

Determinación de ampicilina en suelos del fundo El Pegón-La Unión utilizando la técnica de Espectrofotometría UV-Visible y polímeros de impronta molecular como cartuchos de extracción en fase sólida

Beatriz E. Soledad-Rodríguez¹, Deyniels González²
bsoledad@ucab.edu.ve¹, dfgonzalez94@gmail.com²

Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería, Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, Venezuela^{1 2}

Historia del Artículo

Recibido: 03 de mayo de 2019

Aceptado: 03 de julio de 2019

Disponible online: 12 de julio de 2019

Resumen: Para un desarrollo adecuado del ganado, la industria utiliza aditivos alimenticios como los antibióticos agregados al alimento tanto como promotores del crecimiento como para minimizar las infecciones bacterianas. A pesar de las normas establecidas, los antibióticos son utilizados de manera excesiva en la alimentación del ganado, haciendo que sus excreciones contaminen los suelos con residuos de antibióticos afectando la microbiota del terreno, permitiendo que algunas bacterias se vuelvan sensibles o totalmente indiferentes a sus efectos e incrementando la resistencia bacteriana a los fármacos. Las concentraciones de los antibióticos en suelos, se encuentran en cantidades muy reducidas, por lo que se requieren técnicas de alta sensibilidad y con una gran capacidad de reconocimiento del analito para lograr la detección y extracción del mismo. Por lo general, es necesario limpiar y pre-concentrar al analito, para obtener mayores concentraciones que permitan su detección y cuantificación. Los Polímeros de Impronta Molecular (MIPs, por sus siglas en inglés Molecularly Imprinted Polymers), son capaces de realizar un reconocimiento molecular selectivo del analito y combinados con la técnica de extracción en fase sólida (SPE), se conocen como MISPE, y se emplean para la limpieza y concentración de muestras como por ejemplo las ambientales y de alimentos. En este trabajo, se sintetizó y utilizó un polímero de impronta molecular para la identificación de ampicilina, empleando ácido metacrílico como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato como monómero entrecruzante, en una relación 1:5 monómero entrecruzante. El MISPE fue evaluado para la extracción y limpieza de muestras de suelo suplementadas con ampicilina (AMP). 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 $R^2 = 0,993$, con una precisión menor al 20 %. El Límite de Detección (LOD) calculado en términos de concentración del analito en la solución, fue de $0,440 \text{ mg L}^{-1}$ y el Límite de Cuantificación (LOQ) fue de $1,467 \text{ mg L}^{-1}$. Para las tres concentraciones evaluadas correspondientes al 80 %, 100 % y 120 %, se obtuvo muy buena recuperación de la AMP con el método de extracción desarrollado, obteniéndose valores de 125,37 %, 99,5 % y 93,84 respectivamente. Con los resultados obtenidos se propone el procedimiento seguido en este trabajo de grado para el análisis de muestras de suelo, quedando demostrada la posibilidad de utilizar el AMP-MIP en un sistema de extracción en fase sólida pudiéndose extraer la ampicilina de manera satisfactoria de una matriz compleja como el suelo y analizar la muestra por espectrofotometría UV-Vis

Palabras clave: Polímero de impronta molecular (MIP), Ampicilina, Espectrofotometría UV-Visible

Ampicillin determination in Fundo el Pegón- La Unión soils, with spectrophotometric UV-Vis using molecularly imprinted polymers cartridges as Solid Phase Extraction

Abstract: For an adequate development of livestock, the industry uses food additives such as antibiotics added to the feed both as growth promoters and to minimize bacterial infections. Despite the established norms, antibiotics are used excessively for cattle feed, causing their excretions to contaminate the soil with antibiotic residues affecting the microbiota of the soil, allowing some bacteria to be less sensitive or totally indifferent to their effects and increasing bacterial resistance to drugs. The concentrations of antibiotics in soils are found in very small amounts of the analyte, which is why high sensitivity techniques are required and with a great capacity for recognizing the analyte to achieve detection and extraction. In general, it is necessary to clean and pre-concentrate the analyte, to obtain higher concentrations that allow its detection and quantification. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs), are able to perform a selective molecular recognition of the analyte and combined with the technique of solid phase extraction (SPE), are known as MISPE, and are used for the cleaning and concentration of samples such as environmental and food samples. In this work, a molecularly imprinted polymer was used for the identification of ampicillin, using methacrylic acid as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the crosslinking monomer, in a 1: 5 crosslinking monomer ratio. The MISPE was evaluated for the extraction and cleaning of soil samples supplemented with ampicillin. The methodology developed AMP-MISPE was validated, the calibration curve obtained showed a linearity in the studied range of 1 ppm to 5 ppm with a coefficient of determination of $R^2 = 0.993$, with a precision of less than 20%. The Detection Limit (LOD) calculated in terms of analyte concentration in the solution was 0.440 mg L^{-1} and the Quantification Limit (LOQ) was 1.467 mg L^{-1} . For the three evaluated concentrations corresponding to 80%, 100% and 120%, a very good recovery of the AMP was obtained with the extraction method developed, obtaining values of 125.37%, 99.5% and 93.84 respectively. With the results obtained, the procedure followed in this degree work for the analysis of soil samples is proposed, demonstrating the possibility of using the MPA-AMP in a solid phase extraction system, being able to extract the ampicillin satisfactorily from a matrix. complex as the soil and analyze the sample by UV-Vis spectrophotometry

