

Un nuevo método para analizar ampicilina en aguas ambientales mediante Polímeros de Impronta Molecular

Dionis Sarmiento y Beatriz Soledad

Universidad Católica Andrés Bello

Resumen

Las bajas concentraciones de antibióticos en aguas ambientales requirieron técnicas altamente sensibles y con capacidad de reconocimiento del analito para lograr su detección y extracción y los Polímeros de Impronta Molecular combinados con la extracción en fase sólida (MISPE) son empleados para la limpieza y concentración. En esta investigación, se presenta un nuevo método de análisis de ampicilina presente en aguas ambientales. Se validó la metodología desarrollada AMP-MISPE, obteniéndose muy buena recuperación de la AMP con el método de extracción desarrollado, quedando demostrada la posibilidad de utilizar el AMP-MIP en un sistema de extracción en fase sólida en aguas ambientales.

Palabras clave: Contaminante ambiental, Polímero de Impronta Molecular (MIP), Ampicilina, Espectrofotometría UV-Visible

A new method to analyze ampicillin in environmental waters using Molecularly Imprinted Polymers

Abstract

The low concentrations of antibiotics in environmental waters require highly sensitive techniques with the ability to recognize the analyte to achieve its detection and extraction and the Molecularly Imprinted Polymers combined with solid phase extraction (MISPE) are used for cleaning and concentration. In this research, a new method of analysis of ampicillin present in environmental waters is presented. The methodology developed AMP-MISPE was validated, obtaining very good recovery of the AMP with the extraction method developed, demonstrating the possibility of using the AMP-MIP in a solid phase extraction system in environmental waters.

Keywords:

Environmental pollutant, Molecularly Imprinted Polymer (MIP), Ampicillin, UV-Visible Spectrophotometry

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de los antibióticos es sin duda uno de los problemas más perturbadores por los que atraviesa la medicina desde hace muchos años, facilitando la liberación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que ayudan a las bacterias a aumentar la resistencia a ellos y colonizar ambientes en los que normalmente no podrían sobrevivir. Estos fragmentos no degradados completamente una vez excretados, generan contaminación ambiental, siendo el agua uno de los principales componentes susceptibles de ser contaminado (Rodríguez, Chamorro, Martí, Huerta, Gros, Sánchez, Borrego, Barceló y Balcázar, 2015).

El Lago de Valencia está localizado entre los estados Aragua y Carabobo y se halla en el tramo central de la Cordillera de la Costa, aproximadamente entre los 9°55' y 10°24' de latitud norte y los 67°25' y 68°00' de longitud oeste (Cárdenas y Mirena, 2014).

Diferentes ríos cargados de aguas residuales vierten sus aguas en el lago de Valencia, incrementando su nivel de tal forma que las poblaciones que habitan en sus alrededores presentan graves problemas por el desbordamiento de sus aguas. Actualmente se continúa haciendo hincapié en la detección y solución de los múltiples inconvenientes que presenta el lago de Valencia, así como la cantidad de desechos de diferentes composiciones y orígenes que contribuyen con la degradación de esta cuenca (Villarrol, 2016).

El uso indiscriminado de antibióticos, así como el escaso tratamiento a las aguas residuales, afectan indudablemente al lago de Valencia que ecológicamente es una muestra palpable del creciente deterioro y degradación ambiental del único ecosistema lacustre de tipo endorreico existente en Venezuela. Las aguas sin tratamiento, provocan envenenamiento de la vida acuática, al extremo que en muchos casos esta situación afecta a embalses para el consumo de comunidades, y donde pocas industrias y complejos hoteleros han instalado las requeridas plantas de tratamiento que establece el ordenamiento jurídico sobre la materia, es por esto, que se deben tomar medidas en un futuro lo bastante cercano para disminuir o erradicar este hecho que sin duda multiplicará los problemas de salud y desarrollo en diferentes áreas que le concierne a la nación.

