, si el queso tiene un peso inferior a 1,5 kg, y de 60 días, para el resto de formatos, y máxima de 2 años”.

Las características analíticas que debe tener la leche empleada en la fabricación de Queso Manchego son:

- ✓ Materia grasa: 6,5 % mínimo.
- ✓ Proteínas: 4,5 % mínimo.

- ✓ Extracto seco útil: 11 % mínimo.
- ✓ pH: 6,5 – 7.
- ✓ Punto crioscópico: $\leq - 0,550$ °C.
- ✓ Ausencia de productos medicamentosos.
- ✓ Las condiciones microbiológicas y de presencia de sustancias farmacológicamente activas exigidas son las indicadas en la normativa europea vigente.

Tabla 7: Leche de oveja. Aporte por 100 g de porción comestible

		Minerales		Vitaminas	
<i>Energía [kcal]</i>	96,70	<i>Calcio [mg]</i>	183,00	<i>Vit. B1 Tiamina [mg]</i>	0,05
<i>Proteína [g]</i>	5,29	<i>Hierro [mg]</i>	0,07	<i>Vit. B2 Riboflavina [mg]</i>	0,51
<i>Hidratos carbono [g]</i>	4,70	<i>Yodo [mg]</i>	5,00	<i>Eq. niacina [mg]</i>	1,48
<i>Fibra [g]</i>	0,00	<i>Magnesio [mg]</i>	11,00	<i>Vit. B6 Piridoxina [mg]</i>	0,08
<i>Grasa total [g]</i>	6,26	<i>Zinc [mg]</i>	0,43	<i>Ac. Fólico [μg]</i>	5,00
<i>AGS [g]</i>	3,50	<i>Selenio [μg]</i>	0,90	<i>Vit. B12 Cianocobalamina [μg]</i>	0,51
<i>AGM [g]</i>	1,65	<i>Sodio [mg]</i>	30,00	<i>Vit. C Ac. ascórbico [mg]</i>	4,30
<i>AGP [g]</i>	0,25	<i>Potasio [mg]</i>	182,00	<i>Retinol [μg]</i>	50,00
<i>AGP / AGS</i>	0,07	<i>Fósforo [mg]</i>	0,00	<i>Carotenoides (Eq. β carotenos) [μg]</i>	5,00
<i>(AGP + AGM) / AGS</i>	0,54			<i>Vit. A Eq. Retinol [μg]</i>	51,00
<i>Colesterol [mg]</i>	11,00			<i>Vit. D [μg]</i>	0,18
<i>Alcohol [g]</i>	0,00				
<i>Agua [g]</i>	83,80				

AGS: Ácidos grasos saturados; AGM: Ácidos grasos monoinsaturados; AGP: Ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 8: Leche de oveja. Aporte por 100 g de porción comestible (Ácidos grasos)

<i>Mirístico C14:0 [g]</i>	0,63	<i>Palmitoleico C16:1 [g]</i>	0,08	<i>Araquidónico C20:4 [g]</i>	0,00
<i>Palmítico C16:0 [g]</i>	1,41	<i>Oleico C18:1 [g]</i>	1,28	<i>Eicosapentaenoico C20:5 [g]</i>	0,00
<i>Esteárico C18:0 [g]</i>	0,61	<i>Linoleico C18:2 [g]</i>	0,19	<i>Docosapentaenoico C22:5 [g]</i>	0,00
<i>Omega 3 [g]</i>	0,00	<i>Linoléico C18:3 [g]</i>	0,06	<i>Docosaheenoico C22:6 [g]</i>	0,00
<i>Ac. Grasos cis</i>	0,00	<i>Omega 6 [g]</i>	0,00	<i>Omega 3 / Omega 6</i>	0,00
<i>AGP cis</i>	0,00	<i>Ac. Grasos trans</i>	0,00	<i>AGM cis</i>	0,00
		<i>AGM trans</i>	0,00	<i>AGP trans</i>	0,00

Tabla 9: Leche de oveja. Aporte por 100 g de porción comestible (Aminoácidos)

<i>Alanina [mg]</i>	205,00	<i>Glicina [mg]</i>	103,00	<i>Prolina [mg]</i>	513,00
<i>Arginina [mg]</i>	168,00	<i>Histidina [mg]</i>	121,00	<i>Serina [mg]</i>	298,00
<i>Ac. aspártico [mg]</i>	429,00	<i>Isoleucina [mg]</i>	261,00	<i>Tirosina [mg]</i>	242,00
<i>Ac. glutámico [mg]</i>	998,00	<i>Leucina [mg]</i>	494,00	<i>Treonina [mg]</i>	224,00
<i>Cistina [mg]</i>	56,00	<i>Lisina [mg]</i>	429,00	<i>Triptófano [mg]</i>	65,00
<i>Fenilalanina [mg]</i>	242,00	<i>Metionina [mg]</i>	131,00	<i>Valina [mg]</i>	299,00
		<i>Hidroxiprolina [mg]</i>	0,00		

Tabla 10: Leche de oveja. Aporte por 100 g de porción comestible (Hidratos de carbono)

Hidratos de carbono simples		Ácidos orgánicos		Fitosteroles	
<i>Glucosa [g]</i>	0,00	<i>Ac. orgánicos disponibles [g]</i>	0,12	<i>Fitosteroles totales [mg]</i>	0,00
<i>Fructosa [g]</i>	0,00	<i>Oxálico [g]</i>	0,00	<i>Beta-sitosterol [mg]</i>	0,00
<i>Galactosa [g]</i>	0,00	<i>Cítrico [g]</i>	0,12	<i>Campesterol [mg]</i>	0,00
<i>Sacarosa [g]</i>	0,00	<i>Málico [g]</i>	0,00	<i>Estigmasterol [mg]</i>	0,00
<i>Lactosa [g]</i>	4,70	<i>Ac. Tartárico [g]</i>	0,00	<i>Estigmasterol D7 [mg]</i>	0,00
<i>Maltosa [g]</i>	0,00	<i>Ac. Acético [g]</i>	0,00	<i>Brásica-esterol [mg]</i>	0,00
<i>Oligosacáridos [g]</i>	0,00	<i>Ac. Láctico [g]</i>	0,00	<i>Avenaesterol D5 [mg]</i>	0,00
				<i>Avenaesterol D7 [mg]</i>	0,00
				<i>Otros fitosteroles [mg]</i>	0,00

Hidratos de carbono no disponibles	
<i>Polisac. no celu. solubles [g]</i>	0,00
<i>Polisac. no celu. insolubles [g]</i>	0,00
<i>Celulosa [g]</i>	0,00
<i>Lignina [g]</i>	0,00
<i>Almidón [g]</i>	0,00

3.2 CONTROL DE LA CALIDAD DE LA LECHE

La FAO considera que una leche cruda es de buena calidad cuando no contiene residuos ni sedimentos; tiene propiedades organolépticas normales; tiene un bajo contenido de bacterias; no contiene antibióticos ni detergentes, y tiene una composición y acidez dentro de los parámetros aceptados. La calidad de la leche cruda determina la calidad de los productos lácteos derivados. Para conseguir esta calidad es necesario aplicar buenas prácticas de higiene en todas las fases de la cadena láctea.

La legislación establece todo un proceso de control desde la cría y el ordeño hasta que la leche o derivados están aptos para su consumo. Se siguen una serie de pautas que afectan a las diferentes partes del proceso, en relación a la ganadería e higiene durante su producción y recogida. De modo general se debe cumplir:

- ✓ El ganado no puede presentar síntomas de enfermedades contagiosas transmisibles al hombre por la leche.
- ✓ El ganado debe estar en un buen estado de salud general, no presentando trastornos que puedan contaminar la leche y, en particular, no han de padecer enfermedades del aparato genital con flujo, enteritis con diarrea acompañada de fiebre ni inflamaciones perceptibles de la ubre.
- ✓ Los animales no presentarán ninguna herida en la ubre que pueda alterar la leche.
- ✓ En el caso de administración de productos o sustancias autorizados, se respetará el plazo de espera prescrito para dichos productos o sustancias.

Existen dos tipos de peligros que pueden afectar a la calidad de la leche:

- ✓ *Microbiológicos*. La leche, debido a su gran contenido de nutrientes y alta humedad, es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, tanto beneficiosos como nocivos. Estos pueden llegar a la leche a partir del medio ambiente o de los propios animales lecheros.
- ✓ *Químicos*. La leche puede contaminarse con sustancias químicas (detergentes, desinfectantes, antiparasitarios, antibióticos, herbicidas, plaguicidas, fungicidas) a través de los piensos o el agua consumidos por los animales, o por un mal control del equipo de ordeño, el entorno o las instalaciones de almacenamiento de la leche.

La Fundación Consejo Regulador de la Denominación de Origen Queso Manchego establece además una serie de requisitos muy estrictos durante la elaboración de estos quesos para otorgarles y certificar la calidad como tal.

3.3 MASTITIS OVINA

La mastitis es una de las enfermedades más comunes que afecta a las ovejas y constituye uno de los mayores problemas en la producción lechera. Es una inflamación de la glándula mamaria que puede estar ocasionada por heridas, estrés o por infecciones bacterianas, que pueden ser causadas por *Streptococcus*, *Staphylococcus Aureus*, *Pasturella haemolytica*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas* y coliformes como *Escherichia coli*. Pueden transmitirla a la oveja sus corderos, si tienen una enfermedad respiratoria producida por *Pasturella haemolytica*, causante de neumonía, o si tienen heridas en la boca.

Puede presentarse con síntomas, ocasionando cambios en la ubre, denominada mastitis clínica, que puede ser crónica o aguda, o sin síntomas evidentes, denominada mastitis subclínica, en la que se produce una disminución de la producción lechera de la oveja y la aparición de abscesos duros en sus ubres. Esta última es la más preocupante, pues puede pasar desapercibida.

Esta enfermedad puede dar lugar a importantes pérdidas económicas, puesto que disminuye la producción de leche, hay partidas de leche que es necesario desechar, se tiene que alimentar a los corderos con biberón, se requiere la intervención de un veterinario y requiere la aplicación de tratamientos con antibióticos, sin olvidar que puede llegar a producirse la pérdida del animal.

No existe mucha información sobre el tratamiento de mastitis ovina, ya que generalmente se extrapola lo existente para bovinos. Sin embargo, algunos estudios muestran buenos resultados con el uso de algunos antibióticos como tilmicosina, tobramicina, enrofloxacina, penicilina o espiramicina. Los períodos de retirada necesarios para evitar posteriores residuos en la leche parecen ser más prolongados en las ovejas que en las vacas. Las reglas europeas establecen 7 días como tiempo mínimo de retirada (*Suárez*).

3.4 LEGISLACIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron en 1963 la Comisión del Codex Alimentarius, cuya función es elaborar las normas y directrices alimentarias, así como los textos afines, con la finalidad de proteger la salud del consumidor, garantizar la aplicación de prácticas leales en el comercio de alimentos y promover la

coordinación de todas las normas alimentarias elaboradas por las organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales. El Codex Alimentarius se ha convertido en la fuente de referencia mundial. El Codex ha elaborado varias normas relativas a la leche y productos lácteos.

El *Reglamento (CE) nº 178/2002* establece la necesidad para las empresas alimentarias de poner en práctica, a partir del 1 de enero de 2005, sistemas que permitan en todas las etapas de producción, transformación y distribución, asegurar el seguimiento o trazabilidad de los alimentos. Con el fin de satisfacer los objetivos del citado Reglamento, nace el *Real Decreto 217/2004* con medidas que pretenden regular la trazabilidad de la leche, a través de la identificación y registro de todos los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y también el registro de los movimientos de la leche de vaca cruda destinada al consumo humano. Para ello se crea la base de datos llamada LETRA Q (LEche cruda de vaca, TRAzabilidad y QualiDad).

En el año 2004 la Unión Europea publicó una serie de Reglamentos denominados “Paquete de Higiene”, que establecen el marco legal de la seguridad alimentaria en Europa y son de aplicación obligatoria en la industria agroalimentaria; se extienden los requisitos establecidos en materia de higiene y seguridad a toda la cadena alimentaria (“de la granja a la mesa”) y se señala al sector primario como primer eslabón de la cadena. Se pretende que los productores primarios sean conscientes de su gran responsabilidad en la puesta en circulación de alimentos o animales dirigidos a la obtención de alimentos sanos, seguros, inocuos y de calidad suficiente.

El *Reglamento (CE) 852/2004* señala que, si bien, en ese momento no es viable aplicar los principios APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) al sector primario, se deben desarrollar Guías de Prácticas Correctas de Higiene como medida de autocontrol para todas y cada una de las producciones, así como su difusión y uso, y estas guías deben fomentar el uso de prácticas higiénicas apropiadas en las explotaciones agroganaderas. El mismo Reglamento dice que los Estados miembros fomentarán la elaboración y difusión de guías nacionales de prácticas correctas de higiene. También establece que el uso de estas guías es voluntario.

El *Reglamento (CE) 853/2004* establece normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, incluida la producción de leche.

Siguiendo las indicaciones de la Unión Europea, España publicó la “Guía de Prácticas Correctas de Higiene: caprino de carne y leche” (GPCH) elaborada por la Confederación de Cooperativas Agrarias de España (CCAIE) en 2007 (2ª edición). En esta Guía se especifican requisitos y prácticas correctas para el sector caprino. En el año 2009 el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino publica una Guía para la Producción Responsable de Leche de Oveja en la que agrupa los requisitos establecidos en la GPCH para las distintas áreas específicas haciéndolas corresponder con zonas concretas dentro de la explotación.

4 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE

El mal uso que se ha hecho de los antibióticos desde su descubrimiento ha tenido graves consecuencias, al originarse residuos de los mismos, tanto en el medio ambiente como en los alimentos, que están ocasionando problemas de salud humana. Esto ha llevado a las autoridades competentes, Unión Europea, Codex Alimentarius, Administración de alimentos y medicamentos de los EE.UU. (*Food and Drug Administration-FDA*), etc., no sólo a establecer límites máximos de residuos de antibióticos en productos alimentarios, sino que estos límites se han ido reduciendo progresivamente, con la consiguiente necesidad de disponer de técnicas de análisis adecuadas para el control de estas sustancias.

Como ya se ha visto, la variedad de antibióticos utilizados es muy grande y están cambiando constantemente debido a la aparición de resistencias microbianas. Existe una búsqueda imparable de antibióticos nuevos, lo que implica la necesidad de disponer de nuevos métodos de análisis diferentes, que permitan la identificación y cuantificación de cantidades muy pequeñas, y que variarán según el tipo de muestra del que se trate.

Para desarrollar un método analítico hay que ir diseñando cada uno de los pasos que unen la muestra con la obtención de resultados. Las diferentes etapas que conlleva son:

- ✓ Toma, almacenamiento y conservación de la muestra.
- ✓ Preparación de la muestra, que puede incluir procesos de pretratamiento, extracción, concentración y limpieza.
- ✓ Separación de los analitos, generalmente cromatográfica.
- ✓ Detección, que puede incluir métodos ópticos, electroquímicos, espectrométricos, etc.
- ✓ Análisis de datos y su interpretación.

Para hacer un buen diseño de este proceso es necesario conocer muy bien la muestra y los analitos objetos de estudio, sin olvidarnos de tener en cuenta los recursos de que se dispone. De todas las etapas que incluye el proceso de análisis una de las más críticas es sin duda el tratamiento de la muestra. Gran parte del peso del análisis recae en esta etapa cuando se trata de analitos orgánicos, ya que no hay muchos detectores disponibles para el análisis de estos compuestos y de ellos muy

pocos son específicos. La etapa de preparación de la muestra puede ocupar del 60 al 85% del tiempo total de análisis. Del éxito de esta etapa dependerán parámetros analíticos tan importantes como la eficiencia de recuperación de analitos, la reproducibilidad y la robustez de la técnica, así como la sensibilidad y selectividad de todo el método, el tiempo requerido para el análisis y su coste, etc. (*Stashenko y col., 2011*).

En el caso de la leche, la muestra se debe homogeneizar previamente. A continuación, suele ser necesaria una etapa de eliminación de las proteínas y otra de eliminación de la grasa, esta última de especial importancia en el caso de la leche de oveja, dado su alto contenido graso. Posteriormente los analitos se aíslan de la matriz mediante su extracción con un disolvente, o mezcla de disolventes, adecuado. Por lo general, se requiere un proceso de limpieza que permita eliminar el mayor número posible de interferencias. Para llevar a cabo las etapas de extracción de los analitos y limpieza de la muestra se pueden emplear diferentes técnicas, como por ejemplo la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE), o la dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD), las cuales veremos con más detalle. Finalmente, se lleva a cabo una concentración del extracto obtenido y/o un cambio del disolvente para adecuar la disolución al sistema de análisis que se pretende utilizar, el cual en nuestro caso es la cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta-visible de diodos.

Se muestran, a continuación, las distintas técnicas utilizadas para llevar a cabo la extracción de antibióticos de muestras de leche, para terminar con las técnicas instrumentales más ampliamente utilizadas para su posterior análisis.

4.1 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LIMPIEZA

Ya hemos dicho que de todas las etapas que componen el proceso de análisis una de las más críticas es sin duda el tratamiento de la muestra, que debe permitirnos al final disponer de los analitos en el estado más puro posible. Tras una serie de tratamientos previos para conseguir una muestra homogénea y con unas características que faciliten las siguientes etapas, se procede a la extracción de los analitos, es decir a aislar la sustancia o sustancias que queremos analizar, separándolas de la matriz y de otras sustancias que puedan interferir en la medida. La preparación de la muestra se lleva a cabo en tres etapas: extracción, preconcentración y limpieza.

El objetivo final del tratamiento de la muestra es separar los analitos cuantitativamente, sin alterarlos o modificarlos químicamente, de manera predecible y reproducible, dejando el extracto final libre de los componentes de la matriz y de las interferencias (*Stashenko y col., 2011*).

Para ello, la muestra se ha de poner en contacto con un extractante (sólido, líquido o fluido supercrítico) en unas determinadas condiciones de tal forma que se debiliten completamente las interacciones “analito-matriz” a la vez que se incrementan las interacciones “analito-extractante” (*Martín-Esteban y col., 2002*). Para llevar a cabo el proceso de extracción habrá que tener en cuenta varios factores:

- ✓ La polaridad de los analitos. Habrá que utilizar un extractante con polaridad similar a la de los analitos para que éstos tiendan a interactuar con él con mayor intensidad de la que lo hacen con la matriz.
- ✓ Concentración en la que se encuentren los analitos.
- ✓ Naturaleza de la matriz.
- ✓ Otros factores: pH, fuerza iónica, temperatura...

Para obtener un buen resultado final en el análisis debemos estar seguros de que se han extraído completamente los analitos y no ha quedado una parte unida a la matriz, por lo que pueden hacerse extracciones sucesivas, comprobando la presencia de analitos en cada uno de los extractos.

En el proceso de extracción se suelen obtener, junto con los analitos, otras sustancias que pueden interferir en la determinación; por ello, se suele llevar a cabo previamente una etapa de limpieza del extracto para eliminar todas las posibles sustancias interferentes. Si no es posible su completa eliminación habrá que asegurarse de que no afecten a la determinación final. Otro aspecto a tener en cuenta durante la fase de limpieza es que se deben evitar posibles pérdidas de los analitos durante el proceso.

Los residuos de antibióticos se suelen extraer de las muestras utilizando una extracción con un único disolvente o una extracción líquido-líquido. Para decidir por qué técnica optar hay que ver la naturaleza de la muestra (sólida o líquida) y las propiedades físico-químicas de los analitos, su polaridad y valor de pKa. La extracción con una disolución reguladora como único disolvente presenta ventajas cuando se trata de residuos altamente polares, ya que se reduce la cantidad de componentes de la matriz no polares, como los lípidos, y se eliminan pasos de evaporación del

disolvente. La desventaja es que no se extraen completamente aquellos residuos que se encuentren fuertemente unidos a las proteínas, y se extraerán los componentes de la matriz que sean polares (*Kinsella y col., 2009*).

La mayoría de los métodos emplean disolventes orgánicos comunes como extractantes. El más utilizado es el acetonitrilo (ACN), el cual no sólo consigue buenas recuperaciones de los analitos y bajas de interferentes de la matriz, sino que además es efectivo desnaturalizando las proteínas e inactivando enzimas. Otros también ampliamente utilizados son metanol (MeOH) y acetato de etilo (EtOAc), aunque suelen dar lugar a extracciones con más interferentes (*Kaufmann y col., 2008*). La selectividad de las extracciones mejora con la utilización de la extracción líquido-líquido.

En concreto, para la extracción de macrólidos de muestras de leche se han empleado disolventes orgánicos como metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano..., mezclas de ellos, mezclas del disolvente con algún regulador de pH, o incluso agua.

4.1.1 Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido es una técnica clásica muy útil para separar componentes de una mezcla, que puede ser utilizada para la extracción, preconcentración y limpieza de las muestras que se encuentran en estado líquido. Se basa en la transferencia de los analitos, producida por la diferencia de solubilidad de los mismos en dos fases, desde la muestra a un disolvente inmiscible. Para seleccionar el disolvente hay que saber cuál es la polaridad de los analitos que queremos extraer o de las sustancias interferentes que queremos eliminar. Se suelen seleccionar disolventes orgánicos que tengan una elevada afinidad por las sustancias que queramos separar, que sean totalmente inmiscibles con la fase acuosa y que sean relativamente volátiles, para que sea más fácil su eliminación posterior por evaporación, y poder así, preconcentrar los analitos. Se pueden también utilizar mezclas de disolventes o modificar su valor de pH o fuerza iónica para mejorar la selectividad del proceso.

El gran número de disolventes disponibles y la posibilidad del empleo de mezclas y de hacer modificaciones de pH, hacen que la extracción líquido-líquido sea una técnica que permite analizar casi cualquier compuesto orgánico. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes:

- ✓ La posibilidad de formación de emulsiones.

- ✓ Es necesario manejar grandes volúmenes de muestra.
- ✓ Muchos de los disolventes son tóxicos e inflamables.
- ✓ Se pueden producir pérdidas de los analitos durante el proceso.
- ✓ Existe riesgo de contaminación durante las distintas etapas.

Todo esto hace que esta técnica, al final, resulte cara, lenta y tediosa, por lo que ha sido desplazada en muchos procedimientos por la extracción en fase sólida.

Una variación de la extracción líquido-líquido es el método QuEChERS (sus principios son: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), en el que se lleva a cabo la extracción de los analitos con un disolvente orgánico (ACN, EtOAc o acetona) en presencia de sales ($MgSO_4$, NaCl y/o disoluciones reguladoras), las cuales favorecen la separación de las dos fases. Dependiendo de la polaridad, los analitos quedarán en la fase orgánica y los interferentes de la matriz en la fase acuosa. Tras agitar y centrifugar, se purifica la fase orgánica utilizando extracción en fase sólida dispersa en la cual se mezclan los adsorbentes con el extracto. Esta técnica ha tenido, desde su desarrollo, numerosas modificaciones dependiendo de cuáles sean los residuos, las muestras y la instrumentación (*Kinsella, y col., 2009; Yuan-long, y col., 2015*). Este método ha sido utilizado para la determinación de antibióticos, entre los que se encuentran macrólidos, en leche. La extracción de los analitos se realiza con ACN, sin etapa de limpieza de la muestra (*Aguilera-Luiz, y col, 2008; Pinto da Costa, y col., 2015*).

4.1.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida es un método capaz de extraer, concentrar y purificar los analitos presentes en una disolución por adsorción de los mismos sobre una fase estacionaria que se introduce en un cartucho de extracción. A continuación se lleva a cabo la elución de los analitos con el disolvente de elución adecuado (*Thurman, 1998*).

La técnica se basa en la diferente afinidad que presenta el analito por la fase sólida y por la propia muestra o extracto. Al pasar la muestra a través de la fase sólida algunas sustancias se quedarán retenidas y otras pasarán a través del cartucho. Si son los analitos los que han quedado retenidos, habrá que eluirlos con una pequeña cantidad del disolvente adecuado.

Esta técnica es adecuada para la extracción de analitos de muestras líquidas, o para la preconcentración y limpieza de extractos obtenidos mediante otras técnicas de extracción.

La fase sólida adsorbente normalmente se empaqueta en cartuchos que pueden ser de vidrio o desechables de polipropileno o polietileno, en los que se compactan entre 100 y 500 mg de esta fase estacionaria entre dos fritas de polipropileno de 20 μm . La muestra líquida se pasa a través de la columna de modo que los analitos puedan ser extraídos, concentrados y/o purificados.

Las fases de las que consta el proceso básico de extracción en fase sólida se muestran en la figura 5, y son:

0. *Acondicionamiento*. La fase estacionaria o adsorbente se acondiciona con un disolvente de propiedades similares a la muestra.
1. *Carga de la muestra*. Se hace pasar cierta cantidad de muestra para la retención de los analitos de interés en la fase estacionaria.
2. *Lavado*. Se pasa a través del cartucho un disolvente adecuado para eliminar las interferencias que hayan podido quedar retenidas en el adsorbente.
3. *Elución*. Con un disolvente adecuado se extraen los analitos que estaban retenidos. Las interacciones entre el adsorbente y los analitos de interés van a determinar el eluyente que debe ser empleado.

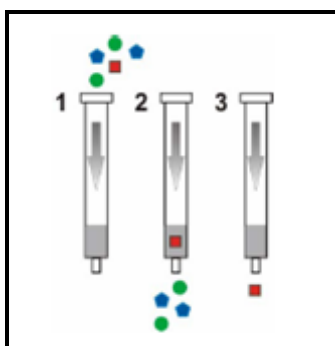


Figura 5: Procedimiento de extracción en fase sólida

Un factor muy importante a la hora de llevar a cabo un proceso de SPE es la elección del adsorbente adecuado. Su elección dependerá de cuál sea el analito, de su concentración y del disolvente en el que se encuentre. Los adsorbentes utilizados en SPE son similares a los empleados en LC, y pueden ser de varios tipos:

- ✓ *Adsorbentes polares o de fase normal.* El soluto queda retenido en el adsorbente por interacciones polares, como puentes de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo. Se emplean en SPE cuando la muestra (o el extracto) es un disolvente orgánico que contiene los analitos de interés. Los analitos deben estar disueltos en un disolvente bastante apolar para maximizar las interacciones con el adsorbente. El adsorbente de este tipo más utilizado ha sido la gel de sílice ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Los sitios activos de adsorción, polares, son los grupos silanol (Si-O-H) superficiales, que son débilmente ácidos, por lo que interaccionan con analitos básicos. Otros adsorbentes de este tipo también muy comunes son la alúmina ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que se puede encontrar en forma ácida, básica o neutra, y el florisil (coprecipitado de sílice y óxido de magnesio). Estos adsorbentes adsorben el agua del aire, desactivándose, por lo que hay que calentarlos a altas temperaturas antes de su uso.

- ✓ *Adsorbentes apolares o de fase reversa.* Los mecanismos de interacción suelen ser fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas, y ocasionalmente interacciones secundarias tales como puentes de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo. Se suelen emplear en SPE cuando los analitos se encuentran disueltos en un líquido polar, generalmente cuando se trata de muestras acuosas. Los adsorbentes más utilizados son los alquil-sílicas (octadecil, C18; octil, C8; etil, C2; fenil y ciclohexil), en los que los grupos alquilo están enlazados covalentemente a grupos silanol en la superficie de la sílica.

- ✓ *Intercambiadores iónicos.* Este tipo de adsorbentes se utiliza para compuestos orgánicos iónicos o que sean fácilmente ionizables. Se debe operar a un valor de pH al cual los analitos se encuentren totalmente en su forma iónica para poder interaccionar y ser retenidos por el adsorbente. El principal problema que presentan es que si hay una gran cantidad de iones inorgánicos en la muestra, se produce la saturación del adsorbente y no se retienen los analitos de interés. Es necesario eliminar estos iones mediante algún pretratamiento de la muestra.

- ✓ *Adsorbentes de exclusión molecular.* Permiten la separación de los analitos en función de su tamaño molecular. El adsorbente tiene pequeños poros en los que sólo pueden entrar moléculas lo suficientemente pequeñas, de forma que las moléculas más grandes pasan directamente. Existe gran variedad de

adsorbentes de este tipo, entre los que destacan Sephadex (dextrano con enlaces cruzados de glicerina) y Bio-GelP (poliacrilamida con enlaces cruzados de N-N'-metilenbisacrilamida).

- ✓ *Adsorbentes de afinidad.* Están formados por un soporte inerte, que puede ser resina, gel, sílica, etc., sobre el que se encuentra inmovilizado una enzima, un anticuerpo o una hormona, capaces de reconocer e interactuar con su correspondiente sustrato, antígeno o receptor. Estos adsorbentes son capaces de extraer selectivamente un determinado compuesto o una familia de compuestos estructuralmente similares. Un adsorbente de este tipo sería la sílica activada con grupos aldehído.

En la tabla 11 se muestran algunos de los adsorbentes comerciales más comúnmente empleados en SPE, así como algunas de sus aplicaciones (*Thurman, 1998*).

Uno de los factores importantes en los procesos de extracción en fase sólida es la elección adecuada del disolvente de elución. Esta elección debe llevarse a cabo teniendo en cuenta tres cuestiones:

- ✓ El tipo de adsorbente empleado.
- ✓ La polaridad de los analitos de interés.
- ✓ La compatibilidad del disolvente con la técnica de análisis que se vaya a utilizar para la determinación de los analitos.

El disolvente de elución debe tener una interacción máxima con el analito de interés y la menor posible con el resto de interferencias. La elución de analitos que se encuentran retenidos en una fase reversa es un proceso bastante simple que consiste en la elección de un disolvente no polar que sea capaz de romper las interacciones entre la fase estacionaria y el analito. Hay tres disolventes compatibles con fases reversas, como son MeOH, ACN, y AcEt. Estos disolventes son capaces de formar puentes de hidrógeno con los silanoles libres de la superficie de sílice, tienen cierta capacidad de disolver el agua residual que haya podido quedar retenida por la superficie y además presentan la capacidad de romper las interacciones de Van der Waals que se dan entre los analitos y las cadenas de C18. Todo esto les hace excelentes disolventes para la elución de analitos retenidos en fases reversas. Sin embargo, la elución de algunos analitos muy hidrofóbicos no es efectiva al cien por cien con estos disolventes por lo que hay que recurrir a mezclas con otro tipo de disolventes (*Thurman, 1998*).

Tabla 11: Principales adsorbentes comerciales empleados en SPE y sus aplicaciones

Adsorbente	Aplicación
C-18	<i>Fase reversa - una de las fases más hidrofóbicas</i> Aislamiento de compuestos hidrofóbicos
C-8	<i>Fase reversa - fase hidrofóbica</i> Aislamiento de compuestos hidrofóbicos de disoluciones acuosas
Sílica	Fase normal - fase polar neutra Aislamiento de especies de baja a moderada polaridad en disoluciones no acuosas Eliminación de vitaminas liposolubles
Florisil	<i>Fase normal - fase polar ligeramente básica</i> Aislamiento de especies de baja a moderada polaridad en disoluciones no acuosas Pesticidas en alimentos y piensos
Alúmina	<i>Fase normal - fase ácida polar</i> Aislamiento de compuestos hidrofílicos en disoluciones no acuosas Azúcares y cafeína en bebidas de cola
Intercambio catiónico	<i>Fase de intercambio catiónico</i> Aislamiento de analitos catiónicos en disoluciones acuosas o no acuosas
Intercambio aniónico	<i>Fase de intercambio aniónico</i> Aislamiento de analitos aniónicos en disoluciones acuosas o no acuosas Extracción de pigmentos ácidos de vinos, zumos y extractos de alimentos
Aminopropil, NH ₂	<i>Fase normal, fase reversa e intercambiador catiónico débil</i> Medicamentos y metabolitos en fluidos biológicos Fenoles y pigmentos de plantas
Cianopropil, CN	<i>Fase normal y fase reversa</i> Analitos en disolventes orgánicos o acuosos Medicamentos y metabolitos en fluidos fisiológicos
Diol, OH	<i>Fase normal y fase reversa</i> Analitos en disolventes orgánicos o acuosos Medicamentos y metabolitos en fluidos fisiológicos

En la elución de analitos retenidos en un adsorbente polar, el disolvente compite con los analitos o los compuestos interferentes por los sitios activos de adsorción del adsorbente. La elución consiste en un desplazamiento del soluto por la acción del disolvente. Cuanto más polar sea el disolvente, mayor poder de elución presentará.

Cuando se trata de eluir los analitos adsorbidos en un intercambiador iónico, el disolvente debe ser una mezcla agua:disolvente orgánico o una disolución reguladora que tengan un pH, al cual la retención esté totalmente desfavorecida.

Cuando se utilizan adsorbentes de afinidad, se puede emplear para la elución un disolvente a un pH ácido o básico, al cual las interacciones antígeno-anticuerpo estén totalmente desfavorecidas; una disolución de cloruro sódico o tiocianato sódico entre 1,5 y 8 M, que minimice las interacciones iónicas antígeno-anticuerpo; o bien mezclas tampón fosfato salino (PBS):disolvente orgánico, las cuales minimizan las interacciones de tipo hidrofóbico. Los disolventes más empleados son etilenglicol, etanol, metanol y acetonitrilo; disolventes más apolares pueden producir la desnaturalización irreversible de los anticuerpos (*Martín-Esteban y col., 2002*).

Además, con el empleo de esta técnica, es posible llevar a cabo eluciones selectivas. Una elución selectiva consiste en realizar sucesivas eluciones con varios disolventes que eluyan diferentes clases de analitos. También es posible emplear disolventes de lavado que permitan la eliminación de impurezas que puedan interferir en el análisis. Otra estrategia posible es el empleo de más de un cartucho de SPE en serie, de manera que, por ejemplo, uno permita la eliminación de interferentes y el otro retenga los analitos.

Como se deduce de lo comentado anteriormente, existe una serie de desventajas inherentes a la técnica de SPE.

Las desventajas más importantes de este sistema de extracción son: a) la falta de selectividad, b) la capacidad de carga, c) la falta de efectividad en la elución y d) la competencia del disolvente con los analitos y sustancias interferentes por los sitios activos.

Por ello en los últimos años se han desarrollado nuevos materiales para su utilización en procesos SPE intentando solventar los problemas de selectividad, capacidad de carga, etc., que se han ido encontrando al aplicar los adsorbentes existentes. Entre

estos nuevos adsorbentes se encuentran los polímeros de impronta molecular (MIPs), copolímeros humedecibles en agua equilibrados hidrofílica y lipofílicamente (HLB), materiales de acceso restringido (RAMs), etc.

A pesar de todo, esta técnica ha sido muy utilizada para la extracción y limpieza de gran variedad de antibióticos macrólidos en diversos tipos de muestras, utilizando cartuchos comerciales más efectivos que los adsorbentes mencionados.

Así, Dubois la utilizó en la determinación de un grupo de antibióticos macrólidos en varias muestras de alimentos, entre los que se encuentra la leche. Para ello empleó cartuchos Oasis HLB como método de limpieza tras la extracción de los analitos y la eliminación de grasa y proteínas de las muestras; realizó la elución con una mezcla de MeOH y NH₃ (*Dubois y col., 2001*). González de la Huebra también utiliza estos cartuchos en la etapa de limpieza de la determinación de una mezcla de antibióticos macrólidos en piensos, eluyendo con metil tert-butil éter (*González de la Huebra y col., 2007*), así como Van Poucke, en la determinación, también en muestras de alimentos para animales, de residuos de promotores del crecimiento antibacterianos prohibidos, incluidos espiramicina y tilosina, pero eluyendo con una mezcla de ACN y H₂O (*Van Poucke y col., 2005*).

Estos mismos cartuchos los empleó Yang para la extracción de una mezcla de macrólidos de muestras de aguas naturales y residuales, eluyendo con MeOH (*Yang y Carlson, 2004*). McClure los utiliza para llevar a cabo la extracción de una mezcla de varios antibióticos, incluidos los macrólidos roxitromicina y eritromicina, también de muestras de aguas residuales (*McClure y Wong, 2007*). Los cartuchos de SPE del tipo HLB continúan utilizándose para la extracción de antibióticos, incluidos los macrólidos. Freitas y colaboradores han validado un método para la determinación de 39 antibióticos de varias familias, en hígado, en el que se lleva a cabo la extracción de los analitos con un cartucho de tipo HLB, para la posterior detección con UHPLC-MS/MS (*Freitas y col., 2015*); Bian y col. lo han utilizado para la limpieza de muestras de suelo previa al análisis cromatográfico de 24 antibióticos, entre los que se encuentran también algunos macrólidos (*Bian y col., 2015*).

Blackwell, cuando analiza la presencia de una mezcla de antibióticos, entre los que está el macrólido tilosina, en muestras de suelos y de aguas superficiales y subterráneas, utiliza dos cartuchos de SPE en tandem para llevar a cabo la etapa de limpieza. Utiliza un cartucho Isolute SAX de intercambio aniónico para eliminar la

materia orgánica, y otro Oasis HLB polimérico para la retención de los analitos; la elución de éstos la lleva a cabo con MeOH (*Blackwell y col., 2004-a; Blackwell y col., 2004-b*). Esta misma combinación de cartuchos SPE la utiliza también Jacobsen para la determinación en suelos agrícolas de residuos de una variedad de antibióticos que incluye eritromicina y tilosina.

Otros cartuchos de SPE utilizados en determinaciones de macrólidos en diversas muestras son los BondElut SCX, intercambiador catiónico, para la limpieza de muestras de varios tejidos de diferentes animales (*Horie y col., 1998; Leal y col., 2001; Codony y col., 2002; Draisci y col., 2001*); todos ellos llevan a cabo la elución con MeOH, aunque en algún caso le añaden NH₄Ac. Cartuchos SPE de tipo diol también se han utilizado para la limpieza de suelos, eluyendo con una mezcla de acetonitrilo y acetato amónico acuoso (*Schlüsener y col., 2003*); los de aminopropil-sílica para la purificación de los extractos de eritromicina obtenidos de muestras de diversos tejidos animales, utilizando como eluyentes CH₂Cl₂ y MeOH (*Bajic y col., 2000*); cartuchos de ciano propilo, eluyendo con metanol y dietilamina, en la fase de limpieza de la determinación de espiramicina y tilosina en piensos (*Civitareale y col., 2004*).

Sacher emplea cartuchos Isolut ENV+, con un copolímero adsorbente no polar, para la extracción de 60 productos farmacéuticos, entre los que hay varios macrólidos, y realiza una elución selectiva primero con ACN y luego con una mezcla de acetonitrilo, agua y trietilamina (*Sacher y col., 2001*). Hirsch también lleva a cabo la extracción de residuos de 18 antibióticos, incluidos varios macrólidos, de muestras de aguas, utilizando dos cartuchos en serie, un Lichrolute EN y un Lichrolute C18 y eluyendo con MeOH (*Hirsch y col., 1998*).

Turnipseed extrae ivermectina y otras avermectinas de muestras de leche utilizando un adsorbente BondElut C18, muy hidrofóbico, eluyendo con ACN, y limpiando después con un cartucho de carbono ENVI-CARB, que presenta afinidad por compuestos polares y no polares y eluyendo con cloruro de metileno (*Turnipseed y col. 2005*).

La extracción en fase sólida continúa siendo un método muy utilizado para la limpieza de muestras y extracción de los analitos en numerosos procedimientos de análisis. Por ejemplo, para la determinación de un gran número de medicamentos utilizados en veterinaria en muestras de leche en polvo, mantequilla, pescado y huevos, Dasenaki y Thomaidis utilizan una SPE como parte del tratamiento de las muestras para la

extracción de los analitos (*Dasenaki y Thomaidis, 2015*). Barreiro y colaboradores han publicado una revisión bibliográfica sobre los últimos métodos de tratamiento de muestras de alimentos, entre los que se encuentra la SPE, utilizados on-line con las técnicas cromatográficas y posterior detección, generalmente, por espectrometría de masas (*Barreiro y col., 2015*).

4.1.3 Dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD)

La técnica de dispersión de la matriz de la muestra en una fase sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*) fue introducida en 1989 por Barker, como una técnica novedosa que permite la disgregación completa de la muestra y dispersa sus componentes en una fase orgánica, que actúa de soporte sólido, generando un material que posee el carácter cromatográfico suficiente para la extracción de las sustancias presentes en una muestra dada (*Barker y col., 1989*).

El modo de trabajo en la extracción MSPD se muestra en la figura 6. Una pequeña cantidad de muestra se mezcla con una cantidad de soporte sólido o adsorbente adecuado (proporción muestra/adsorbente 1:4). Con ayuda de un mortero se tritura hasta conseguir su completa homogeneización. Es importante utilizar un mortero de vidrio o ágata, ya que con los de cerámica u otros materiales porosos puede producirse pérdida de los analitos (*Barker, 2000*). La mezcla homogeneizada se coloca en un cartucho de extracción (también se puede utilizar el cuerpo de una jeringa o un dispositivo similar), en el que se ha colocado previamente un filtro para evitar la pérdida de muestra. La muestra debe estar lo suficientemente seca como para que no haya problemas con el empaquetado, el cual se tiene que llevar a cabo teniendo en cuenta los principios cromatográficos básicos; se debe evitar la formación de canales, así como el compactar demasiado el material para evitar sobrepresiones. Una vez empaquetada la muestra, se puede proceder al proceso de extracción de los analitos que son eluidos con un pequeño volumen del disolvente apropiado.

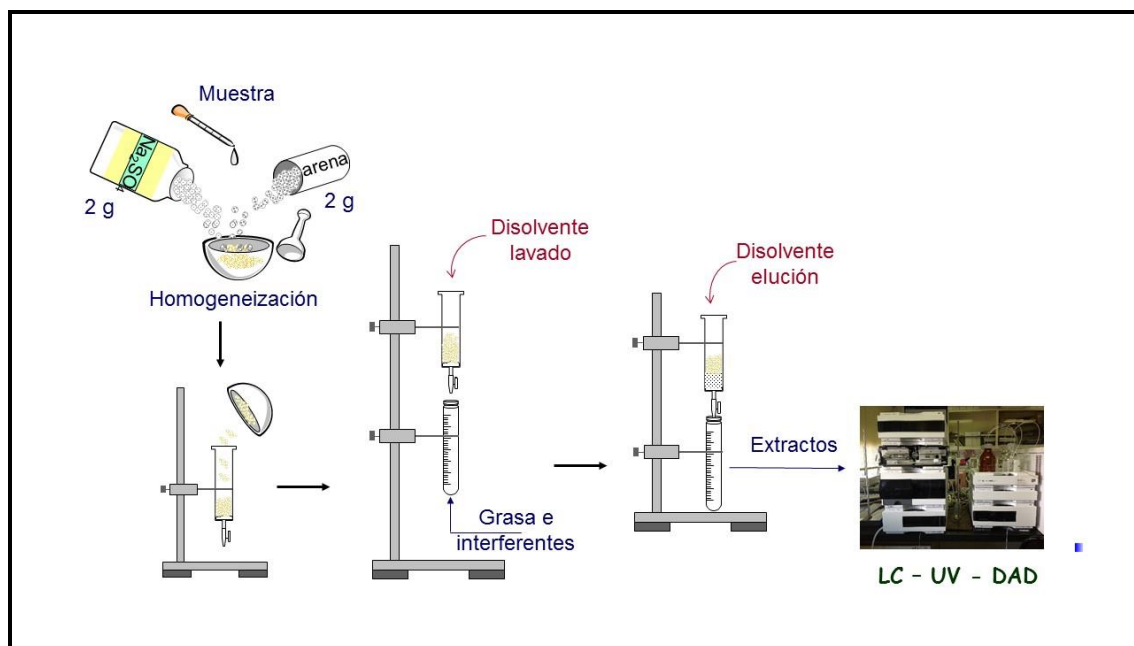


Figura 6: Proceso de extracción MSPD

La mayoría de las eluciones se pueden llevar a cabo por la acción de la gravedad, pero algunas veces, es necesario aplicar una pequeña presión en cabeza de columna para iniciar el flujo del disolvente a través del cartucho, o incluso, en ocasiones, las columnas se colocan en una caja de vacío, donde se controla el flujo por succión.

El empleo de la técnica MSPD permite realizar extracciones secuenciales de varios tipos de analitos, utilizando disolventes de diferente polaridad, pudiéndose aislar un solo compuesto, un grupo de compuestos o incluso varias clases de compuestos en un solo proceso, así como la separación de las sustancias interferentes, ya que la muestra completa se encuentra en la columna. Con esta técnica, en una única etapa, no sólo se realiza la extracción de los analitos, sino también la limpieza simultánea del extracto, con el consiguiente ahorro de tiempo y disolventes.

Para conseguir una correcta extracción de los analitos de las posibles interferencias de la matriz se puede proceder de dos maneras:

- ✓ Eluir en primer lugar las interferencias con un determinado disolvente en lo que sería una etapa previa de lavado, y a continuación eluir los analitos con el disolvente de elución adecuado.
- ✓ Eluir los analitos directamente con el disolvente de elución adecuado y dejar las interferencias de la matriz retenidas en la columna.

4.1.3.1 Elección del soporte sólido

Uno de los aspectos de mayor importancia en MSPD es, por tanto, la elección del soporte sólido adecuado. Sus propiedades morfológicas y mecánicas, así como su comportamiento químico, son de gran importancia a la hora de llevar a cabo la extracción, pues van a afectar a la retención/elución de los analitos y a la dispersión de la matriz de la muestra sobre el soporte sólido.

Los soportes sólidos que se utilizan como sorbentes en MSPD son materiales que disponen de grupos funcionales enlazados en su superficie. Pueden ser los mismos que para la SPE, pero utilizados de otra manera, por ejemplo octadecilsilil sílica (C18). Las fuerzas mecánicas implicadas al mezclar la muestra y el soporte sólido en el mortero provocan la ruptura de la muestra en partículas más pequeñas. Por otro lado, los grupos funcionales de la superficie de las partículas actúan disolviendo y dispersando los componentes de la muestra por toda la superficie en función de sus polaridades relativas: los componentes no polares se dispersan por la fase orgánica no polar; las moléculas polares, como el agua, se unen a los grupos silanol de la superficie y en los poros de las partículas de sílica, así como a los componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno (*Barker, 2000*).

Los sorbentes apolares más comúnmente utilizados son polímeros de alquilsilica, C₈ y C₁₈, aunque también se han empleado fases más polares como sílica gel (SiO₂·H₂O) o florisil (coprecipitado de sílice y óxido de magnesio). La MSPD es adecuada para el análisis de muestras biológicas complejas, sólidas, semi-sólidas y altamente viscosas.

Los adsorbentes más empleados desde el principio son los funcionalizados con cadenas hidrocarbonadas C₈ y C₁₈ (*Souza Caldas y col., 2013; Tao y col., 2014*), así como sílice amorfa funcionalizada con diferentes grupos orgánicos como C₈, C₁₈, NH₂, etc. (*dos Reis y col., 2013; Enríquez-Gabeiras y col., 2012*). Posteriormente, se empezaron a utilizar también materiales simples del tipo de la sílica gel, alúmina, arena o Florisil (*Bogialli y col., 2004; Kishida y Furusawa, 2001*), o nuevos materiales como pueden ser los MIPs (*Guo y col., 2008; Sun y col. 2008; Yan y col., 2011; Yan y col., 2012; Qia, 2011; Qiao, 2010*) o materiales de fibra de carbono (*Zhang y col., 2013*).

4.1.3.2 Elección de los disolventes

La elección de los disolventes de elución y lavado también es clave para conseguir unos buenos resultados en el proceso MSPD. Las interferencias lipofílicas de la matriz se pueden eliminar mediante el lavado con disolventes no polares, como el hexano. Para la elución de residuos de medicamentos veterinarios, se suelen utilizar disolventes polares, como diclorometano, alcoholes o agua caliente, aunque con esta última debe tenerse cuidado si se trata de analitos degradables térmicamente.

El tipo de adsorbente y el disolvente que se vayan a utilizar dependerán tanto del analito objeto de estudio, como de la muestra que se pretenda analizar.

Esta técnica ha sido aplicada con éxito para la determinación de una gran variedad de analitos, como residuos de antibióticos y otros contaminantes, en muestras medioambientales, tejidos biológicos, alimentos, leche y otras muchas matrices.

La extracción de macrólidos, basada en una MSPD, con arena como fase sólida y agua caliente acidificada como eluyente, ha demostrado la robustez de esta técnica en cuanto a los posibles efectos de la matriz; aunque existan sustancias interferentes, éstas no afectan a la exactitud del método. Ha sido aplicada a muestras de leche y yogur (*Bogjalli y col., 2007*).

Zou y colaboradores desarrollan un método para detectar trazas de seis sustancias tireostáticas en leche, utilizando MSPD para la preparación de la muestra. Utilizan como fase sólida sílica gel, eluyendo los analitos con una mezcla de metanol y cloroformo (*Zou y col., 2005*).

Se ha utilizado la técnica MSPD para la determinación de flumequina y doxiciclina, así como de enrofloxacin y ciprofloxacina, en muestras de leche, dispersando la muestra en Chromosorb WAW, adsorbente de sílica funcionalizada con cadenas C18, y eliminando la grasa con hexano (*Choma y col., 2004; Choma y col., 2005*).

El macrólido antiparasitario ivermectina se ha determinado en leche mezclando la muestra con un adsorbente C18, y eluyendo el analito de la columna MSPD con EtOAc. Tras una etapa de limpieza en una columna de sílica, se derivatiza la ivermectina y se detecta por LC/FLD (*Schenck, 1995*).

Las principales ventajas que presenta la técnica MSPD son (*Kinsella y col., 2009*):

- ✓ Se puede utilizar para el aislamiento de una gran cantidad de residuos.
- ✓ Elimina la necesidad de un paso en el proceso de análisis para la precipitación de proteínas.
- ✓ No es necesario centrifugar.
- ✓ Al estar toda la muestra expuesta a los disolventes, se consiguen lavados y eluciones más efectivas.
- ✓ Es posible la elución secuencial de residuos utilizando disolventes de mayor o menor polaridad.

Los inconvenientes son muy pocos en relación a sus ventajas. Tal vez se podría considerar la falta de selectividad en algunos casos. Por ello, se puede introducir un adsorbente selectivo (MIP) en la mezcla dispersiva para mejorar dicho problema.

4.1.4 Polímeros de impronta molecular

El reconocimiento molecular selectivo es en muchos casos fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos de los seres vivos. Tal es el caso de la formación de complejos entre enzimas y sustratos, entre antígenos (Ag) y anticuerpos (Ac), en la replicación de las moléculas de ADN o en la transcripción de las proteínas. En base a estos modelos, los investigadores han tratado de sintetizar materiales que sean capaces de interactuar de forma selectiva o con gran afinidad por los analitos. De estos modelos hay que destacar, por su amplia aplicación, la unión específica entre el Ag y el Ac. Un anticuerpo se unirá de forma preferente y gran afección al Ag por el que fue generado. Se afirma, por tanto, que su unión tiene gran afinidad.

En los últimos 50 años se ha generado un elevado número de anticuerpos específicos a determinados analitos de interés. Sin embargo, a pesar de los importantes esfuerzos llevados a cabo en el desarrollo de los denominados adsorbentes de afinidad (inmunoensayos), la obtención de anticuerpos con las propiedades adecuadas y el mantenimiento necesario para que no pierdan su actividad, supone, un proceso largo, complicado y generalmente costoso.

Se han dedicado muchos estudios al desarrollo de procesos biomiméticos, definidos por la IUPAC como aquellos que se refieren a un procedimiento de laboratorio diseñado para imitar un proceso químico natural (*IUPAC, gold book*).

Por tanto, sigue siendo de gran interés en el campo de la investigación química actual, el diseño, preparación y caracterización de nuevos materiales receptores sintéticos capaces de imitar los procesos biológicos de reconocimiento molecular, entre los que se encuentran los polímeros de impronta molecular (MIPs).

La Real Academia de Ingeniería define los polímeros de impronta molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs) como polímeros altamente entrecruzados que se sintetizan a partir de monómeros en presencia del analito (plantilla), para el cual se desea el reconocimiento selectivo.

En el proceso de síntesis se añade también entrecruzante, iniciador y el disolvente en el que se lleva a cabo la polimerización; finalmente, es necesario extraer la plantilla dejando libres los huecos de reconocimiento.

El resultado final es la obtención de materiales sintéticos altamente entrecruzados, polimerizados en presencia de una molécula molde para formar sitios de unión específicos con ésta. Estos sitios son complementarios en tamaño, forma y funcionalidad a la molécula molde, dando lugar a receptores capaces de unir la molécula objetivo con alta afinidad y especificidad.

Algunos autores los han denominado “anticuerpos de plástico” por asemejarse a estos en ser capaces del reconocimiento molecular selectivo. Las ventajas fundamentales de los MIPs frente a las sustancias naturales de reconocimiento específico (anticuerpos, enzimas...) son la estabilidad y la facilidad de producción. Además, un MIP, en teoría, puede sintetizarse selectivamente para cualquier molécula, incluso para las que no existen receptores naturales o son de difícil obtención.

El gran interés que han despertado los polímeros de impronta molecular ha dado lugar a un gran desarrollo de la tecnología asociada a los mismos, lo que se pone de manifiesto en el número de trabajos realizados en los últimos años (Figura 7).