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers, Ampicillin, Spectrophotometry UV-Vis

I.INTRODUCCIÓN

Uno de los rubros económicos de Venezuela es la industria ganadera, productora de carnes y productos lácteos para la manutención del país. Para ello se requiere un desarrollo adecuado del ganado, lo que implica que éste tenga una buena salud evitando las enfermedades y los problemas nutricionales desde su nacimiento. Con el fin de lograr dicho objetivo, la industria utiliza aditivos añadidos al alimento, como los antibióticos. Estos se agregan al alimento para minimizar las infecciones bacterianas y el control de abscesos hepáticos, comunes en los animales de engorde y de corral. Los

antibióticos disponibles son: clortetraciclina, oxitetraciclina, bacitracina y tilosina [1], y para la protección contra las infecciones bacterianas tales como la mastitis, el ántrax y la brucelosis que

comúnmente se presentan en los espacios ganaderos [2, 3].

En adición a los beneficios del uso de antibióticos, se añade su funcionamiento como promotores del crecimiento, es decir, propician una condición de salud favorable para su desarrollo, al protegerlos de los problemas que puedan causar las infecciones [4, 5]. Los beneficios de los antibióticos como promotores de crecimiento son el aumento de la

productividad, la disminución de pérdidas en el valor nutritivo del pienso, y su contribución a la prevención de infecciones subclínicas y reducción de la mortalidad. Todo ello tiene importantes repercusiones económicas a favor de la empresa [6].

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento es regulado por la Food and Drug Administration (FDA) en los E.E.U.U, y en Europa por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). La utilización de los antibióticos en piensos de aplicación veterinaria se emplea en Europa, sin embargo hay discrepancia en su uso para alimentar al ganado, por lo que la EFSA prohibió la alimentación del ganado con antibióticos para la Unión Europea, mientras que en los E.E.U.U la Veterinary Feed Directive (VFD) aprobada el 2 de junio del 2015, describe el proceso de autorización de uso de drogas VFD (medicamentos para animales destinados a ser utilizados en o sobre los piensos que requieren la supervisión de un veterinario con licencia), permitiendo a los veterinarios suministrar antibióticos en la alimentación de los bovinos [7, 8].

A pesar de las normas establecidas, los antibióticos son utilizados de manera excesiva por manos inexpertas o por demanda de la industria, para la alimentación del ganado, haciendo que sus excreciones contaminen los suelos con residuos de antibióticos [9]. A su vez, la microbiota del terreno es afectada por los residuos, permitiendo que algunas bacterias sean menos sensibles o totalmente indiferentes a sus efectos, resultando en el incremento de la resistencia bacteriana a los fármacos [10, 11].

La inducción en la aparición de resistencias es uno de los principales problemas que podría estar generando la exposición a los antibióticos. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España [12], 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. La necesidad de controlar la presencia de antibióticos a niveles de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, requiere disponer 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 [13].

Al requerir un control en los niveles de antibióticos en suelos para evitar los problemas, mencionados anteriormente, los entes reguladores se ven inmersos en la tarea de desarrollar técnicas para determinar y medir las concentraciones de antibióticos en los terrenos de uso ganadero.

Habitualmente las concentraciones de los antibióticos en suelos, se encuentran en el orden de $\mu\text{g/L}$ y μM ; siendo estas cantidades muy reducidas del analito, lo que comúnmente, se denomina niveles traza. Debido a ello, se requieren técnicas de alta sensibilidad y con una gran capacidad de reconocimiento del analito, para lograr la detección y extracción del mismo. Por lo general, es necesario preconcentrarlo, para obtener mayores concentraciones que permitan su detección y cuantificación [14, 15].