La importancia de analizar la presencia de residuos en el ambiente, implica llevar a cabo una serie de fases para la evaluación de los riesgos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, 2002) y la necesidad de controlar la presencia de antibióticos a niveles de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, requiere de métodos analíticos sensibles y selectivos capaces de alcanzar los límites requeridos por la legislación vigente según el Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, Commission of the European Communities.

De evidenciarse cualquier tipo de contaminación, como los mencionados anteriormente, se pudiese estar frente a patógenos tan resistentes a ciertos antibióticos que la medicina conocida de momento probablemente no cuente con un fármaco para estos organismos con nuevas características. Es por esto que el desarrollo de un método analítico para la determinación de ampicilina en aguas utilizando espectrofotometría UV-Vis y Polímeros de Impronta Molecular (MISPE) representa sin duda el primer escalón para poder proceder en diversas líneas de investigación.

Actualmente se dispone de avances tecnológicos como la impresión molecular, que consiste en la elaboración de polímeros sintéticos altamente estables, llamados Polímeros de Impronta Molecular (MIPs). Estos polímeros son capaces de realizar un reconocimiento molecular selectivo del analito, es decir, la matriz del polímero posee grupos funcionales complementarios en forma y posición a la estructura del analito (Pérez, C. 2015., Soledad, B y col, 2017). En virtud de sus propiedades, los MIPs son utilizados en los distintos estudios que requieran de un análisis de muestra específico como

adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida (SPE) o como fases estacionarias en cromatografía (HPLC) y electro cromatografía capilar; siendo su función como adsorbentes selectivos en SPE, la de mayor aplicación; esta combinación de MIPs y la técnica de SPE, es conocida como el método MISPE (Del Cacho, C. 2009)

Por lo expuesto anteriormente, se plantea la utilización de la técnica de Espectrofotometría UV combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE) para la determinación de ampicilina (AMP), un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas y con gran uso a nivel mundial, en las aguas del Lago de Valencia.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar un método analítico para determinar la concentración de ampicilina en las aguas del Lago de Valencia mediante la técnica de Espectrofotometría UV combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Reactivos y soluciones

Los disolventes utilizados en esta investigación fueron los siguientes: acetonitrilo grado HPLC (ACN) (Sigma-Aldrich, Alemania), Metanol grado HPLC (Burdick y Jackson, USA). Ácido Acético (Fluka, Alemania). Fosfato monobásico de potasio (Riedel-de Hæen, Alemania). Nitrógeno gaseoso (AGA, Venezuela). AMP grado USP (donada por Laboratorios Spedar, Venezuela). Peróxido de hidrógeno al 30 %, PERDROGEN® Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido metacrílico (MAA) y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (Advance Scientific and Chemical Inc. Florida, USA)

Las disoluciones patrón de la AMP de 200 ppm se prepararon disolviendo 300 mg de ampicilina USP al 96,78 % en 100 mL de una solución de agua: acetonitrilo (9:1 v/v). Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente de acuerdo a la dilución apropiada a partir de la disolución patrón.

Las muestras de agua utilizadas como medio líquido para el depósito de ampicilina, fueron recolectados del Lago de Valencia. Las muestras de agua se tomaron en la superficie y fueron colocadas en frascos de vidrio con tapa de baquelita y transportadas al laboratorio manteniéndose refrigeradas en una cava con hielo. En el laboratorio se mantuvieron refrigeradas a 5 °C hasta su uso.

b. Materiales y Equipos

Los materiales y equipos utilizados en este trabajo de investigación fueron: para el análisis por espectrofotometría UV-Vis, se empleó un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis.

c. Síntesis del MIP

El MIP fue preparado por la técnica de polimerización, de acuerdo a una aproximación no covalente, usando MAA como monómero funcional, EGDMA como monómero entrecruzante, ACN como disolvente porogénico y peróxido de hidrógeno como iniciador, utilizando la siguiente relación molécula molde/monómero/entrecruzante (0.010 gramos de AMP (2.2 mM) fue disuelta en ACN (10 mL) en un