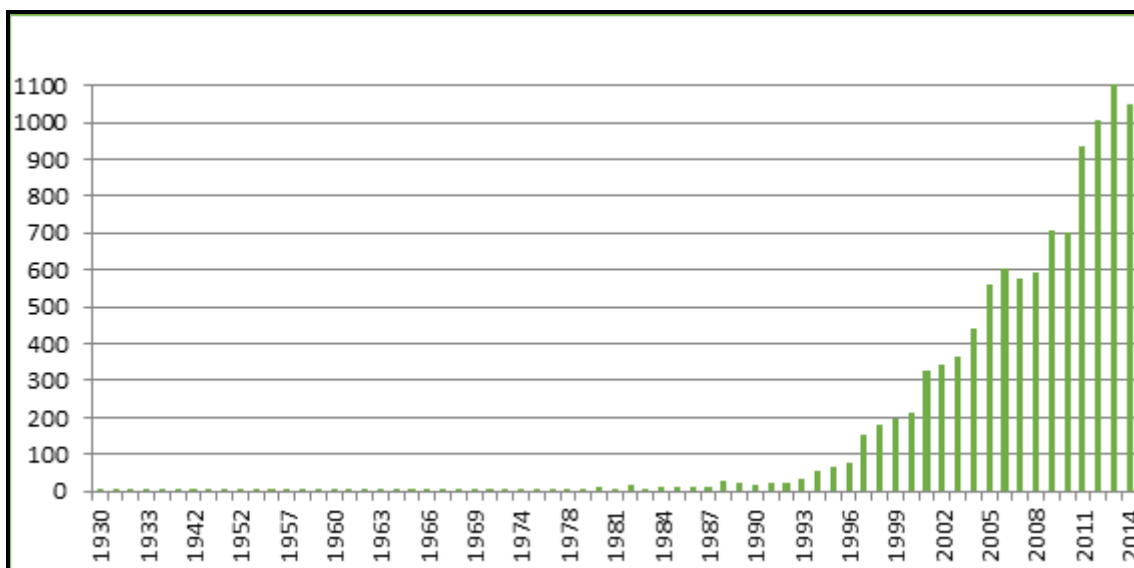


Figura 7: Número de trabajos relacionados con los polímeros de impronta molecular (Society for Molecular Imprinting)

A pesar de que el mayor desarrollo de esta metodología ha tenido lugar en los últimos 20 años, sus inicios se remontan a principios del siglo XX. En 1931, el investigador ruso Polyakov estaba investigando en la preparación de sílica para ser utilizada como fase estacionaria en cromatografía. Su objetivo era conseguir un aumento de la capacidad de la sílica y estudiar el efecto que podían tener ciertos disolventes (benceno, tolueno y xileno) en su morfología, es decir, en el tamaño y estructura de poro o su superficie específica. El procedimiento consistía en acidular distintas disoluciones de silicato sódico con diferentes sustancias, formándose una matriz rígida de partículas de sílica tras secarse. Una vez seca, eliminaba los aditivos lavando con agua caliente. En los experimentos Polyakov observó que al emplear $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como agente acidificante se producía un aumento en la adsorción por parte de la sílica del aditivo con el que se había preparado en comparación con los otros aditivos empleados. Estos resultados sugerían que el aumento en la selectividad observado se debía a un cambio estructural en la sílica originado por la naturaleza química de los aditivos utilizados en su preparación (*Polyakov, 1931*). A pesar de la publicación de este trabajo y otros posteriores detallando el fenómeno observado, los trabajos de Polyakov pasaron desapercibidos para la comunidad científica hasta pasados casi 40 años.

Dickey explicó los hallazgos de Polyakov, basándose en los estudios de su maestro, Linus Pauling, sobre los mecanismos de formación de anticuerpos y su selectividad. Demostró el reconocimiento por parte de la sílice de diferentes colorantes derivados del naranja de metilo que se encontraban presentes durante la obtención del gel de

sílice, de manera que retenía preferentemente a aquel compuesto en cuya presencia se había sintetizado (Dickey, 1949; Dickey, 1955).

La baja estabilidad y reproducibilidad, y la pérdida de memoria con el tiempo de este tipo de materiales limitó el avance de esta línea de investigación, provocando su declive a finales de los años 60, momento en el que, por otro lado, surgen numerosos trabajos relacionados con la inmovilización de enzimas en redes poliméricas entrecruzadas moderadamente hidrofílicas. Mosbach investiga si el material resultante, una vez extraídas las enzimas de la red polimérica, posee la capacidad de retener de nuevo a aquellas que fueron inmovilizadas en él inicialmente (Mosbach, 1966).

Posteriormente, Klotz y Wulff presentan, de forma independiente, trabajos en los que aparecen los primeros ejemplos de impresión molecular con polímeros orgánicos sintéticos. Y son los trabajos de Wulff y su equipo los que han servido de base para la preparación de MIPs siguiendo el modelo covalente (Wulff, 1995).

El procedimiento seguido para la preparación de estos materiales de impronta molecular es el siguiente (figura 8). Se sintetiza un polímero altamente entrecruzado en presencia del analito para el que se desea el reconocimiento selectivo, el cual se utiliza como molécula molde. Se ponen en contacto la molécula molde y un monómero adecuado para formar un complejo de prepolimerización, al que posteriormente se añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente (porogen) en el que tiene lugar la polimerización. Una vez sintetizado el polímero, se extrae la molécula molde, dejando libres los sitios de reconocimiento específico.

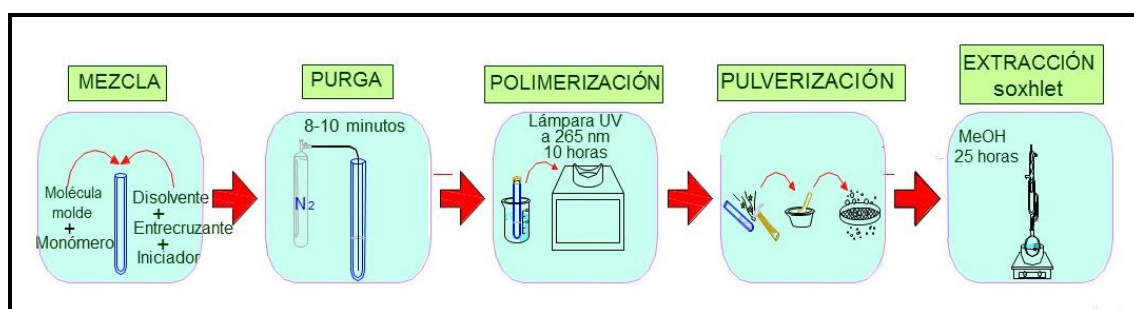


Figura 8: Proceso de preparación de un MIP

Los componentes fundamentales para la preparación de MIPs son por tanto: el monómero funcional, el entrecruzante, el iniciador de la polimerización y el disolvente o porogen.

✓ *Monómero funcional*

El monómero funcional se selecciona en función de la naturaleza de la molécula molde, con la que debe formar un complejo de prepolimerización estable. Este equilibrio debe estar totalmente desplazado hacia la formación del complejo, garantizando su estabilidad, por ello se debe trabajar con un exceso de monómero (relación molar molécula molde:monómero 1:4). Esta proporción es, sin embargo, uno de los parámetros que se debe optimizar, ya que si se añade un exceso de monómero, éste quedará libre en la red polimérica dando lugar a la formación de interacciones no específicas con el analito y con otros compuestos presentes en la muestra.

Al poner en contacto el monómero y la molécula molde deben aparecer entre ellos fuerzas de unión débiles, como puentes de hidrógeno, enlaces dipolo-dipolo o fuerzas electrostáticas, que dependerán de la naturaleza de ambos.

Por tanto, la elección del monómero dependerá en parte de la naturaleza de la molécula molde, de la presencia en ésta o no de grupos funcionales ácidos o básicos, o su capacidad para formar complejos con determinados iones.

Los monómeros funcionales (Figura 9) típicamente empleados son los derivados de ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilbenzoico) cuando, en la molécula molde existen grupos funcionales básicos, y bases débiles heteroaromáticas (vinilpiridina, vinilimidazol) cuando en la molécula molde están presentes grupos funcionales ácidos. El monómero neutro más empleado en medios apolares es la acrilamida. Si la molécula molde tiene capacidad para formar complejos, se utilizan monómeros quelantes como el vinil-imidazol.

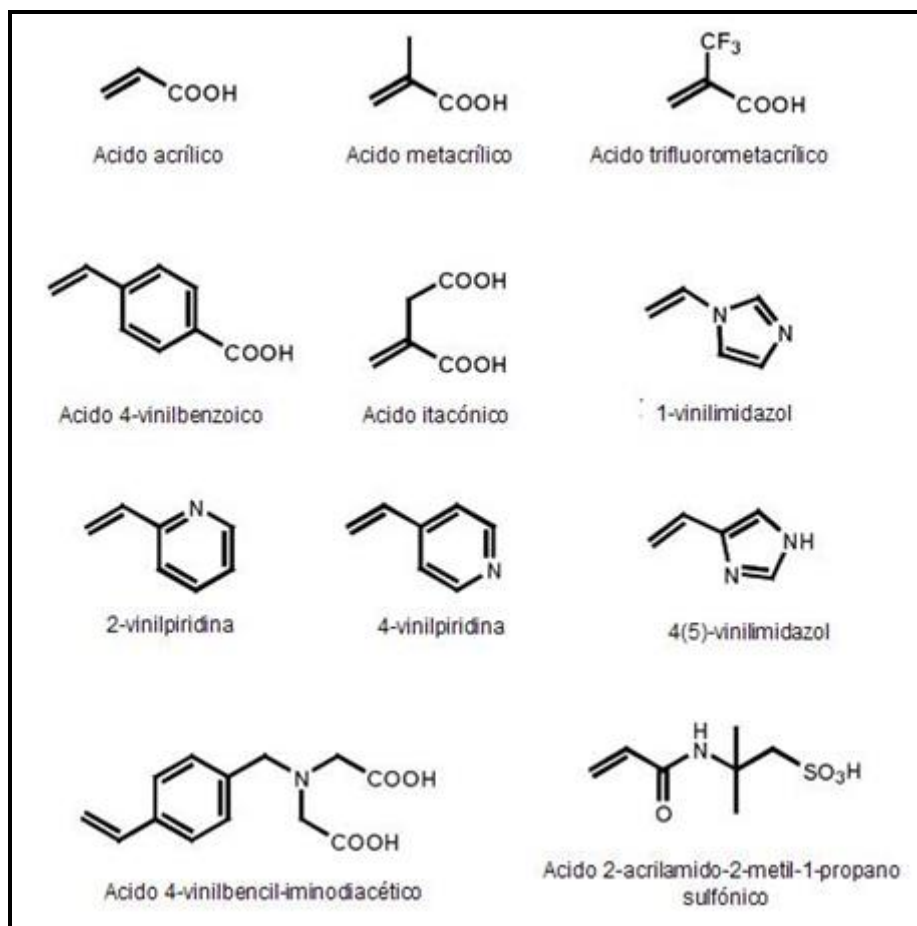


Figura 9: Monómeros funcionales

✓ *Entrecruzante*

El reactivo entrecruzante es el responsable de generar la estructura tridimensional del polímero que permita un reconocimiento molecular adecuado. El entrecruzante tiene que interactuar con el complejo de prepolimerización preservándolo durante la síntesis del polímero.

Los más utilizados son el divinilbenceno como entrecruzante para polímeros de estireno, y el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) y el trimetacrilato de trimetilpropano (TRIM) para polímeros acrílicos y metacrílicos. En la figura 10 se muestran varios entrecruzantes.

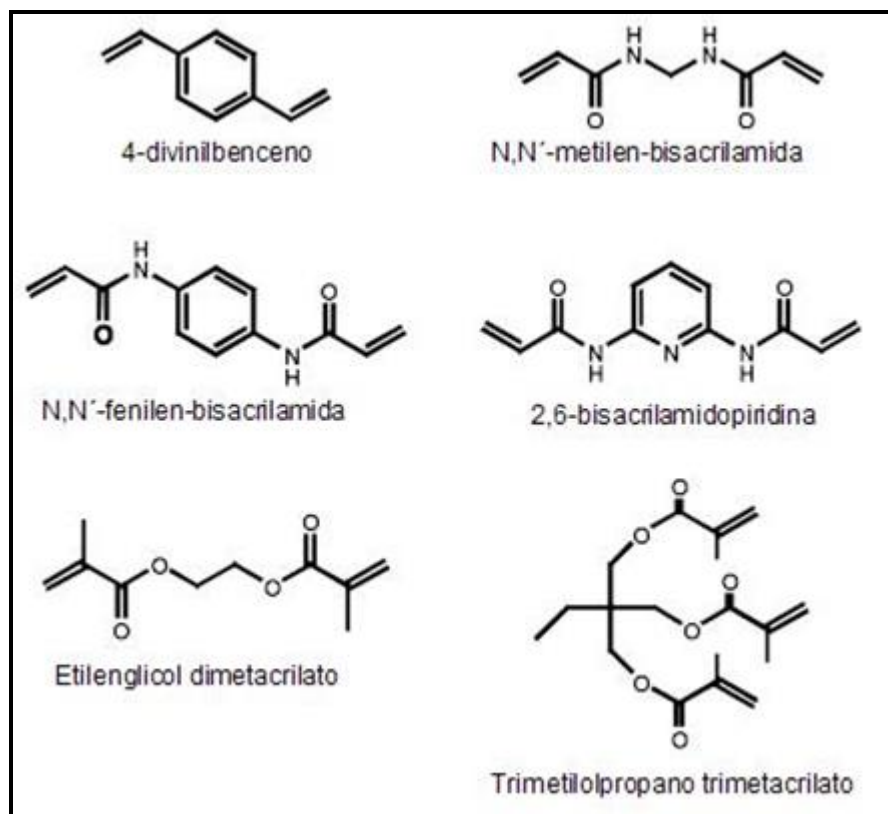


Figura 10: Entrecruzantes

✓ *Disolvente (Porogen)*

El disolvente juega un papel importante en el resultado del proceso de impresión molecular. Controla la fuerza de las interacciones no covalentes además de afectar a la morfología del polímero. Por lo general, cuanto más polar es el porogen, más débil resulta el efecto de reconocimiento, ya que compite con el monómero por los puntos de interacción con la molécula molde. Los mejores disolventes para la impresión molecular, por acentuar la fuerza de las interacciones entre la molécula molde y el monómero, son los de baja constante dieléctrica (ϵ), como tolueno, diclorometano, acetonitrilo o cloroformo. Por otro lado, el porogen influye en la estructura del polímero, debido a que la superficie específica y el diámetro de poro dependen del porogen empleado. Así, con el acetonitrilo, disolvente de polaridad moderada, (ϵ : 36) se obtienen polímeros de mayor poro comparados con los obtenidos en cloroformo (ϵ : 5). Pequeñas áreas superficiales y baja macroporosidad dan lugar a disminución del reconocimiento, debido a una menor accesibilidad a los sitios específicos de interacción.

Como regla general, la mejor opción es utilizar como disolvente el mismo porogen de la polimerización, o al menos de similares características.

✓ *Iniciador*

Una vez preparada la mezcla de reactivos, la polimerización se inicia en presencia de un iniciador radicalario. Los más empleados son los de tipo azo, como el 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) o el azodimetilvaleronitrilo cuando el inicio de la polimerización es por calor. Una alternativa para moléculas térmicamente inestables, que requieren la generación de radicales libres a baja temperatura mediante radiación ultravioleta, es el empleo de fotoiniciadores radicalarios como la dimetoxifenil acetofenona. El AIBN es uno de los más utilizados, ya que se descompone en radicales tanto por la acción de la radiación UV, como por el calor a temperaturas superiores a 60°C (*Lanza y col., 2001*).

4.1.4.1 Síntesis de los polímeros de impronta molecular

El analito de interés, el cual será utilizado como molécula molde, será el primer responsable en la elección de los demás componentes para la síntesis del polímero de impronta molecular.

Conviene tener presentes algunas cuestiones relacionadas con dicho analito. Cuanto mayor es el tamaño y menor la rigidez del compuesto que se emplea como molécula molde, menor es la probabilidad de que la cavidad que se forme esté bien definida y sea selectiva para esa molécula. Además, una molécula de gran tamaño encontrará impedimentos estéricos mayores que una de menor tamaño cuando se está produciendo su difusión a través de la matriz polimérica, durante los procesos de reconocimiento o extracción.

Rachkov y Minoura se fijan en el proceso de reconocimiento del anticuerpo al antígeno para resolver este problema. Los anticuerpos no reconocen a los antígenos en su totalidad, sino sólo a una pequeña parte del mismo. Del mismo modo, puede sintetizarse un material molecularmente impreso que sólo reconozca una zona característica de la molécula (*Rachkov y Minoura, 2001*).

El proceso de síntesis de los polímeros de impronta molecular consta de tres etapas:

✓ *Etapa 1. Generación de la huella molecular*

Se ponen en contacto la molécula molde y el monómero en un disolvente adecuado, dando lugar a la formación del complejo de prepolimerización. Las propiedades del polímero resultante van a depender del tipo de enlace formado entre el monómero y la molécula molde, así como de su estabilidad. Esta unión puede ser covalente o no covalente.

MODELO COVALENTE. Este modelo se basa en el empleo de una molécula molde con grupos unidos a ella mediante enlaces covalentes reversibles que permitan su polimerización (Figura 11). Esto requiere un paso previo para transformar el analito en un derivado polimerizable. En la mayoría de los casos, estos derivados han sido sintetizados a partir de moléculas con grupos diol, capaces de formar ésteres cíclicos con monómeros que contengan grupos –BOOH (ácido bórico).

Las ventajas del modelo son la homogeneidad de los polímeros y la extraordinaria selectividad, gracias a la posibilidad de control de la estequiometría *molécula molde-monómero*, de forma que no quedan monómeros fuera de las cavidades, lo que minimiza la presencia de interacciones inespecíficas (Mayes y Whitcombe, 2005). Mientras que los inconvenientes principales son, por un lado, la limitación a un escaso número de monómeros capaces de formar un enlace covalente reversible con la molécula molde; y además la dificultad en la extracción del analito de la matriz polimérica, que requiere en muchas ocasiones condiciones agresivas que pueden afectar a la estructura tridimensional del polímero.

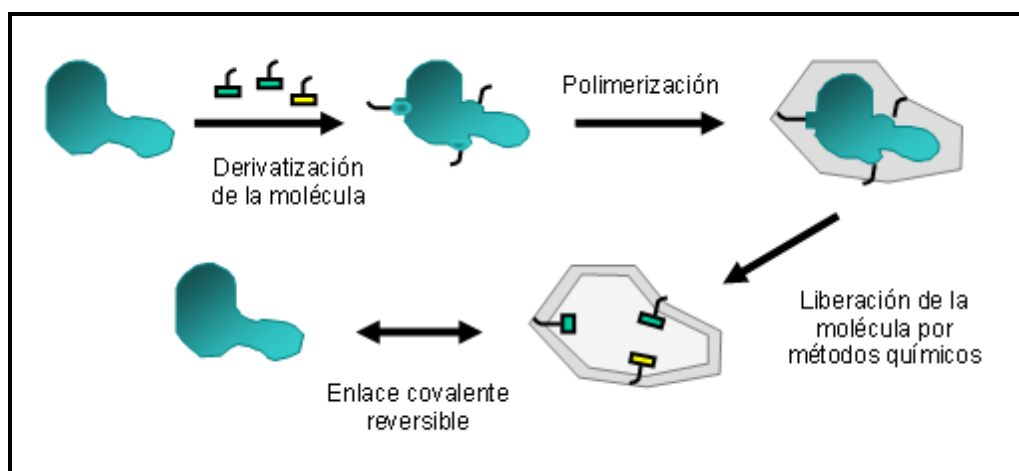


Figura 11: Impresión molecular por vía covalente

MODELO NO COVALENTE. En el caso de la vía no covalente, la molécula molde interacciona con los monómeros funcionales formando un agregado en el que predominan las interacciones moleculares débiles (Figura 12).

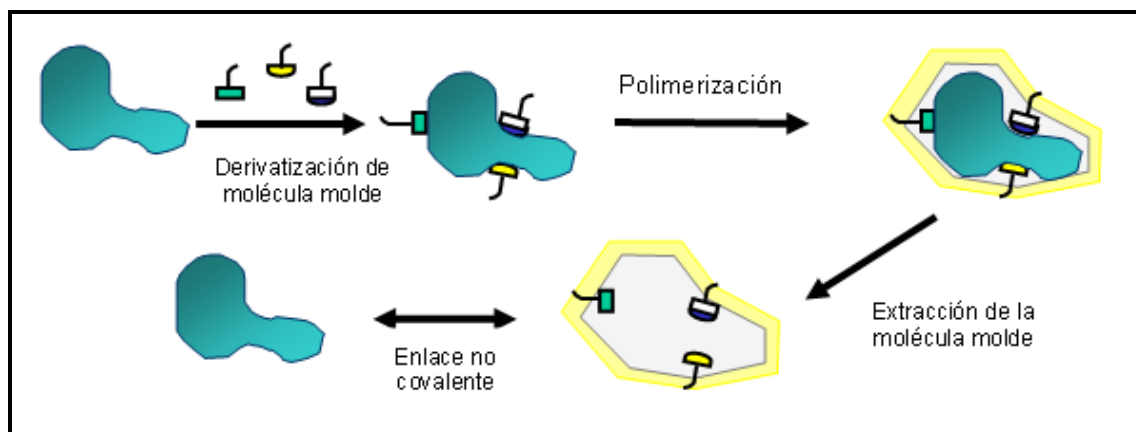


Figura 12: Impresión molecular por vía no covalente

Inicialmente se produce un ordenamiento de los monómeros alrededor de la molécula molde, y a través de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, etc., forman un complejo de prepolimerización. Se ha demostrado que son las interacciones no covalentes *molécula molde-monómero funcional* las que presentan mayor versatilidad. La aparente debilidad de estas interacciones, al considerarlas de forma individual, es superada por la posibilidad de permitir múltiples puntos de interacción simultáneamente, junto con la rápida cinética (asociación/disociación) de este tipo de enlaces. La elección de un monómero u otro dependerá de la naturaleza del analito, y se basa en la complementariedad *monómero-molécula molde*, de tal manera que se seleccionará un monómero con propiedades ácidas si el analito es básico y viceversa. La desventaja está en que no permite controlar la estequiometría del complejo *monómero-molécula molde*, lo que provoca que en el polímero resultante haya una distribución de sitios de unión heterogénea, con diferente afinidad y selectividad, y aparezcan interacciones inespecíficas.

✓ Etapa 2. Polimerización

Se lleva a cabo la polimerización propiamente dicha. Esta polimerización se realiza en presencia de un agente entrecruzante, formándose un red rígida entre el prepolímero formado por el monómero funcional, la molécula molde y el entrecruzante, en el caso del modelo no covalente, o entre el derivado polimerizable obtenido según el modelo covalente y el entrecruzante. La polimerización consta, por tanto, de dos fases, que se

muestran genéricamente en la figura 13. Además es necesario añadir un agente iniciador que dé lugar a los radicales que comenzarán la polimerización. Este inicio del proceso de propagación radicalico puede estar inducido térmica o fotoquímicamente, dependiendo de la molécula que se esté usando como molde; si la molécula es fotosensible se inducirá el proceso térmicamente, si la molécula es termosensible, se hará utilizando una fuente de radiación ultravioleta, y si la molécula fuera foto y termosensible habría que recurrir al empleo de materiales del tipo sol-gel, cuya polimerización se inicie mediante catálisis ácida o básica, y no requiera iniciación radicalica (Fernández-González y Guardia, 2007).

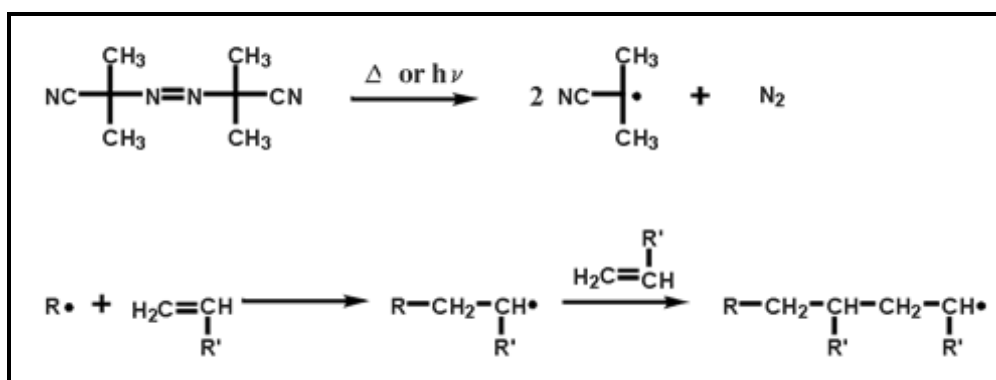


Figura 13: Descomposición del iniciador radicalario 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (AIBN)

El mecanismo de la reacción de polimerización se puede explicar de este modo:

1. Ruptura homolítica del iniciador debida a calor o radiación ultravioleta, dando lugar a dos radicales isobutironitrilo.
2. Extensión de la reacción radicalaria por reacción de estos radicales con los monómeros funcionales y el entrecruzante.

La reacción de polimerización se inicia con la descomposición del iniciador por la acción, bien de calor o de radiación ultravioleta. Las mezclas de polimerización se someten a temperaturas entre 60 y 70 °C (en baño de agua o estufa) o a radiación ultravioleta a bajas temperaturas (normalmente de 5-10 °C) durante aproximadamente 24 horas.

Un interferente de la polimerización es el oxígeno disuelto en el sistema que puede producir la terminación prematura de la reacción; para evitarlo se purga la mezcla de polimerización con helio, nitrógeno o argón.

✓ *Etapa 3. Extracción de la molécula molde*

Por último, en la tercera etapa se elimina el analito o molécula molde del interior de la matriz polimérica, liberando así las cavidades creadas en la matriz que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito plantilla. La presencia de estas cavidades, teóricamente, hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva al analito molde y, en ocasiones, a otros compuestos estructuralmente análogos.

La molécula molde es extraída por métodos químicos, generándose de este modo, huecos de unión con grupos –BOOH donde tienen lugar interacciones covalentes y específicas entre el polímero y la molécula molde.

Esta eliminación se consigue mediante procesos de lavado, extracción Soxhlet, extracción sólido-líquido, tratamiento térmico, digestión en microondas, e incluso mediante reacciones químicas que destruyan la molécula molde.

4.1.4.2 Técnicas de preparación de los polímeros de impronta molecular

Los polímeros de impronta molecular se pueden preparar mediante técnicas diferentes para obtenerlos con distintas configuraciones, según las aplicaciones a las que se vaya a destinar el material: bloques, láminas, esferas, etc.

Preparación de polímeros en bloque

Fue la primera técnica empleada para la síntesis de polímeros de impronta molecular y, hoy en día, sigue siendo la más utilizada debido fundamentalmente a su versatilidad y sencillez.

En este tipo de preparación de polímeros de impronta molecular se mezclan todos los componentes simultáneamente y se espera el tiempo suficiente hasta que tiene lugar la polimerización. Una vez obtenido el polímero rígido, éste es triturado y tamizado para conseguir el tamaño óptimo de partícula que dependerá en gran medida de la aplicación del polímero impreso. Estas partículas de polímero son sometidas a un proceso agresivo de limpieza con la finalidad de romper las interacciones entre la molécula molde y el monómero, extrayendo así el analito de la estructura polimérica. El método tradicionalmente usado ha sido la extracción *Soxhlet*; aunque en la

actualidad está siendo sustituida por la extracción asistida por microondas, suponiendo un ahorro de tiempo de extracción y de volumen de disolvente.

Los inconvenientes que presenta son:

- ✓ La heterogeneidad de las partículas obtenidas, en cuanto a tamaño y forma, lo que conlleva una pérdida considerable de la capacidad del polímero; cuando se requiere una morfología de partículas controlada hay que recurrir a otras técnicas.
- ✓ La posibilidad de pérdidas de polímero durante el tamizado.
- ✓ Durante la trituración se generan calor y tensiones en el material que pueden modificar las características físico-químicas del polímero, generándose puntos de unión no específicos.

Preparación de polímeros en partículas esféricas

La obtención del polímero en forma de partículas esféricas se puede conseguir llevando a cabo la síntesis de diversas formas:

- ✓ *Polimerización por precipitación.* La mezcla de reactivos se encuentra en un exceso de disolvente. Las cadenas poliméricas no son capaces de ocupar todo el volumen de disolvente, con la consiguiente dispersión de partículas esféricas de polímero en el seno de la disolución. Las partículas que se obtienen son muy pequeñas, llegando incluso a 200 nm.
- ✓ *Polimerización por suspensión.* Se utilizan dos fases: una que contiene la mezcla de polimerización en un disolvente orgánico hidrofóbico y otra inmiscible con la anterior que se encuentra en mayor proporción. Al agitar las dos fases se crean micro-gotas en suspensión en las que se produce la polimerización. Permite controlar el tamaño de las partículas.
- ✓ *Polimerización por hinchamiento en etapas.* Se sintetizan partículas esféricas de látex en agua y se introducen en una microemulsión de varias sustancias orgánicas, dejándolas hasta que se hinchan; en ese momento se añade la mezcla de polimerización y se agita hasta que se forma una capa de polímero en su superficie.

- ✓ *Polimerización en partículas de sílica.* Consiste en rellenar partículas de sílica esféricas con la mezcla de polimerización, redisolviendo posteriormente la sílica. No se debe superar el volumen de mezcla necesario, ya que se produciría la polimerización en el exterior de las partículas, formándose agregados.

Preparación de polímeros en láminas delgadas

Consiste en que la polimerización tenga lugar sobre un elemento, como puede ser una placa de vidrio, placa de oro, electrodos, etc. Se consigue por inmersión del elemento seleccionado como soporte en la mezcla de polimerización (cobertura por inmersión), o mediante el empleo de un spin-coater (cobertura por rotación).

Las ventajas que presenta este método son, por un lado la obtención de cavidades con forma y tamaño bien definidos y que no sufren alteraciones debido a que no son necesarios procesos de acondicionamiento posteriores, y por otro, el fácil acceso del analito a casi la totalidad de los sitios activos.

4.1.4.3 Caracterización de los polímeros de impronta molecular

Caracterizar un polímero de impronta molecular es determinar la morfología de sus partículas, su capacidad de producir un reconocimiento selectivo y conocer sus propiedades físicas y químicas. Existen diferentes técnicas que permiten evaluar cada uno de estos parámetros.

- ✓ *Técnicas de caracterización morfológica*

Se basan fundamentalmente en la observación microscópica de la superficie del polímero, mediante microscopía electrónica de barrido o de fuerza atómica, y en la medida de su porosidad, para lo cual se utilizan técnicas basadas en la intrusión/extrusión de mercurio o en la adsorción/desorción de nitrógeno, siendo la primera más adecuada cuando existen poros de más de 50 nm. Midiendo la cantidad de mercurio o de nitrógeno que atraviesa el material a una presión y en un tiempo determinados se obtiene información sobre el área superficial específica, el volumen de poro específico, la distribución de tamaño de los poros y su diámetro medio.

✓ *Técnicas de caracterización química*

Se han de emplear técnicas que permitan el análisis en estado sólido, puesto que los polímeros no son solubles.

Puede utilizarse el análisis elemental, que da información de los distintos elementos que hay en el polímero, y por comparación con datos teóricos, se puede determinar la cantidad de monómero funcional incorporada al polímero, la cantidad de éste sintetizada sobre una partícula, o la disolución de las partículas empleadas como soporte.

Se puede realizar un análisis mediante espectroscopia infrarroja, para obtener información sobre el grado de polimerización, qué grupos funcionales se encuentran presentes, la formación de enlaces de hidrógeno o la relación estequiométrica entre el monómero y la molécula molde.

Un análisis por resonancia magnética nuclear nos permitirá conocer el número de dobles enlaces presentes en el polímero y la estabilidad del complejo de prepolimerización.

✓ *Técnicas de caracterización de los sitios de unión específica: isothermas de adsorción*

La obtención de las isothermas de adsorción se lleva a cabo realizando ensayos que permiten calcular la cantidad de analito que se une al polímero cuando éste está en contacto con cantidades crecientes del mismo; es importante que el sistema esté en equilibrio para minimizar efectos cinéticos y que el analito esté adsorbido únicamente mediante uniones específicas. Los resultados pueden ajustarse a varios modelos matemáticos, que se muestran en la tabla 12.

El modelo más sencillo es el de Freundlich, útil para describir materiales heterogéneos. Los modelos de Langmuir y Jovanovic se ajustan bien cuando se trata de materiales homogéneos. El de Langmuir-Freundlich se ajusta tanto a materiales homogéneos como heterogéneos, por lo que describe bien el mecanismo de adsorción de la mayoría de los polímeros de impronta molecular.

Tabla 12: Modelos de isotermas de adsorción empleados en la caracterización de los puntos de unión de los polímeros de impronta molecular

Modelo	Fórmula
Freundlich	$B = aF^m$
Langmuir	$B = \frac{qKF}{1 + KF}$
Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1K_1F}{1 + K_1F} + \frac{q_2K_2F}{1 + K_2F}$
Langmuir-Freundlich	$B = \frac{qKF^m}{1 + KF^m}$
Jovanovic	$B = q(1 - e^{-KF})$
Bi-Jovanovic	$B = q_1(1 - e^{-K_1F}) + q_2(1 - e^{-K_2F})$

B: cantidad de analito que se une al polímero; F: cantidad de analito que permanece en disolución; q: densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica; K: constante de afinidad media; a: está relacionada con K mediante la expresión $K = a^{1/m}$; m: índice de heterogeneidad, toma valores entre 0 (material heterogéneo) y 1 (material homogéneo).

Para ver a qué modelo se ajusta mejor un determinado mecanismo se representa log B frente a log F. Una relación lineal corresponde al mecanismo de Freundlich, una relación no lineal, probablemente se ajustará a un mecanismo de Langmuir, y si hay dos tramos, uno lineal y otro no, será un mecanismo de Langmuir-Freundlich.

4.1.4.4 Aplicaciones de los MIPs en Química Analítica

La tecnología de impresión molecular supone un instrumento revolucionario en el campo del análisis químico, medioambiental, farmacológico y de la salud. Los polímeros de impronta molecular poseen múltiples aplicaciones debido fundamentalmente a su versatilidad y facilidad de adaptarse a diferentes sistemas, pero sobre todo por sus propiedades de reconocimiento selectivo.

Comparando los MIPs con los sistemas biológicos, presentan una serie de ventajas: son más baratos, más robustos, son resistentes, estables a elevadas presiones y temperaturas, químicamente inertes a los ácidos y bases, iones metálicos y disolventes orgánicos, además de poseer una mayor vida media a temperatura ambiente.

A continuación se detallan algunas de las principales aplicaciones actuales de los polímeros de impronta molecular.

Sensores químicos

La integración de los MIPs en los sensores se puede hacer por polimerización *in situ*, utilizando iniciación fotoquímica o térmica, o insertándolo en una superficie llevando a cabo una iniciación química o UV. Este último sistema permite modificar la superficie de un electrodo con láminas muy finas de polímeros específicos. También puede realizarse una electropolimerización sobre la superficie de una plataforma de transducción (Vasapollo, 2011).

Los MIPs han sido utilizados en el desarrollo de distintos sensores selectivos para la determinación de compuestos de interés medioambiental, como pueden ser pesticidas y otros contaminantes, y de interés clínico o bioquímico, como pueden ser los fármacos.

Alizadeh y colaboradores han puesto a punto un sensor electroquímico de pasta de carbono al que han incorporado un polímero de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en muestras de aguas y suelos (Alizadeh, 2010). También en muestras de agua se han determinado residuos de β -estradiol utilizando un electrodo de oro sobre el que se deposita una capa de polímero impreso molecularmente; para su síntesis se usa como monómero N-feniletilen diamina metacrilamida (NPEDMA) (Des Azevedo, 2013). Para la determinación de fenol en aguas de bebida, naturales y residuales, se ha desarrollado un sensor biomimético colorimétrico basado en membranas de polímero impreso molecularmente (Sergeyeva, 2014).

Se han desarrollado diferentes sensores para la determinación de contaminantes en muestras biológicas de distinta naturaleza. Así, Hantash y col. diseñaron un sensor en el que utilizaban un polímero de impronta molecular para inmovilizar el pesticida

carbaryl de muestras biológicas (*Hantash, 2007*). Se ha desarrollado un sensor basado en un electrodo modificado de nanopartículas de oro y un MIP para la detección de pesticidas organofosforados en todo tipo de aguas; este sensor también ha dado buenos resultados para la detección de metil paratión en la superficie de las frutas habiendo transcurrido 72 horas desde su aplicación (*Li, 2012*).

Otro sensor electroquímico en el que se ha utilizado un polímero de impronta molecular sobre fibra de carbono es el desarrollado por Kai Wang y su equipo, el cual permite la determinación directa, en muestras de sangre humana, de hidrocloreuro de procainamida, medicamento utilizado para recuperar el ritmo cardíaco normal (*Wang, 2015*). Es también posible la detección de tramadol, analgésico de tipo opioide parecido a la morfina, directamente en orina, gracias a un electrodo de pasta de carbono modificado químicamente con un polímero de impronta molecular que ha mostrado una alta selectividad a dicho compuesto (*Afkhami, 2013*). Otras sustancias, para cuya determinación en muestras biológicas se han propuesto sensores de este tipo son el colesterol (*Tong, 2013*), la epinefrina (*Prasad, 2014*), la dopamina (*Xue, 2013*), la nicotina (*Zhou, T., 2014*), etc.

La presencia de fosfatos en bebidas de cola puede realizarse de forma sencilla utilizando un sensor con detección electroquímica basado en un MIP específico que permite su determinación incluso en presencia de carbonatos, nitratos y sulfatos, que son los posibles interferentes. La síntesis del MIP se realiza utilizando dipentil fosfato como molécula molde y ácido metacrílico como monómero funcional, según el modelo no covalente (*Quint, 2014*).

En relación al tema de esta memoria se han desarrollado sensores para la determinación de residuos de antibióticos en alimentos. Así, se han detectado residuos de antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas en agua y leche, en concentraciones inferiores a los LMRs establecidos por la Unión Europea para estas sustancias, utilizando un sensor fluorimétrico basado en un MIP; para la obtención del polímero se utiliza enrofloxacin como molécula molde; el sistema permite la determinación de ésta y de otras fluoroquinolonas, distinguiéndolas de otras familias de antibióticos. No se observan interferencias de otras sustancias. El procedimiento resulta sencillo y práctico, puesto que sólo requiere la precipitación previa de las proteínas cuando se trata de muestras de leche (*Ton, 2012*).

Otra familia de antibióticos para la que se han propuesto sensores basados en un MIP es la de las tetraciclinas, habiéndose aplicado satisfactoriamente a su determinación en muestras complejas como leche y miel (*Wang, 2012; Bougrini, 2016*).

Otro antibiótico, el cloranfenicol, puede determinarse en leche, haciendo uso de un sensor electroquímico de pasta de carbono modificado con un MIP (*Alizadeh, 2012*).

Catálisis

Las enzimas, cuando catalizan los procesos químicos, se enlazan, y así estabilizan, selectivamente al estado de transición de una reacción determinada. Su baja estabilidad en disolventes orgánicos y a temperaturas o valores de pH extremos limita sus aplicaciones. Por ello, una línea importante de investigación actual es encontrar sustancias sintéticas que imiten su comportamiento. Sin embargo, su eficiencia y especificidad son difíciles de conseguir.

La alta selectividad y resistencia de los polímeros de impronta molecular los hace adecuados para utilizarse a altas presiones y temperaturas, en presencia de diferentes disolventes orgánicos, o bajo condiciones agresivas. Por ello han sido utilizados en lugar de las biomoléculas, que son tan sensibles a estas condiciones.

Se han utilizado polímeros de impronta molecular como catalizadores en diversas reacciones químicas imitando a enzimas; para ello, se han preparado utilizando como molécula molde un análogo estructural del estado de transición o del intermedio de una reacción química, de manera que luego el polímero tendrá la capacidad de incorporar y estabilizar ese estado de transición o intermedio de la reacción en la matriz polimérica, mostrando un efecto catalítico análogo al de las enzimas (*Mirata y Resmini, 2015*).

Por ejemplo, se han utilizado MIPs para catalizar la reacción de Huisgen de cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos (*Zhang y col., 2006*), o reacciones de cicloadición de Diels-Alder (*Kirsch y col., 2009; Henschela y col., 2011*).

Díaz-Díaz y colaboradores han logrado MIPs que imitan la capacidad de la cloroperoxidasa de catalizar la oxidación del 2,4,6-triclorofenol (TCP) (*Díaz-Díaz y col., 2011; Díaz-Díaz y col., 2012*).

Pese al elevado número de estas aplicaciones de catálisis con polímeros de impronta molecular, no se han encontrado en la bibliografía trabajos enfocados a la determinación de fármacos en alimentos.

Material para separaciones

- ✓ *Separaciones cromatográficas.* Esta es la principal y clásica aplicación de los polímeros de impronta molecular (Wei y Mizaikoff, 2007; Lee y col., 2008; Turiel y Martín-Esteban, 2005). Generalmente, el proceso consistía en sintetizar el MIP por polimerización en bloque, pulverizarlo mecánicamente e introducirlo en la columna cromatográfica. Este sistema daba lugar a partículas irregulares, resultando empaquetamientos poco reproducibles. Se observa que, cuando se utilizan MIPs como relleno de las columnas en HPLC, se obtienen picos anchos y con cola, lo cual limita su aplicación comercial. Esto se ha atribuido a la heterogeneidad de los sitios enlazantes del MIP (Lee y col., 2008). Este problema se ha intentado solventar preparando el polímero directamente en el interior de las columnas de acero inoxidable o las columnas capilares (Yin y col., 2005). También se ha intentado conseguir una distribución de tamaños más homogénea sintetizando el polímero como partículas esféricas, mediante por ejemplo, polimerización por precipitación (Wei y col., 2006).

Los MIP se han usado frecuentemente como fases estacionarias quirales en HPLC (Selligren, 2001). Han permitido la separación de los enantiómeros de mezclas racémicas de diferentes compuestos, como aminoácidos (Monier y El-Sokkary, 2010), o drogas (Ansell, 2005).

También se han utilizado en microcolumnas de electrocromatografía capilar para la separación de varios compuestos (Turiel y Martín-Esteban, 2005).

- ✓ *Procesos de extracción en fase sólida (SPE).* La principal aplicación de los polímeros de impronta molecular, posiblemente sea su empleo como fases estacionarias para la adsorción, preconcentración y purificación de compuestos en SPE, en procedimientos tanto on-line como off-line (Pichon y Chapuis-Hugon, 2008).

La extracción en fase sólida empleando polímeros de impronta molecular se denomina con las siglas MISPE (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*). El proceso consta de los mismos pasos que cualquier extracción en fase sólida: acondicionamiento del polímero, carga de la muestra, lavado para eliminar posibles interferencias, y elución del analito (Figura 14). El disolvente en el que se carga la muestra debe tener una polaridad similar a la del utilizado en el proceso de polimerización, con el objeto de aumentar las interacciones entre el analito y los sitios enlazantes específicos del MIP.

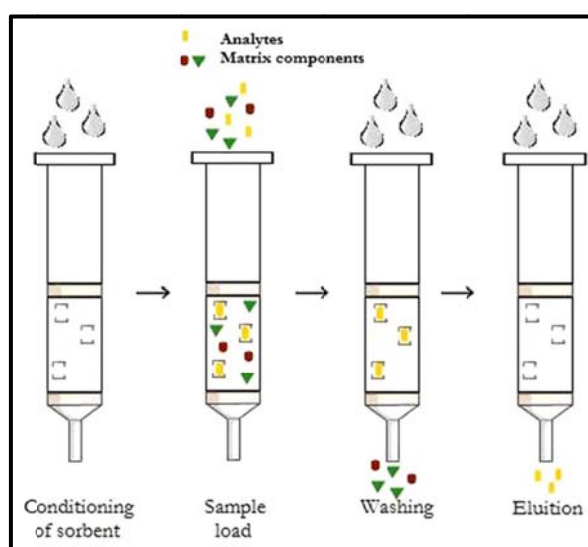


Figura 14: Proceso MISPE (*Vasapollo y col., 2011*)

Debido a las especiales características de estos adsorbentes, los polímeros de impronta molecular ofrecen una nueva alternativa para la extracción selectiva de compuestos, por lo que han sido ampliamente utilizados con éxito en la determinación de una gran variedad de analitos (pesticidas, productos farmacéuticos, aminoácidos, metales...) en muestras de naturaleza muy diversa (alimentos, agua, suelos, fluidos biológicos, medicamentos...).

Existen numerosos trabajos sobre las muchas aplicaciones de los MIP en procesos de extracción en fase sólida. Algunos de ellos se comentan a continuación.

Caro y Marcé revisan las aplicaciones de los MIPs como materiales selectivos en los procesos de extracción en fase sólida (MISPE), destacando la posibilidad de llevar a cabo no sólo la preconcentración y limpieza de la muestra, sino también la extracción selectiva de compuestos de muestras complejas como las medioambientales o biológicas (*Caro y col., 2006*).

Pichon y Chapuis-Hugon hacen otra revisión bibliográfica en 2008 sobre la aplicación de los MIPs a la determinación de contaminantes en el medio ambiente empleando diferentes técnicas, aunque hacen un énfasis especial en las posibilidades que tiene el empleo de los polímeros de impronta molecular como adsorbentes en los procesos de extracción en fase sólida, para la extracción selectiva de los analitos de muestras complejas (*Pichon y Chapuis-Hugon, 2008*).

Un ejemplo del empleo de un proceso MISPE en muestras medioambientales es la determinación de compuestos fenólicos en agua. Se optimiza la síntesis del polímero utilizando tres disolventes, cloroformo, acetonitrilo y tolueno; como disolvente de lavado se usa diclorometano y como eluyente acetonitrilo con un 5% de disolución de amoníaco (*Peipei y col., 2010*). También se han determinado sulfonamidas en aguas de río y embalses utilizando una microextracción en fase sólida con un MIP (*Díaz-Álvarez y col., 2014*).

Scorrano y colaboradores han sintetizado un MIP de una forma sencilla con ácido metacrílico como monómero y una mezcla de acetonitrilo y agua como porogen, para utilizarlo como adsorbente en SPE para la extracción, preconcentración y eliminación de interferencias de 1-metiladenosina (MA), nucleósido modificado que se utiliza como marcador tumoral en orina (*Scorrano y col., 2010*).

Respecto al tema objeto de este estudio existen en la bibliografía diferentes casos de investigación para la determinación de nutrientes y contaminantes en alimentos.

La nicotinamida suele añadirse a los alimentos para asegurar un consumo adecuado de vitaminas. Para su extracción y limpieza de muestras de hígado de cerdo se ha sintetizado un MIP mediante la técnica de polimerización en bloque, utilizando cloroformo como disolvente de carga y lavado, y etanol para la elución (*Del Sole y col., 2011*).

Urraca y colaboradores han propuesto un método para la determinación de seis fluoroquinolonas en carne de pollo, mediante un proceso MISPE y posterior determinación por HPLC con detección fluorescente o espectrometría

de masas. Se optimiza la síntesis de pequeñas partículas esféricas del MIP sobre sílica (*Urraca y col., 2014*).

Se han determinado también fluoroquinolonas en muestras de leche empleando un polímero de impronta molecular magnético (MMIP) (*Zheng y col., 2014*).

Se ha propuesto un método para la determinación de ivermectina en muestras de carne de ternera, mediante LC-UV, previa extracción con un MIP preparado con ivermectina como molécula molde, 4-vinilpiridina como monómero y etilenglicol dimetacrilato como entrecruzante. El polímero se recubre con una capa de albúmina del suero bovino, que actúa como una barrera química biocompatible capaz de eliminar las proteínas de las muestras (*Marília de Lima y col., 2016*).

Los productos de degradación de la penicilina han podido determinarse mediante MSPD-HPLC en muestras de leche, obteniéndose buenas recuperaciones y límites de detección y cuantificación (*Luo y col., 2015*).

Para la determinación de varios macrólidos en muestras de cerdo, pescado y gamba se ha desarrollado un polímero de impronta molecular magnético utilizando eritromicina como molécula molde y nanopartículas de Fe_3O_4 como sustrato soporte. El MMIP muestra selectividad para múltiples antibióticos macrólidos (*Zhou y col., 2015*). Un MMIP se ha utilizado también como adsorbente en la determinación de roxitromicina en plasma humano, mostrando una gran afinidad y selectividad por dicho macrólido (*Ding y col., 2015*).

Zhao y colaboradores han obtenido microesferas poliméricas impresas molecularmente uniformes utilizando eritromicina como molécula molde, ácido metacrílico como monómero, etilenglicol dimetacrilato como entrecruzante y dodecibenceno sulfonato sódico como emulsionante (*Zhao y col., 2014*).

También se han utilizado los MIPs en procesos de dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD), combinando así las ventajas que ofrece el MIP para la extracción selectiva, con la sencillez de la técnica MSPD (*Guo y col., 2008*; *Sun y col., 2008*).

Dispensadores de medicamentos

Un dispensador de medicamentos eficiente es aquel que asegura que el medicamento está en el lugar correcto, en la dosis correcta y durante el tiempo correcto (*Chien, 2002*). Las características de los polímeros de impronta molecular, los hace adecuados para este fin, además de que son resistentes a los ataques químicos y enzimáticos, así como al estrés mecánico que puede existir en los fluidos biológicos.

Sin embargo, la posibilidad de utilización de los MIPs con este fin presenta algunos inconvenientes. En la síntesis de los MIPs se utilizan disolventes orgánicos que causan daños a las células, por lo que es necesario preparar polímeros hidrofílicos compatibles con los sistemas biológicos. Este tipo de polímeros presenta algunos problemas, debido a la debilidad de los enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas en el agua, lo que provoca una disminución de la selectividad del MIP por el analito (*Sellergren y Allender, 2005*).

En los últimos años se han enfocado los esfuerzos de la investigación a la utilización de los MIPs como dispensadores de medicamentos de forma controlada; su capacidad de unirse al fármaco de interés ha permitido utilizarlo como excipiente (*Allender y col., 2000*), por ejemplo, en la administración controlada, de nicotina por vía transdérmica (*Morais Ruela y col., 2014*); e incluso como portadores inteligentes de medicamentos, liberando el producto mediante un desplazamiento competitivo del mismo, con una molécula estructuralmente análoga, que actuaría como activador de la dosificación (*Shinkai y Takeuchi, 2004*), por ejemplo, un MIP que responde al azúcar con insulina enlazada basado en ácido fenilborónico, que es un receptor molecular de sacáridos, es prometedor en la terapia contra la diabetes (*Guo y col., 2015*).

Se está utilizando también un polímero de impronta molecular con propiedades magnéticas para el suministro del derivado 9H-carbazol en el tratamiento del cáncer (*Parisi y col., 2014*).

4.2 DETERMINACIÓN ANALÍTICA

Para la determinación de residuos orgánicos y contaminantes, entre los que se encuentran los antimicrobianos, la Unión Europea establece a través de la *Decisión 2002/657/CE*, dos grupos de técnicas de análisis, basándose en la *Directiva 96/23/CE*.

Técnicas de criba, barrido o screening

Su función es detectar con rapidez la presencia o ausencia de una sustancia o de un tipo de sustancias en los niveles de interés. Se utilizan porque, generalmente, no se conoce el tipo de residuos que puede contener la muestra, ni en qué intervalo de concentraciones se encuentran. Permiten analizar muchas muestras simultáneamente con el objetivo de buscar posibles resultados positivos y están, además diseñadas para evitar falsos negativos (*Decisión de la Comisión 2002/657/CE*). Las técnicas de análisis utilizadas con esta finalidad son:

- ✓ *Técnicas inmunológicas.* Se basan en el empleo de anticuerpos (Ac) que presentan sitios de reconocimiento con interacciones altamente específicas con los antígenos (Ag). La especificidad de esta unión Ag-Ac y el hecho de que pueda visualizarse por métodos directos (precipitación y aglutinación) o indirectos (marcajes) hace que los inmunoensayos puedan ser considerados como una valiosa herramienta analítica para la detección y cuantificación de una amplia variedad de compuestos. En el caso de la detección indirecta, se marca el anticuerpo o antígeno con una sustancia que proporcione una señal analítica; los marcadores pueden ser isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos o compuestos activos electroquímicamente. Existe una enorme cantidad de ensayos de tipo inmunológico, sin embargo entre los más utilizados están los test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

- ✓ *Técnicas microbiológicas.* Son de dos tipos:
 - De inhibición bacteriana. Se basan en la inhibición del crecimiento microbiano producido por la presencia de antibióticos en la muestra. Tradicionalmente, se han utilizado para la detección de residuos de antibióticos en productos alimenticios, especialmente leche y tejidos.

- Ensayos de receptores. Se basan en la utilización de receptores proteicos, en la unión del antibiótico a una proteína específica, alojada en la matriz de una membrana o situada en células microbianas.

- ✓ *Cromatografía en capa fina (TLC)*. Presenta el mismo principio de la mayoría de las técnicas cromatográficas basadas en el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. El/los analitos se adherirán a la fase estacionaria o se moverán con la fase móvil, desplazándose una distancia que será inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. El procedimiento es el siguiente: sobre una placa rectangular de vidrio, plástico o aluminio se fija una capa delgada de la fase estacionaria, que suele estar compuesta por gel de sílice, con ayuda de algún aglomerante orgánico o mineral. Se aplica un pequeño volumen de la muestra cerca del borde inferior de la placa en forma de mancha o de banda, y se introduce ésta en un recipiente en cuyo fondo está la fase móvil. La fase móvil migra por capilaridad a través de la fase estacionaria, arrastrando a velocidades diferentes los componentes de la muestra que se quieren analizar. Las mejoras en las características de los adsorbentes y el equipo utilizado dieron lugar a la técnica conocida como cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC).

Actualmente los métodos de criba más utilizados son los enzimoimmunoensayos, siendo los más conocidos los ensayos ELISA, que se han aplicado a la detección de promotores del crecimiento, entre los que se encuentran los macrólidos espiramicina y tilosina (*Situ y Elliott, 2005*); los biosensores, la cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC) y la HPLC (*Toldrá y Reig, 2006*).

Tradicionalmente, la determinación de residuos de medicamentos veterinarios, como puede ser la determinación de macrólidos en muestras biológicas o en productos alimenticios de origen animal, se ha llevado a cabo por métodos microbiológicos. Montero y sus colaboradores propusieron un método microbiológico específico para leche de oveja llamado Eclipse100®, que permite la detección de una cierta cantidad de agentes antimicrobianos. Comprobaron que el método no daba “falsos positivos”, y lograron límites de detección del orden de los LMRs establecidos por la UE para varias de las familias de antibióticos, aunque en el caso de los macrólidos los valores fueron superiores: 750 µg/kg para eritromicina, 18100 µg/kg para espiramicina y 230 µg/kg para tilosina (*Montero y col., 2004*).

