

Desarrollo de un método analítico para determinar amikacina mediante Polímeros de Impronta Molecular combinados con Extracción en Fase Sólida (MISPE)

Gabriel Suárez-Torres y Beatriz Soledad

Universidad Católica Andrés Bello

Resumen

Para determinar antibióticos en el ambiente, es necesario disponer de 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 amikacina. Se validó la metodología desarrollada AMK-MISPE, obteniéndose buena recuperación de la AMK con el método de extracción desarrollado, quedando demostrada la posibilidad de utilizar el AMK-MIP en un sistema de extracción en fase sólida.

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

Development of an analytical method to determine amikacin using Molecularly Imprinted Polymers combined with Solid Phase Extraction (MISPE)

Abstract

To determine antibiotics in the environment, it is necessary to have highly sensitive techniques with the ability to recognize the analyte to achieve its detection and extraction and molecularly imprinted polymers combined with solid phase extraction (MISPE) are used for cleaning and concentration. In this research, a new test method for amikacin is presented. The methodology developed AMK-MISPE was validated, obtaining good recovery of AMK with the extraction method developed, demonstrating the possibility of using AMK-MIP in a solid phase extraction system.

Keywords:

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

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos después de ser ingeridos por personas y animales enfermos, son metabolizados y posteriormente excretados por las heces, orina o sudor y estos desechos llegan a suelos, aguas residuales o vertederos generando contaminación ambiental. La presencia de estos residuos puede alterar de forma drástica un ecosistema, así como el impacto ambiental generado por la contaminación, además de la evolución de bacterias que crean resistencia ya sea por mutación o transmisión horizontal génica. Señala Martínez, J (2010), que los desechos industriales también contienen bacterias patógenas, las cuales entran en contacto con los microorganismos ambientales generando otras consecuencias, por ejemplo, favoreciendo el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos, considerando estos ambientes como “reactores de resistencia” o “productores de resistencias”. Esto constituye el primer paso en la transmisión de determinantes de resistencia de bacterias ambientales a las patógenas.

Dado el complejo impacto ambiental que tienen estos desechos, es necesario profundizar en las investigaciones para reconocer y cuantificar los daños al ecosistema, la evolución de ciertas bacterias, las resistencias de estas, etc.

Por otra parte, es necesario desarrollar técnicas analíticas que permitan acceder a esa cuantificación, como un correcto muestreo del suelo o del agua ambiental, el empleo de técnicas adecuadas para la limpieza y preparación de la muestra con la finalidad de eliminar sustancias interferentes y realizar el análisis cuantitativo para determinar la presencia y cantidad de uno o varios antibióticos. Es por esto que el desarrollo de un método analítico para la determinación de amikacina en ambiente utilizando espectrofotometría UV-Vis y Polímeros de Impronta Molecular combinados con extracción en fase sólida (MISPE) representa sin duda el primer escalón para poder proceder en diversas líneas de investigación.

En la actualidad, avances tecnológicos como la impresión molecular, permiten obtener polímeros sintéticos altamente estables, llamados Polímeros de Impronta Molecular (MIPs). Esta es una técnica novedosa y valiosa que permite conseguir esos métodos selectivos sensibles necesarios para determinar antibióticos, entre otros agentes químicos. Busca producir en la matriz del polímero, unos espacios selectivos que reconocen una molécula en particular; son sensibles, no se degradan por acción enzimática, tampoco les afecta el calor, pH o presión, imitan receptores naturales, muestran una gran selectividad y afinidad y además pueden ser sintetizados fácilmente a un bajo costo. Por el bajo precio de los reactivos necesarios para crearlos, se pueden producir en grandes cantidades y por las ventajas que presenta, son empleados dentro de muchos métodos analíticos para determinar contaminantes (Barranco, A., Argarate, N y Baliño, L 2007, Soledad, B y col, 2017, Pérez, C. 2015.). Los MIPs son utilizados en estudios que requieran un análisis de muestra específico como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida (SPE) permitiendo pre-concentrar la muestra a ser analizada. La combinación de MIPs y la técnica de SPE, conocida como el método MISPE, permite obtener buenos resultados ya que la muestra contendría pocos residuos de interferentes y el analito de interés casi en su totalidad. (Del Cacho, C. 2009)

Por lo expuesto anteriormente, se plantea la utilización de la técnica de Espectrofotometría UV-Vis combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE) para la determinación de amikacina (AMK), un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos y utilizado en diferentes infecciones bacterianas como en las articulaciones, meningitis, infecciones del tracto urinario, entre otros.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar un método analítico para determinar la concentración de amikacina mediante la técnica de Espectrofotometría UV-Vis 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). Nitrógeno gaseoso (AGA, Venezuela). AMK grado USP (Productos Farmacéuticos Ronava, C.A y Vitalis). 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 AMK de 2500 ppm se prepararon disolviendo 0.1 ml de amikacina en 7.9 ml de agua destilada y añadiendo al final 2 ml de ninhidrina para completar 10 ml. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente de acuerdo a la dilución apropiada a partir de la disolución patrón.

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.

b. 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 molar molécula molde/monómero/entrecruzante: 1/100/500. Para su síntesis, 12.5 mg de AMK fue disuelta en ACN (10 mL) en un 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 48 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.

c. 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 amikacina, 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 amikacina, empleando el método espectrofotométrico conjugado con el púrpura de ninhidrina

Este procedimiento de extracción se repitió tantas veces como fue necesario hasta la no detección de amikacina 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.

d. Procedimiento de detección cuantitativa de amikacina en la disolución extractante

El llamado método de la ninhidrina y método usado en el presente estudio, permite determinar aminoácidos que presenten un grupo carboxilo y un grupo amino libres. Esta reacción es general para todos los aminoácidos con sólo dos excepciones: prolina e hidroxiprolina, siendo ambos iminoácidos. La ninhidrina reacciona con los aminoácidos siempre y cuando el medio sea ácido (pH 3 – 4) y en caliente, produciéndose amoníaco, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura-azulado. Este complejo el cuál generalmente es púrpura mientras más se deje calentar absorbe longitudes de onda entre 400 y 570 nm. La cantidad de color que se cuantifique será igual a la cantidad de aminoácido presente. Para esta determinación es conveniente eliminar previamente sustancias como proteínas, amoníaco y urea, que pueden reaccionar con el reactivo e interferir en el estudio de aminoácidos deseados (Roca P, Oliver J y Rodríguez, A, 2003).

e. El procedimiento se describe a continuación:

El filtrado (disolución conteniendo amikacina con ninhidrina), se colocó en un tubo de ensayo con tapa de baquelita de 15 mL. Se colocó en un vaso de precipitado con agua y se calentó en baño de María hasta llegar al punto de ebullición. Se detuvo el calentamiento al aparecer el color púrpura. La reacción de la ninhidrina con el grupo amino de los aminoácidos se presenta en la figura 1:

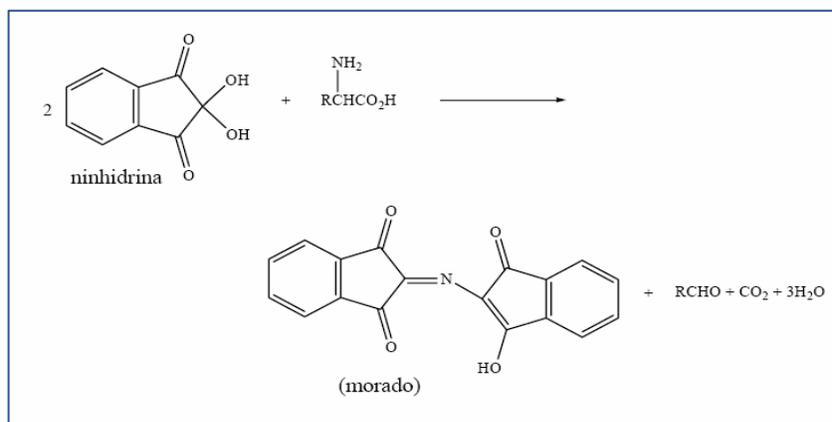


Figura 1. Reacción de ninhidrina con el grupo amino de los aminoácidos

El análisis cuantitativo de la amikacina se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia de la muestra obtenida después del tratamiento MISPE, a una longitud de onda de 400 nm, en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV- Vis.

Procedimiento MISPE

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

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 2x2 mL de acetonitrilo. Una vez acondicionados los polímeros, las columnas se cargaron con la muestra de amikacina. Después de cargado el antibiótico en las columnas de MISPE, estas fueron lavadas con tres porciones de 2 ml de metanol, 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 compuesto morado con la ninhidrina, y así determinar la presencia o ausencia de AMK.

Al finalizar el lavado de los polímeros, el analito se eluyó con 4 porciones de 3 mL de una mezcla 90 % de metanol: 10 % ácido acético 1 N. El procedimiento se hizo por triplicado.

f. 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) y especificidad usando agua destilada a la cual se añadió cantidades conocidas de AMK bajo las condiciones optimizadas del MISPE.

Se evaluó la selectividad del MIP-AMK desarrollado para la gentamicina (un aminoglucósido de la familia de la amikacina).

Para el estudio de la linealidad, se preparó una curva de calibración con concentraciones del antibiótico en un rango de 300 a 500 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 AMK a tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del rango establecido. Se hicieron tres réplicas 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 intra diaria) y la reproducibilidad (precisión inter diaria) basada en las 3 determinaciones para cada una de las concentraciones estudiadas del antibiótico. Se calcularon los porcentajes de la desviación estándar relativa. 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

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 por 48 horas a 28 °C.

Polímero	Amikacina (gramos)	Monómero funcional MAA (ml)	Entrecruzante EGDMA (ml)	Iniciador (ml)	Disolvente porogénico (ml)
MIP	0,0100	0,26	3	0,22	10
NIP	0	0,26	3	0,22	10

Tabla 1. Composición molar de los polímeros sintetizados.

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 dos porciones de 2 mL de acetonitrilo (2x2 mL).

La cantidad adecuada de amikacina para la carga del cartucho MISPE fue de 0.5, 0.6 y 0.7 mL de una disolución de una concentración patrón de 2500 ppm.

El lavado de los polímeros de impronta molecular una vez que se han cargado con el antibiótico debe efectuarse con metanol (3x2 mL).

La mezcla de disolventes para la extracción de la amikacina de los polímeros de impronta molecular con la cual se obtuvo la mejor extracción de la molécula molde es 90 % metanol: 10 % ácido acético 1 N (4x3 mL).

Determinación de la concentración de amikacina extraída 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 destilada a las cuales se añadió cantidades conocidas de AMK bajo las condiciones optimizadas del MISPE.

Con relación a la selectividad, el MIP desarrollado no reconoció a la gentamicina, por lo que aparentemente es selectivo a la molécula molde.

La linealidad del método de espectrofotometría UV-Vis, fue evaluado en el rango de 300 a 500 ppm. La recta de calibración obtenida ($y = 0,0003x - 0,0072$) mostró linealidad con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9954$. El límite de detección y el límite de cuantificación para la disolución, calculado según la FDA (2000) fueron 55.6 mg L⁻¹ y 185.5 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, 1250., 1500 y 1750 mg L⁻¹, los cuales representan respectivamente, el 80, 100 y 120 % de las concentraciones ensayadas. 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 RSD resultó 15.1, 6.7 y 14.5 %, para los niveles bajo, medio y alto respectivamente.

El porcentaje de error obtenido en los análisis efectuados para las tres concentraciones evaluadas, se encuentra en 42.7, 22.2 y 45.6 respectivamente. Para análisis con concentraciones del analito superiores a 100 µg Kg⁻¹ deben encontrarse dentro de un rango de -20 hasta un 10 % establecidos por la Guidance for Industry, FDA, (2011), sin embargo, valores cercanos al 20 % solo se obtuvieron para la concentración de 1500 ppm (correspondiente al 100 %). Por este motivo, es recomendable realizar otros estudios, para lograr una mayor exactitud del método.

Los porcentajes de recuperación de las 3 concentraciones estudiadas fueron 57.2., 77.8 y 54.6 %. Estos valores son mayores al 50%. La recuperación del analito debe presentar un grado de más de 20% para poder ser considerada precisa y reproducible (ONU DC, 2010). Con el polímero sintetizado, se logra recuperar hasta un 77% del analito. Al revisar en la bibliografía, se encontró un porcentaje de recuperación en el rango de 40 a 60 % en algunos métodos analíticos empleando SPE. Como ejemplo, Hernández. A (2004), al determinar ácido fólico en cereales fortificados obtuvo un 43% de recuperación del analito, logrando un aumento en la recuperación a 63% cambiando de método de extracción a filtración. Carmona, I (2006), recuperando plaguicidas catiónicos utilizando SPE en matrices de arroz, brócoli y lechuga es muy baja, encontró valores de 40% como máximo y 12% como mínimo. Ettiene, G y colaboradores (2008), determinaron pesticidas organofosforados en cebollino y cilantro y para lograr la máxima tasa de recuperación posible, los cartuchos de filtro utilizados para la extracción y limpieza contenían diferentes cantidades de carbón grafitizado, carbón grafitizado y activado, con porcentajes de recuperación inferiores al 50%. En este contexto, al comparar los métodos analíticos anteriores con el método analítico propuesto para la determinación de amikacina, empleando extracción en fase sólida, también se podrían afirmar que los porcentajes de recuperación superiores al 50 % encontrados en este trabajo de grado son aceptables.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se concluye:

1. Se sintetizó un polímero de impronta molecular a través de un proceso de polimerización en bloque, no covalente y utilizando la radiación UV. La amikacina fue empleada como molécula molde.
2. Mediante el uso del método de extracción en fase sólida de polímero con impronta molecular MISPE, se desarrolló, optimizó y validó un método analítico para la identificación, determinación y cuantificación de amikacina en soluciones superiores al 100%: 1500 ppm y 1750 ppm. Para este tipo de análisis, el método resultó ser sencillo, rápido y económico.
3. La metodología desarrollada AMIK-MISPE fue validada, la curva de calibración obtenido mostró una linealidad en el intervalo de 300 ppm a 500 ppm con coeficiente de determinación $R^2 =$

0.9954. Y los límites de detección y cuantificación fueron de 55.7 ppm y 185.5 ppm respectivamente.

4. De las tres concentraciones evaluadas (80 %, 100% y 120%), se obtuvo porcentajes de recuperación de 57,4%, 77,8% y 54,6%, lo que indica que el MIP desarrollado es capaz de reconocer la amikacina.
5. El MIP desarrollado no reconoció a la gentamicina (un aminoglucósido de la familia de la amikacina), por lo que aparentemente es selectivo a la molécula molde.
6. Se sugiere probar otras variables en la síntesis del MIP para lograr un mayor reconocimiento del analito y disminuir el porcentaje de error.

REFERENCIAS

- Barranco, A., Argarate, N y Baliño, L (2007). ELIKAMIP-Desarrollo de polímeros de impresión molecular (MIP) para la detección y eliminación de contaminantes químicos en alimentos líquidos. Informe Final 2007, Convenio AZTI/DAPA. Gobierno Vasco.
- Carmona, I (2006). Desarrollo y validación de un método de Extracción en Fase Sólida para la determinación de plaguicidas catiónicos (cuats) en alimentos. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Medicina.
- 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.
- Ettiene, G; Ortega, S; Medina, D; Sepúlveda J y Sandoval, L (2008). Optimización y validación de un método de extracción y limpieza en fase sólida para la determinación de insecticidas organofosforados en cebollín (*Allium fistulosum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.) Rev. Fac. Agron. 25(3).
- 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).
- Hernández, A (2004). Desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Martínez, J (2010). Contaminación ambiental por antibióticos y determinantes de resistencia a los antibióticos. Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Pública. Colombia. N.º 2: 95-105.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Naciones Unidas, Nueva York.
- 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>
- Roca, P; Oliver, J y Rodríguez, A (2003). Bioquímica. Técnicas y Métodos. Editorial Mélice. Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias. Universidad de las Islas Baleares.

SUÁREZ-TORRES Y SOLEDAD

- 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, 1:432–43