SARMIENTO Y SOLEDAD

tubo de vidrio y se agitó en un vortex. Los compuestos se mezclaron en el vortex durante 10 minutos y nuevamente se sometieron a agitación. La mezcla se purgó con nitrógeno durante 5 minutos, se cerró el frasco y selló con plastifilm. La mezcla de polimerización se sometió a la acción de una lámpara UV a una temperatura de 28 °C durante 24 horas. Durante este periodo, se produce la polimerización. Una vez formado el polímero, éste se extrajo del tubo de ensayo mediante una espátula y agua destilada, se colocó en un mortero, se trituró y se tamizó en húmedo con un tamiz de acero inoxidable de tamaño de poro de 300 µm. Se filtró para eliminar el líquido y se lavó primeramente con etanol, luego con metanol. El polímero se dejó secar en campana, y se guardó hasta su uso. Se preparó un polímero no impreso (NIP), en iguales condiciones, pero sin la molécula molde, con propósitos comparativos.

d. Procedimiento de extracción de molécula molde de los MIPs

Se preparó el cartucho SPE (longitud de 65 mm y 10 mm de diámetro) colocando al fondo de una jeringa plástica, papel de filtro para evitar la pérdida del MIP y 300 mg del MIP. Se colocó sobre un kitasato con tapa con orificio y se procedió a extraer la ampicilina, empleada como molécula molde.

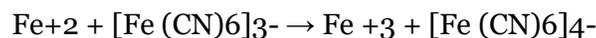
Se realizaron de 4 a 5 lavados con 1 ml de una mezcla metanol-ácido acético 1 M (9:1 v/v). El filtrado fue utilizado para evaluar la presencia de la ampicilina, empleando el método espectrofotométrico basado en el desarrollo del complejo azul de Prusia, que se desarrollará posteriormente.

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

e. Procedimiento de detección cuantitativa de ampicilina en la disolución extractante

El método espectrofotométrico usado para tal fin consiste en la formación del complejo azul de Prusia, método rápido y económico que ha sido empleado para cuantificar antibióticos en preparaciones farmacéuticas (El-Obeidy colaboradores, 1999., Salem, H., Saleh, G., 2002., Okoye y colaboradores, 2007., Farhadi y colaboradores, 2002). El procedimiento se describe a continuación:

A 6 mL del filtrado (disolución conteniendo ampicilina), se le agregó 1 mL de HCl 0,4 M, en un tubo de ensayo de 15 mL. La disolución se calentó a 70 °C durante 45 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de FeCl₃ 0,03 M y 0,25 mL de hexacianoferrato (III) de potasio 0,008 M. La aparición de un color azul intenso indica la presencia de la ampicilina. El producto de la hidrólisis del anillo β-lactámico del antibiótico es capaz de convertir el Fe⁺³ a Fe⁺², y este último reacciona con el hexacianoferrato (III) para dar el complejo coloreado. La reacción es la siguiente:



El análisis cuantitativo de la ampicilina se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia de la muestra obtenida después del tratamiento MISPE, a una longitud de onda de 680 nm, en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV- Vis.

f. Caracterización del agua del Lago de Valencia

i. Análisis Físicoquímicos

a) Determinación de pH

Se añadieron 25 ml del agua del lago de Valencia medidos en un cilindro graduado de 50 ml, en un vaso de precipitado de 100 ml, se dejó reposar por 2 minutos y finalizado este tiempo se tomó registro del pH de la solución con el pHmetro. Dicha determinación se realizó por triplicado.

b) Determinación de la Temperatura

Se registró la temperatura en diferentes puntos del lago, a una distancia equidistante entre sí al momento de la colección respectiva.