Este tipo de ensayos presenta una serie de ventajas: permiten detectar la presencia de numerosos compuestos antimicrobianos, se requieren pequeñas cantidades de muestra, permiten analizar una gran cantidad de muestras simultáneamente con un tratamiento de muestra mínimo, el equipamiento necesario es mínimo y tienen un coste relativamente bajo. Sin embargo, tienen también una serie de inconvenientes: consumen demasiado tiempo, no cumplen con la especificidad (no es posible discriminar entre sustancias de una misma familia terapéutica) ni con la precisión que exige la actual legislación, no pueden detectar metabolitos inactivos microbiológicamente.

La separación por cromatografía en capa fina y posterior identificación de las fracciones activas por bioautografía (microorganismo utilizado *Bacillus subtilis* ATCC 6633) se ha empleado en la determinación de varios antibióticos, entre ellos la eritromicina, en muestras de leche de vaca. La extracción se realizó con acetonitrilo y la eliminación de grasa con éter de petróleo. Los LOQ se encontraban por debajo de los LMRs y las recuperaciones fueron del 90 al 100 % (*Ramírez, 2003*).

Bossuyt ya había utilizado, en 1976, esta técnica para separar e identificar residuos de varios antibióticos usados en el control de la mastitis, entre los que se encontraban la eritromicina y la oleandomicina, en leche, consiguiendo límites de detección entre 0,1 y 3 µg/mL (*Bossuyt y col., 1976*).

Taylor consiguió detectar residuos de ivermectina en suero, después de 3-4 semanas del tratamiento del animal, gracias a la cromatografía en capa fina, examinando los cromatogramas bajo luz ultravioleta tras derivatizar con anhídrido trifluoroacético y 1-metilimidazol (*Taylor y col., 1994*).

Se han descrito otros procedimientos para la separación de los macrólidos basados en la cromatografía en capa fina (*Harpster y col., 1980; Moats y col., 1985; Petz y col., 1987*), y electroforesis (*Krcmar y col., 1996*), todos acoplados a la detección bioautográfica de los analitos.

Técnicas de confirmación

Son aquellas que proporcionan información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de

interés. Han de proporcionar información sobre la estructura química del analito (*Decisión de la Comisión 2002/657/CE*).

Las técnicas de confirmación que cumplen con todos los requisitos establecidos por la legislación son las técnicas cromatográficas acopladas a diferentes detectores.

4.2.1 Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas permiten la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí en una mezcla homogénea líquida o gaseosa. Se basan en el principio de retención selectiva, las especies químicas tienen más afinidad por unos medios que por otros, y por ello son más o menos retenidas, lo que dará lugar a su separación. El proceso general consiste en que una fase móvil (líquido, gas o fluido supercrítico) se hace pasar a través de una fase estacionaria (sólido o líquido inmovilizado en un sólido). Cuando se introduce una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Después de terminar el recorrido de la muestra por la fase estacionaria, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirán en un tiempo diferente, es decir, estarán separadas. Seguidamente se utiliza un sistema de detección que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto. De esta manera se obtiene un cromatograma con un pico para cada analito, útil para un análisis tanto cuantitativo como cualitativo (*Skoog y col., 2003*).

Una clasificación de las técnicas cromatográficas, atendiendo a la naturaleza de las fases y al tipo de interacciones presentes sería:

- ✓ *Cromatografía líquida (LC)*. La fase móvil es un líquido. Se ha ido adaptando hasta convertirse en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
 - Cromatografía líquido-sólido o de adsorción. La fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que se adsorben las moléculas. Las interacciones implicadas son del tipo de Van der Waals.
 - Cromatografía iónica. La fase estacionaria es sólida con grupos funcionales ácidos o básicos (los más comunes son ácido sulfónico y aminas cuaternarias) unidos químicamente a su superficie y la fase

móvil es un tampón acuoso. Las interacciones implicadas son de tipo electrostático.

- Cromatografía de exclusión. La fase estacionaria tiene poros de las dimensiones adecuadas al tamaño de las especies que se pretende separar.
 - Cromatografía de reparto. La fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte que actúa como soporte. Si la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción se denomina cromatografía líquido-líquido. Si la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte, se denomina cromatografía de fase unida químicamente.
 - Cromatografía de afinidad. En la fase estacionaria se inmovilizan especies, como un inhibidor enzimático o un anticuerpo, mediante la formación de enlaces covalentes.
- ✓ *Cromatografía de gases (GC)*. La fase móvil es un gas. Según el fenómeno puede ser:
- Cromatografía gas-líquido. La fase móvil es un gas y la estacionaria un líquido inmovilizado sobre un soporte inerte. El analito se distribuye entre ambas fases.
 - Cromatografía gas-sólido. La fase estacionaria es un sólido poroso sobre el que se adsorben los analitos y la fase móvil un gas.
- ✓ *Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)*. La fase móvil es un fluido supercrítico y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

La cromatografía cumple dos funciones básicas:

- ✓ Separar los componentes de una mezcla para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente.
- ✓ Determinar la cantidad de cada componente de una mezcla.

Las técnicas más utilizadas para la determinación cualitativa y cuantitativa de antibióticos son las técnicas cromatográficas, y dentro de éstas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta o por espectrometría de masas. Aunque también se han desarrollado, en menor medida, métodos basados en HPLC con detección de fluorescencia o electroquímica, o en cromatografía de gases (GC).

Por ejemplo, se han determinado varios macrólidos (oleandomicina, kitasamicina, espiramicina y tilosina) en carne de cerdo y ternera, mediante cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (*Takatsuki y col., 1987*), o detección de ionización de llama (*Mineo y col., 1992*). Recientemente, se ha puesto a punto un método para la determinación de azitromicina en fluidos biológicos mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (*Thangadurai, 2015*).

Las ventajas de las técnicas cromatográficas frente a otras son su capacidad para llevar a cabo determinaciones multianalito, su especificidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, así como su excelente sensibilidad, que depende del detector utilizado. Esto ha llevado a la implantación de los métodos cromatográficos como métodos de validación de los demás métodos analíticos utilizados para la detección de residuos de antibióticos en todo tipo de muestras.

4.2.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es el resultado de la evolución de la cromatografía líquida en columna clásica, en la que se han mejorado considerablemente la selectividad y la resolución gracias al empleo de fases estacionarias muy elaboradas, con un tamaño de partícula mucho más pequeño, y gracias a los avances tecnológicos que han permitido poder trabajar a presiones elevadas para asegurar un caudal adecuado. Requiere de la utilización de equipos como el que se muestra en la figura 15.



Figura 15: Equipo HPLC

Un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia consta de los siguientes componentes:

1. *Recipientes para la fase móvil.* Son depósitos en los que se encuentran los disolventes que forman parte de la fase móvil. Generalmente llevan acoplado un sistema para eliminar los gases disueltos, cuya presencia interfiere en el proceso cromatográfico formando burbujas en la columna o en el sistema de detección. También suelen tener un dispositivo para filtrar los disolventes para que ninguna posible partícula pueda dañar la bomba, el sistema de inyección o producir atascos en la columna. Cuando durante la separación se utiliza la misma fase móvil de composición constante, el proceso se denomina separación isocrática, y puede utilizarse un único recipiente. En el caso de que la composición de la fase móvil varíe durante la realización de la cromatografía se denomina separación en gradiente, siendo necesario en este caso un recipiente para cada componente de la fase móvil.
2. *Bomba.* La bomba de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución es la encargada de suministrar un caudal adecuado de fase móvil para la realización del análisis. Tiene que cumplir una serie de requisitos, como son generar las altas presiones necesarias, proporcionar un flujo constante y permitir el control de un caudal reproducible, además de estar fabricada con materiales resistentes a la corrosión.
3. *Sistema de inyección.* Permite introducir la muestra en el cromatógrafo de manera reproducible, ya que uno de los factores que va a influir en la precisión de las medidas es precisamente la reproducibilidad con que se introduce la muestra en la columna. El sistema puede ser una sencilla válvula de inyección

que permite, en una posición, introducir la muestra en un bucle con una jeringa (posición de carga), y en la otra posición, el bucle queda entre la bomba y la columna, permitiendo que la fase móvil arrastre la muestra (posición de inyección); o puede ser un inyector automático, que permite programar la inyección secuencial de un determinado número de muestras.

4. *Columna de separación.* Contiene la fase estacionaria. Se construyen, generalmente, de acero inoxidable, aunque hay algunas de vidrio resistente, que sólo pueden utilizarse a bajas presiones. Hay una enorme variedad en cuanto a tamaños y tipos de relleno. En ocasiones se utilizan precolumnas para eliminar posibles contaminantes o sustancias que puedan quedarse irreversiblemente adsorbidas en la columna analítica, y así protegerla. En algunos procedimientos es necesario un control de la temperatura, para ello, hay equipos que disponen de un horno en el que se coloca la columna.
5. *Detector.* El detector es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, o bien una propiedad física del eluyente (índice de refracción, constante dieléctrica, densidad...), que se modifica por la presencia de los analitos, o bien una propiedad del analito (absorbancia en el UV, fluorescencia, corriente límite). La detección en cromatografía se realiza habitualmente en continuo.
6. *Sistema de adquisición de datos.* Se utiliza principalmente para registrar la información aportada por el detector. El registro de la propiedad medida en función del tiempo es denominado cromatograma.

La cromatografía de reparto de fase unida químicamente de alta resolución es la más utilizada actualmente. Dependiendo de las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria la cromatografía de reparto se divide a su vez en dos:

- ✓ *Cromatografía en fase normal.* La fase estacionaria presenta alta polaridad y la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes polares. La fase estacionaria puede ser un líquido de elevada polaridad (agua, trietilenglicol...) soportado sobre partículas de sílice o alúmina, o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan en su estructura grupos funcionales de alta polaridad (grupos ciano, amino, etc.). La fase móvil es un disolvente como hexano o isopropiléter.

- ✓ *Cromatografía en fase inversa.* La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilos) y la fase móvil es polar (una disolución acuosa con cantidades variables de metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano...). Es importante controlar que el pH no sea muy básico, ya que puede producirse la hidrólisis de los grupos siloxano unidos a la superficie de sílice provocando la destrucción del relleno. Las interacciones que tienen lugar son interacciones inespecíficas.

El procedimiento en fase inversa es el más ampliamente utilizado. Existen gran cantidad de fases estacionarias no polares en el mercado, y la mayoría están formadas por partículas de gel de sílice con grupos apolares enlazados a los grupos silanol. Estos grupos apolares llevan cadenas de hidrocarburos de diferente longitud y los más utilizados son n-octadecilo (C18) y n-octilo (C8). La fase móvil polar más utilizada está formada por mezclas de tampones acuosos con ACN o MeOH. El mecanismo de separación está basado principalmente en interacciones del tipo de Van der Waals o fuerzas de dispersión entre los grupos de la fase estacionaria y los del analito. Los analitos más polares eluyen primero y los más apolares eluyen después, además la retención aumenta cuando aumenta la hidrofobicidad del analito o la polaridad del disolvente. La polaridad de la fase estacionaria debe ser bastante similar a la de los analitos, utilizándose una fase móvil de polaridad distinta; en cualquier caso, las polaridades de los solutos, fase móvil y fase estacionaria deben estar bien armonizadas para conseguir una buena separación.

La posible disociación de los analitos también tiene un efecto importante en la retención, debido a que los analitos cargados son más hidrofílicos y, por tanto, eluyen más rápido que en su forma neutra. Por otro lado, la retención de los analitos también depende de las cadenas hidrocarbonadas enlazadas a la sílice y, generalmente, aumentan al aumentar la longitud de éstas. Entre las aplicaciones de este tipo de cromatografía destacan la separación de compuestos en el campo farmacéutico, bioquímico, clínico, forense, medioambiental e industrial.

En cuanto al sistema de detección, los más populares de todos son el detector de absorbancia UV-Vis y la espectrometría de masas. El detector de absorbancia UV-Vis de longitud de onda variable o de diodos (DAD) es el detector que posee la mejor combinación de sensibilidad, versatilidad y fiabilidad. El único problema que presenta es que no es un detector universal, ya que solamente detecta aquellos compuestos

que presentan absorción en esta zona del espectro. Afortunadamente, este grupo de compuestos es amplio e incluye a todos los compuestos aromáticos, alquenos y todos aquellos compuestos que presentan enlaces múltiples entre C y O, N o S. La detección por espectrometría de masas (MS) permite obtener una sensibilidad muy elevada aunque todavía es una técnica demasiado costosa para muchos laboratorios de análisis.

La cromatografía líquida de alta resolución es, sin duda alguna, la técnica de separación más utilizada para la determinación de antibióticos. Esta técnica se emplea principalmente para separar y determinar numerosas especies en una gran variedad de muestras y materiales.

La literatura recoge distintos métodos para la determinación de macrólidos en muestras medioambientales, biológicas (tejido animal, orina, plasma) y alimentos, incluida la leche; entre estos métodos destacan la cromatografía líquida con detección ultravioleta, electroquímica, fluorescente o por espectrometría de masas.

Los macrólidos son compuestos lipofílicos que poseen cierto carácter básico. Su separación se ha llevado a cabo, generalmente, en columnas de fase inversa, con materiales desactivados, principalmente octadecil- (C18), aunque también se han utilizado columnas octil- (C8) (*González de la Huebra y col., 2003; González de la Huebra y col., 2004; González de la Huebra y col., 2007*). Furusawa determinó espiramicina utilizando una columna de fase normal LiChrosorb NH₂ con la que consiguió mejores picos que con otras de tipo C18 con las que comparó los resultados (*Furusawa, 1999*). Frieder Kees utilizó una columna con un material ciano propilo, que resultó ser más adecuado para el análisis de macrólidos en muestras biológicas que otros del tipo C18, con los que encontró que se producían algunas interferencias en dichas muestras (*Kees y col., 1998*).

Como fase móvil se utilizan normalmente mezclas de agua, metanol y acetonitrilo en distintas proporciones a diferentes valores de pH. Para regular el pH se suele utilizar una disolución tampón, que generalmente es una disolución reguladora de fosfato o acetato, aunque en ocasiones se ha utilizado ácido fórmico, ácido trifluoroacético (TFA), o ácido acético (*Jank y col., 2015; Xue y col., 2015; De Baere y col., 2015; Rezende y col., 2012*).

La Directiva 93/256/CEE establece que: “los métodos basados solamente en el análisis cromatográfico, sin el uso de detección espectrométrica molecular, no son adecuados para su uso como métodos confirmatorios”, concepto que se reforzó con la directiva 2002/657/CE. Esta normativa ha generado un gran impulso en el desarrollo de los métodos en los que se combina la LC con, sobre todo, detección UV-DAD y MS (Zhou y col., 2015; Wang y col., 2015; Mastovska, 2011; González de la Huebra y Vincent, 2005).

Se han determinado mezclas de diferentes macrólidos y de macrólidos con otros antibióticos utilizando HPLC con detección ultravioleta en muestras medioambientales, como suelos (Blackwell y col., 2004), o aguas superficiales y subterráneas (Blackwell y col., 2004a); muestras biológicas y de alimentos, como diferentes tejidos (músculo, hígado, riñón) de diversos tipos de animales (pollo, cerdo, ganado vacuno) (Horie y col., 1998; Prats y col., 2001; Leal y col., 2001) o huevos (Furusawa y col., 1999). También se han puesto a punto métodos para su determinación en piensos para animales (Civitareale y col. 2004). Se ha determinado roxitromicina en plasma humano (Macek y col., 1999) y eritromicina en geles tópicos para el acné (Dehouck y col., 2003).

Las longitudes de onda que han utilizado en estos trabajos para la determinación de los diferentes macrólidos son 210 - 215 nm para eritromicina y oleandomicina, 220 nm para roxitromicina, 230 - 232 nm para josamicina, y espiramicina y 280 - 287 nm para la tilosina.

En el año 2007, el método propuesto por Berrada y colaboradores fue validado como método de confirmación de acuerdo a lo establecido por la Unión Europea en su Decisión 657/2002 (Berrada y col., 2007). Consiste en la determinación de una mezcla de macrólidos en muestras de tejidos animales mediante HPLC-UV-DAD; utilizan una columna C18 y una elución en gradiente usando como componente A de la fase móvil, disolución reguladora fosfato/ácido fosfórico a pH = 3,5, y como componente B, acetonitrilo. La temperatura de la columna se fijó a 35 °C. Las longitudes de onda a las que se detectaron los componentes de la mezcla fueron: 210 nm para eritromicina, troleandomicina y roxitromicina; 232 nm para josamicina y espiramicina; y 287 nm para tilosina.

La absorción UV proporciona en general una sensibilidad adecuada pero, para la mayoría de los análisis de fármacos, no permite obtener información estructural y está

sujeta a múltiples interferencias, lo que hace que sea necesaria una etapa previa de limpieza de muestra o bien, una derivatización de los compuestos. Sin embargo, el uso del detector DAD ha permitido mejorar la selectividad del método, ya que permite la medida a distintas longitudes de onda, lo cual minimiza el efecto matriz (*Bilandžić, 2011*).

Reuvers propuso un método para la detección de ivermectina en hígado y músculo de ganado basado en HPLC-UV-DAD, como método rápido de screening. Consiguió recuperaciones de 78,6 % en músculo, y de 78,5 % en hígado, con un límite de detección de 5 - 10 µg/kg (*Reuvers y col., 1993*).

La detección fluorimétrica no se ha utilizado tan extensamente como la de absorción UV, ya que la mayoría de los antibióticos macrólidos no presenta fluorescencia. Sin embargo, este sistema de detección sí se ha aplicado al análisis de ivermectina en plasma, previa reacción de derivatización con anhídrido trifluoroacético y N-metilimidazol, (*Montigny y col., 1990; Prieto y col., 2003; Kitzman y col., 2006*), así como en sangre, suero y tejido muscular (*Dickinson, 1990*).

Se han descrito algunos procedimientos basados en el acoplamiento de detectores electroquímicos (culométricos) a HPLC para el análisis de antibióticos macrólidos. Estos dispositivos responden a sustancias electroactivas y son muy sensibles, simples y con una extensa aplicabilidad. Se han determinado así: claritromicina en tejidos y jugos gástricos y plasma (*Wibawa y col., 2003*), en estas mismas muestras se ha determinado eritromicina (*Toreson y Eriksson, 1995*) y roxitromicina en plasma y orina humanos (*Hedenmo y Eriksson, 1995; Demotes-Mainaird y col., 1989*). También se ha utilizado este sistema de detección para el análisis de mezclas de varios macrólidos en fluidos corporales (*Kees y col., 1998; González de la Huebra y col., 2004*), y en piensos para animales (*González de la Huebra y col., 2007*).

Los métodos de LC acoplada a espectrometría de masas (MS) son los más utilizados para la determinación de antibióticos en una gran diversidad de matrices ya que, este sistema de detección ofrece la posibilidad de análisis de compuestos polares, no volátiles y/o termolábiles con buena sensibilidad y, sobre todo, especificidad. En la actualidad, el 80 % de las técnicas empleadas para la determinación de residuos veterinarios están basados en LC-MS (*Wang y col., 2015; Mastovska, 2011; González de la Huebra y Vincent, 2005*).

En espectrometría de masas, inicialmente se utilizaba el sistema de nebulización térmica, el cual se ha ido reemplazando por interfases basadas en ionizaciones más suaves, como son las basadas en ionizaciones a presión atmosférica (APCI), que se han utilizado para la determinación de ivermectina en hígado de cerdo (*Wu y col., 2001*), de eritromicina en pescado e hígado de pollo y ternera (*Bajic y col., 2000*), o para el análisis de mezclas de macrólidos y otros antibióticos en suelos (*Schlüsener y col., 2003*); y las basadas en electronebulización (ESI), sistema que se ha empleado para la separación y determinación de mezclas de macrólidos en diferentes tipos de carne y pescados (*Codony y col., 2002; Berrada y col., 2008; Rezende, C.P. y col., 2012*), o para el análisis de mezclas de diversos antibióticos que incluyen macrólidos en aguas residuales (*Evelyn y col., 2007*) y en suelos agrícolas (*Jacobsen y col. 2004*). También se ha utilizado este tipo de interfase de electronebulización para la determinación de varias sustancias promotoras del crecimiento prohibidas por la UE, entre las que se encuentran la espiramicina y la tilosina, en alimentos para animales (*Van Poucke y col., 2005*).

F. Sacher y col. han evaluado la presencia de varios macrólidos, además de otros antibióticos, en aguas subterráneas de Baden-Württemberg (Alemania) mediante LC-ESI-MS/MS, obteniéndose límites de detección que reflejan la elevada sensibilidad del procedimiento desarrollado (*Sacher y col., 2001*).

Estos sistemas también se ha encontrado que tienen algunas limitaciones, como la incapacidad de aceptar caudales de fase móvil elevados o de asimilar fases móviles con alto contenido en sales. Por ello, se están utilizando nuevas interfases como el triple cuadrupolo (QqQ), por ejemplo para la determinación de residuos de eritromicina, tilmicosina y tilosina en tejidos (*Draisci y col., 2001*); en la determinación de ivermectina en plasma (*Croubels y col., 2002*); o en la de una mezcla de antibióticos de varias familias, incluidos los macrólidos, en leche y carne (*Cepurnieks y col., 2015*). También se ha utilizado el triple cuadrupolo en el análisis de mezclas de diversos productos farmacéuticos, entre los que hay varios macrólidos, en muestras medioambientales, por ejemplo en aguas (*Hirsch y col., 1998*), en suelos (*Schlüsener y col. 2003*) o en sedimentos fluviales (*Löffler y Ternes, 2003*). Otra mejora introducida en los sistemas de detección por espectrometría de masas es la trampa iónica (IT), utilizada por ejemplo para la determinación de eritromicina, roxitromicina y tilosina en aguas naturales y residuales (*Yang y Carlson, 2004*), o en el análisis de espiramicina y sus metabolitos en plasma de rata (*Zhong y col., 2003*).

Son pocos los trabajos sobre la determinación de macrólidos en muestras de leche de vaca, y hasta la fecha, no hay estudios sobre el análisis de estos fármacos en muestras de leche de oveja.

Dreassi y sus colaboradores han comparado dos métodos cromatográficos para la determinación de eritromicina A en muestras de leche de vaca y otros tejidos animales (músculo, riñón, hígado). El primer método fue la determinación tradicional por LC con detección electroquímica y el segundo se basaba en la reacción de la eritromicina con un cromóforo y posterior determinación por LC con detección ultravioleta a 236 nm. Se empleó un estándar interno para verificar la variabilidad del sistema. Las recuperaciones por ambos métodos fueron superiores al 95 % y los LOQ no mostraron diferencia intermétodo: 0,25 µg/g para plasma, 0,025 µg/g para leche y 0,125 µg/g para el resto de matrices, constituyendo un método útil para la determinación de residuos de eritromicina A en dichas matrices (*Dreassi y col., 2000*).

Se han determinado residuos de tilosina en leche de vacas que habían sido tratadas con este antibiótico, utilizando HPLC con detección ultravioleta a 287 nm. El límite de detección fue de 10 ppb y el porcentaje de recuperación estuvo entre 89 % y 94 % (*Sokol y col., 1996*).

Se ha llevado a cabo la determinación de ivermectina en leche de vaca mediante LC con detección fluorimétrica, tras un tratamiento de la muestra utilizando MSPD, consiguiéndose recuperaciones de 97,7 % (*Schenck, 1995*). Cerkvénik y colaboradores también determinaron ivermectina mediante HPLC-FD, pero en leche de oveja y productos derivados (yogur, queso, suero y proteínas del suero) consiguiendo recuperaciones entre 87 % y 100 % y un límite de detección de 0,1 µg/kg. Observaron que durante el proceso de elaboración del queso se perdía aproximadamente un 35% de la ivermectina presente en la leche cruda.

La ivermectina también se ha determinado, junto a otros compuestos análogos, en leche, mediante HPLC-MS utilizando como métodos de ionización la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI) (*Turnipseed y col., 2005*).

Bogialli y colaboradores determinaron antibióticos macrólidos en leche y yogur con un método basado en la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), utilizando agua caliente como extractor y posterior cuantificación por LC-MS, obteniendo unas

recuperaciones del 68 – 86 % y límites de cuantificación (LOQ) inferiores a los LMRs establecidos por la Unión Europea (*Bogialli y col., 2007*).

Se han determinado macrólidos en leche mediante LC-MS, con un tratamiento previo de limpieza de muestras mediante extracción en fase sólida con acetonitrilo como disolvente. Las recuperaciones fueron cercanas al 100 % y los límites de detección < 0.3 µg/Kg, muy por debajo de los LMRs. (*Wang, J. 2006*).

En el caso de Dubois y colaboradores, el pretratamiento de las muestras (varios tejidos, huevos y leche) consistió en un paso de extracción de los antibióticos macrólidos con tampón TRIS, a pH = 10,5, seguido de precipitación de las proteínas con wolframato sódico y finalmente una limpieza por SPE. La determinación se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas. Los resultados mostraron una buena precisión y exactitud del método (*Dubois y col., 2001*).

Recientemente se ha desarrollado y validado un método para el análisis de residuos de 12 clases de medicamentos, entre los que se encuentran algunos macrólidos, en leche de vaca, mediante UHPLC/ESI Q-Orbitrap. El procedimiento requiere la precipitación previa de las proteínas con un tampón, y realiza la extracción de los analitos mediante un proceso de SPE (*Wang y col., 2015*).

Como se ha comentado, no se conocen trabajos en los que se hayan determinado antibióticos macrólidos en leche de oveja, por lo que los estudios de esta memoria son pioneros en el tema de investigación.

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos macrólidos han sido ampliamente utilizados en la práctica veterinaria y se han administrado en ocasiones como aditivos en los alimentos de los animales o en su agua de bebida.

Un uso no adecuado, o no guardar los tiempos reglamentarios de espera tras el tratamiento del animal con antibióticos, ocasiona la aparición de residuos del medicamento en los alimentos, con los problemas que conlleva de posibles reacciones alérgicas en los individuos y de inducción de resistencias en las bacterias.

Esta es la razón por la que la Comisión Europea ha establecido una legislación específica para el control de residuos de antibióticos en productos alimenticios de origen animal, fijando unos límites máximos de residuos posibles en diferentes muestras de alimentos, así como para indicar las técnicas que han de utilizarse para su determinación y las características que deben cumplir los métodos utilizados.

La leche de oveja es una muestra compleja, con gran cantidad de proteínas y grasa, que requiere pretratamientos eficientes para la preconcentración del analito y limpieza, que reduzcan las interferencias y mejoren la exactitud y precisión del análisis. La mayoría de los métodos que se utilizan para el análisis de leche de oveja no han sido validados para esta muestra, sino que lo fueron para leche de vaca y se traslada su aplicación a la de oveja, dando lugar en ocasiones a resultados sospechosos. Por ello se requiere el desarrollo de métodos de tratamiento de muestra y análisis específicos para la leche de oveja.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de nuevas estrategias analíticas para llevar a cabo extracciones selectivas en las etapas de tratamiento de muestras, acopladas a la cromatografía de líquidos con detección ultravioleta con serie de diodos integrados, para la determinación de antibióticos macrólidos en muestras de leche de oveja.

Con esta finalidad se desarrollarán métodos de análisis en los que gradualmente se irán incrementando mejoras en los tratamientos de muestra para conseguir una serie de objetivos parciales específicos:

- ✓ Proporcionar un método robusto y reproducible que sea independiente de posibles variaciones en la matriz de la muestra.
- ✓ Convertir el analito en una forma adecuada para su análisis.
- ✓ Eliminar las posibles interferencias.
- ✓ Mejorar la sensibilidad de los métodos mediante la preconcentración del analito en la etapa de tratamiento de muestra.
- ✓ Reducir al mínimo posible las etapas del análisis.
- ✓ Reducir el tamaño de la muestra requerida.
- ✓ Reducir los volúmenes de disolventes orgánicos necesarios.
- ✓ Que el proceso de extracción sea cada vez más específico y más selectivo.
- ✓ Que el método sea susceptible de automatizarse.

Así, para lograr el objetivo final de esta memoria se desarrollará y pondrá a punto un método para la separación y determinación de varios antibióticos macrólidos (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina, tilosina e ivermectina) mediante HPLC-UV-DAD.

También, se desarrollará, evaluará y optimizará un método simple y efectivo basado en MSPD para la extracción cuantitativa de antibióticos macrólidos (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina, tilosina e ivermectina) de leche de oveja manchega que permita la limpieza simultánea

de la muestra.

En una segunda parte, se llevará a cabo la síntesis y caracterización de polímeros de impronta molecular mediante polimerización en bloque, utilizando eritromicina y espiramicina como moléculas plantilla. Tras su evaluación, estos polímeros se aplicarán como adsorbentes en SPE (MISPE) en la extracción selectiva y cuantitativa de eritromicina, espiramicina y otros macrólidos de estructura semejante en muestras complejas de leche de oveja manchega.

III. PARTE EXPERIMENTAL

**1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
COMPUESTOS MACRÓLIDOS DE LECHE DE
OVEJA PARA SU DETERMINACIÓN CON
HPLC-UV-DAD**

El empleo de antibióticos en veterinaria está permitido si se trata de combatir determinadas enfermedades de los animales productores de alimentos. Sin embargo, están completamente prohibidos cuando se usan simplemente para la prevención de enfermedades o como promotores del crecimiento, dado que esto puede significar la presencia de residuos de los mismos en los productos alimenticios. Además, en ocasiones, como es el caso del alimento objeto de estudio en esta memoria (la leche) los antibióticos se añaden directamente para prolongar su frescura.

Desde el punto de vista de la salud, la presencia de estos residuos en los alimentos puede provocar, por ejemplo, reacciones alérgicas en los consumidores. Esto, unido también a un mal uso en medicina humana, provoca que las bacterias estén expuestas a cantidades subterapéuticas de antibióticos, desarrollando resistencias a los mismos, las cuales, no sólo se generan al antibiótico al que han sido expuestas, sino también a otros de la misma familia con estructura parecida y a los de otras familias que tengan estructuras o mecanismos de acción similares, esto es lo que se conoce como resistencias cruzadas. Estos hechos conllevan diferentes problemas en la salud humana, además de dificultad para encontrar tratamientos adecuados para ciertas infecciones.

Desde el punto de vista tecnológico, los residuos de antibióticos en leche interfieren en el procesado y obtención de los derivados lácteos, ya que dificultan la coagulación de la leche, así como la maduración del queso.

Todo esto ha llevado a que la Unión Europea estableciera límites máximos de residuos en productos alimenticios de origen animal, y a que estos límites vayan siendo cada vez más restrictivos.

El problema de los residuos de antibióticos ha alcanzado tal magnitud que incluso la Organización Mundial de la Salud ha emitido un informe alertando de la necesidad de tomar medidas al respecto.

Una de las familias de antibióticos más utilizadas en veterinaria es la de los macrólidos, utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que destaca la mastitis, y utilizados también, hasta hace unos años, como promotores del crecimiento.

Por ello, es necesario establecer mecanismos de prevención y control para evitar la llegada de alimentos contaminados con antibióticos al consumidor.

Entre los mecanismos de control están los métodos de detección y determinación basados en diferentes principios analíticos.

Se han puesto a punto métodos para la determinación de antibióticos macrólidos en diferentes muestras de alimentos. Entre estas muestras está la leche de vaca, para la que se han propuesto métodos basados en la cromatografía de líquidos con detección UV-DAD, de fluorescencia, electroquímica y sobre todo, de espectrometría de masas (*Aguilera-Luiz y col., 2008; Bogjalli y col., 2007; Bohm y col., 2009; Clark y col., 2011; Gomis y col., 2006; Jian, 2009; Juan y col., 2010; McGlinchey y col., 2008; Ortelli y col., 2009; Sanli y col., 2011; Turnipseed y col., 2011; Wang y Leung, 2007*).

Todos estos métodos han sido desarrollados y evaluados para la leche de vaca, siendo escasos los estudios de su adecuación a la especie ovina, especie en la que, los antibióticos macrólidos son el segundo grupo más empleado.

En España, la calidad de la leche de oveja tiene especial interés, puesto que la mayor parte se utiliza para la elaboración de distintos tipos de quesos. Muchos de estos productos cuentan con el reconocimiento de importantes certámenes, o incluso con la calificación de Denominación de Origen Protegida, como es el caso de los Quesos Manchegos, uno de los más conocidos, elaborados con leche de oveja de raza manchega.

CERSYRA es un Centro Regional de Selección y Reproducción Animal dependiente de la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha, encargado de preservar y mejorar la raza ovina manchega. Las actividades del Centro se dirigen a dar servicios a los ganaderos a través de sus asociaciones, a la actividad experimental e investigadora y a la formación tanto de técnicos como de estudiantes y ganaderos u otras personas relacionadas con el sector ganadero.

Las muestras de leche de oveja utilizadas para el desarrollo de esta tesis doctoral han sido proporcionadas por este Centro.

La leche es una matriz compleja debido a su alto contenido en proteínas y grasa, las cuales suelen interferir en los análisis. En el caso de la leche de oveja este problema

es aún mayor, puesto que contiene casi el doble de proteínas que la leche de vaca, y más del doble de grasa. Por ello, los métodos de análisis optimizados para la leche de vaca y que se utilizan con leche de oveja pueden dar lugar a resultados confusos y difíciles de interpretar y en muchos casos completamente erróneos.

Esto es aún más notorio en los procedimientos de tratamiento y preparación de la muestra, de forma que muchos de los métodos de análisis que han sido desarrollados y optimizados para la leche de vaca no pueden extrapolarse al análisis de leche de oveja.

Las técnicas usadas para la extracción de antibióticos macrólidos de leche de vaca son la extracción líquido-líquido (*Aguilera-Luiz y col., 2008; Gomis y col., 2006; Orтели y col., 2009*), la extracción en fase sólida (*Bohm y col., 2009; Wang y Leung, 2007*) o la extracción con líquidos a alta presión (*Juan y col., 2010*). Se trata, generalmente, de procedimientos laboriosos, que requieren múltiples pasos, con un elevado consumo de muestra y disolventes, que se traduce en un alto tiempo de análisis y un coste elevado del mismo.

Teniendo en cuenta todo lo dicho, es necesario desarrollar y optimizar nuevos métodos de tratamiento de muestra y de determinación de residuos de antibióticos macrólidos apropiados para la leche de oveja, que sean sensibles y precisos y además, sencillos, rápidos y económicos.

A este respecto, el primer trabajo realizado en la presente memoria fue el desarrollo de un nuevo método de separación y determinación de 7 antibióticos macrólidos en leche de oveja mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección de diodo array (HPLC-DAD).

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS MACRÓLIDOS DE LECHE DE OVEJA Y OPTIMIZACIÓN DE SU SEPARACIÓN MEDIANTE HPLC-UV-DAD

M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría,
*Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue
determination of macrolide antibiotics in sheep's milk*, Journal of Chromatography A,
1122 (2006) 76-83

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Póster: "Simultaneous determination of macrolide antibiotics in milk by UV-HPLC",
Euroanalysis XIII: The European Conference on Analytical Chemistry, 5-10
September 2004, Salamanca, Spain.

INTRODUCCIÓN

Los dos objetivos principales de este trabajo fueron: por un lado, la optimización de la separación cromatográfica de los siete macrólidos seleccionados (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, josamicina, espiramicina, tilosina e ivermectina) utilizando cromatografía líquida de alta eficacia con un detector de ultravioleta-visible de serie de diodos integrados; y por otro, el desarrollo de un método de extracción adecuado de esos siete analitos de muestras de leche de oveja.

Durante el proceso de optimización de la separación cromatográfica se evaluaron los diferentes parámetros que podían influir en la misma, como son la columna de separación utilizada, la composición de la fase móvil, la temperatura y la velocidad de flujo.

Se compararon dos columnas cromatográficas, una LiChrosorb con partículas de 5 μm , de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno; y una Hypersil ODS de las mismas características, pero cuyas partículas son esféricas e irregulares, lo que conlleva un aumento del área superficial de la fase estacionaria, consiguiendo así una mejor elución de los analitos y una disminución de los tiempos de retención.

Los estudios se iniciaron con la columna LiChrosorb y utilizando como disolvente A de la fase móvil, una disolución reguladora HAc/NH₄Ac, y como disolvente B diferentes combinaciones de acetonitrilo, metanol y acetato amónico. El pH de la fase móvil estaba en torno a 7, lo cual podía provocar la disociación de los grupos silanol residuales de la fase estacionaria en especies débilmente aniónicas, dando lugar a una mayor retención de los compuestos macrólidos. Para conseguir una fase móvil un poco más ácida se decidió utilizar como disolvente A, una disolución reguladora de dihidrógenofosfato de potasio y ácido fosfórico. Problemas de estabilidad de la línea base llevaron a suprimir el metanol de la composición del disolvente B, dejando sólo como fase móvil acetonitrilo, que es un disolvente más transparente a la radiación ultravioleta.

Se probaron varios valores de la velocidad de flujo, entre 0,2 y 1,2 mL·min⁻¹, observándose que a bajas velocidades el tamaño del pico y la cola del pico final

aumentaban, así como los tiempos de retención de los analitos. Por lo que se optó por una velocidad de flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

La elución de los analitos se llevó a cabo a diferentes valores de temperatura. Con la primera columna (LiChrosorb) se trabajó a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, comprobándose que el aumento de la misma mejoraba la eficiencia de la separación en la columna, posiblemente por la disminución de la viscosidad de la fase móvil, lo que permitía un análisis más rápido. Con la segunda columna (Hypersil ODS) se trabajó con valores de temperatura de entre $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, observándose que no había una influencia significativa ni en los tiempos de retención, ni en la forma de los picos, por lo que se decidió mantener la columna a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la separación.

Posteriormente, y utilizando ya la columna Hypersil ODS, se ensayaron diferentes programas de elución en gradiente, hasta conseguir el óptimo.

Se logró una separación satisfactoria de los 7 macrólidos en 30 minutos de análisis.

En cuanto al proceso de tratamiento de las muestras de leche de oveja y la extracción de los analitos de las mismas, generalmente son necesarios varios pasos con el consiguiente consumo de disolventes. Es necesario comenzar homogeneizando la leche. A continuación hay que precipitar y separar las proteínas, eliminar la grasa y extraer y purificar los analitos.

La precipitación de las proteínas se llevó a cabo inicialmente con una mezcla de disolución reguladora de fosfato a $\text{pH} = 5,2$ y acetonitrilo; sin embargo, tras el centrifugado el sobrenadante permanecía turbio. Se optó por bajar el pH de la disolución reguladora a un valor de $3,4$, consiguiendo así la precipitación completa de las proteínas, con la consiguiente limpieza de los extractos.

Se estudió la eliminación de la grasa mediante extracción líquido-líquido con n-hexano y posteriormente se utilizaron varios disolventes: acetonitrilo, metanol, cloroformo, diclorometano y acetato de etilo, para extraer los analitos. En ningún caso se lograron unas recuperaciones aceptables, aunque con acetato de etilo fueron un poco mejores, posiblemente porque parte de los analitos se extrajeron a la vez que la grasa debido a su naturaleza lipofílica.

Se probó, entonces, a realizar una única extracción líquido-líquido añadiendo simultáneamente una disolución de NaOH, para eliminar la grasa mediante una hidrólisis alcalina, y un disolvente orgánico (se eligió el acetato de etilo) para extraer los analitos. Se ensayaron diferentes cantidades de uno y otro, así como el número de veces que era necesario realizar la extracción. Se obtuvieron buenos resultados con 1 mL de NaOH y 5 mL de acetato de etilo en una única extracción.

Las recuperaciones fueron buenas para todos los analitos, entre 55,5 % y 77,4 %, excepto para la ivermectina que solo se consiguió una recuperación del 13 %.

El método propuesto para la extracción y purificación de los analitos, y su posterior determinación mediante HPLC-UV-DAD presenta unas buenas características analíticas en cuanto a repetibilidad y precisión, con recuperaciones entre 58,1 % y 74,4 % de todos los analitos en análisis realizados por duplicado durante 4 días sucesivos, excepto para IVER que fueron de 13,9 % y 14,8 % para cada una de las concentraciones estudiadas, así como unos límites de cuantificación (24,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ERY, OLE, SPI, JOS y TYL, 48,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ROX y 72,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para IVER) acordes con los valores establecidos por la legislación (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ERY y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para TYL)

Este método presenta, además, una serie de ventajas, como son: la disminución de las cantidades de disolventes empleadas en el proceso o el poco tiempo requerido para la preparación de la muestra, lo cual reduce la posibilidad de contaminación de la misma.

Y por último, resuelve un problema analítico de interés químico y social, como es la determinación de antibióticos macrólidos en leche de oveja, que hasta ahora no habían sido estudiados.

Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk

M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando*, J.S. Durand-Alegría

Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance Education (UNED), 28040 Madrid, Spain

Received 24 January 2006; received in revised form 7 April 2006; accepted 12 April 2006

Available online 8 May 2006

Abstract

A rapid, simple and sensitive liquid chromatography–UV diode-array detection method was developed for the simultaneous determination of seven macrolides (erythromycin, oleandomycin, roxithromycin, josamycin, spiramycin, tylosin and ivermectin) in sheep's milk. The column, mobile phase, temperature and flow rate were optimised to provide the best resolution of these analytes. The extraction of the antibiotic residues involves the treatment of protein-free samples with a combination of concentrated sodium hydroxide and ethyl acetate. Necessary defatting is achieved by alkaline hydrolysis. The recovery of each antibiotic was between 55% and 77%, with relative standard deviations ranging from 1% to 6.5%. The limit of quantification was 72.4 µg/kg for ivermectin, 48.3 µg/kg for roxithromycin, and 24.1 µg/kg for erythromycin, oleandomycin, spiramycin, josamycin and tylosin. The procedure was successfully used in the multi-residue determination of these macrolides at levels below the maximum concentrations legally allowed in milk samples.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Liquid chromatography; Macrolides; Antibiotic residues; Milk

1. Introduction

Macrolide antibiotics are lipophilic molecules with a central 12–16 carbon atom lactone ring to which several amino and/or neutral sugars are bound [1,2]. They are widely used in human and veterinary medicine (with cattle, sheep, swine and poultry) to prevent and treat microbial infections. Some macrolides are permanently used as feed additives to promote animal growth, or added directly to human food (mainly milk) to prolong its freshness [3].

The systematic use of antibiotics in livestock feed may leave residues in derived foods, including milk, and this can have undesirable effects on consumer health (development of allergic reactions, appearance of resistant bacteria, etc.), and they are suspected of causing cross-resistance to other antibiotics of similar structure or mechanisms of action. The European Union

has established regulations for most of the drugs used in veterinary medicine, including macrolide antibiotics and has set out maximum residues levels (MRLs) for them [4].

The determination of macrolides has traditionally been performed by microbiological and immunological assays [5]. However, these are often time-consuming and lack the specificity and precision required by current legislation. The literature reports the analysis of macrolides in animal tissues, urine, plasma and foods (including milk) using LC with UV, electrochemical, fluorescence or MS detection [2,6–20]. The majority of these studies agree that one of the most difficult steps in antibiotic analysis is the extraction and clean-up of the drug from the biomatrix. Macrolides are commonly extracted from biological matrices into organic solvents and further preconcentrated by solid-phase extraction, always after the elimination of proteins and fat. However, recovery is dramatically affected by the type of biological matrix.

Milk is a complex matrix due to its high protein and fat content, which often interfere in analytical procedures. The fat content of sheep's milk is particularly high (7.9% compared to 3.7% in cow's milk), making the isolation of macrolides

* Corresponding author at: C/Senda del Rey no 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 398 72 84; fax: +34 91 398 83 79.

E-mail address: phernando@ccia.uned.es (P. Fernández-Hernando).

from it especially complicated and laborious. Several methods have been described for extracting and determining multiple macrolides in cow's milk [21–27], but to our knowledge, no reliable methods are available for use with sheep's milk. The two papers that have been published in this area deal with the determination of just one macrolide (ivermectin) [28,29].

Due macrolide antibiotics are produced from *Streptomyces* yeasts, and are formed by homologous components, it is difficult to monitor all these components since their residual levels in biological matrices are too low. This study is focussed on the development of a robust, simple and practical method capable of simultaneously extracting and analysing the selected macrolides.

The proposed multi-residue LC–DAD (UV diode-array detection) method is the first one capable of determining seven macrolide antibiotics in samples of “Manchega” sheep's milk at concentrations lower than those allowed by current legislation. The selected analytes were erythromycin (ERY), oleandomycin (OLE), roxithromycin (ROX), josamycin (JOS), spiramycin (SPI), tylosin (TYL) and ivermectin (IVER) (see Fig. 1 for chemical structures).

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Commercial macrolide standards (erythromycin, oleandomycin phosphate, tylosin hemitartrate and spiramycin) were supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany), roxithromycin and ivermectin were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain), and josamycin from Fluka (Steinheim, Germany). Potassium dihydrogenphosphate, phosphoric acid, sodium hydroxide and *n*-hexane were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and methanol (supergradient LC grade) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain), ethyl acetate from Sigma–Aldrich, and dichloromethane from Fluka. All reagents used were of analytical grade or better.

Deionised water (18.2 M Ω cm) used for the preparation of all aqueous solutions was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

2.2. Samples

Macrolide-free sheep's milk was kindly provided by CER-SYRA, a regional centre for animal selection and reproduction in Valdepeñas (Spain). In this central region of Spain, the “Manchega” breed of sheep is raised to produce a prestigious cheese which enjoys *Appellation Contrôlée* status.

The milk was stored at -20°C until use. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and then homogenized by heating at 40°C for 3 min. The recovery experiments first involved spiking these samples with the desired amount of each antibiotic. The spiked samples were homogenized by manual shaking and maintained at room temperature for 20 min to allow the equilibration of the macrolides with the milk matrix before their extraction.

2.3. Preparation of standard solutions

Standard stock solutions of individual macrolides (1 g L^{-1}) were prepared by dissolving 10 mg of each compound in 10 mL of methanol. These solutions were stored in dark glass bottles at 4°C and were stable for at least 3 months. A standard mixture of macrolides (100 mg L^{-1} of each analyte) was prepared daily by diluting with KH_2PO_4 50 mM (pH 4.5)–acetonitrile (ACN) (70:30), pH 5.9. These samples were also stored at 4°C . Working standard solutions were freshly prepared by appropriate dilution with the above solution and held at 4°C before injection into the LC apparatus.

2.4. Processing of milk samples

A 1 mL aliquot of homogenized milk was placed in a 15 mL glass centrifuge tube and spiked with the desired amounts of macrolides. Phosphate buffer solution (3 mL) and ACN (1 mL) were then added simultaneously to precipitate the proteins. The mixture was shaken and allowed to stand for 10 min at room temperature to complete deproteinization. The sample was then centrifuged for 10 min at 3500 rpm and filtered into another glass centrifuge tube.

The removal of fat and the extraction of antibiotics was performed by simultaneously adding 1 mL of NaOH (approximately 5 M) and 5 mL of ethyl acetate to the protein-free filtrate. This mixture was shaken and centrifuged for 20 min at 3500 rpm. The tubes were then placed in an ice bath for 25 min to facilitate the collection of the upper organic phase containing the analytes of interest.

This was transferred to a glass tube with the aid of a Pasteur pipette, and dried under a gentle argon stream at room temperature. Finally, the residue was redissolved in the dilution mixture and an aliquot of 20 μL injected into the LC–DAD system.

2.5. Instrumentation

A Digitem 3000542 thermostat-controlled vibrating water bath (Selecta, Barcelona, Spain) was used to homogenize the milk samples. A Didacen II centrifuge (Alresa, Madrid, Spain) was used to separate the supernatant from the solid phase. A Metrohm 654 pH meter equipped with a combined glass electrode was used for measuring pH. All analyses were performed using an HP 1050 Series LC system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, a column compartment, a vacuum degasser and a diode-array detector. Hewlett-Packard ChemStation software was used by the instrument control and data processing utilities. The stainless analytical column was packed with Hypersil ODS RP-18 5 μm (25 cm \times 4.6 mm I.D.) from Scharlau (Barcelona, Spain). Samples were manually injected through an injection valve (Rheodyne, Model 7725; Hewlett–Packard) in which a 20 μL loop was mounted.

2.6. Chromatographic conditions

The LC gradient was established by mixing two eluents: eluent A (25 mM phosphate buffer solution, pH 3.4) and elu-

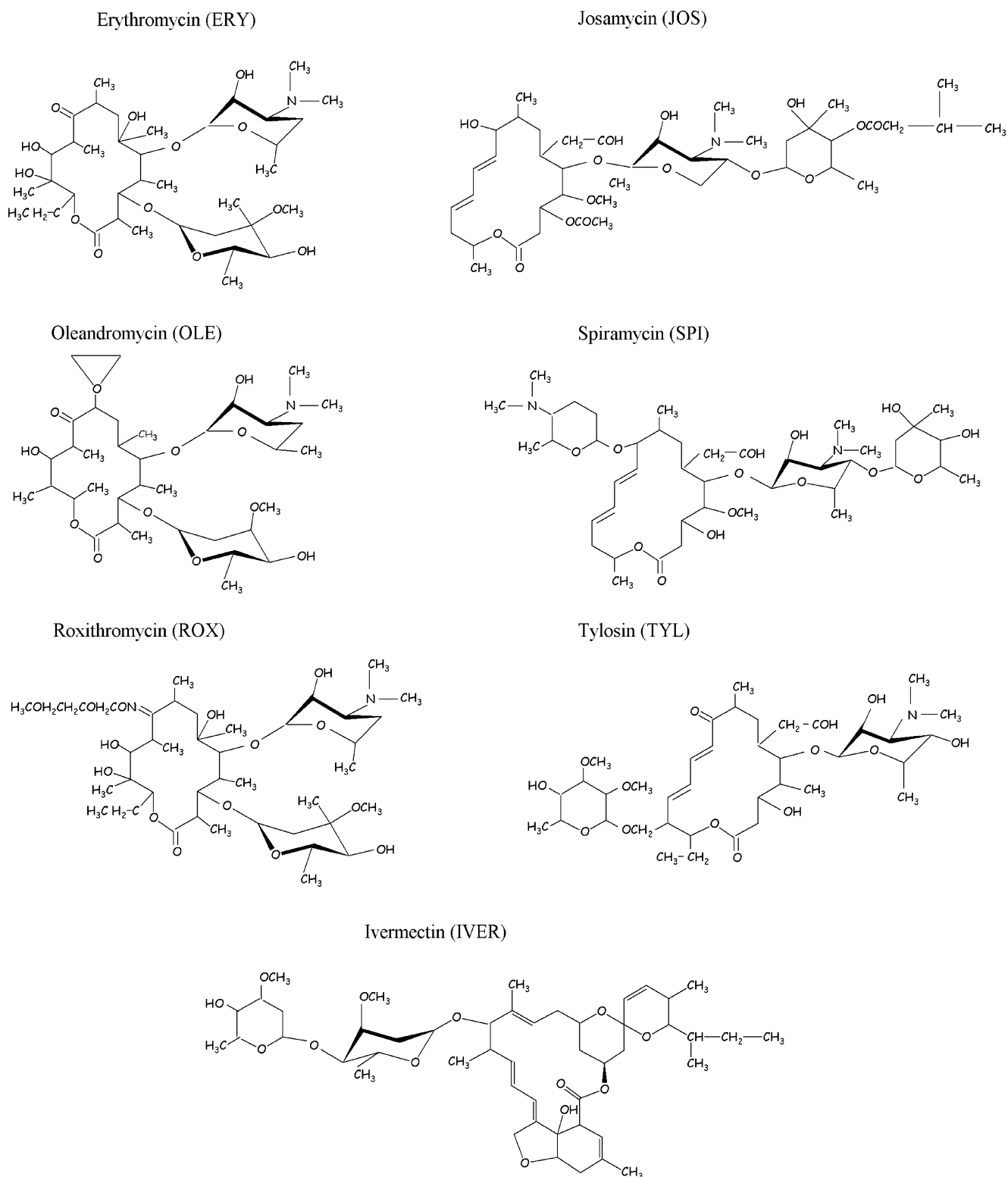


Fig. 1. Chemical structures of the studied macrolide antibiotics: erythromycin (ERY), oleandomycin (OLE), roxithromycin (ROX), spiramycin (SPI), josamycin (JOS), ivermectin (IVER) and tylosin (TYL).

ent B (pure acetonitrile). Chromatographic separation of the analytes was achieved with the following gradient: 0–3 min 20–60% B, 3–11 min 60–80% B, 11–14 min 80–100% B, and 14–30 min 100% B. The flow rate was 1 mL min^{-1} and the temperature 30°C . Quantitative measurements of the peak areas

obtained were performed by selecting the appropriate detection wavelength for each compound, thus achieving maximum sensitivity. ERY, OLE and ROX were therefore quantified at 210 nm, JOS and SPI at 231 nm, IVER at 254 nm, and TYL at 287 nm.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of chromatographic separation

Macrolide antibiotics are basic molecules that contain amino sugars in their structure (Fig. 1) [2]. Therefore, for their separation, base-deactivated reversed-phase materials are usually used, although peak tailing can be observed in the chromatograms due to interactions with residual silanols in the silica gel.

Initially, experiments were performed using a LiChrosorb 5 μm column (25 cm \times 4.6 mm I.D.). Due to the large number of analytes and their different affinities for the column, different elution gradient programs using ammonium acetate buffer as eluent A and different rates of acetonitrile and/or methanol combined with ammonium acetate as eluent B, were tested. The chromatograms obtained did not satisfactorily resolve all the signals. Moreover, the size of the peaks did not allow quantitative analysis. To solve this problem, the influence of the column temperature was examined. Elution of the analytes was performed at 20, 30 and 70 °C. Increasing the temperature improved the efficiency of the column and allowed faster analysis due to a lower mobile phase viscosity and higher flow rate. At 70 °C, an increase in the signals was observed, although not all the analytes were successfully separated. A faster elution of TYL, IVER and JOS (with peak symmetry) was obtained, but the remaining analytes were not eluted from the column. The mobile phase had a pH of around 7, and this may have dissociated any residual silanols to weakly anionic species that would be strongly retain the basic macrolides. To prevent this, the mobile phase pH was adjusted to be acidic; phosphate buffer was used for this.