Para determinar la presencia de los antibióticos en los suelos se utilizan una variedad de técnicas como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía Líquida con Detector Fotométrico UV (HPLC-UV), Espectrometría UV y Cromatografía Gaseosa con Impacto de Electrón, EIGC/MS, entre otros [16]. A pesar de la diversidad de métodos, aún existe la necesidad de una mayor especificidad para la detección de los antibióticos en las muestras colectadas para su determinación.

Al no contar con una mejor especificidad, en el momento que se realiza un análisis de los suelos ganaderos, resulta difícil definir los niveles de contaminación por residuos de antibióticos, derivando en diagnósticos erróneos o inciertos.

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, por sus siglas en inglés Molecularly Imprinted Polymers). 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 [17].

Esta característica les confiere del mecanismo que se emplea para su elaboración, el cual consiste en la polimerización de una serie de monómeros afines a la estructura molecular del analito. En otras palabras, se utilizan reactivos de grupos funcionales (moléculas afines) en los que prevalezca la tendencia a formar enlaces con los grupos funcionales que conforman a la molécula plantilla (analito). 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 electrocromatografía 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 [18].

Al tratarse de un terreno ganadero, se entiende que estos contienen una variedad de sustancias provenientes de la actividad antrópica, los desechos animales y la microbiota, que interactúan con las trazas de antibióticos, por lo que es necesario hacer uso de la técnica SPE para su determinación [19].

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 en los suelos del fundo el Pegón-La Unión.

Usualmente los residuos de AMP se encuentran en muy bajas concentraciones, por ello es necesario un paso previo de limpieza y pre-concentración de la muestra para incrementar la eficiencia y sensibilidad del análisis instrumental, requiriéndose equipos con alta sensibilidad. El investigador se debe enfocar en la estandarización de métodos que permitan determinar al analito en bajas concentraciones, contribuyendo a mejorar las técnicas de análisis, haciéndolas más rápidas, efectivas y aplicándolas a diversas muestras. Estas nuevas estrategias de análisis y determinación de muestras pueden aplicarse en numerosos laboratorios y para ello deben validarse

determinando las características analíticas del método, tales como límite de detección, linealidad del método, reproducibilidad, repetibilidad y porcentaje de recuperación.

Esta investigación se llevó a cabo utilizando AMP, un antibiótico β -lactámico perteneciente al grupo de las penicilinas, uno de los grupos de mayor utilización a nivel mundial.

II. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar un método analítico para determinar la concentración de ampicilina en los suelos del Fundo El Pegón-La Unión mediante la técnica de Espectrofotometría UV combinada con la Extracción en Fase Sólida con Polímeros de Impronta Molecular (MISPE)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos y soluciones

Los disolventes grado HPLC fueron el acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich, Alemania) y el Metanol grado (Burdick y Jackson, USA). El Ácido Acético (Fluka, Alemania). Fosfato monobásico de potasio (Riedel-de Hæn, Alemania). Nitrógeno gaseoso (AGA, Venezuela). La AMP grado USP fue donada por Laboratorios Spedar, Venezuela. El peróxido de hidrógeno al 30 % fue obtenido de PERDROGEN® Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El ácido metacrílico (MAA), y el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) fueron comprados de 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 suelos ganaderos utilizadas como medio sólido para el depósito de ampicilina, fueron recolectados del fundo El Pegón-La Unión. Las muestras de suelo se tomaron en la superficie y fueron colocadas en frascos de vidrio con tapa de baquelita y transportadas al laboratorio manteniéndose a

temperatura ambiente. Previo al uso de los suelos, a estos se les eliminó la humedad sometiéndolos a desecación en estufa a 30 °C por 24 horas. Una vez realizado este procedimiento, las muestras de suelo se guardaron en desecador 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 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 trituro 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,

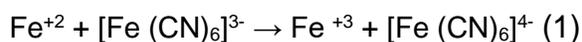
Se realizaron de 4 a 5 lavados con 1 ml de una mezcla metanol-ácido acético 1 M (9:1 v/v). El filtrado fue utilizado para evaluar la presencia de la ampicilina, empleando el método espectrofotométrico basado en el desarrollo del complejo azul de Prusia, que se desarrollará posteriormente.