b) Color y turbiedad

La muestra se percibió incolora y transparente, sin turbiedad. Este análisis solo se hizo por apariencia visual

ii. Análisis Microbiológicos

Los procedimientos seguidos para los análisis microbiológicos realizados se detallan a continuación

a) Determinación de aerobios mesófilos

La determinación de aerobios mesófilos se efectuó siguiendo el método descrito en la Norma COVENIN 902-87 (2ª revisión), mediante el recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri, colocando 1 ml de la muestra y añadiendo agar triptosa glucosa levadura, previamente fundido y a temperatura entre 45-50 °C. Se incubó a 32 °C ± 1 °C por 48 h y se hizo el conteo de las UFC.

b) Determinación de hongos y levaduras

La determinación de aerobios mesófilos se efectuó siguiendo el método descrito en la Norma COVENIN 1337-90 (1ª revisión), mediante el recuento de colonias de mohos y levaduras en placas de Petri, colocando 1 ml de la muestra y añadiendo agar papa-dextrosa para el recuento en placas, previamente fundido y a temperatura entre 45-50 °C. Se incubó en posición invertida en la oscuridad a 20-25 °C por 3-5 días y se hizo el conteo de las UFC.

c) Determinación de coliformes totales, coliformes fecales y E. coli

La determinación de coliformes totales, fecales y E. coli, se realizó siguiendo el procedimiento de la Norma COVENIN 1104:1996 (2ª revisión). El Método consistió en inocular volúmenes conocidos de la muestra en cada uno de 3 tubos de ensayo con tubos de fermentación incorporados y el medio de cultivo caldo lauril sulfato triptosa. Después del período de incubación a 35 °C ± 1°C durante 24 h ± 2 h, se tomó nota de los tubos que presentaron formación de gas, se confirmó en el medio de cultivo apropiado y se obtuvo el Número Más Probable de coliformes. Para la evaluación de los coliformes fecales se evaluó la capacidad de las bacterias para fermentar lactosa y producir gas cuando fueron incubada a una

temperatura de $44,5\text{ C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por un período de 24 a 48 horas. La búsqueda de *E. coli* se realizó a partir de los tubos positivos de caldo EC y sembrados en el medio bilis verde brillante.

g. Procedimiento MISPE

A continuación, se describen las fases del método de extracción en fase sólida (SPE):

i. Preparación del Cartucho SPE

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

Para la preparación de las columnas MISPE, se pesaron 300 mg de polímero de impronta molecular tamizado y este fue empaquetado en el cuerpo de la jeringa colocando un papel de filtro de 0,015 gramos al fondo del cartucho para evitar la salida del polímero, este se colocó en un kitasato sobre el cual se insertó un tapón con orificio.

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

Los pasos a seguir en este procedimiento son los siguientes: acondicionamiento, carga, lavado y elución. Las columnas fueron acondicionadas previamente con un volumen de 3x1 mL de acetonitrilo. Una vez acondicionados los polímeros, las columnas se cargaron con 6 mL (sobrenadante) de la muestra de agua del lago cargado con 8 ppm de ampicilina.

Después de cargado el antibiótico en las columnas de MISPE, estas fueron lavadas con dos porciones de 2 ml de acetonitrilo, con la finalidad de eliminar las interacciones no específicas. Los extractos procedentes de los lavados se recogieron para su análisis evaluando si existía formación del complejo de azul de Prusia, y así determinar la presencia o ausencia de ampicilina.