Baseline problems were experienced at the working wavelengths. Methanol was therefore replaced by ACN since it is more UV transparent. Mixtures of phosphate buffer with ACN as the organic modifier were then tested as the mobile phase.

The flow rate was varied between 0.2 and 1.2 mL min⁻¹. At low flow rates, the peak size and tailing off of the final peak increased significantly, as well as the retention times of the compounds. A flow rate of 1 mL min⁻¹ was selected and separation achieved within 45 min. Under these conditions the elution order was TYL, SPI, ERY, JOS, OLE, IVER and finally ROX.

To improve the feasibility of analyte elution and to reduce the retention times, the possibility of decreasing the surface area of the stationary phase from 500 to 200 m²/g by using spherical rather than irregular particles was explored. This was undertaken using a Hypersil ODS 5 μm (25 cm \times 4.6 mm I.D.) column.

As a result, different eluent gradient profiles [using KH₂PO₄ 25 mM/H₃PO₄ (pH 3.4) as eluent A and ACN as eluent B] were tested to obtain the satisfactory resolution of all signals.

Temperature (25–70 °C) had no a significant effect on retention times or peak shape (an increase in temperature only led to slightly narrower peaks). The column was therefore maintained at 30 °C during the separation for the sake of convenience.

The best separation was achieved using the following optimised conditions: hypersil ODS 5 μm (25 cm \times 4.6 mm I.D.) column at 30 °C, mobile phase = KH₂PO₄ 25 mM/H₃PO₄ (pH 3.4) as eluent A, and ACN as eluent B, and a flow rate of 1 mL min⁻¹ (see 2.6). Fig. 2 shows a typical chromatogram of

the standard mixture of the macrolides obtained under these conditions. All seven compounds were successfully separated within 30 min.

LC–DAD allowed the identification of the seven macrolides through the comparison of their retention times and of their UV spectra with those of the standards.

3.2. Optimisation of macrolide extraction

The main analytical difficulty during the pre-treatment of the milk samples was the coextraction of the fat and analytes, which was first attempted with *n*-hexane as the defatting agent.

Traditional strategies for extracting antibiotics from milk involve a first step of precipitating the proteins with organic solvents, either alone or in combination with strong inorganic or trichloroacetic acids. The macrolides are then extracted from the milk matrix via their direct solvent extraction into organic solvents (typically employing chloroform or dichloroethane) after defatting with *n*-hexane.

The main chemical properties of interest in macrolide extraction methodologies are the instability of these compounds in acid media and their hydrophobic nature. In the present work, initially, protein precipitation was performed using phosphate buffer solution (pH 5.2)/ACN. After centrifugation and phase separation, a slightly cloudy supernatant was obtained, suggesting that protein precipitation was incomplete. To solve this problem, phosphoric acid was therefore added to the buffer solution to reduce the pH (pH 3.4; at which the integrity of all the antibiotics tested was assured). Finally, protein precipitation from the matrix was directly made in phosphate buffer (pH 3.4)/ACN.

Prior to analyte extraction, liquid–liquid partitioning using *n*-hexane was performed to remove the fatty material in the sample. Three consecutive extractions were sufficient to provide clean extracts. Finally, the antibiotics were extracted from the defatted samples by liquid–liquid extraction. Different organic solvents (acetonitrile, methanol, chloroform, dichloromethane and ethyl acetate) were tested as extracting agents, following the procedure described above.

Although the use of the different organic solvents provided extracts free of matrix interference in all cases, the results were not fully satisfactory. Recoveries were <10%, except when extraction was performed with ethyl acetate, which allowed recoveries of 42–58% (except for ERY and IVER; still lower than 10%). Accordingly, ethyl acetate was considered the best choice for antibiotic extraction.

Because of the high fat content of sheep milk (7.90%) and the lipophilic nature of the antibiotics of interest, a mean of quantitatively extracting the analytes without matrix interference was sought. For this, the protein-free sample was subjected to a procedure that directly extracted the antibiotics from the milk at the same time as the alkaline hydrolysis of the fat. For this purpose the protein-free extract was treated with a combination of NaOH and an organic solvent.

The efficiency of the alkaline hydrolysis was evaluated using ethyl acetate as an organic extractant. For this, the volume of NaOH (\approx 5 M) was varied within the range 0.5–1.5 mL. A

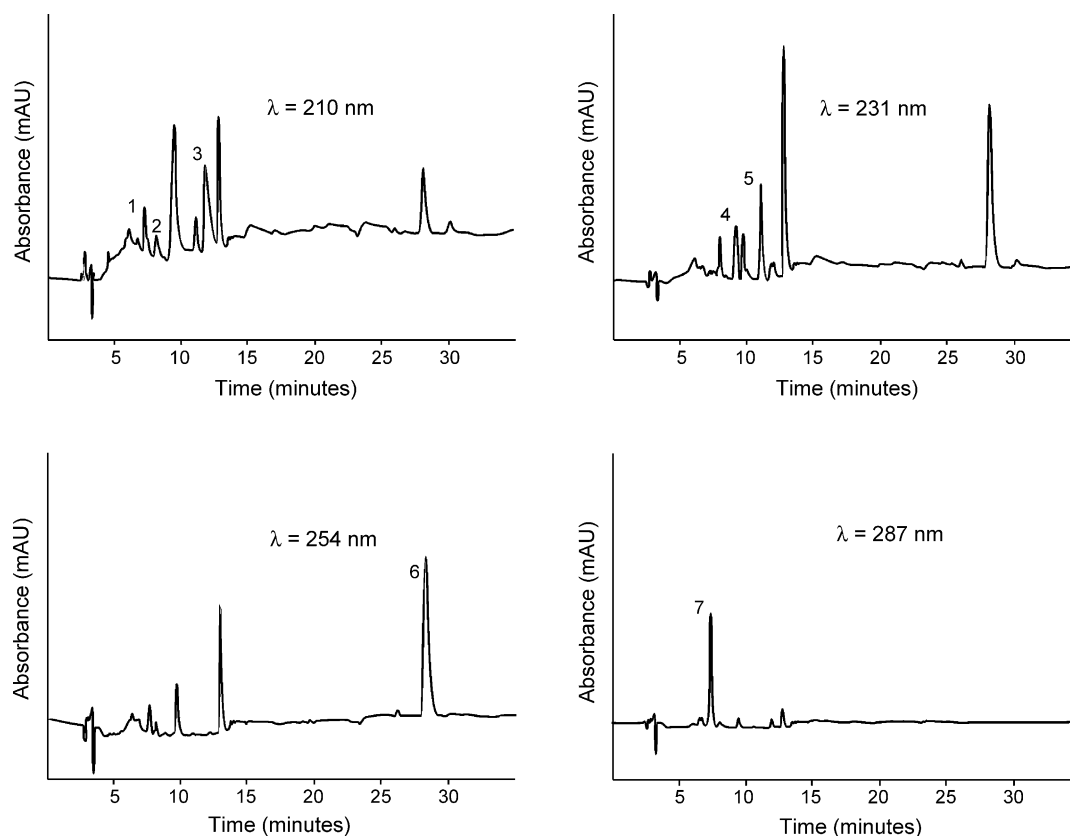


Fig. 2. Chromatograms at 210, 231, 254 and 287 nm, of a standard mixture of macrolides (482.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) using LC–UV–DAD. Peaks: 1, OLE; 2, ERY; 3, ROX; 4, SPI; 5, JOS; 6, IVER and 7, TYL. The experimental conditions are provided in the text.

volume of 0.5 mL led to incomplete centrifugation and cloudy extraction mixtures. However, volumes greater than 1 mL did neither provide cleaner extracts nor higher analyte recoveries. Therefore, 1 mL of NaOH was considered the optimum for completing the alkaline hydrolysis of the total lipid material in large volumes of milk.

To improve the extraction yield, other solvents such as dichloromethane, *n*-hexane, methanol and acetonitrile were tested using a volume of 5 mL of each. When *n*-hexane was used as the extractant, the saponification process provided two well differentiated phases, a cloudy solid organic phase and a clear aqueous phase. As expected, analytes were not detected in the chromatogram when the aqueous phase was analysed. Probably, the presence of *n*-hexane avoids the hydrolysis of the lipids, and as a consequence, antibiotics and lipids are co-extracted and remain in the organic phase.

Extraction of the analytes with methanol and dichloromethane led to greater matrix interference, as shown by the yellow colour of the residue after solvent evaporation. This prevented the LC analysis of the extracts, even after an additional clean-up step using a syringe disc filter.

The use of acetonitrile and ethyl acetate provided clean extracts. However, ethyl acetate was preferred for the extraction since it provided the best recovery rates.

Finally, the extraction of the analytes from the milk sample was optimised by varying the volume of ethyl acetate added to the protein-free extract from 2.5 to 15 mL. Moreover, the

influence of the number of repeated extractions was tested by performing one, two and three consecutive extractions. The results obtained indicate that a volume of 5 mL of solvent in one extraction provides recoveries between 56% and 77% of all the analytes, except IVER, for which recovery was lower than 15%.

Fig. 3 provides an outline of the optimum extraction procedure.

3.3. Analytical performance and application

The linearity of the proposed method for all the test compounds was studied under optimum conditions. Calibration curves were obtained by plotting the peak area against increasing concentrations of the seven macrolides in the milk (range 24–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for OLE, ERY, SPI, JOS and TYL, 48–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ROX and 72–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for IVER; all tests performed in triplicate). Table 1 shows the linear regression data. The results showed good linearity for all the analytes with correlation coefficients (R^2) of >0.9993 .

The within-day repeatability of the method was evaluated by spiking three milk samples with 482.6 and 96.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of each macrolide. Recoveries between 55.5% and 77.4% were obtained for all macrolides (except for IVER; approximately 13%), at these concentrations, with relative standard deviation (RSD) values of $<4.6\%$ (Table 2). The inter-day repeatability was determined by duplicate assays on 4 successive days. All exper-

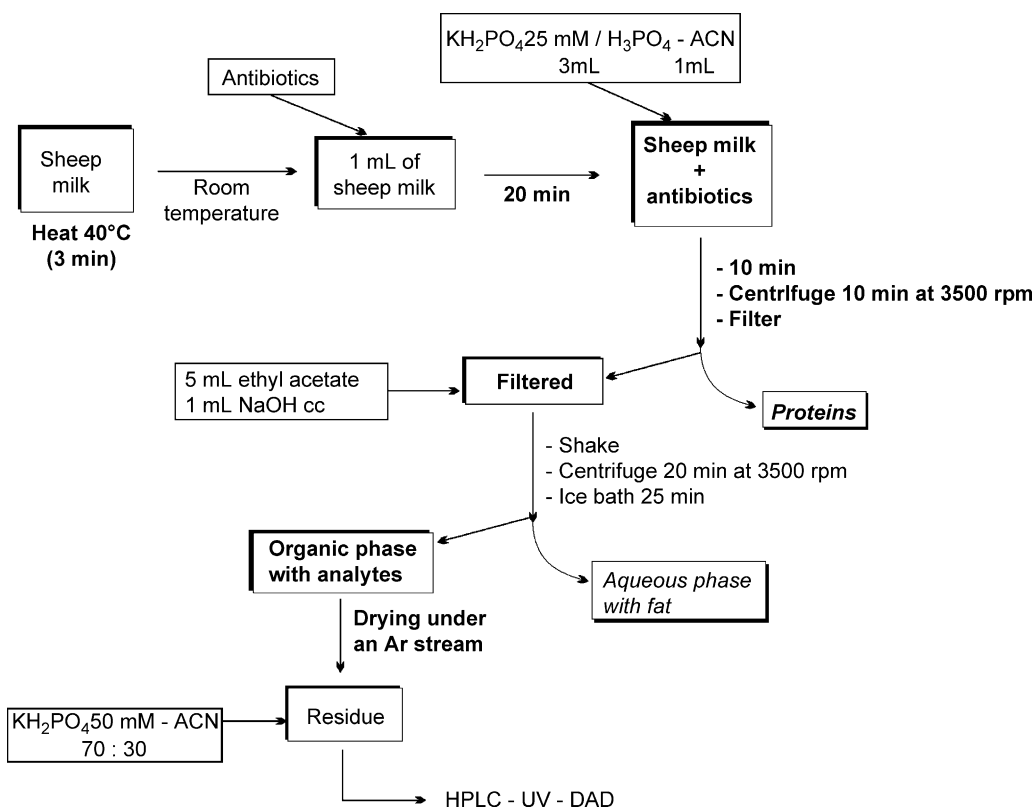


Fig. 3. Macrolide extraction procedure.

Table 1
Analytical parameters and MRLs for the target macrolides

Antibiotic	Concentration range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Regression equation	R^2	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MRLs ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Oleandomycin	24–1000	$y = 0.98C + 10.88$	0.9998	24.1	–
Erythromycin	24–1000	$y = 0.19C - 1.91$	0.9999	24.1	40 (sheep milk)
Roxithromycin	48–1000	$y = 0.39C - 8.19$	0.9998	48.3	–
Spiramycin	24–1000	$y = 0.47C - 5.40$	0.9998	24.1	200 (bovine milk)
Josamycin	24–1000	$y = 0.05C + 2.7$	0.9996	24.1	–
Ivermectin	72–1000	$y = 0.03C + 0.25$	0.9993	72.4	–
Tylosin	24–1000	$y = 0.05C + 1.3$	0.9999	24.1	50 (sheep milk)

Table 2
Inter- and intra-day precision and accuracy of the method (all means are the average of at least four replicates)

Antibiotic	Spiking level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Inter-day recovery (%)	RSD (%)	Intra-day recovery (%)	RSD (%)
Oleandomycin	482.6	74.4	1.3	74.8	1.0
	96.5	70.0	1.6	71.4	1.8
Erythromycin	482.6	72.4	1.3	71.9	4.5
	96.5	70.5	1.7	67.5	2.8
Roxithromycin	482.6	73.5	4.2	77.4	2.3
	96.5	73.2	2.6	74.4	1.2
Spiramycin	482.6	65.1	1.4	65.7	4.6
	96.5	67.5	1.1	69.3	2.0
Josamycin	482.6	61.5	2.0	60.5	1.4
	96.5	58.2	1.8	59.0	0.7
Ivermectin	482.6	13.9	5.2	12.5	1.7
	96.5	14.8	2.9	13.7	0.9
Tylosin	482.6	59.9	6.5	55.5	2.8
	96.5	58.1	3.7	56.6	1.7

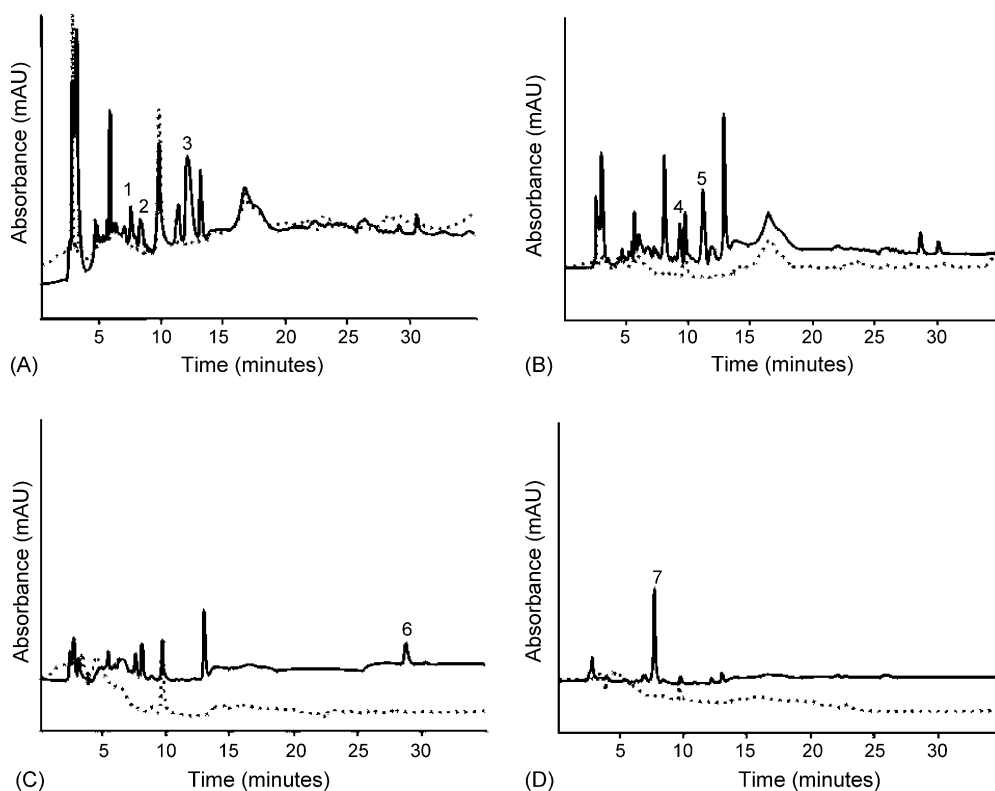


Fig. 4. Chromatograms of spiked sheep's milk (—) with 482.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of each macrolide and the blank milk (\cdots). (A) 210 nm, (B) 231 nm, (C) 254 nm, and (D) 287 nm. Peaks: 1, OLE; 2, ERY; 3, ROX; 4, SPI; 5, JOS; 6, IVER and 7, TYL.

iments were carried out using samples spiked with 482.6 and 96.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of each macrolide. Mean recovery ranged between 58.1% and 74.4% (RSD 1.1–6.5%) for all analytes except for IVER (13.9%, RSD 5.2% and 14.8%, RSD 2.9%) (Table 2). This shows the method has good repeatability and precision.

The limits of quantification (LOQ; 24.1–72.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of the method was calculated as the lowest concentrations where the RSDs were less than 5% (Table 1).

Neither the EU nor the FAO/WHO have established MRLs for the studied macrolides in sheep's milk, except for ERY (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and TYL (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The LOQs achieved with the proposed method for these compounds are lower than these MRLs values. For the rest of macrolides, the LOQs obtained are comparable to those published for macrolides in cow's milk [4] (Table 1), rendering the method suitable for performing routine analyses.

Fig. 4 shows chromatograms at different wavelengths of a sheep's milk sample spiked with 482.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of each macrolide. The signals corresponding to the analytes are well defined against the matrix background, and allow detection and quantification of the macrolides without matrix interference.

4. Conclusions

The proposed multi-residue LC–DAD method is the first to be shown capable of determining macrolide antibiotics (OLE, ERY, ROX, SPI, JOS, IVER and TYL) in sheep's milk. The best analyte separation was achieved after optimisation of the column, mobile phase and extraction conditions.

Post-deproteinization defatting of the milk samples by alkaline hydrolysis at the same time as antibiotic extraction allows successful extraction and purification of analytes, yielding products ready for chromatographic identification and quantification.

Recovery of the macrolides after spiking the milk samples was repeatable, and appropriate LOQs were obtained for all those studied (i.e., well below the MRL for ERY and TYL according to current CE legislation).

The proposed method minimizes the total solvent consumption which is a clear advantage over traditional methods. Complete sample preparation was achieved using only 1 mL of NaOH and 5 mL of ethyl acetate. Another advantage was the shorter time required for sample preparation: fat removal and analyte extraction was performed in a single step, minimizing the risk of contamination by reducing the manipulation of the sample.

This proposed method solves the analytical problem that the determination of macrolides in sheep's milk presents. The method was successfully used to simultaneously determine the levels of macrolides in sheep's milk at concentrations lower than those allowed by current legislation.

Acknowledgement

The authors want to thank the Spanish Government (Comunidad de Madrid) for financial support of this study through the project S-0505/AGR/0312, and also to Adrian Burton for the revision of the manuscript.

References

- [1] S. Omura (Ed.), *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice*, 2nd ed., Academic Press, Orlando, FL, 2002.
- [2] F. Kees, S. Spangler, M. Wellenhofer, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 287.
- [3] A. Di Corcia, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 53.
- [4] Council Directive 2377/90 and the later modifications 1570/98, 508/99, 2593/99, 2338/2000 and 1181/2002, Commission of the European Communities, Brussels, 1990, 1998, 1999, 2000, 2002.
- [5] *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, Arlington, VA, 16th ed., 1995.
- [6] M. Horie, K. Saito, R. Ishii, T. Yoshida, Y. Haramaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 295.
- [7] C. Leal, R. Codony, R. Compañó, M. Granados, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 285.
- [8] C. Civitareale, M. Fiori, A. Ballerini, G. Brambilla, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 317.
- [9] N. Grgurinovich, A. Matthews, *J. Chromatogr.* 433 (1988) 298.
- [10] M. Hedenmo, B.M. Eriksson, *J. Chromatogr. A* 692 (1995) 161.
- [11] M.J. González de la Huebra, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 53.
- [12] M. Tod, O. Biarez, P. Nicolas, O. Petitjean, *J. Chromatogr.* 575 (1992) 171.
- [13] P.A. Blackwell, H.C. Holten Lützhøft, H.P. Ma, B. Halling-Sørensen, A.B.A. Boxall, P. Kay, *Talanta* 64 (2004) 1058.
- [14] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.L. Kratz, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 213.
- [15] F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 199.
- [16] R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Achene, A. Cecilia, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 97.
- [17] R. Codony, R. Compañó, M. Granados, J.A. García-Regueiro, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 131.
- [18] M.P. Schlüsener, M. Spitteller, K. Bester, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 21.
- [19] D. Löffler, T.A. Ternes, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 133.
- [20] S. Yang, K.H. Carlson, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 141.
- [21] R. Chiou, R.J. Stubbs, W.F. Bayne, *J. Chromatogr.* 416 (1987) 196.
- [22] L. Renard, P. Henry, P. Sanders, M. Laurentie, J.M. Delmas, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 219.
- [23] J. Sokol, E. Matisová, E. Dudriková, R. Cabadaj, *Toxicol. Lett.* 95 (1996).
- [24] F.J. Schenck, P.S. Callery, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 99.
- [25] E. Dreassi, P. Corti, F. Bezzini, S. Furlanetto, *Analyst* 125 (2000) 1077.
- [26] M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Delahaut, *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 189.
- [27] A. Ramírez, R. Gutiérrez, G. Díaz, C. González, N. Pérez, S. Vega, M. Noa, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 315.
- [28] J.A. Bogan, Q.A. McKellar, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 11 (1988) 260.
- [29] V. Cerkvenik, I. Grabnar, V. Skubic, D.Z. Doganoc, W.M.J. Beek, H.J. Keukens, M. Drobnič Košorok, M. Pogačnik, *Vet. Parasitol.* 104 (2002) 175.

euroanalysisXIII

European Conference on Analytical Chemistry



5-10 September 2004. Salamanca, Spain

"The Role of Analytical Chemistry in the Protection of the Citizens"

Organized by:

Sociedad Española de Química Analítica (SEQA)

In cooperation with:

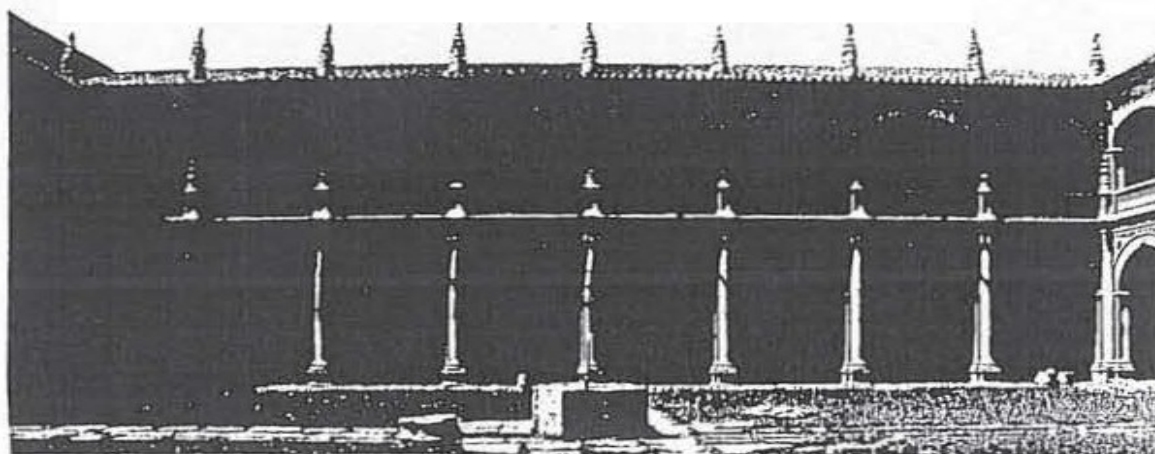
Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología. University of Salamanca (USAL)

Federation of European Chemical Societies Division of Analytical Chemistry

FECS Event: 281



BOOK OF ABSTRACTS



Chairman: Dr. J. Hernández Méndez
Universidad de Salamanca, Salamanca (Spain) Co-Chairman: Dr. J.L.
Pérez Pavón
Universidad de Salamanca, Salamanca (Spain)

Programme Chairman: Dr. I. Pingarrón Carrazón Universidad Complutense de
Madrid, Madrid (Spain)

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN MILK BY UV-HPLC

M.A. GARCÍA MAYOR, R.M. GARCINUÑO MARTÍNEZ, P. FERNÁNDEZ HERNANDO,
J.S. DURAND ALEGRÍA

Department of Analytical Sciences. Faculty of Sciences. UNED. C/ Senda del Rey, 9, 28040,
Madrid, Spain.

The macrolides are lipophilic molecules having a central lactone ring with 12 to 16 atoms to which several amino and /or neutral sugars are bound. Macrolide antibiotics are active agents against Gram-positive bacteria, widely used in medical practices. They are also used in veterinary medicine to treat respiratory diseases and enteric infections in cattle, sheep, swine and poultry. However, these antibiotics are also employed as feed additives to promote animal growth. They may be administered orally or directly by injection.

Incorrect use of these antibiotics may leave residues in foods including milk and causes toxic effects on consumers, e.g. allergic reactions in sensitive or sensitised individuals and the development of resistant strain of bacteria. Consequently, the European Union has developed regulations and set Maximum Residues Limits (MRL) for most of these drugs.

The determination of macrolides is usually carried out by microbiological assays but they are often lengthy and lack the specificity and precision required for regulatory legislation. Methods based on liquid chromatography are appropriate alternatives.

The present work proposes a sensitive and simple UV-HPLC method for the simultaneous determination of seven macrolides. Several chromatographic parameters (mobile phases, temperature, flow rate) have been optimised in order to achieve the best resolution for all studied analytes. The determination of these antibiotics was carried out using a C-18 column and 0.025 M aqueous phosphate buffer/acetonitrile as mobile phase in gradient mode and the chromatograph was operated at 70°C.

The analytical performance of the method was evaluated and the method showed good linearity, precision and low detection limit.



SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN MILK BY HPLC-UV-DAD

M. A. García Mayor*, R. M. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando, J. S. Durand Alegría
Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) Madrid (Spain)

INTRODUCTION



Macrolide antibiotics play a therapeutically important role in human, clinical and veterinary medicine.

Macrolides are a family of antibiotics used to treat a wide range of bacterial infections in agricultural livestock. The use of these pharmaceuticals produces advantages but also drawbacks.

ADVANTAGES

- Growth promoter
- Effective treatment of infections in livestock
- Prevention of infections

DRAWBACKS

- Bacteria becoming increasingly resistant to macrolide antibiotics
- Increasing of allergy effects
- New kind of alimentary changes
- Analytical problems in macrolides determination

Thus it is important for health and environmental assessment to have data about presence and stability of these compounds in alimentary and environmental samples.

OBJECTIVES

This study is focussed on the determination of seven macrolide antibiotics: Erythromycin (ERY), Oleandomycin (OLE), Roxithromycin (ROX), Josamycin (JOS), Spiramycin (SPI), Tylosin (TYL), Ivermectin (IVER) in *manchega* sheep milk, mainly used in cheese factory

Main objectives

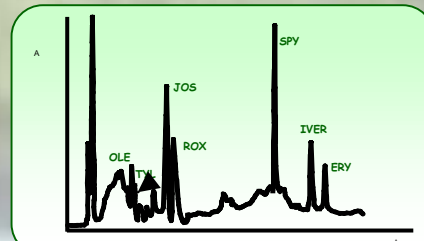
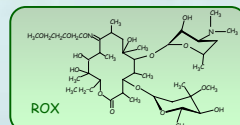
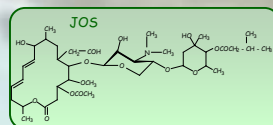
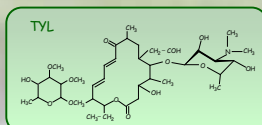
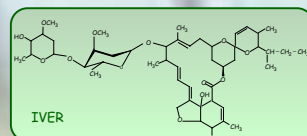
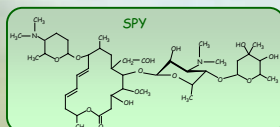
- To optimize the chromatographic separation conditions for seven macrolide antibiotics.
- To develop a simultaneous extraction, preconcentration and clean-up method for the antibiotics in sheep milk samples prior to HPLC analysis.

EXPERIMENTAL

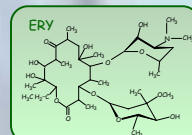
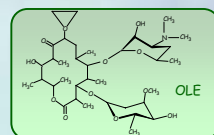
CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

OPTIMIZATION

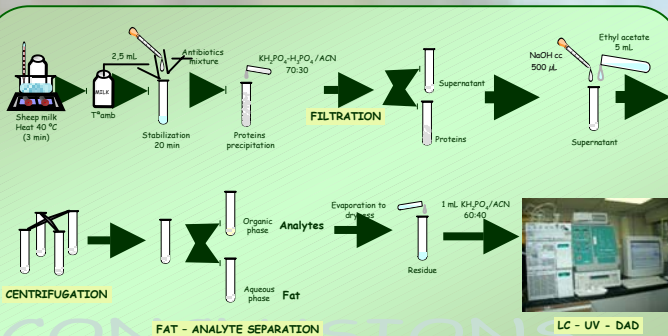
Parameter	Studied	Optimum
Column	- LiChrosorb RP-18 5 μ m (250x4,6) - Hypersil ODS 5 μ m (250x4,6)	Hypersil ODS 5 μ m (250x4,6)
Mobile phase	- A: NH ₄ Ac 20mM; B: A in CH ₃ CN-CH ₂ OH (2:1) - A: NH ₄ Ac 20mM; B: A-CH ₃ CN (60:40) - A: KH ₂ PO ₄ 25mM (pH=3,4); B: A-CH ₃ CN (60:40) - A: KH ₂ PO ₄ 25mM (pH=3,4); B: CH ₃ CN	A: KH ₂ PO ₄ 25mM (pH=3,4) B: ACN
Temperature	- 20°C - 30°C - 70°C	30°C
Flow rate	- 0,2 mL/min - 0,6 mL/min - 0,8 mL/min - 1,0 mL/min	1,0 mL/min
Measurement λ	Analyte λ bibliography - Erythromycin (ERY) 210 nm - Oleandomycin (OLE) 210 nm - Roxithromycin (ROX) 220 nm - Josamycin (JOS) 231 nm - Spiramycin (SPI) 231 nm - Tylosin (TYL) 287 nm - Ivermectin (IVER) 254 nm	210 nm 287 nm



Chromatogram obtained for a spiked sheep milk sample after extraction the analytes



EXTRACTION PROCEDURE



ANALYTICAL CHARACTERISTICS

Analyte	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Concentration range (mg·L ⁻¹)	Regression equation	R ²
OLE	73,4	2,1	5-100	Y = 6,255 x + 3,429	0,9969
TYL	71,7	3,2	0,5-10	Y = 10,503 x + 1,350	0,9966
JOS	76,4	1,5	0,5-10	Y = 5,667 x + 15,667	0,9987
ROX	72,4	2,9	5-100	Y = 25,452 x - 7,536	0,9992
SPI	91,4	1,3	0,5-10	Y = 11,083 x + 112,080	0,9982
IVER	70,4	2,3	0,5-10	Y = 19,351 x + 3,126	0,9996
ERY	75,6	3,7	5-100	Y = 2,188 x + 75,554	0,9974

CONCLUSIONS

The proposed HPLC-UV-DAD method was applied to the simultaneous determination of seven macrolide antibiotics: ERY, OLE, ROX, JOS, SPI, TYL, IVER in sheep milk, a complex sample due to its high fatty content.

The extraction method offers a simple and rapid way to clean-up the sheep milk samples for these antibiotics determination.

The results suggest that the presented method is useful for the analysis of these compounds.



**OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS
MACRÓLIDOS DE LECHE DE OVEJA MEDIANTE DISPERSIÓN DE
LA MATRIZ EN UNA FASE SÓLIDA PARA SU POSTERIOR
DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC-UV-DAD**

M.A. García-Mayor, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, *Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk*, Food Chemistry, 134 (2012) 553-558

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Póster: "Optimization of matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk", **ExTech@2008 Tenth International Symposium on Advances in Extraction Technologies**, 28-30 January 2008, Bruges, Belgium.

INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos más débiles del método analítico desarrollado anteriormente para la determinación de 7 antibióticos macrólidos fue, precisamente, la falta de eficiencia en el tratamiento de la muestra debido a la complejidad de la matriz que ésta presentaba. Por eso, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un método simple y efectivo de dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD), que permita simultáneamente la extracción cuantitativa de siete compuestos macrólidos (eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, josamicina, espiramicina, tilosina e ivermectina) y la limpieza de las muestras de leche de oveja Manchega.

Se requiere la optimización de diversos parámetros, como son la naturaleza y la cantidad del soporte sólido empleado como dispersante de la muestra, así como los disolventes utilizados para la eliminación de la grasa y para la elución selectiva de los analitos.

Las principales características de los compuestos macrólidos que tienen interés para la elección y optimización del método de extracción son su inestabilidad en medios ácidos y su naturaleza hidrofóbica (*Fedeniuk y Shand, 1998*). Teniendo esto en cuenta, uno de los factores más importantes en la optimización del procedimiento MSPD será estudiar la polaridad tanto del soporte sólido como del disolvente de extracción.

Dado el carácter lipofílico de los macrólidos, inicialmente se decide utilizar como soporte sólido un adsorbente no polar tipo C18. Tras la dispersión de la muestra de leche en el soporte y la adición de Na_2SO_4 para eliminar la humedad, la mezcla obtenida en estas condiciones era demasiado compacta para llevar a cabo el proceso cromatográfico, de forma que, al empaquetarla en el cartucho de extracción, la elución resultaba muy difícil.

La leche de oveja es una muestra con un alto contenido en grasa, por lo que el primer paso, una vez se ha preparado el cartucho de extracción, es una etapa de lavado para eliminar dicha grasa. Para ello, se probaron dos desengrasantes distintos: NaOH y hexano. Con el hidróxido sódico los extractos presentaron gran cantidad de

interferencias y muy pobres recuperaciones, mientras que con hexano las recuperaciones mejoraron moderadamente.

Siguiendo el proceso de optimizaciones de la MSPD se cambió el soporte sólido por arena de mar lavada. Esta mezcla presentaba diferente textura, semejante a un tipo de polvo suelto y homogéneo adecuado para el empaquetamiento. En estas condiciones se volvió a ensayar la eliminación de la grasa con hidróxido sódico y con hexano. Los extractos resultaron, de nuevo, turbios y con interferencias cuando se había utilizado hidróxido sódico, mientras que los resultados con hexano eran claramente mejores, extractos más limpios de interferencias. Con objeto de conseguir unos extractos aún más limpios de grasa, se hicieron nuevos estudios, esta vez con diclorometano y mezclas de éste con hexano. Los resultados obtenidos no cambian significativamente respecto al empleo de hexano puro, por lo que este disolvente fue elegido como disolvente para la etapa de lavado y eliminación de grasa.

El eluyente más adecuado será aquel que sea capaz de conseguir la desorción de los analitos y no del resto de posibles sustancias interferentes, las cuales deben quedar retenidas en el adsorbente sólido. Se probaron, como disolventes para la elución de los analitos, varios compuestos de distinta polaridad: acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y mezclas de ellos.

Tras el estudio de las recuperaciones con los distintos disolventes se concluyó que el disolvente que daba lugar a eluciones más completas era la mezcla de metanol y acetato de etilo. Se optimizó, también, la proporción de cada uno de ellos en la mezcla, siendo la mejor 50:50.

Una vez seleccionado el hexano como disolvente para la etapa de eliminación de la grasa y la mezcla metanol/acetato de etilo para la etapa de elución, se optimizó el modo de extracción en cada caso (cantidad de disolvente y número de extracciones).

Se consigue la eliminación completa de la grasa haciendo 5 extracciones estáticas de 1 minuto con 1 mL de hexano en cada una. Y las mejores recuperaciones se obtienen con 5 extracciones estáticas de 1 minuto con 1 mL de la mezcla metanol/acetato de etilo cada vez.

Con el procedimiento MSPD propuesto no es necesario llevar a cabo la etapa de precipitación de las proteínas, las cuales no interfieren en ningún momento del análisis.

Se consiguen recuperaciones entre el 74 % y el 97 % para todos los analitos, incluida la ivermectina, mejorando así considerablemente las conseguidas con el método llevado a cabo en nuestro anterior trabajo.

Entre las ventajas que presenta este nuevo procedimiento de tratamiento de muestra propuesto están que se requieren pequeñas cantidades de muestra y de disolventes, con lo que se minimizan costes. Además, se acorta el procedimiento de tratamiento de muestra, dado que los extractos obtenidos son lo suficientemente limpios como para eliminar la etapa de precipitación de proteínas. El método no requiere mucha manipulación de la muestra y se disminuye el tiempo de análisis.



Analytical Methods

Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk

M.A. García-Mayor, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño*, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría

Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Senda del Rey, 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2011

Received in revised form 12 December 2011

Accepted 19 February 2012

Available online 27 February 2012

Keywords:

Macrolide

Antibiotics

Milk

MSPD

HPLC

ABSTRACT

A simple and effective extraction method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) was developed for the simultaneous cleaning-up and quantitative extraction of macrolide antibiotics (erythromycin, oleandomycin, roxithromycin, josamycin, spiramycin, tylosin and ivermectin) from *manchega* sheep milk samples. Solid support, defatting and elution solvents were evaluated thoroughly to find the optimal MSPD conditions. The best results were obtained using washed sea sand as dispersant sorbent, hexane as defatting agent and a mixture methanol/ethyl acetate (50:50) as elution solvent. Quantitative analyses were performed by liquid chromatography (LC) with diode-array ultraviolet detector (DAD-UV). The chromatographic separation was performed on a Hypersil ODS column (5 μm , 250 \times 4.6) with a gradient system of KH_2PO_4 25 mM (pH = 7) and acetonitrile as the mobile phase at the flow rate of 1.2–1.5 mL min^{-1} and 60 $^\circ\text{C}$ of temperature. Under these conditions antibiotics recoveries were between 74% and 97% and relative standard deviations ranging from 1.6% to 9.0%. The analytical figures of merit of the optimised method have been performed using spiked milk samples at two different concentration levels (96.5 and 482.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The proposed method has been successfully applied to the determination of macrolides on milk samples.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Macrolide antibiotics are active agents against Gram-positive and some Gram-negative bacteria, and are widely used in human and veterinary for both therapeutic and prophylactic treatments against bacterial infections such as mastitis (Fischer, Schilter, Tritscher, & Stadler, 2011; Mavrogianni, Menzies, Fragkou, & Fthenakis, 2011; McGlinchey, Rafter, Regan, & McMahon, 2008). Macrolides are also employed as growth promoters in stock farming at subclinical doses in food producing animals (González de la Huebra, Vincent, & VonHolst, 2007) or added directly to food, mainly milk, to prolong its freshness (Di Corcia & Nazzari, 2002). The incorrect use of antibiotics and the disrespect for withdrawal time after treatment have lead to the presence of antibiotic residues in foods. The residues cause toxic effects on consumers, such as allergic reactions in sensitive or sensitised individuals, provoke the development of antibiotic-resistant bacteria and may induce cross-resistance against other antibiotics of similar structure or mechanism of action, making more difficult to treat certain infections (Roberts, 2004). From the technological point of view, residues of antibiotics can interfere with the manufacture of dairy

products, such as cheese, due to traces of antibiotics make difficult raw milk coagulation which affects cheese ripening.

In Spain, most sheep milk production is used for cheese making, often using raw milk, and such "pure" sheep cheeses carry a Protected Denomination of Origin which guarantees quality control. To ensure the safety of foodstuffs, including dairy products supply for consumers the use of antibiotics is regulated in European Union (EU) through Council Regulation 2377/90/EC, which set maximum residues limits (MRL's) for most of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, including some macrolides (Council Directive 1181/02/EC, 2002). European community legislators have furthermore restricted the veterinary use of antibiotics and banned them as growth-promoting food additives in stock breeding (Regulation 1181/03/EC, 2003). In this frame, the development of sensitive and reliable multiresidue methods allowing the determination of macrolide residues at trace levels is required.

Analytical methods for determination of macrolide residues in milk described in the literature include microbiological and immunological assays (Cháfer-Pericás, Maquieira, & Puchades, 2010; Horwitz, 2001; Kress, Schneider, & Usleber, 2011), which can be used as screening techniques, but they only provide semiquantitative measurements and are not specific enough to ensure accurate identification (Berendsen, Pikkemaat, & Stolker, 2011). To overcome these problems other techniques such as liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis are being used to identify and quantify macrolides in milk. Several LC methods with diode array

* Corresponding author. Address: C/Senda del Rey no 9, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 398 73 66; fax: +34 91 398 83 79.

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

(DAD), fluorescence (FLD) or mass spectrometry (MS) detection have been reported for the determination of the different macrolides in cow milk samples (Aguilera-Luiz, Martínez Vidal, Romero-González, & Garrido Frenich, 2008; Bogialli, Di Corcia, Lagana, Mastrantonio, & Sergi, 2007; Bohm, Stachel, & Gowik, 2009; Clark, Storey, & Turnipseed, 2011; Gomis, Ferreras, Álvarez, & García, 2006; Jian, 2009; Juan, Moltó, Mañes, & Font, 2010; McGlinchey et al., 2008; Orтели, Cognard, Jan, & Edder, 2009; Sanli, Palabiyik, Sanli, Guzel-Seydim, & Alsancak, 2011; Turnipseed, Storey, Clark, & Miller, 2011; Wang & Leung, 2007). Milk is a complex sample matrix, containing lots of substances which can interfere in the analysis, principally proteins and fat matter. Therefore, the majority of the published methods require time consuming sample pre-treatment including milk deproteinisation, defatting and subsequent clean-up process.

The commonly techniques used for the isolation of macrolides from cow's milk are liquid-liquid extraction (LLE) (Aguilera-Luiz et al., 2008; Gomis et al., 2006; Orтели et al., 2009), solid phase extraction (SPE) (Bohm et al., 2009; Wang & Leung, 2007), or more recently pressurised liquid extraction (PLE) (Juan et al., 2010). These are usually multi-step procedures, typically based on exhaustive extraction from the matrix into organic solvents or separated by solid-phase extraction, after the elimination of proteins and lipids, and the subsequent removal of co-extracted material by several clean-up steps prior to instrumental analysis. Such determination methods are laborious, time consuming and usually involves relatively large amount of solvents, which dramatically affected the recovery of the antibiotics and contribute highly to the total cost of the analysis.

In a previous work (García-Mayor, Garcinuño, Fernández-Hernando, & Durand-Alegría, 2006), authors have developed a multiresidue method to determine seven macrolide antibiotics in *Manchega* sheep milk, using liquid-liquid extraction and clean-up step after deproteinisation matrix. Although limits of detection in this method are below the set MRLs, sample preparation is still time consuming including several steps, and recovery of some macrolides such as ivermectin or tylosin are not satisfactory.

The use of matrix solid phase dispersion (MSPD) offers an effective alternative to traditional methods for sample preparation. This methodology combines aspects of several analytical techniques performing sample disruption while dispersing the components of the sample on and into a solid support, thereby generating a chromatographic material with a particular character for the extraction of compounds from the dispersed sample (Cavaliere et al., 2010; Kristenson, Ramos, & Brinkman, 2006). The sample preparation method based on MSPD has been applied to the analysis of several residues of antibiotics in dairy products, such as bovine milk and yoghurt (Bogialli et al., 2007). However, up to date, MSPD has not been used for the extraction of macrolide residues from sheep milk samples.

The objective of this study was to develop and evaluate a simple and effective MSPD method for the quantitative extraction of macrolide antibiotics such as erythromycin (ERY), oleandomycin (OLE), roxithromycin (ROX), josamycin (JOS), spiramycin (SPI), tylosin (TYL) and ivermectin (IVER), from *manchega* sheep milk, which allows a simultaneous clean-up of the sample. The effects of several parameters such as nature and amount of the solid support, defatting and elution solvents were investigated thoroughly to find the optimal MSPD conditions. For analytical separation and quantification LC-UV-DAD was employed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

HPLC-grade solvents used were acetonitrile and methanol, supplied by Scharlau (Barcelona, Spain), ethyl acetate by Sigma-

Aldrich (Madrid, Spain), and dichloromethane by Fluka (Steinheim, Germany). Potassium dihydrogen phosphate, phosphoric acid, sodium hydroxide and *n*-hexane were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Anhydrous sodium sulphate was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). All reagents used were of analytical grade or better. Ultra pure water (18.2 M Ω cm quality) was obtained using a Milli-Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

Solid stock macrolide standards roxithromycin and ivermectin were purchased also from Sigma-Aldrich, erythromycin, oleandomycin phosphate, tylosin hemitartrate and spiramycin were supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and josamycin by Fluka.

Solid phase materials used for MSPD were C-18 bonded silica from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and washed sea sand (0.25–0.30 mm) from Panreac.

2.2. Samples

Fresh sheep milk samples (macrolides free) used in this study were kindly provided by CERSYRA, a Regional Centre of Animal Selection and Reproduction in Valdepeñas, Ciudad Real (Spain). Sheep milk from this region, natural district of La Mancha, is used for the production of Manchego cheese, prestigious and exquisite cheese registered in the Guarantee of Origin.

Raw milk samples were collected and stored in the freezer at -20 °C. Before processing, samples were allowed to thaw at room temperature and homogenised by heated at 40 °C for 3 min. Recovery experiments were performed ($n = 3$) by spiking milk samples with the desired amount of each antibiotic (three spiked levels, between 96.5 and 482.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The analytical figures of merit of the optimised method were obtained using spiked milk samples at two different concentration levels (96.5 and 482.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

2.3. Preparation of standard solutions

Single compound stock solutions of 1 g L $^{-1}$ were prepared every 3 months by dissolving 10 mg of each solid antibiotic in 10 mL of methanol. These solutions were stored in dark glass bottles and were kept at 4 °C when not in use. A mixture standard solution of macrolides (100 mg L $^{-1}$ of each analyte) were prepared daily by diluting the stock solution with the dilution mixture KH $_2$ PO $_4$ 25 mM (pH = 7.0) – acetonitrile (ACN) (70:30), and also stored at 4 °C. Working standard solutions were daily prepared by appropriate dilution with the mentioned solution, and maintained at 4 °C before using.

2.4. Equipments

Analysis for this study were performed using an HP 1050 Series liquid chromatographic system (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump, a column compartment, a vacuum degasser and a diode-array detector. A Hypersil ODS RP-18 5 μm (25 cm \times 4.6 mm i.d.) column from Scharlau (Barcelona, Spain) was used for analytical separation. Samples were manually injected through a sample injection valve (Rheodine Inc., Model 7725; Hewlett Packard) in which a 20 μL loop was mounted. The system was controlled by Hewlett Packard CHEMSTATION software (Hewlett Packard). A Digiterm 3000542 thermostat water bath vibrator from Selecta (Barcelona, Spain) was employed to homogenise the milk samples. A Metrohm 654 pHmeter equipped with a combined glass electrode was used for pH measurements.

2.5. MSPD procedure

A 1 mL aliquot of homogenised raw milk was spiked with the desired amounts of macrolides, and maintained at room tempera-

ture for 20 min before treatment to allow the solution to equilibrate with the milk matrix. A volume of 0.5 mL of spiked milk was poured into a glass mortar containing 2 g of washed sea sand and 2 g of Na₂SO₄, and the mixture was blended with the glass pestle for ca. 10 min, until an apparently dry and homogeneous material was obtained, in order to achieve the complete disruption and dispersion of the sample on the solid support. When blending was completed, the homogenised mixture was left to stand for 15 min, and was packed into a solid phase extraction column with a plug of silanised glass wool at the bottom which retains the entire sample. A covered of a little amount of Na₂SO₄ is placed on top of the sample. To ensure homogeneous packing of the column, close attention was paid to pour the material into the tube in several portions, tapping firmly the tube for 10–15 s after addition of each portion to remove the air pockets inside the material. The sample was firstly defatted using hexane. This washing step was carried out by five consecutive 1 min static extractions with 1 mL of hexane (a total volume of 6 mL). The analytes were eluted with five millilitres of 50:50 (v:v) methanol/ethyl acetate mixture which allowed the elution from the SPE column dropwise by gravity, in five 1 min static extraction steps. A Teflon valve was used to obtain a constant flow rate of approximately 1 mL min⁻¹. The extracts were collected and evaporated to dryness under a stream of argon at room temperature. Finally, the residue was reconstituted in 0.5 mL of the dilution mixture and an aliquot of 20 µL was injected into the chromatographic system.

2.6. Chromatographic analyses

Liquid chromatographic analyses were carried out under the following conditions: 25 mM phosphate buffer solution (pH = 7) as eluent A and pure acetonitrile as eluent B, using gradient conditions (0–7 min 30–50% B, 7–9 min 50–58% B, 9–15 min 58–70% B, 15–16 min 70% B). The flow rate was set up at 1.2 mL min⁻¹ during 10 min and increased to 1.5 mL min⁻¹ at 18 min, to be maintained to the end of the chromatogram. The total time of analysis was 32 min and chromatographic separation was carried out at 60 °C. Quantitative measurements of the peak areas by LC–UV–DAD were carried out by selecting the appropriate detection wavelength for each compound in order to achieve maximum sensitivity. Therefore, ERY, OLE and ROX were quantified at 210 nm, JOS and SPI at 231 nm, IVER at 254 nm and TYL at 287 nm.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of MSPD extraction procedure

The most important factors in MSPD procedure are the polarity of the solid support and the extraction solvent, since they determine both the efficiency of the extraction and the cleanness of the final extracts. Therefore, dispersant agent, cleanup and eluting solvent were carefully selected to achieve extracts with the highest recovery and the lowest amount of matrix interferences from the milk samples.

Taking into account the lipophilic character of the macrolides, a non-polar sorbent, C-18, was chosen as solid phase for sample dispersion. For all experiments, 0.5 mL of milk sample spiked with 100 ppm of OLE, ERY and ROX, and 30 ppm of SPI, JOS, TYL and IVER were dispersed with 2 g of C-18 and 2 g of Na₂SO₄, which addition was assayed due to its ability to bind large amounts of water, promoting the partitioning of macrolides into the organic layer. The homogenised mixture was transferred to an empty cartridge to prepare the MSPD column, as it was indicated in Section 2.4. Since milk samples contain very high amounts of fat, the elution of target compounds was preceded by a washing step to elim-

inate the fat matter. In preliminary experiments 4 mL of hexane and 4 mL of sodium hydroxide (0.5 M) were tested for this purpose and a volume of 6 mL of ethyl acetate, acetonitrile or methanol were proved as elution solvents in each assay.

The MSPD mixture using C-18 as dispersant sorbent resulted in a too compact blending to carry out the chromatographic process once the mixture was packed into the cartridge, making difficult the elution of the sample components. When the column was washed using sodium hydroxide, extracts contained large amounts of interferences and recoveries were below 2%, in the elution solvents tested. Analyte recoveries improved (6–30%) by using hexane as defatting agent, being slightly higher when methanol was used for the elution. The low recoveries obtained were probably because analytes remain strongly retained on C-18 sorbent. Therefore, an inert material, washed sea sand, was tested as solid support. Experiments were carried out using 0.5 mL of fortified milk plus 2 g of washed sea sand and 2 g of Na₂SO₄. The achieved MSPD mixture was a free flowing powder, homogeneous and adequate for packing into the column. The feasibility of both defatting solvents (NaOH 0.5 M and hexane) was tested, eluting the analytes from the MSPD column using ethyl acetate, acetonitrile or methanol. The extracts obtained after sodium hydroxide treatment showed many interferences, as visualised by the yellow colour of the extracts after solvent evaporation and by the number and intensity of peaks reported by LC–DAD analysis. Among solvents tested, methanol provided the best recoveries (less than 15% for all analytes). The use of hexane as defatting agent allowed the extraction of macrolides with minor quantities of interferences, and when the elution of the MSPD was carried out by methanol, as previous results, an enhancement of recoveries was obtained for all the compounds, between 35% and 76%.

In order to improve the obtained recoveries, dichloromethane was tested as defatting agent. Therefore, some trials were carried out using dichloromethane, *n*-hexane/dichloromethane mixture (50:50) and *n*-hexane to remove fat material. Methanol was used as extraction solvent in these experiments. The recovery data of all the mentioned experiments are plotted in Fig. 1. Recoveries ranging between 40% and 55% were obtained for most of the macrolides investigated when *n*-hexane/dichloromethane mixture (50:50) was used, but the best extraction yields and the cleanest extracts were obtained with hexane as defatting solvent (40–80%).

The influence of the static extraction mode on the fat removal was investigated. For this experiment, 1 min extraction cycles using 3, 5, 7 or 9 mL of *n*-hexane (1 mL per cycle) were carried out. Five consecutive 1 min static extractions with 1 mL of hexane provided a complete removal of fat. Then, it was selected as defatting procedure for further experiments.

The election of an adequate elution solvent is an important aspect because the analytes of interest should be desorbed while the remaining matrix components should be retained in the column. The type of the solvent is determined primarily by the polarity of the target analytes and the nature of the sample matrix. A new set of assays was carried out to test the feasibility of several elution solvents of different polarity, i.e. acetonitrile, ethyl acetate, methanol, or mixtures of solvents, methanol/ethyl acetate (50:50) and acetonitrile/ethyl acetate (50:50). Different volumes of elution solvent (3, 5 and 7 mL) were proved using static extraction cycles of 1 min using 1 mL of solvent per cycle. In general, the results improved when methanol/ethyl acetate (50:50) was used in comparison to the rest of the tested solvents for all the experiments, obtaining the best recoveries using five consecutive 1 min static extraction cycles. Under these conditions, Fig. 2 revealed that methanol/ethyl acetate mixture was the best solvent for the extraction.