Este procedimiento de extracción se repitió tantas veces como fue necesario hasta la no detección de ampicilina en la disolución extractante, lo que indicará 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 [20, 21, 22, 23]. 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 suelo del Fundo El Pegón-La Unión

- *Determinación de pH*

Inicialmente se pesó 10 g de muestra del suelo en la balanza y se trasladó a un vaso de precipitado de 250 ml. Luego se añadieron 25 ml de agua destilada, previamente medidos en un cilindro graduado de 50 ml, se agitó durante 3 minutos y se dejó reposar por 30 minutos. Finalizados los 30 minutos, se tomó registro del pH de la solución con el pHmetro. Dicha determinación se realizó por triplicado. Se empleó el método reportado por el Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica [24].

- *Determinación de Conductividad*

Se pesaron 20 g de muestra de suelo en la balanza y se trasladó a una botella de agitación, al cual se le añadieron 100 ml de agua destilada y se agitó durante 30 minutos, luego de ser cerrada la botella. Transcurridos los 30 minutos, fue filtrada la solución y se tomó medida de la conductividad con el conductímetro al filtrado. Dicha determinación se realizó por triplicado. Se empleó el método reportado por el Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

El procedimiento se divide en 3 etapas, dos lavados y una titulación. Luego de registrar los datos se procede a realizar el cálculo, sustituyendo los datos de la fórmula. Esta determinación se realizó por triplicado.

Lavado I: Se pesó 5 g de suelo seco en una balanza analítica, estos se transportaron a un vaso de precipitado de 250 ml, al cual se le añadió 25 ml de acetato de amonio 1 N pH 7 y

se agitó durante 30 minutos con un agitador magnético. Culminado el tiempo, fue filtrada la solución, al vacío, utilizando un embudo de büchner, un kitasato y una bomba de vacío. El vaso de precipitado contenedor de la solución fue limpiado con 10 ml adicionales de acetato de sodio 1 N, pH 7, y se vertieron en el embudo para su filtrado. El exceso de amonio de la muestra, fue lavado con 50 ml de alcohol etílico al 96 % distribuido en 5 porciones de 10 ml cada una.

El primer lavado se finalizó al retirar la fiola del equipo de vacío para eliminar el filtrado y se lavó con agua destilada. La muestra de suelo, se conservó encima del embudo para el segundo lavado.

Lavado II: Se procedió a conectar nuevamente la instrumentación para el filtrado, seguidamente se lavó la muestra con 50 ml de cloruro de sodio al 10 % en 5 porciones de 10 ml cada una. Para finalizar se retiró el embudo y se transportó el filtrado a una fiola de 50 ml, al cual se le añadió 10 ml de formol al 40 % para neutralizar.

Titulación: Se llevó la fiola a un agitador magnético y se procedió a titular la muestra utilizando una bureta de 50 ml llena con hidróxido de sodio 0,1 N y se le añadieron 3 gotas de fenoltaleína a la fiola [25].

- *Determinación de la Textura*

Se determinó a través del método de manipulación, por lo que inicialmente se tomó una masa de suelo seco y se humedeció hasta su compactación, con lo que se procedió a formar una bola de 3-5 cm, la cual se soltó sobre una superficie plana, para comenzar a realizar un cilindro con 16 cm de longitud, el cual se dobló formando un círculo con grietas, indicando que es un suelo de arcilla ligera. El análisis se realizó por triplicado [26].

- *Determinación de la Materia Orgánica*

Previo al análisis, se colocaron los crisoles de porcelana en la estufa a una temperatura de 30 °C durante 24 horas. Luego se tomó el registro de su peso.

Inicialmente se pesaron 10 g de suelo seco y fueron colocados en el crisol de porcelana, el cual estaba situado encima de un trípode con una malla para calentar. Seguidamente se encendió el mechero debajo del trípode, se calentó por 20 minutos la muestra de suelo realizándole pequeños movimientos cada 5 minutos.

Finalizado el tiempo, se retiró el crisol y fue colocado dentro del desecador para su enfriamiento. Después de alcanzar una temperatura ambiente, el crisol fue transportado a una balanza para medir su nuevo peso, restándolo al peso inicial.

Con el resultado se aplicó la fórmula para la determinación del porcentaje de materia orgánica:

$$\frac{\text{Masa del suelo seco}}{\text{Masa del suelo}} \times 100 \quad (2)$$

El procedimiento se realizó repetidamente hasta que se alcanzó un peso constante de la muestra en los crisoles. Esta determinación se realizó por triplicado.