Al finalizar el lavado de los polímeros, el analito se eluyó con tres porciones de 2 mL de una mezcla de metanol: ácido acético 1 N (198,8:1,2 v/v). El procedimiento se hizo por triplicado.

ii. Validación del método analítico

La validación del método analítico fue llevada a cabo analizando los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) usando muestras de agua del lago a las cuales se añadió cantidades conocidas de AMP bajo las condiciones optimizadas del MISPE. Para el estudio de la linealidad, se preparó una curva de calibración con concentraciones del antibiótico en un rango de 1 a 5 ppm (mg/L) evaluando el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta. La exactitud y precisión se basó en los análisis de los patrones de AMP a tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del rango establecido. Se hicieron tres replicas para cada nivel de concentración preparado. La exactitud se evaluó mediante la recuperación (medida de la efectividad del proceso de extracción) y fue verificada por la desviación estándar relativa (DER) de la serie de medidas. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad (precisión intradiaria) y la reproducibilidad (precisión interdiaria) basada en las 3 determinaciones para cada una de las

concentraciones estudiadas del antibiótico. Se calcularon los porcentajes de la DER. La sensibilidad del método es la habilidad para discriminar pequeñas diferencias en la concentración del analito y se evaluó por el LOD y el LOQ. La LOD es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada y puede ser distinguida de un blanco analizado bajo las mismas condiciones. La LOQ es definida como la mínima cantidad de analito requerida para obtener un resultado significativo que pueda distinguirse con una probabilidad conocida de un blanco analizado bajo las mismas condiciones con precisión y exactitud. La LOD y LOQ fueron determinadas basadas en la relación señal-ruido de 3 ($S/N = 3$) y 10 ($S/N = 10$), respectivamente, de acuerdo a la Guía para la industria de la FDA (2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos

a. Preparación del polímero de impresión molecular

Se llevó a cabo la síntesis de un polímero de impresión molecular, MIP y de un polímero no impreso (NIP), mediante la técnica de polimerización en bloque e impresión no covalente, utilizando radiación con luz ultravioleta en frío.

Tabla 1. Composición molar de los polímeros sintetizados.

Polímero	Ampicilina	Monómero funcional MAA	Entrecruzante EGDMA
MIP	1	100	500
NIP	0	100	500

b. Caracterización del agua del Lago de Valencia

a) Análisis fisicoquímico

Los resultados obtenidos del pH, Temperatura, color y turbiedad se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis fisicoquímicos del agua del lago de Valencia

Característica	Valor obtenido
pH	7.5
Temperatura	26 °C
Color y turbiedad (apariencia visual)	Sin color y transparente

b) Análisis Microbiológico

Los resultados obtenidos de los análisis de aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales, coliformes fecales y E. coli, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis microbiológicos del agua del lago de Valencia

Característica	Valor obtenido
Aerobios	> 10.000
Hongos y levaduras	> 10.000
Coliformes totales	presente
Coliformes fecales	presente
E. coli	presente

Como se desprende de los resultados obtenidos, se observa que el agua del lago de Valencia tiene un pH ligeramente alcalino, se encuentra sin color y es transparente y presentan alta contaminación dentro del punto de vista microbiológico. En conjunto estas características propician unas condiciones favorables para el estudio de un método como el MISPE, donde se requiere la menor interferencia posible.

c. Metodología MISPE

Las condiciones óptimas para el método MISPE encontradas se presentan a continuación:

- El mejor acondicionamiento del polímero en los cartuchos MISPE para un óptimo enlazamiento del analito al MIP se obtuvo utilizando una cantidad de 1 mL de acetonitrilo (3x1 mL).
- La cantidad adecuada de ampicilina para la carga del cartucho MISPE fue de 6 mL de una disolución de una concentración de 8 ppm.
- El lavado de los polímeros de impronta molecular una vez que se han cargado con el antibiótico debe efectuarse con acetonitrilo (2x1 mL).
- La mezcla de disolventes para la extracción de la ampicilina de los polímeros de impronta molecular con la cual se obtiene la mejor extracción de la molécula molde es metanol: ácido acético 1 N (198,8:1,2 v/v) (3x1 mL).

d. Determinación de la concentración de ampicilina extraída de la muestra de agua del lago por el método MISPE a través de la espectrofotometría UV-Vis

La metodología MISPE desarrollada fue validada determinando la linealidad, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) usando muestras de agua del lago a las cuales se añadió cantidades conocidas de AMP bajo las condiciones optimizadas del MISPE. La linealidad del método de espectrofotometría UV-Vis, fue evaluado en el rango de 1 a 5 ppm. La recta de calibración obtenida ($y = 0,0576x - 0,0312$) mostró linealidad con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9943$. El límite de detección y el límite de cuantificación para la disolución, calculado según la FDA (2000) fueron 0,414 mg L⁻¹ y 1,380 mg L⁻¹ respectivamente. La precisión del método analítico desarrollado se ha evaluado en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad, a tres niveles de concentración, 3,33.,

SARMIENTO Y SOLEDAD

4,00 y 4,67 mg L⁻¹, los cuales representan respectivamente, el 80, 100 y 120 % del valor máximo de residuo permitido. Para conseguir detectar estos niveles, se ha utilizado 1 g de muestra, a la que se le ha adicionado ampicilina para que tengan concentraciones de 10, 12 y 14 mg L⁻¹ lo que conlleva a concentraciones finales en el eluato de 3,33, 4,00 y 4,67 respectivamente, y se le ha sometido al procedimiento MISPE completo detallado en el apartado de metodología. La repetibilidad se ha evaluado realizando 3 ensayos idénticos en el mismo día y se han obtenido valores de desviación estándar relativa (RSD) menores al 20 %. La reproducibilidad del método se ha determinado en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero llevando a cabo el experimento en días distintos. La reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (RSD) resultó 22,9, 35,6 y 17,6 %, para los niveles bajo, medio y alto respectivamente.

El porcentaje de error obtenido en los análisis efectuados para las tres concentraciones evaluadas (3,33, 4,00 y 4,67 mg L⁻¹), se encuentra en -5,66, -18,58 y -14,78 %, respectivamente. Los valores esperados para análisis con concentración del analito superiores a 100 µg Kg⁻¹ deben encontrarse dentro del rango de -20 hasta 10 % establecidos en la FDA (2000) indicando esto una buena exactitud del método para concentraciones superiores a los 3,3 mg L⁻¹.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye:

- Se sintetizó un polímero de impronta molecular a través un proceso de polimerización en bloque, no covalente, empleando la radiación UV como metodología de polimerización, y utilizando la ampicilina como molécula molde
- Se caracterizó el agua del Lago de Valencia, resultando un agua con pH ligeramente alcalino, y contaminada microbiológicamente lo que pudiese interferir con la absorción de la ampicilina por el MIP
- Se desarrolló, optimizó y validó un método analítico para la identificación, determinación y cuantificación de ampicilina en soluciones a baja concentración (3,33ppm, 4,0 ppm y 4,67 ppm) a través de la técnica de Espectrofotometría UV combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE), el cual resultó ser sencillo, rápido, económico y sensible para el análisis de este tipo de compuestos.
- Se empleó un polímero de impronta molecular como adsorbente de la extracción fase sólida (MISPE) para la extracción selectiva de ampicilina, el cual resultó sensible y efectivo en la captación de la misma.
- Se determinó la concentración de ampicilina extraída por el método MISPE a través del espectrofotómetro Genesys UV 10 obteniendo valores positivos y dentro del rango de aceptación estadística, para las concentraciones de 3,33 ppm, 4,0 ppm, y 4,67 ppm, dicho proceso tuvo una duración de 10 minutos.
- Se validó la metodología desarrollada AMP-MISPE, la curva de calibración obtenida mostró una linealidad en el intervalo estudiado de 1 ppm a 5 ppm con un coeficiente de determinación de R²= 0,9943, con una precisión menor al 20 %. El Límite de Detección (LOD) calculado en términos de

concentración del analito en la solución, fue de 0,414 mg L⁻¹ y el Límite de Cuantificación (LOQ) fue de 1,38 mg L⁻¹.

- Con los resultados obtenidos se propone el procedimiento seguido en esta investigación para el análisis de muestras de aguas ambientales, quedando demostrada la posibilidad de utilizar el AMP-MIP en un sistema de extracción en fase sólida.
- Para las tres concentraciones evaluadas correspondientes al 80 %, 100 % y 120 %, se obtuvo muy buena recuperación del analito con el método de extracción desarrollado, obteniéndose valores de -5,66., -18,58 y -14,78 %, respectivamente.

6. REFERENCIAS

- Cárdenas, S., y Mirena, W. (2014). Desplazamientos poblacionales del Sector La Cabrera en el Municipio Diego Ibarra: Consecuencia socio-ambiental del aumento del espejo de agua del Lago de Valencia (tesis de pregrado). Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
- Del Cacho, C. 2009. Polímeros de Impresión Molecular para la Determinación de Insecticidas. (en línea). Consultado el 05 de marzo de 2017. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9670/1/T31022.pdf>
- Fernanda, B. (2014). La contaminación del agua en Carabobo visto desde la prensa (trabajo de grado). Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, Venezuela.
- El-Obeid H. A., Gad-Kariem E. A., Al-Rashood K. A., Al-Khamees H. A., El-Shafie F. S., Bawazeer G. A. M. 1999. A selective colorimetric method for the determination of penicillins and cephalosporins with α -aminoacyl functions. *Analytical letters*. 32 (14): 2809- 2823.
- Farhadi, K., Ghadamgahi, S., Maleki, R., Feridoun, S. (2002) Spectrophotometric determination of selected antibiotics using Prussian blue reaction. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 49 (6): 993-997
- Food and Drug Administration. 2000. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- COVENIN 902-87 Alimentos. Método para recuento de microorganismos aerobios en placas de Pietri (2^a revisión), República Bolivariana de Venezuela, 2001.
- COVENIN 1104:96 Alimentos. Determinación del número más probable de coliformes fecales y de *Escherichia coli*. (2^a revisión), 2001.
- COVENIN 1337-90 Alimentos. Método para recuento de mohos y levaduras (1^a revisión), República Bolivariana de Venezuela, 2001.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2002). Parte I: Aditivos distintos de los microorganismos y las enzimas. Boletín Oficial del Estado. N° 40. Pág. 6096-6109. Madrid, España. Recuperado de: <http://www.agrodigital.com/upload/2/20/orden%20apa%202732002%20sobre%20lineas%20para%20la%20evaluacion%20de%20aditivos%20en%20alimentacio%20animal.pdf> [Consulta: 2014, Octubre 11]

- Okoye, N., Godwin, I., Ukwueze, N., Okoye, F. (2007). Spectrophotometric determination of some cephalosporin antibiotics using Prussian blue reaction. *Scientific Research and Essay*. 2 (8): 342-347.
- Pérez, C. 2015. Síntesis y Caracterización de Polímeros de Impresión Molecular para Aplicaciones Analíticas.(en línea). Consultado el 5 de mayo de 2016. Disponible en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/16054>
- Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (DOCE L224/1990).
- Rodríguez, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez, Á. Borrego, C., Barceló D., y Balcázar, J. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Salem, H., Saleh, G. (2002) Selective spectrophotometric determination of phenolic betalactam antibiotics. *J Pharm Biomed Anal*. 28(6): 1205-13
- Soledad-Rodríguez, B., Fernández-Hernando, P., Garcinuño-Martínez, R y Durand-Alegría, J (2017). Effective determination of ampicillin in cow milk using a molecularly imprinted polymer as sorbent for sample preconcentration. *Food Chemistry*. 224, 1:432–438
- Villarroel, M. (2016, 10 de agosto). Administración y servicios trabaja para solucionar problemática del agua a nivel nacional. Caracas, Venezuela: Asamblea Nacional. Recuperado de: <http://www.asambleanacional.gob.ve/noticia/show/id/16046>