The methanol/ethyl acetate proportion was optimised. Then, a series of experiments was carried out. Fig. 3 shows that the

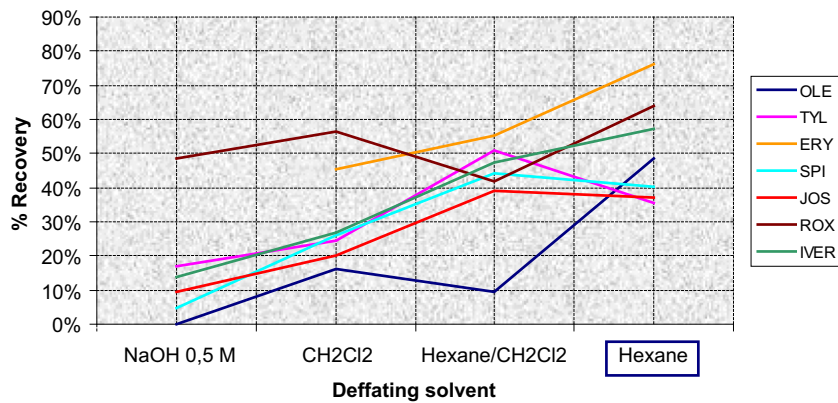


Fig. 1. Influence of the defatting agent on analyte recoveries (RSD ranging between 3% and 10%).

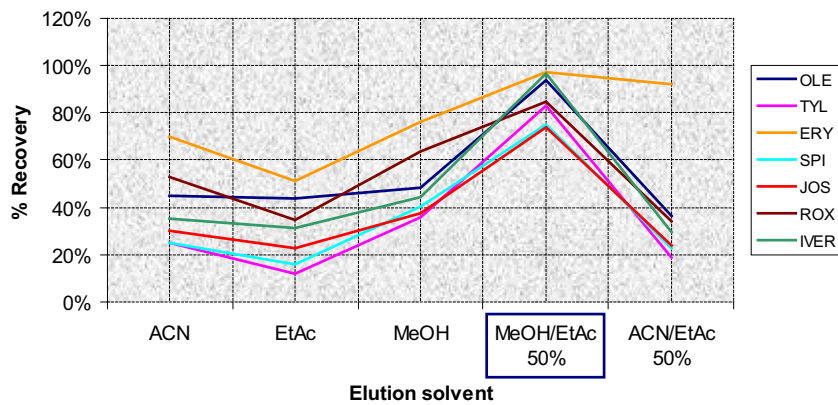


Fig. 2. Effect on the macrolide recoveries of different elution solvents using five consecutive 1 min static extraction cycles (1 mL per cycle) (RSD < 12%).

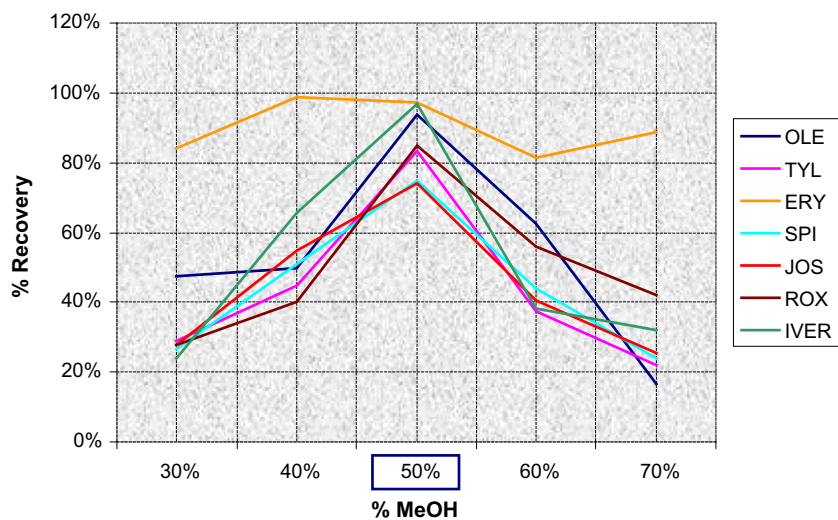


Fig. 3. Influence of different methanol/ethyl acetate ratios on the analyte elution efficiency (RSD < 10%).

use of different methanol/ethyl acetate ratios not improves extraction yield. The best results were found with 5 mL of methanol/ethyl acetate (50:50), which provided recoveries between 74% and 97% and relative standard deviations between 1.6 and 9%.

Fig. 4 shows chromatograms at different wavelengths of a sheep milk sample spiked with $482.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ of each macrolide obtained under the established method. Analytes could be successfully separated within 30 min and the resulting extracts were free from interferences.

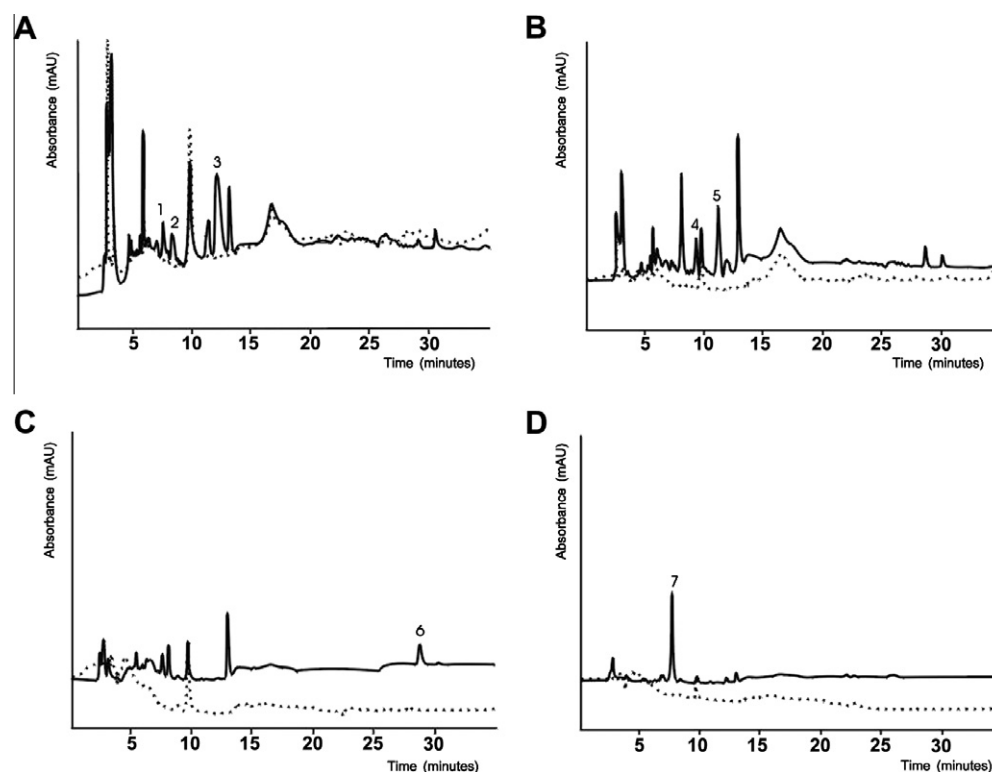


Fig. 4. Chromatograms of MSPD extracted sheep milk spiked with $482.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ of each macrolide (—) and blank milk extract (…), (A) at 210 nm, (B) at 231 nm, (C) at 254 nm, and (D) at 287 nm. Peak assignment: 1 = OLE, 2 = ERY, 3 = ROX, 4 = SPI, 5 = JOS, 6 = IVER and 7 = TYL.

3.2. Validation of the method

The developed MSPD method was validated in terms of linearity, precision, recovery, and limits of detection and quantification, using spiked milk samples.

The linearity of the method was tested for all the macrolides studied. Calibration curves were constructed by preparing spiked samples in triplicate, containing increasing concentrations of each macrolide, in the range of $24\text{--}965 \mu\text{g kg}^{-1}$ for OLE, ERY, ROX, SPI, JOS, IVER and TYL. The results showed good linearity for all the analytes with correlation coefficients (R^2) higher than 0.9993.

Recovery experiments were carried out by triplicate at three spiked levels, between 96.5 and $482.6 \mu\text{g kg}^{-1}$, obtaining results

ranging between 72% and 97% for all the analytes tested, with relative standard deviations ranging from 1.6% to 9.0%.

Precision was calculated in terms of intra-day repeatability ($n = 5$) and inter-day reproducibility (five successive days) and was determined by duplicate assays at two spiking levels (96.5 and $482.6 \mu\text{g kg}^{-1}$). The intra-day repeatability evaluated as relative standard deviation (RSD) ranged from 0.6% to 5.11% and for the inter-day repeatability was lower than 9.0% for all analytes (Table 1).

Table 1 also summarises the limits of quantification (LOQs) for all the macrolides, calculated as the lowest concentrations where the RSDs were less than 5% ($24.1\text{--}48.3 \mu\text{g kg}^{-1}$). European legislation has established MRLs only for ERY and TYL in sheep milk and

Table 1

Analytical characteristics of macrolides from spiked milk samples and MRLs established by the current legislation.

Antibiotic	Concentration range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MRLs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Spiking level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Inter-day recovery \pm RSD (%)	Intra-day recovery \pm RSD (%)
Oleandomycin	24.0–965.0	24.1	–	482.6	93.8 ± 3.2	92.6 ± 0.9
				96.5	90.3 ± 2.6	89.4 ± 1.5
Erythromycin	24.0–965.0	24.1	40 (sheep milk)	482.6	97.3 ± 2.9	98.8 ± 2.6
				96.5	94.8 ± 2.7	93.1 ± 2.7
Roxithromycin	24.0–965.0	24.1	–	482.6	84.7 ± 8.9	95.0 ± 3.0
Spiramycin	24.0–965.0	24.1	200 (bovine milk)	96.5	83.2 ± 5.6	91.3 ± 1.9
				482.6	75.0 ± 7.5	79.8 ± 5.1
Josamycin	24.0–965.0	24.1	–	96.5	72.3 ± 7.1	83.1 ± 3.4
				482.6	76.2 ± 8.1	77.0 ± 3.3
Ivermectin	48.0–965.0	48.3	–	96.5	74.2 ± 5.8	88.5 ± 2.7
				482.6	96.8 ± 1.6	98.0 ± 0.6
Tylosin	24.0–965.0	24.1	50 (sheep milk)	96.5	90.9 ± 2.9	89.4 ± 0.8
				482.6	83.3 ± 9.0	77.0 ± 1.0
				96.5	80.8 ± 4.7	78.5 ± 1.7

for SPY in bovine milk, also included in Table 1. In all cases, LOQs obtained were below those MRLs, which indicates the suitability of the proposed method for the determination of macrolides in sheep milk.

4. Conclusions

A novel MSPD extraction method for the simultaneous determination of seven macrolide residues, OLE, ERY, ROX, SPI, JOS, IVER and TYL, from *manchega* sheep milk samples has been developed. Analytical detection of the analytes was carried out by LC-DAD. This method employed washed sand to disperse the sample and methanol/ethyl acetate (50:50) to elute the analytes from the MSPD column previously defatted by hexane. The proposed procedure did not require proteins precipitation or additional clean-up steps because sample extraction and clean-up were carried out in the same step. Recovery data were in all cases satisfactory (between 74% and 97%, with RSD better than 9%) and LOQs appropriate to apply the procedure below the levels imposed by existing regulations. In addition, the current method requires small sample size and volumes of solvents, and minimises sample manipulation, cost of materials, and analysis time. The results of this study point out that the proposed MSPD method constitutes a significant advance in simplicity and efficiency, which makes it possible a rapid and sensitive simultaneous determination of macrolide antibiotics in sheep milk and can be used for routine monitoring analysis.

Acknowledgements

Authors thank the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER Programme (Project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II) for financial support.

References

- Aguilera-Luiz, M. M., Martínez Vidal, J. L., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2008). Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1205, 10–16.
- Berendsen, B. J. A., Pikkemaat, M. G., & Stolker, L. A. M. (2011). Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test. *Analytica Chimica Acta*, 685, 170–175.
- Bogialli, S., Di Corcia, A., Lagana, A., Mastrantonio, V., & Sergi, M. (2007). A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: Hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 237–246.
- Bohm, D. A., Stachel, C. S., & Gowik, P. (2009). Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8217–8223.
- Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Lagana, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521–2532.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1038–1049.
- Clark, S. B., Storey, J. M., & Turnipseed, S. B. (2011). Optimization and validation of a multiclass screening and confirmation method for drug residues in milk using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 94, 383–393.
- Council Directive 1181/02/EC of 1 July 2002, Brussels. (2002). *Official Journal Europe Communication*, L172, 13.
- Di Corcia, A., & Nazzari, M. (2002). Liquid-chromatographic–mass-spectrometric methods for analysing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A*, 974, 53–89.
- Fischer, W. J., Schilter, B., Tritscher, A. M., & Stadler, R. H. (2011). Contaminants of milk and dairy products: Contamination resulting from farm and dairy practices. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 887–897.
- García-Mayor, M. A., Garcinuño, R. M., Fernández-Hernando, P., & Durand-Alegría, J. S. (2006). Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *Journal of Chromatography A*, 1122, 76–83.
- Gomis, D. B., Ferreras, A. I. A., Álvarez, M. D. G., & García, E. A. (2006). Determination of spiramycin and josamycin in milk by HPLC and fluorescence detection. *Journal of Food Science*, 69, C415–C418.
- González de la Huebra, M. J., Vincent, U., & VonHolst, C. J. (2007). Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feeding stuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1628–1637.
- Horwitz, W. (2001). *Official methods of analysis of AOAC international* (17th ed.). Arlington: AOAC International.
- Jian, W. (2009). Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography–mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 50–92.
- Juan, C., Moltó, J. C., Mañes, J., & Font, G. (2010). Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in meat and milk. *Food Control*, 21, 1703–1709.
- Kress, C., Schneider, E., & Usleber, E. (2011). Determination of penicillin and benzylpenicilloic acid in goat milk by enzyme immunoassays. *Small Ruminant Research*, 96, 160–164.
- Kristenson, E. M., Ramos, L., & Brinkman, U. A. Th. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 96–111.
- Mavrogiani, V. S., Menzies, P. I., Fragkou, I. A., & Fthenakis, G. C. (2011). Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27, 115–120.
- McGlinchey, T. A., Rafter, P. A., Regan, F., & McMahon, G. P. (2008). A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Analytica Chimica Acta*, 624, 1–15.
- Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., & Edder, P. (2009). Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 2363–2374.
- Regulation 1181/03/EC of September 2003, Brussels. (18 October 2003). *Official Journal Europe Communication*, L268, 29.
- Roberts, M. C. (2004). Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Molecular Biotechnology*, 28, 47–62.
- Sanli, S., Palabiyik, I. M., Sanli, N., Guzel-Seydim, Z. B., & Alsancak, G. (2011). Optimization of the experimental conditions for macrolide antibiotics in high performance liquid chromatography by using response surface methodology and determination of tylosin in milk samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 66, 838–847.
- Turnipseed, S. B., Storey, J. M., Clark, S. B., & Miller, K. E. (2011). Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7569–7581.
- 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 Communications in Mass Spectrometry*, 21, 3213–3222.

HTC

International Symposium on

Hyphenated Techniques in Chromatography

Bruges, February 1st, 2008

Our ref.: 25544



To Whom It May Concern:

This is to certify that

Dr. Pilar Fernandez Hernando

UNED

Ciencias Analiticas

C/Senda del Rey 9

ES-28040 Madrid

Spain

attended the *Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography (HTC-10)*, which took place on January 30 - February 1, 2008 at the Conference Center Oud Sint-Jan, Brugge, Belgium.

On behalf of the Organizing Committee,

Dr. Robert Smits
(Chairman Organizing Committee)

Congress Secretariat:

Ordibo bvba · L. Henninckstraat 18 · B - 2610 Wilrijk (Antwerpen) · Belgium
· Tel. +32 58 523116 · Fax +32 58 514575 · e-mail htc@ordibo.be

OPTIMIZATION OF MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION
METHOD FOR THE DETERMINATION OF MACROLIDE
ANTIBIOTICS IN SHEEP'S MILK

M.A. GARCÍA MAYOR, R.M. GARCINUÑO MARTÍNEZ, P. FERNÁNDEZ HERNANDO,

J.S. DURAND ALEGRÍA

Departamento de Ciencias Analíticas. Facultad de Ciencias. UNED. C/ Senda del Rey,

9, 28040, Madrid, Spain

Macrolide antibiotics are frequently used in veterinary medicine. They are also employed as feed additives to promote animal growth. Incorrect use of them may leave residues in foods (including milk) and causes toxic effects on consumers and the development of resistant strain of bacteria. Consequently, the European Union has developed regulations and set Maximum Residues Limits (MRL) for most of these drugs. The analysis of residues of antibiotics in milk can provide the indexes of exposure to these compounds, being sample treatment the limiting step.

Milk is a complex and multicomponent mixture due to its high protein and fat content, which often interfere in analytical procedures, making the isolation of macrolides from it especially complicated and laborious.

In this work, a method based on matrix solid-phase dispersion is described for the quantitative extraction of seven macrolides (erythromycin, oleandomycin, roxithromycin, josamycin, spiramycin, tylosin and ivermectin) from sheep's milk.

Clean-up, elution profile and experimental set-up were optimised. Washed sand was used as the solid-phase for matrix dispersion. After packing the clean-up/extraction column, a first step of defatting with hexane and a second step of elution of the target analytes with a mixture of methanol and ethyl acetate at 50% was carried out. Analyte recoveries were between 74% of JOS and 97% of ERY with relative standard deviations ranging from 1.6 to 9.0.

Determination of these antibiotics in milk samples was done by HPLC-DAD using a C-18 column and 0.025 M aqueous phosphate buffer/acetonitrile as mobile phase in gradient mode.



HTC-10

Bruges, January 30th – February 1st 2008
Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques
in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analysers

ExTech®-10

Bruges, January 28th – 30th 2008
Tenth International Symposium on Advances in
Extraction Techniques

Public Safety and Security

Bruges, January 30th 2008

BOOK OF ABSTRACTS

Symposia organised by the Royal Flemish Chemical Society (KVCV)
And the Chromatography and Electrophoresis Group (C&EG) of the
Royal Society of Chemistry (RSC)



Site Oud Sint Jan, Bruges
Belgium

CIP Koninklijke Bibliotheek van België (Royal Library Albert I), Brussels, Belgium
Book of Abstracts - Tenth International Symposium on Advances in Extraction Techniques 2008
(ExTech(r) 2008) and Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography
and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-10).
Brugge, Belgium, January 28- February 1, 2008 - Royal Flemish Chemical Society (KVCV) and the
Chromatography and Electrophoresis Group (C&EG) of the Royal Society of Chemistry (RSC)
ISBN 9789081124829 (EAN 9789081124829)
Editor: Ordibo bvba

List of Authors and Tutors (Lectures, Posters and tutorials)

Classification of the posters, lectures and tutorials
--

Posters are classified as follows:

The first one or two letters indicate the symposium to which the poster is submitted:

H	HTC
E	ExTech
HE	Htc & ExTech
PS	Public Safety

The last one or two letters indicate the poster category:

B	Bioanalytical
E	Environmental
ET	Extraction Technology
F	Food
G	Gas chromatography
X	GCxGC
L	Liquid chromatography
LM	LC-MS
MI	Molecularly Imprinted polymers
Ph	Pharmaceutical
P	Polymers
PC	Process analysis & Chemometrics
SS	Public safety and Security
ST	Separation Technology

The posters are numbered sequentially within their category.

E. g. poster HEMI-2 is the second poster about Molecularly Imprinted polymers, submitted for both HTC and ExTech.

Lectures are indicated by the starting letter "L", followed by the two-digit session number and the one-digit lecture number. Tutorials are preceded by "tut_", and the number. Chair persons are indicated by "chair_" followed by the session number.

De Coensel, N. E-F10
 de Diego, A. E-En16
 de Freitas, D.R. E-ET5 ; L04-03
 de Godoy Jr., L.A.F. L27-03
 De Jager, L.S. L17-03
 de Jonge, H. L28-04
 de Jooide, T. H-F6
 de Koning, L.J. L32-02
 de Koning, S. H-X6 ; L25-03
 de Koster, C. L32-02
 De Malsche, W. L26-04 ; HE-ST3
 De Moor, P. L26-04 ; HE-ST3
 de Oliveira, A.R.M. E-B7
 de Roos, M. HE-P7
 De Saeger, S. E-B4
 de Zeeuw, J. HE-ST1 ; H-G3 ; H-G4 ; H-L4
 Dean, J. L12-01 ; chair_L06 ; tut_1
 Dekker, H.L. L32-02
 Delepee, R. E-En12
 Delgado, Y. H-Ph12
 Delgado-Zamarreño, M.M. H-F3
 Demarest, C. L37-02 ; chair_34
 Demeestere, K. L05-01
 Desmet, G. HE-L2 ; HE-ST2 ; HE-ST3
 HE-ST5 ; L26-04 ; L29-01 ; chair_L23
 Dettmer, K. L27-01
 Dewulf, J. L05-01
 Di Berardino, S. L10-02
 Diachenko, G.W. L17-03
 Dicinoski, G. PS-SS1
 Dickerson, J. L36-03
 Diels, L. H-X12 ; L29-05
 Diez-Lazaro, A. HE-PC1
 Dimandja, J.-M.D. L30-01
 Ding, D. HE-B2
 Dios-Viéitez, M.C. H-Ph5
 Dittenhafer, M.L. HE-PC1
 Dixon, R. H-En3
 Dizier, I. H-Ph14
 Dolman, B. H-B4
 Domínguez-Álvarez, J. H-En2
 Donato, P. H-B5
 Dorman, F. H-G3
 Dovichi, N. L36-03
 Dreux, M. H-L6
 Driver, J.L. L06-01
 Duffin, M. HE-G2 ; L24-04
 Dufield, R.L. L37-02
 Dugo G. L22-02 ; H-B5 ; H-F10 ; H-F9 ; H-X11
 Dugo, P. H-B5 ; H-F10 ; H-F11 ; H-F9
 H-X11 ; L22-02
 Durand Alegria, J.S. E-F13
 Durand, J.S. E-MI4
 Durosaro, B.S. E-Ph6
 Dziolloss, S. H-P3 ; L28-02

E

Ebrahimzadeh, H. E-ET6 ; E-B2

Eckerle, P.E. HE-PC1 ; H-P5 ; L37-01
 Edam, R. HE-P5 ; HE-P6 ; L28-03
 Edberg, H. L14-03
 Eeltink, S. H-B4 ; H-L9 ; L24-03 ; chair_28
 Eggink, M. L24-05
 Eghbali, H. L26-04 ; HE-ST3
 Eidt, R.A. HE-PC1
 Ellis, D.M. H-X9
 Entwisle, J. L26-02
 Eom, I.-Y. E-En9 ; L03-03 ; chair_L05 ; tut_8
 Ercanbrack, W.D. HE-PC3
 Es'haghi, Z. E-ET10 ; E-ET12 ; E-ET20
 E-Ph4 ; HE-ET2 ; HE-ET3
 Esrafilí, A. E-B1 ; E-Ph3 ; E-Ph2
 Estrada, D.A. E-SS1
 Etxebarria, N. E-En16 ; E-Ph9
 Everaert, J. L33-04

F

Fabulić Ruszkowski, M. H-G5 ; H-G6 ; H-G7
 Falkenhagen, J. H-P4
 Fandrich, N. H-P4
 Fang, L. L10-01
 Farrington, K. E-MI5
 Fathima, S.J.H. E-ET23
 Fekete, V. HE-ST2
 Feng, X. E-ET24
 Fernández Hernando P. E-F13 ; E-MI4
 Fernández, L.A. E-En16
 Fernández-Fernández, E. E-En4
 Fernández-González, V. E-F7 ; E-PC1
 Fernando-Silva, A. L10-3
 Fialkov, A.B. H-X2 ; L34-01
 Fiehn, O. L35-04
 Fijalek, Z. H-Ph4
 Filipov, F. E-ET18
 Forouhi, M. H-Ph3
 Foster, F. HE-ET1 ; HE-F1
 Fouillac A.-M. E-ET3
 Freeman, R. H-G3
 Fuchs, P. L16-03
 Fuhrer, K. L35-01

G

Gallignani, M. H-Ph12 ; H-Ph13
 Gamoh, K. H-LM1 ; L29-03
 Ganesh, A. L05-02
 Gans, O. E-En14
 Gant, R. H-L3
 García Mayor, M.A. E-F13
 García-Falcón, M.S. E-F3 ; E-F4 ; H-F2
 García-Lavandeira, J. H-L2
 García-López, M. L04-02 ; E-F5
 García-Villar, N. H-LM3 ; H-PC2 ; L36-01
 Garcinuño, R.M. E-F13 ; E-MI4
 Gardeniers, H. HE-ST2



OPTIMIZATION OF MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION METHOD FOR THE DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN SHEEP'S MILK



M. A. García Mayor, R. M. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando*, J. S. Durand Alegría
Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)
Madrid (Spain)

Introduction

Macrolides are a family of antibiotics used to treat a wide range of bacterial infections in human and veterinary medicine, and as feed additives to promote animal growth. Incorrect use of them may leave residues in foods (including milk) and causes toxic effects on consumers and the development of resistant strain bacteria.

Milk (mainly sheep's milk) is a complex and multicomponent mixture due to its high protein and fat content, which often interfere in analytical procedures, making the isolation of macrolides from it specially complicated and laborious.

Thus it is important for health and environmental assessment to have data about presence and stability of these compounds in sheep's milk samples. The analysis of residues of these antibiotics can provide the indexes of exposure to them.



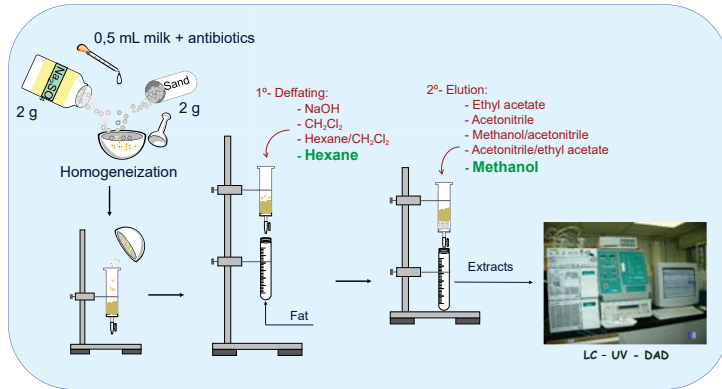
Objective

This study is focused on the optimization of a matrix solid-phase dispersion (MSPD) method for the quantitative extraction of seven macrolide antibiotics: Erythromycin (ERY), Oleandomycin (OLE), Roxithromycin (ROX), Josamycin (JOS), Spiramycin (SPI), Tylosin (TYL), Ivermectin (IVER) from *manchega* sheep milk, mainly used in cheese factory.

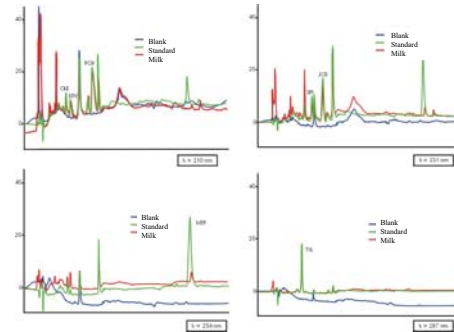
Experimental

OPTIMIZATION OF MSPD PROCEDURE

EXTRACTION PROCEDURE



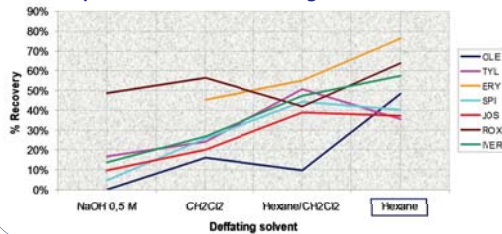
CHROMATOGRAPHIC SEPARATION



Optimum conditions
Column: Hypersil ODS 5 μm (250x4,6)
Mobile phase: A: KH₂PO₄ 25 mM (pH=7)
B: ACN
Temperature: 60 °C
Flow: 1-1,5 mLmin⁻¹

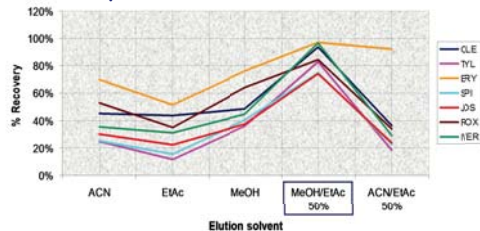
Chromatograms obtained for a spiked sheep milk sample after extracting the analytes.

Optimization of deffating solvent

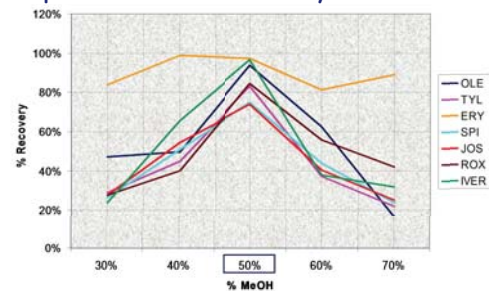


Parameter	Studied	Optimum
Solid phase	- Silica gel - C ₁₈ - Washed sand	Washed sand
Deffating solvent	- NaOH 0,5 M - CH ₂ Cl ₂ - Hexane/CH ₂ Cl ₂ (1:1) - Hexane	Hexane
Elution solvent	- Acetonitrile - Ethyl acetate - Methanol - Methanol/Ethyl acetate - Methanol/Acetonitrile 50% - Acetonitrile/Ethyl acetate 50%	Methanol/Ethyl acetate 50%

Optimization of elution solvent



Optimization of methanol/ethyl acetate ratio



Conclusions

- ✓ The proposed matrix solid-phase dispersion method was applied to the quantitative extraction (74% < recoveries < 97%) of seven macrolide antibiotics (ERY, OLE, ROX, JOS, SPI, TYL, IVER) in sheep milk, a complex sample due to its high fatty content.
- ✓ The method offers a simple and rapid way to simultaneous cleaning-up and extracting of these antibiotics for their determination in sheep milk samples by LC-UV-DAD.
- ✓ The results suggest that the presented method is useful for the analysis of the studied macrolides antibiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by Project CTQ2006-15027 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain)

ExTech©2008 Tenth International Symposium on Advances in Extraction Technologies
January 28-30, 2008, Bruges, Belgium

* pfernando@ccia.uned.es

2 DESARROLLO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA COMPUESTOS MACRÓLIDOS



En general, los métodos analíticos constan de varias etapas: muestreo, preparación de la muestra, separación, detección y análisis de los datos. Cada una de ellas es importante para conseguir unos buenos resultados, sin embargo la preparación de la muestra, en la mayoría de los casos es y sigue siendo, determinante del éxito del método analítico.

Con la preparación de la muestra se pretende convertir la matriz de una muestra real en otra diferente que sea adecuada para el análisis. En este proceso se cambian las interacciones de los analitos con la matriz, las cuales están determinadas por las propiedades físicas y químicas tanto del analito como del resto de componentes de la matriz. En este sentido, es importante tener información sobre las propiedades físicas y químicas de los analitos, tales como polaridad, carácter ácido o básico, solubilidad, etc.

La necesidad de disponer de métodos eficaces para la preparación y limpieza de la muestra en análisis de alimentos es cada vez mayor. Las ventajas de la SPE sobre la extracción líquido-líquido (LLE) quedan ampliamente demostradas: es más rápida y más reproducible, se obtienen extractos más limpios, y el consumo de disolventes se reduce, dado que se requieren tamaños de muestra más pequeños. Por ello, no es de extrañar que gran parte de la investigación actual en el campo de la extracción molecular se concentre en SPE. Sin embargo, esta metodología sigue presentando algunas limitaciones como es la falta de selectividad en la extracción.

Desde hace pocos años los trabajos que combinan la SPE y los MIPs han abierto camino a una intensa investigación en el campo de la llamada extracción en fase sólida de impronta molecular (MISPE). Las ventajas potenciales de esta técnica en comparación con los adsorbentes de extracción de fase sólida convencionales son claramente evidentes e incluyen selectividad y reproducibilidad, junto con una síntesis rápida, fácil, y de bajo coste. Por lo tanto, se proporciona una alternativa atractiva a las fases C18 convencionales.

Por esto, contar con un polímero de impronta molecular que reconozca de forma selectiva antibióticos macrólidos podría significar una sustancial mejora en el tratamiento de la muestra para la determinación de estos analitos en alimentos.

La eritromicina es el elemento representativo de la familia de los antibióticos macrólidos. Posee un anillo lactónico de 14 miembros con 10 centros asimétricos y

dos azúcares. La espiramicina es otro macrólido con un anillo lactónico de 16 miembros. Ambos han sido utilizados en veterinaria y se han detectado residuos en alimentos de origen animal.

Los macrólidos, como la eritromicina y la espiramicina, son el segundo grupo de antibióticos más utilizado en el tratamiento de las mastitis ovinas, con el consiguiente riesgo de aparición de sus residuos en la leche.

Estas consideraciones nos llevaron a enfocar la investigación hacia una preparación de muestra más selectiva hacia estos antibióticos macrólidos ampliamente utilizados en veterinaria.

A continuación se describe el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de muestra basados en la síntesis y caracterización de polímeros de impronta molecular específicos para eritromicina y espiramicina para ser posteriormente utilizados como fase adsorbente en cartuchos de extracción en fase sólida (MISPE). Se han optimizado todos los parámetros involucrados en el proceso MISPE y los analitos se han determinado por cromatografía de líquidos empleando un detector ultravioleta de diodos en serie.

DESARROLLO DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ERITROMICINA EN LECHE DE OVEJA

M.A. García-Mayor, G. Paniagua-González, B. Soledad-Rodríguez, R.M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, *Occurrence of erythromycin residues in sheep milk. Validation of an analytical method*, Food and Chemical Toxicology, 78 (2015) 26-32

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Póster: "Molecularly imprinted solid phase extraction methodology for the determination of macrolide antibiotics in dairy products by liquid chromatography-UV diode-array detection", **1^{er} Congreso Internacional Seguridad Alimentaria ACOFESAL**, 28-29 junio 2012, Madrid, España.

Póster: "Determination of macrolide antibiotics in sheep's milk by molecularly imprinted solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-UV diode-array detection", **HPLC2013, 39th International Symposium on High-Performance Liquid-Phase Separations and Related Techniques**, 16-20 junio 2013, Amsterdam, Holanda. Nominado entre los 30 mejores póster presentados a HPLC2013.

INTRODUCCIÓN

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

- ✓ Síntesis de un nuevo polímero de impronta molecular específico para eritromicina (ERY).
- ✓ Utilización del polímero sintetizado como material adsorbente para la extracción en fase sólida de eritromicina y optimización del proceso.
- ✓ Aplicación del proceso MISPE al análisis de muestras de leche de oveja.

Se llevó a cabo la síntesis no covalente de dos polímeros mediante polimerización en bloque, uno de ellos con iniciación fotoquímica y el otro con iniciación térmica, así como los correspondientes polímeros no impresos.

La molécula molde fue la eritromicina, antibiótico al que se quería que el MIP fuera selectivo.

Se eligió el ácido metacrílico (MAA) como monómero funcional por su capacidad para formar enlaces de hidrógeno y porque permite que la asociación/disociación de la molécula molde pueda llevarse a cabo en condiciones suaves.

Como entrecruzante se seleccionó el etilen glicol dimetacrilato (EGDMA). Para conseguir la polimerización es necesaria una proporción molécula molde:monómero:entrecruzante de 1:100:500, logrando así la rigidez suficiente para proporcionar estabilidad mecánica y un alto grado de entrecruzamiento que dará lugar a cavidades del tamaño y forma adecuados.

La elección del disolvente o porogen es determinante, ya que influirá en las características morfológicas finales del polímero, como el diámetro de poro, y en la capacidad de reconocimiento del analito. Dado que la ERY es soluble en acetonitrilo (ACN), disolvente que contribuye a la formación de interacciones polares entre la molécula molde y el monómero, se seleccionó como porogen.

Los polímeros obtenidos, tras ser triturados y tamizados, se sometieron a una extracción en soxhlet con metanol hasta eliminar la molécula molde.

Posteriormente se llevó a cabo un estudio de la capacidad de adsorción de la molécula de eritromicina que presentaban los polímeros impresos y no impresos sintetizados. Para ello, se evaluó la cantidad de analito que quedaba adsorbida en el polímero tras su carga en diferentes disolventes y el lavado con ACN. Como era de esperar, los mejores resultados se consiguieron utilizando ACN como disolvente de carga, ya que es el que se utilizó como porogen en la polimerización.

De los dos MIP sintetizados, el que mostró un mejor reconocimiento de la ERY fue aquel en el que la iniciación del proceso de polimerización se indujo térmicamente, por lo que es el que se utilizó para los estudios posteriores.

Por otro lado, los polímeros no impresos mostraron una escasa afinidad por el analito, lo que indicó que las interacciones entre la ERY y el MIP son fundamentalmente específicas.

El proceso de extracción en fase sólida impresa molecularmente (MISPE) se llevó a cabo comparando con el comportamiento, en las mismas condiciones, del polímero no impreso, con el objeto de valorar las posibles interacciones no específicas. Se optimizaron los disolventes empleados en las etapas de lavado y de elución, con el fin de lograr un procedimiento que fuera selectivo y que permitiera la mejor recuperación del analito posible. El empleo de ACN como disolvente de lavado para eliminar aquellos compuestos adsorbidos de forma no específica, y de metanol con un 0,5% de ácido acético como disolvente para la elución de la ERY, dio lugar a las mejores recuperaciones. Los resultados sugieren que la eritromicina se une a los sitios enlazantes del polímero mediante enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, las cuales no pueden romperse con el empleo de disolventes apolares o de baja polaridad.

Una vez obtenido el MIP específico para ERY y optimizado el proceso MISPE, se puso a punto su aplicación al análisis de muestras de leche de oveja.

La complejidad de la matriz de la leche de oveja obliga a la realización de un pretratamiento de la muestra en el que se eliminen las proteínas. Se estudiaron varios disolventes y mezclas de los mismos como precipitantes, así como diferentes volúmenes, siendo la mezcla de NaH_2PO_4 y ACN a $\text{pH} = 7$ y un volumen de 5 mL con la que se logró la completa eliminación de las proteínas, evitando así la obstrucción de la fase sólida polimérica durante el proceso MISPE.

Para la siguiente etapa de eliminación de la grasa, se probó con dos disolventes, n-hexano y NaOH. Con n-hexano se consiguieron extractos limpios y recuperaciones de ERY superiores al 95 %. Además, se comprobó que no era necesaria la etapa de lavado con ACN, pues ya se habían eliminado las posibles interferencias junto con la grasa, pudiéndose pasar directamente a la fase de elución, la cual se llevó a cabo, como ya se ha mencionado, con metanol y 0,5 % de ácido acético.

El polímero de impronta molecular obtenido pretende ser un material de reconocimiento específico para eritromicina. Para verificarlo se llevó a cabo un estudio de posibles interferencias, eligiéndose para ello otros antibióticos macrólidos de estructura similar: roxitromicina, espiramicina, josamicina, tilosina e ivermectina. Sólo se observó una alta recuperación en el caso de la roxitromicina (85 %), debido a que esta molécula es más parecida estructuralmente a la ERY, sin embargo no supone una interferencia en el análisis cromatográfico de esta última gracias a la diferencia entre los tiempos de retención de ambos compuestos.

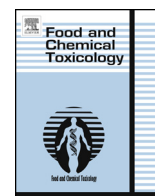
Tras la aplicación del procedimiento descrito se pudo cuantificar eritromicina mediante HPLC-UV-DAD con un límite de cuantificación de $24,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, es decir, en concentraciones inferiores al límite máximo de residuos legislado por la Unión Europea ($40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

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



M.A. García-Mayor^a, G. Paniagua-González^a, B. Soledad-Rodríguez^b,
R.M. Garcinuño-Martínez^{a,*}, P. Fernández-Hernando^a, J.S. Durand-Alegría^a

^a Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance, Madrid 28040, Spain

^b 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 (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 Ω cm quality) was obtained using a Milli Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

Stock standards solutions of individual compounds at 1 g L⁻¹ 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⁻¹) 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 NaH₂PO₄ 25 mM at pH 7/acetonitrile (70:30). Aqueous solvent of the mobile phase was made by dissolving 5 g of NaH₂PO₄ 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 μ 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 μ 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 NaH₂PO₄: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 10⁻² 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 μ 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 μ 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⁻¹, 58% B (8 min) at 1.2 mL min⁻¹ and 70% B (20 min) at 1.5 mL min⁻¹. The column temperature was kept at 60 °C. The injection volume was 20 μ 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⁻¹ 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 6×1 mL of hexane. Then, the target analyte was eluted using 3×2 mL MeOH with 0.5% acetic acid. Elutes were evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 40°C . The residue was re-dissolved with the adequate volume of mixture NaH_2PO_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 3×2 mL of MeOH and 3×2 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°C for 3 h (MIP1) and thermally initiated polymerization in a thermostat-controlled waterbath at 65°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 NaH_2PO_4 :ACN (70:30) at pH 7, 1 mL of 50 mg L^{-1} ERY standard solution, prepared in each solvent mentioned above. Then, a washing step using ACN (3×2 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 mL , 50 mg L^{-1}) from binding studies in different loading solvents: chloroform, ACN and NaH_2PO_4 :ACN (70:30, pH 7).

Polymer	ERY recoveries (%)		
	Chloroform	ACN	NaH_2PO_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

the different solvents assayed. In general, MIP2 showed better recognition properties than MIP1 in all solvents tested. When chloroform or NaH_2PO_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: H_2O and H_2O :ACN mixtures at increasing ACN proportions (50–100%) up to 6 mL (3×2 mL). Fig. 1 shows the results obtained when 1 mL of ERY standard solution at 50 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 NaH_2PO_4 :ACN, 70:30 at pH 7, MeOH and MeOH

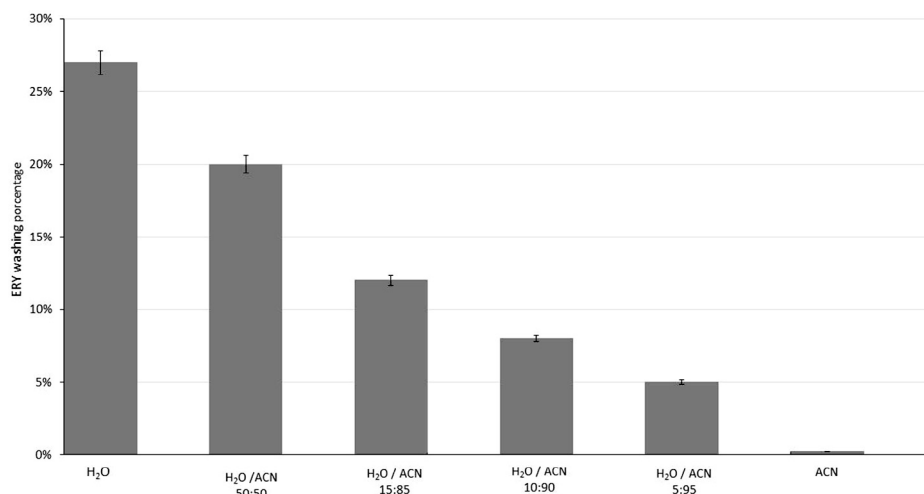


Fig. 1. Percentages of ERY obtained in all fractions collected from washing step using different washing solvents (H₂O, H₂O/ACN mixtures) when ERY standard solution was loaded onto the cartridge (1 mL of 50 mg L⁻¹ in ACN).

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 (NaH₂PO₄: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.

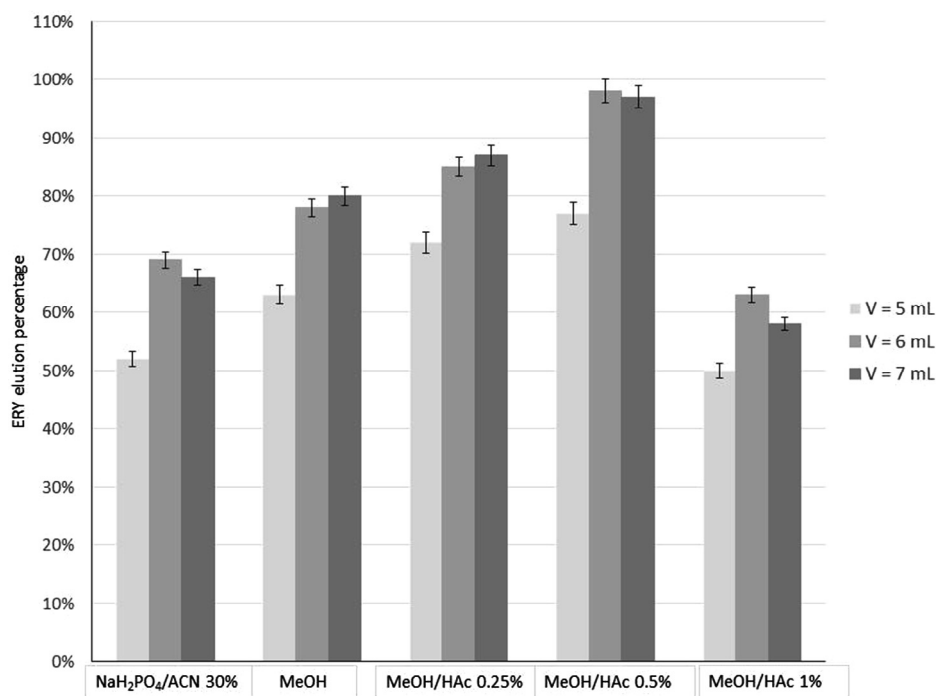


Fig. 2. Elution percentages of ERY in MISPE for different solutions: NaH₂PO₄:ACN (70:30, v/v), MeOH and MeOH at 0.25, 0.5, 1% in acetic acid. Several volumes of elution solvent (5–7 mL) were tested. The studies were developed with 1 mL of ERY standard solution at 50 mg L⁻¹ in ACN.

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, NaH₂PO₄: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 NaH₂PO₄:ACN, it was observed that the samples remained with protein residues, offering the best results of the mixture 3:1 NaH₂PO₄: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 NaH₂PO₄: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 NaH₂PO₄ 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⁻¹), medium level (48.3 µg kg⁻¹) and high level (482.6 µg kg⁻¹). 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⁻¹ and 482.6 µg kg⁻¹ 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⁻¹. 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⁻¹. 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⁻¹).

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⁻¹ and ERY, ROX at 100 mg L⁻¹), medium level (5:50 mg L⁻¹), high level (2.5:25 mg L⁻¹). 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 ⁻¹)
Low level	Medium level	High level	Spiking level	Spiking level	Spiking level	Concentration working range	
24.2 µg kg ⁻¹	48.3 µg kg ⁻¹	482.6 µg kg ⁻¹	48.3 µg kg ⁻¹	482.6 µg kg ⁻¹	48.3 µg kg ⁻¹	(24–965 µg kg ⁻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	$y = 0.23C + 12.36$	24.1
					91.2 ± 2.2	$R^2 = 0.9994$	

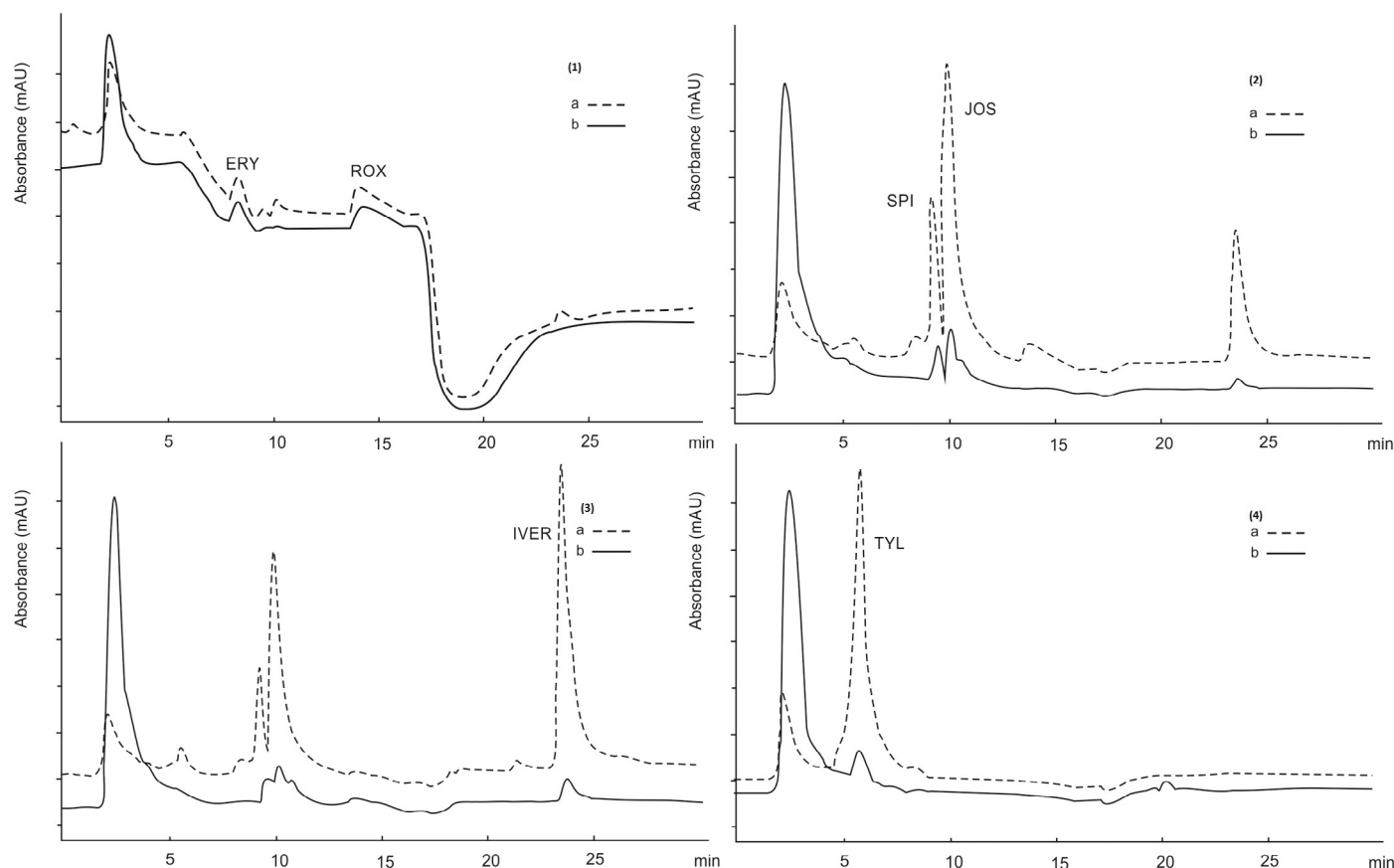


Fig. 3. Chromatograms obtained for the six antibiotic macrolides studied at concentrations of 50 mg L⁻¹ ERY, ROX and 5 mg L⁻¹ JOS, SPI, IVER and TYL. (a) For an ACN standard mixture (b) MISPE extracted sheep milk. Chromatograms were obtained at the wavelength corresponding to each analyte studied: (1) 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⁻¹ and ERY, ROX at 100 mg L⁻¹), medium level (5:50 mg L⁻¹), high level (2.5:25 mg L⁻¹), (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⁻¹ 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 β 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.

1^{er} Congreso Internacional Seguridad Alimentaria

ACOFESAL

Madrid **28 y 29** junio

LUGAR
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

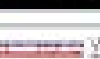
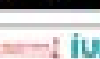
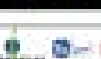
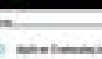
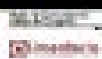
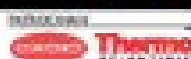
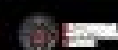
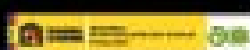
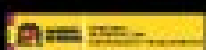
CONTACTO
congreso2013@ucofineslog
<http://congresoacofesal.org>

ORGANIZA

ACOFESAL
Asociación de Científicos y Profesionales de España en Seguridad Alimentaria
C/ Pedro Ferrnandez, 1 - PD 28014 Madrid
Tel 91 312 28902



COLABORA



BOLETÍN DE PRESENTACIÓN TRABAJOS



NOMBRE Y APELLIDOS				
DIRECCIÓN	C/ SENDA DEL REY, 9			
CÓDIGO POSTAL	28040			
POBLACIÓN	MADRID			
PROVINCIA	MADRID			
TELEFONO				
E-MAIL				
PROFESION				
CENTRO DE TRABAJO	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS. FACULTAD DE CIENCIAS			
EMPRESA	UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA			
AREA QUÍMICA	FORMACION	LABORATORIO	CONSULTORIA	CERTIFICACION
AUTORES	1: 2: 3:			
AFILIACIÓN /ES				
PALABRAS CLAVE	1: HPLC	2: ANTIBIÓTICOS	3: MACRÓLIDOS	4: MISPE 5: LECHE DE OVEJA

BOLETÍN DE PRESENTACIÓN TRABAJOS

TÍTULO: OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA UTILIZANDO UN POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDOS EN MUESTRAS LÁCTEAS MEDIANTE HPLC.

RESUMEN

OBJETIVOS

En el presente trabajo se propone un método sencillo y selectivo de tratamiento de muestra para la determinación simultánea de antibióticos macrólidos en leche de oveja, desarrollando un proceso de extracción en fase sólida mediante un polímero de impresión molecular (MISPE). Los objetivos del trabajo podrían quedar resumidos de la siguiente manera:

- Establecer la estrategia de síntesis más adecuada para la obtención de un MIP, por vía covalente mediante la técnica de polimerización en bloque, de forma que presente un adecuado reconocimiento y capacidad de unión específica para la eritromicina.
- Optimización de cada una de las etapas del proceso MISPE para la determinación de antibióticos macrólidos.
- Optimización del método cromatográfico aplicado en la determinación de antibióticos macrólidos.