G. 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 3x1 mL de acetonitrilo. Una vez acondicionados los polímeros, las columnas se cargaron con 6 mL (sobrenadante) de la muestra de suelo 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.

H. 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 suelo 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 [8].

IV. 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 I: Composición molar de los polímeros sintetizados

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

B. Caracterización del suelo del Fundo El Pegón-La Unión

Los resultados obtenidos de pH, conductividad, capacidad de intercambio catiónico, textura y materia orgánica se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Caracterización del suelo del fundo El Pegón-La Unión

| Característica | Valor obtenido |
|------------------------------------|----------------|
| pH | 6,6 |
| Conductividad | 0,0187 dS/m |
| Capacidad de intercambio catiónico | 25,65 meq/100 |
| Textura | Arcilloso |
| Materia orgánica | 0,76 % |

Como se desprende de los resultados obtenidos, se observa que el suelo utilizado en este trabajo de grado es un suelo arcilloso, libre de sales, acidez cercana al valor neutro y con un bajo porcentaje de materia orgánica. En conjunto estas características propician unas condiciones favorables para el estudio de un método como el MISPE, donde se requiere de 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 suelo por

el método MISPE a través de la espectrofotometría UV-Vis

- *Desarrollo del método analítico*

La metodología MISPE desarrollada fue validada determinando la linealidad, exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) usando muestras de suelo 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 ($y = 0,0134x - 0,0118$) mostró linealidad con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9936$. El límite de detección y el límite de cuantificación para la disolución, calculado según [8] fueron $0,440 \text{ mg L}^{-1}$ y $1,467 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, La precisión del método analítico desarrollado se ha evaluado en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad, a tres niveles de concentración, 2,66., 3,33 y $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, 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 8, 10 y 12 mg L^{-1} lo que conlleva a concentraciones finales en el eluato de 2,66, 3,33 y $4,0$ respectivamente, y se le ha sometido al procedimiento MISPE completo detallado en el apartado 2.3 de procedimientos. 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 19,4., 13,1 y 4,2 %, para los niveles bajo, medio y alto respectivamente.

El porcentaje de error obtenido en los análisis efectuados para las tres concentraciones evaluadas (2,6., 3,3 y $4,0 \text{ mg L}^{-1}$), se encuentra en -25,37., 0,45 y 6,16 %, respectivamente. Los valores esperados se encuentran para análisis con concentración del analito superiores a 100

$\mu\text{g Kg}^{-1}$ deben encontrarse dentro del rango de -20 hasta 10 % establecidos [8] sin embargo, para concentraciones muy bajas, cercanas al LOQ, se encontró un valor superior al 20 %. Para concentraciones mayores, se obtuvo dentro de lo esperado, indicando esto una buena exactitud del método para concentraciones superiores a los $3,3 \text{ mg L}^{-1}$.

V. 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 suelo del fundo El Pegón-La unión resultando en un suelo arcilloso, libre de sales que pudiesen interferir con la absorción de la ampicilina con el MIP.

Se desarrolló, optimizó y validó un método analítico para la identificación, determinación y cuantificación de ampicilina en soluciones a baja concentración (2,6 ppm, 3,3 ppm y $4,0$ 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 2,6 ppm, 3,3 ppm, y $4,0$ 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 $R^2 = 0,993$, con una precisión

menor al 20 %. El Límite de Detección (LOD) calculado en términos de concentración del analito en la solución, fue de 0,440 mg L⁻¹ y el Límite de Cuantificación (LOQ) fue de 1,467 mg L⁻¹.

Con los resultados obtenidos se propone el procedimiento seguido en este trabajo de grado para el análisis de muestras de suelo, 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 125,37 %, 99,5 % y 93,84 respectivamente.