MATERIAL

- Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución AGILENT TECHNOLOGIES 1200 SERIES equipado con un detector de diodo array.
- Columna cromatográfica Hypersil ODS RP-18 5 lm (25 cm - 4.6 mm i.d.) de SCHARLAB.
- Las muestras se inyectaron de forma manual mediante una válvula Rheodine Inc., Model 7725; Hewlett Packard) con un bucle de 20 µL.
- pH metro GLD 21+ de CRISON.
- Equipo de vacío para extracción en fase sólida de VARIAN, constituido por una bomba de membrana de vacío de SELECTA.
- Cartuchos de extracción en fase sólida de 3 mL, con filtro de teflón (20 µm) de SUPELCO.
- Tamices de acero inoxidable (200-355 µm) de CISA.

RESULTADOS

La composición del polímero seleccionado como óptimo para aplicarse como fase adsorbente en el proceso MISPE fue la siguiente: 15 mg eritromicina, 170 µL ácido metacrílico, 1900 µL de etilenglicoldimetacrilato, 35 mg de azo-N, N'-bis-isobutironitrilo, como disolvente se utilizó acetonitrilo.

Las condiciones de síntesis del proceso de polimerización consistieron en una purga de la mezcla de polimerización con Argón durante 7 minutos, llevándose seguidamente dicha mezcla a un baño termostático a 65 °C durante 3 horas para la formación del polímero. A continuación el polímero formado se trituró y tamizó en el tamaño de partícula adecuado (355-600 µm), extrayéndose la molécula molde mediante extracción soxhlet con 80 mL de MeOH durante 25 horas.

BOLETÍN DE PRESENTACIÓN TRABAJOS

	<p>Las condiciones óptimas del proceso MISPE fueron:</p> <ul style="list-style-type: none">- 200 mg de MIP- Etapa de acondicionamiento: 3×2 mL MeOH y 3×2 mL ACN- Etapa de lavado: 2×2 mL ACN- Etapa de elución: 3×2 mL MeOH/HAc (0.5%) <p>Los porcentajes de recuperación para la eritromicina obtenidos en el proceso MISPE fueron del 100%. Este proceso fue posteriormente aplicado para la limpieza de muestras que contenían, a parte de la eritromicina, otros 5 antibióticos más de la familia de ésta, y por tanto estructuralmente similares.</p>
CONCLUSIONES	<p>Se ha desarrollado un nuevo método de extracción para la determinación de residuos de antibióticos macrólidos (eritromicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina, ivermectina, tilosina) en leche de oveja manchega. La detección de estos analitos se realizó mediante LC-DAD.</p> <p>En el método propuesto las etapas de extracción y limpieza son llevadas a cabo de forma simultánea durante el proceso MISPE. Las recuperaciones obtenidas para la ERY fueron del 100%, con RSD de 1.7% (n= 5, 50 ppb) y un límite de cuantificación LQO= 24.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor apropiado según la legislación vigente que regula este compuesto (MRL 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$). En el caso de los otros antibióticos, las recuperaciones también fueron aceptables.</p> <p>Otras de las ventajas del método de extracción desarrollado son el uso de pequeños volúmenes de disolventes, escasa manipulación de la muestra, bajo coste de los reactivos y el tiempo de análisis.</p> <p>De los resultados obtenidos en los estudios realizados podemos concluir que el método MISPE propuesto supone un avance significativo, en lo que se refiere a simplicidad y eficiencia en la determinación simultánea de antibióticos macrólidos en leche de oveja, todo ello de forma rápida y con alta sensibilidad.</p>

FECHA: 11 DE MAYO DE 2012

A. García Mayor, G. Paniagua González, R. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando, J. S. Durand Alegría
 Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid (Spain)

INTRODUCTION

Macrolide antibiotics are agents against Gram-positive and some Gram-negative bacteria, and are widely used in human and in animals for therapeutic and prophylactic treatments against bacterial infections such as mastitis. The incorrect use of antibiotics and the disrespect for withdrawal time after treatment have led to the presence of antibiotic residues in foods. The residues cause toxic effects on consumers, such as allergic reactions in sensitive or sensitised individuals, provoke the development of antibiotic-resistant bacteria and may induce cross-resistance against other antibiotics of similar structure or mechanism of action, making more difficult to treat certain infections.

European Union legislators have furthermore restricted the veterinary use of antibiotics and in this sense, the development of sensitive and reliable multiresidue methods allowing the determination of macrolide residues at trace levels is required.

On the other hand, the application of the molecular imprinting technology in the design of new and efficient methods for sample preconcentration and clean up in food applications is constantly increasing. In that context much of the current research in the molecular imprinting field is concentrated on SPE, which offers advantages as the low price, predetermined selectivity for analyte(s) of interest, low time consumption and relatively low amount of solvents and the stability of imprinted polymers, which dramatically affects the recovery and contributes highly to the total cost of the analysis.

OBJETIVES

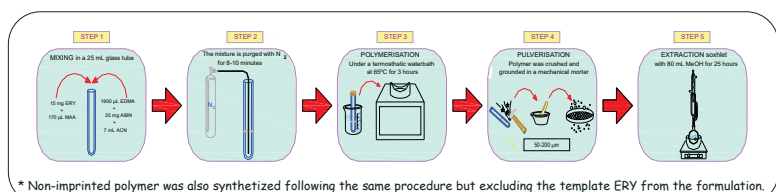
Milk is a complex sample matrix, containing lots of substances which can interfere in the analysis, mainly proteins and fat matter. Therefore, the majority of the published methods require time consuming sample pre-treatment including milk deproteinisation, defatting and subsequent clean-up process. The purpose of this work is to synthesise a novel imprinted functional material by a molecular imprinting technique, to use this material as an SPE sorbent for the quantitative extraction and preconcentration of macrolide antibiotics such as erythromycin (ERY), roxithromycin (ROX), josamycin (JOS), spiramycin (SPI), tylosin (TYL) and ivermectin (IVER), from manchea sheep milk without proteins precipitation step.

The effects of several parameters such as the nature and amount of the solid support and the defatting and elution solvents were thoroughly investigated to find the optimal MISPE conditions. For analytical separation and quantification, LC-UV-DAD was employed.

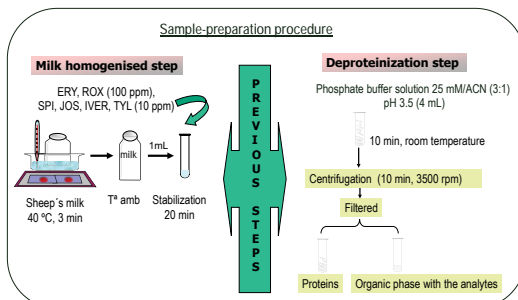
The analytical characteristics (linearity, LODs, precision, accuracy and selectivity) are discussed in order to demonstrate the suitability of the developed method.

EXPERIMENTAL SECTION

SYNTHESIS OF MIP-ERY BY BULK POLYMERISATION

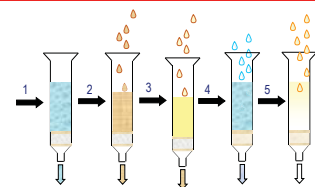


APPLICATION TO SHEEP'S MILK SAMPLES ANALYSIS



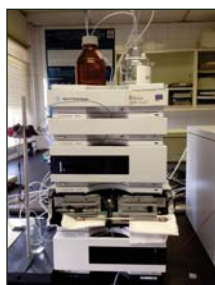
SAMPLE-PREPARATION PROCEDURE BY MISPE EXTRACTION

- SPE-cartridge was packed with a 200 mg portion of ERY imprinted polymer (50-200 µm).
- 1. Conditioning step: 3x2 mL MeOH / 3x2 mL ACN
- 2. Loading step: 1 mL extracted sheep's milk spiked with of each macrolide: ERY, ROX (100 ppm), SPI, JOS, TYL, IVER 10 ppm) in ACN
- 3. Defatting step: 5x1 mL NaOH 0.5 M
- 4. Washing step: 2x2 mL ACN
- 5. Elution step: 3x2 mL MeOH:Acetic acid (0.5%)



LC-UV-DAD conditions:

- Hypersil ODS RP-18 column. Dim. (mm): 100x4.6. Particle size (µm): 5
- Temperature: 60°C
- Elution gradient: 1-1.5 mL/min
- Mobile phase: NaH₂PO₄:ACN (50:50) pH 7
- Analysis time: 35 min (6 macrolide antibiotics)
- UV-DAD Detection: ERY/ROX (210 nm), TYL (287 nm), SPI/JOS (231 nm), IVER (254 nm)



- The elution fraction was evaporated to dryness and redissolved in 1000 µL of NaH₂PO₄:ACN (70:30) to LC analysis.

RESULTS

MISPE OPTIMIZATION CONDITIONS

MISPE Step	Solvents	Optimum conditions
Conditioning (6 x 1 mL)	MeOH / ACN	MeOH / ACN
Sample Loading (1 mL)	ACN, NaH ₂ PO ₄ :ACN (70:30) pH 7	ACN
Defatting	NaOH (0.1-2 M), hexane	NaOH 0.5 M
Washing (2 x 1 mL)	ACN + 15% H ₂ O, H ₂ O	H ₂ O
Elution (3 x 1 mL)	MeOH, MeOH + 0.5% acetic acid	MeOH + 0.5% acetic acid

* Antibiotics solutions (1 mL, 100 ppm ERY, ROX and 10 ppm SPI, IVER, TYL, JOS) for sample loading were prepared different solvents by diluting from stock solution (500 ppm) prepared in MeOH.

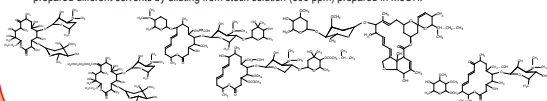


Fig. 1. Chemical structures of the studied macrolide antibiotics: erythromycin (ERY), roxithromycin (ROX), spiramycin (SPI), josamycin (JOS), ivermectin (IVER) and tylosin (TYL).

MISPE RECOVERY STUDIES

1. % ERY retention efficiency in methacrylate-based polymers prepared in acetonitrile using different synthesis conditions after deproteinization step

Polymerization mode	% no retention	% retention
Water bath at 65°C	18	39
UV radiation (265 nm)	8	45

2. % Recovery MISPE process after defatting procedure on line

% Recovery ERY	
NaOH 1 M	42
Hexane	30

3. Optimization NaOH concentration

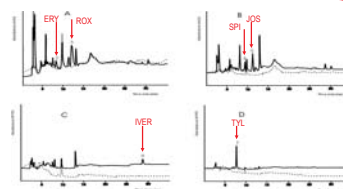
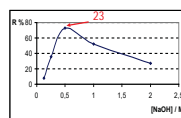


Fig. 2. Chromatograms of MISPE extracted sheep milk with 100 ppm of ERY and ROX and 100 ppm IVER, JOS, SPI, TYL (A) and blank milk extract (B, C, D) at 210 nm, (B) at 231 nm, (C) at 254 nm and (D) at 287 nm. Peak assignment: 2 = ERY, 3 = ROX, 4 = SPI, 5 = JOS, 6 = IVER and 7 = TYL.

SUMMARY OF ANALYTICAL PERFORMANCE

Antibiotics	% Recovery
ERY	91.7 ± 2.4
ROX	98.3 ± 0.3
SPI	85.0 ± 2.7
JOS	94.8 ± 2.0
IVER	---
TYL	79.7 ± 5.5

CONCLUSIONS

- ✓ A novel functional material was prepared by molecular imprinting technique for erythromycin analyte. The prepared material showed improved stability, good selectivity and high adsorption capacity for macrolide antibiotics, and was more suitable as sorbent for SPE.
- ✓ The good sensitivity achieved by combination of HPLC with the proposed molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure allows the determination of macrolide antibiotics at the level required for routine analysis of these compounds in sheep's milk.
- ✓ Recovery data were in all cases satisfactory. In addition, the current method requires small sample size and volumes of solvents, and minimizes sample manipulation, cost materials, and analysis time. The results of this study point out that the proposed MISPE method constitutes a significant advance in simplicity and efficiency, which makes it possible a rapid and sensitive simultaneous determination of macrolides antibiotics in sheep's milk.
- ✓ In future works this method will be evaluated for the analysis of macrolide antibiotics in sheep's milk samples without previous deproteinization step.

REFERENCES

- M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría. Journal of Chromatography A 1122(1-2) (2006) 76-83.
- M.A. García-Mayor, A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría. Food Chemistry 134 (2012) 953-958.
- C. Nicholls, K. Sarim, A.S. Piletski, S. Saini, S. Setford. Biosens. & Bioelectron., 21 (2006) 1171-1177.

ACKNOWLEDGEMENTS

Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER Programme (project S2009/AGR1464, ANALISVC-II) are acknowledged for financial support.

HPLC2013 AMSTERDAM

39th International Symposium

on

High-Performance Liquid-Phase Separations
and Related Techniques



Amsterdam, The Netherlands
June 16-20, 2013

www.hplc2013.org

HOLLAND

JUNE 16-20

AMSTERDAM



HPLC2013

DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN SHEEP'S MILK BY MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION COUPLED WITH HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- UV DIODE-ARRAY DETECTION

A. García Mayor, G. Paniagua González, R. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando, J. S. Durand Alegría

Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance, 28040 Madrid, Spain

The macrolides are a family of antibiotics widely used in veterinary medicine in the treatment of bacterial disease or prophylactically to prevent infection. They have also been administered as feed additives for growth promotion. In human medicine the development of antibiotic resistance in bacteria has been attributed to the overuse of antimicrobials. Another route by which humans are exposed to antibiotics is through the animal food we eat. In order to ensure food safety, several international organizations, such as European Union, have established maximum residue limits (MRLs) of veterinary drugs in foodstuffs from animal origin.

On the other hand, the application of the molecular imprinting technology in the design of new and efficient methods for sample preconcentration and clean up in food applications is constantly increasing. In that context much of the current research in the molecular imprinting field is concentrated on SPE, which offer advantages as the low price, predetermined selectivity for analyte(s) of interest, relatively low amount of solvents and the stability of imprinted polymers, which affects the recovery and contributes highly to the total cost of the analysis.

This work describes the evaluation of a new extraction procedure based on molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) for the quantitative extraction and preconcentration of six macrolides (ERY, ROX, SPI, JOS, TYL, IVER) from sheep's milk samples. The optimization of parameters affecting the preconcentration was carried out to select the best conditions of selectivity and sensitivity to determine these compounds at low concentration levels in foodstuff. In order to demonstrate the suitability of the developed method several analytical characteristics (linearity, LODs, precision, accuracy and selectivity) were studied. The extraction procedure was validated, obtaining recoveries greater than 90%, with repeatability values ($RSDs \leq 15\%$). Limits of detection were lower than -----.

Finally the proposed methodology was applied to manchega milk sheep samples by UV-diode array detection (HPLC-DAD).

G. Paniagua González, A. García Mayor, R. Garcinuño Martínez, P. Fernández Hernando, J. S. Durand Alegría
Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance, 28040 Madrid, Spain

INTRODUCTION

The development of antibiotic resistance in bacteria has been attributed to the overuse of antimicrobials in medicine. Another route by which humans are exposed to antibiotics is through the animal foods we eat. Incorrect use of antibiotics in animals for therapeutic and prophylactic treatments may leave residues in foods and cause toxic effects on consumers, such as allergic reactions in sensitive or sensitised individuals, provoke the development of antibiotic-resistant bacteria and may induce cross-resistance against other antibiotics of similar structure or mechanism of action, making more difficult to treat certain infections. European Union legislators have restricted the veterinary use of antibiotics. For this reason, it is necessary the development new analytical methodology to allow to detect and confirm the presence of this antimicrobials in foods on animal origin.

On the other hand, the application of the molecular imprinting technology in the design of new and efficient methods for sample preconcentration and clean up in food applications is constantly increasing. In that context much of the current research in the molecular imprinting field is concentrated on SPE, which offers advantages as the predetermined selectivity for a particular substance or group of structural analogues, relatively low amount of solvents and the stability of imprinted polymers, which affects the recovery and contributes highly to the total cost of the analysis.

OBJECTIVES

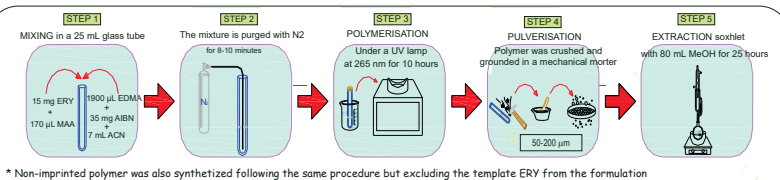
The purpose of this work is to synthesise a novel imprinted functional material by a molecular imprinting technique, to use this material as an SPE sorbent for the quantitative extraction and preconcentration of macrolide antibiotics such as erythromycin (ERY), roxithromycin (ROX), josamycin (JOS), spiramycin (SPI), tylosin (TYL) and ivermectin (IVER) from manchega sheep milk.

The effects of several parameters: the nature and amount of the solid support and the defatting and elution solvents were thoroughly investigated to find the optimal MISPE conditions. For analytical separation and quantification LC-UV-DAD was employed.

The analytical characteristics are discussed in order to demonstrate the suitability of the developed method.

EXPERIMENTAL SECTION

SYNTHESIS OF MIP-ERY BY BULK POLYMERISATION



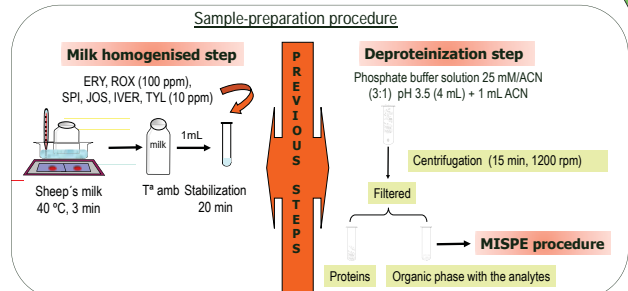
LC-UV-DAD conditions:

- Hypersil ODS RP-18 column. Dim. (mm): 100×4.6. Particle size (µm): 5
- Temperature: 60°C
- Elution gradient: 1-1.5 mL/min
- Mobile phase: NaH₂PO₄:ACN (50:50) pH 7
- Analysis time: 30 min (6 macrolide antibiotics)
- UV-DAD Detection: ERY/ROX (210 nm), TYL (287 nm), SPI/JOS (231 nm), IVER (244 nm)

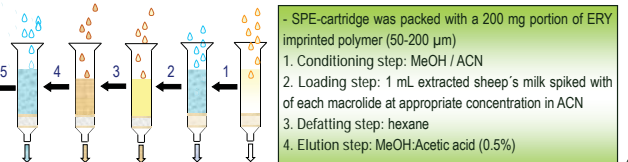


- The elution fraction was evaporated to dryness and redissolved in 1 mL of NaH₂PO₄:ACN (70:30) to LC analysis

APPLICATION TO SHEEP'S MILK SAMPLES ANALYSIS



MISPE EXTRACTION PROCEDURE



RESULTS

MISPE RECOVERY STUDIES

Polymerization mode	% no retention	% retention
Water bath at 65°C	18	39
UV radiation (265 nm, 0°C)	8	45

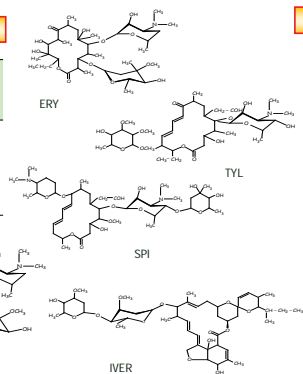


Fig. 1. Chemical structures of the studied macrolide antibiotics: erythromycin (ERY), roxithromycin (ROX), spiramycin (SPI), josamycin (JOS), ivermectin (IVER) and tylosin (TYL).

SUMMARY OF ANALYTICAL PERFORMANCE

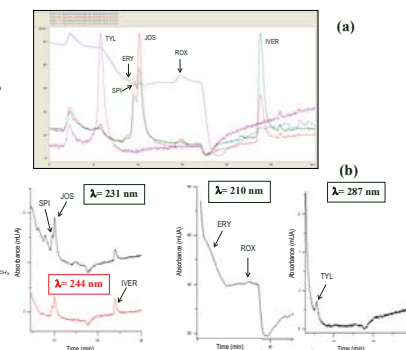


Fig. 2. (a) Chromatograms obtained for (a) standard mixture of macrolides at 50 mg L⁻¹ ERY, ROX and 5 mg L⁻¹ JOS, SPI, IVER, TYL in ACN (b) MISPE extracted sheep milk with 50 mg L⁻¹ (ERY, ROX) and 5 mg L⁻¹ (IVER, JOS, SPI, TYL).

Antibiotic	% Recovery Low level	% Recovery Medium level	% Recovery Maximum level
ERY	99.0 ± 1.7	98.9 ± 0.9	98.9 ± 0.7
ROX	88.3 ± 2.6	88.7 ± 5.5	84.7 ± 3.2
SPI	37.3 ± 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

Macrolides recoveries at three concentration levels. Low level (JOS, SPI, IVER, TYL at 10 mg L⁻¹ and ERY, ROX at 100 mg L⁻¹), medium level (5:50 ppm), maximum level (2.5:25 ppm), (n=3).

- Working concentration range: 2.5×10⁻² – 100 mg L⁻¹ for ERY, ROX and 2.5×10⁻³ – 10 mg L⁻¹ for IVER, TYL, JOS, SPI
- RSD-interday < 5% and < 12.5% for 10 and 25 mg L⁻¹ ERY and ROX concentrations, respectively, (n=3) (milk samples)
- RSD-intraday < 0.8% and < 7% for 10 and 25 mg L⁻¹ ERY and ROX concentrations, respectively, (n=3) (milk samples)

CONCLUSIONS

✓ A novel functional material was prepared by molecular imprinting technique for erythromycin, a MISPE method has been developed for the determination of macrolide antibiotics. The MIP showed improved stability, good selectivity and high adsorption capacity for ERY and ROX macrolides. In addition, the current method requires small sample size and volumes of solvents, and minimizes sample manipulation, cost materials, and analysis time.

✓ The good sensitivity achieved by combination of HPLC with the proposed molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure allows the determination of erythromycin and roxithromycin at the level required and it constitutes a significant advance in simplicity and efficiency for routine analysis of these compounds in sheep's milk.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPIRAMICINA EN LECHE DE OVEJA

M.A. García-Mayor, G. Paniagua-González, R.M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, *Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the determination of spiramycin in sheep milk.*

Enviado a FOOD CHEMISTRY

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Póster: "Development of a selective solid-phase extraction methodology based on a molecular imprinted polymer for the analysis of spiramycin in sheep milk",
EuroFoodChemXVIII, Upcoming Challenges in Food Science, 13-16 octubre 2015, Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis y caracterización de un MIP específico para el antibiótico macrólido espiramicina, y se puso a punto su aplicación como adsorbente para extracción en fase sólida en el análisis de SPI en muestras de leche de oveja mediante HPLC-UV-DAD.

La síntesis de los polímeros impresos (MIP) y no impresos (NIP) se realizó disolviendo inicialmente la molécula molde (espiramicina), y el monómero funcional (ácido metacrílico) en el porogen (acetonitrilo) formando un prepolímero. A continuación, se añadieron el entrecruzante (etilen glicol dimetacrilato) y el iniciador radicalico (2,2'-azobisisobutironitrilo). La proporción molécula molde:monómero:entrecruzante es 1:100:500. El proceso de polimerización en bloque no covalente se llevó a cabo térmica y fotoquímicamente.

Tras triturar y tamizar los polímeros para lograr el tamaño de partícula deseado (200 - 355 μm) se llevó a cabo la extracción de la molécula molde en Soxhlet.

Para seleccionar el polímero óptimo se realizó un análisis de la capacidad de reconocimiento (Batch Binding) de los MIP y NIP sintetizados. Para ello se incubaron 43 mg de los polímeros con una disolución de SPI en ACN durante una noche a temperatura ambiente, analizándose el contenido de SPI no enlazado que, transcurrido este tiempo, permanece en la disolución. Se determinaron: las uniones específicas (porcentaje de SPI enlazado al MIP menos porcentaje enlazado al NIP); el coeficiente de partición k (relación entre la cantidad de SPI enlazada al MIP y la cantidad en la disolución); y el factor de impresión α (relación entre la cantidad de SPI enlazada al MIP y la cantidad de SPI enlazada al NIP). Los resultados mostraron un mayor número de uniones específicas (53,1 % frente a 37,7 %), mayor coeficiente de partición (3,04 frente a 1,65) y mayor factor de impresión (3,40 frente a 2,54) en el caso del MIP con iniciación térmica del proceso de polimerización, por lo que fue el seleccionado para los estudios posteriores.

Para valorar las propiedades de adsorción del polímero seleccionado se obtuvieron las isotermas de adsorción según el modelo de la ecuación de Langmuir y se realizó un análisis de Scatchard, que sugirió la presencia en el polímero de sitios enlazantes heterogéneos de dos tipos.

Se realizó un estudio de la caracterización morfológica del polímero impreso con SPI. Para ello se calculó el área específica superficial a partir de los datos de adsorción/desorción de nitrógeno utilizando la ecuación de Brunauer-Emmett-Teller. El área superficial externa y el volumen de microporo se calcularon por el método t-plot, y las distribuciones de tamaño de poro y el volumen total de poro por el modelo de la Teoría Funcional de Densidades.

Tras la síntesis y caracterización del polímero, se estudió su aplicación como sólido adsorbente en un procedimiento SPE (MISPE), optimizándose las condiciones experimentales que afectan al reconocimiento de la SPI, entre las que se incluyen la composición y cantidad de los disolventes de lavado y elución. Los resultados mostraron que el procedimiento óptimo para la limpieza de la muestra consiste en eliminar la grasa y otras sustancias interferentes de forma simultánea mediante la adición secuencial de 6 mL de n-hexano. Los mejores resultados en el proceso de elución se consiguieron con la adición tres veces de 2 mL de MeOH con 0,5 % de ácido acético. Es necesario realizar la precipitación de las proteínas previamente al desarrollo del proceso MISPE, con el fin de evitar obstrucciones en la columna de extracción.

En cuanto a la aplicación a muestras reales de leche de oveja, se consiguieron recuperaciones de SPI superiores al 90%, así como unos parámetros de validación del método satisfactorios, como buena linealidad ($r^2 = 0,9998$) en el rango de concentraciones de 24 a 965 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; un límite de cuantificación de 24 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; recuperaciones superiores al 90 % con RSDs menores del 5 % para tres niveles de concentración diferentes muestran una buena exactitud; y en cuanto a la precisión, se evaluó en términos de reproducibilidad (recuperaciones en tres días sucesivos) y repetibilidad (recuperaciones secuenciales en un día) a dos concentraciones diferentes, obteniéndose recuperaciones entre 86,4 % y 88,3 % con RSD < 9 % en el primer caso y entre 97,9 % y 99,4 % con RSD < 3 % en el segundo caso.

Se llevaron a cabo estudios de interferencias para evaluar la selectividad del método. Como era de esperar las mayores interferencias se deben a los antibióticos macrólidos de estructura similar a la de la SPI: ERY, JOS, TYL, IVER. El MIP obtenido mostró una alta selectividad por la SPI.

SINTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR THE DETERMINATION OF SPIRAMYCIN IN SHEEP MILK

M. A. García Mayor, G. Paniagua González, R. M. Garcinuño Martínez*, P. Fernández Hernando, J. S. Durand Alegría

Abstract

A series of molecularly imprinted polymers (MIPs) comprising reactionary sites which are complementary to macrolide antibiotic spiramycin (SPI) were synthesized by noncovalent bulk polymerization technique, using methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as the cross-linker. MIPs were synthesized under different polymerization process, UV-initiated photopolymerization or thermally initiated polymerization. Recognition efficiency of both polymers synthesized was evaluated in binding study in comparison with non-imprinted polymers. The best MIP was morphologically characterized and equilibrium assays were carried out. The equilibrium data fitted well to Langmuir equation and Scatchard analyses revealed that two classes of binding sites were formed in the MIP, were high and low affinity sites. The MIP was evaluated as a sorbent for extraction and preconcentration of SPI from aqueous and sheep milk samples and an off-line MISPE method followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV diode-array detection was established. Under the optimum conditions, good linearity were obtained for SPI in a range of 24-965 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the average recoveries at three spiked levels in milk samples were higher than 90% with the relative standard deviation (RSD) less than 5%. Limits of quantification of the method was 24.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, lower than the concentration level established by current legislation. Cross-reactivity studies from other macrolides with similar structure was tested. The data indicated that the imprinted polymer had a good selectivity and affinity for SPI, demonstrating the potential of the proposed MISPE for rapid, sensitive and effective sample pretreatment for selective determination of this antibiotic in sheep milk samples.

1. Introduction

Spiramycin (SPI) is a 16-member macrolide antibiotic with a wide range of veterinary uses. This macrolide was authorized in the past, as feeds additive (5 mg L^{-1}) according to the Directive 70/524/EC [1] in order to modulate gut microbial flora, thus enhancing the growth rates performances in calves, cattle, pigs and poultry. In December 1998 health ministers of European Union countries voted to ban the remaining human-use of related antibiotics still administered to promote animal growth, so that their application will be restricted only to veterinary therapeutic practice [2]. The request for the withdrawal of the authorization was based on scientific evidence that the systematic administration of these compounds at sub-therapeutic doses may leave residues in edible tissues or in food animal origin, such as milk, egg, and meat [3,4]. The presence of antibiotic residues in foodstuff may cause different diseases or disorders in consumers [5,6]. Highly vulnerable group at risk are infants, and there is not legislation applicable for macrolide antibiotics in baby food so far [7]. These residues can also cause problems in the milk industry, due to modify or inhibit the fermentation processes performed in dairy products such as cheese and yoghurt [8,9]. Therefore, to protect consumer health and to ensure high quality of produced milk, the European Union and the Swiss regulation authorities have established maximum residues limits (MRLs) for these drugs residues in milk [10,11]. Specifically, the limit for spiramycin in milk is $200 \mu\text{g kg}^{-1}$.

To ensure the safety of milk, reliable analytical methods need to be developed that are capable of measuring residues of macrolides at these levels. Since 1970s, macrolides have been commonly analyzed by bioassays. Several commercially available test have been developed for the swift detection of antibiotics residues in milk [12,13], but these tests using microorganisms are not sensitive enough to detect many of these antibiotics employed to treat livestock; e.g., spiramycin, lincomycin [14], erythromycin and streptomycin [15]. Other problems often occur when these methods are used to detect the presence of antibiotics in milk, such as lack the selectivity with ambiguous substance identification, false negative or positive results, and approximate quantitative results when it is possible to quantify. Furthermore, one test kit is required for each family of antibiotics and kits are only available for most common antibiotics used. Nowadays, in case of positive results with use of rapid test kits, more accurate chromatographic methods are usually required by government regulatory agencies to confirm the identity and quantity of antibiotic. Analytical methods such as liquid

chromatography coupled to diode-array (LC/DAD) [16-18], ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) [19-21], liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [22-24] or liquid chromatography with fluorescence detection (LC/UV) [25] have been used for the determination of spiramycin in milk samples.

On the other hand, milk is an aqueous sample that contains proteins and fat, components that may hinder development of the analysis. Due to the complexity of milk, previous sample preparation method is very often required. Some developed methods concerning the sample preparation for determination of spiramycin in milk samples using a combination of liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) as extraction and purification techniques, respectively [19,26], and matrix – assisted solid-phase dispersion (MSPD) [22,27] have been published. SPE has gradually replaced LLE and MSPD in recent years due to the difficulties in automating of LLE, or MSPD that has not found widespread application for routine residue surveillance. SPE has also a low-cost and is easily automated to pretreat food samples and it can be coupled to both liquid and gas chromatography. The main drawback of these sample preparation techniques is the lack of selectivity of the sorbents. These are being replaced more and more by polymeric sorbents as molecular imprinted polymers (MIPs). In contrast to classical SPE sorbents, MIPs exhibit high affinity and selectivity towards a target compound or class of structurally related compounds. These materials have demonstrated binding to trace levels of target analytes, and display high selectivity in presence of other compounds that have similar physico-chemical properties, as well as are extremely stable [28-29]. The objective of this work was to achieve the synthesis of a SPI-specific MIP with methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, for the determination of SPI in sheep milk samples. For that purpose, a series of molecularly imprinted polymers were synthesized by noncovalent bulk polymerization using different polymerization conditions. MIPs obtained were then evaluated by binding studies to screen out the appropriate MIP for its application as solid phase extraction sorbent. In order to demonstrate the clean-up and preconcentration capability of the MIP selected, it was applied to the analysis of spiramycin in sheep milk samples by HPLC-with photo diode array detector. The cross-reactivity for others macrolide antibiotics were tested.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Spiramycin (SPI), tylosin hemitartrate (TYL), erythromycin (ERY), josamycin (JOS) and ivermectin (IVER) were purchased by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and methacrylic acid (MAA) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), 2-2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium phosphate monobasic, sodium hydroxide and n-hexane (purity > 99%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents used were of analytical grade. Ultra-pure water (18.2 M Ω cm quality) was obtained from a Milli Q water system (Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

The stock standards solutions (500 mg L⁻¹) of all compounds were prepared by dissolving the adequate amount of substances in methanol of HPLC-grade from Scharlab (Barcelona, Spain) and stored at 4 °C. Standard solutions of each macrolide antibiotic (50 mg L⁻¹) were prepared by diluting the stock solution with acetonitrile (ACN) of HPLC-grade from Scharlab and also stored at 4 °C. Working standard solutions at adequate concentration were daily prepared by appropriate dilution of the mentioned solution with the dilution mixture NaH₂PO₄ 25 mM at pH 7/ acetonitrile (70:30).

2.2. Apparatus and material

A Digiterm 3000542 thermostat-controlled waterbath (Selecta, Barcelona, Spain) was used to provide constant polymerisation temperature. An ultraviolet lamp (Vilber Lourmat CN-6T) was employed for UV-initiated photopolymerization. pH readings were made with a Metrohm 654 pH meter. Imprinted and non-imprinted polymers were ground in a glass mortar (Aldrich, Madrid, Spain) and then passed through CISA standard sieves (200-355 μ m) (Afora, Madrid, Spain). Template extraction was performed using a Soxhlet extractor system with cellulose extraction thimbles. SPE was carried out using a 20-Port Vacuum SPE manifold System (Supelco, Spain) with vacuum control-press pump (Selecta, Spain). Empty SPE cartridges (Supelco, Spain) of 3 mL of capacity with polyethylene frits (20 μ m) were used to pack the solid phase.

2.3. *Chromatographic analysis*

HPLC analyses were performed using an Agilent Technologies chromatograph model 1200 series equipped with an Agilent 1290 quaternary pump, auto sampler, and photodiode array detector (Agilent Technologies, Germany). Data acquisition was performed with LC-DAD Chemstation Software (Agilent technologies). The analytical column was a ProntoSIL Hypersorb ODS (5.0 μm , 250 \times 4.6 mm) from Scharlab Company (Barcelona, Spain). The column thermostat was set at 60°C. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-phosphate buffer. Chromatographic analyses were provided by applying an elution gradient using phosphate buffer solution (25 mM, pH 7) as component A (was made by dissolving 5 g of NaH_2PO_4 in 500 mL of Milli-Q water, and sodium hydroxide was used to adjust the pH at 7) and acetonitrile as component B. The gradient started with 50% B for 3 min at 1 mL min^{-1} and then increased to 58% within 4 min. This composition was stable for 8 min at 1.2 mL min^{-1} , then increased to 70% of eluent B within 1 min. With the following equilibration time of 20 min at 1.5 mL min^{-1} , the resulting total run was 30 min. The injection volume was 20 μL . The detection wavelengths were 231 nm (SPI, JOS), 210 nm (ERY), 254 nm (IVER) and at 287 nm (TYL). Quantification was performed using peak area measurements and external calibration.

2.4. *Preparation of SPI-imprinted polymers*

To prepare the SPI-MIPs, the template molecule (2×10^{-2} mmol) and the functional monomer MAA (2 mmol) were dissolved in acetonitrile as polymerization media (7 mL) into a 25-mL glass tube. The mixture was sonicated at room temperature for 5 min. Subsequently, the cross-linker EGDMA (10 mmol) and the radical initiator AIBN (5.1 mmol) were added, following sonication for 10 min. The solution was degassed with a stream of oxygen-free nitrogen for 7 min, and then the glass tube with the mixture was placed in a thermostat-controlled waterbath at 65 °C for 4 h (MIP1), or under UV light at 235 nm at 5°C for 6 h (MIP2) to carry out the polymerization processes. The resulting bulk polymers were crushed in a glass mortar and wet-sieved by methanol to obtain particles with sizes between 200 and 355 μm . Finally, the template and non-polymerized compounds were extracted in a Soxhlet apparatus with methanol (80 mL) for 20 h, until no SPI could be detected by HPLC-DAD. The non-imprinted polymers

(NIPs) as control polymers were also prepared and treated using an identical procedure without adding SPI.

2.5. Morphological characterization of the SPI-imprinted polymer

The textural characterization of polymers was made using a Micromeritics ASAP 2010 equipment (Norcross, USA). A N₂ adsorption/desorption experiment by nitrogen porosimetry was used for the determination of the specific area (S), the specific pore volume (V_p) and the average pore diameter (D_p) of the polymers. 1g of dry polymer was degassed at 70°C under nitrogen flow for 4 h prior to measurement to remove the absorbed gases and moisture. Nitrogen adsorption/desorption data were then recorded at liquid-nitrogen temperature of 77 K. Specific surface area was calculated from the nitrogen adsorption data using the Brunauer-Emmett-teller (BET) equation [30]. The external surface area (S_{ext}) and the micropore volume (V₁) were calculated by the t-plot method [31], and the pore size distributions and total pore volume of the MIP (V_p) by the Functional Theory of Densities model (DFT) [32].

2.6. Batch binding analysis

To select the optimum synthesized polymer, preliminary studies of the rebinding capability of MIPs and NIPs were evaluated by batch binding experiments. For this study, 43 mg of each SPI-MIP or NIP was added to 4 mL of SPI solution at 100 mg L⁻¹ in ACN, and the mixture was incubated over night at room temperature. The resultant mixture was centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant containing the non-binding SPI was analyzed by HPLC-DAD at 231 nm. The concentration of SPI in solution was determined by reference to calibration curve previously plotted. The amount of bound SPI was calculated from the difference between the concentration added initially and the SPI content of the supernatant. Binding ability of MIPs was determined by the partition coefficient $k = C_p / C_s$ [33], and it was calculated as the ratio between the amount of SPI binding to the MIP (C_p) and the concentration of SPI in the solution (C_s). The imprinting factor (α), representing the degree of imprinting achieved, was calculated as the ratio of MIP-bound SPI to NIP-bound SPI.

To evaluate the adsorptive properties of the optimum polymer selected, the adsorption isotherms were carried out. 20 mg of MIP or NIP were mixed with 2.5 mL of SPI

solutions in ACN at concentrations ranging from 0 to 50 mg L⁻¹ and incubated at 20°C for 24 h. The resultant mixtures were centrifuged at 1200 rpm for 7 min and an aliquot of supernatants was used to analyze the amount of SPI not bound to polymers. From the difference in concentration of SPI solution before and after incubation, the amount of SPI bound by the polymers was evaluated. All the solutions were subjected to HPLC-DAD analysis.

2.7. MISPE conditions

Appropriate amounts of the dry polymer particles of MIPs or NIPs (200 mg) were packed into the SPE cartridges of 3 mL with two polyethylene frits (length of 65 mm and i.d. 10 mm) between the polymer particles. The prepared columns were conditioned with 6 mL of MeOH (3×2 mL) and 6 mL of ACN (3×2 mL) to remove any possible contaminant. Then, 1 mL of SPI solution in ACN at adequate concentration was loaded onto the SPE column with a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. The non-specific bound analyte was washed in a single washing step using 6 mL (3×2 mL) of ACN. The analyte was desorbed with 3×2 mL MeOH: acetic acid (0.5%, v/v) solution. The obtained fractions were evaporated to dryness under a gentle flow of nitrogen at 40 °C and redissolved in 1 mL of mixture NaH₂PO₄ 25 mM (pH 7)/acetonitrile (70:30). Quantification of SPI from the obtained reconstituted samples was carried out by HPLC using the method described above. Finally, the polymer was regenerated by passing 3×2 mL of MeOH and 3×2 mL of ACN for the next assay.

2.8. Milk sample preparation

Sheep milk samples were collected from different sheep in the same stage of lactation by 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. To validate the MISPE-HPLC developed method, sheep milk samples were spiked with SPI. The procedure used for pretreatment of spiked milk samples is detailed below. Milk samples were allowed to thaw at room temperature and homogenized by heating (35 °C for 5 min). A volume of 1 mL of homogenized milk was spiked with the desired amount of SPI into a 10 mL conical flask and mixed by manual shaking. To allow the equilibration of the analyte with the milk matrix, the spiked

sample was maintained at room temperature for 20 min. The spiked milk was pretreated using 4 mL of NaH_2PO_4 :ACN (3:2, pH 7) and 1 mL of ACN simultaneously to precipitate the proteins. Subsequently, the mixed solution was centrifuged (1200 rpm for 15 min) and the obtained supernatant solution was filtered with a fold filter. Finally, 1 mL of the deproteinized milk samples were passed through the MISPE (or NISPE) column, and then was washed and eluted following the extraction procedure described above. Finally, the elution fractions were collected for subsequent HPLC analysis.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis of SPI-MIPs

Two molecular imprinted polymers for SPI (MIP1 and MIP2) were prepared according to non-covalent bulk polymerisation method. This non-covalent approach is the most common one used in SPE among the numerous possibilities: i.e. covalent, semi-covalent, metal-binding, metal-mediated [34]. Rational selection of the functional monomer and the proper molecular ratios of the polymerization reagents can be produce better extraction performance, because this will determine the stability of the formed complex before and during the polymerization process and the subsequent ability of the MIP to interact selectively with the target molecule [35]. In this work, MIPs were synthesized using MAA as functional monomer due to the carboxyl group of the acid functionality could form hydrogen bonds with the hydroxyl and ionic bond with the basic groups of the template. SPI has three hydroxyl groups, an amine group, and a tertiary amine on one of the sugar units, which can form a hydrogen bond and an ionic bond with the corresponding functionalities, respectively.

During the polymerization process, cross-linker fulfils some major functions: was employed to provide mechanical stability to the polymeric matrix, control the morphology of the polymer and stabilize the molecular recognition sites. EDGMA was chosen in this work due to it is the most widely used cross-linker. An excess of functional monomer versus the template was indispensable, since it improves the stability of the pre-polymerisation complex by shifting the association-dissociation equilibrium towards complex formation. Then, the molar ratio of template/monomer/cross-linker was fixed to 1:100:500.

In the synthesis of MIPs, the porogen plays an important role in formation of the porous structure of the polymer. Moreover, the selection of porogen is one of the determining factors in the effective molecular recognition of the template because the accuracy of the assembly between the template and the monomer is related to the physical and chemical characteristics of the solvent. Accordingly, acetonitrile was selected as the porogen solvent because this organic media ensures good solubility of the template and contributes to the formation of polar interactions such as hydrogen bond and electrostatics interactions between template and functional monomer.

The imprinted polymers MIP1 and MIP2 were synthesized according to the bulk polymerisation strategy due to its simplicity, and because the non-regular shape of the particles obtained are not a real limitation for off-line SPE application. Both MIPs were synthesized using the same composition by two different polymerisation procedures: thermally initiated polymerisation in a thermostatic-controlled waterbath at 60 °C for 4 h (MIP1) and UV-initiated photopolymerisation at 235 nm for 6 h (MIP2). The bulk polymer monoliths were then crushed, ground and wet-sieved using methanol to obtain particles mainly in the 200-355 µm size range. The template was removed by Soxhlet extraction with 80 mL of methanol for 20 h. Non-imprinted polymers (NIPs), were in both cases prepared in the same way but without SPI, as control polymers.

3.2. Recognition efficiency of MIPs

The molecular recognition of MIPs depends two factors mainly, three-dimensional spatial configuration of molecule template and matching degree of the bonding sites. In this study, two MIPs were synthesized at the same ratio of template to monomer and using ACN as porogen, but different polymerization conditions were assayed that could affect the imprinting result and so the specificity recognition.

To determine the recognition capacity of MIPs, specific binding, partition coefficient and imprinting factor were studied and calculated by batch binding assays (Table 1). Specific binding is refers to the amount of SPI bound to the MIPs and NIPs, calculated as the percentage of rebinding to the MIP minus the percentage for the NIP. The specific binding for MIP1 (53.1%) was higher than for MIP2 (37.7%). The low amounts of analyte bound by the NIPs in both cases (< 25%) indicated that the presence of template during the imprinting process imparts recognition capacity. The partition coefficient values were higher for MIPs than for NIPs and the highest value was

achieved when MIP 1 was assayed. The difference between MIPs and NIPs indicates that the imprinting procedure has created highly specific cavities designed for the antibiotic SPI in the MIP. The imprinting factor (α) was higher for MIP1 than for MIP2, indicating a major degree of imprinting in MIP1. According to these obtained results, MIP1 was selected as optimum sorbent to be applied in solid phase extraction procedure for SPI determination. The obtained results showed that the polymerization conditions are a key factor for recognition characteristics of MIP.

3.3. Adsorption isotherm study

The adsorption capacity is an important factor that reflected the efficiency and affinity of the polymers towards the analyte. Equilibrium binding experiments were carried out to obtain polymer adsorption isotherms and to investigate the adsorption behavior of MIP1 and NIP1. The adsorption isotherm model Langmuir equation was used to fit the data. Langmuir isotherm model describes monolayer adsorption based on the assumption that all the adsorption sites have equal template affinity and that adsorption at one site does not affect adsorption at an adjacent site. The adsorption isotherms showed in Fig.1A describes the saturation adsorption of MIP1 and NIP1 bound with different concentrations of SPI solution. The adsorption of MIP1 was not linear with respect to the increase of the initial SPI concentration. At each SPI concentration tested, MIP1 could bind much more SPI than the NIP1, and the binding amount increased with the increase of the initial SPI concentration, ultimately reaching a stable plateau.

To estimate the binding parameters of MIP1, the binding data in Fig. 1A were plotted according to the following Eq. (1) [36-38]:

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max1}}{K_{d1} + F} + \frac{B_{max2}}{K_{d2} + F} \quad (1)$$

where B is the amount of SPI bound to MIP at equilibrium, F is the free SPI concentration, B_{max1} and B_{max2} are the maximum numbers of the higher and lower-affinity binding sites, and K_{d1} and K_{d2} are two equilibrium dissociation constants related to the affinity of the adsorption sites.

The data of the MIP binding characteristic was used for the Scatchard analysis by the Eq. (2):

$$\frac{B}{F} = \frac{(B_{max} - B)}{K_d} \quad (2)$$

where K_d and B are the equilibrium dissociation constant and the apparent maximum number of binding sites, respectively. F is the free concentration of SPI in binding solution. The Scatchard plot obtained by the method is presented in Fig.1B and it allowed to estimate the binding nature of MIP1. As it is shown, the Scatchard was not linear and composed of two straight lines, which suggested that the binding sites of MIP1 for SPI were heterogeneous and rather two kinds of binding sites existed in the polymer.

Apparently, highly selectivity of binding sites for SPI can be explained as result from the carboxyl group of the acid functionality of the monomer which cooperatively bound with the hydroxyl and amine groups of the SPI. In our system, the coefficients of Eq. (1) were calculated: for high affinity binding sites, $K_{d1} = 0.08706 \text{ mg L}^{-1}$ and $B_{max1} = 1.27 \text{ mg g}^{-1}$; and for low affinity binding sites, $K_{d2} = 0.08705 \text{ mg L}^{-1}$ and $B_{max2} = 3.56 \text{ mg g}^{-1}$. It is suggested that the dual-site Langmuir binding model might describe the SPI rebinding on molecularly imprinted polymer surface.

3.4. Morphological characterization of the SPI-imprinted polymer

In order to characterize the structure and porous nature of MIP1 the BET analysis was carried out. The textural characterisation of the SPI-MIP was accomplished by nitrogen gas adsorption at 77 K [30–32]. The specific surface area (BET) was $296 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. The total volume of pores was found to be $0.429 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$; which a micropores volume of $0.043 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, and a mesopores volume of $0.306 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. The average pore size (DFT) of MIP1 was 5.8 nm.

3.5. Optimization of MISPE procedure

After the evaluation of the binding capacity of the synthesized MIPs, the applicability of MIP1 as solid sorbent in the SPE procedure (MISPE) was studied. MISPE is based on

conventional solid-phase extraction procedure, therefore, typical loading, washing and elution steps are carried out as a matter of routine. In this study, a series of experiments was performed to optimize the experimental conditions affecting the SPI recognition by MIP1 in a MISPE procedure including composition and amount of washing and eluting solvents. An amount of 200 mg of MIP1 was sufficient for being used as sorbent to develop an off-line MISPE for SPI due to the high affinity of this polymer. Firstly, the prepared MISPE column was conditioned with 6 mL of MeOH (3x2 mL) and 6 mL of ACN (3x2 mL). To achieve a selective extraction, a clean-up step with a suitable solvent was used prior to the analyte elution from the column. This washing solvent is one of the crucial factors in MISPE procedure to maximize the specific interactions between the analyte and binding sites, and –simultaneously destroy non-specific interactions to discard matrix components from the cartridge. In this study, different washing solutions such as H₂O, ACN and H₂O/ACN mixtures at different proportions (50-95% ACN) were investigated. Volumes up to 6 mL were assessed. As presented in Fig. 2, when the washing solution was H₂O more than 70% of the loaded SPI was recovered in the fractions collected from washing steps. However, the amount of analyte washing from the cartridge was less than 10% when ACN was used. Therefore, 6 mL of ACN was selected as optimum washing solvent.

The elution solvent plays an important role in MISPE procedure since the target analyte should be efficiently desorbed from the cartridge. Usually, for the recovery of strongly bounded analyte, a small amount (1-10%) of modifier, such as water or weak acids is added to help the breaking of the hydrogen-bonding. The effect of elution solvents and volume on extraction efficiency of SPI were tested for different types of solvents including NaH₂PO₄:ACN (70:30, v/v) at pH 7, MeOH and MeOH containing acetic acid at different percentages (0.25, 0.5 and 1% acetic acid). The studies were developed with 1 mL of SPI standard solution at 50 mg L⁻¹ in ACN. Results showed that the presence of acetic acid in solvent elution provided higher recoveries with respect to the use of 100% MeOH (Figure 3). The use of MeOH:acetic acid (99.5:0.5, v/v) offered the best elution efficiency (95 %). Recovery did not improve when MeOH:acetic acid (99:1, v/v) was used. Due to SPI is stable at pH between 4-5, percentages of acetic acid higher than 1% were not tested. Different volumes of elution solvent ranged from 4 to 7 mL were assayed in order to optimize the elution volume. Volumes higher than 6 mL of MeOH:acetic acid (99:1, v/v) hardly had any benefit to the recoveries of SPI. Consequently, SPI was quantitatively eluted from the sorbent with 6 mL (3x2) of MeOH containing 0.5% acetic acid. The polarity of this elution solvent was enough to disrupt the interaction ionic and hydrogen bonds established between analyte and polymer.

3.6. Application in real milk samples

To evaluate the performance of the proposed MISPE-HPLC method for the sample clean up and determination of SPI, real sheep milk samples were analysed under the optimal conditions. Milk samples are complicated matrix, over 100.000 different molecular species have been identified in it. Although milk contains approximately 90% water, it can be described as an *oil-in-water* emulsion with the fat globules dispersed in the continuous serum phase, or as a *colloid suspension* of casein micelles, or as a *solution* of lactose, soluble proteins, minerals, vitamins and other components [39]. Moreover, milk composition can be affected by many factors, e.g. breed variations, herd-to-herd variations chiefly attributed to feed considerations, seasonal and geographic aspects. Due to its complexity, pretreatment of milk matrix is usually needed before analysis. In this work, previously the MISPE procedure, the samples were pretreated according to the procedure mentioned in *Section 2.8* for proteins removal. Otherwise, the impurities, such as saturated fat or protein would block the column and decrease the recovery [40]. After the proteins precipitation step, milk sample was analysed by the above described MISPE procedure. Then, 1mL of deproteinized milk sample was loaded onto SPE cartridge previously conditioning at a rate of 0.2 mL min⁻¹.

The removal of fat content in milk, that could produce interferences in the determination of SPI, was also required. Triglycerides account for around 98% of milk fat. Other classes of lipids include phospholipids (<1%), which are mainly associated with the fat globule membrane, and cholesterol (<5%), which is mostly located in the fat globule core. Based on a previous works [27], fat removing step was optimized. For this study, two solvents were tested (n-hexane and NaOH at different concentration between 0-2 M) by passing a volume of 6 mL through the SPE column after the sample was loading. As can be seen in Fig. 4, recoveries of SPI higher than 90% were obtained when n-hexane was used. However, when NaOH 0.5 M was assayed at all concentrations tested, the complete removal of fat was not allowed. Different volumes of n-hexane were tested and the obtained results showed that the use of more than 6 mL did not improve considerably SPI recovery. Therefore, 6 mL (6×1 mL) of n-hexane was chosen as optimum solvent conditions for this purpose. It is remarkable that the use of n-hexane was enough to wash off the content of fat and interferences in milk samples in the same step, avoiding washing step with ACN. This is leading to significant time

saving and simplify the procedure. In all cases, elution was carried out with 3×2 mL of MeOH containing 0.5% of acetic acid. Fractions collected were taken to dryness and reconstituted in a volume of 1 mL in NaH₂PO₄ 25 mM/ACN (70:30) mixture at pH 7. Finally, SPI was detected by HPLC-DAD.

3.7. Validation method

The developed method was validated for linearity, recovery, accuracy, precision (inter- and intra-assay), and detection limit under the optimum conditions for sheep milk matrix. Calibration curve was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area versus SPI concentration, preparing spiked milk samples in triplicate in the concentration range of 24-965 µg kg⁻¹. Good linearity ($R^2= 0.9998$) was established throughout the studied concentration range for SPI. The limit of quantification (LOQ), estimated as the lowest concentrations with RSD below 5%, was 24.1 µg kg⁻¹. The accuracy was assessed by calculating the recovery obtained for SPI in MISPE procedure of 1 mL of spiked milk samples at three concentrations levels: low level (48.3 µg kg⁻¹), medium level (482.6 µg kg⁻¹) and high level (965.2 µg kg⁻¹). Residues were analysed by HPLC-DAD in triplicate. The obtained results are shown in Table 2. Recoveries were higher than 90% with RSDs lower than 5%. The repeatability of MISPE method was assessed by injection a solution of SPI (three times in one day) at two different concentrations (241.3 and 965.2 µg kg⁻¹). Precision was tested in terms of reproducibility and repeatability at two concentration levels (241.3 µg kg⁻¹, 965.2 µg kg⁻¹). The repeatability (day-to-day variability) between three different days was checked and recoveries ranged from 97.9 to 99.4% with RSDs less than 3% were obtained. Reproducibility (day-to-day variability) values ranged from 86.4-88.3% with RSD lower than 9% (Table 2).

3.8. Selectivity

Once the MISPE procedure for SPI was optimized, cross-reactivity studies were carried out in order to evaluate the selectivity of the MIP used as a solid-phase extraction sorbent. MIPs are not intrinsically selective. Their selectivity results from the combination of a polymerization procedure that gives rise to specific cavities for the target analytes together with the association of an extraction procedure involving solvents able to develop interactions that should only take place into the cavities. For

this study, other macrolide antibiotics such as JOS, IVER, ERY and TYL were chosen as competitive molecules because of their similar structures. To evaluate the effect of coexisting substances on the recovery of SPI by the MIP, macrolides mixture solution at a spiramycin:interferent ratio of 2.5:25 mg L⁻¹ (low level), 5:50 mgL⁻¹ (medium level) and 10:100 mg L⁻¹ (high level) were tested. Fig. 5 showed the chromatograms obtained at different wavelengths for macrolides extraction by MISPE procedure. Recoveries for macrolide antibiotics under study were calculated as the difference between the total amount of each compound load into the cartridge and the fractions collected from elution step. Table 3 summarizes the obtained results. Recoveries for SPI were higher than 90%, while recoveries for the rest of antibiotics tested were less than 30%. The results revealed a significantly higher selectivity of the MIP1 for SPI in comparison with other structurally related macrolide antibiotics.

4. Conclusions

In this work, two series of SPI imprinted polymers were synthesized by bulk polymerization and evaluated in batch adsorption experiments. Binding analysis allowed selected and characterized the optimum MIP, which was employed as a solid-phase extraction sorbent to extract SPI from spiked sheep milk samples. The optimized extraction method provided satisfactory recoveries and RSD values, and LOD lower than levels established by current legislation. An unique washing step was necessary in MISPE procedure to remove the fat content of the milk samples and to reduce the non-specific interactions of SPI with MIP, keeping the analyte specifically retained on the MIP. This makes it easier the milk treatment and supposes a very important saving in solvents and the analysis time. The optimized MISPE indicated that the MIP can recognize SPI without cross-reactivity to other macrolides studied. So, it has been demonstrated that methacrylic based SPI-MIP obtained has a great potential for utilization as specific SPE sorbent for SPI clean-up and preconcentration in complex mixtures such as sheep milk, offering an rapid, sensitive and cost-effective alternative tool to the existing sorbents for analyzing SPI in milk samples.

Acknowledgements

This research work was supported by Comunidad Autónoma of Madrid (Spain) and European funding from FEDER program (project S2013/ABI-3028, AVANSECAL). The

authors thank the Regional Centre of Animal Selection and Reproduction (CERSYRA) for supplying sheep milk samples.

References

- [1] EEC Directive, 70/524, 1970, No. 524.
- [2] EEC Regulation 2821/98, 1998, No. 2821.
- [3] H.H Chung, J.B. Lee, Y.H. Chung, K.G. Lee, *Food Chem.* 113 (2009) 297.
- [4] J. Adrian, D.G. Pinacho, B. granier, J.M. Diserens, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1703.
- [5] P. Demoly, A. M. Romano, *Current Allergy & Asthma. Report* 1 (2005) 9.
- [6] M.S. Wilke, L. Andrew, A.L. Lovering, N.C. Strynedka *Current Opin. Microbiol.* 8 (2005) 525.
- [7] E. Rodríguez, F. Navarro Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *J. Chromatography A* 1217 (2010) 605.
- [8] M.I. Berruga, M.P. Molina, B. Noves, M. Roman, A. Molina, *Milchwissenschaft*, 62 (2009) 303.
- [9] W. Packham, M.C. Broome, G.K.Y. Limsowtin, H. Roginski, *Australian journal of Dairy Technology*, 56 (2001) 15.
- [10] Council regulation (ECC) No.2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the stablismnt of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuff of animal origin. *Official Journal*, L 224 (1990) 1.
- [11] Swiss regulation RS817.021.23, Ordonnance sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires. www.admin.ch/ch/f/rs/c817_021_23.html.
- [12] IDF-FILL, Bull No. 442 (2010). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- [13] O. Nagel, M.P. Molina, R. Althaus, *Internat. Dairy Journ.* 32 (2013) 150.
- [14] B. Linage, C. Gonzalo, J. Carriedo, J. Asensio, M. Blanco, I. De la Fuente, *Journ. Dairy Science*, 90 (2007) 5374.
- [15] R. Althaus, M. Berruga, A. Montero, M, Roca, M, Molina, *Analytica Chimica Acta*, 632 (2009) 156.
- [16] M. Horie, Y. Kido, M. Muyarama, M. Toyoda, H. Nakazawa. *Shokuhim, Eiseigaku Zasshi.* 40 (1999) 401.
- [17] M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, I. Delahaut. *Journal. of Chromatogr. B* 753 (2001) 189.

- [18] M.A. García, R.M. Garcinuño, P. Fernández, J.S. Durand, *Journal. of Chromatogr. A* 1122 (2006) 76.
- [19] J. Wang, D. Leung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3213.
- [20] R. Romer, M.M. Aguilera, P. Plaza, A. Garrido. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 9353.
- [21] D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edder. *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 2363.
- [22] S. Bogialli, A. Di Corzia, A. Lagana, V. Mastrantoni, M. Sergi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 237.
- [23] C. Juan, J.C. Moltó, J. Mañes, G. Font. *Food Control* 21 (2010) 1703.
- [24] D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowick. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8217.
- [25] D. Gomis, A.I. Ferreras, M.D. Álvarez, E. García, *Food Chem. Toxicol.* 69 (2004) 415.
- [26] S.B. Turnipseed, W.C. Andersen, C.M. Karbiwnyk, M.R. Madson, K.M. Miller, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1467.
- [27] M.A. García, A. Gallego, R.M. Garcinuño, P. Fernández, J.S. Durand. *Food Chemistry*, 134 (2012) 553.
- [28] I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Hedin-Dalström, P. Jokela, J. G. Karlsson, L. Olofsson, J. Rosengren; S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 9.
- [29] A. Cameron, S.A. Hakan, I.A. Lars, J.A. Richard, K. Nichole, A.N. Ian, O.M. Jonh, J. W. Michael, *J. mol. Recognit.* 19 (2006) 106.
- [30] S. Bruneauer, P.H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1983) 309.
- [31] G. Horvath, K. Kawazoe, *J. Chem. Eng. Jpn.* 16 (1983) 470.
- [32] J.P. Oliver, *J. Porous Mater.* 2 (1995) 9.
- [33] W. Cai, R.B. Gupta. *Sep. Purif. Technol.* 35 (2004) 215-221.
- [34] M.J. Syu, Y.M. Nian, Y.S. Chang, X.Z. Lin, S.C. Shiesh, T.C. Chou, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 54.
- [35] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Comarck, R.M. Marcé K. *TRAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1363.
- [36] H. A. Feldman. *Anal. Biochem* 48 (1972) 317.
- [37] J. G. Nörby, P. Ottolenghi, J. Jensen. *Anal. Biochem* 102 (1980) 318.
- [38] J. Zhou, X. He, Y. Li. *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 81.
- [39] V. F. Samanidou, E. G. Karageorgou. *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2013.

[40] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull. J. Sep. Sci 29 (2006) 1230.

Figures

Fig.1 - (A) The saturation adsorption of SPI onto the MIP1 and NIP1 at different concentrations of SPI solution (temperature: 20°C, sorbent weight: 20 mg, SPI solution volume: 2.5 mL, SPI concentration range: 0-50 mg L⁻¹, contact time: 24 h). (B) Scatchard analysis to estimate the binding nature of SPI to the MIP1.

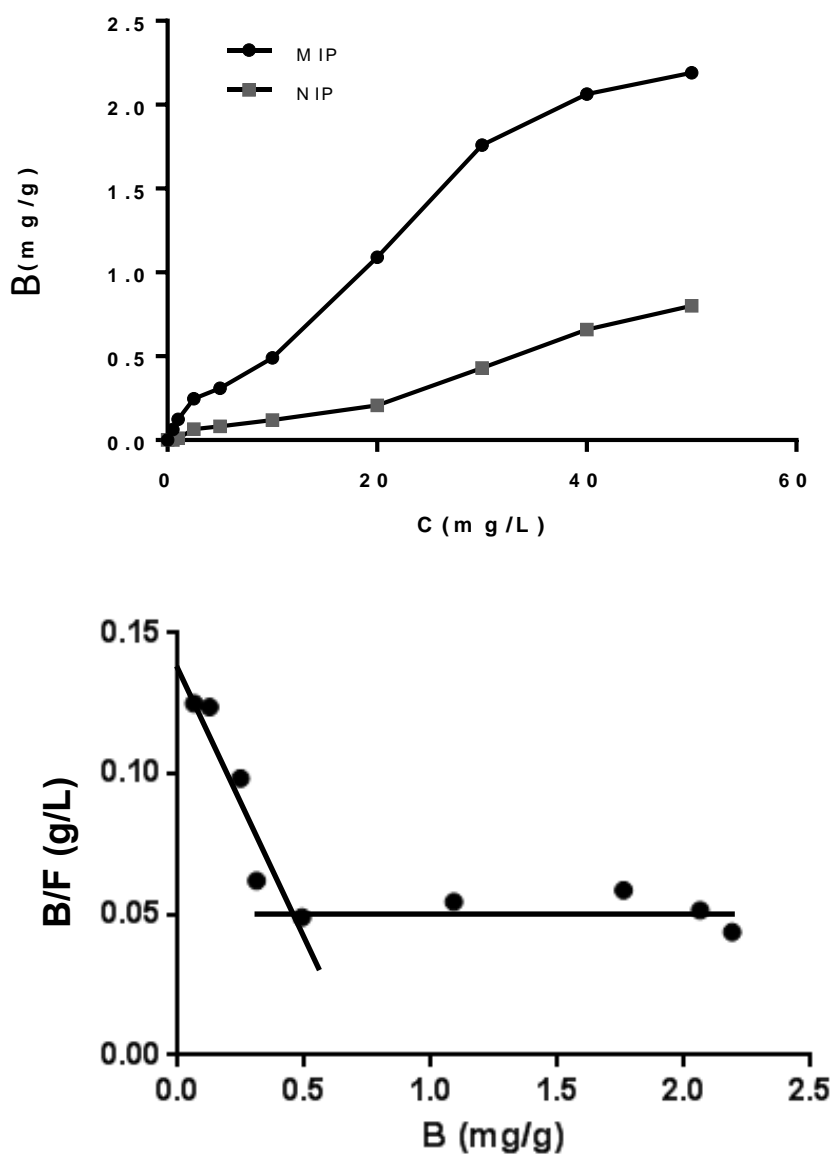


Fig. 2 - Recoveries of SPI in MISPE column after washing when 1 mL of 50 mg L⁻¹ of SPI standard solution was loaded onto the cartridge.

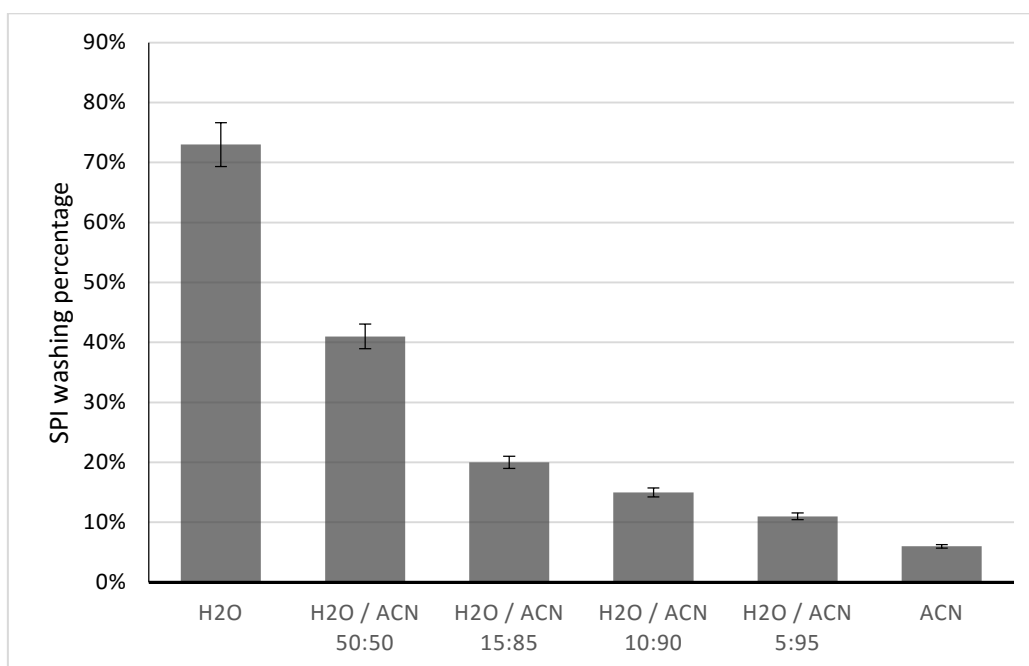


Fig. 3 - Recoveries of SPI after eluting with different solutions: NaH₂PO₄:ACN (70:30, v/v), MeOH and MeOH at 0.25, 0.5, 1% in acetic acid. Elution solvent volumes tested (4, 5, 6, 7 mL).

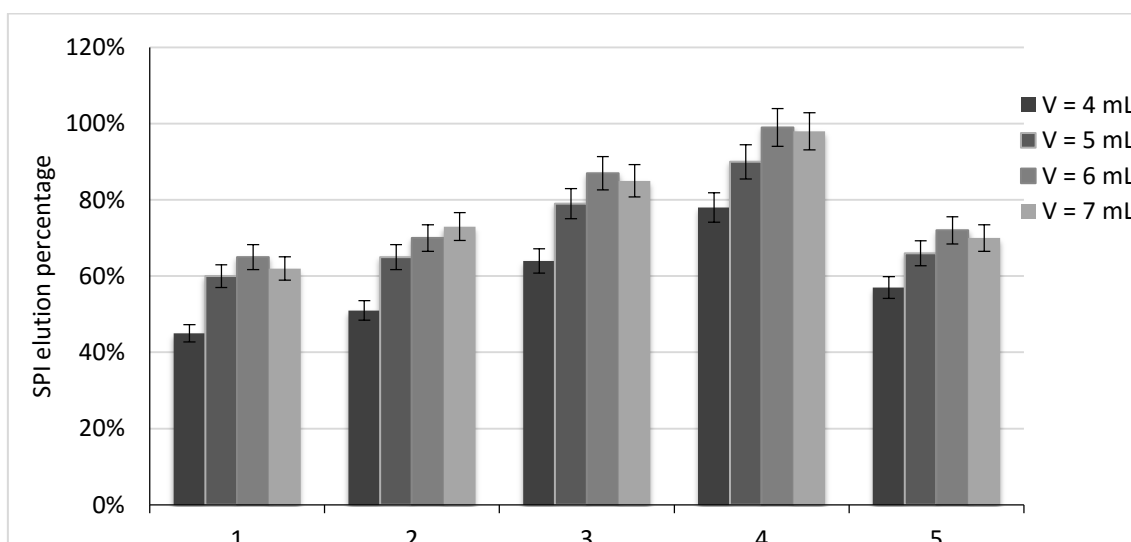


Fig. 4 - Effect of the defatting solvents and volume of extraction efficiency on SPI recoveries.

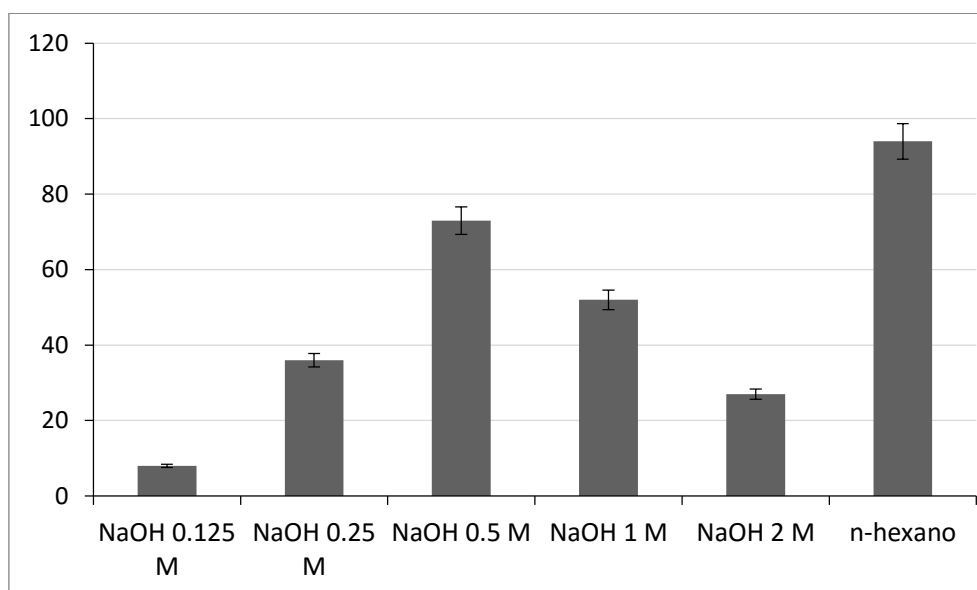
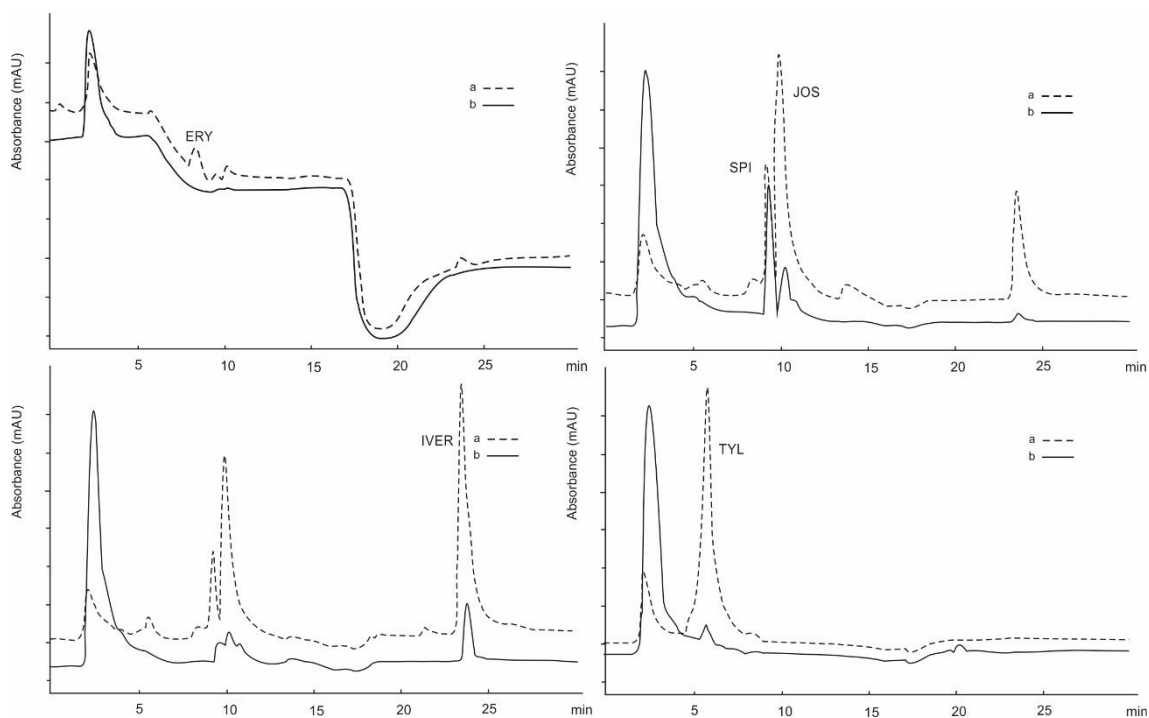


Fig. 5 - Comparison of chromatograms obtained for antibiotic macrolides studied: (a) standard mixture solution in ACN (b) spiked sheep milk sample with MISPE treatment. Concentrations: 5 mg L⁻¹ (SPI, JOS, IVER, TYL), 50 mg L⁻¹ (ERY). Detection wavelengths: SPI, JOS (231nm); ERY (210 nm); IVER (254 mn); TYL (287 nm).



Tables

Table 1. Specific binding, partition coefficients and imprinting factors for MIPs and NIPs in ACN. Adsorption conditions: temperature= 20°C; sorbent weight= 43 mg; sample volume= 4 mL; SPI concentration = 100 mg L⁻¹.

Absorbent	% Specific binding			Partition coefficient (k)		Imprinting factor (α)
	MIP	NIP	Specific	MIP	NIP	
Polymer 1	75.3	22.2	53.1	3.04	0.29	3.40
Polymer 2	62.2	24.5	37.7	1.65	0.32	2.54

Table 2. Analytical characteristics of the optimized MISPE-HPLC method for SPI determination. Based on triplicated analysis.

% Recovery			Inter-day recovery (%)		Intra-day recovery (%)	
Low level (48.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Medium level (482.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	High level (965.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Spiking level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Spiking level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
			241.3	965.2	241.3	965.2
99.8 \pm 0.2	90.3 \pm 2.4	91.8 \pm 4.3	88.3 \pm 7.6	86.4 \pm 8.8	99.4 \pm 1.1	97.9 \pm 1.6

Table 3. Macrolides recoveries at three concentration levels. High level (JOS, SPI, IVER, TYL at 10 mg L⁻¹ and ERY at 100 mg L⁻¹), medium level (5:50 mg L⁻¹), low level (2.5:25 mg L⁻¹), (n= 3).

Antibiotic	% Recovery Low level	% Recovery Medium level	% Recovery Maximum level
ERY	-	-	-
SPI	99.8 \pm 0.2	90.3 \pm 2.4	91.8 \pm 4.3
JOS	26.9 \pm 2.8	25.0 \pm 5.7	20.5 \pm 6.9
IVER	27.0 \pm 1.1	22.3 \pm 5.3	23.9 \pm 7.4
TYL	21.8 \pm 5.3	16.9 \pm 0.4	18.4 \pm 3.9

FINAL PROGRAM

EUROFOODCHEM XVIII

OCTOBER 13-16, 2015
MADRID, SPAIN

UPCOMING CHALLENGES IN FOOD SCIENCE



www.eurofoodchemxviiimadrid2015.com

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)

European Association for Chemical and Molecular Sciences (EuCheMS)

EuCheMS
European Chemical Sciences
Division of Food Chemistry

75
AÑOS



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ictan

DEVELOPMENT OF A SELECTIVE SOLID-PHASE EXTRACTION METHODOLOGY BASED ON A MOLECULAR IMPRINTED POLYMER FOR THE ANALYSIS OF SPIRAMYCIN IN SHEEP MILK

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

Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, National University of Distance, 28040 Madrid, Spain. E-mail: gpaniagua@pas.uned.es

Spiramycin (SPI) is a 16-member macrolide antibiotic with a wide range of veterinary uses. This macrolide antibiotic was authorized in the past, as feeds additive (5 mg L⁻¹) according to the Directive 70/524/EC [1] in order to modulate gut microbial flora, thus enhancing the growth rates performances in calves, cattle, pigs and poultry. In 1998 health ministers of European Union countries voted to ban the use of antibiotics to promote animal growth, restricting their application only to therapeutic practice [2] basing on scientific evidences that the systematic administration of these compounds at sub-therapeutic doses may leave residues in edible tissues or in food animal origin, such as milk, egg, and meat [3]. The antibiotic residues in foodstuff may cause different diseases or disorders in consumers, and can also cause problems in the milk industry, due to modify or inhibit the fermentation processes performed in dairy products such as cheese and yoghurt. Thus, the determination of these antibiotic residues in milk samples is an interesting and difficult challenge according with European legislation on safety and quality of foods for human consumption.

This work is focused on the development of new analytical tools for SPI extraction using selective molecular receptors. The synthesis of two molecularly imprinted polymers (MIPs) by noncovalent bulk polymerization technique, using a macrolide antibiotic spiramycin (SPI) as template, methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as the cross-linker is described. MIPs were synthesized under different polymerization process, UV-initiated photopolymerization (235 nm at 5°C, 6 h) or thermally initiated polymerization (65 °C, 4 h). The ability of both polymers synthesized was evaluated by binding studies to screen out the appropriate MIP for its application as solid phase extraction sorbent. The clean-up and preconcentration capability of the selected MIP was demonstrated using spiked milk samples. Determination of SPI was done by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV diode-array detection. Under the optimum conditions, good linearity were obtained for SPI in a range of 121-9652 µg kg⁻¹ and the average recoveries at three spiked levels were higher than 90% with relative standard deviation (RSD) less than 5%. Cross-reactivity from other macrolides antibiotics was also tested. Results indicated that the use of a MIP as SPE sorbent for SPI determination is a promising method for selective determination of this antibiotic in sheep milk samples.

Keywords: Spiramycin; Molecularly imprinted polymer; Solid phase extraction; Sheep milk samples

[1] EEC Directive, 70/524, 1970, No. 524.

[2] EEC Regulation 2821/98, 1998, No. 2821.

[3] H.H Chung, J.B. Lee, Y.H. Chung, K.G. Lee, Food Chem. 113 (2009) 297.

Acknowledgements

Authors thank financial support from the Comunidad Autónoma of 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.

INTRODUCTION

Spiramycin (SPI) is a 16-member macrolide antibiotic with a wide range of veterinary uses. In December 1998 European Union countries banned its use to promote animal growth, so that their application will be restricted only to veterinary therapeutic practice. The request for the withdrawal of the authorization was based on scientific evidence that the systematic administration of these compounds at sub-therapeutic doses may leave residues in edible tissues or in food animal origin (milk, egg, and meat). These residues can also cause problems in the milk industry, due to modify or inhibit the fermentation processes performed in dairy products such as cheese and yoghurt. To protect consumer health and to ensure high quality of produced milk, the European Union and the Swiss regulation authorities have established maximum residues limits (MRLs) for SPI in milk is 200 µg kg⁻¹.

Due to the complexity of milk, which contains proteins and fat, very often a previous sample preparation method is required. In that sense, the classical SPE sorbent are being replaced more and more by polymeric sorbents as molecular imprinted polymers (MIPs). These materials have demonstrated binding to trace levels of target analytes, and display high selectivity in presence of other compounds that have similar physic-chemical properties, as well as being extremely stable.

OBJECTIVES

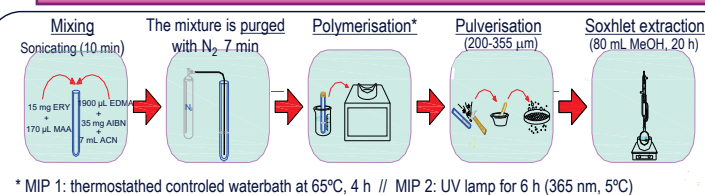
This work is focused on the synthesis of several molecularly imprinted polymers comprising reactionary sites which are complementary of macrolide antibiotic spiramycin by non-covalent bulk polymerisation technique. MIPs were synthesized under different polymerisation process: thermally polymerisation and UV-initiated photopolymerization.

The ability of both polymers synthesized was evaluated, and the optimum loading, washing and elution conditions were established in order to obtain a solid phase extraction sorbent that exhibit good recognition and selectivity towards spiramycin.

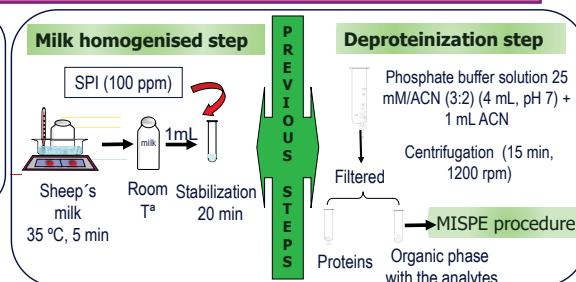
In order to demonstrate the clean-up and preconcentration capability of MIP selected, an off-line molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) method by HPLC-with photo diode array detector for the analysis of spiramycin in sheep's milk samples was established. The cross reactivity for others macrolide antibiotics with similar structures were tested.

EXPERIMENTAL SECTION

SYNTHESIS OF MIP-SPI BY BULK POLYMERISATION

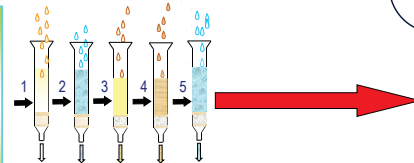


SHEEP'S MILK SAMPLE-PREPARATION PROCEDURE



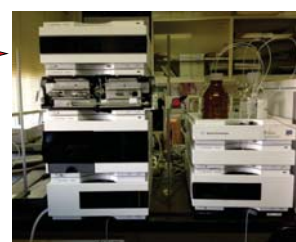
MISPE EXTRACTION PROCEDURE

- SPE-cartridge was packed with 200 mg of SPI MIP
- 1. Conditioning step: MeOH (3 × 2 mL)/ACN (3 × 2 mL)
- 2. Loading step: 1 mL extracted sheep's milk spiked with of each macrolide
- 3. Defatting step: n-hexane (6 × 1 mL)
- 4. Elution step: MeOH:Acetic acid (0.5%) (3 × 2 mL)



BATCH BINDING ANALYSIS

- SPI-MIP1, SPI-MIP2 or NIPs sorbents were incubated over night with a SPI solution in ACN.
- Mixture was centrifuged (1200 rpm, 5 min). The supernatant containing the non-binding SPI was analyzed by HPLC-DAD.



- LC-UV- DAD conditions:
- Hypersil ODS RP-18 column.
 - Temperature: 60°C
 - Elution gradient: 1-1.5 mL/min
 - Mobile phase: NaH₂PO₄:ACN (50:50) pH 7
 - Analysis time: 30 min
 - UV-DAD Detection: ERY (210 nm), TYL (287 nm), SPI/JOS (231 nm), IVER (254 nm)

RESULTS

BATCH BINDING STUDIES

Table 1. Results obtained for MIPs and NIPs in ACN.

Absorbent	% Specific binding			Partition coefficient (k)		Imprinting factor (a)
	MIP	NIP	Specific	MIP	NIP	
Polymer 1	75.3	22.2	53.1	3.04	0.29	3.40
Polymer 2	62.2	24.5	37.7	1.65	0.32	2.54

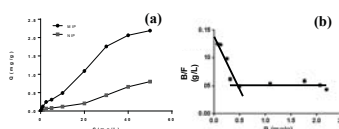


Fig. 1. (a) Adsorption isotherms of SPI onto the MIP1 and NIP1 at different SPI concentrations. (b) Scatchard analysis of SPI binding to the MIP1.

EXPERIMENTAL VARIABLES STUDIES

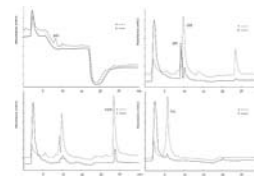


Fig. 5. Chromatograms for (a) standard mixture of macrolides (b) MISPE extracted sheep milk.

SUMMARY OF ANALYTICAL PERFORMANCE

- Working concentration range: 24–965 µg kg⁻¹ SPI
- LOQ: 24.1 µg kg⁻¹ (RSD < 5%)
- RSD-interday: Recoveries (97-99%) with RSD < 3% for 241 µg kg⁻¹ and 965 µg kg⁻¹ SPI concentrations, (n= 3).
- RSD-intraday: Recoveries (86-88%) with RSD < 9% for 241 µg kg⁻¹ and 965 µg kg⁻¹ SPI concentrations, (n= 3).

Table 2. Recoveries at three SPI:interferent ratios.

Antibiotic	% Recovery	% Recovery	
		Low level	Maximum level
ERY	-	-	-
SPI	99.8 ± 0.2	90.3 ± 2.4	91.8 ± 4.3
JOS	26.9 ± 2.8	25.0 ± 5.7	20.5 ± 6.9
IVER	27.0 ± 1.1	22.3 ± 5.3	23.9 ± 7.4
TYL	21.8 ± 5.3	16.9 ± 0.4	18.4 ± 3.9

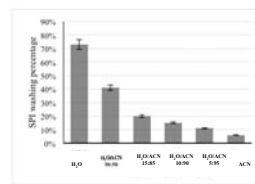


Fig. 2. Recoveries of SPI after washing.

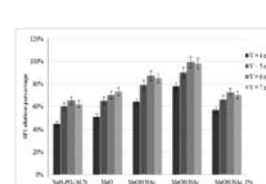


Fig. 4. Recoveries after eluting.

CONCLUSIONS

- ✓ A novel functional material for SPI was synthesized by molecular imprinting technique. Binding analysis and the corresponding chromatographic evaluation allowed selected and characterized the optimum MIP. The studies demonstrated that the porous structure was responsible for much of the binding capability, and there were at least two kind of sites affinity for SPI.
- ✓ The optimum MIP was used as SPE sorbent to extract SPI in the milk samples providing satisfactory results. An only washing step was necessary in MISPE procedure to remove the fat content in the milk samples and to reduce the non-specific interactions, allowing facilitate the treatment and saving in the analysis time.
- ✓ The good sensitivity achieved by combination of HPLC with this MISPE procedure allows the determination of SPI at lower level than MRLs established, without cross-reactivity to other macrolide studied.

**Acknowledgements: The authors thank the Comunidad Autónoma de Madrid (Spain) and European funding from FEDER Programme (project P2013/AB3028, AVANSECAL) for financial support, the Regional Centre of Animal Selection and Reproduction (CERSYRA) for supplying milk's sheep samples.

IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Desde su descubrimiento, los antimicrobianos revolucionaron la práctica de la medicina, tanto humana como veterinaria, reduciendo considerablemente las tasas de mortalidad provocada por infecciones bacterianas graves. Sin embargo, los grandes progresos de la medicina en la época dorada de los antibióticos pueden verse ensombrecidos por la amenaza que representa la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos.

Tras un tiempo de uso, un determinado antibiótico suele perder eficacia debido a que los organismos patógenos, que en un principio son sensibles a él, evolucionan y se adaptan, pudiendo sobrevivir en presencia de dosis de dicho antimicrobiano que deberían ser suficientes para inhibir su reproducción o matarlos. Esta capacidad de las bacterias de desarrollar mecanismos que las hacen resistentes a los antimicrobianos, es innata, de forma que tras un tiempo de exposición prolongado, habrán muerto las bacterias no resistentes y habrán proliferado las que sí lo son.

Esto se ve agravado por el hecho de que algunas bacterias desarrollan resistencia a familias diferentes de antibióticos con estructuras o mecanismos de acción similares, lo que da lugar a una reducción del número de tratamientos disponibles, a una prolongación de los tiempos de recuperación o incluso al fracaso de los tratamientos. Además, se ha observado que existe una vinculación entre el uso de determinados antibióticos en veterinaria que dan lugar a la aparición de resistencias y la propagación de las mismas en humanos. Este desarrollo de resistencias a los antibióticos constituye una seria amenaza para los ciudadanos.

El rápido aumento de las resistencias de las bacterias a los antibióticos que se está produciendo en los últimos años es consecuencia de dos hechos fundamentales:

- ✓ El uso inadecuado de los antibióticos en medicina humana y veterinaria.
- ✓ La falta de desarrollo de nuevos antibióticos por la falta de rentabilidad.

El uso inadecuado de antibióticos en medicina humana se debe a la administración de dosis excesivas, al consumo de antibióticos de baja calidad y a la interrupción anticipada de los tratamientos. Y en medicina veterinaria los malos usos tienen que ver con su administración con fines profilácticos, en dosis excesivas, o como promotores del crecimiento.

El empleo de antibióticos en veterinaria de forma fraudulenta o sin respetar los tiempos de espera establecidos, da lugar a la aparición de residuos de los mismos en los

alimentos procedentes de animales que han sido tratados. Estos residuos de antibióticos en los alimentos que se consumen no sólo contribuyen a la aparición de las resistencias, sino que además pueden dar lugar a reacciones alérgicas en el consumidor. La presencia de estos residuos en la leche tiene otro problema añadido de tipo tecnológico, y es que interfieren en los procesos de fermentación y obtención de los derivados lácteos.

La resistencia a los antibióticos y el uso inadecuado de los mismos constituyen hoy día uno de los mayores problemas de salud pública, que ha requerido de una actuación por parte de los organismos gubernamentales de los diferentes países. Se han establecido planes de vigilancia y control del uso y consumo de antibióticos y de la aparición de resistencias, y se han fijado límites máximos de residuos de antibióticos en la mayoría de los alimentos de origen animal.

La Unión Europea ha establecido, además, el llamado “Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL)”, que es el contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado, y que es aplicable a aquellas sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido.

La vigilancia y control del uso de antibióticos implica el desarrollo de procedimientos de análisis que sean robustos, sensibles, precisos, que permitan la detección, identificación y cuantificación simultánea de múltiples analitos en los niveles exigidos por la legislación vigente, y que a la vez sean sencillos, rápidos y económicos.

La Unión Europea ha fijado además normas específicas relativas a la toma de muestras y a los métodos analíticos, estos últimos se han dividido en métodos de cribado y de confirmación. Los análisis deben ser efectuados por laboratorios autorizados que deben utilizar métodos validados.

La validación de un método consiste en determinar la linealidad, la recuperación de los analitos, la repetibilidad, reproducibilidad y dado el caso, la especificidad.

Los métodos aceptados por la legislación como métodos de confirmación para el análisis de sustancias antibacterianas incluyen una técnica cromatográfica, principalmente cromatografía líquida de alta eficacia, con detección espectrométrica, preferentemente espectrometría de masas o ultravioleta con serie de diodos integrados.

En la bibliografía pueden encontrarse gran cantidad de procedimientos para el tratamiento de muestras de diferentes productos alimenticios, entre los que se incluyen carne de ternera, cerdo, pollo o pescado, huevos o leche; así como la optimización de diferentes métodos analíticos que emplean la HPLC acoplada a la espectrometría de masas o a la espectroscopia UV-vis.

El tratamiento de las muestras de alimentos para investigar la presencia de residuos de antibióticos suele incluir técnicas de extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida o dispersión de la matriz en una fase sólida. Hay que señalar que poco a poco se ha ido imponiendo el empleo de materiales como los polímeros de impronta molecular para ser utilizados como fase sólida en procesos SPE.

Aunque se han desarrollado y evaluado varios métodos para la determinación de antibióticos en leche, son para leche de vaca, y apenas hay trabajos que pongan a punto métodos adecuados para la especie ovina.

Sin embargo, la producción de leche de oveja es de gran importancia en el área Mediterránea, siendo España la tercera productora de la Unión Europea (UE) con casi 440.000 toneladas al año. De esta leche, alrededor del 10% se destina a elaborar queso Manchego con Denominación de Origen Protegida (DOP), un producto de calidad que debe garantizar la seguridad del consumidor.

Por otro lado, las sustancias antibacterianas para las que se ha desarrollado un mayor número de procedimientos son la familia de los β -lactámicos, puesto que son los antibióticos de primera elección en la práctica veterinaria; bastantes menos se han descrito para el segundo grupo más empleado, el de los macrólidos, y apenas ninguno para la determinación de éstos últimos en leche de oveja.

En esta tesis doctoral se han propuesto y optimizado varios procedimientos de tratamiento de muestras de leche de oveja para la extracción de residuos de antibióticos macrólidos, y se ha desarrollado y validado un método de confirmación para su determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta con serie de diodos integrados.

El primer paso fue el desarrollo, puesta a punto y validación del primer método de análisis multi-residuo HPLC-UV-DAD capaz de determinar siete antibióticos macrólidos

en concentraciones inferiores a las establecidas por la legislación, en muestras de leche de oveja de raza manchega.

Los macrólidos elegidos son eritromicina, oleandomicina y roxitromicina, con anillo lactónico de 14 átomos, espiramicina, josamicina y tilosina, con anillo de 16 átomos, e ivermectina, compuesto considerado dentro del grupo de los macrólidos porque tiene en su estructura un anillo lactónico de 16 átomos, a pesar de que no presenta actividad antibacteriana sino antiparasitaria y antihelmíntica (se utiliza en el tratamiento contra infecciones causadas por gusanos nematodos).

Aunque la mayoría de los métodos de análisis de antibióticos en alimentos que se proponen utilizan la espectrometría de masas como sistema de detección, todavía los equipos son mucho más caros que aquellos en los que la detección es por absorción en el ultravioleta. Dado que todos los antibióticos objeto de estudio presentan absorción en esta zona del espectro se decidió utilizar como técnica de análisis HPLC-UV-DAD.

Se comenzó por tanto, optimizando las condiciones de la separación cromatográfica. Dado que los antibióticos macrólidos tienen carácter básico y cierta naturaleza hidrofóbica, generalmente se utilizan para su separación columnas de fase reversa basadas en rellenos de tipo C18. Se comenzaron los estudios con una columna tipo LiChrosorb, fase estacionaria con un área superficial de 500 m²/g debido a la forma irregular de las partículas que la forman, pero posteriormente se cambió por una Hypersil ODS, cuya fase estacionaria está constituida por partículas esféricas con una menor área superficial, 200 m²/g, reduciéndose los tiempos de retención de los analitos al facilitar su elución.

Los disolventes empleados según la bibliografía para la separación de este tipo de compuestos eran generalmente acetonitrilo, metanol y algún tampón acuoso que permita controlar el pH de manera que se favorezca la elución, pero no se produzca la degradación de ninguno de los antibióticos. Se ensayaron diferentes mezclas de los dos disolventes orgánicos con tampón acetato amónico y tampón dihidrógenofosfato. Con tampón acetato no se lograba una buena resolución de los picos y su tamaño no era adecuado para el análisis cuantitativo; se intentó resolver el problema aumentando la temperatura de elución para disminuir la viscosidad de la fase móvil, observándose un aumento en las señales con la temperatura y una más rápida elución de JOS, TYL e IVER, pero no se logró eluir el resto de analitos. La utilización de tampón fosfato, con

un pH más ácido favoreció la desorción de los analitos de la fase estacionaria. Se observaron problemas con la línea base que se solventaron eliminando el metanol de la fase móvil, ya que el ACN es más transparente a la radiación ultravioleta, quedando finalmente la fase móvil constituida por tampón fosfato como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B.

Debido al elevado número de analitos se optó por llevar a cabo una elución en gradiente, durante la cual se va disminuyendo la polaridad de la fase móvil al aumentar el porcentaje de ACN.

Con el objeto de mejorar los tiempos de retención de los analitos se modificó la velocidad de flujo, de forma que un aumento en la velocidad daba lugar a una disminución del tiempo de análisis y la mejora adicional de la desaparición de la cola del pico final.

Finalmente se logró separar los siete antibióticos macrólidos en 30 minutos.

Las longitudes de onda para su identificación se consultaron en la bibliografía y se comprobaron obteniendo el espectro de absorción UV-vis de cada uno de ellos. Los máximos de absorción seleccionados para la detección fueron 210 nm para ERY, OLE y ROX; 231 nm para SPI y JOS; 254 nm para IVER y 287 nm para TYL.

Una vez optimizada la separación cromatográfica y la identificación de los analitos se pasó a comprobar su aplicación al análisis de muestras de leche de oveja. Para ello hubo que buscar previamente un procedimiento adecuado de tratamiento de la muestra que permitiera la extracción cuantitativa de los siete antibióticos.

La leche de oveja es una muestra compleja, con un contenido en grasa y proteínas mayor que el de la leche de vaca, por lo que las formas de tratamiento propuestas para esta última pueden dar lugar a extractos no adecuados para el análisis cromatográfico.

La leche de oveja representa una matriz muy compleja en la que se pueden encontrar gran cantidad de sustancias. Se puede considerar que está formada por tres fases: una emulsión de los glóbulos de grasa, una suspensión coloidal de las micelas de caseína (proteína) y una disolución acuosa de lactosa, proteínas hidrosolubles, vitaminas, minerales, etc. Además, la composición de la leche se ve afectada por

multitud de factores, como pueden ser variaciones en la reproducción, diferencias de raza, variaciones en la alimentación, aspectos estacionales o geográficos, etc. Debido a esta complejidad, generalmente, es necesario un tratamiento previo de la muestra, y su preparación para el análisis no resulta sencilla.

Las muestras de leche analizadas fueron recogidas de diferentes ovejas que se encontraban en el mismo estado de lactación por el Centro Regional de Selección y Reproducción Animal CERSYRA, que se encuentra en Valdepeñas. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio donde se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Justo antes del análisis, se dejan las muestras a temperatura ambiente y se homogeneizan en baño termostático a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 5 minutos. Se añaden los antibióticos en concentración conocida y, tras agitar manualmente, se deja equilibrar la matriz de la leche con los antibióticos a temperatura ambiente durante unos 20 minutos.

En general, los procedimientos de tratamiento de la muestra incluyen una primera etapa de precipitación de las proteínas con un disolvente orgánico conteniendo cierta cantidad de algún ácido, una etapa de eliminación de la grasa, otra de eliminación de otras sustancias interferentes, y finalmente la extracción de los analitos.

Con el fin de encontrar los disolventes más adecuados para cada etapa, es necesario tener en cuenta algunas propiedades químicas de interés de los antibióticos macrólidos, como son su inestabilidad en medios ácidos y su naturaleza hidrofóbica.

Para lograr una completa precipitación de las proteínas y que los analitos permanezcan en la disolución se añaden simultáneamente acetonitrilo y tampón fosfato; se necesita un pH por debajo de 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína) para que las proteínas precipiten. Tras agitar, se mantiene unos minutos hasta que se completa la desproteinización, centrifugando para lograr la separación de las dos fases y poder recoger el sobrenadante donde se encontrarán los analitos. Se debe tener cuidado de no disminuir el pH demasiado debido a la inestabilidad de los antibióticos macrólidos en medios ácidos, los cuales podrían degradarse, especialmente la eritromicina.

La siguiente etapa es la eliminación de la grasa, tradicionalmente realizada mediante una extracción líquido-líquido con n-hexano, y a continuación se lleva a cabo la

extracción de los analitos utilizando de nuevo una LLE con algún disolvente como acetonitrilo, metanol, cloroformo, diclorometano o acetato de etilo. Aunque se consiguieron extractos libres de grasa, las recuperaciones de los analitos fueron en general, muy bajas (< 10 %); sólo con acetato de etilo se logró una recuperación del orden del 50 % para todos los analitos excepto ERY e IVER. Posiblemente los antibióticos macrólidos fueron extraídos por el n-hexano junto con la grasa.

Para resolver este problema se decidió llevar a cabo una hidrólisis alcalina de la grasa con NaOH, añadiendo simultáneamente un disolvente orgánico que extraiga los analitos. De nuevo se buscó el disolvente orgánico (diclorometano, n-hexano, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo) que diera lugar a la completa extracción de todos los antibióticos. Se pudo comprobar cómo el n-hexano impedía la hidrólisis de los lípidos produciéndose una extracción simultánea de los mismos con los analitos en la fase orgánica. El diclorometano y el metanol condujeron a extractos con gran cantidad de interferencias al extraer otras sustancias presentes en la matriz. Con acetonitrilo y acetato de etilo se consiguieron extractos limpios, pero se optó por el acetato de etilo como disolvente para la extracción de los antibióticos macrólidos porque fue el que proporcionó mayores recuperaciones. Por otro lado se optimizaron las cantidades de hidróxido de sodio y acetato de etilo necesarias para conseguir los extractos más limpios con las mejores recuperaciones de todos los analitos. Estos extractos fueron llevados al cromatógrafo para la identificación y cuantificación de los siete antibióticos macrólidos.

Se lograron buenas recuperaciones de todos los analitos excepto de ivermectina, y los límites de cuantificación fueron inferiores a los LMRs establecidos por la legislación. Hay que señalar que sólo se han fijado límites máximos de residuo en leche de oveja para ERY (40 mg/kg) y TYL (50 mg/kg).

El método de tratamiento propuesto permite la realización de dos etapas, la eliminación de grasa y la extracción de los analitos, en una sola, con el consiguiente ahorro de disolventes, así como la disminución del tiempo necesario para completar el análisis.

El resultado de esta investigación ha dado lugar a la validación del primer procedimiento para la determinación simultánea de los antibióticos macrólidos, eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina y tilosina, en

concentraciones inferiores a los límites establecidos por la legislación, presentes en muestras de leche de oveja.

El siguiente paso en la investigación fue buscar algún otro procedimiento para tratar la muestra que permitiera la extracción de los siete antibióticos estudiados y mejorara sus recuperaciones.

Dadas las características de la muestra, alto contenido de grasa y proteínas de la leche de oveja, se pensó que podrían lograrse buenos resultados utilizando la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida, utilizada, con buenos resultados, en el caso de muestras sólidas, semisólidas o muy viscosas.

Los factores más importantes en un proceso MSPD son la selección del soporte sólido y los disolventes de limpieza y extracción, cuestión para la que hay considerar la polaridad de los mismos en relación con la de los analitos. Una elección acertada determinará la eficiencia de la separación y la limpieza de los extractos finales.

Dado el carácter lipofílico de los antibióticos macrólidos se optó por un adsorbente no polar, un material C18, como fase sólida para dispersar la muestra.

Una vez realizado el pretratamiento de la leche como ya se ha descrito, la muestra enriquecida con los siete antibióticos se mezcla en un mortero con el material adsorbente y se añade cierta cantidad de Na_2SO_4 , con el fin de captar las moléculas de agua y favorecer así la dispersión de los analitos en la capa orgánica. La mezcla bien homogeneizada se introduce en un cartucho de extracción en fase sólida sobre un poco de lana de vidrio para impedir pérdidas del material por la parte de abajo, y se añade una pequeña cantidad de Na_2SO_4 en la parte de arriba. Hay que asegurarse de conseguir un buen empaquetamiento del material, de manera que no queden huecos de aire por el medio que establezcan luego caminos preferentes para los disolventes.

En los ensayos preliminares se probaron n-hexano y NaOH para eliminar la grasa y acetato de etilo, acetonitrilo y metanol como disolventes para la elución.

La mezcla de la leche con el material C18 como dispersante resultó ser demasiado compacta una vez empaquetada en el cartucho, haciendo difícil el proceso de elución.

Por otro lado, el empleo de NaOH para eliminar la grasa dio lugar a extractos que contenían grandes cantidades de interferencias, siendo las recuperaciones de los analitos muy bajas. Estas recuperaciones mejoraron cuando se utilizó n-hexano en la extracción de la grasa, pero gran parte de los analitos continuaba quedando fuertemente unida a la fase sólida. Por ello se decidió cambiar el soporte sólido dispersante por otro material, arena de mar lavada.

Con el nuevo adsorbente la mezcla resultó más suelta y fácil de empaquetar. Del mismo modo, los extractos obtenidos tras la eliminación de la grasa con n-hexano estaban más libres de interferencias; aun así se intentó una mejora añadiendo diclorometano, pero los resultados no fueron satisfactorios.

En cuanto a las recuperaciones, el disolvente óptimo para la elución será aquel que sea capaz de desorber los analitos de la fase sólida sin extraer el resto de sustancias que han de quedar retenidas en la misma. Se probaron diferentes volúmenes de varios disolventes para la elución de los analitos: acetato de etilo, acetonitrilo, metanol, MeOH/EtOAc 50:50 y ACN/EtOAc 50:50, siendo la mezcla de metanol y acetato de etilo la que proporcionó los mejores resultados. Tras varios ensayos para optimizar la proporción de los dos disolventes se consiguieron las recuperaciones más altas con una mezcla al 50% de metanol y acetato de etilo.

El método propuesto presenta claras ventajas respecto al anterior. No se requiere etapa de precipitación de las proteínas ni etapa adicional de limpieza; se consigue la eliminación de las posibles interferencias y de la grasa simultáneamente. Esto se traduce en un gasto de menor cantidad de disolventes. La cantidad de muestra que se utiliza para el análisis también es pequeña. Se disminuyen claramente, además, la manipulación de la muestra, los costes materiales y el tiempo requerido para llevar a cabo el proceso.

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de nuevas estrategias analíticas para la extracción selectiva de antibióticos de muestras biológicas. Y de manera más específica, lo que se pretende es poner a punto métodos de tratamiento de muestra, optimizados para leche de oveja, que permitan la extracción selectiva de antibióticos macrólidos para su posterior determinación cromatográfica.

A la vista del auge que ha ido adquiriendo la tecnología de la impresión molecular y de la gran versatilidad que presenta, la utilización de los polímeros impresos permite la

extracción selectiva de los analitos en matrices de elevada complejidad, lo que hace que presenten grandes ventajas respecto a otros tipos de adsorbentes, así como del hecho de que no se hayan desarrollado apenas polímeros impresos molecularmente específicos para la familia de los macrólidos, la segunda parte de esta tesis se dedica a la síntesis y caracterización de polímeros específicos para antibióticos macrólidos aplicados a su determinación en leche de oveja de raza manchega.

En primer lugar se sintetiza un polímero para ERY, que permite su extracción y la de ROX, antibiótico con una estructura muy similar, mediante un proceso SPE, de muestras de leche de oveja, para su posterior determinación mediante HPLC-UV-DAD, llevándose a cabo la validación del método. Posteriormente se sintetiza otro polímero para SPI, que resulta ser específico para este antibiótico, y se lleva a cabo su caracterización.

La optimización de la síntesis de ambos polímeros es análoga, ya que las estructuras de ERY y SPI son muy similares. Por ello, a continuación se explica cómo se lleva a cabo dicha optimización para ambos polímeros simultáneamente.

Para la síntesis de los polímeros se elige el método de polimerización en bloque no covalente, ya que la forma irregular de las partículas que se obtienen por este mecanismo no constituyen una limitación para su aplicación en procesos SPE off-line, y por ser un proceso muy sencillo de llevar a cabo. La forma de unión no covalente entre la molécula molde y el monómero es la más habitual, ya que este tipo de interacciones son las que presentan mayor versatilidad.

El procedimiento consiste en mezclar el monómero con la molécula molde en el disolvente o porogen y añadir el entrecruzante. Se añade el iniciador radicalico y se procede a la inducción de la polimerización térmica o fotoquímicamente, manteniéndolo durante unas horas hasta que ésta sea completa. Una vez obtenido el polímero en forma de monolito, se tritura y tamiza para conseguir el tamaño de partícula deseado. Finalmente, se elimina la molécula molde y los compuestos no polimerizados mediante una extracción en soxhlet con MeOH, hasta que no se detecte la molécula molde (ERY o SPI) en los extractos mediante HPLC-DAD. Se sintetizan de manera análoga polímeros no impresos (NIP), pero sin la adición de la molécula molde, con el objeto de que sirvan de referencia para evaluar la existencia de interacciones inespecíficas.

Es importante una adecuada selección del monómero, entrecruzante, porogen e iniciador, según las características de la molécula molde que se vaya a utilizar, que en nuestro caso son eritromicina y espiramicina, con características similares. También es determinante para conseguir un buen proceso de extracción, la proporción entre las cantidades de la molécula molde y los reactivos necesarios para la polimerización.

Se elige como monómero funcional el ácido metacrílico, puesto que gracias al grupo carboxilo puede formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo y enlaces iónicos con los grupos básicos de las moléculas de eritromicina o espiramicina. Tanto la eritromicina como la espiramicina poseen en su molécula grupos hidroxilo y aminas terciarias que les permiten la formación de los enlaces de hidrógeno y uniones iónicas.

Las funciones que debe cumplir el entrecruzante son: proporcionar a la matriz polimérica la estabilidad mecánica necesaria, determinar la morfología del polímero y estabilizar los sitios de reconocimiento molecular. El entrecruzante más ampliamente utilizado es el etilenglicol dimetacrilato y es el que elegimos para nuestra síntesis.

Para lograr buenas separaciones en las aplicaciones cromatográficas del polímero es fundamental que la estabilidad mecánica sea suficiente y haya un alto grado de entrecruzamiento. Para ello es necesario que la proporción molécula molde:entrecruzante sea suficientemente alta, de manera que se formen en el polímero cavidades específicas del tamaño y forma correctos y que estas se mantengan.

También es necesario un exceso del monómero funcional respecto a la cantidad de molécula molde con el fin de mejorar la estabilidad del complejo de prepolimerización ya que así se consigue un desplazamiento del equilibrio asociación-disociación hacia la formación del complejo.

Tras varios ensayos, la mejor polimerización se consiguió con la proporción molécula molde:monómero:entrecruzante 1:100:500.

Otro factor importante a la hora de realizar la síntesis de un MIP es el porogen, el cual juega un importante papel en la morfología final del polímero, siendo el responsable del diámetro de los poros que se formen, lo que determinará la capacidad de reconocimiento para un determinado analito. Sus características físicas y químicas influirán en la efectividad de las uniones entre la molécula molde y el monómero. En

los polímeros con uniones no covalentes, en los que las interacciones son de tipo electrostático o de enlaces de hidrógeno, conviene utilizar disolventes apróticos y apolares que no deshabiliten dichas interacciones. De acuerdo con estas premisas se selecciona el acetonitrilo como porogen, el cual asegura además, una buena disolución de la eritromicina y la espiramicina.

Se sintetizan dos MIPs y sus correspondientes NIPs siguiendo un proceso de polimerización radicalica para el que se añade como iniciador 2,2'-azobisisobutironitrilo, pero en cada caso el mecanismo de activación del proceso es diferente; en uno se utiliza una activación fotoquímica con radiación UV de 235 nm a 5 °C, y en el otro la activación se hace térmicamente en un baño termostatzado a 65 °C. Estas condiciones diferentes afectan a la impresión molecular y por tanto a la especificidad del reconocimiento.

El reconocimiento molecular de un MIP depende fundamentalmente de dos factores: la configuración espacial tridimensional de la molécula molde y del grado de coincidencia de los sitios enlazantes.

La capacidad de reconocimiento de los MIPs se determina utilizando tres parámetros: la cantidad de uniones específicas, el coeficiente de partición y el factor de impresión de los polímeros. En función de estos valores se selecciona el MIP óptimo para los análisis posteriores. Para ello, se llevan a cabo estudios de unión o "binding".

Estos estudios se realizan añadiendo a cierta cantidad del polímero una concentración conocida de la molécula molde en un disolvente previamente optimizado manteniendo la mezcla en incubación durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifuga y se analiza el sobrenadante para determinar la cantidad de molécula molde que no se ha enlazado; la cantidad enlazada se calcula por diferencia entre la añadida y la detectada en la disolución tras la incubación.

La optimización del disolvente de carga se llevó a cabo con los polímeros sintetizados para la ERY. Para ello se hicieron los estudios de unión con cloroformo, acetonitrilo y mezcla $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ 70:30 a $\text{pH} = 7$, llevando a cabo después varios lavados con ACN. Los resultados de los ensayos mostraron una mejor capacidad de reconocimiento cuando se había utilizado ACN como disolvente de carga, como era de esperar, pues parece lógico que el polímero muestre una mejor capacidad de reconocimiento en el disolvente utilizado para la polimerización.

La cantidad de uniones específicas se obtiene restando al porcentaje de molécula molde enlazado en el MIP el porcentaje de molécula molde enlazado en el NIP. Los resultados para los dos polímeros obtenidos en condiciones diferentes mostraron un mayor número de uniones específicas en el caso del polímero obtenido mediante activación térmica, tanto en los polímeros de ERY como en los de SPI. Por ello se seleccionan los MIPs obtenidos por activación térmica del proceso de polimerización como sorbentes del proceso SPE para la determinación de ERY o SPI en leche de oveja. Además, se observó que la cantidad enlazada en los polímeros no impresos era muy pequeña, lo que indica que la molécula molde empleada confiere una buena capacidad de reconocimiento al polímero durante el proceso de impresión creando cavidades altamente específicas.

El coeficiente de partición ($k = C_p / C_s$) es la relación entre la concentración de molécula molde enlazada al polímero (C_p) y la concentración que permanece en la disolución (C_s). El factor de impresión (α) representa el grado de impresión conseguido de la molécula molde en el polímero. Se calcula como la relación entre la cantidad de molécula molde enlazada al MIP y la enlazada al NIP. Los valores del coeficiente de partición y del factor de impresión de los polímeros de SPI confirmaron que el polímero obtenido con activación térmica es el que presenta un mayor grado de impresión y por tanto, la mejor capacidad de reconocimiento.

Al no tener conocimiento de la existencia de ningún polímero de impronta molecular específico para espiramicina, se decidió realizar la caracterización de los sitios de unión y morfológica del polímero obtenido.

La caracterización de los puntos de unión se llevó a cabo obteniendo las isotermas de adsorción. Se mezcló cierta cantidad del polímero con disoluciones de SPI en ACN de varias concentraciones, y se dejaron en incubación durante 24 h a 20 °C. Tras centrifugarlas se analizan alícuotas de los sobrenadantes de cada una de ellas para evaluar la cantidad de SPI que no se ha enlazado al polímero en cada caso. Los resultados se ajustaban al modelo de Langmuir, el cual describe la adsorción en una lámina basándose en la asunción de que todos los sitios de adsorción presentan la misma afinidad por el analito y que la adsorción en un sitio no afecta a la adsorción en el sitio contiguo. Los resultados mostraron que la adsorción en el polímero aumenta al aumentar la concentración de SPI inicial, aunque no de forma lineal, hasta alcanzar un valor estable. Una vez obtenidos los datos de las características de las uniones del

polímero, se usaron para hacer un análisis de Scatchard, cuya representación dio lugar a dos líneas rectas, lo que sugiere que los sitios enlazantes del polímero son heterogéneos y de dos tipos diferentes: sitios enlazantes de alta afinidad y sitios enlazantes de baja afinidad.

La capacidad de adsorción así determinada es un factor importante que se va ver reflejado en la eficiencia y la afinidad de los polímeros hacia el analito.

En cuanto a la caracterización morfológica para determinar la naturaleza y estructura de los poros, se llevó a cabo mediante la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno, basada en la medida de la cantidad de nitrógeno que es capaz de atravesar el material en un período de tiempo determinado, proporcionando información acerca del área superficial específica, el volumen de poro específico, la distribución del tamaño de los poros y su diámetro medio.

Una vez sintetizados los polímeros para ERY y SPI se procedió a la optimización del proceso MISPE para su posterior aplicación a la extracción de los dos antibióticos de muestras de leche de oveja.

Los factores determinantes para optimizar el proceso MISPE son la naturaleza y cantidad de los disolventes empleados en las etapas de lavado y elución.

Una buena elección del disolvente de lavado es crucial para lograr afianzar las interacciones específicas entre el analito y los sitios de unión y simultáneamente romper las interacciones no específicas que permitan la eliminación de la columna de los componentes de la matriz interferentes.

Una vez acondicionada la columna con MeOH y ACN, se ensayaron diferentes volúmenes de varios disolventes para la etapa de lavado: H₂O, ACN, y mezclas H₂O/ACN en diferentes proporciones. El disolvente que fue capaz de eluir una menor cantidad de analito fue el ACN, por lo que se seleccionó como disolvente de lavado.

En cuanto al disolvente para la elución, debe ser capaz de conseguir la desorción del analito de forma eficiente de la columna. Generalmente, para conseguir la recuperación del analito fuertemente enlazado, es necesario añadir una pequeña cantidad de modificador que facilite la ruptura de los enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas existentes entre el analito y el polímero, compitiendo con el

analito por los sitios de unión. Se probó la elución con cantidades diferentes de varios disolventes: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ 70:30 a $\text{pH} = 7$, MeOH, MeOH/HAc en diferentes proporciones. El disolvente con el que se consiguieron las mayores recuperaciones fue el MeOH con un 0,5 % de HAc. No deben utilizarse mayores cantidades de ácido acético debido a la inestabilidad de los antibióticos macrólidos en medios ácidos.

Por último se procedió a la utilización del proceso MISPE para la limpieza y extracción de ERY y SPI de muestras de leche de oveja, así como a la validación de los métodos MISPE-HPLC-DAD para su determinación.

La optimización del proceso MISPE fue análoga a la realizada previamente cuando se utilizó la MSPD. El disolvente utilizado para la eliminación de la grasa que condujo a las mejores recuperaciones fue también el n-hexano, y también en esta ocasión en esta etapa se consigue simultáneamente eliminar las sustancias interferentes, pudiendo prescindir de la etapa de lavado con ACN.

Hay que mencionar que para evitar obstrucciones en el polímero es necesaria la precipitación previa de las proteínas según el procedimiento ya comentado.

Se llevaron a cabo estudios de interferencias en los dos procedimientos, con el MIP para ERY y con el MIP para SPI. Para ello se aplicó el procedimiento descrito a muestras que contenían, además de los analitos objetos de estudio, otros antibióticos macrólidos de estructura similar. En el caso del polímero de ERY se añadieron como posibles interferentes espiramicina, josamicina, roxitromicina, tilosina e ivermectina, obteniéndose bajas recuperaciones para todos ellos excepto para la roxitromicina, de la que se recuperó un 85 %, y un 98 % de ERY. Esto es coherente con la gran similitud entre las estructuras de la ERY y la ROX. Sin embargo, no se puede considerar como sustancia interferente debido a la diferencia entre sus tiempos de retención.

Y en el caso del polímero de SPI, los posibles interferentes fueron eritromicina, josamicina, tilosina e ivermectina, de los que se obtuvieron muy bajas recuperaciones. Las recuperaciones de SPI fueron superiores al 90 %, con lo que se puede considerar que el polímero obtenido es selectivo a la espiramicina.

Los métodos desarrollados para la determinación selectiva de eritromicina y espiramicina fueron validados mediante su linealidad, recuperación, exactitud,

precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad, y límite de detección, bajo las condiciones óptimas para la matriz de la leche de oveja.

Gracias a las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis doctoral se proponen varios métodos de extracción selectiva de antibióticos macrólidos, los cuales constituyen la segunda familia más utilizada en medicina veterinaria, de muestras de leche de oveja de raza manchega, producto utilizado para la elaboración del queso Manchego con Denominación de Origen Protegida. Hasta ahora los métodos existentes de extracción de residuos de medicamentos en leche estaban optimizados para leche de vaca, obteniéndose resultados dudosos cuando se aplicaban a la leche de oveja.

Es necesario continuar desarrollando métodos aplicables a la especie ovina. Así mismo se ha puesto a punto un método sencillo, basado en HPLC-UV-DAD, que permite la determinación simultánea de siete antibióticos macrólidos en concentraciones inferiores a los límites establecidos por la legislación.

La combinación de los métodos de extracción propuestos con la determinación mediante HPLC-UV-DAD da lugar a nuevos procedimientos de análisis de residuos de antibióticos en muestras biológicas, abordándose así uno de los problemas prioritarios de salud pública con los que nos encontramos actualmente.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer del desarrollo de esta Tesis Doctoral se resumen a continuación:

- ✓ Se ha optimizado la separación cromatográfica de siete antibióticos macrólidos: oleandomicina, eritromicina, roxitromicina, espiramicina, josamicina, tilosina e ivermectina, utilizando cromatografía líquida de alta eficacia con un detector de ultravioleta-visible de serie de diodos integrados. Las condiciones óptimas de separación de los siete analitos incluyen el empleo de una columna de fase reversa Hypersil ODS, la elución en gradiente con una fase móvil compuesta por dos disolventes: una disolución reguladora de dihidrógenofosfato de potasio/ácido fosfórico y acetonitrilo, a una velocidad de flujo de 1 mL·min⁻¹. La separación completa de los siete macrólidos se logra en 30 minutos de análisis.
- ✓ Se ha desarrollado un método de tratamiento de muestra de leche de oveja en el que, tras la desproteización de la leche con una mezcla de disolución reguladora de fosfato a pH = 3,4 y acetonitrilo, se consigue en un único paso la extracción y purificación de los analitos mediante una hidrólisis alcalina (1 mL de NaOH) y la adición simultánea de un disolvente orgánico (5 mL de EtOAc), obteniéndose extractos apropiados para la posterior identificación y cuantificación cromatográfica de los antibióticos macrólidos objeto de estudio. El método presenta claras ventajas, como son: bajo consumo de disolventes y un único paso para la eliminación de la grasa y la extracción de los analitos, lo que reduce la manipulación de la muestra y por tanto el riesgo de contaminación de la misma.
- ✓ Se ha puesto a punto el primer método multiresiduo de análisis de leche de oveja que permite la extracción de antibióticos macrólidos, la limpieza de la matriz y la posterior determinación de los mismos mediante HPLC-DAD, resolviéndose de esta manera el problema analítico existente para la determinación de antibióticos macrólidos en leche de oveja. El método se ha aplicado satisfactoriamente a la determinación simultánea de macrólidos en leche de oveja en concentraciones inferiores a las permitidas por la legislación vigente.
- ✓ Se ha desarrollado y optimizado un nuevo método de dispersión de la matriz en una fase sólida (MSPD), que permite simultáneamente la extracción cuantitativa de siete antibióticos macrólidos (OLE, ERY, ROX, SPI, JOS, TYL e

IVER) y la limpieza de las muestras de leche de oveja manchega. En este método se emplea arena lavada como agente dispersante y una mezcla de metanol y acetato de etilo al 50 % para la elución de los analitos de la columna MSPD, tras la eliminación de la grasa con hexano. El procedimiento propuesto no requiere la precipitación previa de las proteínas ni otros pasos de limpieza adicionales. Los límites de cuantificación permiten la aplicación del procedimiento al análisis de residuos en concentraciones inferiores a las establecidas por la legislación. El método presenta, además, las ventajas de requerir pequeñas cantidades de muestra y disolventes y minimizar la manipulación de las muestras, así como los costes y el tiempo de análisis. Este método constituye un avance significativo en simplicidad y eficiencia, haciendo posible la determinación simultánea de antibióticos macrólidos de forma rápida y sensible en leche de oveja, pudiéndose utilizar en los análisis de monitorización rutinarios.

- ✓ Se ha sintetizado y caracterizado un polímero de impronta molecular para eritromicina como molécula molde, mediante polimerización en bloque no covalente con iniciación térmica, utilizando ácido metacrílico como monómero funcional, acetonitrilo como disolvente, etilen glicol dimetacrilato como entrecruzante, y 2,2'-azobisisobutironitrilo como iniciador radicalico. La proporción óptima molécula molde:monómero:entrecruzante es 1:100:500. El MIP sintetizado muestra buena selectividad y alta capacidad de adsorción de eritromicina, y permite también la recuperación de roxitromicina sin mostrar problemas de interferencias. El polímero se ha utilizado en más de 200 ensayos sin observarse pérdida de efectividad, lo cual demuestra su estabilidad.

- ✓ Se ha optimizado un proceso de extracción en fase sólida impresa molecularmente (MISPE) utilizando el MIP previamente sintetizado como material adsorbente para eritromicina. El disolvente óptimo de lavado es el ACN y el de elución metanol con un 0,5 % de ácido acético. Antes de aplicar el proceso MISPE a muestras de leche de oveja, se requiere la precipitación previa de las proteínas con 5 mL de mezcla de tampón NaH_2PO_4 y ACN a pH = 7. El disolvente n-hexano es el óptimo para la eliminación de la grasa, sirviendo esta etapa para la limpieza simultánea de la matriz, y pudiéndose prescindir del lavado con ACN.

- ✓ Se ha desarrollado un método fiable para la determinación de eritromicina en muestras de leche de oveja, utilizando el proceso MISPE para la extracción del analito y HPLC-DAD para su cuantificación. Tras el estudio de interferencias con otros antibióticos macrólidos de estructura similar a la de la ERY se puede afirmar que el método propuesto es altamente selectivo a dicho antibiótico. El método propuesto supone una simplificación y ahorro de tiempo en el tratamiento de la muestra, y permite la determinación de ERY en concentraciones inferiores al límite requerido por la UE en leche de oveja de $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

- ✓ Se ha sintetizado y caracterizado un polímero de impronta molecular para espiramicina mediante polimerización en bloque no covalente con iniciación térmica. Los reactivos empleados para la formación del polímero fueron el ácido metacrílico como monómero funcional, etilen glicol dimetacrilato como entrecruzante, 2,2'- azobisisobutironitrilo como iniciador radicalico y acetonitrilo como disolvente. Las propiedades de adsorción del polímero se valoraron mediante la obtención de las isotermas de adsorción según el modelo de la ecuación de Langmuir y el análisis Scatchard deduciendo la presencia en el polímero de sitios enlazantes heterogéneos de dos tipos, de alta y baja afinidad.

- ✓ Se ha desarrollado un método para la determinación de espiramicina en muestras de leche de oveja, utilizando el MIP sintetizado como sólido adsorbente en un proceso MISPE para la extracción del analito y HPLC-DAD para su cuantificación. En el proceso MISPE sólo es necesario un único paso de lavado con 6 mL de hexano para eliminar el contenido de grasa y otras sustancias interferentes de las muestras de leche. La elución se consigue adicionando tres veces 2 mL de MeOH con 0,5 % de ácido acético. El método optimizado proporciona recuperaciones con valores de RSD menores del 5 % y límite de cuantificación de $24,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, los cuales se encuentran por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por la Comisión Europea. Los estudios de interferencias dieron como resultado una alta selectividad del MIP por la SPI. Se ha demostrado que el MIP de SPI obtenido tiene un gran potencial para su utilización como adsorbente específico en SPE para la limpieza y preconcentración de SPI en mezclas complejas como la leche de oveja, ofreciendo una alternativa rápida, sensible y económica a los adsorbentes existentes para el análisis de SPI en muestras de leche.

Se puede concluir que los métodos desarrollados en esta Tesis Doctoral suponen un avance importante dentro del campo de la Seguridad Alimentaria. Ha quedado demostrada la utilidad de los procedimientos descritos para la determinación de antibióticos macrólidos en muestras de leche de oveja en concentraciones inferiores a los límites establecidos por la legislación vigente. Sus características analíticas los hacen, además, adecuados para ser utilizados en análisis de rutina.

Sin embargo, como ocurre casi siempre al abrir una nueva investigación, se debe seguir avanzando en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan la detección de aquellos medicamentos veterinarios que se están utilizando en terapia de ganado ovino lechero. Existen numerosas vías de continuidad de las investigaciones iniciadas con esta Tesis Doctoral, como son el desarrollo de más estrategias de extracción selectiva tanto de antibióticos macrólidos como de cualquier otro empleado en la práctica veterinaria; la aplicación de estas nuevas estrategias no sólo a muestras de leche de oveja manchega sino también a los quesos elaborados con ella; mejora de los procedimientos descritos mediante el acoplamiento en continuo del método de extracción y el sistema de detección, etc.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Afkhami, A., Ghaedi, H., Madrakian, T., Ahmadi, M., Mahmood-Kashani, H., Fabrication of a new electrochemical sensor based on a new nano-molecularly imprinted polymer for highly selective and sensitive determination of tramadol in human urine samples. *Biosens. Bioelectron.* 44 (2013) 34-40.
2. Aguilera-Luiz, M.M., Martínez Vidal, J.L., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10-16.
3. Alizadeh, T., Ganjali, M.R., Zare, M., Norouzi, P., Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. *Food Chem.* 130 (4) (2012) 1108-1114.
4. Alizadeh, T., Zare, M., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Tavana, B., A new molecularly imprinted polymer (MIP) – based electrochemical sensor for monitoring 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in natural waters and soil samples. *Biosens. Bioelectron.* 25 (5) (2010) 1166-1172.
5. Allender, C.J., Richardson, C., Woodhouse, B., Heard, C.M., Brain, K.R., Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. *Int. J. Pharm.* 195 (1-2) (2000) 39-43.
6. Ansell, R.J., Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1809-1835.
7. B. Cancho Grande, M. S. García Falcón, J. Simal Gándara. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2000 Vol. 3, Nº 1, 39-47.
8. Bajic, S., Doerge, D.R., Lu, L., Hansen Jr., E.B., Analysis of erythromycin by liquid chromatography/mass spectrometry using involatile mobile phases with a novel atmospheric pressure ionization source. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14(3) (2000) 156-160.
9. Barker, S.A., Long, A.R., Short, C.R., Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersión. *J. Chromatogr. A*, 475 (1989) 353-361.

10. Barker, S.A., Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 115-127.
11. Barreiro J.C., Luiz, A.L., Maciel, S.C., Maciel, E.V., Lanças, F.M., Recent approaches for on-line analysis of residues and contaminants in food matrices: A review. *J. Sep. Sci.* 38(10) (2015) 1721-1732.
12. Berrada, H., Borrull, F., Font, G., Marcé, R.M., Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1208 (2008) 83-89.
13. Berrada, H., Borrull, F., Font, G., Moltó, J.C., Marcé, R.M., Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 281-288.
14. Bian, K., Liu, Y., Wang, Z., Zhou, T., Song, X., Zhanga, F., He, L., Determination of multi-class antimicrobial residues in soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *RSC Adv.* 5 (2015) 27584-27593.
15. Bilandžić, N., Kolanović, B.S., Varenina, I., Scortichini, G., Annunziata, L., Brstilo, M., Rudan, N., Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control* 22(12) (2011) 1941-1948.
16. Blackwell, P.A., Holten Lützhøft, H.C., Ma, H.P., Halling-Sørensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P., Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography–UV detection. *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 111-117.
17. Blackwell, P.A., Holten Lützhøft, H.C., Ma, H.P., Halling-Sørensen, B., Boxall, A.B.A., Kay, P., Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection. *Talanta* 64 (2004) 1058-1064.
18. Böcker W. Gerhard Domack. 100. Geburtstag der Pathologen und Nobelpreisträger. *Pathologe* 16(6) (1995) 383-385. Desarrollo de antibióticos a base de sulfa del alemán Gerhard Domagk.

19. Bogialli, S., Capitolino, V., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Sergi, M., Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 3286-91.
20. Bogialli, S., Di Corcia, A., Lagana, A., Mastrantoni, V., Sergi, M., A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: Hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 237-246.
21. Bohm, D.A., Stachel, C.S., Gowik, P., Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8217-8223.
22. Bossuyt, R., Van Renterghem, R., Waes, G., Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* 124(1) (1976) 37-42.
23. Bougrini, M., Florea, A., Cristea, C., Sandulescu, R., Vocanson, F., Errachid, A., Bouchikhi, B., El Bari, N., Jaffrezic-Renault, N., Development of a novel sensitive molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metal-organic framework for tetracycline detection in honey. *Food Control*, 59 (2016) 424-429.
24. Caballero J. Macrólidos. *Revista Paceyña de Medicina Familiar*. 9 de abril 2009.
25. Calvo, A., Ehrlich y el concepto de "bala mágica". *Rev Esp Quimioterap*, Marzo 2006; Vol.19 (Nº 1): 90-92.
26. Caro, E., Marcé, R.M., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *TrAc Trends Anal. Chem.* 25 (2) (2006) 143-154.
27. Cepurnieks, G., Rjabova, J., Zacs, D., Bartkevics, V., The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole – Orbitrap mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 184-192.

28. Cerkvenik, V., Perki, B., Rogeli, I., Doganoc, D.Z., Skubic, V., Beek, W.M., Keukens, H.J., Fate of ivermectin residues in ewes' milk and derived products. *J. Dairy Res.* 71(1) (2004) 39-45.
29. Chien, Y.W., Lin, S., Optimisation of treatment by applying programmable rate-controlled drug delivery technology. *Clin. Pharmacokinet.* 41 (2002) 1267-1299.
30. Choma, I., Komaniecka, I., Matrix solid-phase dispersion combined with thin-layer chromatography-direct bioautography for determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in milk. *J. J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 28 (2005) 2467-78.
31. Choma, I., Pilorz, K., A novel application of matrix solid-phase dispersion for determination of doxycycline and flumequine residues in milk. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 27 (2004) 2143-51.
32. Civitarreale, C. Fiori, M. Bellerini, A. Brambilla, G., Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 317-325.
33. Clark, S.B., Storey, J.M., Turnipseed, S.B., Optimization and validation of a multiclass screening and confirmation method for drug residues in milk using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 94(2) (2011) 383-393.
34. Codony, R., Compañó, R., Granados, M., García-Regueiro, J.A., Prat, M.D., Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 131-141.
35. Croubels, S., De Baere, S., Cherlet, M., De Backer, P., Determination of ivermectin B1a in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 840-847.
36. da Costa, R.P., Spisso, B.F., Pereira, M.U., Monteiro, M.A., Ferreira, R.G., da Nóbrega, A.W., Innovative mixture of salts in the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for the extraction of residual macrolides in milk followed by analysis with liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 38(21) (2015) 3743-9.

-
37. Dasenaki, M.E., Thomaidis, N.S., Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 103-121.
 38. De Baere, S., Devreese, M., Watteyn, A., Wyns, H., Plessers, E., De Backer, P., Croubels, S., Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of gamithromycin in animal plasma, lung tissue and pulmonary epithelial lining fluid. *J. Chromatogr. A* 1398 (2015) 73-82.
 39. de Montigny, P., Shim, J.S.K., Pivnichny, V., Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8(6) (1990) 507-511.
 40. Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.
 41. Dehouck, P., Van Looy, E., Haghedooren, E., Deckers, K., Vander Heyden, Y., Adams, E., Roets, E., Hoogmartens J., Analysis of erythromycin and benzoylperoxide in topical gels by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 794 (2003) 293-302.
 42. Del Sole, R, Scardino, A., Lazzoi, M.R., Vasapollo, G., Molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of nicotinamide in pork liver samples. *J. Appl. Polym. Sci.* 120 (2011) 1634-1641.
 43. Des Azevedo, S., Lakshmi, D., Chianella, I., Whitcombe, M.J., Karim, K., Ivanova-Mitseva, P.K., Subrahmanyam, S., Piletsky, A., Molecularly imprinted polymer – hybrid electrochemical sensor for the detection of b-estradiol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (39) (2013) 13917-13923.
 44. Di Corcia, A., Nazzari, M., Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 53-89.

45. Díaz-Álvarez, M., Barahona, F., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Supported liquid membrane-protected molecularly imprinted beads for micro-solid phase extraction of sulfonamides in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 158-164.
46. Díaz-Díaz, G., Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco, P., Hemo-acrylic polymers as catalyst for the oxidative dehalogenation of 2,4,6-trichlorophenol. Chloroperoxidase's mimic imprinting effects. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 353-354 (2012) 117-121.
47. Díaz-Díaz, G., Diñeiro, Y., Menéndez, M.I., Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco, P., Molecularly imprinted catalytic polymers with biomimetic chloroperoxidase activity. *Polym.* 52 (12) (2011) 2468-2473.
48. Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84, 634-643.
49. Dickey, F.H., Specific Adsorption. *J. Phys. Chem.*, 59 (1955) 695.
50. Dickey, F.H., The Preparation of Specific Adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 35 (1949) 227-9.
51. Dickinson C.M., Improved high-performance liquid chromatographic method for quantitation of ivermectin in whole blood, serum or muscle tissue. *J. Chromatogr. B* 528 (1990) 250-257.
52. Ding, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, L., Wang, L., Wang, C., Zhao, Q., Xu, Y., Ding, L., Ren, N., Determination of roxithromycin from human plasma samples based on magnetic surface molecularly imprinted polymers followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* In press.
53. Directiva 2004/28/CE del Parlamento europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
54. Directiva 70/524/CEE del Consejo de 23 de noviembre de 1970 sobre los aditivos en la alimentación animal.

-
55. Dos Reis Souza, M.R., Oliveira Moreira, C., Gleice de Lima, T., Aquino, A., Silveira, H.O., Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchem. J.* 110 (2013) 395-401.
 56. Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Achene, L., Cecilia, A., Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 97-104.
 57. Dreassi, E., Corti, P., Bezzini, F., Furlanetto, S., High-performance liquid chromatographic assay of erythromycin from biological matrix using electrochemical or ultraviolet detection. *Analyst* 125(6) (2000) 1077-81.
 58. Dubois, M., Fluchard, D., Sior, E., Delahaut, P., Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 189-202.
 59. EARS-net.
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx
 60. Enríquez-Gabeiras, L., Gallego, A., Garcinuño, R.M., Fernández-Hernando, P., Durand, J.S., Interference-free determination of illegal dyes in sauces and condiments by matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid chromatography (HPLC-DAD). *Food Chem.* 135 (2012) 193-198.
 61. European Commission, Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002, *Off. J. Eur. Union*, L221 (2002) 8.
 62. European Commission, Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products. *Off. J. Eur. Union* L125 (23 May 1996) 10.
 63. European Commission, 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 (1990).

64. FAO. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/calidad-y-evaluacion/es/#.VSgNeSjaMy4>
65. Fedeniuk, R.W., Shand, P.J., Review: Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 3-15.
66. Fernández-González, A., Guardia, L., Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *An. Quím.* 103 (2) (2007) 14-22.
67. Freitas, A., Barbosa, J., Ramos, F., Multidetecion of antibiotics in liver tissue by ultra-high-pressure-liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 976-977 (2015) 49-54.
68. Furusawa, N., Normal-phase high-performance liquid chromatographic determination of spiramycin in eggs and chicken. *Talanta* 49 (1999) 461-465.
69. G. Wulff, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 34 (1995) 1812-1832.
70. GAG, Gestión Agroganadera. Comercio nacional e internacional de leche de oveja. Composición nutricional de la leche de oveja. 18 de agosto 2014. <http://gestionagroganadera.com/composicion-nutricional-de-la-leche-de-oveja-2/>.
71. Gardner AD, Chain E. Proactinomycin: a “bacteriostatic” produced by a species of Proactinomyces. *B J Exp Pathol* 1942; 23:123-127.
72. Gomis, D.B., Ferreras, A.I.A., Álvarez, M.D.G., García, E.A., Determination of spiramycin and josamycin in milk by HPLC and fluorescence detection. *J. Food Sci.* 69 (2006) C415-C418.
73. González de la Huebra, M.J., Bordin, G., Rodríguez, A.R., A multiresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC-ECD). *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 53-63.

-
74. González de la Huebra, M.J., Vincent, U., Bordin, G., Rodríguez, A.R., Characterisation of dirithromycin and spiramycin using high performance liquid chromatography and direct infusion mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 247-256.
 75. González de la Huebra, M.J., Vincent, U., von Holst, C., Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feedingstuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1628-1637.
 76. Grunwald, L., Petz, M., Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 73.
 77. Guo, B., Pan, G., Guo, Q., Zhu, C., Cui, W., Li, B., Yang, H., Saccharides and temperature dual-responsive hydrogel layers for harvesting cell sheets. *Chem. Commun.* 51 (2015) 644-647.
 78. Guo, L., Guan, M., Zhao, C., Zhang, H., Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for extraction of chloramphenicol in fish tissues coupled with high-performance liquid chromatography determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1431-1438.
 79. H. Brockmann, W. Henkel. *Naturwissenschaften*, 1950, 37, 138; *Chem. Ber.* 1951, 84, 284.
 80. Hantash, J., Bartlett, A., Oldfield, P., Dénès, G., O'Rielly, R., David, F., Application of an in-line imprinted polymer column in a potentiometric flow-injection chemical sensor to the determination of the carbamate pesticide carbaryl in complex biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (1) (2007) 351-357.
 81. Harpster, C.P., Katz, S.E., Improved microbiological procedure for determining erythromycin in milk and some milk products. *J. Assoc. of Anal. Chem.* 163 (5) (1980) 1144-1148.
 82. Hedenmo, M., Eriksson, B.M., Liquid chromatographic determination of the macrolide antibiotics roxithromycin and clarithromycin in plasma by automated solid-phase extraction and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 692(1-2) (1995) 161-166.

83. Henschel, H., Kirsch, N., Hedin-Dahlström, J., Whitcombe, M.J., Wikman, S., Nicholls, I.A., Effect of the cross-linker on the general performance and temperature dependent behaviour of a molecularly imprinted polymer catalyst of a Diels-Alder reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 72 (2011) 199-205.
84. Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., Kratz, K.L., Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 213-223.
85. Horie, M., Saito, K., Ishii, R., Yoshida, T., Haramaki, Y., Nakazawa, H., Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 295-302.
86. International Merchandising Corporation. A spore in a petri dish. En: *The Nobel century*. London: Chapman, 1991:166-7. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming.
87. IUPAC, Gold Book. <http://goldbook.iupac.org/>
88. Jacobsen, A. M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., Hansen, S. H. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solidphase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 157-170.
89. Jank, L., Targa Martins, M., Bazzan Arsand, J., Magalhães Campos Motta, T., Barcellos Hoff, R., Barreto, F., Pizzolato, T.M., High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). *Talanta* 144 (2015) 686-695.
90. Jian, W., Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Mass Spectrom. Rev.* 28 (2009) 50-92.

-
91. Juan, C., Moltó, J.C., Mañes, J., Font, G., Determination of macrolide and lincosamide antibiotics by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in meat and milk. *Food Control* 21 (2010) 1703-1709.
 92. Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Widmer, M., Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-microm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 66-79.
 93. Kawanami, Y., Yunoki, T., Nakamura, K., Fujii, K., Umamo, K., Yamauchi, H., Masuda, K., Imprinted polymer catalysts for the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. *J. Mol. Catal. A* 145(1-2) (1999) 107-110.
 94. Kees, F., Spangler, S., Wellenhofer, M., Determination of macrolides in biological matrices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 287-293.
 95. Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M., Review. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A* 1216 (46) (2009) 7977-8015.
 96. Kirsch, N., Hedin-Dahlström, J., Henschel, H., Whitcombe, M.J., Wikman, S., Nicholls, I.A., Molecularly imprinted polymer catalysis of a Diels-Alder reaction, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58 (1-4) (2009) 110-117.
 97. Kishida, K., Furusawa, N., Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49-55.
 98. Kitzman, D., Wei, S.Y., Fleckenstein, L., Liquid chromatographic assay of ivermectin in human plasma for application to clinical pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40(4) (2006) 1013-1020.
 99. Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., Kurylowicz, W., *Antibiotics: Origin, Nature and Properties*, Ed. Elsevier, 2013.

100. Krcmar, P., Ruzickova, V., High-voltage electrophoretic identification of residual antibiotics in milk. *Vet. Med.* 41 (3) (1996) 93-95.
101. Kyle RA, Shampo MA. Selman A. Waksman. El descubrimiento de la estreptomicina por Selman A. Waksman. *JAMA* 243(24) (1980) 2494.
102. Lanza, F., Hall, A.J., Sellergren, B., Bereczki, A., Horvai, G., Bayoudh, S., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Anal Chim Acta*, 435 (2001) 91-106.
103. Laosa Zafra O., Ochoa Mazarro D., Frías Iniesta, J. Bases farmacológicas para el uso de antibióticos en pediatría. *Rev. Esp. de Pediatría*. 60 (1) (2004) 23-31.
104. Leal, C. Codony, R. Compañó, R. Granados, M., Frat, M.D., Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 285-290.
105. Leclercq R. y Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and strptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991b, 35, 1267-1272.
106. Leclercq R. y Courvalin P. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991a, 35, 1273-1276.
107. Lee, W.C., Cheng, C.H., Pan, H.H., Chung, T.H., Hwang, C.C., Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1101-1109.
108. Li, H., Wang, Z., Wu, B., Liu, X., Xue, Z., Lu, X., Rapid and sensitive detection of methyl-parathion pesticide with an electropolymerized, molecularly imprinted polymer capacitive sensor. *Electrochim. Acta* 62 (2012) 319-326.
109. Libro blanco sobre seguridad alimentaria. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas. 12.1.2000. COM (1999) 719 final.

-
110. Lilliam Cordiés Jackson, Looney Andrés Machado Reyes; María Lilliam Hamilton Cordiés. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. ACTA MEDICA 8(1) (1998) 13-27.
 111. Löffler, D., Ternes, T.A., Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1021 (2003) 133-144.
 112. Losee L. Ling, Tanja Schneider, Aaron J. Peoples, Amy L. Spoering, Ina Engels, Brian P. Conlon, Anna Mueller, Till F. Schäberle, Dallas E. Hughes, Slava Epstein, Michael Jones, Linos Lazarides, Victoria A. Steadman, Douglas R. Cohen, Cintia R. Felix, K. Ashley Fetterman, William P. Millett, Anthony G. Nitti, Ashley M. Zullo, Chao Chen & Kim Lewis. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature. 517 (2015) 455-459.
 113. Luo, Z., Du, W., Zheng, P., Guo, P., Wu N., Tang, W., Zeng, A., Chang, C., Fu, Q., Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to liquid chromatography for simple and selective analysis of penicilloic acid and penilloic acid in milk by matrix solid-phase dispersion. Food Chem. Toxicol. 83 (2015) 164-173.
 114. Macek, J., Ptáček P., Klíma, J., Determination of roxithromycin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. J. Chromatogr. B 723 (1999) 233-238.
 115. Marília de Lima, M., Coutinho Vieira, A., Martins, I., Bergamin Boralli, V., Bastos Borges, K., Costa Figueiredo, E., On-line restricted Access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. Food Chem. 197 A (2016) 7-13.
 116. Martín-Esteban, A., Fernández Hernando, P., Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos. En: Toma y tratamiento de muestras. Editora: Cámara, C. Ed. Síntesis S.A. Madrid, 2002.
 117. Martínez, J.A., Sánchez, F., Mecanismo de acción de los antibióticos. JANO 13 de julio – 6 de septiembre 2007. Nº 1660.
 118. Mastovska, K., Multiresidue Analysis of Antibiotics in Food of Animal Origin Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Methods Mol. Biol. 747 (2011) 267-307.

119. Mayes, A.G., Whitcombe, M.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1742.
120. McClure, E.L., Wong, C.S., Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 53-62.
121. McGlinchey, T.A., Rafter, P.A., Regan, F., McMahon, G.P., A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 1-15.
122. McGuire J M, Bunch R L, Anderson R C et al. *Anti biot. Chemother* 2 (1952) 281.
123. Mineo, H., Kaneko, S., Koizumi, I., Asida, K., Akahori, F., An analytical study of antibacterial residues in meat: the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. *Vet. Hum. Toxicol.* 34(5) (1992) 393-397.
124. Mirata, F. y Resmini, M. Molecularly imprinted polymers for catalysis and synthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 150, Chapter: Molecularly imprinted polymers in Biotechnology, (2015) 107-129.
125. Moats, W.A., Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotic residues in tissues and milk of food-producing animals. *J. Assoc. of Anal. Chem.* 68 (5) (1985) 980-984.
126. Monier, M., El-Sokkary, A.M.A., Preparation of molecularly imprinted cross-linked chitosan/glutaraldehyde resin for enantioselective separation of L-glutamic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 47 (2010) 207-213.
127. Montero, A., Althaus, R.L., Molina, A., Berruga, I., Molina, M.P., Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse 100®) for ewe milk. *Small Ruminant Res.* 57(2) (2005) 229-237.
128. Morais Ruela, A.L., Costa Figueiredo, E., Ribeiro Pereira, G., Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. *Chem. Eng. J.* 248 (2014) 1-8.
129. Mosbach, K., Mosbach, R. *Acta Chem. Scan.* 20 (1966) 2807.

-
130. Noticia en JANO.es del 27 de noviembre de 2014. Un total de 23 entidades crean la Red para el Descubrimiento de Antibióticos contra el auge de las bacterias multirresistentes.
 131. Omura, S., *Macrolide Antibiotics*. Academic Press (2002).
 132. Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P., Edder, P., Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2363-2374.
 133. Parisi, O.I., Morelli, C., Puoci, F., Saturnino, C., Caruso, A., Sisci, D., Trombino, G.E., Picci, N., Sinicropi, M.S., Magnetic molecularly imprinted polymers (MMIPs) for carbazole derivative release in targeted cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 6619-6625.
 134. Peipei, Q., Jincheng, W, Jing, J., Fan, S., Jiping, C., 2,4-dimethylphenol imprinted polymers as a solid-phase extraction sorbent for class-selective extraction of phenolic compounds from environmental water. *Talanta* 81 (2010) 1630-1635.
 135. Petz, M., Solly, R., Lymburn, M., Clear, M.H., Thin-layer chromatographic determination of erythromycin and other macrolide antibiotics in livestock products. *J. Assoc. of Anal. Chem.* 70 (4) (1987) 691-697.
 136. Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., Review: Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants. *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 48-61.
 137. Polyakov, M.V., Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur. Fiz. Kim.* 2 (1931) 799-805.
 138. Portillo, A., Mecanismos de resistencia a antibióticos macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en *Streptococcus* y *Enterococcus*. Universidad de la Rioja (2002).

139. Prasad, B.B., Srivastava, A., Prasad, A., Tiwari, M.P., Molecularly imprinted micro solid-phase extraction technique coupled with complementary molecularly imprinted polymer-sensor for ultra trace analysis of epinephrine in real samples. *Colloids Surf. B*, 113 (2014) 69-76.
140. Prats, C., Francesch, R., Arboix, M., Pérez, B., Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 766 (2001) 57-65.
141. Prieto, J.G., Merino, G., Pulido, M.M., Estevez, E., Molina, A.J., Vila, L., Alvarez, A.I., Improved LC method to determine ivermectin in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 639-645.
142. Primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos. "Antimicrobial resistance: global report on surveillance". World Health Organization. Abril 2014.
143. Qiao, F., Sun, H., Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 795-798.
144. Qiao, F., Yan, H., Simultaneous analysis of fluoroquinolones and xanthine derivatives in serum by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3551-3555.
145. Quint, M.L., de Souza, F.S., Spinelli, A., Domingos, J.B., Low-range detection of the phosphate group by a molecularly imprinted polymer-modified carbón paste electrode. *Sensors Journal, IEEE* 15 (2) (2014) 1012-1019.
146. Rachkov, A., Minoura, N., Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1544 (1-2) (2001) 255-266.
147. Ramírez, A., Gutiérrez, R., Díaz, G., González C., Pérez, N., Vega, S., Noa, M., High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 315-322.

-
148. Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
 149. Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.
 150. Reglamento (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.
 151. Reglamento (CEE) nº 2309/93 del Consejo de 22 de julio de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos.
 152. Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo 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.
 153. Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
 154. Resolución del Parlamento Europeo, de 11 de diciembre de 2012, sobre el desafío microbiano: la creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos. (2012/2041 (INI)).
<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=TA&reference=P7-TA-2012-0483&language=ES&ring=A7-2012-0373>

155. Reuvers, Th., Diaz, R, Martin de Pozuelo, M., Ramos, M., Rapid screening method for ivermectin residue detection in cattle muscle and liver by liquid chromatography with UV detection. *Anal. Chim. Acta* 275 (1993) 353-358.
156. Rezende, C.P., Souza, L.F., Almeida, M.P., Dias, P.G., Diniz, M.H., Garcia, J.C., Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory method for residues of macrolide antibiotics and lincomycin in kidney by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* 29(4) (2012) 587-595.
157. S.E. Jorgensen, B. Halling-Sorensen. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40, (2000) 691-699.
158. Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Blankenhorn, I., Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 199-210.
159. Sanli, S., Palabiyik, I.M., Sanli, N., Guzel-Seydim, Z.B., Alsancak, G., Optimization of the experimental conditions for macrolide antibiotics in high performance liquid chromatography by using response surface methodology and determination of tylosin in milk samples. *Anal. Chem.* 66 (2011) 838-847.
160. Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.T. *Chemosphere* 64 (2006) 497.
161. Schenck, F.J., Isolation and Quantification of ivermectin in bovine milk by matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.* 18 (2) (1995) 349-362.
162. Schlüsener, M.P., Spittler, M., Bester, K., Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1003(1-2) (2003) 21-28.
163. Scorrano, S, Longo, L., Vasapollo, G., Molecularly imprinted polymer for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine. *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 167-171.
164. Sellergren, B., Allender, C.J., Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1733-1741.

-
165. Sellergren, B., Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 227-252.
166. Sergeyeva, T.A., Chelyadina, D.S., Gorbach, L.A., Brovko, O.O., Piletska, E.V., Piletsky, S.A., Sergeeva, L.M., El'skaya, A.V., Colorimetric biomimetic sensor systems based on molecularly imprinted polymer membranes for highly-selective detection of phenol in environmental samples. *Biopolym. Cell.* 30 (3) (2014) 209-215.
167. Shinkai, S., Takeuchi, M., Molecular design of synthetic receptors with dynamic, imprinting, and allosteric functions. *Biosens. Bioelectron.* 20(6) (2004) 1250-1259.
168. Situ, C., Elliott, C.T., Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 89-96.
169. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Principios de Análisis Instrumental*, McGraw Hill, 5ª ed., 2003.
170. Sokol, J., Matisová, E., Dudriková, E., Cabadaj, R., Determination of tylosin in milk by HPLC using SPE. *Toxicol. Lett.* 88 (1996) 95-96.
171. Souza Caldas, S., Marian Bolzan, C., Jaime de Menezes, E., Venquiaruti Escarrone, A.L., Gaspar Martins, C.M., Blanchini, A., Gilberto Primel E., A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. *Talanta* 112 (2013) 63-68.
172. Stashenko, E.E., Martínez, J.R., Preparación de la muestra, un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica* 3 (1) (2011) 25-49.
173. Suárez, Víctor H., Mastitis en Ovejas Lecheras, Sitio Argentino de Producción Animal, Sanidad. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_leche/23-mastitis.pdf
174. Sun, H., Qiao, F., Liu, G., Liang, S., Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 154-159.

175. Swann, M.M., Baxter, K.L., Field, H.I. 1969. Report of the Joint Committee on the Use of Antibiotic in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO.
176. Takatsuki, K., Ushizawa I., Shoji, T., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring. *J. Chromatogr. A* 391 (1987) 207-217.
177. Tao, Y., Zhu, F., Chen, D., Wei, H., Pan, Y., Wang, X., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Z., Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction of multi-fenicol determination in shrimp and fish by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 150 (2014) 500-506.
178. Taylor, W.G., Danielson, T.J., Orcutt, R.L., Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle serum. *J. Chromatogr. B* 661 (2) (1994) 327-333.
179. Thangadurai, S., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of azithromycin in biological fluids. *Anal. Sci. Technol.* (2015).
180. Thurman, E.M., Mills, M.S., Solid-Phase Extraction. Principles and Practice (1998), Wiley-Interscience, New York.
181. Toldrá, F y Reig, M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci. Technol.* 17 (9) (2006) 482-489
182. Ton, X., Acha, V., Haupt, K., Sum Bui, B.T., Direct fluorimetric sensing of UV-excited analytes in biological and environmental samples using molecularly imprinted polymer nanoparticles and fluorescence polarization. *Biosens. Bioelectron.* 36 (1) (2012) 22-28.
183. Tong, Y., Li, H., Guan, H., Zhao, J., Majeed, S., Anjum, S., Liang, F., Xu, G., Electrochemical cholesterol sensor based on carbon nanotube@molecularly imprinted polymer modified ceramic carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 553-558.
184. Toreson, H., Eriksson, B.M., Determination of erythromycin in gastric juice and blood plasma by liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 673(1) (1995) 81-89.

-
185. Turiel, E., Martín-Esteban, A., Molecular Imprinting Technology in Capillary Electrochromatography. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 719-728.
 186. Turnipseed, S.B., Storey, J.M., Clark, S.B., Miller, K.E., Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7569-7581.
 187. Turnipseed, S.B., Toybal, J.E., Andersen, W.C., Kuck, L.R., Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 159-165.
 188. Urraca, J.L., Castellari, M., Barrios, C.A., Moreno-Bondi, M.C., Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 1-9.
 189. Van Poucke, C., Dumoulin, F., Van Petegheim, C., Detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation of the extraction solvent by experimental design. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 211-220.
 190. Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Review. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (9) (2011) 5908-5945.
 191. Visnjevski, A., Schomäcker, R., Yilmaz, E., Brüggemann, O., Catalysis of a Diels-Alder cycloaddition with differently fabricated molecularly imprinted polymers. *Catal. Commun.* 6(9) (2005) 601-606.
 192. Waldo H. Belloso. Historia de los antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires.* Vol. 29, nº 2, diciembre 2009.
 193. Wang Y.L., Liu, Z.M., Ren, J., Guo, B.H., Development of a Method for the Analysis of Multiclass Antibiotic Residues in Milk Using QuEChERS and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(8) (2015) 693-703.

194. Wang, J., Leung, D., 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 Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 3213-3222.
195. Wang, J., Leung, D., Chow, W., Chang, J., Wong, J.W., Development and Validation of a Multiclass Method for Analysis of Veterinary Drug Residues in Milk Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63(41) (2015) 9175-9187.
196. Wang, K., Guan, X., Chai, S., Zou, Q., Zhang, X., Zhang, J., A novel, molecularly imprinted polymer sensor made using an oligomeric methyl silsesquioxane-TiO₂ composite sol on a glassy carbon electrode for the detection of procainamide hydrochloride. *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 94-101.
197. Wang, L.Q., Lin, F.Y., Yu, L.P., A molecularly imprinted photonic polymer sensor with high selectivity for tetracyclines analysis in food. *Analyst*, 137 (2012) 3502-3509.
198. Wei, S., Mizaikoff, B., Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1794-1805.
199. Wei, S., Molinelli, A., Mizaikoff, B., Molecularly imprinted micro and nanospheres for the selective recognition of 17 β -Estradiol. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1943-1951.
200. Wibawa, J.I.D., Shaw, P.N., Barrett, D.A., Quantification of clarithromycin, its 14-hydroxy and decladinose metabolites in rat plasma, gastric juice and gastric tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 783 (2003) 359-366.
201. Wistuba, D., Schurig, V., Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 875(1-2) (2000) 255-276.
202. Wu, Z., Li, J., Zhu, L., Luo, H., Xu, X., Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 361-366.

-
203. Xue, C., Han, Q., Wang, Y., Wu, J., Wen, T., Wang, R., Hong, J., Zhou, X., Jiang, H., Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 199-203.
204. Xue, Q., Qi, Y., Liu, F., Ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of antibiotic residues in environmental waters. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22(21) (2015) 16857-16867.
205. Yan, H., Cheng, X., Sun, N., Cai, T., Wu, R., Han, K., Rapid and selective screening of melamine in bovine milk using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 908 (2012) 137-142.
206. Yan, H., Wang, H., Qiao, J., Yang, G., Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2182-2188.
207. Yang, S., Carlson, K.H., Solid-phase extraction--high-performance liquid chromatography--ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 141-155.
208. Yin, J., Yang, G., Chen, Y., Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 68-75.
209. Zhang, H., Piacham, T., Drew, M., Patek, M., Mosbach, K., Ye, L., Molecularly imprinted nanoreactors for regioselective Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (13) 2006 4178-4179.
210. Zhao, N., Hu, X.L., Guan, P., Song, R.Y., Tian, T., Zhang, X.R., Preparation of erythromycin-imprinted polymeric microspheres by emulsion polymerization and their adsorption properties *Acta Physico-Chimica Sinica* 30 (1) (2014) 121-128.

211. Zheng, H.B., Mo, J.Z., Zhang, Y., Gao, Q., Ding, J., Yu, Q.W., Feng, Y.Q., Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in milk samples. *J. Chromatogr. A* 1329 (2014) 17-23.
212. Zhong, D., Shi, X., Sun, L., Chen X., Determination of three major components of bitespiramycin and their major active metabolites in rat plasma by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 791 (2003) 45-53.
213. Zhou, T., Jorgensen, L., Matthebjerg, M.A., Chronakis, I.S., Ye, L., Molecularly imprinted polymer beads for nicotine recognition prepared by RAFT precipitation polymerization: a step forward towards multi-functionalities. *RSC Adv.* 4 (2014) 30292-30299.
214. Zhou, Y., Zhou, T., Jin, H., Jing, T., Song, B., Zhou, Y., Mei, S., Lee, Y.I., Rapid and selective extraction of multiple macrolide antibiotics in foodstuff samples based on magnetic molecularly imprinted polymers. *Talanta* 137 (2015) 1-10.
215. Zou, Q.H., Liu, Y., Xie, M.X., Han, J., Zhang, L., A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 184-91.