REFERENCIAS

- [1] Bavera, G.; Bocco, O.; Beguet, H. & Petryna, A. 2002. Promotores del Crecimiento y Modificadores del Metabolismo. (en línea). Consultado el 11 de julio de 2016. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/19-promotores_del_crecimiento.pdf
- [2] Zwald, AG.; Rugg, PL.; Kaneene, JB.; Warnick, LD.; Wells, SJ.; Fossler, C. & Halbert, LW. 2004. Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. American Dairy Science Association. Journal of Dairy Science.
- [3] Sawant, A.; Sordillo, L. y Jayarao, B. 2005. A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. (en línea). Consultado el 13 de octubre de 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16027213>
- [4] Torres, C. y Zarazaga, M., 2002. Antibióticos como Promotores del Crecimiento en Animales: ¿Vamos por el buen camino? Gac Sanit. (en línea). Consultado el 20 de agosto de 2017. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000200002.
- [5] Prescott, J.; Baggot, J. & Walker, R. 2000. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Tercera edición. Wiley-Blackwell. USA.
- [6] Cepero, R. 2006. Retirada de los Antibióticos Promotores de Crecimiento en la Unión Europea: Causas y Consecuencias. (en línea). Consultado el 11 de julio de 2016. Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1142587453a.pdf
- [7] Soledad-Rodríguez, B., Fernández-Hernando, P., Garcinuño-Martínez, R., 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
- [8] 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).
- [9] Booth, N. y McDonald, E. 1987. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Zaragoza, ES. Acribia. (en línea). Consultado el 10 de jul 2016. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1998000200014&script=sci_arttext
- [10] Martínez, J. 2010. Contaminación Ambiental por Antibióticos y Determinantes de Resistencia a los Antibióticos. (en línea). Consultado el 17 de julio de 2016. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237027114_Resistencia_a_antibioticos_y_a_metales_pesados_en_bacterias_aisladas_del_rio_Almendares
- [11] Okolo, M.I.O. 1986. Bacterial Drug Resistance in Meat Animals. International Journal Zoonosis. (en línea). Consultado el 20 de agosto de 2016. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/19611523_Bacterial_drug_resistance_in_meat_animals_A_review
- [12] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2002). *Parte I: Aditivos distintos de los microorganismos y las enzimas*. Boletín Oficial del Estado. Nº 40. Pág. 6096-6109. Madrid, España. Recuperado de: <http://www.agrodigital.com/upload/2/20/orden%20apa%20732002%20sobre%20lineas%20para%20la%20evaluacion%20de%20aditivos%20en%20alimentacio%20animal.pdf> [Consulta: 2014, Octubre 11].
- [13] 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).
- [14] Ashnagar, A. y Gharib, N. 2007. Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC. (en línea). Consultado el 12 de octubre de 2016. Disponible en: <file:///C:/Users/Dejniels/Downloads/480907.pdf>
- [15] WingChing-Jones. 2008. Residualidad de Sustancias Xenobióticas en el Suelo Empleadas en la Producción Pecuaria. Agronomía Mesoamericana. (en línea). Consultado el 05 de marzo 2017. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v19n01_099.pdf
- [16] APHA. 2001. Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. (en línea). Consultado el 06 de diciembre de 2018. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books?id=duFMBgAAQBAJ&pg=PA126&lpg=PA126&dq=apha+\(2001\)+++methods+for+the+microbiological+examination+of+foods&source=bl&ots=QZxW-7kSZv&sig=ACfU3U2sbovvUSN9uRlw4RyBSVS66SILRw&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwi2o_DbgrngAhUJnFkKHZekDC04FBDoATAlegQIBBAB#v=onepage&q=apha%20\(2001\)%20%20methods%20for%20the%20microbiological%20examination%20of%20foods&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=duFMBgAAQBAJ&pg=PA126&lpg=PA126&dq=apha+(2001)+++methods+for+the+microbiological+examination+of+foods&source=bl&ots=QZxW-7kSZv&sig=ACfU3U2sbovvUSN9uRlw4RyBSVS66SILRw&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwi2o_DbgrngAhUJnFkKHZekDC04FBDoATAlegQIBBAB#v=onepage&q=apha%20(2001)%20%20methods%20for%20the%20microbiological%20examination%20of%20foods&f=false)
- [17] 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>
- [18] 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>
- [19] Cano, E. y Urbina, M. (2008). Polímeros inteligentes y aplicaciones. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid: FEDER Acción Innovadora.
- [20] 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.
- [21] Salem, H., Saleh, G. (2002) Selective spectrophotometric determination of phenolic betalactam antibiotics. *J Pharm Biomed Anal*. 28(6): 1205-13

- [22] 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.
- [23] 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
- [24] Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. 2013. (en línea). Consultado el día 28 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/LSF/20130520/Info%20pH.pdf>
- [25] Azcarate, M. y Kloster N. 2010. Comparación de método de Ensayo para determinación de CIC: acetato de amonio y cloruro de amonio.(en línea) Consultado el día 28 de marzo de 2018. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_comparacion_de_metodos_de_ensayo_para_determinacion_de_cic_-_azcarate_mp_2010.pdf
- [26] Food and Agriculture Organization of United Nations. 2006. Textura del Suelo.(en línea). Consultado el día 28 de marzo de 2018. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm