

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICA
Departamento de Química Analítica



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS
ANALÍTICOS BASADOS EN NUEVOS ELEMENTOS DE
RECONOCIMIENTO MOLECULAR PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
EN MUESTRAS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO Y
MEDIOAMBIENTAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Elena Benito Peña

Bajo la dirección de la doctora:
María Cruz Moreno Bandi

Madrid, 2006

- **ISBN: 978-84-669-2967-7**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS
ANALÍTICOS BASADOS EN NUEVOS
ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO
MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS
DE INTERÉS AGROALIMENTARIO Y
MEDIOAMBIENTAL**

Director:
Dra. María Cruz Moreno Bondi
Profesora Titular de la U.C.M.

TESIS DOCTORAL
QUE PRESENTA

MARÍA ELENA BENITO PEÑA
MADRID, 2006



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DOÑA **MARÍA CRUZ MORENO BONDI**, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Qué el trabajo titulado **“Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental”** ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 10 de mayo de 2006

Fdo. María Cruz Moreno Bondi

Fdo. María Elena Benito Peña

Madrid, 18 de Junio de 2006

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Profesora María Cruz Moreno Bondi a quien expreso mi más sincero agradecimiento por su apoyo y ayuda prestada para la consecución de esta Tesis.

Asimismo, quiero agradecer al Profesor José Manuel Pingarrón, director del Departamento de Química Analítica, su acogida en el mismo durante el periodo de realización de éste trabajo.

Esta labor de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación aportada por la Unión Europea dentro del programa "Calidad de Vida y Gestión de los Recursos Vivos", perteneciente al V Programa Marco (QLK1-CT-1999-00902), por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto ALI1999-1841-CE y proyecto BQU2002-04515-C01) y por la Universidad Complutense de Madrid gracias a la concesión de una beca predoctoral para la realización de esta Tesis Doctoral.

Me gustaría agradecer la colaboración, en distintas partes de este trabajo, al Prof. G. Orellana (Universidad Complutense, Madrid), a la Dra. M. Kempe (Universidad de Lund, Suecia), al Dr. G.C. Fiaccabrino (Universidad de Neuchâtel, Suiza) y al Dr. M. French (Kalibrant S.A., Reino Unido). Del mismo modo expreso mi gratitud a la Prof. María Eugenia de León González por su inestimable aporte científico.

Por otro lado, quiero expresar mi sincera gratitud a los profesores Ángel Raqueira y Rosa Puchades que me acogieron amablemente en su grupo de investigación perteneciente al Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

Finalmente, debo mencionar mi especial reconocimiento al trabajo de investigación realizado por las Ldas. María Jesús de la Asunción, Vanessa Ramos, Susana de Dios, Cristina Grande, Ana Isabel Partal y el Dr. Santiago Aparicio, ya que su buen hacer han contribuido de forma directa al desarrollo de esta Tesis.

María Elena Benito Peña

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIBIÓTICOS	5
1.1. CLASIFICACIÓN	6
1.1.1. Clasificación según la tinción gram de las bacterias	7
1.1.2. Clasificación según el efecto de su acción	7
1.1.3. Clasificación según el mecanismo de acción	8
1.1.4. Clasificación según la estructura química	9
2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	11
2.1. PENICILINAS	15
2.1.1. Estructura y clasificación	15
2.1.2. Mecanismo de acción	16
2.1.3. Espectro antibacteriano	18
2.1.4. Mecanismos de resistencia	18
2.1.5. Propiedades fisicoquímicas de las penicilinas estudiadas	19
3. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA	23
3.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA	24
3.1.1. Utilización de antibióticos como promotores del crecimiento	25
3.1.2. Utilización de antibióticos con fines profilácticos y terapéuticos	27
3.2. CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA	29
3.2.1. Problemas sanitarios	30
3.2.2. Problemas tecnológicos	32
3.2.3. Problemas medioambientales	33
4. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, LEGISLACIÓN Y CONTROL DE RESIDUOS	37
4.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS Y EN EL MEDIO AMBIENTE	37
4.1.1. Análisis de los riesgos derivados de la presencia de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal	38
4.1.2. Análisis de los riesgos derivados de la presencia de residuos de antibióticos en el medio ambiente	41

4.2.	LEGISLACIÓN Y CONTROL	44
4.2.1.	Control de residuos de antibióticos	48
5.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS	51
5.1.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	51
5.1.1.	Cromatografía de gases (GC)	52
5.1.2.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	53
5.1.3.	Otros métodos cromatográficos y de separación	60
5.2.	MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS	60
5.2.1.	Métodos basados en ensayos de barrido (Test de screening)	61
5.2.2.	Ensayos de barrido para antibióticos β -lactámicos	65
5.3.	OTROS MÉTODOS	75
5.3.1.	ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)	75
6.	BIBLIOGRAFÍA	79
II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS GENERALES		89
III. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS		95
1.	DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS	99
2.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS	105
3.	PARTE EXPERIMENTAL	107
3.1.	REACTIVOS	107
3.1.1.	Derivados β -lactámicos fluorescentes	107
3.1.2.	Reactivos y disolventes generales	108
3.2.	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	108
3.2.1.	Espectrofotómetros y fluorímetros	108
3.2.2.	Cromatografía	110
3.2.3.	Otros instrumentos y materiales	111
3.3.	PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA	112
3.3.1.	Medidas de intensidad de luminiscencia	112
3.3.2.	Medidas de luminiscencia con resolución temporal	112
3.3.3.	Cálculo del rendimiento cuántico de emisión de luminiscencia (Φ_{em})	113
3.3.4.	Estudio de la estabilidad de los derivados fluorescentes β -lactámicos	114
3.4.	MODELIZACIÓN MOLECULAR	114
3.5.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS	115

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
4.1. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO PIRENO	118
4.1.1. Derivados del ácido 1-pirenoacético	120
4.1.2. Derivados del ácido 1-pirenobutírico	123
4.2. ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO DANSILO	125
4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS	129
4.3.1. Antibióticos β -lactámicos fluorescentes derivados del fluoróforo de tipo pireno	129
4.3.2. Antibióticos β -lactámicos fluorescentes derivados del fluoróforo de tipo dansilo	133
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PENICILINA MARCADA PAAP Y FACTORES QUE AFECTAN A SU FLUORESCENCIA	136
4.4.1. Efecto del oxígeno disuelto en la fluorescencia del PAAP	136
4.4.2. Evaluación de la estabilidad del PAAP mediante HPLC	141
4.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS DE PENICILINAS FLUORESCENTES	143
5. CONCLUSIONES	145
6. BIBLIOGRAFÍA	147
IV. DESARROLLO DE UN FLUOROENSAYO BASADO EN EL EMPLEO DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	151
1. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) COMO MATERIALES DE RECONOCIMIENTO	157
1.1. PRINCIPIOS GENERALES	159
1.1.1. Obtención de MIPs mediante impronta covalente	161
1.1.2. Obtención de MIPs mediante impronta no covalente	162
1.1.3. Obtención de MIPs mediante impronta semicovalente	168
1.1.4. Obtención de MIPs mediante espaciadores sacrificables	169
1.1.5. Nuevas tecnologías	170
1.2. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR	171
1.2.1. Síntesis de partículas granulares: Polimerización en bloque	171
1.2.2. Síntesis de partículas esféricas	172
1.2.3. Materiales compuestos	174
1.2.4. Preparación de monolitos mediante polimerización “in situ”	177
1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR	177
1.3.1. Caracterización química	177
1.3.2. Caracterización morfológica	178

1.3.3.	Caracterización de los sitios de unión específica: isoterma de adsorción	180
1.4.	APLICACIONES DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR	182
1.4.1.	Aplicaciones en síntesis y catálisis	183
1.4.2.	Aplicaciones en técnicas de separación	183
1.4.3.	Sensores	187
1.5.	DESARROLLO DE ENSAYOS EMPLEANDO POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (“MOLECULARLY IMPRINTED ASSAY”, MIA)	191
1.5.1.	Radioensayos	191
1.5.2.	Ensayos basados en marcadores no-radiactivos	192
2.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS	197
3.	PARTE EXPERIMENTAL	199
3.1.	REACTIVOS Y DISOLUCIONES	199
3.1.1.	Antibióticos e inhibidores de las β -lactamasas	199
3.1.2.	Derivados fluorescentes β -lactámicos	200
3.1.3.	Reactivos para la preparación de polímeros de impronta molecular	201
3.1.4.	Reactivos y disolventes generales	202
3.1.5.	Disoluciones	202
3.2.	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	203
3.2.1.	Sistema de control y manejo de fluidos	203
3.2.2.	Espectrofotómetros y fluorímetros	203
3.2.3.	Otros instrumentos y materiales	204
3.3.	PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y MEDIDA	205
3.3.1.	Síntesis de los polímeros de impronta molecular	205
3.3.2.	Sistema de medida en flujo (FI)	207
3.3.3.	Sistema optosensor	209
3.3.4.	Protocolo de ensayo del MIA	209
3.4.	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	211
3.4.1.	Determinación de penicilina G en un preparado farmacológico	211
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	213
4.1.	SÍNTESIS DE UNA LIBRERÍA DE MIPs SELECTIVOS A PENG	213
4.2.	EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS MIPs POR LOS DERIVADOS β-LACTÁMICOS FLUORESCENTES	215
4.3.	CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR MIP1	219
4.3.1.	Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	219
4.3.2.	Caracterización morfológica mediante porosimetría de adsorción/desorción de nitrógeno	220
4.3.3.	Caracterización de los sitios de unión específica del MIP1 para el PAAP	227

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO	230
4.4.1. Optimización de las variables hidrodinámicas del sistema en flujo	231
4.4.2. Influencia de la disolución de unión sobre la respuesta del ensayo	233
4.4.3. Ensayo competitivo vs ensayo por desplazamiento	234
4.4.4. Tiempo de incubación	237
4.4.5. Optimización de la concentración de PAAP y MIP1	238
4.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL FLUOROENSAYO COMPETITIVO BASADO EN MIPS	242
4.5.1. Calibración del MIA	242
4.5.2. Estudios de reactividad cruzada	244
4.5.3. Precisión del sistema	248
4.5.4. Estudio de la estabilidad temporal del MIP1	250
4.6. APLICACIÓN DEL MIA A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES	252
4.6.1. Determinación de penicilina G en un preparado farmacológico	252
4.7. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR EMPLEANDO MIPS COMO ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO	254
5. CONCLUSIONES	257
6. BIBLIOGRAFÍA	261
V. DESARROLLO DE UN FLUOROINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	273
1. TÉCNICAS ANALÍTICAS INMUNOQUÍMICAS	281
1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS	281
1.1.1. Producción de anticuerpos	283
1.1.2. Interacciones antígeno-anticuerpo	285
1.2. TIPOS DE INMUNOENSAYOS	287
1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS	289
1.4. INMUNOSENSORES	291
1.4.1. Soportes y métodos de inmovilización	294
1.5. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	298
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS	303
3. PARTE EXPERIMENTAL	307
3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	307
3.1.1. Antibióticos e inhibidores de las β -lactamasas	307
3.1.2. Derivados fluorescentes β -lactámicos	308

3.1.3.	Inmunoreactivos	308
3.1.4.	Soportes de inmovilización de anticuerpos	309
3.1.5.	Reactivos y disolventes generales	310
3.1.6.	Disoluciones	311
3.2.	INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	312
3.2.1.	Sistema de control y manejo de fluidos	312
3.2.2.	Espectrofotómetros y fluorímetros	313
3.2.3.	Otros instrumentos y materiales	313
3.3.	PROCEDIMIENTOS DE INMOVILIZACIÓN	314
3.4.	PROCEDIMIENTO DE MEDIDA	316
3.4.1.	Protocolo de ensayo del inmunosensor	317
3.5.	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	321
3.5.1.	Determinación de antibióticos β -lactámicos en aguas residuales	321
3.5.2.	Determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	322
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	325
4.1.	ENSAYOS PRELIMINARES	325
4.1.1.	Purificación de anticuerpos	325
4.1.2.	Ensayos de actividad: valoración de la avidéz de los anticuerpos policlonales por los derivados β -lactámicos fluorescentes	327
4.2.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO	332
4.2.1.	Diseño del reactor	332
4.2.2.	Selección del inmunoadsorbente	334
4.2.3.	Efecto del caudal de inmovilización	336
4.2.4.	Efecto del volumen de muestra	337
4.2.5.	Influencia de la disolución reguladora sobre la respuesta del inmunoensayo	338
4.2.6.	Efecto de la temperatura	343
4.2.7.	Competición simultánea vs consecutiva	344
4.2.8.	Tiempo de incubación	346
4.2.9.	Optimización de la concentración de antígeno-anticuerpo	347
4.3.	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL INMUNOSENSOR	351
4.3.1.	Calibración del sensor	351
4.3.2.	Estudios de reactividad cruzada	353
4.3.3.	Precisión del sistema	358
4.3.4.	Estudio de la estabilidad temporal del inmunosoporte	360
4.4.	APLICACIÓN DEL INMUNOSENSOR A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES	362
4.4.1.	Determinación de penicilina G y amoxicilina en muestras de aguas residuales	362
4.4.2.	Determinación de penicilinas en muestras de leche	365

5. CONCLUSIONES	369
6. BIBLIOGRAFÍA	373
VI. DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	379
1. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	385
1.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS	385
1.1.1. Tratamiento de muestra previo al proceso de extracción/purificación en muestras de origen agroalimentario	386
1.1.2. Extracción líquido-líquido	389
1.1.3. Extracción en fase sólida	390
1.1.4. Extracción sólido-líquido	395
1.1.5. Extracción sólido-sólido	398
1.2. ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE HPLC-DAD	398
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS	403
3. PARTE EXPERIMENTAL	405
3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	405
3.1.1. Antibióticos e inhibidores de las β -lactamasas	405
3.1.2. Reactivos y disolventes generales	406
3.1.3. Disoluciones	407
3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	409
3.2.1. Cromatografía	409
3.2.2. Espectrofotómetros	410
3.2.3. Extracción presurizada con disolventes (PLE)	410
3.2.4. Extracción en fase sólida (SPE)	411
3.2.5. Otros instrumentos y materiales	411
3.3. PROCEDIMIENTO DE MEDIDA	412
3.3.1. Determinación cromatográfica de antibióticos β -lactámicos	412
3.3.2. Preconcentración selectiva de antibióticos β -lactámicos	415
3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES	416
3.4.1. Determinación de antibióticos β -lactámicos en aguas residuales	416
3.4.2. Determinación de antibióticos β -lactámicos en leche	417
3.4.3. Determinación de antibióticos β -lactámicos en pienso	421
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	423
4.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EMPLEANDO DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNNA	423
4.1.1. Reacción de derivatización precolumnna	423

4.1.2.	Optimización de la separación cromatográfica	431
4.1.3.	Características analíticas del proceso cromatográfico	440
4.2.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS SIN DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA	444
4.2.1.	Características espectroscópicas de los antibióticos β -lactámicos	444
4.2.2.	Optimización de las condiciones cromatográficas	445
4.2.3.	Características analíticas del proceso cromatográfico	448
4.3.	ESTUDIO DE PRECONCENTRACIÓN EMPLEANDO CARTUCHOS EN FASE SÓLIDA (SPE)	453
4.3.1.	Influencia del pH de la disolución de carga	454
4.3.2.	Elección de la disolución de lavado	455
4.3.3.	Elección de la disolución de elución	456
4.3.4.	Cálculo del volumen de ruptura	460
4.4.	DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS EN MUESTRAS REALES	463
4.4.1.	Determinación de penicilinas en muestras de aguas residuales	463
4.4.2.	Determinación de penicilinas en muestras de leche	469
4.4.3.	Determinación de penicilinas en muestras de pienso	475
5.	CONCLUSIONES	483
6.	BIBLIOGRAFÍA	487
VII.	CONCLUSIONES FINALES	493
VIII.	GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	499
IX.	ANEXO	507

I.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIBIÓTICOS

1.1. CLASIFICACIÓN

- 1.1.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA TINCIÓN GRAM DE LAS BACTERIAS
- 1.1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE SU ACCIÓN
- 1.1.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN
- 1.1.4. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA ESTRUCTURA QUÍMICA

2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

2.1. PENICILINAS

- 2.1.1. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN
- 2.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN
- 2.1.3. ESPECTRO ANTIBACTERIANO
- 2.1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA
- 2.1.5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS PENICILINAS ESTUDIADAS

3. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA

3.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA

- 3.1.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO
- 3.1.2. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON FINES PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

3.2. CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA

- 3.2.1. PROBLEMAS SANITARIOS
 - 3.2.1.1. Hipersensibilidad y reacciones alérgicas
 - 3.2.1.2. Desarrollo de resistencias bacterianas

- 3.2.2. PROBLEMAS TECNOLÓGICOS
- 3.2.3. PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES

4. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, LEGISLACIÓN Y CONTROL DE RESIDUOS

- 4.1. **EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS Y EN EL MEDIO AMBIENTE**
 - 4.1.1. ANÁLISIS DE LOS RIESGOS DERIVADOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL
 - 4.1.2. ANÁLISIS DE LOS RIESGOS DERIVADOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN EL MEDIO AMBIENTE
- 4.2. **LEGISLACIÓN Y CONTROL**
 - 4.2.1. CONTROL DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

- 5.1. **MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**
 - 5.1.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)
 - 5.1.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)
 - 5.1.3. OTROS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y DE SEPARACIÓN
 - 5.1.3.1. Cromatografía en capa fina
- 5.2. **MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS**
 - 5.2.1. MÉTODOS BASADOS EN ENSAYOS DE BARRIDO (TEST DE SCREENING)
 - 5.2.1.1. Características de los ensayos de barrido
 - 5.2.1.2. Clasificación de los ensayos de barrido
 - 5.2.2. ENSAYOS DE BARRIDO PARA ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
 - 5.2.2.1. Métodos microbiológicos
 - 5.2.2.2. Métodos inmunoquímicos
- 5.3. **OTROS MÉTODOS**
 - 5.3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

6. BIBLIOGRAFÍA

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIBIÓTICOS

1

Desde el principio de la existencia del ser humano, su lucha por la supervivencia se estableció con otros seres vivos de muy diversos tamaños. Algunos tan pequeños que no se veían ni se tocaban, sin embargo estos microorganismos, en la batalla por su propia supervivencia infligieron a la especie humana grandes pérdidas. Se las llamaron plagas (como las de Egipto), o pestes (como la Peste bubónica) o, más modernamente epidemias como la gripe, el cólera, etc.

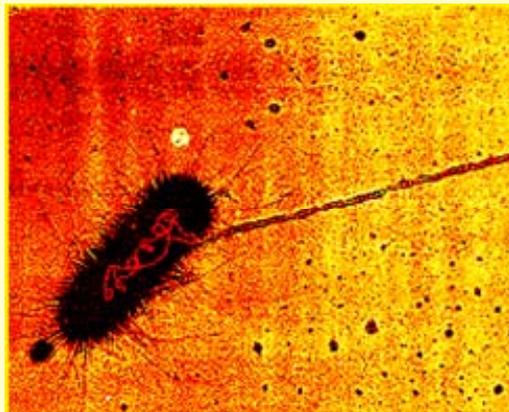


Fig.1. Microscopía electrónica de una bacteria.

Fueron necesarios muchos años hasta que empezaron a identificarse, gracias al microscopio, bacterias, rickettsias y virus (microorganismos).

En **1897**, el médico francés **E. Dúchense** demostró que ciertos mohos podían detener la proliferación de cepas microbianas.

En **1929**, **A. Fleming** evidenció la acción lítica sobre el estafilococo dorado, de una cepa de *Penicillium notatum*. Gracias a él, se produjo el descubrimiento del primer antibiótico, **la penicilina**, adentrándonos pues en la **era antibiótica**.

En **1941**, **E. B. Chain** aisló la sal sódica, amorfa e impura de la penicilina aplicando diversas técnicas de extracción y purificación.

Años después, **H. W. Florey** la sintetizó a escala industrial.



Cuando Sir Alexander Fleming (1881-1955) descubrió los efectos de la penicilina, introdujo la era antibiótica y ganó el premio Nobel.

Desde entonces, se han preparado numerosas moléculas en búsqueda del **antibiótico ideal**, caracterizado por: *ser efectivo para todas las infecciones, generar sólo el efecto buscado, no generar resistencias, actuar en cualquier parte del organismo, ser útil por vía oral, ser económicamente accesible.*

Los **antibióticos** son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos originando su destrucción. En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las **sulfonaminas** y las **quinolonas**, que presentan también actividad bacteriana [1].

Los antibióticos actúan a través de 2 mecanismos principales: matando los microorganismos existentes (acción bactericida), e impidiendo su reproducción (acción bacteriostática). El antibiótico ideal interfiere con las funciones vitales de las bacterias sin afectar a las células del huésped. Se dice que presentan una *selectividad selectiva* [2].

En la actividad de un antibiótico deberá tenerse en cuenta [2]:

- El que un antibiótico inhiba o mate a una bacteria depende de la concentración. Para la mayoría de los antibióticos, a mayor cantidad, mayor acción lítica.
- El efecto bactericida también puede depender del tiempo. En el caso de antibióticos glucopeptídicos y β -lactámicos, es más importante mantener constante una determinada concentración a lo largo del tiempo que emplear una concentración muy elevada y un tratamiento corto.
- Los antibióticos pueden actuar juntos de forma sinérgica, antagónica o indiferente.

1.1. CLASIFICACIÓN

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos.

Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y se basan en distintos criterios; por tal motivo, es difícil determinar cuál es la ideal. De ellas las más utilizadas son las que se mencionan a continuación.

1.1.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA TINCIÓN GRAM DE LAS BACTERIAS

Según la actividad que tienen los antibióticos frente a las bacterias grampositivas y gramnegativas, éstos pueden clasificarse en tres grupos según se muestra en la tabla 1 [3,4].

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según la tinción gram [3,4].

Antibióticos contra grampositivos	Antibióticos contra gramnegativos	Antibióticos de amplio espectro
Glicopéptidos	Aminoglucósidos	Cefalosporinas
Lincosamida	Aminociclitoles	Carbapenémicos
Rifampicinas	Polipéptidos	Anfenicoles
-	-	Macrólidos
-	-	Quinolonas
-	-	β -lactámicos
-	-	Tetraciclinas

1.1.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL EFECTO DE SU ACCIÓN

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en **bacteriostáticos** y **bactericidas**, dependiendo de que inhiban el crecimiento u originen la lisis de la bacteria, respectivamente [5].

Esta clasificación es bastante inexacta, pues estos efectos varían en función del tipo de germen y de la concentración del antibiótico. Por ejemplo, el **cloramfenicol** se comporta como bacteriostático frente a la *E. coli* y otros microorganismos y como bactericida frente a algunas cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae* [3,4].

En la tabla 2 se detalla una lista de distintos antibióticos clasificados según este criterio.

Tabla 2. Distribución de algunos antibióticos según su acción sobre las bacterias [5].

Bactericidas	Bacteriostáticos
β -lactámicos	Amfenicoles
Aminoglucósidos	Lincosamidas
Glicopéptidos	Macrólidos
Quinolonas	Sulfamidas
Rifampicinas	Tetraciclinas

1.1.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos se pueden clasificar, en función de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos. De este modo encontramos:

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular: forman parte de este grupo los antibióticos β -lactámicos (*penicilinas* y *cefalosporinas*).
- Modificadores de la función de la membrana celular: compuestos que actúan de modo indirecto sobre la membrana celular del microorganismo afectando a su permeabilidad y permitiendo la fuga de compuestos intracelulares [1].
- Inhibidores de la síntesis proteica: dentro de este grupo de antibióticos, podemos destacar aquellos que alteran la funcionalidad de las subunidades ribosómicas 30S y 50S causando una inhibición reversible de la síntesis proteica (*cloranfenicol*, *tetraciclinas*, *eritromicina* y *clindamicina*); y aquellos que se unen a la subunidad 30S alterando la síntesis proteica y dando lugar a la muerte celular (*aminoglucosidos*) [1].
- Inhibidores de la síntesis o función de los ácidos nucleicos: ejemplos, los constituyen la *rifampicina*, *quinolonas* o *antivirales*, que pueden actuar mediante tres mecanismos: interfiriendo la replicación de ADN, impidiendo la transcripción o inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales

En la figura 1 se muestran los lugares de acción de los diferentes agentes antibióticos [6].

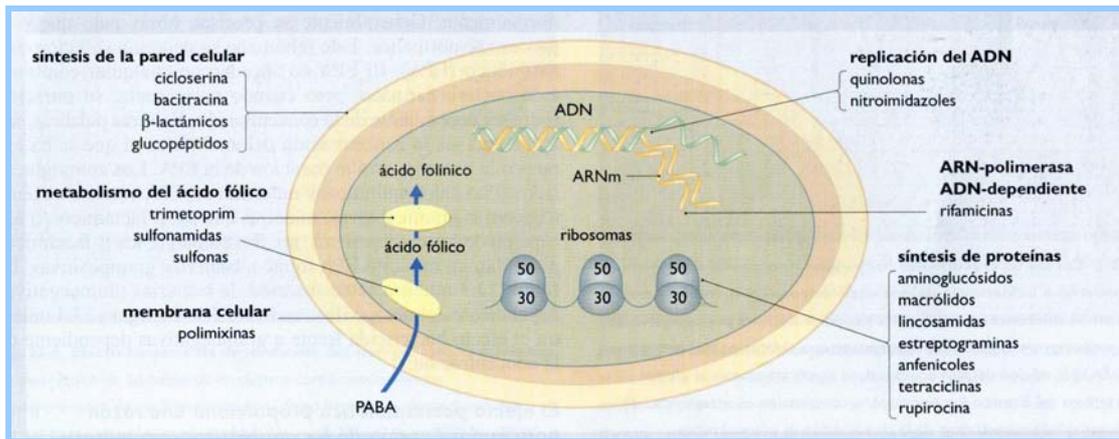


Figura 1. Acción de los diferentes antibióticos. (PABA, ácido *p*-aminobenzoico)[6].

1.1.4. CLASIFICACIÓN SEGÚN LA ESTRUCTURA QUÍMICA

Esta clasificación es la más utilizada en la literatura científica. Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. Dentro de esta clasificación, las penicilinas se pueden dividir en: bencilpenicilinas, fenoximetilpenicilinas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, isoxazolilpenicilinas, etoxinaftilpenicilinas, etc. [7].

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

2

Tras 70 años de uso clínico, los antibióticos β -lactámicos son los antimicrobianos más prescritos tanto en atención primaria como en hospitales, además de medicina veterinaria. A pesar de que no se dispone de ningún β -lactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el aumento incesante de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares han condicionado la existencia de una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.

Los **antibióticos β -lactámicos** son compuestos muy útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, debido a su escasa toxicidad y amplio espectro de actividad. Todos comparten una estructura común, ya que están formados por un anillo β -lactámico constituido por cuatro átomos de carbono. Igualmente poseen un mismo mecanismo de acción: producen la inhibición de la síntesis de peptidoglucanos de la pared bacteriana [8].

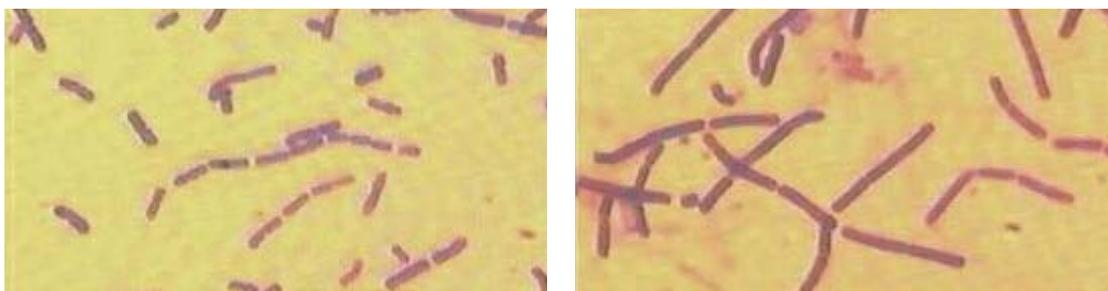


Figura 2. La foto de la izquierda muestra un cultivo de la bacteria *Bacillus cereus* en ausencia de antibiótico β -lactámico. A la derecha se muestra un cultivo de la misma bacteria en presencia del antibiótico [1].

Como se muestra en la figura 2, cuando la bacteria crece en presencia del antibiótico se produce el daño en la pared bacteriana y un sobrecrecimiento anómalo de la misma además de una menor división celular.

Su acción es principalmente bactericida y su efecto es lento y dependiente del tiempo. La mayoría de los antibióticos β -lactámicos se eliminan, sin cambios, a través del riñón, por ello están indicados en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario. Poseen un alto margen terapéutico, siendo el principal efecto adverso las reacciones alérgicas. Raramente producen anafilaxia. Se consideran seguros para su uso durante la gestación.

Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gramnegativos, pero la progresiva aparición de microorganismos resistentes a éstas ha ido limitando su empleo y su eficacia en determinadas situaciones.

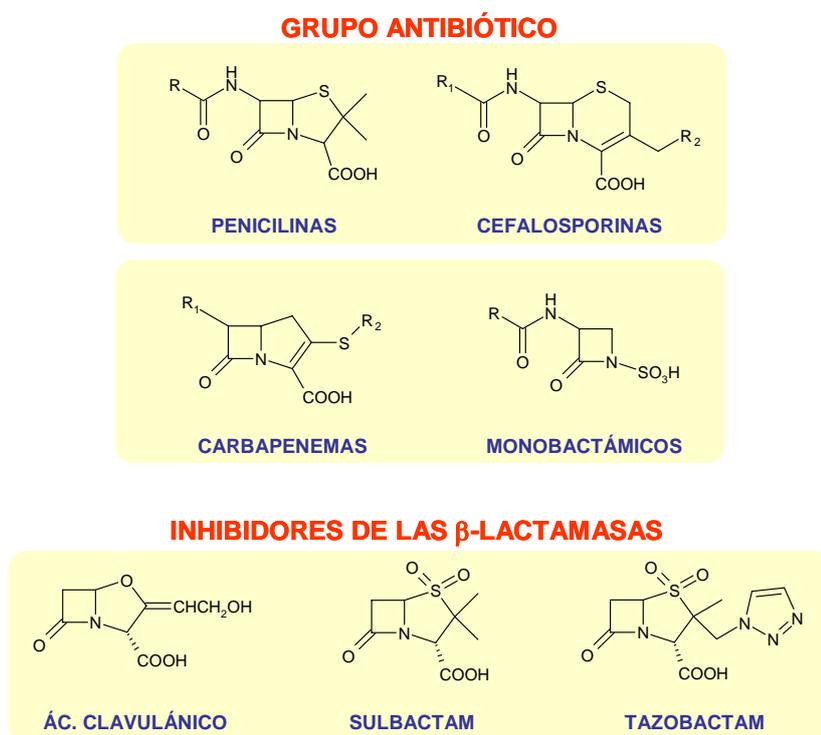


Figura 3. Estructura química básica de las cuatro clases principales de antibióticos β -lactámicos y de los inhibidores de las β -lactamasas. La R representa las posiciones en las que se efectúan las sustituciones químicas para sintetizar los diferentes fármacos.

La presencia de un anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (figura 3) [9-11].

- **Cefalosporinas**

Las cefalosporinas o cefems son antibióticos semisintéticos derivados de la cefalosporina C, un antibiótico natural producido por el hongo *Cephalosporium acremonium*. El núcleo activo, ácido 7-aminocefalosporánico, está estrechamente relacionado con el ácido 6-aminopenicilánico por poseer ambos un anillo β -lactámico. Son bactericidas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana al igual que las penicilinas. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales origina diversas cefalosporinas que se clasifican en “generaciones” según el tipo de bacteria que atacan. Actualmente existen cefalosporinas de 4ª generación.

- **Carbapenemas**

Se caracterizan por poseer en su molécula el anillo β -lactámico, como las penicilinas y cefalosporinas. Se diferencian de éstas en que en el anillo tiazolidínico el átomo de azufre ha sido sustituido por un grupo metileno. El imipenem, derivado *N*-formimidoilo de la tienamicina, obtenido del *Streptomyces cattleya*, fue el primer antibiótico carbapenémico.

Se utiliza en el tratamiento de infecciones intraabdominales combinadas, nosocomiales, incluyendo las de microorganismos gramnegativos resistentes, como son las de *Enterobacter* y las originadas por el uso previo de antibióticos de amplio espectro.

- **Monobactámicos**

Fueron los primeros antibióticos β -lactámicos monocíclicos producidos a partir de bacterias, aunque en la actualidad se obtienen sintéticamente. El aztreonam fue el primer compuesto disponible comercialmente. Su acción es bactericida y actúa sobre la síntesis de la pared celular. El imipenem, cuya actividad se restringe a

microorganismos aerobios gramnegativos, es muy efectivo contra *P. aeruginosa*. La administración de estos antibióticos puede producir hipersensibilidad a otros antibióticos β -lactámicos. Otros monobactámicos como el carumonam y el tigemonam pueden suministrarse por vía oral, pero no son activos contra la *P. aeruginosa*.

- **Inhibidores de las β -lactamasas**

En el momento actual tan sólo se emplean inhibidores de las β -lactamasas de estructura β -lactámica. Como se muestra en la figura 3, el **ácido clavulánico** tiene un núcleo similar al ácido penicilánico, con la sustitución del átomo de azufre en posición 3 por un átomo de oxígeno (que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona mayor afinidad por las β -lactamasas), y la falta de cadena lateral acilamino en posición 6. El **sulbactam** es una sulfota semisintética del ácido penicilánico. El **tazobactam** se diferencia del sulbactam por la presencia de un grupo triazol en posición 3.

Estos inhibidores presentan mayor afinidad frente a las β -lactamasas que los antimicrobianos correspondientes, uniéndose a ellas de forma irreversible de manera que evitan la degradación enzimática de los antibióticos. Estos compuestos presentan actividad antibacteriana, con la excepción del sulbactam que actúa frente al *Acinetobacter baumannii* y a otros bacilos gramnegativos no fermentadores.

El empleo de los inhibidores de la β -lactamasa permite mantener la eficacia del antibiótico β -lactámico en infecciones causadas por microorganismos que se han hecho resistentes por producción de β -lactamasas (*S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides spp.*) y amplían el espectro de acción a bacterias que no eran sensibles al antibiótico al producir estas enzimas de forma natural (*K. pneumoniae*).

2.1. PENICILINAS

Las penicilinas constituyen uno de los grupos de antibióticos de mayor importancia en el mundo actual. Desde el descubrimiento de la primera penicilina, han surgido nuevos antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias, pero las penicilinas siguen siendo unos de los grupos más importantes y continúan sintetizándose nuevos derivados del núcleo penicilínico básico.

2.1.1. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

La estructura básica de las penicilinas está formada por un sistema cíclico β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico que origina el ácido 6-aminopenicilánico. Ésta estructura deriva de la condensación de una molécula de valina y otra de cisteína para dar lugar al doble anillo característico.

El propio núcleo de la penicilina es el elemento estructural fundamental para su actividad biológica; la transformación metabólica, o la alteración química, de esta parte de la molécula hacen que se pierda toda la acción bacteriana [8].

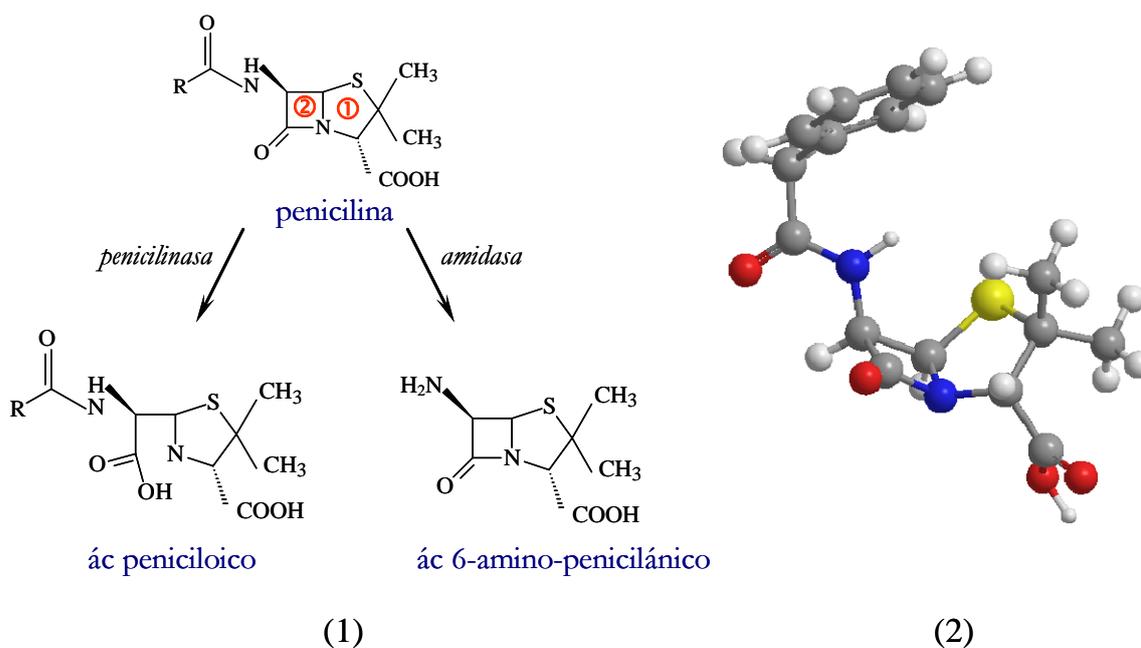


Figura 4. (1) Estructura básica de la penicilina, ácido amino-penicilánico y ácido peniciloico. A) anillo tiazolidínico, B) anillo β -lactámico. (2) Estructura tridimensional de la penicilina.

En la tabla 3, se muestra una clasificación de las penicilinas más empleadas en farmacología.

Tabla 3. Clasificación de las penicilinas.

Penicilinas estándar	<i>Penicilina G</i> <i>Penicilina V</i>
Penicilinas antiestafilocócicas	<i>Meticilina</i> <i>Nafcilina</i> <i>Penicilinas isoxazólicas</i> <i>Oxacilina</i> <i>Cloxacilina</i> <i>Dicloxacilina</i> <i>Flucloxacina</i>
Aminopenicilinas	<i>Amoxicilina</i> <i>Ampicilina</i>
Penicilinas antiseudomonas	<i>Carboxipenicilinas</i> <i>Carbenicilinas</i> <i>Ureidopenicilinas</i> <i>Piperacilina</i> <i>Azlocilina</i> <i>mezlocilina</i>

2.1.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Las penicilinas son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano. En las bacterias grampositivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias gramnegativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano.

El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente (gramnegativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Las penicilinas inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo,

la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen estos antibióticos es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

Los componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados, a través de la membrana citoplasmática, al espacio que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), que son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas proteínas (**PBPs**, del inglés "*Penicillin Binding Proteins*") fijan a las penicilinas y otros β -lactámicos. La función de las PBPs es alargar, dar forma y dividir la bacteria. Los anillos de las penicilinas poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (*D*-alanil-*D*-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa.

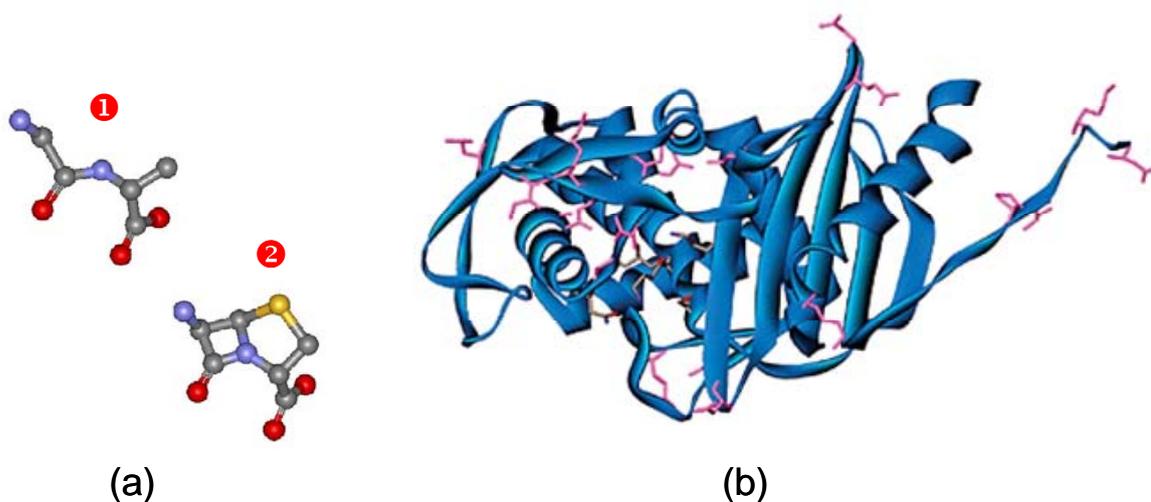


Figura 5. (a) Semejanza estructural entre el sistema β -lactámico (2) y la secuencia terminal *D*-alanil-*D*-alanina del peptidoglucano (1). (b) Estructura tridimensional de una proteína fijadora de penicilina (PBP).

Las penicilinas también activan una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas pero no destruidas [8].

2.1.3. ESPECTRO ANTIBACTERIANO

El espectro de las penicilinas incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son activas sobre los micoplasmas porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*.

El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarca cocos grampositivos y gramnegativos y bacilos grampositivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos gramnegativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos del ácido 6-aminopenicilánico permitió disponer de preparados activos por vía oral, con mayor resistencia a las β -lactamasas y mayor capacidad de penetración en las bacterias gramnegativas, como las aminopenicilinas, las penicilinas antiestafilocócicas y las penicilinas anti-*Pseudomonas*.

2.1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos β -lactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian [12]. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias.

Los mecanismos implicados son los siguientes:

- **Alteraciones de la permeabilidad.** La presencia de membrana externa en los bacilos gramnegativos dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como las penicilinas, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para tal fin.
- **Modificación de las dianas.** Los β -lactámicos deben unirse a las PBP's para ejercer su efecto bactericida. Cambios a nivel de las PBP's implican una pérdida de su afinidad por las penicilinas, con la consiguiente disminución de su actividad. Este mecanismo afecta fundamentalmente a cocos grampositivos [13,14].

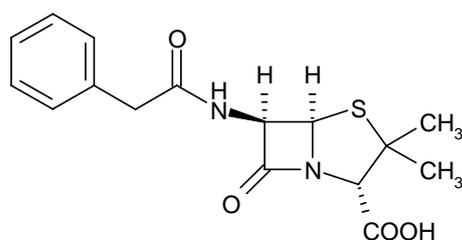
- **Producción de enzimas.** Actualmente constituye el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos, sobre todo en las bacterias gramnegativas. Las β -lactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica que actúan rompiendo el enlace amídico del anillo β -lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que éste pierde la capacidad de unirse a las PBPs. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes β -lactámicos y propiedades hidrolíticas.
- **Expresión de bombas de eliminación activa.** Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de flujo, dependientes de energía, que bombean al antimicrobiano al exterior. Este mecanismo se ha demostrado en ciertos bacilos gramnegativos, especialmente en *P. aeruginosa*.

2.1.5. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS PENICILINAS ESTUDIADAS

Las propiedades físicoquímicas de ésta molécula, especialmente la solubilidad, están relacionadas con la estructura del grupo acilo de la cadena lateral y con la naturaleza de los diferentes contraiones con los que forman las sales [9].

Algunas propiedades físicoquímicas de los antibióticos β -lactámicos ensayados se exponen en los párrafos siguientes junto con su respectiva fórmula estructural [15,16].

PENICILINA G

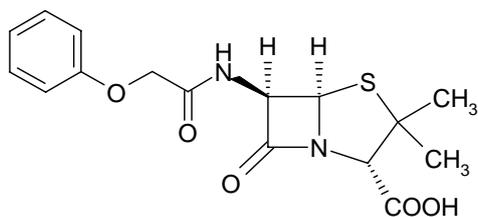


ácido benzilpenicilánico

$C_{16}H_{18}N_2O_4S$
Pm 334.40 g mol⁻¹

- Antibiótico en polvo microcristalino e higroscópico de sabor amargo. Fuente: cultivo *Penicillium*.
- pK_a 2.8
- Soluble: *agua, metanol, etanol, dioxano, DMF, DMSO*. Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *tolueno, éter, cloroformo*.
- Mayor estabilidad a pH 6.5 y a +4 °C.
- Inactivación por ácidos, hidróxidos alcalinos y agentes oxidantes (e.g. HCl, penicilinasas, acilasas).
- Reducción de actividad por metales pesados, etanol, glicerina, yodo, ácido láctico, vitaminas B₁ y C.

PENICILINA V



ácido 6-fenoxiacetamidopenicilánico

$C_{16}H_{18}N_2O_5S$
Pm 350.40 g mol⁻¹

-Se encuentra en forma ácida y sales monobásicas, como la potásica. Fuente: cultivo *Penicillium*.

-pK_a 2.7

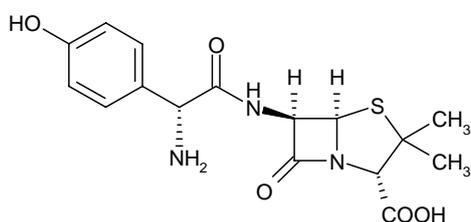
-Soluble: *agua, metanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *etanol, éter, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *tolueno, hexano*.

-Ácido resistente a pH < 5.0. Inactivación rápida en medio alcalino (pH 9-11).

-Estable a T < 37 °C, relativamente estable a ácidos.

-UV max: 268, 274 nm (ε 1330, 1100 L mol⁻¹ cm⁻¹).

AMOXICILINA



ácido 6-(p-hidroxi-α-aminofenilacetamido)penicilánico

$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Pm 365.41 g mol⁻¹

-Antibiótico en polvo cristalino transparente. Fuente: *Semisintética*

-pK_{a1} 2.8, pK_{a2} 7.2

-Soluble: *H₂O, metanol y etanol*. Insoluble: *hexano, benceno, acetato de etilo y acetonitrilo*.

-Más resistente a ácidos.

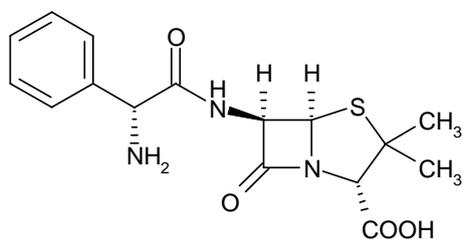
-Estable a pH 3.5-6.0 en disolución acuosa, 0.20% (p/v).

-UV max: (etanol): 230, 274 nm (ε 10850, 1400 L mol⁻¹ cm⁻¹).

(0.1 N HCl): 229, 272 nm (ε 9500, 1080 L mol⁻¹ cm⁻¹).

(0.1 N KOH): 248, 291 nm (ε 2200, 3000 L mol⁻¹ cm⁻¹).

AMPICILINA



ácido 6-(D[-]-α-aminofenilacetamido)penicilánico

$C_{16}H_{19}N_3O_4S$
Pm 349.41 g mol⁻¹

-Antibiótico en polvo cristalino transparente. Fuente: *Semisintética*

-pK_{a1} 2.7, pK_{a2} 7.3

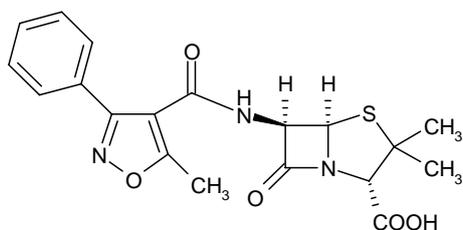
-Soluble: *agua, metanol, etanol, acetona, DMF, DMSO*. Poco soluble: *cloroformo*. Insoluble: *éter, acetona y aceites no volátiles*.

-Estable a pH 3.5-5.5 en disolución acuosa, 0.25% (p/v).

-Inactivación rápida en medio alcalino (pH 9-11).

-UV máx: (metanol) y (m. ácido): 257, 262 nm.

OXACILINA



ácido 6-(5-metil-3-fenil-2-isoxazolil-4-carboxamido)penicilánico

$C_{19}H_{19}N_3O_5S$
Pm 401.44 g mol⁻¹

-Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*

-pK_a 2.7

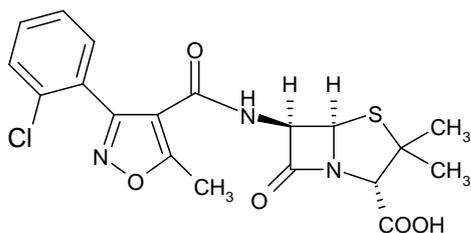
-Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *acetato de etilo, éter, cloroformo*.

-Estable a 24 °C (1 día) y a 4 °C (7 días).

-Inactivación del 36% a pH 2 (24 horas).

-UV máx: 232, 259 nm.

CLOXACILINA

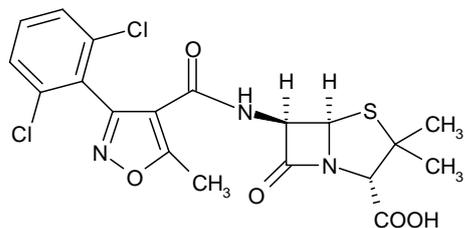


ácido 6-(5-metil-4-0-clorofenil-4-isoxazolilcarboxamido) penicilánico

$C_{19}H_{17}ClN_3O_5S$
Pm 435.9 g mol⁻¹

- Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*.
- pK_a 2.7
- Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO, piridina, etilenglicol*. Poco soluble: *hexano, acetonitrilo, acetona*. Insoluble: *acetato de etilo, éter, cloroformo, isoctano*.
- Estable a pH de 6.0-7.5 en disolución acuosa al 1% (sal sódica).
- UV máx: 230, 261 nm.

DICLOXACILINA

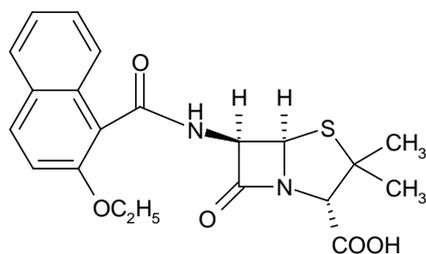


ácido 6-[3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-4-isoxazolilcarboxamido]penicilánico

$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_5S$
Pm 470.33 g mol⁻¹

- Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*.
- pK_a 2.7
- Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO, acetona*. Poco soluble: *cloroformo, acetato de etilo*. Insoluble: *hexano, benceno, isoctano*.
- Estable a 24 °C (7 días) y a 4 °C.
- Inactivación del 12% a pH 2 (24 horas).

NAFCILINA



ácido 6-(2-etoxi-1-naftamido)penicilánico

$C_{21}H_{22}N_2O_5S$
Pm 414.48 g mol⁻¹

- Antibiótico en polvo cristalino. Fuente: *Semisintética*.
- pK_a 2.7
- Soluble: *agua, metanol, etanol, DMF, DMSO*. Poco soluble: *acetona*. Insoluble: *hexano, benceno, isoctano, cloroformo*.
- Estable entre 2-8 °C.

EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA

3

Los antibióticos se empezaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. Hoy en día la gran variedad de antibióticos existente permite el tratamiento de infecciones bacterianas que afectan de un modo frecuente tanto a animales como a humanos permitiendo por ejemplo, en estos últimos, tratamientos quirúrgicos más eficaces, incluido el transplante de órganos, y un mejor control de las infecciones asociadas al uso de agentes antitumorales e inmunosupresores en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas.

El impacto ejercido por los antibióticos en el sector de la salud animal es tan importante como en el de la medicina. Para los veterinarios los nuevos fármacos supusieron el primer recurso farmacéutico realmente eficaz para la lucha frente a enfermedades tales como la mastitis bovina. También revolucionaron el tratamiento de las infecciones intestinales y respiratorias más importantes, convirtiéndose en una parte esencial de los procedimientos de tratamiento de heridas post-quirúrgicas. Los antibióticos han tenido un efecto muy positivo no sólo en la salud de los animales sino también en los niveles de bienestar de los mismos.

El empleo de antibióticos en animales de compañía tiene fines fundamentalmente terapéuticos y a veces profilácticos, mientras que en los animales productores de alimentos también se pueden utilizar como promotores del crecimiento añadiéndolos al pienso en dosis subterapéuticas durante períodos de tiempo relativamente prolongados.

3.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA

De las diez mil toneladas de antibióticos que se producen anualmente en Europa, más de la mitad se destinan a uso veterinario. De ellos, el 70% se utilizan con fines terapéuticos y el 30% como promotores del crecimiento.

En cuanto al consumo de antibióticos en veterinaria, en España disponemos de la aproximación realizada por Pérez-Gorricho y Baquero [17] que estimaron que en 1984 el consumo de antibióticos como agentes promotores del crecimiento fue de 250 toneladas, mientras que los destinados al consumo humano fueron de 365 toneladas. Por otro lado, Díez y Calderón [18] refieren un volumen de ventas de productos farmacológicos en sanidad animal en el año 1995, de 13.646 millones de pesetas (82 millones de euros, 98% de los cuales fueron antiinfecciosos).



Figura 6. Los antibióticos se utilizan como sustancias auxiliares fundamentales en el mantenimiento de la salud de los animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano.

Para alcanzar rendimientos óptimos, se han puesto en marcha procedimientos que implican mejoras en la genética, alimentación, manejo de explotaciones y también en el tratamiento de la patología animal. Para la producción animal en cría intensiva es necesario, hoy en día, el control de posibles enfermedades mediante la utilización de medicamentos veterinarios de uso metafiláctico, profiláctico y terapéutico (antimicrobianos, antiparasitarios), así como la utilización de aditivos en la alimentación animal (antibióticos, coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas) que actúan como factores de crecimiento, a fin de mejorar el rendimiento potencial completo [19].

Por todo ello, los objetivos fundamentales del uso de antibióticos en la industria zoonosanitaria están ligados al suministro de mayor número y mejores productos alimenticios de origen animal.

3.1.1. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO

La propiedad de los antibióticos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde 1950 cuando Stokstand y Jukes [20] observaron que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo. Se identificó el factor de crecimiento en dichos extractos como residuos de clortetraciclina. Posteriormente se confirmó esta propiedad utilizando diferentes antibióticos para diversas especies animales.

El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud [21]. Básicamente actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la microflora intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. También reducen la concentración de sustancias tóxicas, como el amoníaco, que retardan el crecimiento, y disminuyen la destrucción y competencia por nutrientes en el tracto gastrointestinal entre el huésped y la flora normal. Como consecuencia, existe una mayor capacidad de adaptación de los animales a los cambios de alimentación y manejo, y una disminución de las enfermedades causadas por el transporte y los cambios de ambiente, con lo cual se logran mayores ganancias de peso, con menor cantidad de alimento consumido, en períodos menores de tiempo [22].

Se puede decir que la causa final del aumento del crecimiento es una compleja interacción de factores nutritivos, fisiológicos, microbianos y patológicos. Esta respuesta es distinta para cada especie animal y, dentro de una misma especie, es distinta según la raza, la edad de los animales, las condiciones ambientales o el tipo de alimentación. El índice de conversión del pienso y el índice de crecimiento suelen aumentar conforme aumenta la dosis del antibiótico hasta un cierto límite. El efecto de los antibióticos está más marcado en casos de poca higiene, ya que actúan frente a los

agentes infecciosos. No obstante, parece posible diferenciar el efecto estimulante del crecimiento ejercido por los antibióticos del efecto que tienen como preventivos de enfermedades, sobre todo cuando se trata de antibióticos que no se absorben en el intestino [23].

También se obtienen **ventajas medioambientales**, ya que el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento repercute de forma muy positiva en la mejor conservación del medio ambiente, permitiendo a los granjeros mantener en condiciones competitivas las producciones de carne y demás productos, con un número menor de animales. De esta manera se limita el consumo de agua, se reduce considerablemente la emisión de residuos y se evita el impacto producido por la menor liberación al medio ambiente de nitrógeno y fósforo. Si los antimicrobianos fueran retirados de la dieta del ganado porcino, vacuno y avícola, se incrementarían considerablemente los vertidos de estas sustancias al medio ambiente. Lo mismo pasa con los gases de amoníaco y metano, ya que el uso de antibióticos reduce su emisión en un 33% y un 15%, respectivamente.

Dentro de la Unión Europea, la utilización de antibióticos en piensos está sujeto a la directriz 70/524/CEE. En el anexo I y II de dicha directriz, se recoge una lista de los antibióticos admitidos como aditivos en toda la UE [24] que se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Antibióticos admitidos como aditivos en la UE bajo la directriz 70/524/CEE (1998).

Grupo	Antibiótico (N°CEE)	Animales productores
Glicopéptidos	Avoparcina (E-715)	Suspendido
Macrólidos	Tilosina (E-713)	Cochinillo, cerdo
	Espiramicina (E-710)	Pavo, otras aves, ternero, cordero, cabrito, cochinillo, cerdo
Oligosacáridos	Avilamicinina (E-717)	Cochinillo, cerdo, pollo, pavo
Poliéteres (ionóforos)	Monensina (E-714)	Ganado vacuno
	Salinomycinina (E-716)	Cochinillo, cerdo
Polipéptidos	Bacitracina (E-700)	Gallina ponedora, pavo, pollo, ternero, cordero, cabrito, cochinillo, cerdo
Estreptogramines	Virginiamicina (E-711)	Gallina ponedora, pavo, pollo, ternero, cochinillo, cerdo, ganado vacuno, cerda
Otros	Flavofosfolipol ^a (E-712)	Gallina ponedora, pavo, pollo, ternero, cochinillo, cerdo, ganado vacuno, cerda

^atambién conocido como bambermicina.

De esta lista se han ido suprimiendo varias moléculas. Así, en 1999 la UE restringió a avilamicina, flavofosfolipol, monensina sódica y salinomicina los antibióticos que podían utilizarse como promotores del crecimiento. Además, su empleo está siendo sometida a una reevaluación (existe una moratoria al respecto hasta el año 2006) y es posible que, en un futuro, se prohíba en la UE el uso de todos los antibióticos con este fin [25].

3.1.2. UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CON FINES PROFILÁCTICOS Y TERAPÉUTICOS

Por razones económicas y medioambientales, muchas formas de producción animal suponen la concentración de un gran número de ellos en un espacio reducido. En esta situación, las infecciones subclínicas pueden dañar seriamente la productividad de la explotación ya que, en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales de ese ambiente cerrado.

En este tipo de ganaderías, en las que tratar a cada individuo por separado es prácticamente imposible, tiene mucha importancia la utilización de medicamentos, para prevenir enfermedades o, en caso necesario, tratar a toda la población animal. Las sustancias utilizadas son de diversos orígenes: químico, biológico y/o biotecnológico. Si estas sustancias se utilizan de forma racional y se respetan las indicaciones y modo de empleo así como el cumplimiento de un plazo de espera o período de supresión, los residuos potenciales que pudieran estar presentes en los animales tratados, o en sus productos y subproductos alimenticios destinados a consumo humano, estarían minimizados. Si por el contrario, los medicamentos veterinarios se utilizan de forma indiscriminada, la salud pública puede verse seriamente afectada [19].

La incorporación de España a la Comunidad Europea ha supuesto importantes modificaciones legislativas en este sector. El Real Decreto 109/1995 de 27 de enero [26] regula todos los aspectos relacionados con los medicamentos veterinarios y el Real Decreto 157/1995 de 3 de febrero [27] establece las condiciones de preparación, puesta en el mercado y utilización de los piensos medicamentosos.

Generalmente para los animales productores de alimentos el período de supresión, a no ser que el medicamento veterinario lo indique específicamente para las especies que trate, no deberá ser inferior a siete días para los huevos y la leche, 28 días para las carnes de aves de corral y mamíferos, grasa y menudillos incluidos, y 500 gramos/día para las carnes de pescado.

Tabla 5. *Períodos de supresión del fármaco y de descarte de la leche para algunos antibióticos β -lactámicos [28].*

Antibiótico	Especie animal	Período de supresión (días)	Descarte de la leche (días)
Penicilina G procaína	Ganado bovino	10 (según lo aprobado 3 dosis), 30 (a 20.000 UI kg ⁻¹), dos veces al día	3
	Ovejas	9	-
	Cerdos	7	-
Penicilina G benzatina	Ganado bovino	30	-
Ampicilina	Ganado bovino	6	-
	Prerumiantes terneros	15	-
Amoxicilina	Ganado bovino	30	2
Ceftiofur	-	0	-
Cefapirina sódica	-	4 (antes del sacrificio)	4
Cefapirina benzatina	Vacas improproductivas	42 (después última infusión)	3 (después calostro)

Además, el veterinario deberá llevar un registro de todo el tratamiento, mencionando la fecha de examen clínico de los animales, la identificación del propietario, el número de animales tratados, el diagnóstico, los medicamentos recomendados bajo prescripción, las dosis administradas así como la duración del tratamiento. Este libro de registro estará a disposición de las autoridades competentes con fines de inspección por un período de, al menos, tres años [29].

Finalmente, indicar que esta “receta veterinaria” enmarcada en el marco de las *buenas prácticas veterinarias* (BPV) no se aplica en el caso de los agentes promotores del crecimiento, considerados como aditivos, para los cuales existe una lista positiva legislada, como ya indicamos en el apartado 3.1.1..

3.2. CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ZOOTECNIA

Como ya hemos visto, la utilización de antibióticos en animales destinados al consumo humano proporciona una serie de beneficios al consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal. Sin embargo, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana. Además, estos antimicrobianos pueden ser vertidos incontroladamente como sustancias de desecho de las granjas agrícolas y ganaderas pudiendo ocasionar problemas de contaminación.

Estas situaciones de riesgo resultan extremadamente peligrosas y deben de evitarse por las siguientes razones:

- Algunos residuos pueden causar manifestaciones de hipersensibilidad en determinados individuos.
- Generalmente las prácticas veterinarias que dan lugar a la generación de residuos por encima de los límites fijados suelen ser ilegales y, por tanto, penalizables.
- Determinados residuos de antibióticos, sobre todo en las industrias lácteas, son capaces de interferir en los cultivos iniciadores de los derivados de la leche, como queso o yogurt.
- Los residuos de antibióticos son capaces de inhibir el desarrollo de la flora microbiana que ha podido contaminar un alimento y, de esta forma, cuando se realiza el análisis bacteriológico podría pasar desapercibida la presencia de patógenos y llegar incluso a comercializarse.
- Notable incremento de la preocupación social, que exige la garantía de salubridad de los productos destinados a consumo humano.
- El desarrollo de resistencias bacterianas [23], principal efecto peligroso de la existencia de residuos de antimicrobianos desde el punto de vista sanitario, que

se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre [30,31], ya que sus ecosistemas bacterianos no están separados [32].

- Posible contaminación medio ambiental por parte de estas sustancias.

Algunos de estos efectos adversos ocasionados por la existencia de residuos de antibióticos se describen detalladamente a continuación.

3.2.1. PROBLEMAS SANITARIOS

3.2.1.1. HIPERSENSIBILIDAD Y REACCIONES ALÉRGICAS

El consumo de productos que contienen antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa en dosis equivalentes. Los **efectos tóxicos** son, en general, poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades. Sin embargo, pueden producir **reacciones alérgicas**, como anafilaxia (ver figura 7), en individuos que estén especialmente sensibilizados a algún tipo de antibióticos.



Figura 7. La penicilina es la causa más frecuente de alergia a los medicamentos. La más grave de las reacciones inmediatas es el shock anafiláctico (0.1% de todas las reacciones) que produce una mortalidad del 10-25% en humanos.

Existe una gran cantidad de casos documentados de personas que han demostrado reacciones inmunopatológicas producidas por la exposición a residuos de antibióticos en alimentos, siendo las penicilinas los antimicrobianos que más efectos alérgicos producen, tanto en medicina humana como veterinaria.

Muchos autores han descrito reacciones de hipersensibilidad inmediatas debidas al consumo de leche y carnes contaminadas con residuos de éstos compuestos [33-36]. Por otra parte, se ha observado que las cefalosporinas también producen reacciones adversas como diarreas y nefrotoxicidad [37].

3.2.1.2. DESARROLLO DE RESISTENCIAS BACTERIANAS

En los últimos años, la comunidad científica ha manifestado una gran preocupación por el alarmante incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos debido al problema que esto supone en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Numerosas publicaciones científicas han destacado la posible relación entre el uso de antimicrobianos en animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de gran importancia en patología humana y animal [38-40].

Como ejemplo, se ha demostrado [41] que el uso de **avoparcina** como promotor de crecimiento (autorizado en Europa hasta 1997) condujo a la aparición de cepas resistentes de *Enterococcus* (sobre todo *E. faecalis* y *E. faecium*, detectadas en 1993) a este antibiótico y otros glucopéptidos como la **vancomicina**, antimicrobiano utilizado con fines terapéuticos tanto en animales como en humanos.

La consecuencia del uso de este antibiótico como aditivo veterinario fue que las cepas resistentes de animales pasaron a las personas, llegándose a transferir incluso los genes de resistencia a enterococos del intestino humano, ocasionando con ello infecciones intestinales graves.

La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que están siendo tratados, como veterinarios, granjeros, etc.. Otra vía de transmisión, más general, sería el consumo o manipulación de productos de origen animal, como la leche, los huevos y carne, que contengan flora resistente a antibióticos.

Tabla 6. Bacterias implicadas en zoonosis con gran tasa de resistencia a diferentes antibióticos [42].

Bacterias resistentes	Animales huésped	Antibióticos ^a	Infecciones ^b
<i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Vacas Cerdos Pavos Pollos	Ampicilina	Enterocolitis infantiles
		Cefalosporinas (1 ^a , 2 ^a y 3 ^{oa} generación)	Toxi-infecciones alimentarias
		Fluoroquinolonas	Infecciones sistémicas de inmunodeprimidos
Quinolonas		Diarreas infantiles	
Macrolidos			
<i>Campylobacter jejuni</i>		Amoxicilina	Úlcera péptica
		Claritromicina	
		Tetraciclinas	
<i>Helicobacter pylori</i>		Ampicilina	
		Fluoriquinolonas	
	Cefalosporinas 3 ^a g.		
	Cotrimoxazol		

^aAntibióticos a los que los patógenos indicados son resistentes total o parcialmente. ^bInfecciones que dichas cepas bacterianas causan en el hombre.

La leche generalmente se pasteuriza y, aunque es poco probable que contenga bacterias resistentes, puede tener residuos de antibióticos por haber recibido el ganado tratamientos terapéuticos con estos compuestos. Los huevos se encuentran en la mayoría de los casos estériles, si la cáscara no ha sufrido ningún daño al manipularlos. Por tanto, la carne es la que puede representar el mayor peligro debido a la contaminación por bacterias resistentes a la hora del sacrificio.

3.2.2. PROBLEMAS TECNOLÓGICOS

La presencia de estos residuos en la industria láctea de fermentación, constituye un factor de riesgo tecnológico, ya que provocan importantes pérdidas económicas. El mayor problema asociado a la existencia de residuos de antibióticos en la leche hace referencia a la inhibición parcial o completa de la fermentación ácida necesaria para la fabricación de productos lácteos tales como queso, yogurt, etc.. Shahani y Harper [43] determinaron la cantidad mínima de penicilina y aureomicina necesaria para inhibir satisfactoriamente el crecimiento de 19 cepas de queso. Tan sólo 0.05 – 0.1 unidades mL⁻¹ de penicilina y 1.0 – 3.0 µg mL⁻¹ de aureomicina fueron necesarios para inhibir el

crecimiento completo de la mayoría de los cultivos ensayados. Por otra parte, Whitehead y col. [44] observaron que 0.05 unidades de penicilina por mL de leche rebajaba considerablemente la producción de ácido y 0.5 unidades la impedía completamente. Asimismo, comprobaron que bajos niveles de antibióticos también afectaban a la textura y sabor del producto final, además de incrementar la probabilidad de crecimiento de patógenos como los coliformos, resistentes a los antibióticos [45].

3.2.3. PROBLEMAS MEDIOAMBIENTALES

La atención prestada hasta ahora por las administraciones y los científicos al impacto de los productos farmacéuticos sobre el medio ambiente se puede calificar de ínfima.

El consumo europeo de antibióticos es casi igual que la producción de ciertos pesticidas, es decir, varios miles de toneladas anuales. El potencial contaminante de los antimicrobianos es obvio, ya que éstos fueron concebidos para inducir efectos biológicos. Además, algunos antibióticos pueden llegar a ser persistentes e incluso lipófilos, lo que agrava su capacidad para polucionar. De hecho, se sospecha que el uso generalizado de agentes antibacterianos en medicinas humanas y veterinarias ha provocado el desarrollo de cepas medioambientales resistentes a dichos compuestos afectando peligrosamente a los ecosistemas.

Por otra parte, cabe destacar que los antibióticos están englobados en un nuevo tipo de contaminantes medioambientales conocidos como contaminantes farmacéuticos y de productos de uso personal (**PPCPs**, del inglés “*Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants*”).

El interés por el control de los PPCPs comenzó en Europa en los años 80 y, en la actualidad, existen numerosos trabajos científicos [46,47] y proyectos de investigación, como Eravmis (2000), Rempharmawater y Poseidon, que se centran en la evaluación del impacto de la presencia de antibióticos en el medio ambiente y en los que han participado científicos de 13 países [48].

Según estos estudios, las principales vías de entrada de PPCPs en el medio ambiente se deben a las prácticas que se realizan en zoonosis, como pueden ser: la utilización del estiércol producido por animales sometidos a tratamiento antibiótico como abono y la reutilización de aguas que han sido usadas para suministrar antibióticos en el riego de cultivos. Para la evaluación del riesgo que suponen estas prácticas, en el departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) han desarrollado un Sistema de Suelo Multiespecie (MS-3), en el marco del proyecto Eravnis, que permite conocer qué ocurre en una columna de suelo agrícola de 25 centímetros, como si fuera un laboratorio [49].

En la figura 8 se recogen los diferentes ecosistemas que pueden estar afectados por los PPCPs así como la gran variedad de fuentes posibles de contaminación.

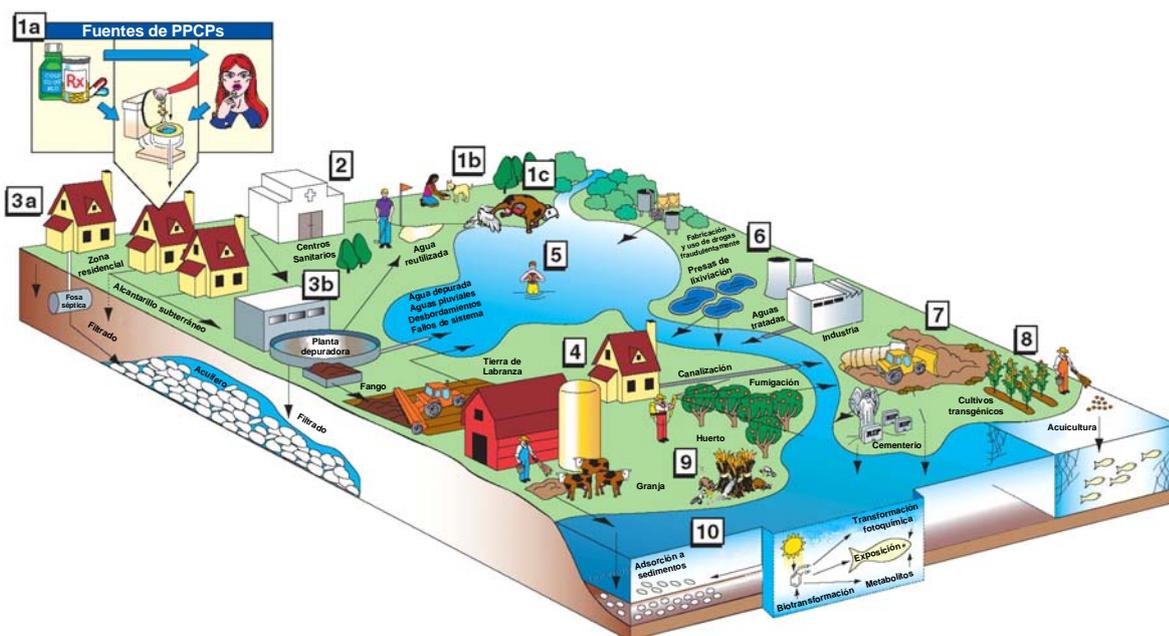


Figura 8. Contaminación por PPCPs: fuentes y ecosistemas afectados: [1] Uso doméstico: (1a) Personas, (1b) Mascotas. Fuentes de PPCPs: Excreción del organismo (sustancias no metabolizadas o metabolitos), vertido incontrolado de medicamentos al desagüe, filtración al subsuelo desde el sistema de alcantarillado, (1c) abandono de cadáveres de animales que sirven de alimento a carroñeros. [2] Vertido de residuos de hospitales a sumideros urbanos. [3] Liberación de efluentes líquidos de fosas sépticas (3a) y plantas depuradoras (3b) en aguas superficiales y/o acuíferos. [4] Transferencia de residuos sólidos a superficies: fertilización con abonos (ej. antibióticos), vertido de piensos medicamentosos, etc. [5] Liberación directa por baños, lavados. [6] Vertido controlado y clandestino de residuos industriales. [7] Compactación y enterramiento de residuos (domésticos, medicamentos, cementerios). [8] Liberación de aguas (medicadas y/o excretadas) empleadas en acuicultura, vertido de sustancias procedentes de cultivos transgénicos. [9] Liberación de agentes químicos empleados para desinfección y desratización. [10] Transporte final al compartimento acuoso (fototransformación, alteración físico-química, degradación, mineralización, volatilización, absorción por plantas, etc.).

No sólo los humanos y los animales respondemos peor a la farmacología, también lo hacen las **plantas depuradoras** donde van a parar residuos que atacan directamente a las bacterias y otros microorganismos encargados de la biodegradación de las sustancias contaminantes. No obstante, hay que destacar que se está produciendo una gran evolución en materia de depuración de aguas. Por ejemplo, las investigaciones realizadas dentro del proyecto Poseidon [50] demuestran que la aplicación de ozono y luz ultravioleta permite la eliminación del 80% de los antibióticos presentes en las aguas. Precisamente, Alaton y col. [51] han evaluado la degradación por ozonización de amoxicilina y ácido clavulánico en un efluente de depuradora, obteniendo una eficiencia en el proceso de oxidación de hasta el 84% para ambos compuestos.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD, LEGISLACIÓN Y CONTROL DE RESIDUOS

4

4.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS Y EN EL MEDIO AMBIENTE

Para garantizar la seguridad frente a los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, es necesario un análisis pormenorizado de los riesgos y el establecimiento de directrices que regulen adecuadamente el uso de estos compuestos en zootecnia.

Asimismo, se evidencia la necesidad de evaluar las repercusiones medioambientales de éstos fármacos incluyendo, en las directrices mencionadas, criterios de evaluación del riesgo medioambiental.

En resumen, los estudios propuestos deben estar dirigidos a demostrar que el uso de un antibiótico es seguro [52]:

- Para las especies diana, a los niveles permitidos;
- Para las personas que al manejar dichos compuestos, ya sea en forma pura o incorporado a premezclas o pienso, estén expuestas a los mismos a través de las vías respiratorias o por contacto con otras glándulas mucosas, los ojos o la piel;
- Para los consumidores que ingieren alimentos procedentes de animales a los que se ha administrado el fármaco y que podrían contener restos del mismo o sus metabolitos;

- Para los animales y las personas a través de la selección y la difusión de genes resistentes a los agentes antimicrobianos;
- Para el medio ambiente, ya sea directamente o a través de los excrementos de los animales.

4.1.1. ANÁLISIS DE LOS RIESGOS DERIVADOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Un **residuo** se define literalmente como “algo que está de más” [53]. Por su trascendencia legal, podemos considerar la definición de “residuo” recogida en el artículo 2 de la Directiva del Consejo 96/23/CEE [54], incluida en el artículo 2.3 del Real Decreto 1749/1998 [55], entendida como: *‘el residuo de sustancias de acción farmacológica, de sus productos de transformación y de otras sustancias que se transmitan a los productos animales y que puedan resultar nocivos para la salud humana’*.

En el curso de los últimos años, la problemática de los residuos de antibióticos de uso veterinario en los alimentos ha ido evolucionando. En un principio se tenía el concepto de “residuos cero” pero, hoy en día, gracias al perfeccionamiento de los métodos de análisis cuantitativos es posible detectar cantidades de residuos muy pequeñas, del orden de partes por billón. Gracias a ello y basándose en los datos toxicológicos, se establecieron los **límites máximos de residuos** (LMRs) que son: *‘el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg kg^{-1} o en $\mu\text{g kg}^{-1}$ sobre la base en peso en fresco) autorizada por la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio’* [57].

Actualmente, cada sustancia farmacológicamente activa debe ser estudiada desde el punto de vista de su significancia toxicológica para el hombre, al objeto de establecer el **nivel sin efecto adverso observado** (NOEL) y, en consecuencia, la **ingesta diaria admisible** (IDA) como se muestra en la figura 9. La IDA debe ser compatible con los LMRs y son valores clave para la protección del consumidor frente a los residuos potenciales de medicamentos veterinarios presentes en alimentos.

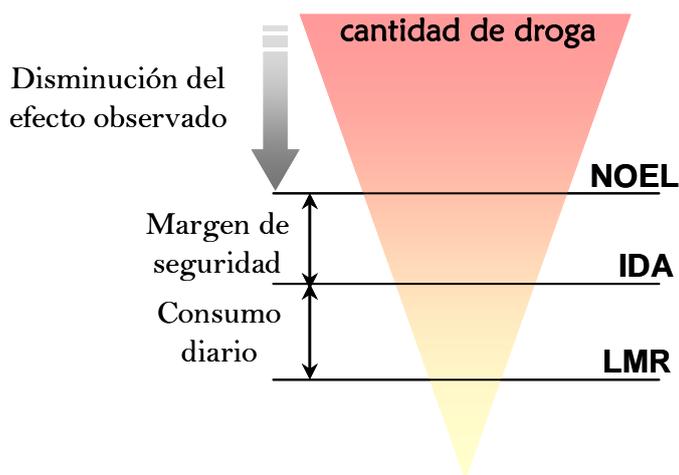


Figura 9. Esquema correspondiente al principio de la evaluación toxicológica de residuos y contaminantes: NOEL (mg kg^{-1} en animales); IDA (mg día^{-1}); LMR (mg kg^{-1}).

El punto de partida de cualquier **evaluación del riesgo** es identificar todo peligro o efecto adverso, incluso teórico, que puede ser originado por el consumo de un alimento (carne, leche o huevos) conteniendo residuos de un medicamento veterinario. El riesgo es función de dos parámetros, la peligrosidad de la sustancia química, es decir, su **toxicidad** y el **nivel de exposición** al que estaría sometido el consumidor. Además, la evaluación del riesgo tiene en consideración otros factores tales como la jerarquización de las prioridades, la relación coste/eficacia de los métodos de control y consideraciones socioeconómicas. Por último, la comunicación del riesgo exige intercambios de información entre las autoridades responsables del análisis del riesgo y el conjunto de las personas implicadas. A tal efecto interviene la “Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos” (EMEA) y el “Comité Conjunto de Aditivos Alimentarios” (JECFA).

Como norma general, deberán presentarse los estudios tendentes a establecer la identidad, las condiciones de empleo, las propiedades fisico-químicas, los métodos de control y la eficacia del medicamento veterinario así como los efectos biológicos y toxicológicos de su evolución metabólica y sus residuos en las especies diana. Estos análisis se resumen en las siguientes etapas:

1. **Identificación de los residuos** presentes en los alimentos capaces de inducir efectos adversos sobre la salud del consumidor.
2. **Caracterización de la peligrosidad de los residuos** mediante estudios toxicológicos *in vitro* e *in vivo*, en animales de experimentación y si fuera posible, obtención de datos epidemiológicos en el hombre que caractericen los efectos adversos que deben tomarse en consideración.
3. **Evaluación de la exposición para el consumidor.** Sin conocer con certeza las raciones consumidas, lo que se hace es sobreestimar las posibilidades de ingesta alimentaria. El principio que se aplica supone igualmente el caso más desfavorable en el que los alimentos consumidos están todos contaminados con concentraciones de residuos iguales a los LMRs, incluso aunque el medicamento veterinario no se use a gran escala y que los tratamientos sean más bien ocasionales.
4. **Caracterización del riesgo** que se traduce por la fijación del LMR sobre la base de los datos precedentes, tras la estimación de las frecuencias y naturaleza de los efectos indeseables: el LMR garantiza el respeto de la IDA. El analista encargado de controlar los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal dentro del plan de vigilancia, debe asegurarse que los valores de los LMRs se cumplen en estos alimentos.

En definitiva, la evaluación de la seguridad de los residuos de los medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal está asociada estrechamente con la **evaluación del riesgo** (determinación de las IDAs) y de la **gestión del riesgo** (establecimiento y control de los LMRs). La seguridad de los alimentos para los consumidores frente a estos residuos farmacológicos está plenamente garantizada siempre que se respeten las normas de utilización de los mismos y que los dispositivos de control e inspección sean eficaces y funcionen en el curso de la recogida de los productos alimenticios de origen animal.

4.1.2. ANÁLISIS DE LOS RIESGOS DERIVADOS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Como se expuso anteriormente, es importante tener en cuenta las consecuencias que para el medio ambiente pueden ocasionar los antibióticos utilizados en zootecnia. Sin embargo, no existen unas pautas estrictas para la evaluación y control de riesgos como las que nos encontramos en el campo de los alimentos de origen animal.

No obstante, en la Directiva 2001/79/CE [52], en la que se fijan líneas directrices para la evaluación de aditivos en alimentación animal, sí se recogen ciertos planteamientos que deben adoptarse con el objeto de evaluar el impacto medioambiental de dichos aditivos.

Según se recoge en dicha orden, para determinar el impacto medioambiental de un aditivo veterinario, se adoptará un planteamiento gradual (véase esquema decisional) (figura 10), en el que, en una primera fase (fase I), se identifiquen claramente las sustancias que no necesitan más pruebas. Para los demás, será necesario introducir una segunda fase de pruebas (fase II A) a fin de obtener información adicional para llevar a cabo estudios ulteriores (fase II B).

- **Fase I de evaluación.**

El objetivo de la fase I de evaluación es determinar, sobre la base de datos ya establecidos para otros fines, si es probable que un aditivo o sus metabolitos presenten efectos ambientales significativos. No se realizará la fase II de evaluación sobre la base de uno de los dos criterios siguientes:

a) *La naturaleza química y el efecto biológico del aditivo y de su uso indican que el impacto será insignificante.* En estos casos se cumple que el aditivo o su metabolito o metabolitos principales (más del 20 por 100 del total de residuos en los excrementos) son: a) sustancias fisiológicas/naturales (por ejemplo una vitamina o un mineral) que no alterarán la concentración en el ambiente, a menos que exista un motivo evidente que aconseje la evaluación (por ejemplo, cobre); b) aditivos destinados a los animales de compañía (excluidos los caballos).

b) *La concentración ambiental prevista (PEC) es demasiado baja para resultar peligrosa.* Por lo que se refiere al compartimiento terrestre, no se requerirá ninguna evaluación adicional si el valor PEC no excede de los $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, para el conjunto de los principales componentes residuales en el abono procedente de excrementos de animales a los que se les ha administrado aditivos. Por lo que se refiere al agua, el peor valor PEC aparecerá, ya sea por vertido directo de los piensos o de los excrementos que contienen el aditivo y sus metabolitos, en depósitos de agua o por medio de lixiviación del material que se encuentra en los excrementos o en el suelo en las aguas freáticas. Si se puede establecer, de forma admisiblemente fiable, que el valor PEC relativo a la contaminación de los depósitos de agua o del agua freática es menor de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, no será necesario llevar a cabo la fase II de la evaluación del efecto medioambiental del aditivo en los medios acuáticos.

En general, si no puede demostrarse que el aditivo se puede clasificar en una de estas categorías de exención, o si el aditivo se libera directamente en el medio ambiente (por ejemplo, en la acuicultura), se requerirá la fase II de la evaluación. En el caso de los antibióticos esta fase II se hace absolutamente necesaria ya que, entre otros aspectos, estas sustancias son extensamente utilizadas con fines profilácticos en piscifactorías [56].

- **Fase II de evaluación.**

La fase II de la evaluación se realizará en dos partes: fase II A y fase II B. En ella, se evaluará el potencial de bioacumulación del aditivo y de sus principales metabolitos, así como su influencia sobre el margen de seguridad previsto.

Fase II A. El objetivo de la fase II A de la evaluación es identificar el riesgo para el medio ambiente por medio de: el refinamiento del cálculo de los valores PEC y la determinación de la relación entre la exposición, niveles de aditivo y los efectos nocivos a corto plazo en especies animales y vegetales que sean representativas del ecosistema objeto de estudio. El uso de estos resultados servirá para determinar los valores de la *concentración prevista sin efecto (PNEC)*.

RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE DE LOS ADITIVOS PARA LA ALIMENTACIÓN ANIMAL. Esquema decisonal, fase I

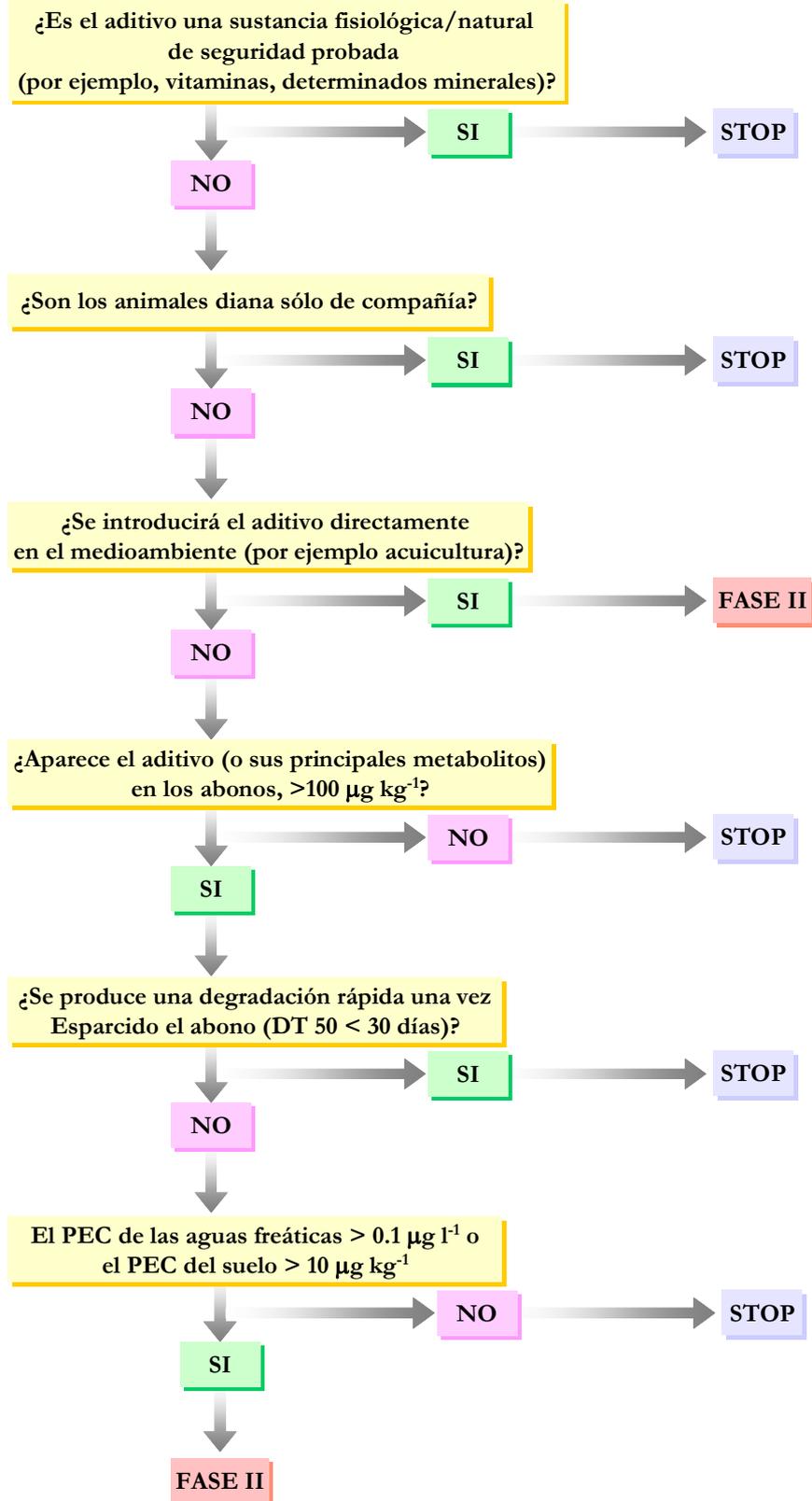


Figura 10. Esquema decisonal para la evaluación de los riesgos para el medio ambiente de los aditivos empleados en la alimentación animal [52].

Fase II B. (estudios toxicológicos más detallados). Aquellos aditivos para los cuales persisten dudas sobre su impacto medioambiental una vez realizada la fase II A de evaluación, requerirán estudios más detallados sobre sus efectos en las especies biológicas de los compartimientos medioambientales que, de acuerdo con los resultados de los estudios de la fase II A, siguen presentando dudas.

Finalmente, en el caso de que no se pueda establecer un margen de seguridad adecuado entre los valores de PEC y PNEC, se proporcionarán medidas atenuantes eficaces para limitar las consecuencias negativas del residuo en el medio ambiente.

4.2. LEGISLACIÓN Y CONTROL

Toda la reglamentación de la Unión Europea referente a los **residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal** ha sido objeto de un esfuerzo de armonización importante. El objetivo de esta reglamentación es doble, por una parte asegurar un mismo nivel de protección de la salud en el conjunto de la Unión Europea y por otra, facilitar los intercambios de los alimentos de origen animal.

Básicamente, estas medidas han sido el establecimiento de los LMRs que se fijan para un principio activo (residuo marcador) y para un tejido dado (tejido diana). Los LMRs constituyen una norma de seguridad alimentaria de tal importancia que la Unión Europea ha regulado mediante el Reglamento 90/2377/CEE el establecimiento, de manera centralizada, de estos LMRs que se aplican en el conjunto de todos los Estados miembros [57]. Desde el 1 de enero de 1992, ningún Estado miembro puede acordar la autorización de un registro de un nuevo medicamento veterinario destinado a los animales productores de alimentos si no se ha establecido previamente el LMR comunitario para el residuo marcador. Estas normativas están en constante revisión como consecuencia de la aportación de nuevos y mejores datos científicos. De hecho, el reglamento 90/2377/CEE desde su elaboración hasta septiembre de 2002 ha sido rectificado 8 veces [58] y modificado en ciento dos ocasiones, la última en abril de 2003 [59].

La tabla 7 recoge los valores de los LMRs para diversos antibióticos β -lactámicos establecidos por la Comunidad Económica Europea en alimentos de origen animal.

Tabla 7. Lista de sustancias farmacológicamente activas (antibióticos β -lactámicos) cuyos límites máximos de residuos se han fijado por la UE [57].

ANEXO I					
Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tejidos diana	Otras disposiciones
• Penicilinas					
Amoxicilina	Amoxicilina	Todas las especies productoras de alimentos	50	Músculo	
			50	Grasa	
			50	Hígado	
			50	Riñón	
			4	Leche	
Ampicilina	Ampicilina	Todas las especies productoras de alimentos	50	Músculo	
			50	Grasa	
			50	Hígado	
			50	Riñón	
			4	Leche	
Bencilpenicilina (Penicilina G)	Bencilpenicilina (Penicilina G)	Todas las especies productoras de alimentos	50	Músculo	
			50	Grasa	
			50	Hígado	
			50	Riñón	
			4	Leche	
Cloxacilina	Cloxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	300	Músculo	
			300	Grasa	
			300	Hígado	
			300	Riñón	
			30	Leche	
Dicloxacilina	Dicloxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	300	Músculo	
			300	Grasa	
			300	Hígado	
			300	Riñón	
			30	Leche	
Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)	Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)	Porcinos	25	Músculo	
			25	Hígado	
			25	Riñón	
Nafcilina	Nafcilina	Bovinos	300	Músculo	Exclusivamente para uso intramamario
			300	Grasa	
			300	Hígado	
			300	Riñón	
			30	Leche	

Tabla 7. Lista de sustancias farmacológicamente activas (antibióticos β -lactámicos) cuyos límites máximos de residuos se han fijado por la UE [57] (continuación).

ANEXO I						
Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tejidos diana	Otras disposiciones	
• Penicilinas (cont.)						
Oxacilina	Oxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	300	Músculo		
			300	Grasa		
			300	Hígado		
			300	Riñón		
			30	Leche		
Penetamato	Bencilpenicilina (Penicilina G)	Bovinos	50	Músculo		
			50	Grasa		
			50	Hígado		
			50	Riñón		
			4	Leche		
		Porcinos	50	Músculo		
			50	Grasa		
			50	Hígado		
50	Riñón					
• Cefalosporinas						
Cefacetrilo	Cefacetrilo	Bovinos	125	Leche	Exclusivamente para uso intramamario	
Cefalexina	Cefalexina	Bovinos	200	Músculo		
			200	Grasa		
			200	Hígado		
			1000	Riñón		
			100	Leche		
Cefalonio	Cefalonio	Bovinos	20	Leche		
Cefapirina	Suma de cefapirina y desacetilcefapirina	Bovinos	50	Músculo		
			50	Grasa		
			100	Riñón		
			60	Leche		
Cefazolina	Cefazolina	Bovino, ovinos, caprinos	50	Leche		
Cefoperazono	Cefoperazono	Bovinos	50	Leche		
Cefquinoma	Cefquinoma	Bovinos	50	Músculo		
			50	Grasa		
			100	Hígado		
			200	Riñón		
			20	Leche		
		Porcinos	50	Músculo		
			50	Grasa		
			100	Hígado		
200	Riñón					

Tabla 7. Lista de sustancias farmacológicamente activas (antibióticos β -lactámicos) cuyos límites máximos de residuos se han fijado por la UE [57] (continuación).

ANEXO I					
Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Tejidos diana	Otras disposiciones
• Cefalosporinas (cont.)					
Ceftiofur	Suma de todos los residuos con estructura β -lactámica expresados como desfuroilceftiofur	Bovinos	1000	Músculo	Excluido uso intramamario
			2000	Grasa	
			2000	Hígado	
			6000	Riñón	
			100	Leche	
		Porcinos	1000	Músculo	
			2000	Grasa	
			2000	Hígado	
			6000	Riñón	
• Inhibidores de la β-lactamasa					
Ácido clavulánico	Ácido clavulánico	Bovinos	100	Músculo	
			100	Grasa	
			200	Hígado	
			400	Riñón	
			200	Leche	
		Porcinos	100	Músculo	
			100	Piel y grasa	
			200	Hígado	
			400	Riñón	

Por otra parte, hay que destacar que existen organismos internacionales cuyo fin es ayudar a los países que lo necesiten en la evaluación del riesgo, evitando la dispersión de los esfuerzos científicos y llevando a cabo una armonización favorable para una protección homogénea de la salud pública, beneficiando los intercambios internacionales. Ejemplo de estas organizaciones son: el comité del *Codex Alimentarius* [60], cuerpo subsidiario de la **FAO** (del inglés “*Food and Agriculture Organization*”) y la organización mundial de la salud (**WHO**, del inglés “*World Health Organization*”), que propone a los gobiernos internacionales normas alimentarias, así como diferentes técnicas analíticas, en función de la responsabilidad de los diferentes estamentos de la cadena alimentaria. En contraste con la FDA y las directrices comunitarias de la UE, la Comisión *Codex Alimentarius* no tiene autenticidad legal pero es un valor de peso para la consecución de una armonización mundial, ya que muchos países adoptan sus propuestas en sus legislaciones nacionales [61].

4.2.1. CONTROL DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

El objetivo de los planes de **vigilancia** (o **control**) de residuos es verificar que se cumplen los LMRs establecidos para los diferentes productos alimenticios de origen animal. La Directiva del Consejo 86/469/CEE [62] establece igualmente las responsabilidades de la Comisión Europea, cuyo papel es proponer los métodos analíticos de referencia para la investigación de residuos dentro de un programa conocido como Plan Nacional. Bajo este plan, el 0.1% de los animales destinados al consumo humano, se deben tomar como muestras para averiguar la posible existencia de residuos de antibióticos.

La Comisión suele armonizar los criterios de validación de los métodos analíticos de confirmación, y designa los **laboratorios comunitarios de referencia (LCR)**. Por decisión del Consejo (91/664/CEE) [63] se han designado 4 LCR siendo el LMV de Fougères (Francia) el laboratorio responsable del control de antimicrobianos en los países de la UE.

En España, la determinación sistemática de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal se realiza en el Centro Nacional del Instituto de Salud Carlos III, Laboratorio Nacional de Referencia para el análisis de este tipo de sustancias. Durante los años 1994 y 1995, se realizó en dicho centro un estudio sobre 634 muestras recibidas de laboratorios de control para la identificación de los antibióticos (figura 11) que producían respuesta positiva en los ensayos de inhibición antimicrobianos que allí se efectuaron.

Una vez realizados todos los análisis pertinentes de confirmación, se pudo observar que de todas las muestras recibidas de riñón y músculo de reses ovinas, la presencia de tetraciclinas acaecía en más de un 90%. Además, las tetraciclinas fueron también los antibióticos aparecidos con mayor frecuencia en muestras de ganado porcino aunque también se detectaron cantidades significativas de β -lactámicos en músculo y de neomicina o gentamicina en el riñón. Los porcentajes de antimicrobianos en ganado vacuno son más variados, las tetraciclinas y los antibióticos

β -lactámicos son los que aparecen más frecuentemente en el músculo de la especie y neomicina y gentamicina en el riñón.

Si consideramos el conjunto de todos los tejidos y especies, los resultados demuestran que los residuos de antibióticos que aparecen con mayor frecuencia en muestras de origen animal son las tetraciclinas.

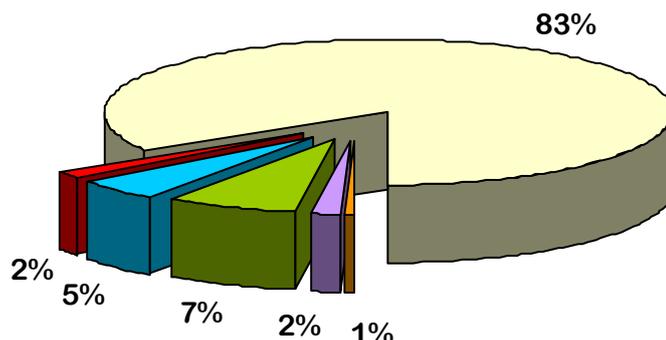


Figura 11. Naturaleza de los antibióticos que contenían las muestras positivas analizadas en los años 1994 y 1995 en el Centro Nacional de Salud Carlos III. ● tetraciclinas (83%), ● estreptomicina (1.7%), ● neomicina y gentamicina (5%), ● β -lactámicos (7.5%), ● eritromicina y otros macrólidos (1.7%) y ● tilosina y quinolonas (83%).

No obstante, tan sólo en un 16% de los casos los niveles encontrados superaron los límites máximos de residuos ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en músculo y $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ en riñón) [64].

Por último debemos, destacar que los antibióticos, junto a otros residuos de medicamentos veterinarios, escapan en gran medida a las regularizaciones gubernamentales relativas al **medio ambiente**. De hecho, ningún antimicrobiano se recoge en la lista de sustancias prioritarias y peligrosas de la directiva del marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (Directiva Marco 2000/60/CE) [65,66].

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

5

La metodología utilizada actualmente para la determinación de antibióticos β -lactámicos es muy variada e incluye la utilización de diferentes técnicas analíticas. Cada una de ellas aporta una serie de ventajas e inconvenientes que deben ser valoradas detenidamente a la hora de seleccionar el sistema de medida a utilizar en cada caso. No obstante, la determinación de estos antibióticos en alimentos de origen animal, a las bajas concentraciones permitidas por la legislación, implica la necesidad de desarrollar métodos de medida muy sensibles y selectivos.

Los métodos de análisis que se aplican hoy en día para la detección de antimicrobianos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos cromatográficos y métodos no cromatográficos, en donde se engloban los métodos basados en ensayos de barrido (del inglés “*screening methods*”).

5.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las técnicas cromatográficas son, sin duda, las más utilizadas para determinar con fines cualitativos y/o cuantitativos, antibióticos β -lactámicos. El gran potencial de éstos métodos estriba en su capacidad para llevar a cabo determinaciones multianalito, en su especificidad, precisión, exactitud, reproducibilidad así como en su excelente sensibilidad, que depende del detector utilizado. Estas características han facilitado la

implantación de los métodos cromatográficos como métodos de validación de los demás métodos analíticos utilizados en la detección de residuos de antibióticos en muestras biológicas, medioambientales, preparados farmacéuticos, etc..

La técnica cromatográfica más utilizada para el análisis de antibióticos es la cromatografía líquida de alta resolución (**HPLC**, del inglés “*high performance liquid chromatography*”). No obstante, aunque en menor medida, también se han desarrollado métodos basados en cromatografía de gases (**GC**, del inglés “*gas chromatography*”) para la determinación de estos antimicrobianos.

5.1.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

El hecho de que la cromatografía de gases no sea una técnica muy utilizada para esta aplicación se debe a que los antibióticos β -lactámicos son compuestos poco volátiles, de elevada polaridad y termolábiles, lo que hace necesario recurrir a una derivatización precolumna para llevar a cabo la determinación [67]. Así, por ejemplo, Meetschen y col [68] han determinado penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y nafcilina en leche y penicilina G en músculo bovino, realizando una derivatización con diazometano. La detección se realiza con un espectrómetro de masas (**MS**, del inglés “*mass spectrometry*”) y los límites de detección alcanzados oscilan entre 0.1 – 0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. No obstante, el método desarrollado no puede aplicarse para el análisis de β -lactámicos anfóteros, como son la amoxicilina y ampicilina, pues la reacción de metilación utilizada sólo puede emplearse con penicilinas de cadena lateral neutra.

En GC se utilizan gran variedad de dispositivos de detección, tales como los de captura de electrones (**ECD**, del inglés “*electron captured detector*”), fósforo-nitrógeno (**NPD** del inglés “*nitrogen phosphorus detector*”) o fotometría de llama (**FPD**, del inglés “*flame photometric detector*”). Empleando, éste último, H. Mineo y col. [69] han desarrollado un método para la determinación de siete penicilinas, tres tetraciclinas y otros antibióticos en músculo bovino con recuperaciones, para los 36 compuestos evaluados, por encima del 82%.

5.1.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es, sin duda alguna, la técnica de separación más utilizada para la determinación de antibióticos.

La separación de estas sustancias se realiza generalmente mediante columnas de fase inversa, con diferentes tipos de soportes (octadecil-, octil-, fenil-, soportes poliméricos, etc.). A lo largo de los años se han publicado numerosos trabajos evaluando el efecto de distintas variables cromatográficas sobre la separación de los antibióticos β -lactámicos, tales como: el tipo de columna, temperatura, concentración y pH del tampón de la fase móvil, la naturaleza y contenido de modificador orgánico en la fase móvil, etc. [70-75].

Los sistemas de detección acoplados al HPLC son, habitualmente, la **espectrofotometría UV** [76,77], el detector de hilera de diodos integrados (**DAD**, del inglés “*diode array detector*”) [78,79], la **fluorescencia** y, más recientemente, la espectrometría de masas (MS) [80].

La **absorción UV** proporciona en general una sensibilidad adecuada [81] pero, para la mayoría de los análisis de fármacos, no permite obtener información estructural y está sujeta a múltiples interferencias, lo que hace necesario una etapa previa de limpieza de muestra o bien, una derivatización de los compuestos [82]. No obstante, el uso del detector **DAD** ha permitido mejorar la selectividad del método ya que permite la medida a distintas longitudes de onda, lo cual facilita la minimización del efecto matriz mediante un sistema de compensación de los efectos de la misma. Utilizando este tipo de métodos es posible la determinación fiable de ciertos tipos de antibióticos en una gran variedad de matrices biológicas y medioambientales [83,84]. Sin embargo, no es posible tampoco en este caso obtener información estructural sobre los antibióticos de una misma clase, como es el caso de los β -lactámicos, debido a la similitud que presentan los espectros de absorción UV de los mismos.

La **detección fluorimétrica** no se ha utilizado tan extensamente como la de absorción UV, ya que la mayoría de estos antimicrobianos no presenta fluorescencia intrínseca. Sin embargo, este sistema de detección se ha aplicado ampliamente al

análisis de amino penicilinas, como amoxicilina y ampicilina, previa reacción de derivatización precolumna. Los reactivos derivatizantes más ampliamente utilizados son *formaldehído* [85,86,87], *salicilaldehído* [88], *4-bromometil-7-metoxicumarina* [89] y *dansilhidrazina* [90].

De este modo, Luo y Ang [91] han descrito la determinación de amoxicilina en tejidos animales empleando un detector fluorescente. El derivado se obtiene por reacción con formaldehído alcanzándose límites de detección de $0.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ y recuperaciones de entre 82 – 95%. Por otra parte, Luo y col. [88] han descrito la determinación de amoxicilina y ampicilina en leche empleando como reactivo derivatizante salicilaldehído, alcanzándose límites de detección de 1.1 y $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para amoxicilina y ampicilina respectivamente. Recientemente, Gamba y col. [92] han descrito un procedimiento cromatográfico con detección fluorescente, utilizando formaldehído como compuesto derivatizante, para la determinación de amoxicilina y ampicilina en piensos con recuperaciones del orden del 80%.

Algunos grupos de investigación han descrito procedimientos basados en el acoplamiento de **detectores electroquímicos** a HPLC para el análisis de antibióticos β -lactámicos. Estos dispositivos responden a sustancias electroactivas y son muy sensibles, simples y con una extensa aplicabilidad. Kirchmann y col. [93] han empleado un detector amperométrico de pulso integrado (**IPAD**, del inglés *“integrated pulsed amperometric detector”*) para la determinación de ocho penicilinas en leche, alcanzando unos límites de detección de $70 \mu\text{g L}^{-1}$ para penicilina. G. Dasenbrock y LaCourse [94] describieron, en 1998, el análisis de cepapirina y ampicilina en leche mediante otro sensor IPAD, consiguiendo una gran selectividad y límites de detección del orden de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

En el año 1994, Carson y col. [95] evaluaron distintos métodos basados en GC y LC utilizando detectores comerciales para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche y concluyeron que ninguno de los procedimientos ensayados resultaba adecuado como método confirmatorio. De hecho, la directiva 93/256/CEE [96] establece que: *“los métodos basados solamente en el análisis cromatográfico, sin el uso de detección espectrométrica molecular, no son adecuados para su uso como métodos confirmatorios”*, concepto que se ha

reforzado recientemente con la directiva 2002/657/CE [97]. Esta normativa ha generado un gran impulso en el desarrollo de métodos de LC acoplados a **espectrometría de masas (MS)** para la determinación de antibióticos en una gran diversidad de matrices ya que, entre otros aspectos, este sistema de detección ofrece, el mejor sistema de análisis de compuestos polares, no volátiles y/o termolábiles en términos de sensibilidad y, sobretodo, especificidad. En la actualidad, el 80% de las técnicas empleadas para la determinación de residuos veterinarios están basados en LC-MS [98].

Voyksner y col. [99] han propuesto un procedimiento rápido y simple, basado en el acoplamiento LC-TS-MS, para el análisis de penicilina G en leche con límites de detección de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Sucesivamente, el sistema de nebulización térmica (**TS**) se ha ido reemplazando por las interfases basadas en ionizaciones más suaves, como son las basadas en ionizaciones a presión atmosférica (**APCI**) y electronebulización (**ESI**). Este hecho se debe, fundamentalmente, a los problemas observados de descomposición térmica y distorsión de picos que produce a menudo la interfase TS durante el análisis de antibióticos β -lactámicos y otros compuestos termolábiles y/o volátiles [80]. De este modo, Blanchflower y col. [100] han utilizado la interfase ESI acoplada a un equipo LC-MS para la determinación de cinco penicilinas en leche, alcanzándose límites de detección inferiores a los estipulados por la UE. En la actualidad, el sistema de electronebulización es el que posee un uso más extendido, principalmente en el análisis de muestras medioambientales. Precisamente, F. Sacher y col. han evaluado recientemente la presencia de siete penicilinas en aguas superficiales de Baden-Württemberg (Alemania) mediante LC-ESI-MS/MS, obteniéndose límites de detección de entre $15 - 21 \text{ ng L}^{-1}$, valores que reflejan la elevada sensibilidad del procedimiento desarrollado [101].

No obstante, dicho sistema sufre una serie de limitaciones, como son: su incapacidad de aceptar caudales de fase móvil elevados (volumen máximo admitido $4 - 50 \mu\text{L min}^{-1}$) y su incapacidad para asimilar fases móviles con alto contenido en sales. Es por ello que en la actualidad se están utilizando nuevas interfases como el triple cuadrupolo (**QqQ**), la trampa iónica (**IT**) y el tandem cuadrupolo-tiempo de vuelo (**Q-**

ToF) para la mejora del análisis de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC-ESI-MS [102,103,104].

A modo de resumen, en la tabla 8 se recogen las características más importantes de los principales métodos aplicados al análisis de antibióticos β -lactámicos, descritos en la bibliografía, basados en la cromatografía líquida de alta eficacia.

Tabla 8. Determinación de antibióticos mediante HPLC.

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
PARAC, CLOF, PENV, NAPX, BEZAF, IBUP, MEFEN	Agua de río	ODS-AM MeOH-agua-tampón gradiente	APCI-MS ESI-MS	LD: 0.04 – 1.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: SPE	[105]
PENG, PENV, OXA, NAFCI, CLOX, DICLOX	Hígado y riñón bovino	ODS-80 acetonitrilo-tampón	UV 220 nm	LD: 20 – 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE	[103]
AMOX	Músculo de bovino, porcino y aviar	ODS 2 ó 3 acetonitrilo-tampón	Fluorescencia $\lambda_{\text{exc}}=358$ nm $\lambda_{\text{emis}}=440$ nm	LD: - Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización	[93]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, NAFCI, DICLOX	Músculo, hígado y riñón de bovino y porcino	C ₁₈ acetonitrilo-MeOH-tampón gradiente	UV 323 nm	LD: 8.90 – 20.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización	[106]
OXA, CLOX, DICLOX, NAFCI	Leche bovina	C ₁₈ -	UV 300 nm derivatización fotoquímica	LD: - Observaciones: ultrafiltración RAM (ADS): 70 – 80%	[107]
AMOX	Músculo de trucha	C ₁₈ acetonitrilo-MeOH-tampón gradiente	UV 323 nm	LD: 2.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización	[108]
PENG, AMPI, AMOX, OXA, CLOX,	Leche bovina	YMC-ODS-AQ acetonitrilo-agua (65:35) gradiente	ESI-MS/MS	LD: 0.4 – 1.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE	[109]
AMOX	Plasma humano	C ₁₈ - Hypersil acetonitrilo-MeOH-tampón (1:3:96) isocrático	UV 228 nm	LD: 0.020 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Observaciones: columna RAM + BSA	[110]
AMOX, AMPI, PENG, CLOX	Músculo bovino	C ₈ acetonitrilo-tampón	UV 325 nm	LD: 2 – 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, derivatización	[82]

Tabla 8. Determinación de antibióticos mediante HPLC (continuación).

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
¹ PENG, ¹ PENV, ² CLOX, ² OXA, ² DICLOX	Leche bovina	C-2 acetonitrilo-tampón (ac. fórmico 10 mmol L ⁻¹) gradiente	UV 1325 nm 2350 nm	LD: 4 – 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: Derivatización (1,2,4 - triazol 2 mol L ⁻¹ + HgCl ₂ 0.01 mol L ⁻¹)	[111]
PENV, PENG, OXA, NAFCI, DICLOX, CLOX, MET	Agua de manantial	Merck LiChrospher RP-18 acetonitrilo-tampón (NH ₄ Ac 20 mmol L ⁻¹ , pH 5.7) gradiente	ESI-MS/MS	LD: 20 ng L ⁻¹ Observaciones: liofilización (79 – 94%) SPE (58 – 107%)	[112]
PENG, AMPI, AMOX, CLOX, DICLOX	Tejidos	C ₁₈ acetonitrilo-tampón gradiente	UV 325 nm	LD: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: dispersión de matriz sólida, SPE, derivatización	[113]
CEFAP, AMPI	Leche bovina	C ₈ (columna de guarda C ₈) MeOH-tampón	IPAD	LD: 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE	[114]
OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C ₈ acetonitrilo-MeOH-tampón	UV 340nm	LD: 2 – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización	[115]
AMPI, PENG, CLOX, DICLOX, NAFCI	Leche bovina	ODS acetonitrilo-MeOH-tampón	UV 210nm	LD: 30 – 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE	[116]
AMPI	Leche bovina	ODS-3 acetonitrilo-tampón	Fluorescencia $\lambda_{\text{exc}}=346\text{nm}$ $\lambda_{\text{emis}}=422\text{nm}$	LD: 0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: extracción, derivatización	[86]
AMOX, AMPI	Leche bovina	ODS-3 acetonitrilo-tampón gradiente	Fluorescencia	LD: 1.0 – 1.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, derivatización	[88]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C ₁₈ acetonitrilo-tampón gradiente	UV 323nm	LD: 1.3 – 2.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: SPE, derivatización	[117]
PENG, CLOX	Tejidos animales	C ₁₈ acetonitrilo-tampón	UV 325 nm	LD: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, derivatización	[118]
PENG, PENV	Leche bovina	Nova-Pak C ₁₈ acetonitrilo-tampón gradiente	TS-MS UV	LD: TS-MS/UV: 3/6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE	[119]

Tabla 8. Determinación de antibióticos mediante HPLC (continuación).

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
PENG	Tejidos bovino y de cerdo	Inertsil ODS-2 acetonitrilo-tampón (68:32) isocrático	UV 215 nm / lactamasa	LD: 5 µg kg ⁻¹ Observaciones: extrac. acetonitrilo y SPE	[120]
PENG, PENV	Sangre	Nova-Pak C ₁₈ acetonitrilo-tampón (25:75) isocrático	UV 325 nm	LD: - Observaciones: desproteínizar, SPE derivatización (1,2,4-triazol 2 mol L ⁻¹ + HgCl ₂ 0.01 mol L ⁻¹)	[121]
PENG, PENV	Queso, leche, yogurt	Nova-Pak C ₁₈ acetonitrilo-tampón (150 mmol L ⁻¹ NH ₄ Ac) gradiente	TS-MS	LD: - Observaciones: desproteínizar, SPE	[122]
PENG	Huevo	Inertsil C ₈ acetonitrilo-tampón (fosfato 5 mmol L ⁻¹) (28:72) isocrático	UV 325 nm	LD: - Observaciones: dispersión de matriz sólida, SPE, derivatización	[123]
OXA, CLOX, DICLOX	Leche, carne, queso	Nova-Pak C ₁₈ acetonitrilo-tampón (fosfato 0.1 mol L ⁻¹) gradiente	UV 345 nm	LD: 5 – 7 µg L ⁻¹ Observaciones: SPE 75 – 93%	[124]
AMOX, AMPI	Aguas residuales de hospital	YMC Hydrosphere C ₁₈ acetonitrilo-tampón (0.1% ác. fórmico) gradiente	ESI-MS/MS	LC: AMOX: 37 ng L ⁻¹ AMPI: 33 ng L ⁻¹ Observaciones: SPE (Isolut ENV+) AMOX: 54% AMPI: 48%	[125]
8 penicilinas + 7 cefalosporinas	Leche ¹ , músculo ² y riñón ³ bovino	Phenomenex Synergi Polar-RP phenylether acetonitrilo-MeOH-agua (0.005% ac. fórmico) gradiente	ESI-MS/MS	CCα¹: 4.6 – 113.8 µg L ⁻¹ CCα²: 52.6– 349.7 µg kg ⁻¹ CCα³: 54.6– 1081 µg kg ⁻¹ Observaciones: extrac. acetonitrilo y digestión enzimática	[126]
PENG, AMPI, OXA, AMOX, DICLOX, CEFA, CEFAP	Leche bovina	Merck-LiChrospher 100 RP18 acetonitrilo-agua (0.1% ác. fórmico) gradiente	ESI-MS/MS	LD: < 1 – 5 µg L ⁻¹ Observaciones: extracción ácida (28 – 82%)	[104]
AMOX, CLAV	Plasma humano	Merck-LiChrospher 100 RP18 acetonitrilo-tampón (0.01 mol L ⁻¹ fosfato + 0.02 mol L ⁻¹ (CH ₃) ₄ NCl) gradiente	UV 220 nm	LD: AMOX: 0.05 mg L ⁻¹ CLAV: 0.08 mg L ⁻¹ Observaciones: extracción MeOH	[127]
PENG, PENV	Medio de cultivo (producción industrial β-lactámicos)	Hibar LiChrosorb C ₁₈ acetonitrilo-tampón (0.2 mol L ⁻¹ tiosulfato + 0.04 mol L ⁻¹ ác. fosfórico) gradiente	UV 228 nm	LD: - Observaciones: desproteínizar con MeOH	[128]

Tabla 8. Determinación de antibióticos mediante HPLC (continuación).

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
OXA, CLOX, DICLOX	Músculo bovino	RP 18 (columna de guarda C ₁₈) acetonitrilo-MeOH-tampón	PB-MS	LD: 40 – 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción	[129]
AMPI	Leche bovina	C ₁₈ acetonitrilo-MeOH-tampón	UV 325nm	LD: 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, derivatización	[130]
CLOX, AMPI, AMOX	Leche bovina	Phenyl Spheri-5 i-propanol-tampón	TS-MS	LD: 100-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: dilución y centrifugación	[131]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C ₁₈ acetonitrilo-tampón-SDS gradiente	UV 210-290 nm.	LD: - Observaciones: desproteínizar, limpieza LC	[132]
PENG	Leche bovina	C ₈ acetonitrilo-tampón gradiente	UV 320nm	LD: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización postcolumna	[133]
PENG, AMPI, AMOX, CLOX, CEFAP	Leche bovina	C ₁₈ i-propanol-tampón	MS	LD: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, derivatización	[134]
AMOX, CEFAP, PENG, AMPI, CLOX, CEFTF	Leche bovina	a) fenil b) C ₁₈ a) acetonitrilo-tampón-NEt ₃ b) acetonitrilo-tampón	a) UV 210-290nm b) UV 230nm y TS-MS	LD: - Observaciones: filtrar	[135]
PENG, AMPI, AMOX, CEFAP, CLOX, CEFTF	Leche bovina	Micro LC acetonitrilo-tampón gradiente	ESI-MS	LD: 3 – 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínización y ultracentrifuga	[136]
PENV, PENG, OXA, CLOX, DICLOX	Músculo, riñón y leche	Inertsil ODS 2 acetonitrilo-tampón-NEt ₃	APCI-MS	LD: 2 – 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínización y LLE	[100]

Abreviaturas: PARAC: *paracetamol*, CLOF: *ác. clofibrato*, PENV: *penicilina V*, NAPX: *naproxen*, BEZAF: *bezafibrato*, IBUP: *ibuprofeno*, MEFEN: *ác. mefenámico*, PENG: *penicilina G*; OXA: *oxacilina*, CLOX: *cloxacilina*, DICLOX: *dicloxacilina*, NAFCI: *nafcilina*, AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, OXY: *oxitetraciclina*, CEFAP: *cefapirina*, CEFTF: *ceftiofur*, PROCAI: *procaína*, MET: *metilina*, CLAV: *ác. clavulánico*, CEFA: *cefalosporina*, BSA: *albúmina de suero bovino*, CC α : *límite de decisión*, TS: *nebulización térmica*, ESI: *interfase de electronebulización*, APCI: *interfase por ionización a presión atmosférica*, PB: *interfase de haz de partículas*, UV: *detector de ultravioleta*, IPAD: *detector amperométrico de pulso integrado*, MS: *espectroscopia de masas*, SPE: *extracción en fase sólida*, LLE: *extracción líquido-líquido*, SDS: *doecilsulfato sódico*, RAM: *material de acceso restringido*, ADS: *alquil diol sílica*.

5.1.3. OTROS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y DE SEPARACIÓN

5.1.3.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Además de la GC y el HPLC, se han aplicado otros métodos cromatográficos para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Entre los métodos desarrollados para llevar a cabo el análisis múltiple de antibióticos de diversa polaridad en concentraciones ultratraza, destaca la cromatografía en capa fina (**TLC**, del inglés “*thin layer chromatography*”) [137] y su análogo, la cromatografía en capa fina de alta resolución (**HPTLC**, del inglés “*high performance thin layer chromatography*”). Vaguean y Alongué [138] desarrollaron un método basado en TLC para la determinación cuantitativa de residuos de ampicilina en músculo y leche. Después de la extracción, derivatización, purificación y preconcentración de la muestra, ésta se inyecta en una placa de gel de sílice de HPTCL empleándose acetato de etilo como fase móvil. El analito se detecta espectrofotométricamente a 365 nm y los límites de detección alcanzados para la ampicilina en leche y músculo son de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ y $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Otro ejemplo de detección de antimicrobianos mediante cromatografía en capa fina es el trabajo de Ramírez y col. [139] que determinan ampicilina, penicilina G y dicloxacilina en leche de vaca mediante HPTLC con detección mediante bioautografía. Este sistema de detección está basado en la localización y cuantificación de la actividad antibacteriana en cromatografía, en este caso, plana [140]. El microorganismo utilizado para la detección es el *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Este método presenta un límite de detección comprendido entre $0.007 - 0.027 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los tres antibióticos y porcentajes de recuperación entre 90 – 100%.

5.2. MÉTODOS NO CROMATOGRÁFICOS

Como ya se ha indicado en el apartado 5.1., las técnicas cromatográficas se aplican extensamente para el análisis de antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes.

En general, los métodos desarrollados se caracterizan por la complejidad de todo el proceso analítico involucrado, que supone disponer de laboratorios con personal técnico cualificado. Además, la realización de análisis *in situ*, tanto en campo como en una línea de fabricación, es complicada. A ello se han de añadir los elevados costes del sistema y su mantenimiento. Por otro lado, el proceso de análisis es lento, ya que se requiere una etapa previa de tratamiento de muestra que limita la utilidad práctica de las técnicas cromatográficas en grandes explotaciones ganaderas y estaciones de control medioambiental en las que se requieren procedimientos que permitan garantizar el cumplimiento de las normativas vigentes en el menor tiempo posible.

Para llevar a cabo este control, se requieren métodos sensibles, selectivos, rápidos, automatizables, económicos y fáciles de usar. Todo ello ha generado la necesidad de poner a punto métodos alternativos para la determinación de residuos de antibióticos, como son los clásicos ensayos de inhibición microbiana e inmunoensayos [141] y otros desarrollados más recientemente como los sensores [142], “*kit*” de ensayos químicos [143] y equipos de laboratorio miniaturizados [144].

5.2.1. MÉTODOS BASADOS EN ENSAYOS DE BARRIDO (TEST DE SCREENING)

La importancia y el potencial de estos ensayos se ponen de manifiesto en el considerable incremento de trabajos científicos relacionados con estas metodologías analíticas en los últimos veinte años.

El interés de estos métodos analíticos es doble: en primer lugar, por la necesidad de abaratar los costes de los programas de vigilancia y control; en segundo lugar, por la necesidad de conocer el origen, vías de distribución y destino de los contaminantes que pueden ser perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

Un **ensayo de barrido** o **test de screening** se define como “*aquel método analítico que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que uno previamente establecido como umbral*” [145]. Por lo tanto, la aplicación de estos métodos permite identificar las muestras que probablemente están contaminadas las

cuales serán sometidas a un análisis más exhaustivo permitiendo determinar la presencia cualitativa y cuantitativa fiable del residuo mediante un método analítico validado que, en la mayoría de los casos, es cromatográfico. En la figura 12 se muestra el esquema de funcionamiento de los ensayos de barrido [145].



Figura 12. Esquema de aplicación de los ensayos de barrido.

5.2.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS DE BARRIDO

Entre las ventajas de los ensayos de barrido cabe destacar su rapidez, simplicidad y minimización de errores debido a la ausencia o aplicación de procedimientos sencillos de tratamiento de muestra. Otros factores son el ahorro de tiempo y dinero, ya que sólo las muestras que proporcionan una respuesta positiva al ensayo necesitarán ser confirmadas con otra técnica más sofisticada.

Las características fundamentales que diferencian los análisis convencionales de los ensayos de barrido se resumen en los siguientes puntos [145]:

- La respuesta que proporciona el ensayo permite tomar una decisión inmediata.
- Los resultados obtenidos mediante estos métodos a menudo necesitan ser confirmados mediante técnicas convencionales.
- Suelen proporcionar respuestas, fundamentalmente, cualitativas aunque, en menor medida, también pueden suministrar medidas cuantitativas.
- Requieren un escaso o nulo pretratamiento de muestra.
- Son ensayos rápidos.

No obstante, no es necesario que los métodos puestos a punto presenten todas estas características. Tan sólo es necesario definirse por tres de ellas para que un método analítico pueda ser considerado un ensayo de barrido.

Asimismo, una de las características más relevantes de estos procedimientos es el tipo de respuesta binaria que proporcionan, esto es SI/NO, que resalta su carácter cualitativo. No obstante, hay que considerar que muchos de estos ensayos, como sucede para la mayoría de los sensores, poseen la capacidad de proporcionar resultados cualitativos y también cuantitativos con óptimos valores de precisión y exactitud.

Por otro lado, del mismo modo que los resultados obtenidos mediante los métodos convencionales llevan asociados una incertidumbre debida al proceso de análisis, los ensayos que proporcionan respuestas binarias también se encuentra sometidos a errores, denominados:

- **Falsos negativos.** Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SI. Ejemplo de esta circunstancia sería que una muestra de leche que contuviera residuos de antibióticos produjera una respuesta negativa en el ensayo, considerándose por tanto apta para consumo.
- **Falsos positivos.** Se producen cuando el resultado del test es SI pero debería ser NO. Ejemplo de ello sería una muestra de leche que no contuviera ningún antimicrobiano y sin embargo el ensayo confirmase la presencia de dichos analitos.

5.2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE BARRIDO

Los ensayos de barrido o “*test de screening*” pueden ser clasificados atendiendo a una gran variedad de criterios, que se recogen en la tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de los ensayos de barrido (*test de screening*)[145].

TIPO DE RESPUESTA BINARIA	<i>Ensayos discriminatorios</i> Proporciona información individualizada de un analito o grupo de analitos
	<i>Ensayos globales</i> Proporciona información de varias especies considerándola como un único conjunto
RELACIÓN SEÑAL-ANALITO	<i>Ensayos directos</i> La señal analítica esta directamente relacionada con el analito
	<i>Ensayos indirectos</i> La señal analítica esta relacionada con el producto de una reacción química, bioquímica o inmunológica
ESTADO AGREGACIÓN DE LAS MUESTRAS	<i>Ensayos para muestras líquidas</i>
	<i>Ensayos para muestras gaseosas</i>
	<i>Ensayos para muestras sólidas</i>
TRATAMIENTO DE MUESTRA	<i>Ensayo directo</i> El más simple y la que mejor se ajusta a la definición de ensayo de barrido ya que no se realiza tratamiento previo de la muestra
	<i>Ensayo con pretratamiento simple</i> Se realiza un pretratamiento de muestra pero es rápido y simple
	<i>Ensayo con pretratamiento exhaustivo</i> Su aplicación sólo está justificada en el caso de que los métodos convencionales de análisis supongan un coste económico excesivo
SISTEMA DE DETECCIÓN	<i>Ensayo con detección idéntica</i> La más simple y la que mejor se ajusta a la definición de ensayo de barrido ya que no se realiza tratamiento previo de la muestra
	<i>Ensayo con detección diferente</i> Se realiza un pretratamiento de muestra, pero es rápido y simple

Además de en función de estos criterios, los ensayos de barrido también pueden clasificarse:

- En función del tipo de **sistema de detección**: ópticos, electroanalíticos, de masas, etc..
- Según el **formato de ensayo**, podemos encontrar “*kits*”, sensores de ensayo, etc..

5.2.2. ENSAYOS DE BARRIDO PARA ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

La necesidad de establecer normativas con LMRs cada día más bajos, así como la existencia de programas de vigilancia y control de residuos más rigurosos, ha originado una demanda creciente de métodos para la detección de antimicrobianos en muestras medioambientales y, especialmente, en productos alimentarios.

Para satisfacer estas necesidades, se han desarrollado distintas metodologías basadas en ensayos de barrido, algunas de las cuales se han comercializado, que presentan suficiente sensibilidad para el análisis de antibióticos β -lactámicos en tejidos biológicos, miel, pescados, orina, huevos, leche, agua, etc..

Los métodos basados en ensayos de barrido para la determinación de antibacterianos se pueden dividir en dos grandes grupos: **métodos microbiológicos** y **métodos inmunoquímicos**.

5.2.2.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

a) Ensayos de inhibición microbiana

Fueron los primeros métodos utilizados para la detección de antimicrobianos. Se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano debido a la presencia de antibióticos. Las principales ventajas de estos dispositivos es su capacidad de adaptación al análisis de un gran número de muestras, su facilidad de manejo y sus bajos costes. Sin embargo, poseen la desventaja de ser poco selectivos y de respuesta poco rápida (tiempos de incubación de más de dos horas).

Algunos de estos kits comerciales basados en esta respuesta biológica son:

- **Delvotest-P[®]** (DCM-Gist Brocades), introducido en los años 70 por Os y col.. El sistema emplea en un microorganismo, *Bacillus stearothermophilus*, que se encuentra encapsulado en un medio de cultivo agar que contiene un indicador de pH; el nutriente y la muestra se adicionan simultáneamente en el momento de la medición. La ausencia de antibiótico implica un cambio de color del

indicador ya que con el crecimiento bacteriano se produce una disminución del pH del medio. La sensibilidad para penicilina G es de 3 µg L⁻¹.

- **Delvotest-SP[®]** (DSM-Gist Brocades), de desarrollo más reciente, se diferencia de su predecesor en que es capaz de detectar un mayor espectro de antibacterianos, en especial las sulfonamidas. La sensibilidad de este ensayo para penicilina G se encuentra establecido en 2.5 µg L⁻¹. La última versión del dispositivo Delvotest es el **Delvotest[®] MCS** (DSM-Gist Brocades) que en Francia es utilizado, desde el año 2001, como método oficial para la detección de residuos de antibióticos en leche de vaca.

Aunque Delvotest es el ensayo de inhibición microbiana más empleado, existen otros muchos sistemas de detección comercializados: **Charm AIM-96** y **BsDA** (Charm Sciences Inc.), **Brilliant Black Reduction Test** (BR-test, 1967), mejorado por Müller en 1990 [146], **Valio T101-test** (1990), **CMT – Copan Milk Test** (Copan Diagnosis Inc.) y **Premi[®]test** (DSM-Gist Brocades), desarrollado para el análisis de antibióticos de amplio espectro en muestras de pescado, huevos, miel, orina, etc..

En la tabla 10 se muestran los límites de detección alcanzados por algunos ensayos de inhibición microbiana para antibióticos β-lactámicos.

Tabla 10. Límites de detección (µg kg⁻¹) declarados por las casas comerciales de algunos ensayos de inhibición microbiana para antibióticos β-lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β-lactámico						
	Penicilina G	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Nafcilina
Delvotest P (2½ h)	3	5 – 6	5	10 – 15	25	20	10
Delvotest SP (2¾ h)	2.5	3 – 4	3 – 4	10	15 – 25	10 – 15	5 – 8
Delvotest MCS	2.4	-	-	-	-	-	-
Charm AIM - 96	4	4	6	30	50	30	-
Charm Farm V/MV	3 – 4	4	4	-	-	-	-
BsDA	4	-	5	-	35	-	-
Valio T101	2 – 4	30 – 50	10 – 30	150 – 200	100 – 150	-	-
CMT	1 – 2	2 – 4	< 2	5 – 10	10 – 15	10 – 15	5 – 10
BR-test	1	-	1	-	40	-	-

La posibilidad de desarrollar sistemas automáticos basados en ensayos de inhibición microbiana es muy limitada y, actualmente, es difícil encontrar un dispositivo de estas características [147].

b) Ensayos de receptores

En los últimos quince años y paralelamente a los ensayos tradicionales de inhibición microbiana, se ha producido un incremento notable en el desarrollo de métodos basados en la utilización de receptores proteicos para la determinación de antibióticos.

Estos ensayos se basan en la unión del antibiótico a una proteína específica alojada en la matriz de una membrana o situada en células microbianas. Se trata de métodos más versátiles que los ensayos de inhibición microbiana y, en principio, se pueden aplicar a la determinación de diferentes residuos de antibióticos en una gran variedad de matrices.

Al igual que en el caso anterior, también existe una gran diversidad de dispositivos comerciales basados en este tipo de reconocimiento: **Charm I test** (Charm Sciences Inc.) permite la detección exclusiva de antibióticos β -lactámicos, fue el primer test de ensayo rápido reconocido por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (**AOAC**, del inglés "*The Association of Official Analytical Chemists*"), con un tiempo de ejecución de quince minutos. Con el tiempo, Charm I se ha ido mejorando con nuevas versiones como son **Charm II test**, que permite la detección de tetraciclinas, sulfonamidas, amfenicoles además de los β -lactámicos y, la última versión, **Charm SL β -lactam test** [148], que se caracteriza por ser un dispositivo robusto, estable, selectivo y, prácticamente, sin problemas de interferencias.

En una encuesta realizada en cuatro países europeos: España, Suecia, Suiza y Francia, en el marco del proyecto CREAM (Ref. QLK-1999-00902), se ha encontrado que los ensayos más utilizados en granjas de producción láctea son el **Delvotest-SP[®]** y el **Charm AIM-96**.

Otro ensayo disponible hoy en día para la detección de antibióticos es el **Betastar[®] test** (UCB Bioproducts) que emplea un receptor específico para β -lactamas que se encuentra unido a partículas de oro. El análisis se realiza mediante tiras reactivas detectando penicilinas y cefalosporinas con alta sensibilidad tras ocho minutos de incubación.

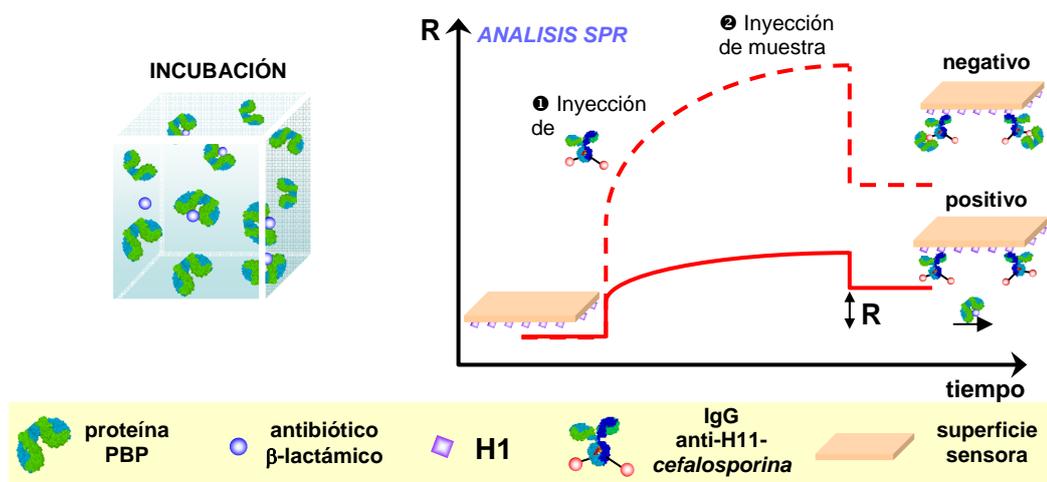
El **Delvo-X-Press** y **SNAP β -lactam** (IDEXX Laboratories) son ensayos de receptores en donde la detección se realiza gracias a una reacción enzimática. El método está basado en un ensayo heterogéneo con formato competitivo indirecto (“*enzyme-linked receptor-binding assay*”) en el que los residuos β -lactámicos compiten con penicilina G, ligada a un soporte, por una proteína fijadora de penicilina (PBP) marcada con la enzima peroxidasa de rábano (**HRP**, del inglés “*horse radish peroxidase*”).

Paralelamente al desarrollo de estos dispositivos comerciales, se han descrito numerosos sensores que utilizan el mismo sistema de reconocimiento debido al gran interés que suscita la aplicación analítica de métodos automáticos de análisis. Los avances en estas líneas de investigación han sido posibles debido a la rapidez con la que se realiza la unión del inhibidor a la proteína específica (< 20 min), que contrasta con los tiempos necesarios para la obtención de resultados en los ensayos de inhibición microbiana (> 120 min).

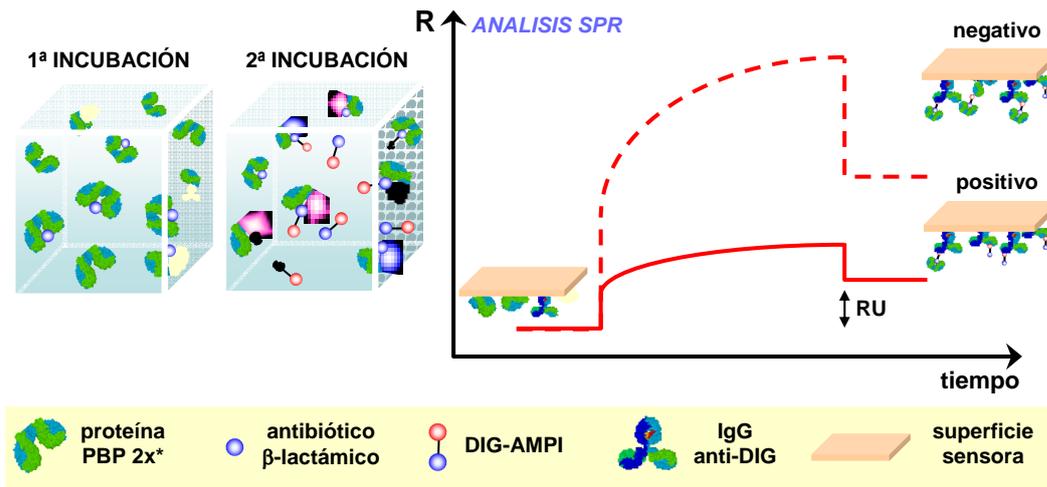
Varios autores han descrito en los últimos años biosensores basados en los ensayos de receptores. En este sentido, Gustavsson y col. han desarrollado un biosensor para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche usando como proteína fijadora de β -lactámicos la enzima *DD*-carboxipeptidasa (R39) [149] (ver figura 13a). El ensayo consiste en la unión de la proteína a un conjugado de cefalosporina ligada a un anticuerpo monoclonal (anti-H11). La detección se realiza mediante resonancia de plasmón superficial (**SPR**, del inglés “*superficial plasmon resonante*”) que es sensible a los cambios de densidad másica en la superficie del sensor evaluados mediante la monitorización de las condiciones de excitación de los plasmones superficiales. La cantidad de R39 unida a la interfase es inversamente proporcional a la concentración de antibióticos β -lactámicos en la muestra. Los límites de detección que se obtienen para varias penicilinas y cefalosporinas, se encuentran por debajo o próximos a los

LMRs permitidos, con reproducibilidades óptimas (6 – 12% para penicilina G) y un intervalo dinámico de 2.0 – 12.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Desafortunadamente, la aplicación del ensayo al análisis de muestras reales conlleva la aparición de un alto porcentaje de unión no específica en la superficie del sensor, lo que hace necesario una mejora del sistema desarrollado.

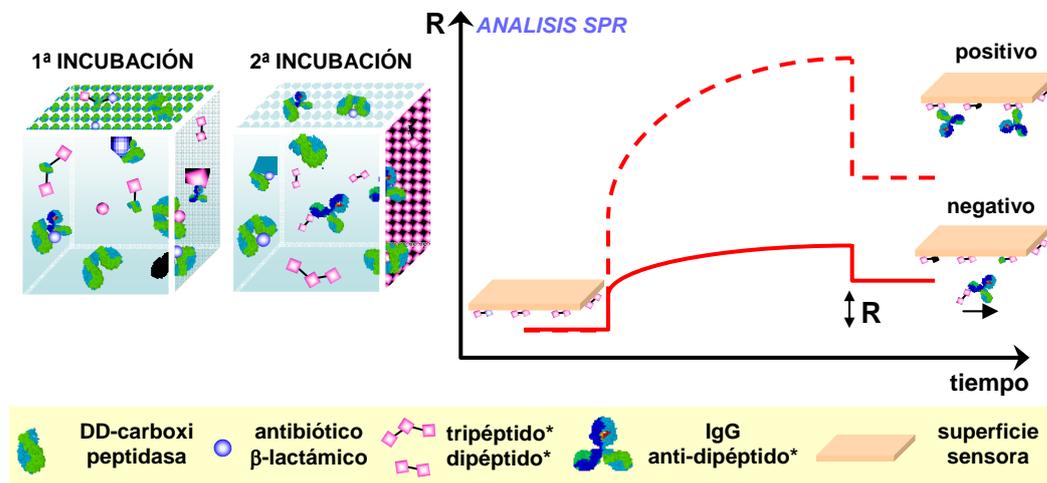
Recientemente Cacciatore y col. [150] (ver figura 13b) han desarrollado otro biosensor para la determinación de β -lactámicos en leche utilizando también SPR como sistema de detección. El ensayo está basado en la inhibición de la unión del conjugado digoxigenina-ampicilina (DIG-AMPI) a una proteína fijadora de penicilinas derivada de la cepa *Streptococcus pneumoniae* (PBP 2x*). En una primera etapa, las muestras se incuban con PBP 2x*, de forma que los antibióticos se unen a la proteína. En una segunda etapa, la fracción de PBP 2x* libre se une a la molécula DIG-AMPI formando el complejo DIG-AMPI/PBP 2x* que se detectará mediante la unión de la digoxigenina a un anticuerpo monoclonal anti-DIG inmovilizado en la superficie del sensor. Empleando este sensor, es posible medir penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefalexina y cefoperazona en leche desnatada a niveles de concentración por debajo de los LMRs. Sin embargo, el sistema también se encuentra sometido a interferencias debidas a la matriz de la muestra ensayada.



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Esquema detallado de tres tipos de biosensores basados en espectrometría SPR para la determinación de antibióticos β-lactámicos en muestras de leche. Ver texto para descripción detallada [149,150,151]. (*dipéptido: *Ac-L-Lys-D-Ala*, *tripéptido: *Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala*).

c) Ensayos enzimáticos

Aunque también están basados en la unión del antibiótico a un receptor proteico, se denominan ensayos enzimáticos a aquellos basados en la medida de la inhibición, por parte de los antibióticos, de la enzima *DD*-carboxipeptidasa, involucrada en la síntesis de la pared bacteriana.

Entre los dispositivos comerciales basados en este tipo de ensayos, el más utilizado es el **Penzym**[®] (SmithKline Beecham). Actualmente, se encuentran en el mercado los dispositivos **Penzym**[®]100 y **Penzym**[®] S 100 que permite alcanzar menores límites de detección y tiempos de análisis inferiores a 20 minutos.

En la tabla 11 se recogen los límites de detección de algunos receptoensayos y ensayos enzimáticos para antibióticos β -lactámicos.

Tabla 11. Límites de detección ($\mu\text{g kg}^{-1}$), declarados por los fabricantes de algunos receptoensayos y ensayos enzimáticos para antibióticos β -lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β -lactámico						
	Penicilina G	Amoxicilina	Ampicilina	Oxacilina	Cloxacilina	Dicloxacilina	Nafcilina
Betastar [®]	2 – 4	2 – 4	2 – 5	5 – 10	5 – 10	5 – 10	8 – 20
Charm SL β -L	2	5	4	30	30	20	30
Delvo-X-Press	2 – 4	4 – 8	4 – 8	-	30 – 40	-	-
SNAP β -lactam	≤ 4	-	-	-	-	-	-
Penzym 100	4 – 6	4 – 6	4 – 7	30 – 50	60 – 100	-	-
Penzym S 100	2 – 4	3 – 4	3 – 4	20 – 30	30 – 70	-	-

Hasta el momento no se han publicado muchos trabajos sobre el desarrollo de sensores basados en este mismo principio de medida. No obstante, Gustavsson y col. [151] han descrito un biosensor basado en medidas SPR para la determinación de β -lactámicos en leche basado en la medida del grado de inhibición producido en la reacción de hidrólisis del tripéptido (Ac-L-Lys-D-Ala-D-Ala) en el dipéptido (Ac-L-Lys-D-Ala) por parte de la enzima *DD*-carboxipeptidasa en presencia del antibiótico (ver figura 13c). Este biosensor presenta un límite de detección de $2.6 \mu\text{g kg}^{-1}$, con una incertidumbre entre $7.3 - 16\%$ ($n = 3$).

Alternativamente a los ensayos enzimáticos basados en la inhibición de la *DD*-carboxipeptidasa, se han descrito otros métodos enzimáticos utilizando como elemento de reconocimiento biológico β -lactamasa (penicilinas) o penicilina G-amidasa. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces amida del antibiótico

generando los ácidos penicilínico y 6-aminopenicilánico (6-APA), respectivamente. El principio de medida de este tipo de dispositivos está basado en cuantificar el cambio de pH producido por los ácidos formados mediante los transductores de pH adecuados: sensores electroquímicos [152], sensores ópticos [153-155], capacitivos [156], etc..

5.2.2.2. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Engloban todas aquellas herramientas analíticas que utilizan como principio básico de medida la interacción anticuerpo-antígeno (Ab-Ag).

Los **inmunoensayos** o **técnicas inmunoanalíticas** tienen su origen en química clínica. El primer método inmunoanalítico cuantitativo, un radioinmunoensayo (**RIA**) para el análisis de insulina humana a niveles de picogramos, fue descrito por Yalow y col. en 1959 [157].

Los métodos inmunoquímicos son muy selectivos, gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo y, además, presentan otras ventajas como son la rapidez de análisis, su facilidad de ejecución, sensibilidad así como el bajo coste necesario para su aplicación. El principal inconveniente de este tipo de ensayos es la baja estabilidad de los reactivos biológicos empleados y la disponibilidad limitada de algunos de ellos.

Entre los dispositivos comerciales basados en este tipo de ensayos podemos destacar: **CITEProbe** (IDEXX), **Fluorophos™ Beta-Screen®** (Advance Instruments) [158] y **LacTek** (Idetek) [159]. En los dos últimos se lleva a cabo un inmunoensayo enzimático en fase heterogénea (**ELISA**, del inglés “*enzyme-linked immunosorbent assay*”) siendo el LacTek el que proporciona con menor frecuencia falsos positivos [160,161].

Recientemente, se ha incorporado un nuevo dispositivo comercial basado en un inmunoensayo fluorescente con formato competitivo denominado **Parallux™ Beta Lactam Assay System** (IDEXX) [162]. El sistema ha sido aplicado satisfactoriamente a la determinación de penicilina G, ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cepapirina y

ceftiofur en muestras de leche caracterizándose por su alta sensibilidad (límites de detección para los seis β -lactámicos comprendidos entre 2.9 – 33.8 $\mu\text{g L}^{-1}$), y ausencia de interferencias derivadas de la presencia de células somáticas ($1 \cdot 10^{-6}$ cell mL^{-1}).

En la tabla 12 se recogen los límites de detección que se obtienen con algunos dispositivos inmunoquímicos que actualmente se pueden encontrar en el mercado.

Tabla 12. Límites de detección ($\mu\text{g kg}^{-1}$) declarados por los fabricantes de algunos inmunoensayos comerciales para el análisis de antibióticos β -lactámicos en leche.

Ensayo	Antibiótico β -lactámico						
	<i>Penicilina G</i>	<i>Amoxicilina</i>	<i>Ampicilina</i>	<i>Oxacilina</i>	<i>Cloxacilina</i>	<i>Cefapirina</i>	<i>Ceftiofur</i>
Beta-sreen[®]	2	12	4	25	25	-	-
CiteProbe	5	10	10	-	100	5	10
CTII test	2.5	5	5	-	20	5	5
LacTek	5	4	5	4	10	10	100
EZ-Screen	-	-	-	-	-	-	-
Spot test	3.7	-	-	-	62.5	15	-

Finalmente cabe destacar que, aunque la mayoría de los ensayos de barrido desarrollados están orientados a la determinación de residuos de antibióticos en muestras de leche, algunos de ellos se han adaptado al análisis de otras matrices (miel, carne, aguas, etc.) [144]. En la tabla 13 se recogen algunas de estas aplicaciones descritas en la bibliografía.

Tabla 13. Determinación de antibióticos mediante ensayos de barrido en diversas muestras biológicas y medioambientales.

Analito	Muestra	Método de barrido	Tratamiento de muestra	Características	Ref.
CEFX	Tejidos pollo	Microbiológico organismo: <i>B. ste rothermophilus</i> C953NIZO	desproteínizar: TCA SPE: DiaionHP-20	cualitativo	[163]
OXY	Miel	Microbiológico organismo: <i>B. cereus</i> ATCC 11778	diluir con t.fosfato pH 7	cualitativo	[164]
ETPR	Huevos	Microbiológico organismo: <i>B. subtilis</i> BGA	mezclar con surfactante /t. fosfato pH 8 + centrifugar	cualitativo	[165]
penicilinas tetraciclinas	Suero orina tejidos	Microbiológico (ensayo de receptores) Charm II	-	concentración evaluada: Suero: 200 µg L ⁻¹ Orina: 1000 µg L ⁻¹ Tejidos: 50 µg Kg ⁻¹	[166]
TCY, OXY, CTC, DOXY, CEFTF, CEFQ, PENG, AMPI, AMOX, CEFAP, CEFX	Riñón porcino y vacuno	Inmunoquímico Parallux™	mezclar 5g con 10 mL t. fosfato pH 7.6 + centrifugar	LD: TCY/OXY/CTC/DOXY: 300 µg Kg ⁻¹ CEFTF/CEFQ: 200 µg Kg ⁻¹ PENG/AMPI/AMOX: 50 µg Kg ⁻¹ CEFAP: 100 µg Kg ⁻¹ CEFX: no detectada	[167]
5 tetraciclinas 6 sulfonamidas	Agua y aguas residuales	Microbiológico (ensayo de receptores) Charm II- SPE	filtrar (0.2 µm) + centrifugar (agua residual) + 0.5 mL AEDT 5%	LD: 0.05 µg L ⁻¹ SPE: Oasis HLB (60 mg/3 mL)	[168]
TYL, TCY, CTC	Muestras acuosas	Inmunoquímico ELISA commercial: ¹ Int. Diagnosis System Corp. ² R-Biopharm AG	filtrar (0.45 µm) + diluir (1:1) t.fosfato	LD: 10.1 µg L ⁻¹ , 20.05 µg L ⁻¹ Observaciones: Recuperación ca. 100%	[169]
CEFZ	Aire	Inmunoquímico ELISA (competitivo indirecto) Ab: anti-CEFZ Ag conjugado: CEFZ-BSA Ag: CEFZ	análisis sobre el filtro (nitrate de celulosa, Ø 25 mm/0.1 µm)	LD: 1.9 ng/filtro Observaciones: RC: 19 – 56% para CEFX, CEPH, PENG, AMPI	[170]

Abreviaturas: PENG: *penicilina G*; AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, CEFAP: *cefapirina*, CEFTF: *ceftiofur*, ETPR: *estreptomina*, TCY: *tetraciclina*, CTC: *clorotetraciclina*, DOXY: *doxiciclina*, CEFQ: *cefquinona*, TYL: *tilosina*, CEFZ: *ceftazidina*, CEFX: *cefalexina*, SPE: *extracción en fase sólida*, RC%: *reactividad cruzada*, ELISA: *inmunoensayo enzimático en fase heterogénea “enzyme-linked immunosorbent assay”*.

5.3. OTROS MÉTODOS

Algunos de los primeros métodos analíticos que se desarrollaron para la determinación de antibióticos β -lactámicos estaban basados en **métodos volumétricos** [171]. Entre ellos, los más utilizados empleaban valoraciones redox, en las que se valoraban los productos de degradación obtenidos tras la hidrólisis de los antibióticos empleando especies oxidantes como el yodato (IO_4^-) [172] o el mercuríco (Hg^{2+}) [173]. El punto final de las valoraciones se detectaba espectrofotométricamente o potenciométricamente, obteniéndose LD superiores a 0.095 mg mL^{-1} . Se ha descrito también el empleo de estos métodos para la determinación de penicilinas mediante análisis por inyección en flujo (FIA) [174]. Hoy en día, se sigue trabajando en la mejora de este tipo de análisis debido a su simplicidad y posibilidad de aplicación en los países del Tercer Mundo [175].

5.3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

La **electroforesis capilar (CE)**, del inglés “*capillary electrophoresis*”) es un proceso en el cual las especies cargadas (iones o partículas coloidales) se separan en función de su distinta velocidad de migración en un campo eléctrico en el interior de una columna capilar. La versatilidad de la CE para el análisis de distintas sustancias deriva en parte de los diferentes métodos electroforéticos desarrollados hasta el momento, entre los que destacamos: la electroforesis capilar de zona (**CZE**, del inglés “*capillary zone electrophoresis*”), la cromatografía electrocinética capilar micelar (**MEKC**, del inglés “*micellar electrokinetic chromatography*”) y la isotacoforesis capilar (**CITP**, del inglés “*capillary isotachophoresis*”).

En la actualidad, el uso de la electroforesis capilar para la determinación de productos farmacéuticos y drogas ha alcanzado un puesto de considerable relevancia dentro de las técnicas utilizadas habitualmente para el análisis de estos analitos [176]. Se han publicado varias revisiones sobre la aplicación de esta técnica en el análisis de antibióticos [177,178,179].

Las principales ventajas de la electroforesis capilar son, entre otras, la eficacia del proceso de separación, la posibilidad de utilizar pequeños volúmenes de muestra y el abaratamiento asociado al menor consumo de disolventes orgánicos. Además, se puede automatizar fácilmente y es posible acoplarla a una gran variedad de sistemas de detección. Sin embargo, cuando se desean alcanzar bajos límites de detección es necesario aumentar el volumen de muestra inyectada y/o el uso de otras técnicas de detección más sensibles, como detectores electroquímicos [180] o la fluorescencia inducida por láser (**LIF**, del inglés “*Laser-Induced Fluorescent*”) [181].

Entre las aplicaciones de esta técnica para la determinación de antibióticos β -lactámicos, podemos destacar el trabajo de Wan y col. [182] que analizaron penicilina G y compuestos relacionados en productos intermedios de la fabricación de penicilina sintéticas. Por otro lado, Ahrrer y col. [105] han realizado un estudio comparativo entre CE-MS y HPLC-MS concluyendo que la CE es una alternativa útil a la técnica de HPLC para esta aplicación a pesar de que requiere un mayor pretratamiento de muestra y que, en general, proporciona mayores límites de detección para los antibióticos analizados (para penicilina V, LD (CE-MS) = 134 $\mu\text{g L}^{-1}$ y LD (HPLC-MS) = 0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$).

En la tabla 14 se recogen las características principales de los métodos basados de electroforesis capilar (CE) aplicados a la determinación de antibióticos β -lactámicos.

Tabla 14. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante CE.

Analito	Muestra	Modo CE	Pretratamiento /Recuperación	Detección	LD	Ref.
PENG-Procaína PENG-Benzatina	Preparado farmacéutico	MECK	- PENG-Procaína 98% PENG-Benzatina > 97%	UV 214 nm	LD: 0.001 mg mL ⁻¹ Observaciones: -	[183]
AMOX	Plasma	CZE	SPE (cartuchos C ₁₈) 90%	UV	LD: 0.28 mg L ⁻¹ Observaciones: -	[184]
PENG, AMPI, AMOX, OXA, PENV, CLOX	Agua residual de granja de ganado porcino	MECK	filtrar 96 – 112%	UV 214 nm	LD: 0.2 μ g L ⁻¹ Observaciones: posible uso SPE	[176]
AMOX, CEFAP, PENG, AMPI, CLOX, OXA, PENV, PIPER, DICLOX	Agua bidestilada	MECK	-	UV 210 nm	LD: - Observaciones: optimización de la separación	[185]
CLOX, OXA, DICLOX	Leche bovina	CE	-	UV	LD: 2 μ g L ⁻¹ Observaciones: 0.1 mL leche	[186]
PENV, (otros: CLOF, NAPX, IBUP)	Agua superficial	MECK	1) extracción LLE 2) SPE ODS Bondesil -	ESI-MS	LD: 4.8 – 18.8 ng L ⁻¹ Observaciones: 0.1 mL leche	[187]

Abreviaturas: CLOF: *ác. clofibrico*, PENV: *penicilina V*, NAPX: *naproxen*, IBUP: *ibuprofeno*, PENG: *penicilina G*; OXA: *oxacilina*, CLOX: *cloxacilina*, DICLOX: *dicloxacilina*, AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, CEFAP: *cefapirina*, PIPER: *piperacilina*, ESI: *interfase de electronebulización*, UV: *detector de ultravioleta*, MS: *espectroscopia de masas*, SPE: *extracción en fase sólida*, LLE: *extracción líquido-líquido*, MECK: *cromatografía electrocinética capilar micelar*, CE: *electroforesis capilar*, CZE: *electroforesis capilar de zona*.

- [1] A. Goodman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Editorial Médica Panamericana, México D.F. (México), **1993**.
- [2] N.H. Booth, L.E. McDonald, *Farmacología y terapéutica veterinaria*, Acribia, Zaragoza (España), **1987**.
- [3] S.B. Calderwood, R.C. Moellering. *Principles of anti-infective therapy*, en J.H. Stein (eds.) *Internal Medicine*, Boston: Little Brown and Co, Boston (EE.UU.), **1990**.
- [4] M.C. Brugueras, M.M. García, *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* **1998**, *14*, 347.
- [5] M. Flórez, J.A. Armijo, A. Mediavilla, *Farmacología humana*, Eunsa. Barcelona (España), **1989**.
- [6] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principios de Bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona (España), **1995**.
- [7] A. Velasco, P. Lorenzo, J.S. Serrano, F. Andrés-Trellos, *Velázquez farmacología*, Interamericana McGraw-Hill, Madrid (España), **1993**.
- [8] C.P. Page, M.J. Curtis, M.C. Sutter, M.J.A. Walker, B.B Hoffman, *Farmacología integrada*, Harcourt Brace de España, Madrid (España), **1998**.
- [9] J.L. Robinson, T. Hameed, S. Carr, *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *35*, 26.
- [10] I. Levitron, *Curr. Pharm. Design* **2003**, *9*, 983.
- [11] M.J. Torres, M. Blanca, J. Fernandez, *Allergy* **2003**, *58*, 961.
- [12] K. Poole, *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4*, 500.
- [13] A.M. Smith, K.P. Klugman, T.J. Coffey, B.G. Spratt, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1938.

- [14] H. De Lencastre, A.M. Sa Figueiredo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35, 632.
- [15] A. Windholz, *The Merck Index*, 10ª edición, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, New Jersey (EE.UU.), **1990**.
- [16] H. Trolldeiner, *Antibióticos en medicina veterinaria*, Acribia, Zaragoza (España), **1980**.
- [17] B. Pérez Gorricho, F. Baquero, *Rev. Esp. Quimioterap.* **1988**, 1, 98.
- [18] P. Díez, V. Calderón, *Rev. Esp. Quimioterap.* **1997**, 10, 275.
- [19] A. Anadón, “Residuos de medicamentos y aditivos en los alimentos de origen animal”, en Consejo de Colegios Veterinarios de Cataluña (eds.), *Guía Veterinaria de Cataluña*, Barcelona (España), **1995**.
- [20] E.L.R. Stokstad, T.H. Jukes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1950**, 73, 523.
- [21] E. Ortega, G. Arellano, M. Morales, *Revista de Investigación Clínica* **1988**, 40, 423.
- [22] J.F. Prescott, J.D. Baggot, “Incorporación de antibióticos a los piensos como estimulantes del crecimiento”, en *Terapéutica antimicrobiana veterinaria*, Acribia, Zaragoza (España), **1991**.
- [23] N.T. Crosby, “Current trends in agricultural practice”, en Ellis Horwood (ed.) *Determination of Veterinary Residues in Food*, Ellis Horwood Limited, London (Inglaterra), **1991**.
- [24] J. Turnidge, Joint Expert Advisory Committee On Antibiotic Resistance, *The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans*, Commonwealth of Australia, Canberra (Australia), **1999**.
- [25] C. Torres, M. Zaragaza, “Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino?”, en *Gaceta Sanitaria*, Ediciones Doyma S.L., Barcelona (España), **2002**.
- [26] B.O.E., *Real Decreto 109 sobre medicamentos veterinarios*, Boletín Oficial del Estado, 53, 27 de enero de **1995**.
- [27] B.O.E., *Real Decreto 157 por el que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos*, Boletín Oficial del Estado, 64, 3 de febrero de **1995**.
- [28] S.E. Aiello, *El manual Merck de Veterinaria*, 5ª edición, Océano Grupo Editorial S.A., Barcelona (España), **2000**.
- [29] A. Anadón, “Normas legales sobre el uso de medicamentos en ponedoras”, en Jornada Técnica de Avicultura de Puesta (eds.) *TROUW Nutrition*, Madrid (España), **1998**, 1.
- [30] R. Hummel, H. Tschape, W. Witte, *J. Basic. Microbiol.* **1986**, 26, 461.
- [31] R. Rolland, G. Hausfater, B. Marshall, S.B. Levy, *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, 49, 791.
- [32] S.B. Levy, *J. Food Prot.* **1987**, 50, 616.

- [33] G.M. Nickas, *Acad. Med.* **1975**, *51*, 1039.
- [34] M.I. Okolo, *Int. J. Zoonoses.* **1986**, *13*, 143.
- [35] M.C. Zimmerman, *Am. Med. Assoc. Arch. Dermatol.* **1959**, *79*, 1.
- [36] W.R. van Dresser, J.R. Wilcke, *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **1989**, *194*, 1700.
- [37] L.D. Petz, *J. Infect. Dis.* **1978**, *137*, S74.
- [38] L.J.V. Piddock, *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *38*, 1.
- [39] C. Torres, M. Zarazaga, *Rev. Esp. Quimioterap.* **1998**, *11*, 29.
- [40] W. Witte, *Science* **1998**, *279*, 996.
- [41] F.M. Aarestrup, *Microbial Drug Resistance* **1995**, *1*, 255.
- [42] M Marín, F. Gudiol, *Enferm. Infecc. Microbio. Clin.* **2003**, *21*, 42.
- [43] K.M. Shahani, W.J. Harper, *Milk Prods. J.* **1958**, *45*, 827.
- [44] H.R. Whitehead, D.J. Lane, *J. Dairy Res.* **1956**, *23*, 355.
- [45] B.A. Friend, K.M. Shahani, "Antibiotics", en J.C. Ayres and J.C. Kirschman (eds.) *Impact of Toxicology on Food Processing*, Wesport CT (EE.UU), **1981**.
- [46] E.M. Golet, A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes, W. Giger, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3632.
- [47] M.E. Lindsey, M. Meyer, E.M. Thurman, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4640.
- [48] http://europa.eu.int/comm/research/rtdinfo/40/article_481_es.html (Marzo 2006).
- [49] www.el-mundo.es/papel/2003/06/30/ciencia/1427896.html (Marzo 2006).
- [50] http://www.poseidon.geo.uni-mainz.de/the_objectives.htm (Marzo 2006).
- [51] I.A. Alaton, S. Dogruel, E. Baykal, G. Gerone, *J. Environ. Management* **2004**, *73*, 155.
- [52] B.O.E., *Orden APA/273/2002, de 31 de enero, por la que se sustituye el anexo del Real Decreto 1329/1995, de 28 de julio, por lo que se fijan líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal*, Boletín Oficial del Estado, 15 de febrero de **2002**.
- [53] C. Bergström, *Tesis Doctoral*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala (Suecia), **1998**.
- [54] Directiva del Consejo 96/23/CEE, de 29 de abril de **1996**, *relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y sus productos y por las que derogan las directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE (DOCE L 125/1996)*.

- [55] B.O.E., *Real Decreto 188 por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos*, Boletín Oficial del Estado, 31 de julio de **1998**.
- [56] G.M. Lalumera, D. Calamari, P. Galli, S. Castiglioni, G. Crosa, R. Fanelli, *Chemosphere* **2004**, *54*, 661.
- [57] Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de **1990** *por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, (DOCE L 224/1990).
- [58] Rectificación (CE) n° 1181/2002 (DOCE L 251/2002), de 19 de septiembre de **2002**.
- [59] Reglamento del Consejo (CE) n° 806/2003 (DOCE L 122/2003), de 14 de abril de **2003**.
- [60] *Joint FAO/WHO Food Standars Programme Codex Alimentarius Commission*, 2ª edición, Codex Alimentarius, **1993**.
- [61] S.S. Deshpande , “*Drug Residues*”, en S.S. Deshpande (ed.) *Handbook of Food Toxicology*, Marcel Dekker Incorporated, Nueva York (EE.UU), **2002**.
- [62] Directiva del Consejo 86/469/CEE, *relativa a la investigación de residuos en los animales y en las carnes frescas*.
- [63] Décision du Conseil 91/664/CEE, *designant les quatre laboratoires communautaires de référence pour le contrôle de résidues dans les aliments*.
- [64] V. Calderón, J. A. Berenguer, J. González, P. Díez, “*Post-screening of antibiotic residues in meat and kidney samples*”, en N. Haagsma (ed.) *EuroResidue III*, Veldhoven (Holanda), **1996**.
- [65] Directiva del Consejo 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de **2000**, *por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas*, (DOCE L 327/2000).
- [66] <http://europa.eu.int/comm/environment/water> (Marzo 2006).
- [67] H. Oka, H.I. Nakazawa, K.I. Harada, J.D. MacNeil, *Chemical Analyses for Antibiotics Used in Agriculture*, *AOAC. Int, Washington (USA)*, **1995**.
- [68] U. Meetschen, M. Petz, *J. AOAC Int.* **1990**, *73*, 373.
- [69] H. Mineo, *Vet. Hum. Toxicol.* **1992**, *34*, 393.
- [70] D.J. Fletouris, J.E. Psomas, A.J. Mantis, *Chromatographia* **1991**, *32*, 436.
- [71] J.O. Miners, *J. Liq. Chromatogr.* **1985**, *8*, 2827.
- [72] W.A. Moats, *J. Chromatogr.* **1986**, *366*, 69.
- [73] W.A. Moats, L. Leskinen, *J. Chromatogr.* **1987**, *386*, 79.

- [74] A.M. Lipezynski, *Analyst* **1987**, *112*, 411.
- [75] J. Martin, R. Mendez, A. Negro, *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11*, 1707.
- [76] M.J. Nunes, M.F. Camoes, J. Fournier, *Chromatographia* **1997**, *44*, 505.
- [77] N. Masqué, M. Galiá, R.M. Marcé, F. Borrull, *Analyst* **1997**, *122*, 425.
- [78] N. De Bertrand, G. Durand, D. Barceló, *J. Environ. Sci. Health* **1991**, *A 26*, 575.
- [79] S. Guenu, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* **1996**, *725*, 57.
- [80] A. Di Corcia, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* **2002**, *974*, 53.
- [81] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid (España), **1994**.
- [82] J.O. Boison, L.J.Y. Keng, *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 1267.
- [83] M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 25.
- [84] E. Turiel, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1008*, 145.
- [85] C.Y.W. Ang, W. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 389.
- [86] C.Y.W. Ang, W. Luo, *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 25.
- [87] W. Luo, C.Y.W. Ang, H.C. Thompson, *J. Chromatogr.* **1997**, *694*, 401.
- [88] W. Luo, E.B. Hansen, C.Y.W. Ang, J. Deck, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1264.
- [89] K. Berger, M. Petz, "Sensitive confirmatory method for determination of seven penicillins in bovine tissues and milk", en N. Haagsma, A. Ruiter (eds.) *EuroResidue Conf.*, Utrecht (Holanda), **1990**.
- [90] R.K. Munns, W. Shimoda, J.E. Roybal, C. Vieira, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, *68*, 968.
- [91] W. Luo, C.Y.W. Ang, *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 20.
- [92] V. Gamba, G. Dusi, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 69.
- [93] E. Kirchmann, R.L. Earley, L.E. Welch, *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*, 1755.
- [94] C.O. Dasenbrock, W.R. LaCourse, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2415.
- [95] M.C. Carson, R.F. Righter, D.D. Wagner, *Wageningen Press* **1994**, *76*, 80.
- [96] Commission Decision 93/256/ EEC of 14th April **1993**, *Off. J. Eur. Comm.* No L. 118/ 64.

- [97] Commission Decision 657/2002 of 12th August **2002**, *Off. J. Eur. Comm.* No L. 221/8.
- [98] A.A.M. Stolker, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 15.
- [99] K. Tyczkowska, R.D. Voyskner, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* **1989**, 490, 102.
- [100] W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt, D.G. Kennedy, *Analyst* **1994**, 119, 2595.
- [101] F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A* **2001**, 938, 199.
- [102] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 406.
- [103] Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, K. Takeba, H. Nagase, *J. Chromatogr. A* **2000**, 880, 85.
- [104] S. Ghidini, E. Zanardi, G. Varisco, R. Chizzolini, *Food Addit. Contam.* **2003**, 20, 528.
- [105] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* **2001**, 910, 69.
- [106] L.K. Sørensen, K. Snor, T. Elkaer, H. Hansen, *J. Chromatogr. B* **1999**, 734, 307.
- [107] L. Grunwald, M. Petz, *Anal. Chim. Acta.* **2003**, 483, 73.
- [108] L.K. Sørensen, H. Hansen, K. Snor, *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 1345.
- [109] S. Riediker, R.H. Stadler, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1614.
- [110] M. Marchetti, I. Schwaiger, E.R. Schmid, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 371, 64.
- [111] Q.B. Cass, R.F. Gomes, S.A. Calafatti, J. Pedrazolli Jr., *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 235.
- [112] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K.L. Kratz, *J. Chromatogr. A* **1998**, 815, 213.
- [113] M. McGrane, M. O'Keefe, M. R. Smyth, *Analyst* **1998**, 123, 2779.
- [114] M.V. Dabrio, G.P. Blanch, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, M. de Frutos, M. Herraiz, I. Martínez Castro, J. Sanz Perucha, *Cromatografía y electroforesis en columna*, Springer, Barcelona (España), **2000**.
- [115] E. Verdon, P. Coëudor, *J. Chromatogr. B* **1998**, 705, 71.
- [116] K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* **1998**, 812, 205.
- [117] L.K. Sørensen, B.M. Rasmussen, J.O. Boison, L. Keng, *J. Chromatogr. B* **1997**, 694, 383.
- [118] H.E. Gee, K. B. Ho, J. Toothill, *J. AOAC Int.* **1996**, 79, 640.
- [119] J.O.K. Boison, L.J. Keng, J.D. MacNeil, *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 565.
- [120] W.A. Moats, R.D. Romanowski, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1410.

- [121] J.O. Boison, G.O. Korsrud, J.D. MacNeil, L. Keng, M. Papich, *J. Chromatogr.* **1992**, 576, 315.
- [122] G. Lunn, N.R. Schmuff, *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*, John Wiley & Sons, Nueva York (EE.UU), **1999**.
- [123] N.A. Botsoglou, D.J. Fletouris, *Drug residues in foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis*, Marcel Dekker Inc., Nueva York (EE.UU), **2000**.
- [124] P. Kubalee, E. Brandsteterova, A. Bednarikova, *Z. Lebensm. Unters Forsch.* **1997**, 205, 85.
- [125] R. Lindberg, P. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind, *Chemosphere* **2004**, 57, 1479.
- [126] M. Becker, E. Zittlau, M. Petz, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 520, 19.
- [127] G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 30, 661.
- [128] K. Schügerl, G. Seidel, *J. Chromatogr. A* **1998**, 812, 179.
- [129] D. Hurtaud, B. Delepine, P. Sanders, *Analyst* **1994**, 119, 2731.
- [130] E. Verdon, "Determination of ampicillin residues in milk by high performance liquid chromatography", Laboratoire des médicaments vétérinaires, Community Reference Laboratory, **1996**.
- [131] R.D. Voyksner, K.L. Tyczkowska, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* **1991**, 567, 404.
- [132] R. Harik-Khan, W.A. Moats, *J. AOAC Int.* **1995**, 78, 978.
- [133] J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer, *Anal. Chim. Acta* **1995**, 318, 95.
- [134] C.E. Parker, J.R. Perkins, K.B. Tomar, Y. Shide, K. O'Hara, *J. Chromatogr.* **1993**, 616, 45.
- [135] K.L. Tyczkowska, *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 1122.
- [136] R.F. Straub, M. Linder, R.D. Voyksner, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3651.
- [137] G.E. Morlock, *J. Chromagr. A* **1996**, 754, 423.
- [138] J.P. Abjean, V. Lahogue, *J. AOAC Int.* **1997**, 80, 1171.
- [139] A. Ramírez, R. Gutiérrez, G. Díaz, C. González, N. Pérez, S. Vega, M. Noa, *J. Chromatogr. B* **2003**, 784, 322.
- [140] L. Botz, S. Nagy, B. Kocsis, "Detection of microbiologically active compounds" en Sz Nyiredy (ed.), *Proc Int Symp Planar Chromatography, Planar Chromatography*, Lillafured (Hungría), **2001**.

- [141] W.A. Moats *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 1.
- [142] G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *520*, 13.
- [143] www.ucb-group.com (Abril 2006).
- [144] www.charm.com (Abril 2006).
- [145] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *TrAC* **1999**, *18*, 685.
- [146] C. Bergström, *Tesis Doctoral*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala (Suecia), **1998**.
- [147] S. Stead, M. Sharman, J.A. Tarbin, E. Gibson, S. Richmond, J. Stark, E. Geijp, *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 216.
- [148] R.S. Salter, D. Legg, N. Ossanna, C. Boyer, J. Scheemaker, R. Markovsky, S.J. Saul, *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 29.
- [149] E. Gustavsson, P. Bjurling, J. Degelaen, Å. Sternesjö, *Food Agric. Immunol.* **2002**, *14*, 121.
- [150] G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A.A. Bergwerff, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *520*, 105.
- [151] E. Gustavsson, P. Bjurling, Å. Sternesjö, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*, 153.
- [152] U. Brand, T. Scheper, K. Schügerl, *Anal. Chim. Acta* **1989**, *266*, 87.
- [153] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *320*, 199.
- [154] T. Scheper, W. Brandes, H. Maschke, F. Plötz, C. Müller, *J. Biotechnol.* **1993**, *233*, 65.
- [155] P.H. Chan, H.B. Liu, Y.W. Chen, K.C. Chan, C.W. Tsang, Y.C. Leung, K.Y. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4074.
- [156] A. Poghossian, M. Thust, M.J. Schöning, M. Müller-Veggian, P. Kordos, H. Lüth, *Sens. Actuators B* **2000**, *68*, 260.
- [157] R.S. Yalow, S.A. Berson, *Nature* **1959**, *184*, 1648.
- [158] Å. Sternesjö, G. Johnsson, *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 808.
- [159] J.M. Mitchell, A.J. Yee, W.B. McNab, M.W. Griffiths, S.A. McEwen, *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 79.
- [160] J. Cullor, *Vet. Med.* **1992**, *87*, 1235.
- [161] J. Cullor, A. Van Eenennaam, I. Gardner, L. Perani, J. Dellinger, W. Smith, T. Thompson, M. Payne, L. Jensen, W. Guterbock, *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 862.

- [162] S.P. Huth, P.S. Warholic, J.M. Devou, L.K. Chaney, G.H. Clark, *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 355.
- [163] J. Okada, I. Higuchi, S. Kondo, B.I. Saito, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1988**, *71*, 337.
- [164] L.A. Roth, S. Kwan, P. Sporns, *J. Food Prot.* **1986**, *49*, 436.
- [165] M. Zavanella, P. Aureli, A.M. Ferrini, *Arch. Lebensmittelhyg.* **1986**, *37*, 118.
- [166] Y. Oin, L.J. Bao, L.M. Zhu, *Fenxi-Ceshi-Xenebao* **2003**, *22*, 60.
- [167] L. Okerman, K. De Wasch, J. Van Hoof, W. Smedts, *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 236.
- [168] S. Yang, K. Carlson, *Water Res.* **2004**, *38*, 3155.
- [169] K. Kumar, A. Thompson, A.K. Singh, Y. Chander, S.C. Gupta, *J. Environ. Qual.* **2004**, *33*, 250.
- [170] F.J. Rowell, Z.F. Miao, R.N. Reeves, R.H. Cumming, *Analyst* **1997**, *122*, 1505.
- [171] E. Roets, P. Rappe, M. Heeren, J. Hoebus, A. Verbruggen, J. Hoogmartens, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1141.
- [172] J.K. Grime, B. Tan, *Anal. Chim. Acta* **1979**, *105*, 361.
- [173] B. Karlberg, U. Forsman, *Anal. Chim. Acta* **1976**, *83*, 309.
- [174] R. Wolters, M.A.J. Van-Opstal, G. Kateman, *Anal. Chim. Acta* **1990**, *233*, 65.
- [175] S.Z. Qureshi, T. Qayoom, M.I. Helalet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 473.
- [176] L. Nozal, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523*, 21.
- [177] K.D. Altria, *J. Chromatogr.* **1993**, *646*, 245.
- [178] C.A. Monning, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 280.
- [179] C.L. Flurer, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 4249.
- [180] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *TrAC* **2003**, *22*, 416.
- [181] X. Bossuyt, W.E. Peetermans, *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 204.
- [182] H.B. Wan, J. Lin, K.C. Ang, S.F.Y. Li, *Talanta* **1998**, *45*, 663.
- [183] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 265.
- [184] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. B* **1999**, *731*, 309.
- [185] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromatogr. A* **1997**, *768*, 97.
- [186] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* **2003**, *17*, 3089.

[187] W. Ahrer, W. Buchberger, *Am. Lab.* **2001**, *33*, 24.

II.

**OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS
GENERALES**

La búsqueda de productos de elevada calidad para la alimentación humana es un área de interés creciente, sobre todo a raíz de los últimos fraudes detectados en países de la UE y fuera de ésta. Desafortunadamente, en algunas ocasiones, los productos empleados para mejorar la calidad de los alimentos dan lugar a la aparición de **residuos** que pueden resultar altamente nocivos para la salud. Por todo ello, es necesario aprovechar adecuadamente los métodos analíticos existentes, así como la implantación de **nuevas tecnologías de análisis** para la detección de estos analitos.

La detección rápida (métodos de barrido) de los residuos de antibióticos, llamados también inhibidores, se ha basado, tradicionalmente, en la inhibición bacteriana de cepas sensibles a antibióticos e inmunoensayos. Debido a su falta de especificidad y la excesiva frecuencia de los llamados falsos positivos, se ha planteado la necesidad de desarrollar y establecer técnicas analíticas sensibles y específicas para la identificación y cuantificación de residuos de antibióticos, en el que se han centrado las investigaciones de esta Tesis Doctoral.

El presente trabajo se enmarca dentro de la labor interdisciplinar que el Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, perteneciente a los departamentos de Química Analítica y Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid, viene desarrollando en el campo de **nuevas tecnologías de análisis con detección luminiscente** para la determinación de **residuos químicos**, de particular relevancia tanto en el sector agroalimentario como en el medio ambiente, eg. micotoxinas, antibióticos, disruptores endocrinos, pesticidas, etc..

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de un Proyecto del **V Programa Marco**, subvencionado por la U.E., dentro del área de **Calidad de Vida y Gestión de Recursos Vivos**. El proyecto titulado, "*Cartridges with molecularly imprinted recognition elements for antibiotic residues monitoring in milk*": CREAM (Ref. QLK-1999-

00902) ha tenido como objetivo el desarrollo de cartuchos que utilizan un sistema de detección óptico para la **monitorización *in situ* de antibióticos β -lactámicos** en leche, basados en el empleo de **polímeros de impronta molecular (MIPs, del inglés “*molecularly imprinted polymers*”)**, como elementos de reconocimiento selectivo.

Con este fin, se plantearon las siguientes tareas:

1. **Diseño y síntesis de MIPs** para interactuar con los antibióticos seleccionados, trabajo realizado en la Universidad de Lund, dirigido por la Dra. M. Kempe.
2. **Diseño de un sistema de detección óptico integrado** en combinación con cartuchos desechables para la medida con MIPs o anticuerpos como elementos de reconocimiento molecular. Esta tarea se ejecutó en el Instituto de Microtecnología de la Universidad de Neuchâtel por el grupo del Dr. G.C. Fiaccabrino.
3. **Diseño y síntesis de sondas fluorescentes** para interrogar la interacción analito-MIP o analito-anticuerpo. Este trabajo se realizó en la Universidad Complutense de Madrid, dirigido por el Prof. G. Orellana.
4. **Caracterización analítica del sistema desarrollado** y aplicación al análisis de antibióticos en muestras de leche, trabajo realizado en la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Prof. M.C. Moreno-Bondi.

Considerando las tareas indicadas anteriormente, los objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido:

1. **Caracterización fotofísica y fotoquímica** de los **derivados fluorescentes de penicilinas** para su aplicación en el análisis de antibióticos.
2. **Desarrollo de un fluoroensayo competitivo**, basado en el empleo de **MIPs**, como elementos de reconocimiento selectivo para el análisis de antibióticos de la familia de penicilinas en alimentos y medicamentos.

3. **Desarrollo de un fluoroinmunoensayo competitivo**, totalmente automatizado, basado en el empleo de los derivados fluorescentes de penicilinas y anticuerpos policlonales selectivos a antibióticos β -lactámicos. Aplicación del biosensor al análisis de muestras de leche y medioambientales.
4. **Desarrollo de un método cromatográfico** basado en la técnica de HPLC con detección UV para la determinación de los residuos de antibióticos β -lactámicos (amoxicilina, ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina, nafcilina y dicloxacilina) en muestras biológicas y medioambientales con el fin de validar los dispositivos desarrollados. Este objetivo incluye la optimización de un método de extracción en fase sólida (SPE) para la preconcentración y limpieza de las muestras seleccionadas.

La presente Memoria se ha dividido en cuatro Capítulos correspondientes a los objetivos principales planteados anteriormente. En cada uno de ellos, se recogen los antecedentes del tema propuesto así como los objetivos particulares de cada Capítulo y los resultados más relevantes obtenidos en cada caso.

III.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

III. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

1. DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS

- 3.1.1. DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES
- 3.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- 3.2.1. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS
- 3.2.2. CROMATOGRAFÍA
- 3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

3.3. PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA

- 3.3.1. MEDIDAS DE INTENSIDAD DE LUMINISCENCIA
- 3.3.2. MEDIDAS DE LUMINISCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL
- 3.3.3. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DE EMISIÓN DE LUMINISCENCIA (Φ_{em})
- 3.3.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS

3.4. MODELIZACIÓN MOLECULAR

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO PIRENO

4.1.1. DERIVADOS DEL ÁCIDO 1-PIRENOACÉTICO

4.1.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO 1-PIRENOBUTÍRICO

4.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO DANSILO

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

4.3.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DEL FLUORÓFORO DE TIPO PIRENO

4.3.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DEL FLUORÓFORO DE TIPO DANSILO

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PENICILINA MARCADA PAAP Y FACTORES QUE AFECTAN A SU FLUORESCENCIA

4.4.1. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA FLUORESCENCIA DEL PAAP

4.4.1.1. Efecto de la temperatura del medio

4.4.1.2. Efecto de la naturaleza del disolvente

4.4.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PAAP MEDIANTE HPLC

4.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS DE PENICILINAS FLUORESCENTES

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

1

Un aspecto crucial, de cara al desarrollo de nuevos ensayos basados en medidas ópticas para el análisis de antibióticos, es el diseño de sondas moleculares que presenten características adecuadas para la medida que se pretende realizar. La función de estas sondas sería actuar como un transductor, convirtiendo la concentración de analito en una señal óptica cuantificable.

Las principales características que debería poseer el marcador ideal se recogen a continuación:

- Mostrar unas *longitudes de onda* analíticas *favorables* (longitud de onda de absorción o, en el caso de que se realicen medidas de fluorescencia, longitud de onda de excitación y emisión compatibles con las fuentes de luz y con los sistemas de detección más asequibles).
- Presentar un *coeficiente de absorción molar elevado* o, en su caso, un *rendimiento cuántico de emisión* suficientemente *grande*, a fin de garantizar una sensibilidad elevada y con una instrumentación sencilla.
- En el caso de que se realicen medidas de luminiscencia, exhibir un *gran desplazamiento de Stokes*, que permita minimizar las interferencias ópticas entre la luz de excitación y de emisión, aumentando la selectividad y sensibilidad del dispositivo y abaratando sus costes de fabricación.

- Poseer valores *adecuados* de los *parámetros físico-químicos* (pK_a , solubilidad, elevada constante de unión al material de reconocimiento molecular empleado, etc.). Asimismo, su detección no debe estar afectada por factores ajenos a la reacción química de interés, e.g. concentración y pH del tampón, naturaleza de la matriz de la muestra, etc..
- El *marcador luminiscente* seleccionado debe disponer de grupos funcionales adecuados para su *unión covalente* al analito que se desea derivatizar, intentando que las propiedades físico-químicas del compuesto sufran una alteración mínima. Es decir, tanto la sustancia libre como la marcada han de mostrar un comportamiento similar a la hora de interactuar con el elemento de reconocimiento selectivo (anticuerpo, polímeros de impronta molecular, PBPs, etc.) [1].
- Presentar una *estabilidad* química y fotoquímica elevada.
- Ser asequible, con suficiente grado de *pureza*, a un precio razonable y en cantidades apreciables, para no encarecer el precio del ensayo, y resultar comercialmente competitivo.

El **diseño de antibióticos β -lactámicos marcados** no resulta sencillo debido a la alta susceptibilidad del grupo carbonilo de la β -lactama a sufrir un ataque nucleófilo, lo que se traduce en una elevada sensibilidad a la hidrólisis. La reactividad de las penicilinas es incluso superior a la de otros antibióticos β -lactámicos simples, como los monobactámicos, debido a la presencia en las primeras de dos anillos fusionados en su esqueleto básico.

No obstante, aunque un antibiótico β -lactámico debe ser lo más estable posible para poder desarrollar su actividad antibacteriana sin descomposición, su capacidad para sufrir ataques nucleófilos debe mantenerse intacta, ya que éste es el mecanismo a través del cual los grupos nucleófilos de la enzima, que regula la biosíntesis de la pared celular microbiana, reaccionan con la β -lactama. Esta reacción, que causa la inhibición irreversible de la enzima, consiste en la apertura del anillo del antibiótico y la acilación del grupo nucleófilo del biocatalizador.

La síntesis de los **compuestos β -lactámicos fluorescentes**, y más concretamente de antibióticos del grupo de las penicilinas, es un objetivo de máximo interés, debido al gran número de aplicaciones que presentan estas moléculas. Así, dichos conjugados fluorescentes pueden utilizarse para la determinación de la actividad enzimática de las β -lactamasas, para el estudio de proteínas de membrana bacteriana, para el análisis de medios de fermentación microbianos o en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y sensibles para detectar cualitativa y cuantitativamente antibióticos β -lactámicos (en fluidos de origen biológico, en preparados y formulaciones farmacéuticas, en alimentos, etc.) [2-12].

Dichos métodos analíticos pueden basarse, si bien no está limitado a ellos, en procedimientos **cromatográficos, enzimáticos, inmunológicos** o en el uso de polímeros de impronta molecular (**MIPs**, del inglés “*molecularly imprinted polymers*”).

Hasta la fecha son pocos los trabajos recogidos en la bibliografía que describen la síntesis de tales compuestos luminiscentes, lo que pone de manifiesto la dificultad sintética que conlleva la preparación de estas estructuras (insolubilidad de los productos de partida, inestabilidad del anillo β -lactámico, etc.). De hecho, en la mayoría de los casos, las correspondientes *penicilinas fluorescentes* no se han *aislado* ni *purificado*, sino que se generan *in situ* para su análisis (*vide infra*).

Algunos de estos trabajos están basados en la preparación de derivados fluorescentes de antibióticos β -lactámicos con **orto-ftaldialdehído** [6], **fluorescamina** [13] o **9-isotiocianatoacridina** [14], y se han utilizado para la determinación cromatográfica de dichos antibióticos. Asimismo, se ha descrito la preparación de antibióticos β -lactámicos que incorporan en su estructura **complejos luminiscentes de rutenio (II)** para la cuantificación de la actividad de β -lactamasas [15]. Sin embargo, ninguna de estas publicaciones describe el aislamiento y la purificación de los antibióticos β -lactámicos fluorescentes, sino su generación *in situ* en una extensión desconocida, lo que cuestiona su aplicabilidad en determinados ensayos, como son aquéllos en los que es imprescindible la cuantificación de los derivados luminiscentes.

También se ha descrito la preparación y usos de sustratos para β -lactamasas dotados simultáneamente de una entidad fluorescente y una entidad desactivadora de la fluorescencia de la molécula [5,9]. Sin embargo, mientras que los sustratos descritos por estos autores poseen el anillo β -lactámico intacto, la necesidad de mantener la presencia simultánea de un grupo fluorogénico y del desactivador de su emisión, limita el número, la variedad y las aplicaciones de los antibióticos β -lactámicos que se pueden preparar mediante este procedimiento.

Recientemente, *Molecular Probes Inc.* (Eugene, OR, EE.UU) ha comercializado dos antibióticos β -lactámicos fluorescentes [16], **BocillinTM FL** y **BocillinTM 650/665** (ver figura 14), sintetizados a partir de penicilina V y el colorante pirrometénico BODIPYTM FL (*ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaz-a-s-indacen-3-propiónico*) ($\lambda_{exc} = 502$ nm, $\lambda_{em} = 511$ nm), compuesto espectralmente similar a la fluoresceína, o un derivado pirrólico de éste que desplaza su absorción y fluorescencia notablemente hacia el rojo.

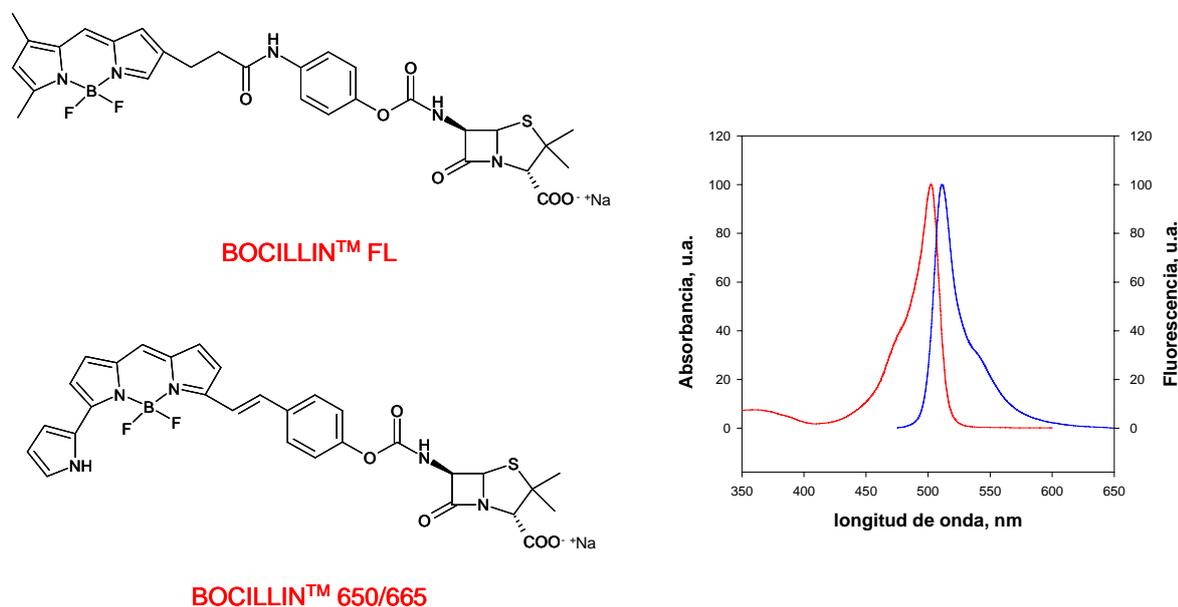


Figura 14. Estructura básica de los indicadores fluorescentes BocillinTM FL y BocillinTM 650/665 y espectros de absorción y emisión del fluoróforo BODIPYTM FL en metanol.

Estos derivados, extremadamente fluorescentes, se utilizan en proteómica para la medida de la actividad enzimática de β -lactamasas [17,18] y la detección de PBPs [19,20]. Sin embargo, presentan un mínimo desplazamiento de Stokes, son muy caros y, hasta el momento, no se ha descrito ninguna aplicación en la que se utilicen estos compuestos para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

2

Como se ha expuesto en el apartado anterior, la síntesis, purificación y caracterización de antibióticos β -lactámicos altamente fluorescentes es objeto de máximo interés para gran variedad de aplicaciones. Los métodos analíticos en los que pueden emplearse éstas moléculas están basados, sin limitarse a ellos, en procedimientos cromatográficos, inmunológicos, enzimáticos o en el uso de polímeros de impronta molecular (MIPs).

Uno de los objetivos del proyecto 'CREAM' era la preparación y caracterización de derivados fluorescentes de los antibióticos β -lactámicos para su aplicación en el desarrollo de ensayos de tipo competitivo empleando MIPs o anticuerpos como elementos de reconocimiento selectivo.

Los derivados fluorescentes preparados deben conservar intacta la estructura molecular característica del antibiótico, con el fin de mantener el reconocimiento por el polímero de impronta molecular, o el anticuerpo, desarrollados a partir de una estructura β -lactámica intacta y sin marcar.

Los compuestos β -lactámicos fluorescentes propuestos en el marco del proyecto 'CREAM' por los miembros del equipo investigador pertenecientes al Dpto. de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid (Prof. G. Orellana), eran derivados del grupo de las penicilinas, incluyendo amoxicilina, ampicilina y ácido

6-aminopenicilánico que presentaban en su estructura una entidad de tipo **pireno** o **dansilo** (*5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo*) como grupos altamente fluorogénicos.

En consecuencia, los **objetivos** planteados en este Capítulo de la Tesis Doctoral se centran en:

1. Caracterización de las propiedades espectroscópicas (espectros de absorción y espectros de emisión), fotoquímicas y fotofísicas (rendimiento cuántico de emisión, tiempo de vida de emisión, coeficiente de absorción molar) de los conjugados luminiscentes de las β -lactamas sintetizadas.
2. Evaluación de las características luminiscentes de una de las sondas sintetizadas, el *ácido* *[2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0]heptane-2-carboxílico* (**PAAP**) en función de la naturaleza del medio de medida.
3. Evaluación de la actividad antibiótica de los derivados fluorescentes de penicilinas mediante la medida de la sensibilidad “*in vitro*” de microorganismos patógenos a antimicrobianos.

3.1. REACTIVOS

3.1.1. DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES

a. Derivados de pireno

- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1-ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAP** [21].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilacetil)amino]etanoil}amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAM** [21].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{{(2*R*)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)etanoil}amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAX** [21].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(4-piren-1-ilbutanoil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PBAP** [21].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilbutanoil)amino]etanoil}amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PBAM** [21].

b. Derivados de dansilo

- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{{(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonil}amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **DAP**.

- *Ácido* [2S,5R,6R]-6-{[(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonyl]amino-2-feniletanoil}amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **DAM**.

3.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

a. Disolventes orgánicos

- Metanol, 99.8% para HPLC (SDS).
- Acetonitrilo, > 99.8% para HPLC (SDS).
- Diclorometano, 99.8% para HPLC (SDS).

b. Reactivos para la preparación de disoluciones reguladoras

- Monohidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Dihidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Ácido fosfórico, ca. 85% (Fluka).

c. Otros reactivos

- Hidróxido sódico, 99% p.a. (Merck).
- Ácido clorhídrico, 35% p.a. (Panreac).
- Agua purificada Milli-Q (Millipore).

d. Gases

- Oxígeno N-40, 99.990% (Air Liquide).
- Nitrógeno C-55, 99.9995% (Carbueros metálicos).

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

3.2.1. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS

- *Espectrofotómetro Varian modelo Cary-3 Bio* para la realización de espectros de absorbancia (UV-vis) conectado a un ordenador para la adquisición, tratamiento de datos y control del instrumento.

- ***Espectrofluorímetro Horiba-JY modelo SPEX Fluoromax-2*** provisto de una lámpara de arco de xenon (150 W) como fuente de excitación y un tubo fotomultiplicador R928P, de respuesta extendida al rojo. Además, el fluorímetro dispone de un compartimento termostatzado de cubetas con agitador magnético. El instrumento está conectado a un ordenador para la adquisición y tratamiento de datos empleando el software original *Datamax Spectroscopy-Std versión 2.20* (Galactic Instruments, Salem, NH).
- ***Espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-50B*** provisto de una lámpara pulsada de xenon (10 μ s anchura de pulso, 50 Hz) como fuente de excitación y un fotomultiplicador Hamamatsu R-928, de respuesta extendida al rojo, con alimentación fijada en 775 V. El instrumento está conectado a un ordenador para almacenamiento y tratamiento de datos. El control de temperatura (± 0.5 °C) se lleva a cabo mediante un baño termostático Polyscience 9015.
- ***Espectrofluorímetro para medidas de emisión con resolución temporal por conteo de fotones correlacionados con el tiempo, TC-SPC (Edinburgh Analytical Instruments FL-900)*** equipado con una lámpara de descarga pulsada en nitrógeno a baja presión (0.3 bar) y una separación entre electrodos de 1.5 mm. El instrumento incluye un fotomultiplicador Hamamatsu R-955, de respuesta extendida al rojo (190 – 850 nm), enfriado con un sistema peltier a -25 °C. El control del instrumento, la adquisición de datos y su análisis se realiza con un ordenador empleando el programa suministrado por Edinburgh Instruments (versión 3.30) que permite la determinación de los tiempos de vida de emisión mediante ajuste de los datos experimentales a un modelo exponencial o suma de exponenciales, empleando un algoritmo no lineal de tipo Marquardt, con o sin deconvolución de la respuesta instrumental (ca. 1 ns FWHM) [22].

La figura 12 muestra una fotografía de algunos de los instrumentos descritos anteriormente.

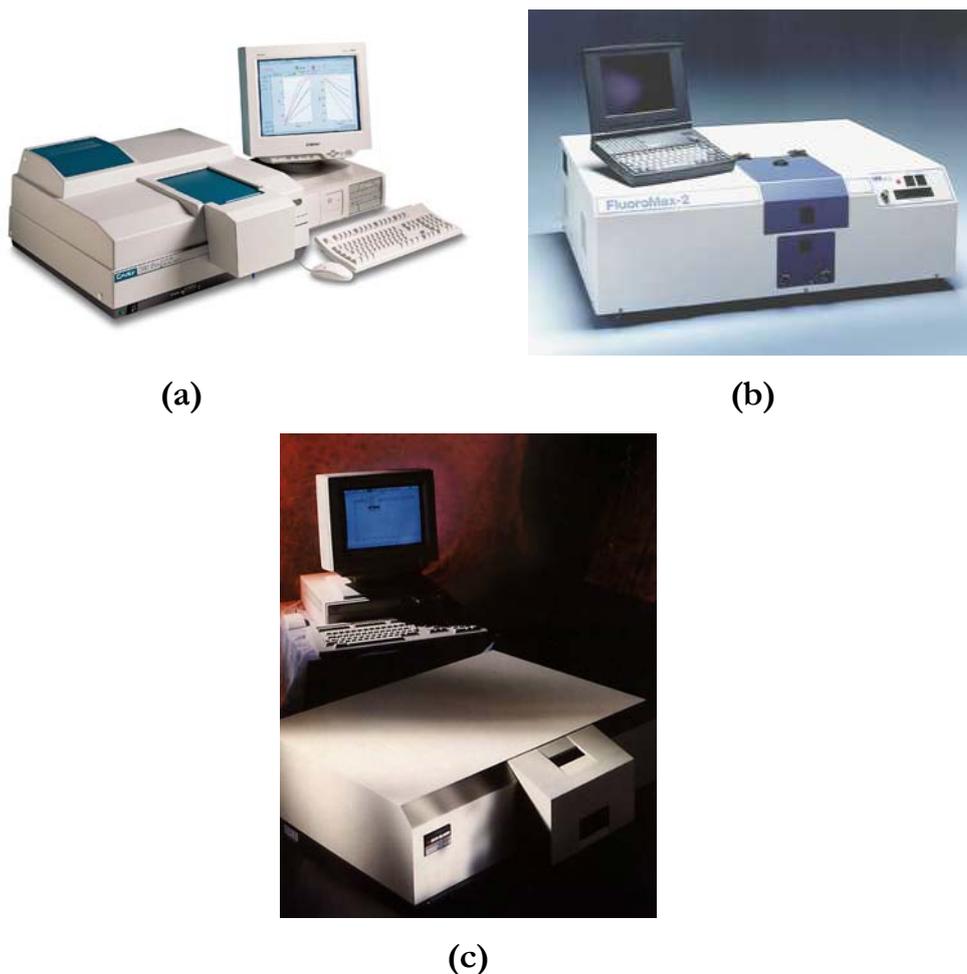


Figura 15. (a) Espectrofotómetro Varian modelo Cary-3 Bio, (b) Espectrofluorímetro Horiba-JY modelo SPEX Fluoromax-2, (c) Espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-50B.

3.2.2. CROMATOGRAFÍA

Las medidas se han llevado a cabo con un **cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 LC (Agilent Technologies)** que se compone de:

- Sistema de bombeo cuaternario HP 1100, con bomba de doble pistón en serie que proporciona un caudal entre $0.2 - 10 \text{ mL min}^{-1}$.
- Detector de fluorescencia de señal múltiple de rápido escaneado en línea (FLD) HP 1100, con lámpara de xenon ($5 - 20 \text{ W}$) y frecuencia de pulso 296 Hz (74 Hz para modo espectral). Célula de flujo de sílice fundida con volumen de $8 \mu\text{L}$ y 20 bar de presión máxima admisible.

- Sistema de inyección automático termostaticado HP 1100, con un intervalo de volumen de inyección 0.1 – 100 μL y equipado con un muestreador con capacidad para 100 viales de 2 mL y control de temperatura desde 4 a 55 $^{\circ}\text{C}$.
- Desgasificador HP 1100, con un caudal máximo 10 mL min^{-1} por canal y volumen interno 12 mL por canal.
- Termostaticador de columna HP 1100, con intervalo de temperatura desde 10 $^{\circ}\text{C}$ por debajo de la temperatura ambiente hasta 80 $^{\circ}\text{C}$ (± 0.8 $^{\circ}\text{C}$).
- Columna cromatográfica Phenomenex LUNA[®] C₁₈ (2), 5 μm , 4.6 \times 150 mm.
- Precolumna Agilent compuesta por un soporte de cartucho, cartucho Eclipse[™] XDB-C8, 5 μm , 4.6 \times 12.5 mm y un capilar de conexión a columna.
- Ordenador provisto del programa *HP ChemStation Rev A.09.03 [682]* Copyright[®] Hewlett Packard Company que incluye la interfaz de usuario 'Method & Run Control' y el procesador de datos 'Data Analysis'.

3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- Baño termostático Polyscience[®] 9015, con control digital de temperatura (± 0.5 $^{\circ}\text{C}$).
- pH-metro Orion 710A dotado de un electrodo combinado de vidrio.
- Balanzas analíticas (Sartorius), con 0.1 mg de sensibilidad y Mettler AT261 DeltaRange[®], con 0.01 mg de sensibilidad.
- Cubetas de cuarzo Hellma[®] modelo 111-QS, de 10 \times 10 mm de paso óptico.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Filtrador de disolventes (Afora).
- Agitador magnético termostaticado (Ikamag Ret).
- Termómetro.
- Material analítico de calidad contrastada.
- Micropipetas (Biohit) regulables de émbolo capilar de volumen máximo 50, 100, 200, 500 y 1000 μL .

- Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore.
- Filtros de PTFE, modelo Millex-FG (Millipore, 13 mm, tamaño de poro 0.20 μm).
- Programa de tratamiento y procesado de datos Sigma Plot 8.0, SPSS (2002) y Microsoft Excel, Microsoft (2003).
- Programa de modelización molecular Chem 3D Ultra 8.0, Cambridge Soft Corporation (2003).

3.3. PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA

3.3.1. MEDIDAS DE INTENSIDAD DE LUMINISCENCIA

Las medidas de intensidad de luminiscencia y la determinación de las longitudes de onda de excitación y emisión máximas se han llevado a cabo empleando el espectrofluorímetro Horiba-JY modelo SPEX Fluoromax-2 (apartado 3.2.1. de esta Parte Experimental) y una cubeta de cuarzo, en la que se introduce una disolución de sonda fluorescente de concentración adecuada.

Las medidas de luminiscencia se han realizado excitando a la longitud de onda correspondiente al máximo de la banda de absorción de las sondas fluorescentes.

3.3.2. MEDIDAS DE LUMINISCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL

La cinética de extinción de la luminiscencia de los derivados β -lactámicos fluorescentes se ha determinado mediante la técnica de TC-SPC empleando el fluorímetro Edinburgh Instruments FL-900 (apartado 3.2.1. de esta Parte Experimental). Se selecciona una λ_{exc} de 337 nm (40 Hz), correspondiente a uno de los máximos de excitación de la lámpara de N_2 , y una λ_{em} máxima correspondiente a cada una de las sondas fluorescentes. La temperatura se ha mantenido a $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ durante todos los experimentos.

3.3.3. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DE EMISIÓN DE LUMINISCENCIA (Φ_{em})

Este parámetro se ha determinado mediante el método de Parker & Rees que relaciona el rendimiento cuántico de emisión de un fluoróforo patrón $(\Phi_{em})_{pat}$ con el rendimiento cuántico de emisión de la sustancia luminiscente cuya magnitud se desea cuantificar $(\Phi_{em})_{anal}$, siempre que la emisión de ambos tenga lugar en un intervalo espectral similar.

Los espectros de absorción y emisión se adquieren en las mismas condiciones con disoluciones ópticamente diluidas ($A_{exc} \leq 0.05$ u.a.) de ambas especies. Finalmente, el rendimiento cuántico de emisión se calcula mediante la expresión [23]:

$$(\Phi_{em})_{anal} = (\Phi_{em})_{pat} \frac{A_{pat}}{A_{anal}} \frac{S_{anal}}{S_{pat}} \left(\frac{n_{anal}}{n_{pat}} \right)^2 \quad (1)$$

donde A es la absorbancia de las disoluciones a la longitud de onda de excitación, S es el área bajo la curva de fluorescencia y n es el índice de refracción, en el caso de que el patrón y el analito de interés deban medirse en diferentes disolventes.

Los fluoróforos que se han utilizado como patrones de referencia con rendimientos cuánticos de emisión conocidos son el **pireno** (Aldrich, +99%, recristalizado dos veces en metanol y sublimado, $\Phi_{em} = 0.62$ en acetonitrilo [24]) y el **ácido 5-dimetilamino-1-naftaleno sulfónico hidratado** (Aldrich, $\Phi_{em} = 0.36$ en NaHCO_3 0.1 mol L⁻¹ [25]).

3.3.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS

Mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-FLD)

Para la determinación y evaluación cuantitativa de la estabilidad de una disolución de sonda fluorescente **PAAP**, se inyecta en la columna analítica un volumen de 10 μ L de la disolución de la sonda en el disolvente ensayado, utilizando un inyector automático termostatzado a 10 °C.

La separación se realiza en modo isocrático mediante una columna Phenomenex LUNA[®] C₁₈ (2), 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, utilizando como fase móvil la mezcla binaria acetonitrilo-agua (ácido fosfórico 0.08%, pH 2) (45:55, v/v). La temperatura de la columna se mantiene a 35 °C y el caudal se fija en 1 mL min⁻¹. La detección se efectúa empleando una $\lambda_{exc} = 340$ nm y $\lambda_{em} = 396$ nm.

La identificación se realiza:

- Por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos para los patrones de compuestos análogos inyectados individualmente en las mismas condiciones cromatográficas.
- Mediante comparación del espectro de emisión del pico cromatográfico con los de otros compuestos fluorescentes de tipo pireno. Además, se realiza un control de pureza del pico cromatográfico.

3.4. MODELIZACIÓN MOLECULAR

La conformación tridimensional de mínima energía de las penicilinas fluorescentes se ha determinado mediante mecánica molecular (MM2) seguida de dinámica molecular y minimización de energía por el método semiempírico MOPAC y campo de fuerzas AM1.

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

La determinación de la actividad antibiótica de las sondas fluorescentes se ha realizado empleando la **técnica de la difusión en agar**, utilizando tres microorganismos grampositivos diferentes: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. El estudio microbiológico lo ha realizado la Profesora Dr. Josefina Rodríguez de Lecea, perteneciente al Dpto. de Microbiología III de la Facultad de CC Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Micrococcus luteus ATCC 9341 y *Bacillus subtilis* BGA son los microorganismos tipo utilizados en la técnica de cribado de las cuatro placas (Bogaerts y Wolf, 1980) [26] para la detección de residuos de antibióticos en diversos tipos de muestras (alimentos, tejidos, productos zoonosanitarios, etc.). Concretamente, *M. luteus* ATCC 9341 es el microorganismo de elección para la determinación de antibióticos β -lactámicos. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es una bacteria presente en la microbiota humana, que puede dar lugar a diversos síntomas clínicos, por infección o por intoxicación. Su presencia en alimentos puede originar la producción de toxinas que, al ser ingeridas, ocasionan una intoxicación alimentaria característica.

Para la realización del ensayo se ha seguido el procedimiento estandarizado que se describe a continuación [27].

Se cultivan las tres cepas de forma individual durante 24 horas, en solución estéril a 37 °C, empleando **TSA** (agar triptona soja) como medio de cultivo. A continuación se prepara una suspensión densa, equivalente al N° 5 de la escala de Mc Farland, y se realiza una siembra por inundación. En ella se aplican, por duplicado, discos de papel impregnados en disoluciones acuosas ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) de las penicilinas fluorescentes ensayadas. Como control se preparan, al mismo nivel de concentración, discos conteniendo penicilina G, ampicilina, amoxicilina y el marcador fluorescente ácido pirenoacético.

Finalmente, las placas se incuban a 37 °C durante 24 h. La lectura e interpretación de los datos se realiza mediante la medida y comparación de los diámetros de los halos de inhibición producidos por cada uno de los compuestos ensayados con los obtenidos con los antibióticos de referencia.

Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los obtenidos empleando espectroscopia de absorción. Otra ventaja de los métodos luminiscentes es su elevada selectividad, significativamente superior a la encontrada en los métodos de absorción. Estas fueron algunas de las razones que favorecieron la elección de un marcador luminiscente para el desarrollo del ensayo propuesto en el proyecto 'CREAM'.

Los análogos β -lactámicos fluorescentes empleados en esta Tesis Doctoral son derivados de las penicilinas, incluyendo amoxicilina, ampicilina y el ácido 6-aminopenicilánico, que incorporan en su molécula un grupo pireno o dansilo fuertemente fluorogénicos.

Los compuestos marcados fueron sintetizados en el Dpto. de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid, procediéndose a su caracterización y aplicación en el marco del presente trabajo de investigación.

Las características más relevantes de los nuevos conjugados fluorescentes se detallan en los siguientes apartados.

4.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO PIRENO

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (**PAHs**, del inglés “*polynuclear aromatic hydrocarbon*”), son una clase amplia de compuestos que presentan una estructura aromática extendida, constituida por tres o más anillos aromáticos que pueden estar unidos linealmente, angularmente o bien condensados.

Dependiendo del compuesto en particular, la banda de absorción puede estar situada en la zona del UV o visible del espectro electromagnético, y la banda de emisión alrededor de 400 nm, con desplazamientos de Stokes pequeños o moderados. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia suelen ser elevados ($\Phi_{em} > 0.5$) y los tiempos de vida de emisión (τ) son relativamente largos (50 – 400 ns) comparados con los que presentan la mayoría de fluoróforos orgánicos. Se trata de compuestos de gran estabilidad química, siendo menos estables desde el punto de vista fotoquímico ya que pueden sufrir fotooxidación o fotodegradación.

Los PAHs, en particular el **pireno** y sus derivados, se encuentran disponibles en el mercado a precios razonables y se utilizan como sondas fluorescentes en un gran número de aplicaciones [28-31]. Por ejemplo, se ha elaborado una escala de polaridad de varios disolventes en función del espectro de emisión del pireno cuando se disuelve en cada uno de estos medios [32]. Esta aplicación es posible debido a la correlación entre el acoplamiento vibrónico de los estados electrónicos excitados s_1 y s_2 que muestra el pireno y la escala empírica de la polaridad basada en este fluoróforo. La naturaleza dipolar del disolvente determina el grado de generación, en la molécula de pireno, de un momento dipolar inducido por distorsiones vibracionales de la coordenada nuclear de simetría b_{3g} . Ello se manifiesta en una variación de la intensidad relativa de las diferentes bandas que constituyen la estructura fina de la emisión del pireno, en función de la polaridad del medio circundante [33].

Basándose en el mismo principio y en su naturaleza hidrófoba, estos compuestos se han utilizado para el estudio de los distintos microentornos existentes

en matrices poliméricas de fases estacionarias cromatográficas. Asimismo, se han empleado para la caracterización de zeolitas, evaluación de las interacciones polímeros-surfactantes y la caracterización de ARN y ADN [34,35]. También se han utilizado derivados del pireno y perileno en la construcción de optodos para la medida de oxígeno molecular, gracias a la eficaz desactivación que éste gas produce en el indicador luminiscente [36].

Algunas de las ventajas que hacen de los **derivados de pireno** unos excelentes candidatos para el marcaje fluorescente de antibióticos β -lactámicos, sin que sus propiedades fisicoquímicas difieran significativamente de la β -lactama original, son: su *estructura compacta* (en comparación con otros hidrocarburos aromáticos) y la *ausencia de grupos funcionales de naturaleza iónica o ionizable* (característica nada deseable para marcadores luminiscentes que han de trabajar en medio orgánico).

Sin embargo, su utilización conlleva a su vez una serie de inconvenientes como son los efectos adversos que provocan en el organismo (irritación en mucosidades, piel y sistema respiratorio). Además algunas de estas sustancias, como por ejemplo el benzo(a)pireno, se ha demostrado que poseen actividad cancerígena. No obstante, dada la extremada sensibilidad fluorescente que proporciona este tipo de compuestos, las cantidades normalmente utilizadas son del orden del pmol, nivel muy por debajo de los valores que podrían afectar a la salud del operario.

Finalmente destacar que, aunque sus características espectroscópicas (bajas longitudes de onda de absorción y emisión) pudieran suponer un obstáculo a la hora de disponer de instrumentación sencilla y barata, afortunadamente en la actualidad existen fuentes pulsadas de bajo consumo capaces de excitar, con suficiente intensidad, a bajas longitudes de onda (e.g. lámparas pulsadas de descarga en xenon) y diodos emisores de luz de bajo coste que permitirían la fabricación de equipos comerciales.

A continuación se van a describir los antibióticos β -lactámicos fluorescentes desarrollados que se han utilizado en la presente Memoria. Los derivados marcados se han sintetizado, en todos los casos, a partir de los ácidos *1-pirenoacético* (PyCH_2COOH) y *1-pirenobutírico* ($\text{Py}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$) [21].

4.1.1. DERIVADOS DEL ÁCIDO 1-PIRENOACÉTICO

Ácido *[2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (PAAP)*

$C_{26}H_{22}O_4N_2S$

PM 458 g mol⁻¹

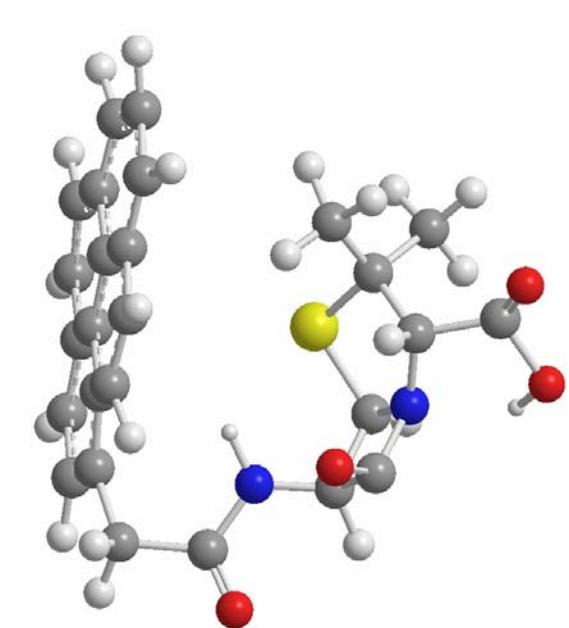
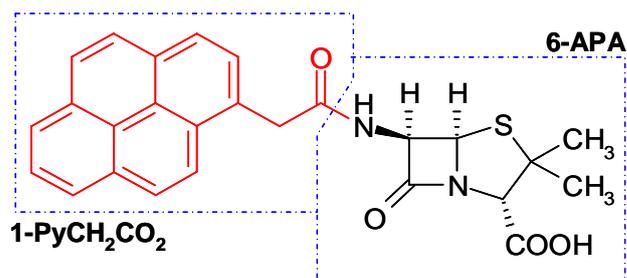


Figura 16. Estructura tridimensional del PAAP.

- El **PAAP** se ha sintetizado a partir del *ácido 6-aminopenicilánico* (6-APA) comercial.
- Es un sólido cristalino, amarillo pálido, con un punto de fusión de 148 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-((2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilacetil)amino]etanoil)amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (PAAM)

$C_{34}H_{29}O_5N_3S$

PM 591 g mol⁻¹

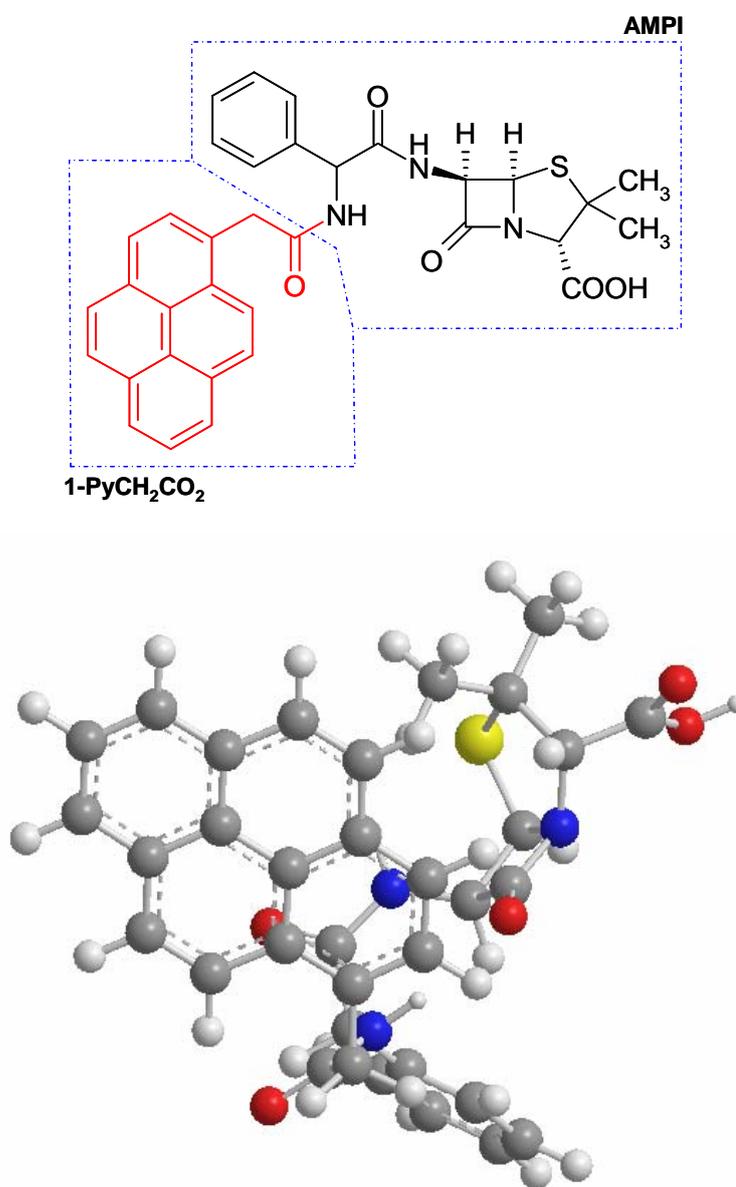


Figura 17. Estructura tridimensional del PAAM.

- El **PAAM** se sintetiza a partir del antibiótico *ampicilina* (AMPI).
- Es un sólido amarillo, con un punto de fusión de 142 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{[(2*R*)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)etanoil]amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (PAAX)

C₃₄H₂₉O₆N₃S

PM 607 g mol⁻¹

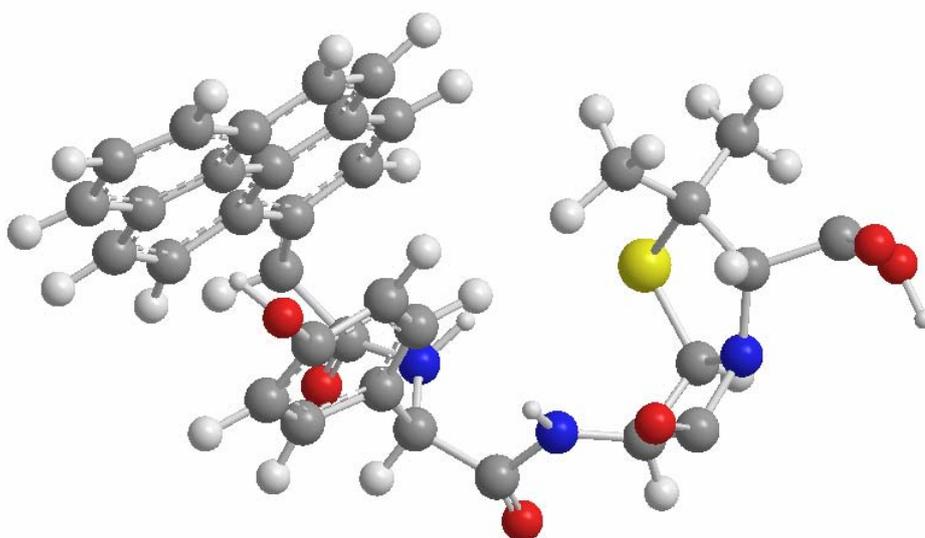
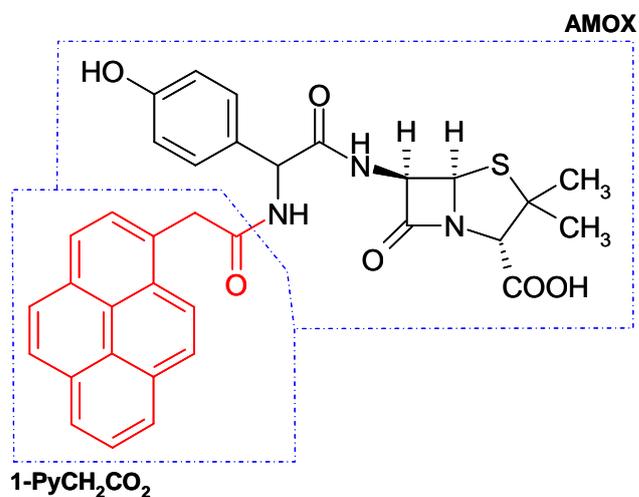


Figura 18. Estructura tridimensional del PAAX.

- El **PAAX** se sintetiza a partir del antibiótico *amoxicilina* (AMOX).
- Es un sólido amarillo pálido, con un punto de fusión de 159 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

4.1.2. DERIVADOS DEL ÁCIDO 1-PIRENOBUTÍRICO

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(4-piren-1ilbutanoil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (PBAP)

 $C_{28}H_{26}O_4N_2S$

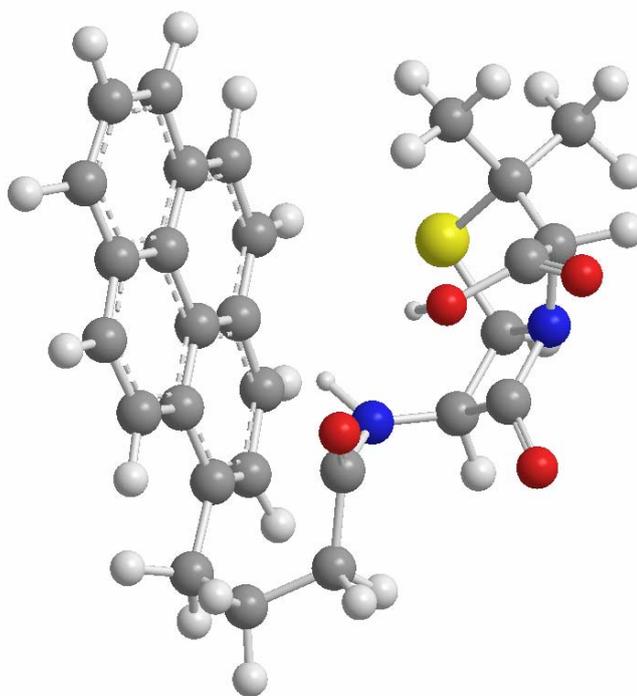
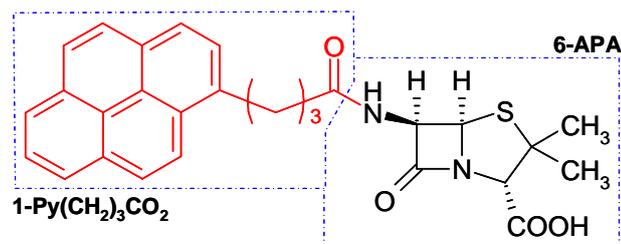
 PM 486 g mol⁻¹


Figura 19. Estructura tridimensional del PBAP.

- El **PBAP** se sintetiza a partir del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) comercial.
- Es un sólido amarillo pálido, con un punto de fusión de 89 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilbutanoil)amino]etanoil} amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (PBAM)

C₃₆H₃₃O₅N₃S

PM 619 g mol⁻¹

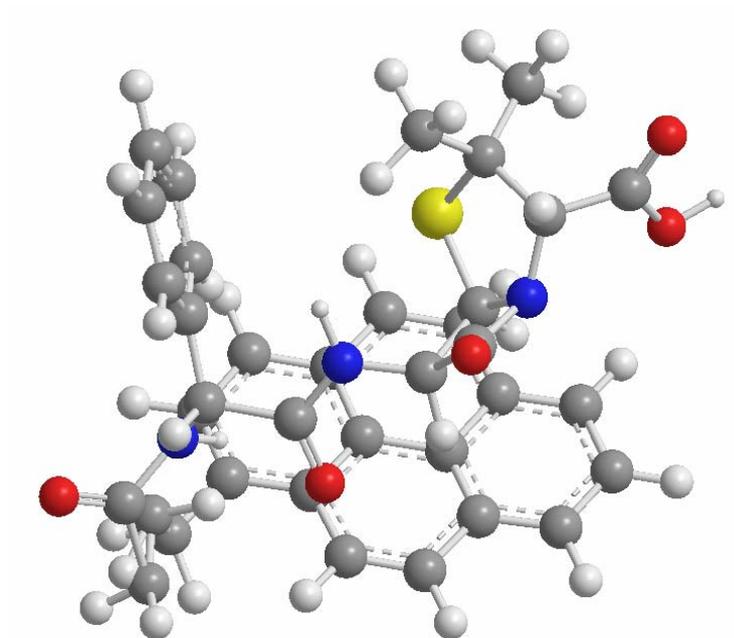
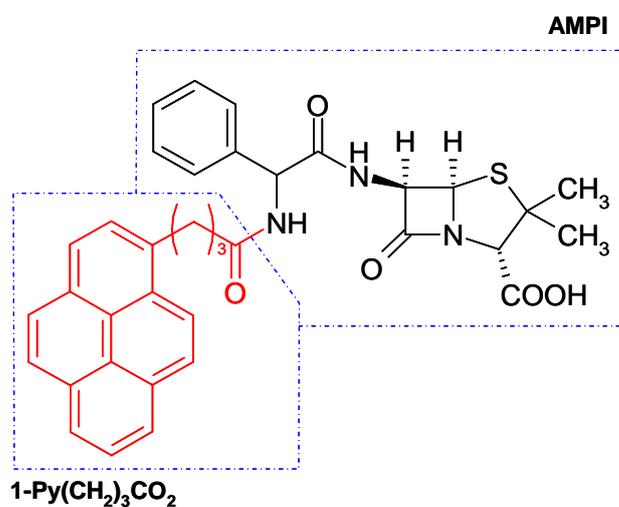


Figura 20. Estructura tridimensional de PBAM.

- El **PBAM** se sintetiza a partir del antibiótico *ampicilina* (AMPI).
- Es un sólido amarillo pálido, con un punto de fusión de 137 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

4.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DE UN FLUORÓFORO DE TIPO DANSILO

Uno de los grupos cromóforos más ampliamente utilizado en la preparación de marcadores fluorescentes es el dansilo, en particular el **cloruro de dansilo** (*cloruro de 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo*), desarrollado por Weber en 1952.

El cloruro de dansilo absorbe en la región del UV (longitud máxima de absorción ca. 340 nm) en una banda que presenta una anchura a mitad de altura (**FWMH**, del inglés *“Full Width at Middle Height”*) de 80 nm. Presenta, en medio orgánico, una fuerte emisión a ca. 525 nm, con un rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia elevado ($\Phi_{em} \sim 0.4$) y con un tiempo de vida de emisión relativamente corto (> 10 ns). La intensidad de fluorescencia es fuertemente dependiente de la polaridad del microentorno, siendo muy inferior en medio acuoso debido al carácter de transferencia de carga intramolecular de su estado electrónico excitado.

Su uso más extendido es en el campo de la bioquímica de péptidos y aminoácidos [37] en la que puede utilizarse para la identificación de residuos peptídicos *N*-terminales. Además, se ha aplicado satisfactoriamente como reactivo derivatizante para la determinación, a nivel de trazas, de numerosas sustancias, e.g. productos farmacológicos no fluorescentes [38,39], aminas [40], aminoácidos [41], oligopéptidos y proteínas.

Así, por ejemplo, Moret y col. [42] han analizado aminas biogénicas (catecolaminas e indolaminas) en muestras vegetales (tomates, espinacas, etc.) tras una reacción de derivatización previa con cloruro de dansilo y *o*-ftaldehído. La determinación se realiza mediante HPLC-UV. Tras la comparación de los resultados obtenidos mediante ambos procedimientos de derivatización, aplicados a los mismos extractos, se ha demostrado que el marcador dansilo es más adecuado que el *o*-ftaldehído, ya que permite obtener menores tiempos de retención y puede aplicarse a la determinación de un mayor número de aminas.

El cloruro de dansilo es una buena alternativa para la preparación de análogos fluorescentes de antibióticos β -lactámicos ya que éstos se pueden sintetizar a través de una reacción directa del fluoróforo con el grupo amino libre del 6-APA o de aquellos antibióticos que posean dicho grupo funcional en su estructura (e.g. amoxicilina, ampicilina).

A continuación se presentan los antibióticos β -lactámicos fluorescentes que han sido sintetizados a partir del *ácido 6-aminopenicilánico* (6-APA) y la penicilina dibásica *ampicilina* (AMPI) para su caracterización y aplicación en la presente Tesis Doctoral.

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-6-[[5-(dimetilamino)-1-naftil]sulfonyl]amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (DAP)

$C_{20}H_{23}O_5N_3S_2$

PM 449 g mol⁻¹

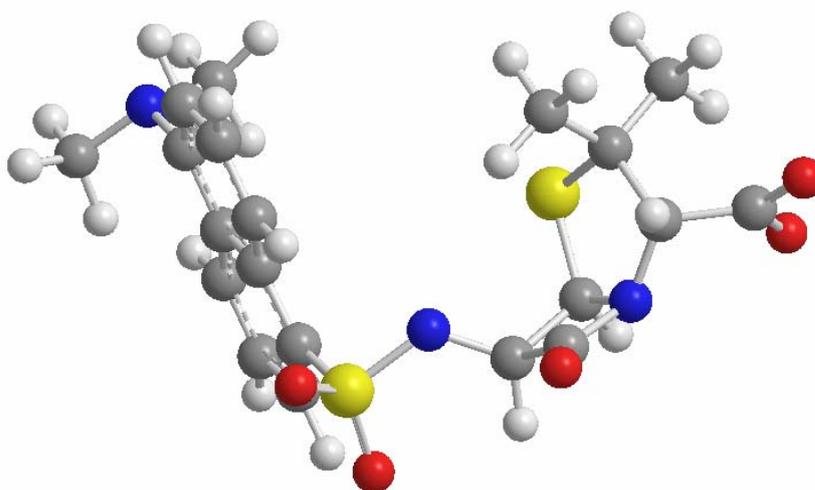
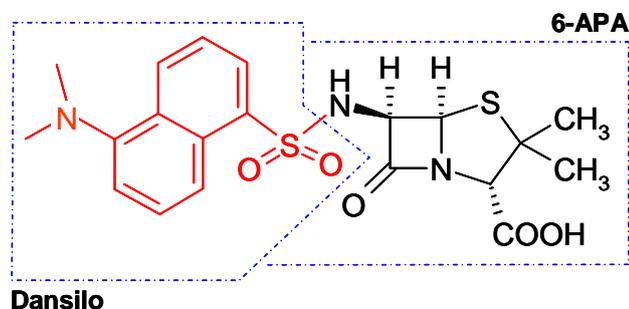


Figura 21. Estructura tridimensional del DAP.

- El **DAP** se sintetiza a partir del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).
- Es un sólido amarillo pálido, con un punto de fusión de 139 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

Ácido [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{[(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonyl]amino-2-feniletanoil}amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico (DAM)

C₂₈H₃₀O₆N₄S₂

PM 582 g mol⁻¹

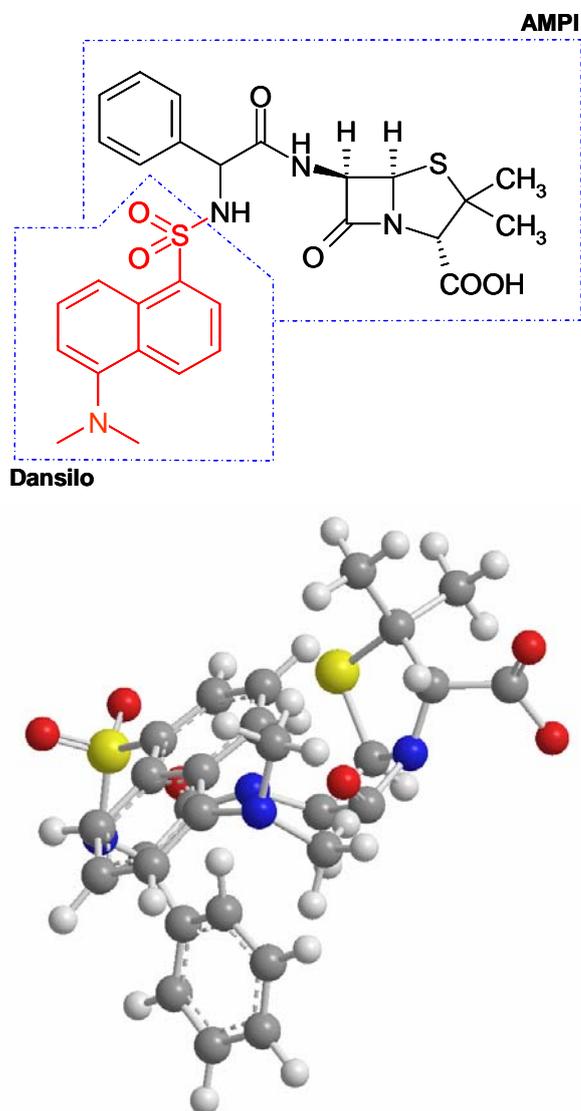


Figura 22. Estructura tridimensional de DAM.

- El **DAM** se sintetiza a partir del antibiótico *ampicilina* (AMPI).
- Es un sólido amarillo, con un punto de fusión de 154 °C, temperatura a la cual descompone.
- Soluble en medio acuoso (pH > 2.5) y disolventes orgánicos (acetonitrilo, metanol, éter etílico, etc.).

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES DE PENICILINAS

La caracterización espectroscópica de los derivados fluorescentes de penicilinas sintetizados se ha realizado empleando las técnicas de espectroscopia de absorción y emisión de luminiscencia, tanto de estado estacionario como con resolución temporal.

4.3.1. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DEL FLUORÓFORO DE TIPO PIRENO

La fluorescencia más intensa y de mayor utilidad analítica es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución. El pireno y sus derivados se encuentran entre los compuestos orgánicos fluorescentes más típicos, caracterizados estructuralmente por un sistema conjugado de anillos aromáticos condensados que favorece su eficacia cuántica.

Otros factores que afectan positivamente a la fluorescencia de las moléculas orgánicas son: el aumento de la rigidez conformacional (que dificulta la conversión interna y, por consiguiente, disminuye la eficiencia del proceso de desactivación no radiativa), la planaridad del sistema conjugado π y la existencia de sustituyentes en la molécula, especialmente los de carácter fuertemente electroatractor o electrodonador (que no se da en las estructuras sintetizadas).

En la figura 23 se muestran los espectros de absorción y de fluorescencia de los nuevos derivados de tipo pireno de penicilinas, en acetonitrilo y CH_2Cl_2 .

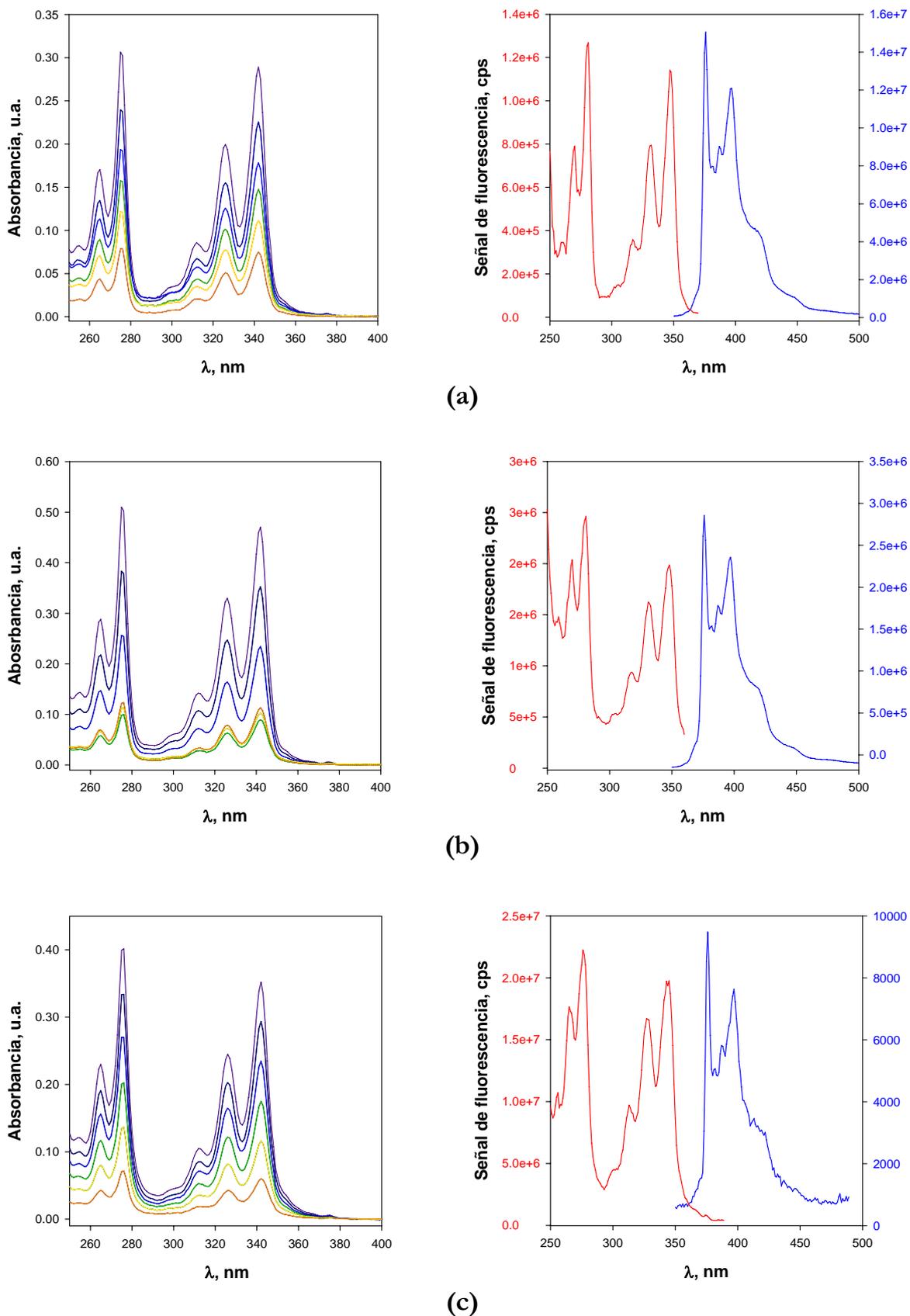


Figura 23A. Espectros de absorción ($1.1 - 84 \mu\text{mol L}^{-1}$) y espectros de fluorescencia ($-$ excitación; $-$ emisión) ($3.4 - 71 \mu\text{mol L}^{-1}$) a 25°C : (a) PAAP, (b) PAAM, (c) PAAX. Espectros de emisión sin corregir por la respuesta instrumental, $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$. Las medidas de absorbancia se realizaron en acetonitrilo y las de fluorescencia en CH_2Cl_2 y equilibrada al aire.

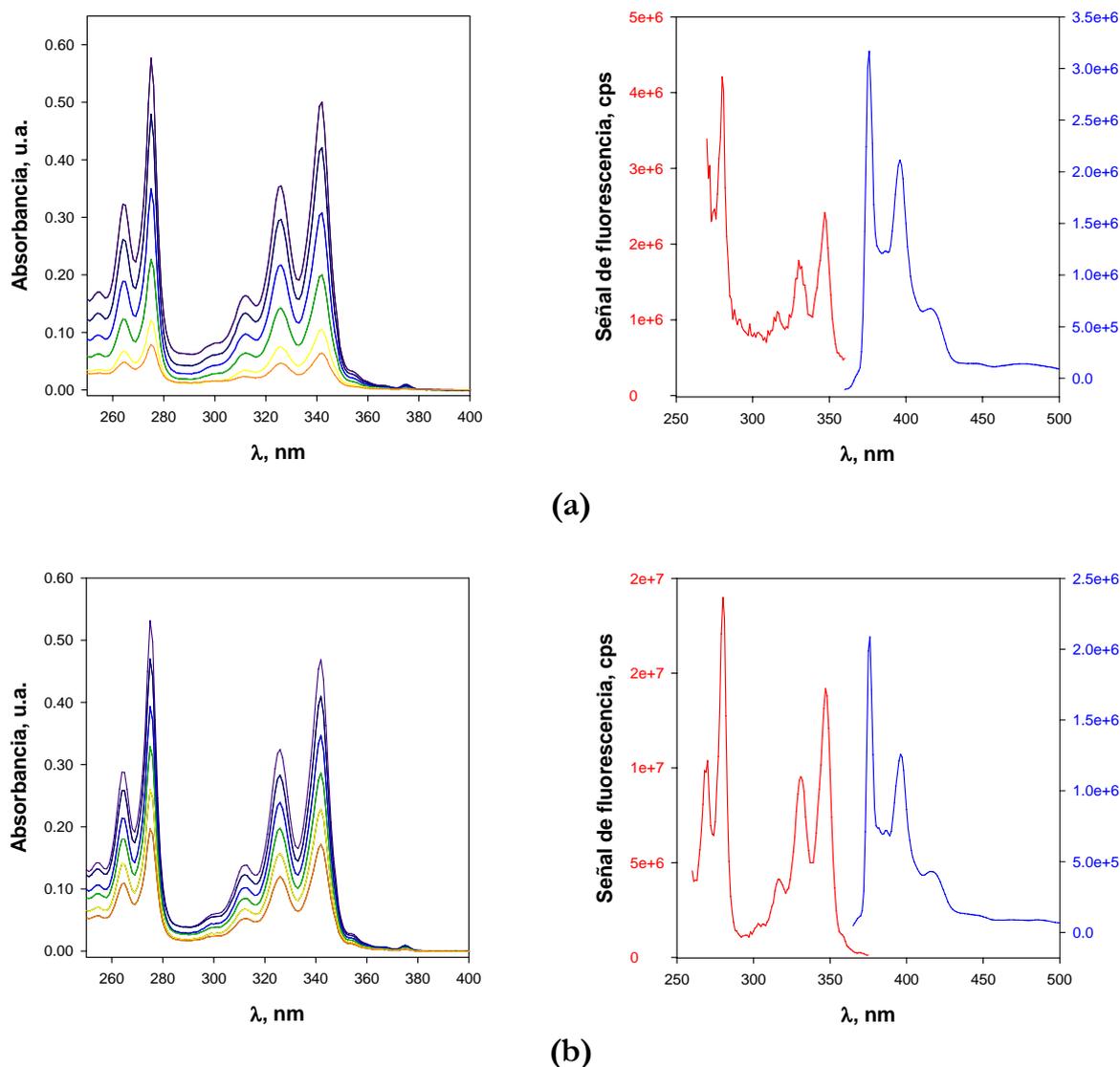


Figura 23B. (a) PBAP, (b) PBAM. Ver figura 23A.

A partir de los espectros de absorción se puede observar el perfil estructurado de las bandas de vibración de las penicilinas y derivados fluorescentes conjugados con el marcador pireno.

Los espectros de emisión se midieron a temperatura ambiente en acetonitrilo y CH_2Cl_2 , para concentraciones comprendidas entre $3.4 - 71 \mu\text{mol L}^{-1}$, observando el espectro característico de emisión del fluoróforo pireno.

Los espectros de absorción y de emisión son prácticamente una imagen especular uno del otro, ya que las diferencias de energía vibracional para los estados electrónico fundamental y excitado son similares [43]. Asimismo, se aprecia que el

desplazamiento de Stokes de la banda de fluorescencia es de ca. 30 nm, muy superior al presentado por los derivados comerciales Bocillin™ y Bocillin 650/665.

En la tabla 15 se recogen los datos espectroscópicos más importantes de los nuevos derivados β -lactámicos preparados.

Tabla 15. Características espectroscópicas y fotofísicas de los derivados β -lactámicos de tipo pireno en acetonitrilo a 25 °C.

Derivado fluorescente	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, nm ^a (ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, nm	Φ_{em}^b	τ , ns ^c
PAAP	342 (36800)	376	0.89 ± 0.07	254 ± 7
PAAM	342 (37400)	376	0.94 ± 0.07	263 ± 8
PAAX	342 (34800)	374	0.90 ± 0.07	246 ± 7
PBAP	342 (30800)	374	0.75 ± 0.07	207 ± 6
PBAM	342 (32400)	375	0.77 ± 0.07	198 ± 6

^aError: ± 1 nm. Error: ± 100 L mol⁻¹ cm⁻¹.

^bObtenido a partir del estándar de pireno purificado en acetonitrilo ($\Phi_{\text{em}} = 0.62$).

^cDeterminados mediante la técnica TC-SPC en disolución desoxigenada mediante desplazamiento con argón (30 min).

Los valores de los **rendimientos cuánticos de emisión** (Φ_{em}) y de los tiempos de vida de emisión (τ) de estas moléculas a una temperatura de 25 °C y en ausencia de O₂ se recogen también en la tabla 15.

El *rendimiento cuántico* de fluorescencia o de fosforescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia por unidad de tiempo respecto al número total de moléculas excitadas (fotones absorbidos) por unidad de tiempo. Para las moléculas altamente fluorescentes como la fluoresceína o el difenilantraceno, Φ_{em} se aproxima a la unidad bajo ciertas condiciones. Las especies químicas que no son fluorescentes de manera apreciable tienen valores de Φ_{em} que se aproximan a cero.

Como puede observarse en la tabla 15, los Φ_{em} obtenidos son elevados (≥ 0.75) y de acuerdo con los valores habituales que se consiguen con este tipo de marcadores,

lo que determinará una importante sensibilidad del método analítico que se desarrolle a partir de ellos.

Por otro lado, todos los derivados sintetizados presentan **tiempos de vida de emisión elevados** (≥ 200 ns), al igual que se observa en el caso del pireno libre. Esta particularidad tiene su origen en el carácter relativamente prohibido de la transición electrónica entre los dos estados singletes de menor energía ($S_1 \rightarrow S_0$) [44].

Finalmente destacar que los derivados β -lactámicos fluorescentes de tipo pirenoacético (PAAP, PAAM y PAAX) muestran mayores rendimientos cuánticos de emisión (ca. 0.90) y mayores tiempos de vida de emisión (ca. 250 ns) que sus análogos derivados del marcador de tipo pirenobutírico (PBAP y PBAM). Este hecho podría ser consecuencia de una menor movilidad conformacional de los primeros que dificulta la conversión interna desde S_1 a S_0 . La mayor flexibilidad de la cadena trimetilénica de los derivados del ácido pirenobutírico incrementaría la eficiencia del proceso de relajación del estado excitado, por conversión externa, disminuyendo la contribución de la desactivación radiativa. El valor similar de las relaciones τ_{PA}/τ_{PB} y Φ_{PA}/Φ_{PB} (~ 1.25) indicaría que la velocidad del proceso radiativo de desactivación es similar en los sistemas pirenoacético (PA) y pirenobutírico (PB) ($\Phi = \tau/\tau_0^{(f)}$), lo cual está de acuerdo con el análogo carácter electrónico de las cadenas alifáticas unidas al sistema pireno.

4.3.2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES DERIVADOS DEL FLUORÓFORO DE TIPO DANSILO

El cloruro de dansilo es un compuesto utilizado habitualmente como marcador fluorogénico. Un aspecto importante que caracteriza su fluorescencia es la variación que experimenta la longitud de onda de emisión con la polaridad del disolvente. Además, el rendimiento cuántico de emisión de este fluoróforo se incrementa a medida que disminuye la polaridad del disolvente (e.g. su intensidad de fluorescencia es 10 veces mayor en hexano que en agua).

El efecto del disolvente sobre la luminiscencia de ciertas moléculas tiene importancia sobre todo en compuestos fluorogénicos que presentan elevados momentos dipolares en el estado excitado por la transferencia de carga intramolecular. Un aumento de la polaridad del disolvente provoca un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción y de emisión.

Otros factores que afectan a sus características fluorogénicas son la presencia de especies desactivadoras de la fluorescencia y el pH del medio.

En la figura 24 se muestran los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia del DAP y del DAM registrados a temperatura ambiente en ausencia de oxígeno molecular y utilizando como disolventes acetonitrilo y diclorometano. Asimismo, en la tabla 16 se recogen los datos espectroscópicos más relevantes obtenidos para estas moléculas.

Tabla 16. Características espectroscópicas de los derivados β -lactámicos dansilados en acetonitrilo a 25 °C.

Derivado fluorescente	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, nm ^a (ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, nm	Φ_{em}^b	τ , ns ^c
DAP	341 (40500)	520	0.39 ± 0.01	21 ± 2
DAM	339 (42100)	522	0.43 ± 0.01	22 ± 2

^aError: ± 1 nm. Error: ± 100 mol⁻¹ L cm⁻¹.

^bObtenido a partir del estándar de ácido 5-dimetilamino-1-naftaleno sulfónico hidratado en NaHCO₃ 0.1 mol L⁻¹ (Aldrich, $\Phi_{\text{em}} = 0.36$).

^cDeterminados mediante la técnica TC-SPC en disolución desoxigenada mediante desplazamiento con argón (30 min).

Los rendimientos cuánticos de emisión calculados para ambas especies (ver tabla 16) son inferiores a los encontrados para las β -lactamas marcadas con el fluorógeno de tipo pireno como corresponde a las diferencias entre ambos marcadores. Por otro lado, los tiempos de vida observados, entorno a 22 ns, son los habituales para el fluoróforo aislado en diferentes disolventes orgánicos.

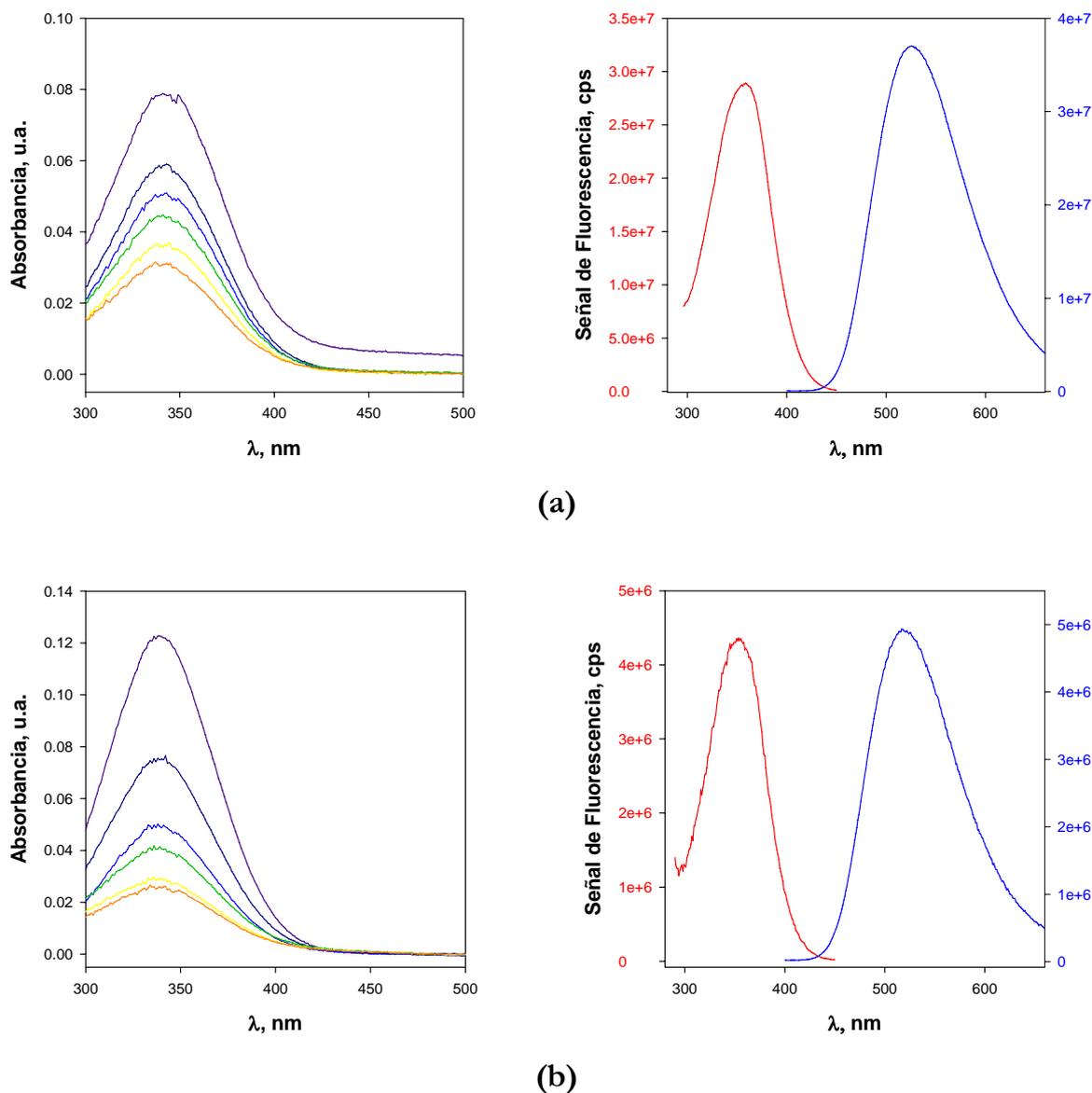


Figura 24. Espectros de absorción ($5.0 - 28 \mu\text{mol L}^{-1}$) y espectros de fluorescencia ($-$ excitación; $-$ emisión) ($31 - 57 \mu\text{mol L}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$: (a) DAP ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$), (b) DAM ($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$). Espectros de emisión sin corregir por la respuesta instrumental. Las medidas de absorción se realizaron en acetonitrilo y las de fluorescencia en CH_2Cl_2 y equilibrada al aire.

En los espectros que se muestran en la figura 24, se observa la banda de emisión de fluorescencia en la región del verde del espectro electromagnético con un único máximo de luminiscencia a 527 nm y 522 nm para el DAP y DAM, respectivamente. También se aprecia el importante desplazamiento de Stokes obtenido para los derivados β -lactámicos dansilados (ca. 180 nm). Este fenómeno es consecuencia de la formación de un estado excitado de transferencia de carga

fuertemente polar, seguida de la rápida reorientación de los dipolos del disolvente previa a la desactivación radiativa del mismo.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PENICILINA MARCADA PAAP Y FACTORES QUE AFECTAN A SU FLUORESCENCIA

Además del efecto de la estructura molecular, las propiedades luminiscentes del marcador pueden verse afectadas de forma significativa por las características del medio.

Los efectos de distintos parámetros tales como la temperatura, el disolvente o la concentración de oxígeno, sobre el ácido *[2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico* (**PAAP**) se describen a continuación. Su conocimiento es esencial para llevar a cabo con éxito el desarrollo de la metodología analítica basada en dicha sonda fluorescente.

4.4.1. EFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO EN LA FLUORESCENCIA DEL PAAP

Como ya indicamos anteriormente, la fluorescencia de los compuestos basados en estructuras de tipo pireno es desactivada eficazmente por el oxígeno molecular como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del mismo, que provocan cruzamientos entre sistemas y conversiones de las moléculas excitadas al estado triplete [45].

Los procesos de desactivación pueden dividirse en dos grandes grupos: **desactivación dinámica** o **difusional** y **desactivación estática** de la luminiscencia [46,47].

En la desactivación dinámica, la interacción entre el analito y el luminóforo se produce durante el tiempo de vida del estado excitado del mismo. La eficacia del proceso de desactivación dependerá, por tanto, del tiempo de vida del estado excitado

de la especie emisora y de la concentración de desactivador, de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer [48]:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

Esta ecuación puede expresarse en función de los rendimientos cuánticos de emisión Φ_0 y Φ en ausencia y en presencia del desactivador, respectivamente, en función de los tiempos de vida del estado excitado, τ_0 y τ , si la forma de la banda de emisión permanece constante, en función de la intensidad de emisión en las condiciones, I_0 e I . En esta ecuación $[Q]$ representa la concentración de desactivador (oxígeno) y K_{sv} es la denominada constante de Stern-Volmer, que es igual al producto de la **constante de desactivación bimolecular difusional**, k_q , por el tiempo de vida del indicador en ausencia del desactivador, τ_0 . El valor de la k_q depende de la naturaleza y viscosidad del disolvente, de la temperatura y del tipo de luminóforo y desactivador.

La **desactivación estática** de la luminiscencia de un fluoróforo se produce cuando éste, en su estado fundamental, interacciona con el analito (O_2), que generalmente no es luminiscente o, si lo es, presenta unas características de emisión sensiblemente diferentes a las del luminóforo libre.

Si el complejo fluoróforo-analito no es luminiscente la intensidad de luminiscencia medida dependerá de la concentración de desactivador y de la constante de formación del complejo entre éste y el luminóforo en su estado fundamental (K_A), según se muestra en la ecuación 3 [49]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_A[Q] \quad (3)$$

donde $[Q]$ es la concentración del desactivador. Al no producirse interacción dinámica entre el analito y el indicador en el estado excitado, al contrario de lo que sucede en la desactivación difusional, el tiempo de vida de emisión de este último no varía. Es decir, la excitación del complejo indicador/analito y su posterior desactivación es

instantánea, con lo cual no entra en competencia con las otras posibles vías de desactivación.

En muchos casos, la desactivación de la emisión del luminóforo por el oxígeno disuelto se produce simultáneamente, mediante un mecanismo de desactivación estático y dinámico de la luminiscencia. El resultado es una relación no lineal entre el cociente de las intensidades relativas, en ausencia de desactivador y la concentración del mismo.

Para determinar el efecto del oxígeno disuelto sobre la intensidad de fluorescencia del PAAP, es necesario un conocimiento exacto de la temperatura del medio así como del tipo de disolvente empleado.

4.4.1.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA DEL MEDIO

La temperatura de la disolución que contiene la muestra va a influir tanto en la *concentración* de oxígeno en el entorno del derivado fluorescente, para un porcentaje dado del gas en equilibrio con la disolución, como en la *difusión* del gas en el medio acuoso.

La solubilidad del oxígeno en agua, para una fuerza iónica dada, disminuye con el aumento de la temperatura $S = S_0 e^{0.3/RT}$ [50], sin embargo el coeficiente de difusión en el mismo medio aumenta con ella $D = D_0 e^{-9.0/RT}$ [50].

Afortunadamente, tanto la solubilidad como la difusión del oxígeno en agua, dentro del intervalo de temperaturas ensayado, se conoce perfectamente y está ampliamente documentado en la bibliografía consultada (ver tabla 17).

Con el fin de evaluar el efecto global de la temperatura sobre la fluorescencia del PAAP, se realizaron medidas de emisión del compuesto a distintas concentraciones de oxígeno disuelto en disolución reguladora (HCl/Gly 0.1 mol L⁻¹, pH 2.0), a diferentes temperaturas, en el intervalo de 6 a 35 °C.

Tabla 17. Coeficiente de difusión y concentración de oxígeno disuelto en agua en función de la temperatura del medio [48].

T, °C	^a D 10 ⁵ , cm ² s ⁻¹	^b [O ₂], mg L ⁻¹ (0.21 atm O ₂)
6	-	10.50
10	-	9.63
15	-	8.63
20	1.97	7.80
25	2.50	7.10
30	-	6.47
40	3.24	-

^aCoeficiente de difusión en agua del oxígeno molecular a 1 atm de presión parcial.

^bObtenido a partir de una disolución acuosa de fuerza iónica (en [Cl], mg L⁻¹) igual a la de la disolución reguladora Gly/HCl 0.1 mol L⁻¹.

Como puede observarse en la figura 25, la emisión de la sonda disminuye notablemente según asciende la temperatura, siendo este efecto más acusado al aumentar la concentración de oxígeno disuelto.

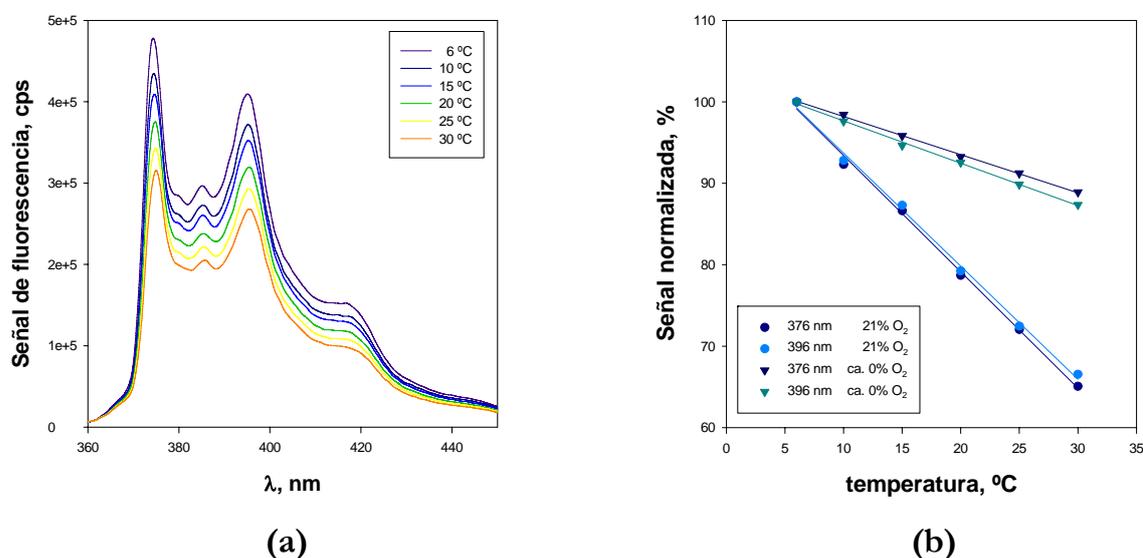


Figura 25. (a) Espectros de emisión del PAAP en función de la temperatura (6.0 – 30.0 °C, ± 0.2 °C). Las medidas se realizaron con disoluciones aireadas de Gly/HCl 0.1 mol L⁻¹, pH 2.0; (b) Variación de la intensidad de fluorescencia (señal normalizada) con la temperatura para las longitudes de onda de emisión 376 nm y 396 nm.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la desactivación del PAAP al aumentar la temperatura no puede atribuirse exclusivamente al incremento en la

constante de difusión del oxígeno, dado que dicho aumento se compensa con la disminución de la solubilidad del mismo.

Por lo tanto, el aumento de la constante de desactivación (k_q) debe ser un factor predominante a tener en cuenta en la disminución de la sensibilidad observada con la temperatura [51].

Por todo ello será necesario conocer y controlar el efecto de este parámetro para el desarrollo de ensayos analíticos basados en la utilización de PAAP.

4.4.1.2. EFECTO DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE

El efecto de la naturaleza del disolvente sobre la emisión del PAAP se ha llevado a cabo mediante medidas de intensidad de emisión para cinco mezclas acetonitrilo-agua en distintas proporciones. En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos empleando PAAP 101 nmol L^{-1} . Las medidas se han obtenido irradiando a 342 nm y manteniendo la temperatura constante a $25.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$.

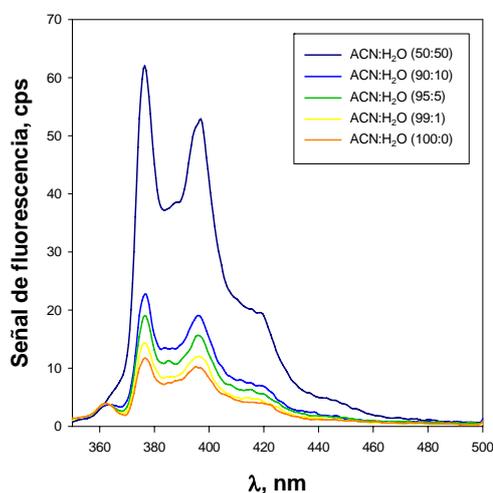


Figura 26. Espectros de emisión del PAAP en función de la naturaleza del disolvente (PAAP 101 nmol L^{-1}). $\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$, R/R 5/5 y $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Disoluciones equilibradas al aire.

Como podemos observar, la desactivación de la penicilina fluorescente, mediante el oxígeno molecular, es mayor a medida que aumenta la proporción de acetonitrilo en la mezcla hidroorgánica.

Experimentos realizados en ausencia de oxígeno demostraron que este efecto viene determinado por la presencia de cantidades variables del gas en cada uno de los disolventes ensayados. Como se describe en la bibliografía consultada (ver tabla 18) [52,53], la concentración de oxígeno disuelto en acetonitrilo es prácticamente un orden de magnitud mayor que en medio acuoso.

En este sentido, los resultados obtenidos indican que al aumentar la cantidad de acetonitrilo en el medio, aumenta la concentración de desactivante en el entorno del fluoróforo, favoreciendo la atenuación, por parte del O₂, de la luminiscencia del PAAP. Este efecto tiene una importancia notable para el desarrollo de los ensayos competitivos empleando anticuerpos o MIPs como elementos de reconocimiento selectivos.

Tabla 18. Concentración de oxígeno disuelto en función del disolvente y de la temperatura del medio [54].

Disolvente	T, °C	[O ₂] 10 ³ , mol L ⁻¹ (0.21 atm O ₂) ^a	[O ₂] 10 ³ , mol L ⁻¹ (1 atm O ₂) ^b
Acetonitrilo	24	9.1 ^c	1.9 ^c
Agua	20	1.39	0.29
	25	1.27	0.27

^aValores para 0.21 atm de presión parcial de O₂ calculadas a partir de b, asumiendo que se cumple la ley de Henry.

^bValores procedentes de datos evaluados por Riddick y col. [55]. Los experimentos se realizaron a una atmósfera de presión parcial de O₂.

^c[56].

4.4.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PAAP MEDIANTE HPLC

La estabilidad térmica del derivado fluorescente se ha determinado mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector fluorescente (FLD). Con este propósito, el procedimiento cromatográfico fue optimizado de modo que proporcionara información sobre la estabilidad temporal de la sonda PAAP con el objeto de establecer sus condiciones de almacenamiento óptimas.

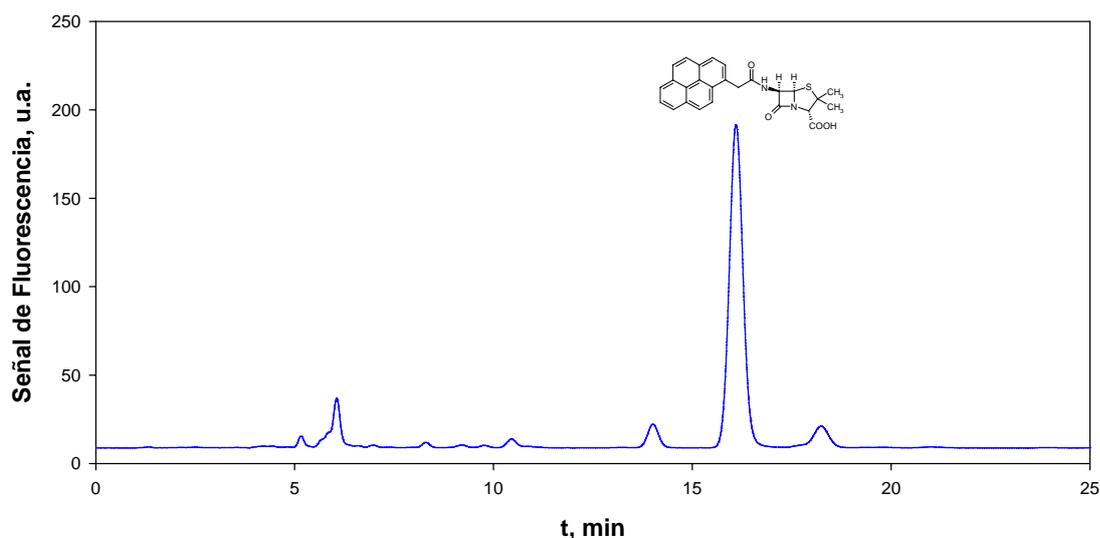


Figura 27. Cromatograma correspondiente a una disolución de PAAP $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ en acetonitrilo-agua (99:1, v/v). Las condiciones cromatográficas se describen en el apartado 3.3.4. de este Capítulo.

Se realizaron estudios de estabilidad a largo plazo de disoluciones de PAAP más concentradas y almacenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en disolución de acetonitrilo y atmósfera inerte (N_2). Los resultados que se muestran en la figura 28 demuestran la alta estabilidad de la disolución de PAAP (1.5 mmol L^{-1}) para un tiempo de conservación superior a los 9 meses.

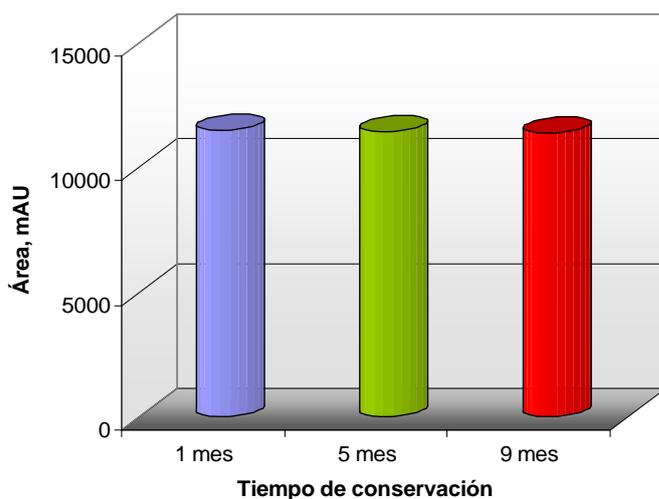


Figura 28. Estabilidad de la sonda PAAP 1.5 mmol L^{-1} almacenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera inerte (N_2) en función del área del pico cromatográfico registrado. Las condiciones cromatográficas se describen en el apartado 3.3.4. de este Capítulo.

4.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DERIVADOS DE PENICILINAS FLUORESCENTES

El objetivo de estos ensayos era confirmar la actividad antibacteriana de las β -lactamas fluorescentes sintetizadas, empleando ensayos de susceptibilidad “*in vitro*” de microorganismos patógenos a antimicrobianos (*Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* BGA y *Staphylococcus aureus*).

La evaluación de la actividad antibacteriana de las penicilinas fluorescentes se ha efectuado mediante la técnica de difusión en agar, en medio TSA (agar triptona soja) según el procedimiento descrito en el apartado 3.5. de la Parte Experimental. Los compuestos β -lactámicos fluorescentes estudiados se han agrupado en tres categorías según su semejanza con tres antibióticos de estructura química análoga: penicilina G, ampicilina y amoxicilina.

Tabla 19. Sensibilidad medida en mm de halo de inhibición del crecimiento de las cepas *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* BGA y *S. aureus*. Discos impregnados en disoluciones de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de los compuestos fluorescentes y penicilinas de referencia.

Grupo	Analito	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>B. subtilis</i> BGA	<i>S. aureus</i>
1	PENG	37 mm	27 mm	15 mm
	PAAP	33 mm	22 mm	trazas
	PBAP	25 mm	13 mm	trazas
	DAP	15 mm	13 mm	sin halo
2	AMPI	40 mm	20 mm	sin halo
	PAAM	23 mm	10 mm	sin halo
	PBAM	20 mm	10 mm	sin halo
	DAM	25 mm	15 mm	sin halo
3	AMOX	40 mm	20 mm	trazas
	PAAX	26 mm	trazas	sin halo
Blanco	PAA	sin halo	sin halo	sin halo

Abreviaturas: PAA: ácido pirenoacético

Los resultados obtenidos, tras 24 h de incubación a 37 °C, indican la aparición de zonas de inhibición del crecimiento de los microorganismos alrededor de las muestras. En la tabla 19 se presenta la sensibilidad medida en mm de halo de inhibición del crecimiento bacteriano para cada uno de los compuestos ensayados. Se considera que el resultado es positivo cuando la zona de inhibición (desde el borde de

la muestra hasta el borde del halo de inhibición) tiene, al menos, 2 mm de anchura [27].

La obtención de una inhibición positiva, tanto en la cepa *M. luteus* como en la *B. subtilis*, demuestran el **carácter antibiótico de todas las penicilinas fluorescentes estudiadas**.

Este resultado se confirmó comparando los perfiles de actividad con los obtenidos empleando los antibióticos patrón [57], siendo especialmente significativo el resultado obtenido usando la cepa *M. luteus*, microorganismo idóneo para la detección de antibióticos β -lactámicos. Además, el resultado logrado con el **PAAP**, que da lugar a halos de inhibición de un tamaño similar a la PENG en las cepas *M. luteus* ATCC 9341 y *B. subtilis* BGA, indica el fuerte carácter inhibidor de este compuesto.

Finalmente, los ensayos de actividad antimicrobiana del ácido pirenoacético, que contiene el grupo pireno responsable de la fluorescencia en las moléculas de PAAP, PAAM y PAAX, demostraron la resistencia (ausencia del halo de inhibición) de las tres cepas evaluadas a este compuesto. Este efecto implica que las penicilinas fluorescentes inhiben el crecimiento bacteriano debido a la presencia del anillo penicilánico en su estructura (ver Capítulo I, apartado 2.1.2.).

- Se han sintetizado siete análogos fluorescentes de las penicilinas que contienen entidades fluorogénicas pireno o dansilo para ensayos de tipo competitivo empleando anticuerpos o polímeros de impronta molecular (MIPs), así como para explorar las características nanoestructurales de los materiales de reconocimiento molecular. Los siete nuevos análogos se han caracterizado mediante espectroscopía de absorción y de emisión, en estado estacionario y con resolución temporal.
- El estudio de las características fotofísicas del PAAP ha permitido vincular las propiedades de la molécula (máximo de absorción y de emisión, rendimiento cuántico de emisión y tiempo de vida del estado excitado) con información acerca del entorno de la misma.
- Las pruebas microbiológicas realizadas a las penicilinas fluorescentes de nueva síntesis indican la existencia de un comportamiento inhibitorio del crecimiento bacteriano para todas ellas, lo que demuestra su carácter antibiótico.

- [1] D. Hawcroft, T. Hector, F. Rowell, “*Technical Details of Some Labelled Binding Assays*”, en A. M. James (ed.), *Quantitative Bioassay*, John Wiley & Sons, Londres (Reino Unido), **1988**.
- [2] Z.L. Chang, en K. Florey (ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, New York (EE.UU), **1988**.
- [3] H.Y. Chen, *Patente* US 4740459.
- [4] H.Y. Chen, *Patente* WO 8903889.
- [5] R.Y. Tsien, G. Zlokarnik, *Patente* WO 9630540.
- [6] M.E. Rogers, M.W. Adlard, G. Saunders, G. Holt, *J. Chromatogr.* **1984**, 297, 385.
- [7] M.B. Medina, *ACS Symp. Ser.* **1996**, 636, 132.
- [8] R.P. Haughland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9ª edición, Molecular Probes, Eugene, OR, **2004**.
- [9] A.P. de Silva, J. Eilers, G. Zlokarnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 8336.
- [10] B. Lakaye., C. Damblon, M. Jamin, M. Galleni, S. Lepage, B. Joris, J. Marchand-Brynaert, C. Frydrych, J.M. Frère, *Biochem. J.* **1994**, 300, 141.
- [11] M. Galleni, B. Lakaye, S. Lepage, M. Jamin, I. Thamm, B. Joris, J.M. Frère, *Biochem. J.* **1993**, 291, 19.
- [12] Å. Sternesjö, G. Johnsson, *J. Food Prot.* **1998**, 61, 808.
- [13] H. Nakagawa, K. Nishiyama, T. Higashitani, S. Ishikawa, Y. Fukui, *Yakugaku Zasshi* **1985**, 105, 1096.
- [14] J.E. Sinsheimer, D.D. Hong, J.H. Burckhalter, *J. Pharm. Sci.* **1969**, 58, 1041.

- [15] P. Liang, L. Dong, M.T. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9198.
- [16] www.probes.com (Abril 2005).
- [17] Y. Morikawa, M. Kitazato, J. Mitsuyama, S. Mizunaga, S. Minami, Y. Watanabe *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1229.
- [18] J.Y. Cha, A. Ishiwata, S. Mobashery, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 14917.
- [19] K.R. Gee, H.C. Kang, T.I. Meier, G. Zhao, L.C. Blaszczak, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 960.
- [20] G. Zhao, T. I. Meier, S.D. Kahl, K.R. Gee, L.C. Blaszczak, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1124.
- [21] G. Orellana Moraleda, S. Aparicio Lara, M.C. Moreno Bondi, E. Benito Peña, *Patente ES 2197811*.
- [22] S.W. Zinder, J.N. Demas, B.A. DeGraff, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2704.
- [23] C.A. Parker, W.T. Rees, *Analyst* **1960**, *85*, 587.
- [24] D.S. Karpovich, G.J. Blanchard, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3951.
- [25] C.M. Himel, R.T. Mayer, *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 130.
- [26] R. Bogaerts, F. Wolf, *Fleischwirtschaft* **1980**, *60*, 672.
- [27] M.R. Pascual Anderson, V. Calderón y Pascual, *Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*, 2ª edición, Díaz de Santos, Madrid (España), **2000**.
- [28] A. Katz, M.E. Davis, *Nature* **2000**, *403*, 286.
- [29] M. Marek, K. Kaiser, H.J. Gruber, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 560.
- [30] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Medium*, Academic Press, New York (EE.UU), **1989**.
- [31] J. Martins, E. Melo, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 832.
- [32] K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039.
- [33] D.S. Karpovich, G.J. Blanchard, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3951.
- [34] N.G. Walter, J.M. Burke, *Method Enzymol.* **2000**, *317*, 409.
- [35] K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, H. Nakano, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1266.
- [36] D.W. Lübbers, *Adv. Biosens.* **1992**, *2*, 215.
- [37] A. Torrado, G.K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 609.

- [38] C. Maraschiello, E. Miranda, E. Millan, P. Floriano, J. Vilageliu, *J. Chromatogr. B* **2003**, *791*, 1.
- [39] R. Bartzatt, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488*, 203.
- [40] H. Li, W. Luo, J. Lin, Z. Lin, Y. Zhang, *J. Chromatogr. B* **2004**, *810*, 277.
- [41] M. Linetsky, J.M. W. Hill, R.D. LeGrand, F. Hu, *Exp. Eye Res.* **2004**, *79*, 499.
- [42] S. Moret, D. Smela, T. Populin, L.S. Conte, *Food Chem.* **2005**, *89*, 355.
- [43] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios De Análisis Instrumental*, McGraw-Hill; Madrid (España), **2000**.
- [44] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis, Madrid (España), **1997**.
- [45] M. Danko, P. Hrdlovič, E. Borsig, *European Polymer Journal* **2003**, *39*, 2175
- [46] A. Sharma, S.G. Schulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Wiley, New York (EE.UU.), 1999.
- [47] Y. Fujiwara, I. Okura, T. Miyashita, Y. Amao, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *471*, 25.
- [48] O. Stern, M. Volmer, *Phys. Z.* **1919**, *20*, 183.
- [49] J.N. Demas, *Excited Stated Lifetime Measurements*, Academic Press (EE.UU.), **1983**.
- [50] J. Brandrup, E.H. Immergut, *Polymer Handbook*, 3ª edición, Wiley, New York (EE.UU.), **1999**, VI-444.
- [51] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, (1ª edición estudiante), R. C. Weast (ed.), CRS Press, BocaRaton, Florida (EE.UU.), **1988**, D-196.
- [52] A.N. Reshetilov, P.V. Iliasov, A.V. Slepkin, G.M. Grechkina, I.I. Starovoitov, *Anal. Lett.* **1999**, *32*, 11.
- [53] R. Nandakumar, B. Mattiasson, *Anal. Lett.* **1999**, *32*, 2379.
- [54] S.L. Murov, I. Carmichael, G.L. Hug, *Handbook of Photochemistry Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, Inc., New York (EE.UU.) **1993**.
- [55] J.A. Riddick, W.B. Annger, T.K. Sakano, "Organic solvents: Physical Properties and Methods of Purification" en *Techniques of chemistry*, vol. 2, 4ª edición, John Wiley & Sons, New York (Reino Unido), **1986**.
- [56] W.D.K. Clark, C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6347.
- [57] V. Calderón, J. González, P. Díez, J.A. Berenguer, *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 1.

IV.

**DESARROLLO DE UN FLUOROENSAYO
COMPETITIVO EMPLEANDO POLÍMEROS DE
IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) COMO ELEMENTOS
DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS**

IV. DESARROLLO DE UN FLUOROENSAYO BASADO EN EL EMPLEO DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

1. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) COMO MATERIALES DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO

1.1. PRINCIPIOS GENERALES

- 1.1.1. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA COVALENTE
- 1.1.2. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA NO COVALENTE
 - 1.1.2.1. Factores que influyen en las propiedades de reconocimiento de los MIPs
- 1.1.3. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA SEMICOVALENTE
- 1.1.4. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE ESPACIADORES SACRIFICABLES
- 1.1.5. NUEVAS TECNOLOGÍAS

1.2. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

- 1.2.1. SÍNTESIS DE PARTÍCULAS GRANULARES: Polimerización en bloque
- 1.2.2. SÍNTESIS DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS
 - 1.2.2.1. Polimerización mediante dispersión-precipitación
 - 1.2.2.2. Polimerización mediante suspensión-emulsión
 - 1.2.2.3. Polimerización mediante hinchamiento multipasos
- 1.2.3. MATERIALES COMPUESTOS
 - 1.2.3.1. Obtención de polímeros de impronta molecular a partir de silica-MIP
 - 1.2.3.2. Obtención de polímeros de impronta molecular a partir de técnicas de injerto
- 1.2.4. PREPARACIÓN DE MONOLITOS MEDIANTE POLIMERIZACIÓN "in situ"

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

- 1.3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA
- 1.3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
- 1.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICA: ISOTERMA DE ADSORCIÓN

1.4. APLICACIONES DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

- 1.4.1. APLICACIONES EN SÍNTESIS Y CATÁLISIS
- 1.4.2. APLICACIONES EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN
 - 1.4.2.1. Cromatografía
 - 1.4.2.2. Extracción en fase sólida (SPE)
 - 1.4.2.3. Electro cromatografía capilar (CEC)
- 1.4.3. SENSORES
 - 1.4.3.1. Sensores de adsorción
 - 1.4.3.2. Sensores receptores
 - 1.4.3.3. Sensores enzimo-miméticos

1.5. DESARROLLO DE ENSAYOS EMPLEANDO POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (“Molecularly imprinted assay”, MIA)

- 1.5.1. RADIOENSAYOS
- 1.5.2. ENSAYOS BASADOS EN MARCADORES NO-RADIACTIVOS

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- 3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS
- 3.1.2. DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS
- 3.1.3. REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR
- 3.1.4. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES
- 3.1.5. DISOLUCIONES

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- 3.2.1. SISTEMA DE CONTROL Y MANEJO DE FLUIDOS
- 3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS
- 3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

3.3. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y MEDIDA

- 3.3.1. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR
 - 3.3.1.1. Extracción de la molécula plantilla
- 3.3.2. SISTEMA DE MEDIDA EN FLUJO (FI)
- 3.3.3. SISTEMA OPTOSENSOR
- 3.3.4. PROTOCOLO DE ENSAYO DEL MIA

3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

- 3.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G EN UN PREPARADO FARMACOLÓGICO

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE UNA LIBRERÍA DE MIPs SELECTIVOS A PENG

4.2. EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS MIPs POR LOS DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES

4.3. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR MIP1

4.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

4.3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE POROSIMETRÍA DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DE NITRÓGENO

4.3.2.1. Determinación del área superficial: aplicación del método BET y representación "t-plot"

4.3.2.2. Evaluación de la mesoporosidad

4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICA DEL MIP1 PARA EL PAAP

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO

4.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS DEL SISTEMA EN FLUJO

4.4.1.1. Efecto del caudal de la disolución portadora

4.4.1.2. Efecto del volumen de inyección de muestra

4.4.2. INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN DE UNIÓN SOBRE LA RESPUESTA DEL ENSAYO

4.4.3. ENSAYO COMPETITIVO VS ENSAYO POR DESPLAZAMIENTO

4.4.4. TIEMPO DE INCUBACIÓN

4.4.5. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PAAP Y MIP1

4.4.5.1. Optimización de la concentración de polímero

4.4.5.2. Optimización de la concentración de penicilina fluorescente

4.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL FLUOROENSAYO COMPETITIVO BASADO EN MIPs

4.5.1. CALIBRACIÓN DEL MIA

4.5.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

4.5.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA

4.5.3.1. Reproducibilidad entre lotes de fabricación del MIP1

4.5.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TEMPORAL DEL MIP1

4.6. APLICACIÓN DEL MIA A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES

4.6.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G EN UN PREPARADO FARMACOLÓGICO

4.7. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR EMPLEANDO MIPs COMO ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) COMO MATERIALES DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO

1

Los **polímeros de impronta molecular (MIPs)** son matrices sintetizadas artificialmente que presentan propiedades de reconocimiento molecular específico hacia determinados compuestos.

Hemos traducido el término inglés “*molecularly imprinted polymers*” por “*polímeros de impronta molecular*” (imprint = huella, impronta), que respeta el acrónimo original. El término impronta se utiliza en Paleontología de forma habitual [1] para referirse a la huella que produce la inclusión de un organismo en un sedimento antes de su desintegración, dando lugar a un fósil. Podríamos considerar que este proceso natural presenta cierta analogía a la técnica sintética que aquí se presenta (figura 29).

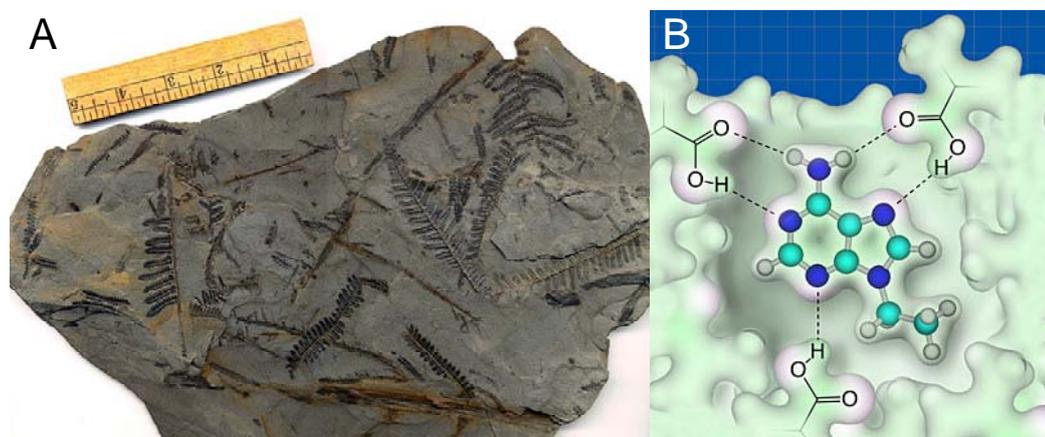


Figura 29. (A) Fósil en donde se aprecia la impronta dejada por hojas de *pecopteris aborescens*. (B) Huella de una molécula plantilla en un polímero de impronta molecular (MIP).

Los MIPs son **materiales biomiméticos** que reproducen, de un modo más básico, el mecanismo de reconocimiento de algunos sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo).

Estos polímeros con “memoria selectiva” cuentan con una serie de características de gran interés dentro del campo de la Química Analítica. Su elevado potencial, como sustitutos de compuestos bioquímicos, se ha materializado en el desarrollo de nuevos métodos analíticos que incorporan MIPs como elementos de reconocimiento en sensores [2,3], como sorbentes en procesos de extracción en fase sólida (SPE) [4,5] y fases estacionarias en HPLC y CE [6-8].

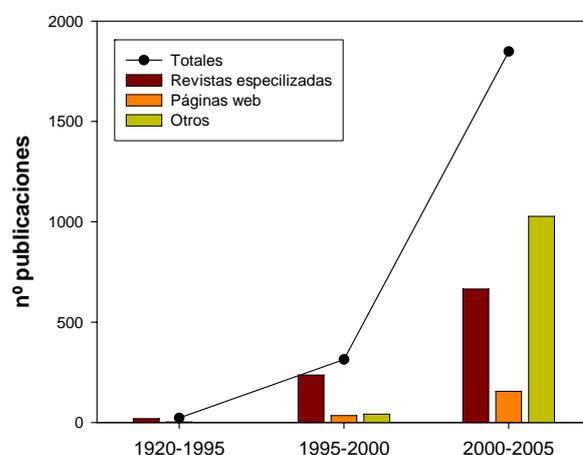


Figura 30. Progresión en el desarrollo y aplicación de polímeros de impronta molecular (MIPs) [9].

En los últimos años, esta tecnología ha experimentado un avance espectacular. Así lo demuestra el número de artículos, basados en el empleo de MIPs, que se publican actualmente (Figura 30) y la reciente comercialización de estos materiales (tabla 20) [8].

Tabla 20. Polímeros de impronta molecular (MIPs) disponibles comercialmente [10].

	Aplicación 1	Aplicación 2	Aplicación 3	Aplicación 4	Aplicación 5
CAMPO DE APLICACIÓN	Extracción en fase sólida (SPE)	HPLC	Síntesis y caracterización de MIPs	Sensores para detección y diagnóstico	Impronta de proteínas (Arrays)
NOMBRE COMERCIAL	MIP4SPE	MIP4LC	-	-	PMI technology
COMPAÑÍA ASOCIADA	MIP Technologies www.miptechnologies.se	MIP Technologies	Oxonon www.oxonon.net	Semorex www.semorex.com	Aspira Biosystems www.aspirabio.com

Abreviaturas: PMI: *Impronta molecular parcial*, del inglés “*Partial molecular imprinting*”.

1.1. PRINCIPIOS GENERALES

Como ya indicamos anteriormente, los polímeros de impronta molecular son matrices sintéticas que se comportan como receptores biomiméticos artificiales capaces de reconocer e interactuar de forma específica con el analito para el cual han sido sintetizados.

Se basan en la formación de una estructura polimérica, altamente entrecruzada, alrededor de una molécula que actúa como plantilla (del inglés, “*template*”) que se extrae después de la polimerización. De esta forma, se originan cavidades en la estructura del MIP, complementarias en forma y tamaño a la molécula plantilla, que son capaces de reconocerla posteriormente de forma selectiva (Figura 31).

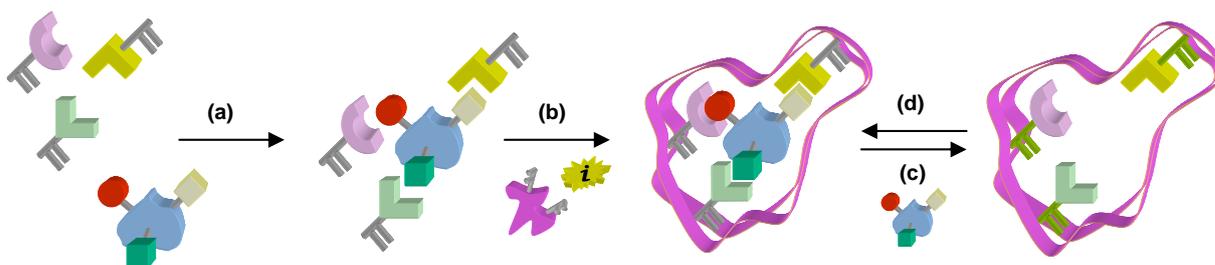


Figura 31. Esquema de la preparación de MIPs. (a) Formación del complejo de prepolimerización entre la molécula plantilla y los monómeros funcionalizados. (b) Co-polimerización con un exceso de monómero entrecruzante. (c) Extracción de la plantilla de la cavidad. (d) Unión de la plantilla a la cavidad.

Las **ventajas** que presentan los MIPs como elementos de reconocimiento son las siguientes:

- *Sensibilidad y selectividad* adecuadas.
- Posibilidad de desarrollar MIPs frente a muy diversos analitos, incluyendo especies para las que aún no se ha encontrado un elemento de reconocimiento biológico.
- *Especificidad predecible* teóricamente aunque, en la práctica, la existencia de interacciones de carácter no específico hace difícil su determinación.
- Producción con un *bajo coste a gran escala*.

- Tiempo de vida largo: *estabilidad química, térmica y mecánica* altas frente a diferentes condiciones de pH, temperatura y presencia de disolventes orgánicos.

Sin embargo, también existen **limitaciones** asociadas al uso de MIPs [11]:

- Tecnología en desarrollo en muchos campos de la Química: por ejemplo, existen muy pocas aplicaciones basadas en impronta de material biológico macromolecular.
- En general, las constantes de afinidad son bajas, es decir, que la tendencia del analito y del MIP a unirse es pequeña. Esto implica una cinética de unión más lenta.
- Requiere altas concentraciones de molécula plantilla.
- En ocasiones, el procedimiento de síntesis de los MIPs conlleva múltiples etapas. Además hay pérdidas de material útil y se obtienen redes con una distribución poco homogénea de los sitios de unión.

En la tabla 21 se muestra, a modo de resumen, una comparativa de las principales características de los MIPs y los anticuerpos, receptores naturales de amplio uso en Química Analítica.

Tabla 21. Comparación de las características de los polímeros de impronta molecular (MIPs) y de los anticuerpos.

		MIPs		Anticuerpos	
HOMOGENEIDAD DE LOS SITIOS DE UNIÓN		✗	La mayoría poseen alta heterogeneidad	✓	El uso de anticuerpos monoclonales origina ensayos muy selectivos
PREPARACIÓN		✓	Simple y fácil de preparar	✗	Alta dificultad en su producción y manejo
AFINIDAD		✗	Las condiciones de polimerización comprometen su afinidad 10^3 a 10^9 L mol ⁻¹	✓	Alta afinidad. $5 \cdot 10^4$ a 10^{12} L mol ⁻¹
COSTE		✓	Económico	↔	Biosíntesis de coste elevado pero amortizable
ESTABILIDAD		✓	Robusto, resistente en un amplio intervalo de pH, humedad y temperatura.	✗	Inestable en condiciones muy extremas: tiempo de vida limitado
SELECTIVIDAD		↔	Medio-alta	✓	Alta
DISOLVENTE	MEDIO ACUOSO	↔	Limitada compatibilidad con agua	✓	Comportamiento excelente en medios acuosos
	MEDIO ORGÁNICO	✓	Comportamiento excelente	✗	Incompatibilidad: Desnaturalización del anticuerpo

Se han empleado cuatro procedimientos generales para la preparación de los MIPs que se diferencian en el modo en el que se fija la posición de los grupos funcionales del polímero a fin de que el reconocimiento sea óptimo: **método de impronta covalente** (método “preorganizado”), **método semicovalente**, **método de impronta no covalente** (aproximación al “autoensamblado”) y el **método de impronta mediante ‘espaciadores sacrificables’**.

1.1.1. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA COVALENTE

Este modelo surgió en el año 1972 cuando Wulff y col. [12,13] presentaron los primeros ejemplos de impronta molecular con polímeros orgánicos sintéticos.

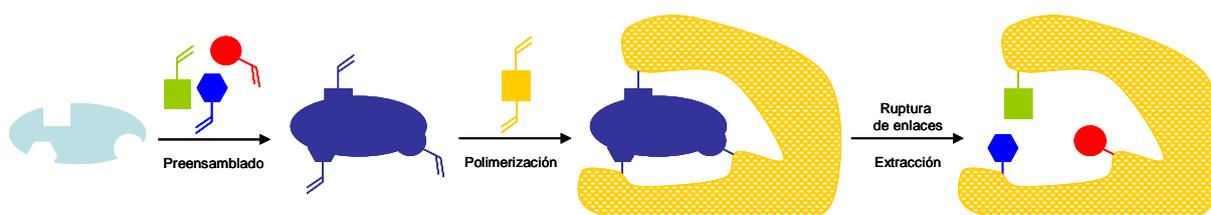


Figura 32. Esquema de la preparación de MIPs de impronta covalente.

La **impronta covalente** (figura 32) implica la síntesis de un conjugado de la molécula plantilla y el monómero funcionalizado unidos por un enlace covalente “reversible”. Por ejemplo: *éster borónico* para la impronta de galactosa y fructosa [13], nucleótidos [14], L-DOPA [15], etc; *base de Schiff* en la síntesis de MIPs enantioselectivos para aminoácidos [15,16] o un *enlace acetal* para la formación de polímeros de plantillas basadas en mono- y diacetona [17,18] o monoalcoholes [19] (figura 33).

Una vez obtenido el derivado polimerizable de la plantilla, se adiciona un agente entrecruzante formándose una red tridimensional. Finalmente, la extracción de la plantilla del MIP mediante medios químicos (hidrólisis ácida/básica), permite obtener una estructura tridimensional con los grupos funcionales dispuestos en la posición adecuada.

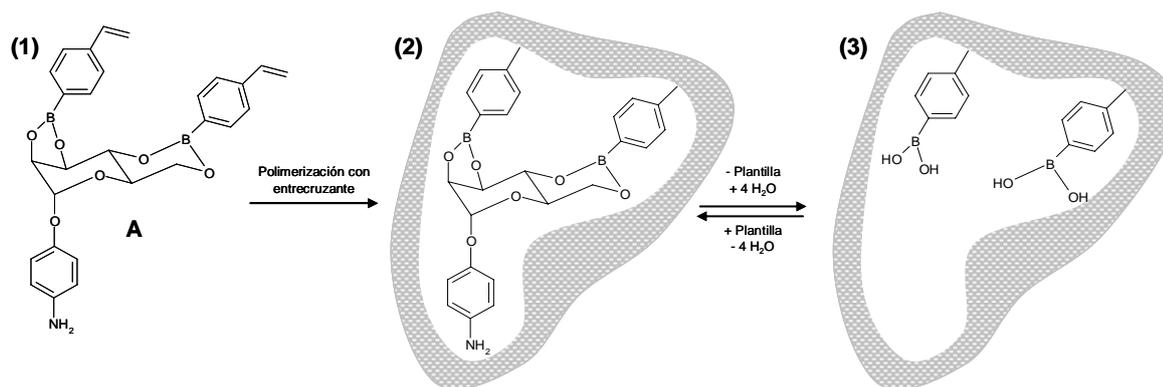


Figura 33. Impronta covalente de la molécula plantilla 4-nitrofenil- α -D-manopiranosido-2,3:4,6-di-O-(4-vinilfenilboronato) (A). Se prepara mediante condensación del ácido 4-vinilbenzenoborónico con 4-nitrofenil- α -D-manopiranosido (1) que se copolimeriza con el entrecruzante (divinilbenzeno o etilenglicol dimetacrilato) para dar lugar al polímero (2). La eliminación de la plantilla implica la hidrólisis de los grupos éster del boronato y la adición de 4 equivalentes de agua (3). La posterior unión de la molécula molde al polímero es reversible y lo suficientemente rápida como para poder ser usado como fase estacionaria en cromatografía líquida [20].

Los MIPs obtenidos de este modo se caracterizan por poseer unos centros activos muy homogéneos (muy similares entre sí) y, gracias a la adición estequiométrica de los monómeros funcionales, un porcentaje de unión no específica muy pequeño.

La mayor limitación de este método de síntesis viene determinada por la necesidad de preparación previa de un conjugado plantilla-monómero, la ruptura química de la plantilla del polímero y la lenta cinética de unión.

1.1.2. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA NO COVALENTE

A diferencia de la impronta covalente, en este modelo el complejo formado entre la plantilla y el monómero funcional no se realiza a través de enlaces covalentes, sino que se forma mediante interacciones moleculares de carácter débil.

Los primeros trabajos basados en este modelo de polimerización fueron descritos por Mosbach y col. [18,21] en los que se sintetizaron geles de poliacrilamida selectivos a varios indicadores (eg. Saffranina, azul de rodanilo) y alcaloides. El monómero utilizado mayoritariamente fue ácido metacrílico (MAA) y, en algunas ocasiones, el monómero *N,N'*-dietilaminoetilmetacrilato (DEAEM). Los

entrecruzantes utilizados fueron mezclas de N,N' -metilenbisacrilamida (MDAA) y N,N' -1,4-fenilenbisacrilamida y el disolvente, también llamado porógeno, una mezcla de DMF-agua. La capacidad de reconocimiento de los geles resultantes se evaluó mediante métodos cromatográficos.

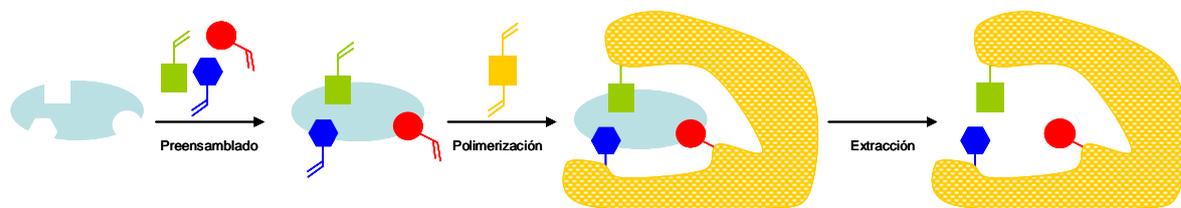


Figura 34. Esquema de la preparación de MIPs de impronta no covalente.

La **impronta no covalente** (figura 34) se basa en la interacción de los monómeros funcionales con los correspondientes grupos funcionales de la molécula plantilla en la mezcla de prepolimerización, originando un preordenamiento molecular en el que se maximiza la interacción entre las dos especies. Estas interacciones pueden darse en uno o más puntos de las moléculas y pueden involucrar enlaces de hidrógeno e interacciones π - π , dipolo-dipolo, electroestáticas y/o hidrofóbicas.

Posteriormente, en presencia de un entrecruzante, un disolvente porógeno y un iniciador de la polimerización, se forma el sólido polimérico que contiene dicha especie. Finalmente, la plantilla se extrae del material utilizando un disolvente capaz de anular las interacciones específicas con el monómero funcional.

1.1.2.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LAS PROPIEDADES DE RECONOCIMIENTO DE LOS MIPs

La selectividad y capacidad de un MIP se ven afectadas por un gran número de variables del proceso de impronta. En primer lugar, las interacciones complementarias entre la plantilla, los monómeros funcionales y entrecruzante dependen de la naturaleza y proporción de las mismas, siendo imprescindible un amplio conocimiento de su comportamiento para crear una organización molecular lógica, de morfología y selectividad adecuada. En segundo lugar, el disolvente usado en la polimerización

determina el momento de la separación de fases durante la misma [22] y establece, en última instancia, la accesibilidad a los sitios de unión. Finalmente, la temperatura y proceso de extracción de la molécula plantilla afecta al equilibrio entre ésta y los monómeros funcionales.

A continuación, se describen algunos ejemplos y particularidades de los factores anteriormente citados.

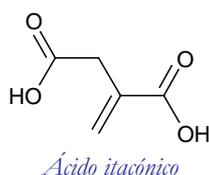
• Monómeros funcionales

La impronta no covalente es más flexible en cuanto a la selección de los monómeros funcionalizados que complementan los grupos funcionales de la plantilla. En algunos casos pueden combinarse distintos monómeros para incrementar las interacciones y mejorar la complementariedad de la plantilla proporcionando una mejor selectividad. A continuación, se presentan algunos de los monómeros comúnmente utilizados en estos mecanismos de polimerización.

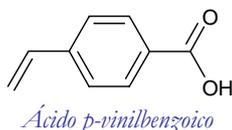
MONÓMEROS ÁCIDOS



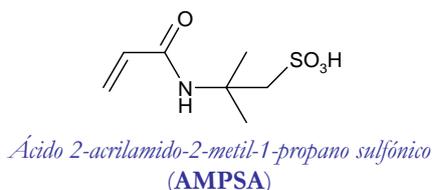
-Utilizado en impronta de: Derivados de aminoácidos [23], péptidos [24,25], teofilina [26], propanolol [27], morfina [28], derivados de monosacáridos [29], penicilina [30], etc.



-Utilizado en impronta de: β -bloqueantes como (*S*-(-)-timolol) [31], (-)-norefedrina [32], etc.

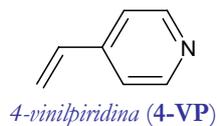


-Utilizado en impronta de: Derivados de aminoácidos [33], etc.

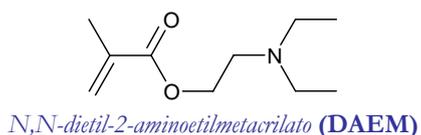


-Utilizado en impronta de: 2,6-Diaminoantroquinona [34], desmetrina (herbicida) [35], etc.

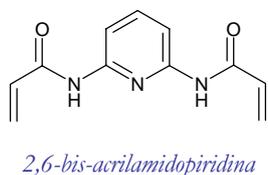
MONÓMEROS BÁSICOS



-Utilizado en impronta de: *S*-naproxen [36], derivados de aminoácidos [37,38], etc.



-Utilizado en impronta de: Atrazina [39], etc.

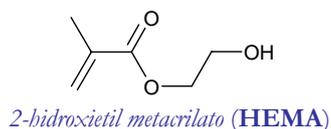


-Utilizado en impronta de: Barbitúricos [40], aloxan [41], etc.

MONÓMEROS NEUTROS



-Utilizado en impronta de: Fenitoína [42], etc.

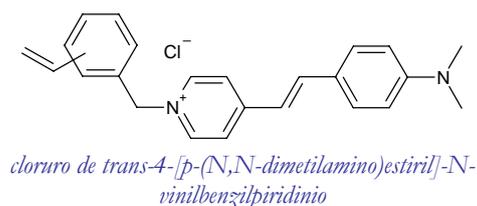


-Utilizado en impronta de: cAMP [43], efedrina [44], colesterol [45], etc.

MONÓMEROS CON CARGA ELECTROESTÁTICA



-Utilizado en impronta de: Penicilina G [46], etc.



-Monómero fluorescente utilizado en la impronta de cAMP [47], etc.

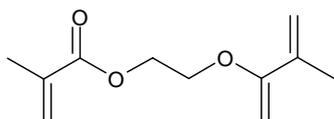
• **Entrecruzantes**

La función del entrecruzante en el proceso de impronta se resume en tres aspectos fundamentales [48]. En primer lugar, es el principal *responsable de la morfología* de la matriz polimérica, en segundo lugar *estabiliza los sitios de unión selectivos* formados en la impronta y, en tercer lugar, *confiere estabilidad mecánica* al material sintetizado. En general, se utiliza gran cantidad de estos reactivos para asegurar las características anteriormente citadas, que requieren un grado de entrecruzamiento mayor del 80% [49]. A continuación, se presentan algunos de los entrecruzantes más utilizados.

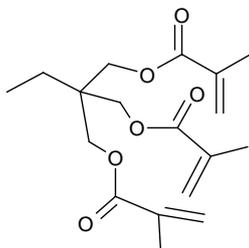
ENTRECRUZANTES



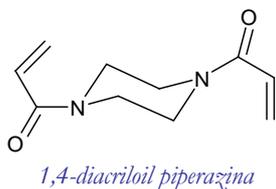
-Derivado del estireno: Producto comercial consistente en una mezcla de isómeros de *divinilbenceno* y *alquilestirenos*. Muy utilizado. Los polímeros formados son estables y resistentes a la mayoría de los tratamientos químicos.



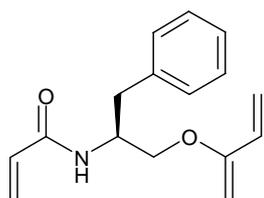
-Éster derivado de metacrilato: Entrecruzante más utilizado [50].



-Éster derivado de metacrilato: En algunas aplicaciones presenta mejores prestaciones que el EDMA. Produce un mayor grado de entrecruzamiento [51,52].



-Soluble en agua [53].



-Derivado de aminoácido [54].

- **Disolvente porógeno**

A parte de su doble papel, como disolvente clásico y agente porogénico, el disolvente en impronta no covalente influye drásticamente en la interacción monómero-molécula plantilla. En general, *disolventes apróticos* con bajas constantes dieléctricas, como cloroformo, tolueno o acetonitrilo, facilitan la unión por enlaces de hidrógeno y electrostáticos. Por otro lado, los disolventes próticos, e.g. agua, metanol, son los adecuados cuando las interacciones son de carácter hidrofóbico [49].

- **Iniciador**

La elección del indicador radicalico se realiza en función de las características del resto de componentes del sistema, como por ejemplo la estabilidad de los reactivos empleados. La polimerización puede comenzar empleando radiación UV o por inducción térmica, dependiendo de la estructura del iniciador.

El azo-derivado 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (**AIBN**) es el compuesto más utilizado, bien como iniciador fotoquímico a bajas temperaturas [30,55] o térmico (≥ 60 °C) [56]. Otros iniciadores fotoquímicos y térmicos utilizados en impronta molecular son el 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (**ABCHC**), 2,2'-azobis[(2,4-dimetilvaleronitrilo)] (**ABDV**) y el 4,4'-azobis[(4-(ácido cianoaléxico)] (**ACVA**), peróxido de benzoilo (**BPO**), etc. [48].

En resumen, los polímeros preparados según esta metodología se caracterizan por una distribución no uniforme (heterogénea) de los sitios de unión. Ello puede explicarse teniendo en cuenta que parte de los sitios de unión pueden interaccionar favorablemente con la plantilla mientras que otros sitios pueden unirse de una manera menos favorable o incluso inespecífica [57]. Esto es el resultado de una incorporación aleatoria de los monómeros funcionalizados, que depende de las condiciones específicas del proceso de polimerización, tales como la temperatura y el disolvente utilizado [58,59]. Sin embargo, no es obvio que la impronta covalente sea, en términos prácticos, superior a la impronta no covalente ya que también se ha observado

heterogeneidad en los sitios de unión de polímeros “covalentes” [60]. Es probable que, en cualquier caso, la impronta molecular produzca materiales con una amplia distribución de sitios de unión, de los cuales sólo una fracción presenta selectividad frente a la plantilla.

1.1.3. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE IMPRONTA SEMICOVALENTE

El modelo semicovalente fue propuesto por Whitcombe y col. en 1995. En este caso, el proceso se realiza del mismo modo que en el modelo covalente, mediante la conjugación previa de la plantilla y los monómeros funcionales, aunque el reconocimiento selectivo se produce mediante interacciones no covalentes (figura 35).

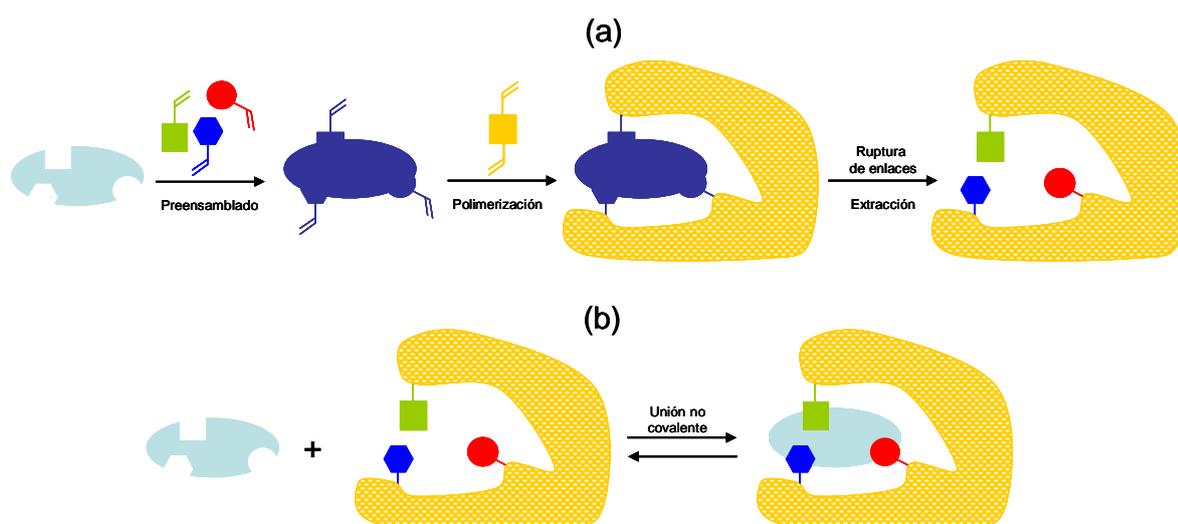


Figura 35. Esquema de la preparación de MIPs de impronta semicovalente. (a) Síntesis del MIP mediante impronta covalente, (b) Reconocimiento de la molécula plantilla mediante interacciones no covalentes.

Basándose en estos principios, Sellergren y Anderson [61] utilizaron un derivado diéster como molécula molde para la síntesis de un polímero selectivo al éster etílico de la p-aminofenilalanina. El MIP obtenido presentaba una buena enantioselectividad para el reconocimiento reversible de la molécula de interés a pesar de la pequeña cantidad de plantilla utilizada en el proceso de polimerización.

Como ventaja de esta técnica, destaca su gran versatilidad a la hora de utilizarse en diferentes condiciones de polimerización. Esto ha permitido su uso en la impronta con emulsiones, de dendrímeros, etc. [62]. Su principal desventaja radica en la importante carga sintética que es necesaria para la fabricación de estos materiales.

1.1.4. OBTENCIÓN DE MIPs MEDIANTE ESPACIADORES SACRIFICABLES

La mayoría de los MIPs preparados utilizan moléculas plantilla altamente funcionalizadas, con grupos carboxilo, amino, amido y carbonílicos. La obtención de MIPs mediante “espaciadores sacrificables” permite ampliar la impronta molecular a moléculas plantilla con otras características químicas. Particularmente, esta técnica confiere la habilidad de formar enlaces de hidrógeno débiles (que no se formarían por autoasociación con monómeros funcionales convencionales) o desarrollar interacciones que involucren electrones π de sistemas aromáticos.

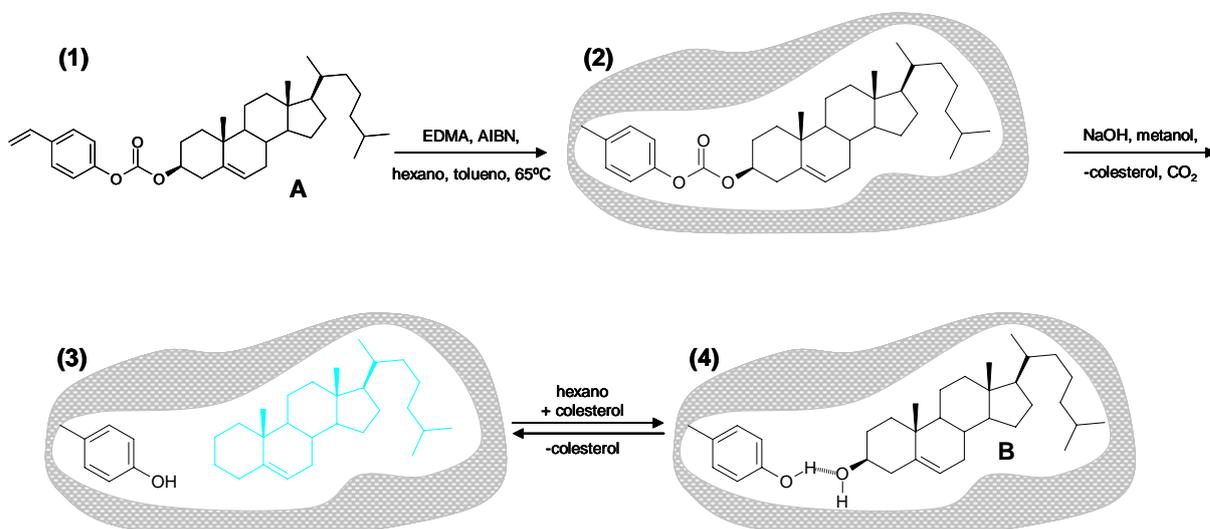


Figura 36. Preparación de MIPs empleando espaciadores sacrificables selectivos a colesterol (B). (1) La molécula plantilla colesteril (4-vinil)fenilcarbonato (A) polimeriza con EDMA; (2) la molécula A permanece unida covalentemente al polímero resultante; (3) hidrólisis alcalina en la que la plantilla se elimina junto con la pérdida del espaciador (CO₂) y la formación de un polímero unido a fenol en la zona de reconocimiento; (4) reconocimiento del colesterol mediante enlace de hidrógeno con el fenol.

Basándose en este método se han desarrollado improntas con resultados satisfactorios para compuestos aromáticos policlorados [63] y péptidos [64]. Un ejemplo de esta estrategia es el desarrollo de un MIP para la detección de colesterol [65]. Se seleccionó este triglicérido como molécula plantilla ya que el grupo hidroxilo presente en la molécula puede formar enlaces de hidrógeno débiles en disolventes no polares. Para lograr el reconocimiento del colesterol, se sintetizó una molécula plantilla modificada, colesteril (4-vinil)fenilcarbonato (A, figura 36) en la que el grupo carbonilo actúa como espaciador sacrificable. La copolimerización se realizó mediante la adición de EDMA y la plantilla se eliminó mediante hidrólisis con NaOH, dejando grupos fenólicos activos en la zona de reconocimiento preparados para interactuar con el analito de interés (B, figura 36).

1.1.5. NUEVAS TECNOLOGÍAS

Un procedimiento típico de síntesis de MIPs implica la polimerización radicalica de una solución concentrada de monómeros iniciada térmica o fotoquímicamente. Se obtiene así un monolito de polímero insoluble que se muele y tamiza para obtener partículas micrométricas de tamaño uniforme. Estos métodos son tediosos y consumen mucho tiempo de modo que obtener un MIP con las propiedades de unión óptimas puede llevar días e incluso semanas, sobretodo si las proporciones de reactivos se seleccionan a partir de ensayos de prueba y error.

Para evitar estos inconvenientes, se han utilizado **métodos de modelización molecular** para seleccionar los monómeros más adecuados para la obtención del polímero. Mediante estos métodos matemáticos se han desarrollado polímeros de alta calidad para moléculas como creatinina [24], efedrina [66] o microcistina LR (figura 37).

Por otra parte, también se han aplicado distintos métodos quimiométricos para la optimización de la composición de los MIPs [62].

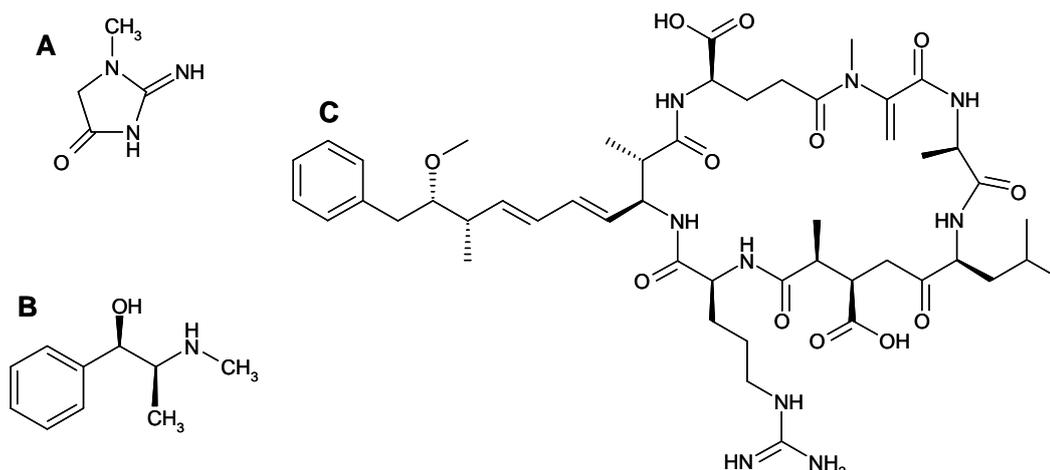


Figura 37. (A) Creatinina; (B) Efedrina; (C) Microcistina-LR. Moléculas sobre las cuales se ha utilizado métodos de modelización molecular para la selección de las condiciones óptimas de impronta.

1.2. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

La necesidad de mejorar las características físico-químicas de las partículas de MIP, ha originado el desarrollo de diversas metodologías de síntesis. A continuación, se describen aquellas de mayor repercusión dentro del campo de la Q. Analítica.

1.2.1. SÍNTESIS DE PARTÍCULAS GRANULARES: Polimerización en bloque

El procedimiento que más se ha utilizado para la síntesis de polímeros de impronta molecular consiste en la polimerización radicalica de una solución concentrada de monómeros iniciada térmica o fotoquímicamente [33,67]. De este modo, se obtiene un monolito de polímero insoluble que se muele y tamiza para obtener partículas micrométricas amorfas de tamaño uniforme (figura 38a).

Aunque este método es fácil de llevar a cabo, ya que no requiere material específico, presenta una serie de desventajas, como son: grandes pérdidas de material en el proceso de elaboración, baja capacidad de carga y distribución de los sitios de unión muy heterogénea.

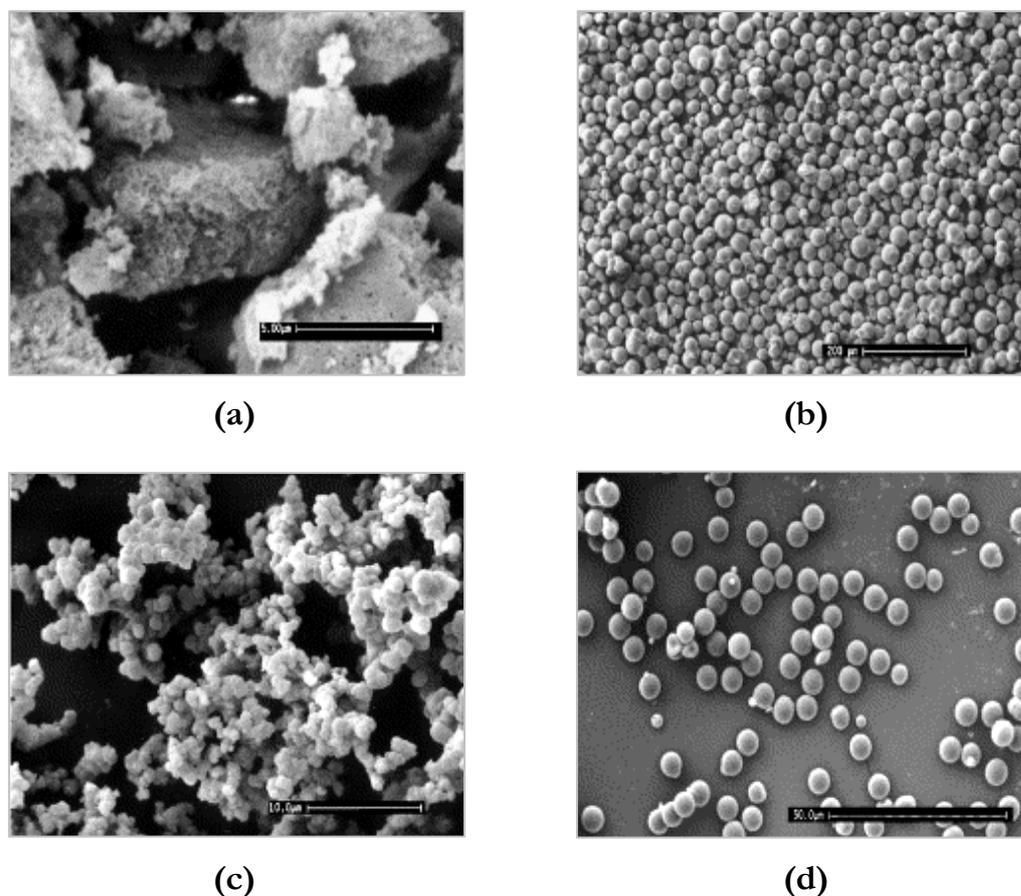


Figura 38. Micrografías SEM y TEM de MIPs obtenidos por diferentes métodos de polimerización: (a) Polimerización en bloque; (b) Polimerización mediante dispersión-precipitación (tamaño de partícula 700 nm); (c) Polimerización mediante suspensión-emulsión (tamaño de partícula 6-40 μm); (d) Polimerización mediante hinchamiento multipasos (tamaño de partícula 6-40 μm) [33].

1.2.2. SÍNTESIS DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS

Durante los últimos años el trabajo realizado se ha enfocado principalmente en dos aspectos: **la síntesis de partículas de tamaño uniforme** con distribuciones de tamaño estrechas y **mejor transferencia másica**. Ambos objetivos están íntimamente relacionados con la morfología de las partículas obtenidas. Se pueden preparar partículas esféricas de tamaño uniforme mediante varias técnicas: *polimerización mediante dispersión-polimerización* [68], *polimerización mediante suspensión-emulsión* [69], *polimerización mediante hinchamiento multipasos* [70], etc..

1.2.2.1. POLIMERIZACIÓN MEDIANTE DISPERSIÓN-PRECIPITACIÓN

Al igual que la polimerización en bloque, este procedimiento de síntesis está basado en la polimerización radicalica de monómeros. Sin embargo, en este caso, la mezcla de reactivos se encuentra mucho más diluida por el disolvente porógeno. Esto produce una dispersión de micropartículas independientes en el seno de la disolución de tamaño uniforme [71-73] (figura 38b).

Como ventajas de esta técnica cabe destacar la mayor capacidad y mejor distribución de los sitios de unión, así como un gran rendimiento de polimerización. Además, es una síntesis sencilla y directa. Todas estas características han favorecido su aplicación en el desarrollo de sensores [74,75] o fases estacionarias en técnicas de separación [76].

La principal desventaja de esta técnica reside en el pequeño tamaño de las partículas que se obtienen (diámetro $< 1 \mu\text{m}$) que dificulta su empleo en cromatografía líquida.

1.2.2.2. POLIMERIZACIÓN MEDIANTE SUSPENSIÓN-EMULSIÓN

La polimerización se produce combinando dos fases: una orgánica hidrofóbica y discontinua, donde se encuentra la mezcla de prepolimerización, y otra continua, dispersante, en mayor proporción. Mediante agitación se generan microesferas que son estabilizadas (eg. polivinil alcohol (**PVA**)) (figura 38c).

La fase dispersante suele ser agua [77] o líquidos perfluorados [7,78]. Éstos últimos presentan una gran hidrofobicidad y no interfieren en la formación del complejo monómero-plantilla.

El principal inconveniente de este mecanismo de polimerización radica en los altos costes de los reactivos dispersantes. Recientemente, el empleo de aceite mineral como fase continua supone una alternativa eficaz a los disolventes perfluorados [79].

1.2.2.3. POLIMERIZACIÓN MEDIANTE HINCHAMIENTO MULTIPASOS

La polimerización mediante hinchamiento multipasos fue desarrollada por primera vez para polímeros de impronta molecular por Hosoya y col. en 1994 [80]. Consiste en una primera etapa de síntesis de partículas de latex en medio acuoso seguido de un proceso de hinchamiento mediante microemulsiones de un plastificante (eg. dibutil ftalato). A continuación, se añade la mezcla de prepolimerización que es absorbida por las partículas de latex. Éste método produce partículas monodispersas de 2-50 μm de diámetro (figura 38d).

El principal inconveniente de esta técnica es el alto grado de dificultad en su ejecución y la incompatibilidad con la obtención de polímeros de impronta no covalente, ya que se emplea agua como fase dispersante [81,82].

1.2.3. MATERIALES COMPUESTOS

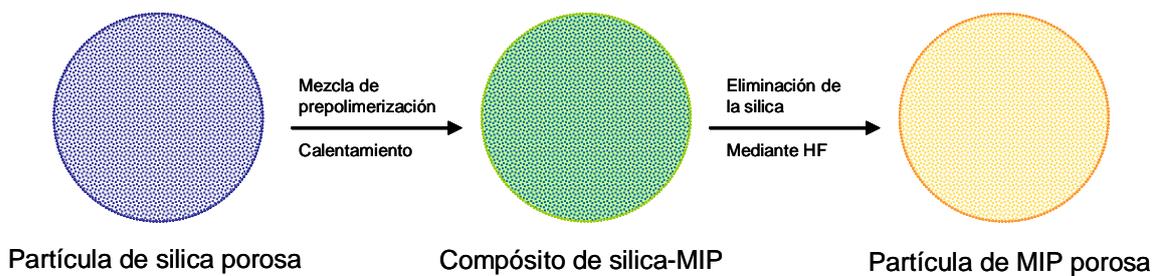
Recientemente se han descrito nuevas metodologías para la producción de polímeros de impronta basados en la utilización de partículas de sílica de morfología bien conocida y definida. Los MIPs así obtenidos permiten una mejor accesibilidad del analito hacia los sitios de unión y un tamaño de partícula controlado [51,73].

1.2.3.1. OBTENCIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR A PARTIR DE SÍLICA-MIP

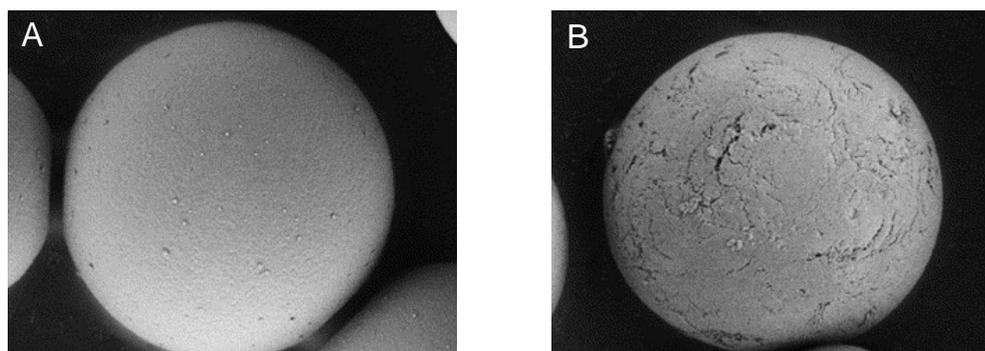
Esta metodología consiste en la impregnación de partículas de sílica con la mezcla de prepolimerización de tal modo que ocupe el espacio dominado por los mesoporos de dicho material. Así, el volumen de la mezcla añadido se corresponde con el volumen de poro de sílica empleada. Finalmente, la polimerización tiene lugar térmicamente obteniéndose un material compuesto que adopta el mismo perfil que la sílica inicial (compósito sílica-MIP) [83].

En una siguiente etapa, la sílica es disuelta y eliminada con un reactivo adecuado (eg. HF 40% en agua) dando lugar a partículas esféricas constituidas exclusivamente

por MIPs (figura 39a). En la figura 39b se muestra las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido realizadas a una partícula de sílica (A) y a otra partícula de polímero de impronta (B) obtenida mediante esta técnica tras la disolución del soporte original [84].



(a)



(b)

Figura 39. (a) Presentación esquemática de la preparación de compósitos sílica-MIP y partículas esféricas de MIP derivadas de la eliminación de la sílica mediante HF [85]. (b) Micrografías SEM de MIPs obtenidos para una partícula compósita de sílica-MIP (A) y una partícula esférica MIP (B). Tamaño de partícula aproximado $10\ \mu\text{m}$ [84].

Yilmaz y col. [85] han desarrollado polímeros de impronta molecular basados en esta metodología para la separación enantiomérica de (-)-isoproterenol y (+)-isoproterenol. El estudio comparativo del MIP de síntesis convencional, compósito sílica-MIP y partículas esféricas de MIP libres de sílica, demuestran que los dos últimos presentan mayor número de platos teóricos (N) aunque el polímero clásico aporta una mayor selectividad (α) en la separación de las dos especies quirales.

1.2.3.2. OBTENCIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR A PARTIR DE TÉCNICAS DE INJERTO

Las técnicas de injerto (del inglés, “*grafting*”) ofrecen una interesante alternativa a la síntesis de polímeros de impronta molecular utilizando partículas como soporte (eg. sílica [86], polisacáridos [87]) u otras morfologías (eg. membranas de poliestireno, polipropileno) [88,89].

Hasta el momento, se han descrito dos tipos de metodologías mediante las cuales llevar a cabo este proceso:

- La primera de ellas, consiste en la inmovilización de moléculas con enlaces polimerizables (monómeros) sobre la superficie en la que se va a realizar la polimerización, dando lugar a la formación de una capa de MIP. Este sistema ha sido empleado para la obtención de polímeros de impronta según el modelo covalente [90] y no covalente [21,91]. Sin embargo, presenta serias dificultades a la hora de comprobar el grosor de la capa polimérica formada, así como su densidad.
- La segunda metodología surge con la intención de mejorar las propiedades de transferencia de masa y la capacidad de carga de los polímeros preparados mediante el método anteriormente descrito. La diferencia fundamental, se basa en que el compuesto a inmovilizar es el iniciador. De este modo, la densidad del polímero formado se puede controlar de manera más precisa [92].

Los iniciadores utilizados habitualmente en este tipo de técnica de injerto son:

- Los *iniciadores azoderivados* [93], cuya principal desventaja reside en la generación de radicales libres activos en disolución que provocan polimerizaciones no controladas.
- Los *iniciadores de tipo “miferter”* [85], Otsu (1982, [94]), son iniciadores radicálicos asimétricos en los que, al fragmentarse, una de las partes inicia la reacción de polimerización y la otra la finaliza por recombinación con otros radicales libres.

1.2.4. PREPARACIÓN DE MONOLITOS MEDIANTE POLIMERIZACIÓN “in situ”

La polimerización *in situ* en el interior de una columna cromatográfica, permite obtener fases estacionarias de mayor porosidad y permeabilidad que aquellas obtenidas mediante empaquetamientos clásicos de partículas de polímero. No obstante, su uso como columnas de cromatografía líquida convencionales no ha encontrado aplicaciones prácticas relevantes [95]. El problema viene asociado a la falta de uniformidad de la fase estacionaria formada debido al propio proceso de fabricación. Por ello, su aplicación está más enfocada al empaquetamiento de capilares para electrocromatografía capilar (**CEC**, del inglés “*capillary electrochromatography*”) y μ -HPLC [96] que no poseen las limitaciones de las columnas tradicionales [97,98].

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

La aplicación adecuada de los polímeros de impronta molecular requiere una caracterización precisa de sus propiedades superficiales y estructurales. Al contrario que las zeolitas, con estructuras porosas bien definidas, los MIPs son sólidos amorfos de gran diversidad estructural, químicamente heterogéneos e insolubles. No obstante, es posible realizar una caracterización correcta de sus propiedades químicas y morfológicas así como de su capacidad de reconocimiento molecular selectivo [48,99].

1.3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Dada la naturaleza insoluble de los polímeros de impronta, las técnicas aplicadas para su caracterización deben ser compatibles con muestras en estado sólido. Los métodos analíticos habitualmente utilizados para la caracterización química de un polímero se describen en la tabla 22.

Tabla 22. Métodos analíticos aplicados a la caracterización química de MIPs.

Técnica analítica	Información obtenida	Observaciones	Ref.
ANÁLISIS ELEMENTAL	<ul style="list-style-type: none"> - Proporciona el contenido total de C, H, N, S, etc. del polímero en % en masa. - Habitualmente utilizado en análisis de copolímeros para calcular la relación de comonomeros cuando uno de ellos incluye en su estructura heteroátomos (eg. 4-vinilpiridina copolimerizado con divinilbenceno). 	<i>No ofrece sensibilidad suficiente para determinar cantidades traza de molécula plantilla que aún estén presentes en el MIP.</i>	[25,100, 101]
ESPECTROSCOPIA DE ADSORCIÓN ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV)	<ul style="list-style-type: none"> - Proporciona información en la etapa de prepolimerización sobre la relación estequiométrica de monómeros-molécula plantilla y el efecto que produce la adición del entrecruzante. 	<i>No ofrece sensibilidad suficiente</i>	[102]
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	<ul style="list-style-type: none"> - Proporciona información cualitativa sobre la composición del MIP, eg. grupos funcionales. - Aporta información sobre la existencia de interacciones no covalentes, eg. enlaces de hidrógeno. 	<i>No ofrece sensibilidad suficiente</i>	[103-105]
RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	<p>¹³C-RMN en estado sólido</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proporciona información sobre los distintos carbonos presentes en la red polimérica. - Determina el número de dobles enlaces que quedan sin reaccionar en el polímero (grado de curación). 	<i>Técnica de reciente aplicación, poco utilizada y cara.</i>	[18]
	<p>¹H-RMN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proporciona información, de la mezcla de prepolimerización, sobre la estabilidad de los complejos monómero-plantilla formados. 	<i>Aplicada mayoritariamente a muestras líquidas.</i>	[106]

Abreviaturas: FTIR: espectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier, RMN: resonancia magnética nuclear.

1.3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La mayoría de las técnicas aplicadas al análisis morfológico de los polímeros de impronta molecular son aquellas ya establecidas para la caracterización de materiales porosos. Dependiendo de cual sea la técnica utilizada, la información recogida permitirá determinar el *volumen* y el *tamaño medio de los poros*, la *distribución del tamaño de poros* y/o la *superficie de área específica*.

La tabla 23 resume las características generales de las técnicas analíticas aplicadas a la caracterización de MIPs, destacando los aspectos comentados anteriormente.

Tabla 23. Métodos analíticos aplicados a la caracterización morfológica de MIPs.

Técnica analítica	Información obtenida	Observaciones	Ref.	
POROSIMETRÍAS	Adsorción/ Desorción de NITROGENO	<i>Proporcionan información sobre:</i> - Área de superficie específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). - Volumen de poro específico (mL g^{-1}). - Distribución del tamaño de poros. - Diámetro medio de poros.	<i>Intervalo de trabajo para poros de tamaño 0.001-0.5 μm. Adecuado para la evaluación de microporos ($< 2\text{nm}$) y mesoporos ($2\text{nm} < 50 \text{nm}$).</i>	[25,48, 107]
	Intrusión/ Extrusión de MERCURIO		<i>Intervalo de trabajo para poros de tamaño 0.002-100 μm. Se puede utilizar para la evaluación de mesoporos ($2\text{nm} < 50 \text{nm}$) pero es más sensible para macroporos ($> 50 \text{nm}$).</i>	
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR INVERSA (ISEC)	- Proporciona información sobre la arquitectura porosa del polímero de impronta que se presenta como fase estacionaria sobre la que se cromatografían polímeros solubles de distribución de pesos moleculares conocidos.	<i>Porosimetría por interacción líquido-sólido.</i>	[48,108]	
MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	- Perfil topográfico tridimensional cuantitativo de la superficie. - Diferencia entre fase amorfa y cristalina en un polímero semicristalino. - Diferencia entre homopolímeros y copolímeros. - Estudio de propiedades mecánicas. - Seguimiento de procesos “in situ”.	<i>Técnica poco utilizada.</i>	[103]	

Abreviaturas: AFM: *microscopía de fuerza atómica* (del inglés “atomic force microscopy”), SEM: *microscopía electrónica de barrido* (del inglés “scanning electron microscopy”), ISEC: *cromatografía de exclusión molecular inversa* (del inglés “inverse size-exclusion chromatography”).

Tabla 23. Métodos analíticos aplicados a la caracterización química de MIPs (continuación).

Técnica analítica	Información obtenida	Observaciones	Ref.
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	<ul style="list-style-type: none"> - Se obtiene la imagen superficial con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina (inferior a una micra) de la muestra de polímero mediante un proceso de rastreo - Aporta información sobre la morfología de las partículas poliméricas y de los macroporos superficiales. - Especial interés para la evaluación morfológica de partículas de MIP (eg. granulares, esféricas). 	<p><i>Simplicidad en el proceso de preparación de muestras.</i></p> <p><i>Muestras no recuperables: es necesario el metalizado previo.</i></p>	[109,110]

Abreviaturas: AFM: *microscopía de fuerza atómica (del inglés “atomic force microscopy”)*, SEM: *microscopía electrónica de barrido (del inglés “scanning electron microscopy”)*, ISEC: *cromatografía de exclusión molecular inversa (del inglés “inverse size-exclusion chromatography”)*.

1.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICA: ISOTERMA DE ADSORCIÓN

En los polímeros en estado sólido, semicristalino u amorfo, suele ser habitual describir los diferentes mecanismos de adsorción y retención de compuestos mediante el empleo de isotermas de adsorción [111,112].

La selectividad de los MIP, las constantes de afinidad y la densidad de los sitios de unión se calculan a partir del ajuste de los datos experimentales a un modelo de isoterma de adsorción adecuado. Para seleccionar el modelo apropiado, se debe tener en cuenta que el sistema debe de estar termodinámicamente en equilibrio y no introducir parámetros suplementarios que nos alejen del significado químico del experimento.

Existen distintos modelos matemáticos de isotermas de adsorción que se han aplicado a la caracterización de polímeros de impronta molecular [113] y proporcionan una buena descripción de muchos de los fenómenos observados en estos polímeros. Estos modelos pueden dividirse en dos clases: **modelos discretos** y **modelos de distribución continua**. Los *modelos discretos* simplifican la distribución de afinidad en

un número finito de sitios de unión y cada uno de los cuales posee una afinidad diferente. Por otra parte, los *modelos de distribución continua* consideran una función continua con un número infinito de sitios de unión para modelizar dicha distribución. En la tabla 24 se recogen algunos de los modelos más utilizados.

Tabla 24. Modelos de isothermas de adsorción [113].

Modelo de isoterma de adsorción	Ecuación	Ref.
<i>Modelos discretos</i>		
LANGMUIR	$B = \frac{qkF}{1 + kF} \quad (5)$	[114]
BI-LANGMUIR	$B = \frac{q_1k_1F}{1 + k_1F} + \frac{q_2k_2F}{1 + k_2F} \quad (6)$	[115]
JOVANOVIC	$B = q(1 - e^{-kF}) \quad (8)$	[116]
BI-JOVANOVIC	$B = q_1(1 - e^{-k_1F}) + q_2(1 - e^{-k_2F}) \quad (9)$	
<i>Modelos de distribución continua</i>		
FREUNDLICH	$B = aF^n \quad (4)$	[111]
FREUNDLICH-LANGMUIR	$B = \frac{qkF^n}{1 + kF^n} \quad (7)$	[117]
FREUNDLICH-JOVANOVIC	$B = q(1 - e^{-kF^n}) \quad (10)$	[118]

Abreviaturas: B : cantidad de analito unido al polímero, F : cantidad de analito libre, k (eq. 5,6,8,9): constante de afinidad, q : densidad de sitios de unión, n : parámetro de heterogeneidad.

Los modelos de **Langmuir** (5) y **Jovanovic** (8) muestran una versión simplificada del comportamiento de estos polímeros al considerar una única constante de afinidad y la ausencia de heterogeneidad en los sitios de unión. Por otro lado, los modelos **Bi-Langmuir** (6) y **Bi-Jovanovic** (9), describen el mecanismo de adsorción/unión dual, con dos clases distintas de sitios de unión, de alta y de baja afinidad.

La isoterma de **Freundlich** (4) describe una distribución continua de distintas clases de sitios de unión en donde se incluye el parámetro n , que representa el *grado de heterogeneidad* de la muestra adoptando valores comprendidos entre 0 y 1. Cuanto más homogéneo sea el material, más cerca de 1 estará el valor de n y menos dispersa será la afinidad de los sitios de unión específicos.

Además existen dos modelos de ajuste basados en isoterms bi-modales, el modelo de **Freundlich-Langmuir** (7) [119] y el modelo de **Freundlich-Jovanovic** (10) [118], que describen un mecanismo de unión híbrido entre la distribución continua de centros activos que postula el modelo de Freundlich y la homogeneidad propuesta por los modelos de Langmuir y Jovanovic. Con ellas se permite ajustar simultáneamente las regiones de saturación y no saturación de la isoterma de unión.

1.4. APLICACIONES DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

En los últimos años, se ha producido un crecimiento exponencial del número de publicaciones dedicadas a la técnica de impronta molecular y, por ende, del volumen de aplicaciones desarrolladas (figura 40) [120].

Desde su primera aplicación en 1972, dentro del campo de los polímeros orgánicos, se han empleado con éxito materiales poliméricos de elevada especificidad en áreas muy variadas como **cromatografía, electroforesis capilar, sensores y catálisis** [121-127] y para distintas aplicaciones, como el análisis medioambiental, clínico y biotecnología [99,126,128].

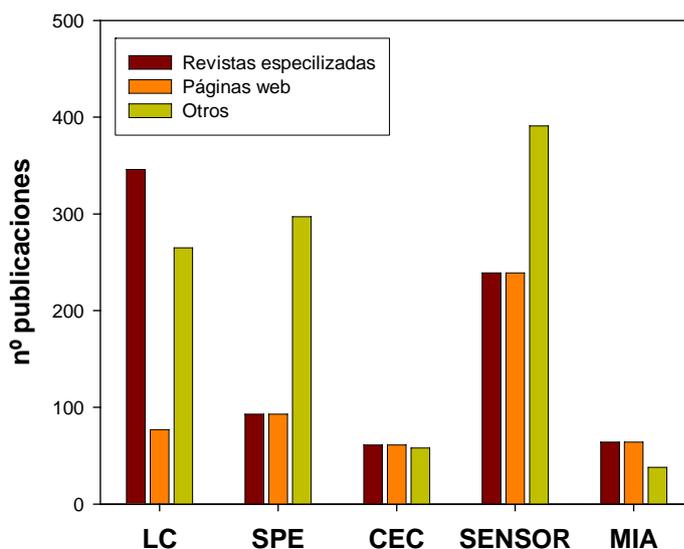


Figura 40. Representación esquemática de las áreas de Química Analítica en donde se aplica con éxito la tecnología de polímeros de impronta molecular (MIPs). Artículos científicos publicados desde 1985 hasta octubre de 2005 [9]. Otros: Artículos divulgativos, citas en prensa, tesis doctorales, etc..

1.4.1. APLICACIONES EN SÍNTESIS Y CATÁLISIS

Los MIPs sintetizados a partir de plantillas quirales o proquirales tienen sitios de unión que son intrínsecamente asimétricos pudiéndose considerar similares a los dominios de unión de las enzimas, aunque con más restricciones conformacionales. La analogía con los sitios de unión enzimáticos es notable. En particular, la definición espacial y direccionalidad de los grupos funcionales químicos ofrecen un gran potencial para la síntesis selectiva y asimétrica en el interior de las cavidades de los polímeros. Los primeros ejemplos fueron descritos por Damen y Neckers [129] y por Shea y col. [130]. Este último describe la síntesis de MIPs enantioselectivos. El uso del racemato del éster *trans*-1,2-ciclobutanodicarboxílico durante la impronta produjo ácido ciclopropanodicarboxílico racémico, mientras que la impronta con el isómero (-)-*trans*, produjo un incremento en la pureza enantiomérica del derivado ciclopropánico recuperado. A pesar de que el exceso del enantiómero inducido por la impronta fue bajo (< 0.05%), los resultados demuestran que pueden prepararse productos con estequiometría definida mediante esta metodología.

El número creciente de publicaciones en las cuales los MIPs se han utilizado como reactivos, soportes auxiliares sintéticos (e.g. β -eliminaciones [131], condensación alcohólica [132], reacción Diels-Alder [133], hidrólisis alcalina), sugiere que hay un gran potencial para las aplicaciones de estos materiales en este campo.

1.4.2. APLICACIÓN EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

1.4.2.1. CROMATOGRAFÍA

El uso de MIPs como fases estacionarias en cromatografía líquida es, sin duda, la aplicación más utilizada para la evaluación de estos polímeros [134,135].

La primera aplicación de los MIPs fue como fases estacionarias en cromatografía de afinidad, en particular para la resolución de mezclas racémicas. El proceso de impronta introduce la capacidad enantioselectiva en los polímeros que se sintetizan a partir de plantillas quirales.

La particularidad de los MIPs, comparada con fases estacionarias quirales convencionales, es que su selectividad está predeterminada. Los valores típicos para el factor de selectividad están comprendidos entre 1.5 y 5.0, aunque en algunos casos se pueden obtener valores mayores [82]. Si la molécula de interés contiene más de dos centros quirales, como en el caso de los hidratos de carbono, las propiedades de estos materiales de impronta llegan a ser más relevantes. Por ejemplo, un polímero para el dipéptido Ac-L-Phe-L-Trp-OMe fue capaz de reconocer específicamente el isómero usado como plantilla respecto a los otros tres estereoisómeros *DD*, *DL* y *LD* [136].

En los últimos años, se han descrito algunos procedimientos de síntesis y evaluación de **MIPs selectivos a antibióticos β -lactámicos** aplicados a técnicas cromatográficas [137]. En este sentido, Skudar y col. [138] han desarrollado polímeros de impronta molecular para penicilinas utilizando como molécula plantilla penicilina V, penicilina G y oxacilina. Los MIPs fueron evaluados tanto en fase orgánica como acuosa y se comprobó que todos ellos presentaban una adecuada selectividad para estos antimicrobianos (ver figura 41).

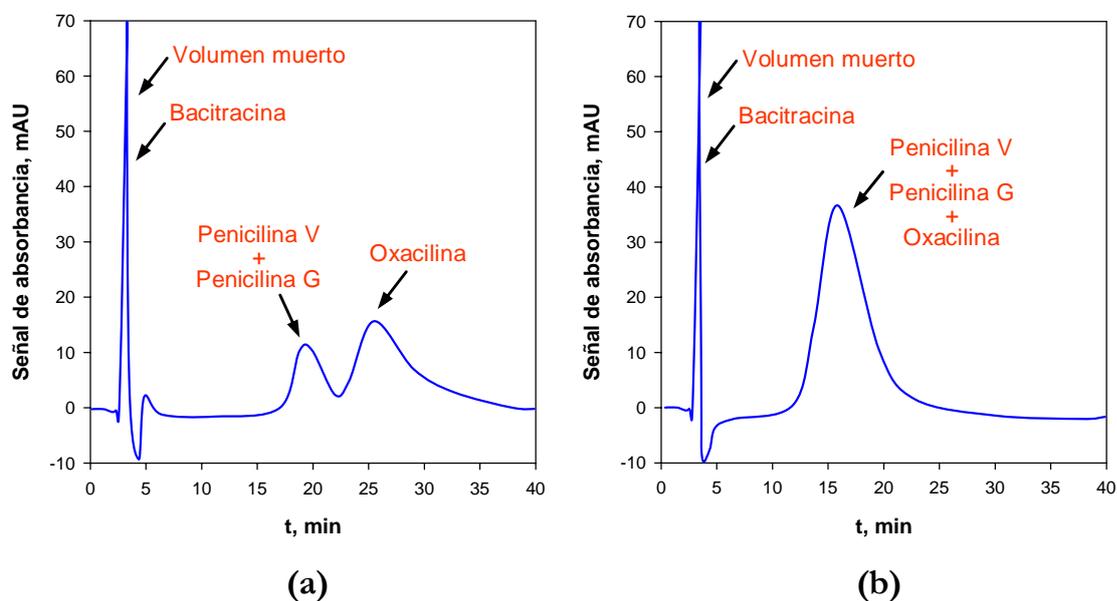


Figura 41. (a) Cromatograma obtenido para la separación de oxacilina, penicilina G, penicilina V y otro antibiótico no β -lactámico (bacitracina) empleando un MIP sintetizado a partir del monómero 4-vinilpiridina, el entrecruzante TRIM y oxacilina como molécula plantilla. Los análisis se llevaron a cabo con acetonitrilo-ácido acético (99:1, v/v) como fase móvil; (b), mismas condiciones pero utilizando el respectivo polímero de control [138].

Por otro lado, Prasad y col. [139] han preparado, caracterizado y optimizado cromatográficamente partículas esféricas de sílica-MIP selectivas a oxazolonas generadas a partir de cefalosporinas y penicilinas.

En la tabla 25 quedan recogidos una selección de estudios en donde los MIPs se han utilizado para separaciones cromatográficas de productos naturales, farmacéuticos y compuestos de interés clínico y medioambiental.

Tabla 25. Aplicaciones de los MIPs como fases estacionarias en cromatografía líquida.

Analito	Composición MIP (monómero/entrecruzante/morfología)	Ref.
Cromatografía líquida (LC)		
AMINOÁCIDOS	MAA/TRIM/bloque (partículas granulares)	[140]
ATRAZINA	MAA/EDMA/bloque (partículas granulares)	[141]
NICOTINA	TFMAA/EDMA/monolito	[142]
ESTEROIDES	MAA/EDMA/bloque (partículas granulares)	[143,144]
NAPROXEN	4-VP/EDMA/bloque (partículas granulares)	[36]
ZEARALENONA	1-ALPP/TRIM/bloque (partículas granulares)	[145]
EFEDRINA	MAA/EDMA y PETRA/bloque (partículas granulares)	[146]
CLORFENIRAMINA (ANTIHIÁSTAMÍNICO)	MAA/TFMAA/hichamiento multipasos (partículas esféricas)	[147]
OXAZEPAM (ALCALOIDE)	MAA/-/bloque (partículas granulares)	[148]
Cromatografía en capa fina (TLC)		
EFEDRINA Y ANÁLOGOS	MAA/EDMA/bloque (partículas granulares)	[149]
Electroforesis capilar (CE)		
PROPANOLOL	N-acrilóil-alanina/EDMA/bloque (partículas granulares)	[150]

Abreviaturas: LC: *cromatografía líquida*, TLC: *cromatografía en capa fina*, CE: *Electroforesis capilar*, MAA: *ácido metacrílico*, TRIM: *Trimetilopropano trimetacrilato*, EDMA: *Etilenglicol dimetacrilato*, TFMAA: *ácido trifluorometilacrílico*, 4-VP: *4-vinilpiridina*, PETRA: *pentaeritritol triacrilato*, 1-ALPP: *1-alilpiperazina*.

1.4.2.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es la técnica en la que mayor aplicación ha encontrado hasta el momento los MIPs [122,151,152]. La mayoría de los polímeros de impronta molecular tienen selectividades y constantes de afinidad muy altas, lo cual les hace especialmente adecuados para incrementar la selectividad en SPE. Comparados con los inmunoabsorbentes, estos materiales presentan las siguientes ventajas: *son fáciles de preparar, coste bajo, rápida y gran reproducibilidad en la preparación y mayor duración del material.*

Por tanto, la aplicación de estos polímeros en técnicas de extracción en fase sólida (**MIP-SPE** o **MISPE**, del inglés “*molecularly imprinted polymer based solid phase extraction*”) puede considerarse como una técnica prometedora para la limpieza y enriquecimiento selectivo de analitos presentes en muestras complejas.

El procedimiento experimental utilizado abarca desde métodos de preconcentración en línea [153-155], preconcentraciones convencionales en cartuchos de SPE [156-158] hasta procedimientos en el que el MIP se incubaba previamente con la muestra (**MSPD**, del inglés “*matrix solid phase dispersion*”) [159].

El primer ejemplo de MISPE fue descrito en 1994 por Sellergren y col. que empleó un MIP selectivo a pentamidina para la preconcentración y limpieza en continuo de muestras de orina enriquecida [160]. Desde entonces son numerosísimos los trabajos publicados de aplicaciones MISPE para la determinación de multitud de analitos en diversas muestras medioambientales (agua de río, subterránea, residual, de mar, extracto de suelos, etc.), fluidos biológicos (orina, suero, plasma y sangre), tejidos, alimentos, plantas medicinales, etc. (ver tabla 26) [161].

Tabla 26. Aplicaciones representativas del MISPE para la extracción selectiva de compuestos en muestras medioambientales y biológicas.

Analito	Método síntesis	Matriz	Método MISPE	Sistema analítico	Ref.
TERBUTILAZINA	No covalente	Agua de río	En continuo	MISPE-HPLC-UV	[123]
BENZO(a)PIRENO	No covalente	Agua de lago y grifo	Discontinuo	HPLC-Fluorescencia	[162]
BISFENOL A	No covalente	Agua de río	En continuo	MISPE-HPLC-Fluorescencia	[163]
IBUPROFEN	No covalente	Agua de río	Discontinuo	HPLC-UV	[164]
NAPROXEN	No covalente	Orina	Discontinuo	HPLC-UV	[165]
2-AMINOPIRIDINA	No covalente	Suero	En continuo	MISPE-DPE-UV	[166]
OXY	No covalente	Riñón cerdo	Discontinuo	HPLC-UV	[167]
CLENBUTEROL	No covalente	Hígado	MSPD	HPLC-MS	[168]
IBUPROFENO	RAM-MIP	Suero	En continuo	HPLC-UV	[169]
CEFX	No covalente	Suero	En continuo	MISPE-DPE-UV	[170]

Abreviaturas: OXY: *oxitetraciclina*, CEFX: *cefalexina*, RAM: *medio de acceso restringido (restricted access media)*, DPE: *elución pulsada diferencial (differential pulsed elution)*.

Un ejemplo de un método **MISPE** para la determinación de **antibióticos β -lactámicos** es el desarrollado por Lai y col. para la determinación de cefalexina en

plasma humano y suero. La síntesis del MIP se realizó utilizando cefalexina como molécula plantilla y TFMAA/EDMA como pareja monómero/entrecruzante. El polímero se empaquetó en una microcolumna y mediante elución pulsada diferencial (**DPE**, del inglés “*differential pulsed elution*”) se consiguió la elución selectiva del antibiótico con un límite de detección de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Cabe destacar que para aplicaciones analíticas de MISPE es problemático usar directamente el analito de interés como molécula molde, ya que su eliminación total del MIP es difícil y se puede ver afectada la exactitud y la precisión de la medida analítica. Una posible solución es usar como plantilla un análogo del analito para realizar la impronta. Esta aproximación ha sido descrita por Andersson y col. en una publicación que detalla el uso de MIPs para la preconcentración de sameridina, en plasma humano, previa a su cuantificación por cromatografía de gases (GC) [159].

1.4.2.3. ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR (CEC)

La electrocromatografía capilar (**CEC**, del inglés “*capillary electrochromatography*”) combina el uso de una fase estacionaria de cromatografía líquida con la separación electroforética mediante una fase móvil dirigida mediante ósmosis [171].

En los últimos años, han surgido un gran número de estudios basados en **MIP-CEC** [172]. Las investigaciones se han centrado principalmente en la adaptación de la tecnología de impronta molecular a CEC, concretamente en el empaquetamiento de MIPs como fases estacionarias en columnas capilares [173].

1.4.3. SENSORES

Los sensores químicos son una alternativa de bajo costo y de gran poder analítico frente a las tecnologías convencionales para la identificación de analitos en presencia de numerosas especies interferentes.

Un **sensor químico** [174] es un dispositivo capaz de transformar una **información química** sobre la muestra, por ejemplo la concentración de un

componente específico de la misma o bien un análisis total de su composición, en una **señal analítica útil**. La información química investigada puede originarse en una reacción química en la cual interviene el analito, o bien a partir de una propiedad física del sistema investigado. El éxito de un sensor químico depende de la elección apropiada del elemento de reconocimiento y el transductor.

Los sensores acoplados a MIPs pueden dividirse en tres grupos: *sensores de adsorción*, *sensores receptores* y *sensores enzimo-miméticos* [175].

1.4.3.1. **SENSORES DE ADSORCIÓN**

Son los sensores más comunes en este tipo de aplicaciones. En este caso, la detección se basa en la medida del analito adsorbido en el MIP inmovilizado en la superficie del detector [176,177].

En base a este principio, se han desarrollado sensores con detección óptica para la determinación de flavonol, utilizando un sistema de inyección en continuo (**FI**, del inglés *“flow injection”*) y partículas de MIP empaquetadas en una célula de flujo [178]. Del mismo modo, se han determinado PAHs utilizando poliuretanos selectivos [179].

Otro ejemplo de transducción óptica es la medida de fosforescencia a temperatura ambiente (**RTP**, del inglés *“room temperature phosphorescence”*) de nafcilina que interacciona de forma selectiva con materiales de impronta, tanto en forma de películas como de partículas granulares [180].

Una técnica alternativa es aquella basada en transductores acústicos sensibles a la variación de masa, como la microbalanza de cristal de cuarzo (**QCM**, del inglés *“quartz crystal microbalance”*) que se utilizan en combinación con polímeros de impronta molecular. La acumulación del analito en el MIP produce un cambio en la masa del disco sensor y, en consecuencia, una disminución cuantificable en la frecuencia de oscilación. Las ventajas del uso de este dispositivo para el diseño de sensores son: *su simplicidad*, *la interpretación sencilla de la respuesta del sensor* y su *compatibilidad con numerosos disolventes y analitos*.

Utilizando este transductor, el grupo de Percival [181] ha desarrollado un sensor **MIP-QCM** para la determinación de L-mentol en fase líquida. Se analizó la unión selectiva del analito y se cuantificó mediante la variación de frecuencias de la QCM. El límite de detección del L-mentol fue de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

1.4.3.2. **SENSORES RECEPTORES**

Los sensores receptores se basan en la capacidad del MIP de modificar alguna propiedad medible, como la conductividad, permeabilidad o potencial de superficie, al unirse al analito [60].

Alternativamente, los sensores se pueden diseñar de tal manera que un monómero funcional cambie sus propiedades al interactuar con el analito [182] o incorporar un fluoróforo marcador al polímero de forma que su señal de fluorescencia varíe durante la interacción directa con el analito. Estos **MIPs fluorescentes** o **fluoroMIPs** presentan grandes atractivos ya que la modificación de la intensidad de fluorescencia permite la detección de analitos a muy bajas concentraciones [183].

En este sentido, Takeuchi y colaboradores [184] integraron la porfirina de Zn(II) **(1)** (Figura 42) en un MIP para complejar la (-)-cinconidina **(2)**, produciendo la desactivación de la fluorescencia del complejo porfirínico. Se determinó un valor de la constante de asociación $K_{as} = 1.14 \cdot 10^7 \text{ mol L}^{-1}$, valor diez veces mayor que la K_{as} medida para dos MIPs análogos, uno preparado sin **(1)** y otro sin MMA.

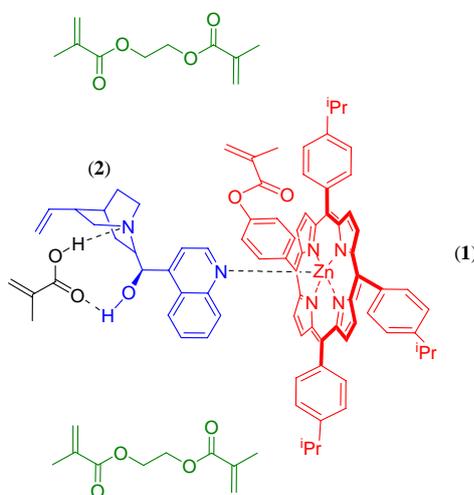


Figura 42. Representación del complejo de prepolimerización de la (-)-cinconidina (2, azul) y la porfirina de Zn(II) monofuncionalizada (1, rojo).

Este principio, también se ha aplicado en la determinación de cAMP en medio acuoso [185], para el análisis de L-triptófano tras desplazamiento de un desactivador de la fluorescencia alojado en el polímero [186] o para la determinación de D-fructosa por el incremento de la fluorescencia del MIP marcado con antraceno [187].

1.4.3.3. **SENSORES ENZIMO-MIMÉTICOS**

Las enzimas se han empleado extensamente para la construcción de biosensores [188]. Los MIPs sintetizados a partir de plantillas quirales o proquirales tienen sitios de unión que son intrínsecamente asimétricos y pueden considerarse similares a los sitios de unión de las enzimas, aunque con más restricciones conformacionales. Por lo tanto, el uso de **polímeros de impronta catalíticamente activos** para el desarrollo de sensores, parece el modo más directo y atractivo de reemplazar los actuales biosensores por otros cuya fase sensible sea mucho más estable.

Aunque existen algunas publicaciones científicas que demuestran que pueden prepararse MIPs con estereoquímica definida y memoria quiral de la plantilla, hasta el momento no existen ejemplos prácticos de su aplicación como materiales de reconocimiento en dispositivos sensores. No obstante, el número creciente de publicaciones en las cuales los MIPs se han utilizado como soportes catalíticos sintéticos, sugiere que hay una gran potencial para la fabricación y aplicación de estos materiales [189-191].

Por ejemplo, Strikovsky y col. [192] han sintetizado partículas esféricas de MIP enzimo-miméticos de alta selectividad mediante la copolimerización de EDMA con un monómero basado en derivados de amidina y utilizando difenil fosfato como molécula plantilla. La actividad catalítica desarrollada por los polímeros preparados fue evaluada mediante la hidrólisis de difenil carbonato y difenil carbamato. Según los autores, las constantes de Michaelis-Menten obtenidas con los polímeros de impronta, son las mejores publicadas para MIPs catalíticos hasta la fecha.

1.5. DESARROLLO DE ENSAYOS EMPLEANDO POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (“Molecularly imprinted assay”, MIA)

Dado que los polímeros de impronta molecular comparten con los anticuerpos su capacidad de unión selectiva a una molécula diana, resulta lógico pensar que la gran diversidad de técnicas desarrolladas para la determinación de analitos mediante inmunoensayos (e.g. RIA, radioinmunoensayos, ELISA) [193-195] pueden emplearse para ensayos que utilicen MIPs como materiales de reconocimiento (**MIA**, del inglés “*molecularly imprinted sorbent assay*”).

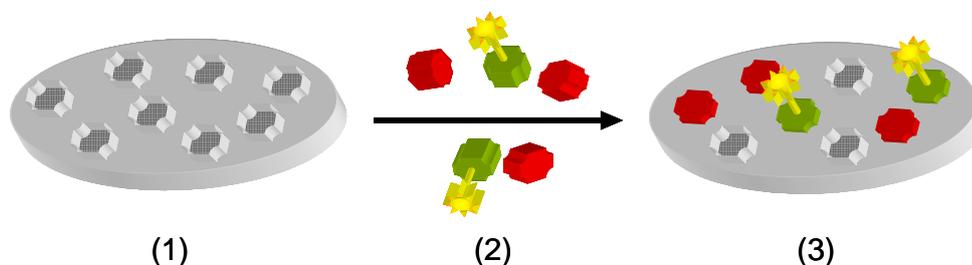


Figura 43. Esquema de un ensayo MIA: (1) MIP aislado, (2) analito y sonda se añaden al MIP, (3) analito y sonda compiten por los sitios de unión.

La mayoría de los métodos desarrollados están basados en ensayos de **tipo competitivo**, en los que el analito y una pequeña cantidad de análogo marcado compiten para unirse a un número limitado de sitios de unión específicos del polímero. La cantidad de analito marcado unido al polímero será proporcional a la cantidad de especie no marcada presente en la mezcla (Figura 43).

1.5.1. RADIOENSAYOS

El primer ensayo con elementos de impronta molecular fue descrito por Vlatakis y col [26] en 1993 y presentaba un diseño similar al radioinmunoensayo (**RIA**, del inglés “*radioimmunoassay*”). El experimento se aplicó a la determinación de teofilina, un broncodilatador de extenso uso médico.

A diferencia de los ensayos RIA, la muestra de plasma conteniendo la droga no se añadió directamente al MIP sino que, en primer lugar, la teofilina se extrajo utilizando un disolvente orgánico. A esta solución se añadió la droga marcada y el MIP, incubando durante cierto tiempo para que se produjera la competición entre el analito y el derivado marcado por los sitios de unión. A continuación, el MIP se centrifugó y la radiactividad del sobrenadante se determinó mediante un contador de centelleo con un intervalo dinámico entre 14 – 224 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Los resultados se correlacionaron de manera excelente con un inmunoensayo comercial. Otros ejemplos, publicados recientemente, se recogen en la tabla 27.

Tabla 27. Aplicaciones MIA empleando marcadores radiactivos [196].

Analito	Marcador	Disolvente de ensayo	Competidores	Ref.
TEOFILINA	^3H -Teofilina	(a) ACN/ CH_3COOH , (b) Tolueno/THF (90:10), (c) ACN, (d) Tolueno	Teofilina, teobromina, cafeína, otras xantinas	[197]
ATRAZINA	^{14}C -Atrazina	(a) ACN, (b) Tolueno, (c) T. fosfato pH 7/Tween 20 (1.5%)	Atrazina, otras triazinas	[198]
MORFINA	^3H -Morfina	(a) Tolueno, (b) Citrato pH 6/Etanol (90:10)	Morfina, otros opiáceos	[199]
S-PROPANOLOL	^3H -S-Propanolol	(a) Tolueno, (b) Tampones acuosos, (c) 60% plasma	S-Propanolol, R-propanolol, racémicos de drogas relacionadas	[200]
2,4-D	^{14}C -2,4-D	T. fosfato pH 7/Triton X-100 (0.1%)	Ácidos relacionados, ésteres	[201]
CAFEINA	^{14}C -Cafeína	(a) Heptano/THF (3:1) (b) ACN	Cafeína y teofilina	[52]
4-NITROFENOL	^{14}C -4-Nitrofenol	ACN	4-Nitrofenol	[202]

Abreviaturas: ACN: acetonitrilo, THF: tetrahidrofurano, CH_3COOH : ácido acético, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

1.5.2. ENSAYOS BASADOS EN MARCADORES NO-RADIATIVOS

Los compuestos radiactivamente marcados son virtualmente idénticos a los no marcados y, a menudo, asequibles comercialmente. Sin embargo, el riesgo sanitario asociado al uso de material radiactivo, impulsó el desarrollo de sistemas de detección

menos peligrosos. La detección fluorescente, colorimétrica y enzimática son alternativas posibles y, por ello, se han desarrollado fluoro-ensayos (MIFA, del inglés “*molecularly imprinted fluoroassay*”), cromo-ensayos, ensayos enzimáticos, etc. también basados en los polímeros de impronta molecular (tabla 28) [196].

Tabla 28. Aplicaciones MIA empleando marcadores no radiactivos [196].

Analito	Marcador	Disolvente de ensayo	Competidores	Ref.
Marcadores cromóforos				
CLORAMFENICOL	Cloramfenicol-rojo de metilo	ACN	Cloramfenicol, cloramfenicol diacetato, tiamfenicol	[203]
BIOTIN METIL ÉSTER	Biotin nitrofenil éster	ACN	Biotin metil éster	[204]
Marcadores fluorescentes				
TRIAZINA	5-(4,6-diclorotriazol) amino fluoresceína	Etanol	Triazina, atrazina, simazina	[205]
CLORAMFENICOL	Cloramfenicol dansilado	ACN	Cloramfenicol, cloramfenicol diacetato, tiamfenicol	[206]
ATRAZINA	5-(4,6-diclorotriazol) amino fluoresceína	Agua	Atrazina, atraton-D, metribuzina	[207]
Marcadores enzimáticos				
2,4-D	2,4-D-TOP	Fosfato pH 7/Triton X-100 (99.1:0.1)	2,4-D, ácidos y ésteres relacionados	[208]
EPINEFRINA	Norepinefrina-HRP	Fosfato pH 6	Epinefrina y otras hormonas catecolaminas	[209]
L,R-MICROCISTINA	Microcistina-HRP	Fosfato pH 7	L,R-Microcistina y otros péptidos relacionados	[210]
Sondas no análogas cromóforas/fluorescentes				
2,4-D	7-carboxi-metoxi-4-metilcumarina	Fosfato pH 7/Triton X-100 (99.9:0.1)	2,4-D, aromáticos relacionados	[211]
Sondas análogas electroactivas				
2,4-D	Ácido homogentísico	Fosfato pH 7/MeOH (9:1)	2,4-D, aromáticos relacionados	[212]

Abreviaturas: ACN: *acetonitrilo*, MeOH: *metanol*, 2,4-D: *ácido 2,4-diclorofenoxiacético*, HRP: *peroxidasa de rábano*, TOP: *peroxidasa de tabaco*.

No obstante, la selección del marcador supone una etapa crítica en el desarrollo del ensayo ya que puede afectar a la selectividad y al límite de detección del método. Un ejemplo es la determinación de cloramfenicol. Cuando éste se marcó con rojo de metilo, el límite de detección obtenido en los ensayos de desplazamiento en continuo

fue de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ [213]. Posteriormente, se desarrolló un ensayo fluorescente que mejoró las características del anterior con una mayor selectividad y un menor límite de detección ($\text{LD} = 8 \mu\text{g L}^{-1}$) [206].

Existen cuatro alternativas a la hora de diseñar un MIA basado en el uso de sondas no radiactivas:

- El polímero se sintetiza utilizando el analito como plantilla y un conjugado marcado del analito como competidor directo.

Piletsky y col. [214] han descrito un ensayo competitivo utilizando conjugados fluorescentes y MIPs en forma de membrana. La atrazina (1) y la 5-[(4,6-diclorotriazin-2-il)amino]fluoresceína (4) compiten por los sitios de unión del MIP siendo la concentración de sonda en el sobrenadante proporcional a la concentración de herbicida. Los polímeros fueron selectivos para la atrazina frente a la triazina (3) y la simazina (2) (figura 44).

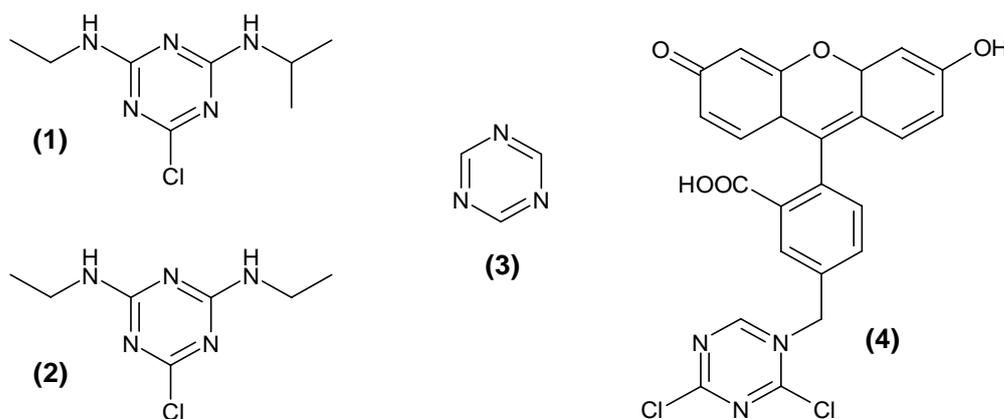


Figura 44. Estructuras de la atrazina (1), triazina (2), simazina (3) y del conjugado de fluoresceína (4) [214].

- El polímero se sintetiza utilizando el analito marcado como plantilla.

Chow y col. [215] sintetizaron un derivado de la *DL*-homocisteína con el fluoróforo *N*-(1-pirenil)maleimida para preparar, a continuación, un MIP con el conjugado en vez de con el analito. La respuesta del polímero fue lineal en el intervalo de concentraciones $0 - 3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

La desventaja de esta técnica se centra en el aumento de los llamados *falsos positivos*, ya que este tipo de polímeros de impronta son selectivos tanto al analito como al marcador que constituye el conjugado utilizado como molécula plantilla [196].

- El polímero se sintetiza utilizando el analito como plantilla y una sonda estructuralmente no relacionada con el analito como competidor directo.

La viabilidad de este ensayo depende de la capacidad de la sonda para unirse al polímero. La sonda ideal será aquella que posea grupos funcionales similares a la molécula plantilla y se una específicamente al MIP [216,217].

Un ejemplo de este tipo de ensayos es la detección de 2,4-D con MIPs utilizando un derivado de la cumarina como sonda fluorescente [211]. La selectividad y sensibilidad del ensayo son del mismo orden que los obtenidos utilizando el mismo polímero en un radioensayo. Este método puede ser utilizando tanto en medio acuoso como medio orgánico, con un límite de detección de 100 nmol L⁻¹.

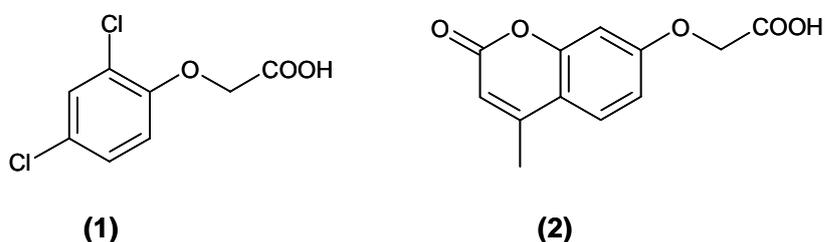


Figura 45. Estructuras de la 2,4-D (1) y del CMMC (7-carboxi-metosi-4-metilcumarina) (2) [209].

- El polímero se sintetiza a partir de una molécula plantilla sin relación estructural con el analito.

Esta aproximación adolece de las mismas desventajas que la segunda alternativa propuesta. El número de publicaciones científicas basadas en este esquema es mínimo [218].

Otra opción posible para la detección del analito en MIA es utilizar un **conjugado enzimático** del mismo. Son pocos los ensayos de este tipo que se han descrito hasta el momento. Surugiu y col. [201] han usado la peroxidasa del tabaco

(**TOP**) como marcador desarrollando un ensayo para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**) en el que se mide la actividad enzimática del sobrenadante. Se demostró que el 2,4-D competía con el 2,4-D-TOP por los sitios de unión del MIP.

Piletsky y col. [209] desarrollaron una técnica para recubrir micropocillos con una fina capa de MIP y realizaron ensayos competitivos usando epinefrina marcada con peroxidasa de rábano (**HRP**). Para minimizar los efectos de unión inespecífica, el ensayo se realizó a pH 6-8. Los resultados obtenidos para la epinefrina son excelentes ya que el MIP sintetizado tuvo una gran especificidad y buena afinidad ($K_d = 9 \pm 2 \mu\text{mol L}^{-1}$), similar a los receptores naturales ($K_d = 4.6 \pm 0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$).

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

2

Como ya se expuso en el Capítulo II, uno de los objetivos del proyecto CREAM era el desarrollo de cartuchos basados en un sistema de detección óptico para la monitorización “*in situ*” de antibióticos β -lactámicos en leche, empleando polímeros de impronta molecular como elementos de reconocimiento.

En este sentido, el planteamiento inicial del trabajo que aquí se expone fue **diseñar y sintetizar MIPs** selectivos a antibióticos β -lactámicos que pudieran emplearse en ensayos fluorescentes para la determinación de estos compuestos. Con este fin, se diseñaron y sintetizaron, como se ha indicado en el Capítulo III de la Memoria, **penicilinas fluorescentes** con una estructura semejante a la de los analitos objeto de estudio, capaces de interaccionar con el MIP.

En consecuencia, y teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente Capítulo se describe la puesta a punto de un **ensayo fluorescente basado en el empleo de polímeros de impronta molecular para la cuantificación de antibióticos β -lactámicos** de tipo penicilinas empleando un sistema de análisis por inyección en flujo semiautomático. Dicho ensayo está basado en un formato competitivo directo en el que el antibiótico compite por los sitios específicos de reconocimiento del MIP con un derivado fluorescente de penicilina.

Los objetivos de este capítulo se indican a continuación:

1. Síntesis y caracterización de los MIPs utilizando como molécula plantilla PENG según las pautas establecidas por el grupo de M. Kempe (Lund, Suecia), responsable de este área en el proyecto CREAM.
2. Evaluación de la afinidad de los MIPs por los derivados β -lactámicos fluorescentes y selección de la pareja MIP/sonda fluorescente más adecuada para el desarrollo de un ensayo con óptimas prestaciones analíticas, en términos de sensibilidad.
3. Diseño de un sistema de inyección en flujo adecuado para la realización del ensayo.
4. Estudio de la influencia de diversas variables (eg. tiempo de incubación, concentración de polímero y sonda) sobre la sensibilidad y selectividad del ensayo.
5. Caracterización analítica del ensayo y evaluación de la reactividad cruzada frente a analitos relacionados estructuralmente con la PENG.
6. Aplicación del ensayo desarrollado al análisis de un preparado farmacológico de PENG.

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

a. Antibióticos β -lactámicos

- *Amoxicilina base anhidra*, en forma ácida, 87% (AMOX, Sigma).
- *Ampicilina trihidratada*, en forma de sal sódica, $\geq 86.6\%$ (AMPI, Sigma).
- *Penicilina G*, en forma de sal potásica, 95.7% (PENG, Sigma).
- *Penicilina V*, en forma de sal potásica, 93.7% (PENV, Sigma).
- *Oxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.8% (OXA, Sigma).
- *Cloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 91.8% (CLOX, Sigma).
- *Dicloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.2% (DICLOX, Sigma).
- *Nafcilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 87.9% (NAFCI, Sigma).
- *Cefapirina*, en forma de sal sódica (CEFAP, Sigma).
- *Ácido 6-aminopenicilánico*, 96% (6-APA, Aldrich).

b. Otros antibióticos

- *Norfloxacin*a, (NOR, Sigma).
- *Oxitetraciclina*, en forma de sal sódica (OXY, Sigma).
- *Doxiciclina*, en forma de hidrocloreuro, 93.7% (DOXY, Sigma).

- *Cloramfenicol*, > 98% (CLOR, Sigma).
- *Eritromicina*, en forma de sal sódica, 99.9% (ERY, Sigma).
- *Tetraciclina*, en forma de hidrocloreuro, 95% (TCY, Fluka).
- *Dapsona* (4,4'-diaminodifenil sulfona), \geq 97.0% (DDS, Fluka).

c. Inhibidores de las β -lactamasas

- *Ácido clavulánico*, en forma de sal de litio, 94.9% (CLAV). Cedido por la Prof. M. Kempe (Lund, Suecia).

3.1.2. DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS

a. Derivados de pireno

- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1-ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAP** [219].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilacetil)amino]etanoil}amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAM** [219].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{{(2*R*)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)etanoil}amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PAAX** [219].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(4-piren-1-ilbutanoil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PBAP** [219].
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2*R*)-2-fenil-2-[(piren-1-ilbutanoil)amino]etanoil}amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **PBAM** [219].

b. Derivados de dansilo

- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{{(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonil}amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **DAP**.
- *Ácido* [2*S*,5*R*,6*R*]-6-{{(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonil}amino}-2-feniletanoil}amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, abreviadamente **DAM**.

3.1.3. REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

a. Monómeros

- *Ácido metacrílico*, 99% (**MAA**, Sigma-Aldrich).
- *Metacrilamida*, 98% (**MAM**, Sigma-Aldrich).
- *4-vinilpiridina*, 95% (**4-VP**, Sigma-Aldrich).
- *2-hidroxietil metacrilato*, (**HEMA**, Sigma-Aldrich)
- *2-(dietilamino)etil metacrilato*, 99% (**DAEM**, Sigma-Aldrich).
- *Cloruro de (ar-vinilbenzil)trimetil amonio*, 99% (Sigma-Aldrich).
- *Acrilamida*, > 99% (**AMM**, Sigma-Aldrich).

b. Entrecruzantes

- *Trimetil propano trimetacrilato*, (**TRIM**, Aldrich).
- *Etilen glicol dimetacrilato*, 98% (**EDMA**, Sigma-Aldrich).

c. Iniciadores

- *1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo)*, 98% (**ABCHC**, Aldrich).
- *Azobisisobutironitrilo*, (**AIBN**, Acros).

d. Otros

- *N-terbutoxicarbonil-L-fenilalanina*, $\geq 98\%$ (**Boc-L-Phe-OH**, Fluka).
- *Acetonitrilo*, $\geq 98\%$ p.a. (Merck).

Los monómeros y entrecruzantes se purificaron mediante una extracción en columna utilizando una resina específica (Aldrich, Milwaukee, WI) que elimina los **inhibidores de la polimerización** (eg. hidroquinona) [163]. El iniciador AIBN se recrystalizó en metanol antes de su uso.

3.1.4. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

a. Disolventes orgánicos

- Metanol, 99.8% para HPLC (SDS).
- Acetonitrilo, > 99.8% para HPLC (SDS).

b. Reactivos para la preparación de disoluciones de trabajo

- Ácido clorhídrico, 35% p.a. (Panreac).
- Ácido sulfúrico, 96% p.a. (Merck).

c. Otros reactivos

- Agua purificada Milli-Q (Millipore).

d. Gases

- Nitrógeno C-55, 99.9995% (Carbueros metálicos).
- Argón N-45, 99.9995% (Praxair).

3.1.5. DISOLUCIONES

Todas las disoluciones acuosas se han preparado utilizando agua purificada mediante un sistema milli-Q (Millipore) y acetonitrilo para HPLC (SDS).

- *Disolución patrón de antibióticos 0.8 g L⁻¹*: Se disuelve la cantidad que corresponda de compuesto en 10 mL de mezcla hidroorgánica acetonitrilo/agua en proporción adecuada. Las disoluciones de trabajo, de menor concentración, se preparan diariamente por dilución de la disolución patrón. La disolución final contendrá acetonitrilo-agua en una proporción 99:1 (v/v).

- *Disolución patrón de derivados fluorescentes β -lactámicos 0.2 g L⁻¹*: Se disuelve 1 mg de sonda fluorescente en 5 mL de acetonitrilo. Se mantiene en atmósfera inerte (argón) a

-20 °C. Las disoluciones de menor concentración, se preparan diariamente por dilución de la disolución patrón en acetonitrilo-agua (99:1, v/v).

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

3.2.1. SISTEMA DE CONTROL Y MANEJO DE FLUIDOS

Para los ensayos en continuo se utilizó un sistema de manejo de fluidos semiautomático que consta de una **bomba automática de pistón**, con jeringa de 5 mL conectada a una válvula de distribución de 8 canales (“syringe pump”, módulo 50300 de Kloehn Co., Las Vegas, NV).

Además, dispone de una válvula de seis canales (Omnifit, EE.UU), una válvula de distribución de cuatro canales (Omnifit, EE.UU) y un sistema de filtración en línea (Kalibrant, Inglaterra).

3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS

- ***Espectrofotómetro Varian modelo Cary-3 Bio*** para la realización de espectros de absorbancia (UV-vis) conectado a un ordenador para la adquisición, tratamiento de datos y control del instrumento empleando el software original *Cary WinUV versión 3.1* (Varian Inc., Palo Alto, CA).

- ***Espectrofluorímetro Horiba-JY modelo SPEX Fluoromax-2*** provisto de una lámpara de arco de xenon (150 W) como fuente de excitación y un tubo fotomultiplicador R928P, de respuesta extendida al rojo. Además, el fluorímetro dispone de un compartimento termostatzado de cubetas con agitador magnético.

Para las medidas de los espectros de emisión de los derivados fluorescentes de penicilinas unidos a los polímeros de impronta molecular, se utilizó el espectrofluorímetro SPEX acoplado a una plataforma para fibra óptica (F-3000) y un cable de fibra óptica de cuarzo bifurcado de 1 m de longitud.

El instrumento está conectado a un ordenador para la adquisición y tratamiento de datos empleando el software original *Datamax Spectroscopy-Std versión 2.20* (Galactic Instruments, Salem, NH).

3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- Baño termostático Polyscience[®] 9015, con control digital de temperatura (± 0.5 °C).
- pH-metro Orion 710A/ISE dotado de un electrodo combinado de vidrio.
- Balanzas analíticas (Sartorius), con 0.1 mg de sensibilidad y Mettler AT261 DeltaRange[®], con 0.01 mg de sensibilidad.
- Célula de flujo para medidas de fluorescencia Hellma[®] modelo 176.050, con volumen interno de 450 μ L y paso óptico 10×4 mm.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Filtrador de disolventes (Afora), utilizado para el filtrado de las disoluciones empleadas con la bomba de jeringa.
- Agitador vortex, (Bio-vortex).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Micropipetas (Biohit) regulables de émbolo capilar de 50, 100, 200, 500 y 1000 μ L.
- Micropipetas electrónicas (Biohit) regulables de 1 y 8 canales de volumen variable.
- Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore.
- Bomba Minipuls-2 (Gilson).
- Programa de tratamiento y procesado de datos *Sigma Plot 8.0*, SPSS (2002), Microsoft Excel 2003 y *Table Curve 2D 5.0*, MMIV Systat Software (2004).

3.3. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y MEDIDA

3.3.1. SÍNTESIS DE LOS POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

Los polímeros se prepararon siguiendo un procedimiento descrito anteriormente [220] para la obtención de MIPs mediante impronta no covalente:

- Se pesa 1 mmol (372.5 mg) de PENG en un tubo de borosilicato (45 mL) y se suspende en 1 mL de acetonitrilo.
- Se añaden 10 mmol (860 μ L) de MAA y la mezcla se agita suavemente hasta que se observa la disolución total de la molécula plantilla. En ese instante, se incorpora una disolución de entrecruzante TRIM (15 mmol, 4.8 mL) y AIBN (0.6 mmol, 98.5 g), seguido de la cantidad restante de acetonitrilo (6.5 mL).
- La mezcla de prepolimerización se enfría y se purga con una corriente de nitrógeno durante 10 min.



Figura 46. Imagen del reactor fotoquímico utilizado para la polimerización de los polímeros de impronta molecular (longitud de onda de excitación 350 nm).

- Finalmente, el tubo de borosilicato se sitúa en un reactor fotoquímico ($\lambda = 350$ nm) durante 24 h a 4 °C obteniéndose un monolito de polímero insoluble que se muele y tamiza hasta obtener partículas micrométricas de tamaño uniforme (50 – 100 μ m).

Todos los polímeros empleados en esta Memoria se han preparado de forma análoga variando la naturaleza y concentraciones de los monómeros utilizados, como se indica en la tabla 29. Los polímeros de control (CP) se sintetizaron utilizando los mismos reactivos y proporciones pero empleando Boc-L-Phe-OH como molécula plantilla [30].

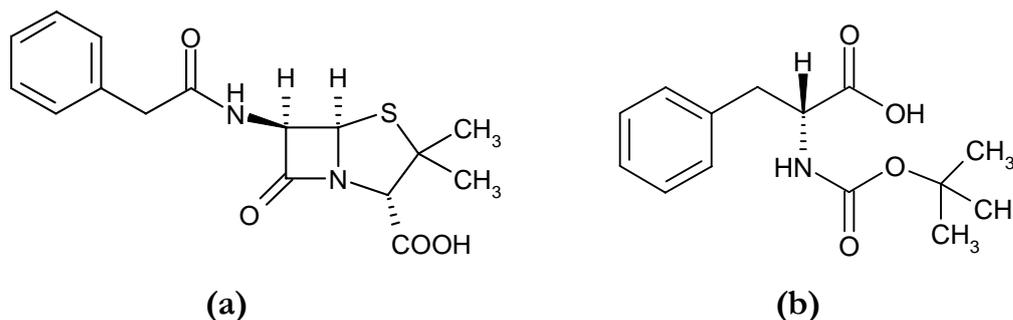


Figura 47. Estructuras de la PENG (a) y Boc-L-Phe-OH (b).

Tabla 29. Composición de la librería de MIPs (molécula plantilla: PENG: 1 mmol) estudiado en esta Memoria y polímero de control (CP) (molécula plantilla: Boc-L-Phen-OH: 1 mmol) [30].

MIP	Monómero, mmol	Entrecruzante, mmol	Iniciador, mmol	Disolvente porógeno, mL
1	MAA (10)	TRIM (15)	AIBN (0.6)	ACN (7.5)
2	MAA (10)	TRIM (40)	ABCHC (0.5)	ACN (8.0)
3	MAA (14)	EDMA (70)	AIBN (0.84)	ACN (14.4)
4	MAA-MAM (10:6)	TRIM (48)	ABCHC (0.64)	ACN (33.6)
5	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (28)	AIBN (0.4)	ACN (13.6)
6	MAA-HEMA (14:4)	EDMA (90)	AIBN (1.1)	ACN (25.5)

Abreviaturas: PENG: penicilina G, MAA: ácido metacrílico; HEMA: 2-hidroxiethylmetacrilato; MAM: metacrilamida; EDMA: etilen glicol dimetacrilato; TRIM: trimetil propano trimetacrilato; AIBN: Azobisisobutironitrilo; ABCHC: 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo).

3.3.1.1. EXTRACCIÓN DE LA MOLÉCULA PLANTILLA

La extracción de la molécula plantilla e impurezas fluorescentes del polímero se llevó a cabo mediante un procedimiento en etapas que se describe a continuación:

- Inicialmente, las partículas poliméricas se lavan mediante agitación automática con unas disoluciones metanol-ácido acético (1:4, v/v) ($3 \times 1 \text{ h} + 1 \times 16 \text{ h}$), metanol ($4 \times 25 \text{ min} + 1 \times 16 \text{ h}$), acetonitrilo ($3 \times 2 \text{ h} + 1 \times 120 \text{ h}$) y metanol ($4 \times 1 \text{ h} + 1 \times 72 \text{ h}$).
- A continuación, se realiza una extracción sólido-líquido con acetonitrilo mediante soxhlet durante 48 h. Se lavan de nuevo con acetonitrilo-agua (1:1, v/v) durante 48 h y se efectúa una nueva extracción en soxhlet con acetonitrilo puro durante 48 h.
- Finalmente, el sólido particulado se seca en un horno a vacío a 40 °C durante 48 h.

La fluorescencia de las sucesivas fracciones de lavado se evaluó en la región de 350-450 nm hasta observar que la última disolución no presentaba una señal diferenciable de la correspondiente al disolvente. Además, se cuantificó cromatográficamente la cantidad de PENG extraída en las dos últimas **etapas de soxhlet**, resultando ser el 0.15% y el 0.09% de la cantidad inicial de PENG, respectivamente.

3.3.2. SISTEMA DE MEDIDA EN FLUJO (FI)

El sistema que se ha utilizado para todos los ensayos MIA está basado en un sistema de inyección en flujo. La figura 48 representa un esquema del dispositivo de medida.

La disolución portadora (acetonitrilo-agua (99:1, v/v)), se conduce mediante una **bomba automática de pistón (A)**, con una jeringa de 5 mL, conectada a una **válvula de distribución** de 8 canales **(B)** (“*syringe pump*”, módulo 50300 de Kloehn Co., Las Vegas, NV). El sistema trabaja a base de aspirar y dispensar volúmenes fijos de disolución a un caudal de 6 mL min⁻¹.

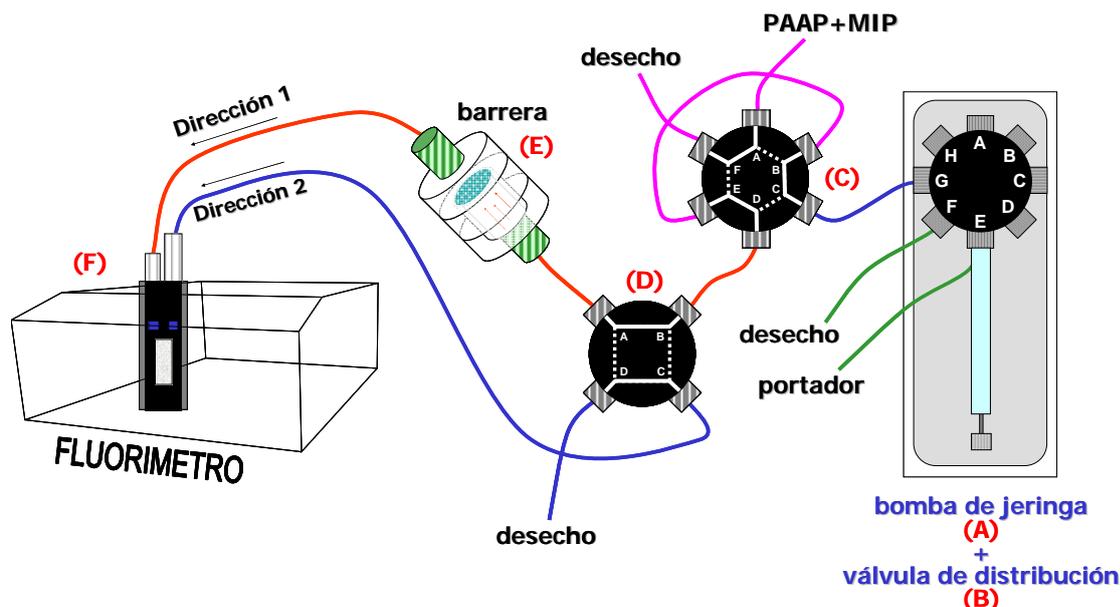


Figura 48. Esquema del dispositivo de medida empleado para el ensayo MIA desarrollado.

La muestra se introduce empleado una **válvula de inyección de 6 vías** (Omnifit, EE.UU) (bucle 200 μ L) (C) que se encuentra acoplada en serie al sistema de bombeo automático.

La salida de la válvula de inyección está conectada a otra **válvula de distribución de cuatro canales** (Omnifit, EE.UU) (D) que permite que el flujo pueda ser dirigido en dos direcciones distintas. En una posición (*dirección 1*), el portador es empujado a través de un sistema que actúa de **barrera** (E) (Kalibrant, Inglaterra) evitando el paso de partículas de MIP, con un tamaño superior a 20 μ m, hacia la célula de flujo alojada en el **fluorímetro** y termostaticada a 25°C, donde se realiza la medida (F). En la segunda posición, el flujo cambia de dirección (*dirección 2*) con el objeto de limpiar la barrera de partículas retenidas, eliminándolas al desecho.

La señal de fluorescencia se detecta de forma continua excitando en el máximo de la banda de absorción de los marcadores fluorescentes conjugados de penicilinas y midiendo la intensidad de emisión en el máximo de la banda cada 0.5 s (eg. PAAP, $\lambda_{exc} = 327$ nm y $\lambda_{em} = 376$ nm, $R_{exc}/R_{em} = 5/7$).

3.3.3. SISTEMA OPTOSENSOR

El dispositivo usado se muestra en la figura 49. La **microcélula de flujo (A)** fue fabricada en el Instituto de Microtecnología (IMT) de la Universidad de Neuchâtel (Suiza) con vidrio y silicio [221]. Las dimensiones de la cavidad interna son de $9.3 \times 2.0 \times 0.25$ mm, con un volumen interno aproximado de $5 \mu\text{L}$.

Las partículas de MIP, que previamente han sido incubadas con el fluoroderivado de penicilina, se introducen directamente en la célula (*entrada 1*), acoplada a un soporte conductor de fluidos (**B**), mediante una bomba peristáltica Minipuls-2 (Gilson) con tubo de PTFE (0.8 mm d. i.). Las partículas permanecen allí retenidas gracias a la barrera fotolitografiada situada en la *salida 2*.

La medida de fluorescencia se realiza con la fibra óptica (**C**) que se ajusta mediante un accesorio de PVC a la zona de lectura de la microcélula (**D**).

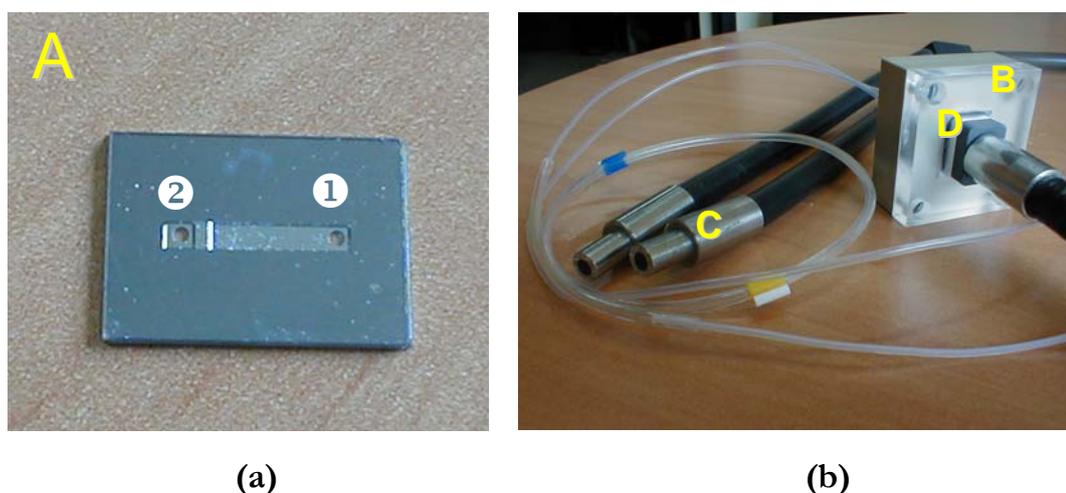


Figura 49. (a) Vista superior de la microcélula (1. Entrada del polímero; 2. Barrera), (b) Configuración del sistema de medida integrado por un soporte conductor de fluidos (B), donde se coloca la microcélula, la fibra óptica (C), y el accesorio de fibra óptica (D) para la medida de la fluorescencia.

3.3.4. PROTOCOLO DE ENSAYO DEL MIA

El esquema operativo está basado en los fundamentos del MIA, concretamente en un **fluoroensayo** con formato de tipo **heterogéneo competitivo directo** (ver figura 50).

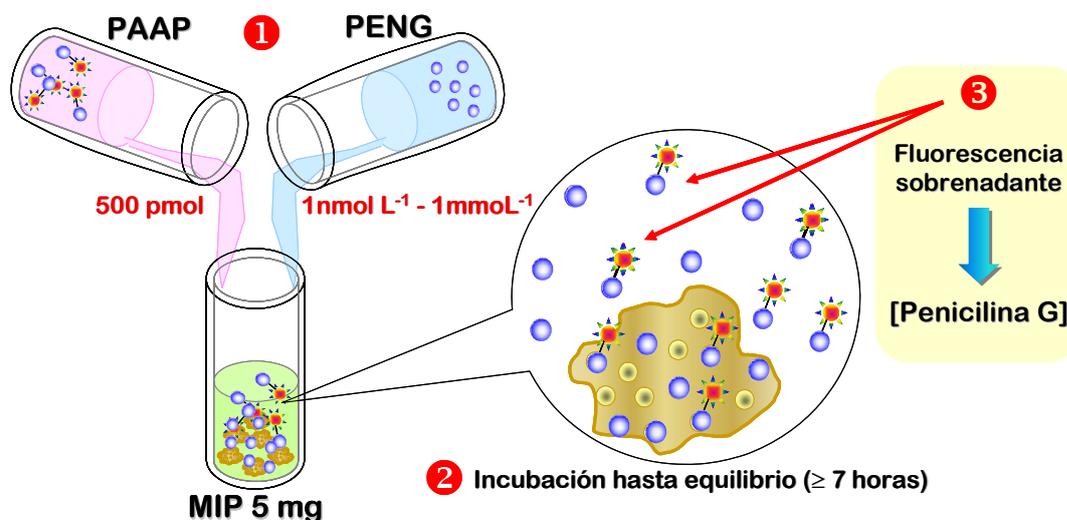


Figura 50. Esquema del procedimiento de medida empleado para el fluoroinmunoensayo desarrollado.

En primer lugar, 5 mg de partículas de MIP se mezclan con 500 pmol de PAAP y cantidades variables del analito patrón que corresponda (intervalo de concentración: 1 nmol L⁻¹ – 1 mmol L⁻¹), llevándose a un volumen final de 2 mL con acetonitrilo-agua (99:1, v/v).

A continuación, la mezcla se incuba durante 7 h a temperatura ambiente en tubos de polipropileno (5 mL) empleando un agitador orbital. Todas las disoluciones se preparan por triplicado y cada muestra se analiza 3 veces (n = 9).

La luminiscencia del sobrenadante se determina utilizando el sistema de medida descrito en el apartado 3.3.2. de esta sección.

La señal de fluorescencia que se obtiene en el espectrofotómetro es proporcional a la cantidad de marcador fluorescente (PAAP) que ha interactuado con el MIP. La respuesta experimental se normaliza utilizando la ecuación (11):

$$\text{Señal normalizada} = S_N = \frac{B}{B_0} \quad (11)$$

donde B es la señal de intensidad de fluorescencia medida en presencia de concentraciones crecientes de PENG y B₀ es la señal en ausencia de antibiótico.

El intervalo dinámico de trabajo se estableció mediante la realización del correspondiente calibrado competitivo en el que se representa la señal normalizada, obtenida a partir de la ecuación 11, en función del logaritmo de la concentración de PENG.

La curva de calibrado se ajustó a la ecuación paramétrica (12) [222]:

$$Señal\ normalizada = S_N = B_{min} + \frac{B_{max} - B_{min}}{1 + 10^{(\log[analito] - \log IC_{50})b}} \quad (12)$$

donde B_{max} corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima en ausencia de analito, $\log IC_{50}$ es el logaritmo de la concentración de analito en el punto de inflexión y B_{min} es la señal de respuesta del ensayo MIA en presencia de antibiótico en exceso.

3.4. ANALISIS DE MUESTRAS REALES

3.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G EN UN PREPARADO FARMACOLÓGICO

El fluoroensayo desarrollado basado en polímeros de impronta molecular, se ha empleado para el análisis de un medicamento antibiótico utilizado en prácticas veterinarias.

Erbacilina Enzimática 4+5 (Industrial Veterinaria, España) fue proporcionado por la Dra. Calista Rodríguez de la Facultad de Veterinaria (UCM, Madrid, España). La composición de la muestra por dosis es 1000000 U.I. (626.6 mg) de PENG en forma de sal potásica y 3000000 U.I. (3000 mg) de PENG en forma de sal procaína.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 20 mL de agua destilada y sonicando durante 10 min (valor nominal 347 mmol L⁻¹ de PENG). A continuación, 20 µL de la suspensión se diluyeron en 50 mL de acetonitrilo-agua hasta alcanzar una proporción final de los disolventes de 99:1 (v/v).

Para los estudios de recuperación, las muestras se enriquecieron independientemente con 20 μL y 40 μL de un patrón que contenía PENG potásica y PENG procaína (concentración total de PENG 349.6 mmol L^{-1}) en la misma proporción que el medicamento. Las disoluciones se llevaron a un volumen final de 50 mL, analizándose como se describe en el apartado 3.3.2..

El método desarrollado para la determinación de antibióticos β -lactámicos está basado en la utilización de MIPs como *materiales de reconocimiento selectivo* en un **fluoroensayo en fase heterogénea** (MIA). El formato de ensayo es de tipo **competitivo directo** en el que el analito y un antibiótico fluorescente compiten para unirse al polímero cuyos centros activos se encuentran en cantidad limitante.

4.1. SÍNTESIS DE UNA LIBRERÍA DE MIPs SELECTIVOS A PENG

Uno de los objetivos del proyecto europeo CREAM era la preparación de una librería de MIPs, siguiendo un procedimiento de impronta no covalente, empleando PENG como molécula plantilla. Dichos polímeros, así como los correspondientes polímeros blanco o de control (CP) sintetizados empleando Boc-L-Phe-OH como molécula molde, fueron preparados por la Dra. Maria Kempe de la Universidad de Lund [30].

En la tabla 30 se recogen las composiciones de los polímeros sintetizados destacándose los seleccionados para posteriores ensayos (*) [30].

Tabla 30. Composición de los polímeros de impronta molecular preparados en el marco del proyecto CREAM (MIP: molécula plantilla PENG 1 mmol; CP: molécula plantilla Boc-L-Phen-OH 1 mmol) [30].

MIP/CP	Monómero, mmol	Entrecruzante, mmol	Disolvente porógeno, mL
1*	MAA (10)	TRIM (15)	ACN (7.5)
2*	MAA (10)	TRIM (40)	ACN (8.0)
3*	MAA (14)	EDMA (70)	ACN (14.4)
4*	MAA-MAM (10:6)	TRIM (48)	ACN (33.6)
5*	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (28)	ACN (13.6)
6*	MAA-HEMA (14:4)	EDMA (90)	ACN (25.5)
7	MAA (8)	TRIM (8)	ACN (5.2)
8	MAA (10)	TRIM (10)	ACN (7.5)
9	MAA (10)	TRIM (20)	ACN (7.5)
10	MAA (10)	TRIM (30)	ACN (7.5)
11	MAA (10)	TRIM (50)	ACN (7.5)
12	MAA (16)	TRIM (16)	ACN (6.1)
13	MAA (24)	TRIM (24)	ACN (6.0)
14	MAA (24)	TRIM (24)	ACN (12.0)
15	MAA (32)	TRIM (32)	ACN (12.0)
16	MAA (32)	TRIM (32)	ACN (20.0)
17	MAA (10)	EDMA (60)	ACN (10.2)
18	MAA (14)	EDMA (70)	ACN (8.0)
19	MAA (14)	EDMA (70)	ACN (10.0)
20	MAA (14)	EDMA (70)	ACN (18.0)
21	MAA-MAM (10:2)	TRIM (20)	ACN (10.7)
22	MAA-MAM (10:4)	TRIM (20)	ACN (10.7)
23	MAA-MAM (10:6)	TRIM (20)	ACN (10.7)
24	MAA-MAM (10:8)	TRIM (20)	ACN (10.7)
25	MAA-MAM (10:10)	TRIM (20)	ACN (10.0)
26	MAA-MAM (10:10)	TRIM (60)	ACN (30.0)
27	MAA-MAM (10:10)	TRIM (80)	ACN (40.0)
28	MAA-MAM (10:2)	EDMA (100)	ACN (30.0)
29	MAA-MAM (10:4)	EDMA (100)	ACN (30.0)
30	MAA-MAM (10:6)	EDMA (100)	ACN (30.0)
31	MAA-MAM (10:8)	EDMA (100)	ACN (30.0)
32	MAA-MAM (10:10)	EDMA (40)	ACN (20.0)
33	MAA-MAM (10:10)	EDMA (80)	ACN (24.0)
34	MAA-MAM (10:10)	EDMA (120)	ACN (35.0)
35	MAA-MAM (10:12)	EDMA (100)	ACN (30.0)
36	MAA-HEMA (10:5)	TRIM (15)	ACN (7.2)
37	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (12)	ACN (5.7)
38	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (16)	ACN (7.7)
39	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (32)	ACN (15.5)
40	MAA-HEMA (10:8)	TRIM (18)	ACN (8.7)
41	MAA-HEMA (10:10)	TRIM (20)	ACN (10.5)
42	MAA-HEMA (10:6)	TRIM (24)	ACN (11.6)
43	MAA-HEMA (12:6)	TRIM (20)	ACN (9.6)
44	MAA-HEMA (10:2)	EDMA (36)	ACN (10.2)

Tabla 30. Composición de los polímeros de impronta molecular preparados en el marco del proyecto CREAM (MIP: molécula plantilla PENG 1 mmol; CP: molécula plantilla Boc-L-Phen-OH 1 mmol) [30] (continuación).

MIP/CP	Monómero, mmol	Entrecruzante, mmol	Disolvente porógeno, mL
45	MAA-HEMA (10:2)	EDMA (48)	ACN (13.6)
46	MAA-HEMA (10:2)	EDMA (50)	ACN (7.1)
47	MAA-HEMA (10:2)	EDMA (60)	ACN (17.0)
48	MAA-HEMA (11:2)	EDMA (72)	ACN (20.4)
49	MAA-HEMA (11:2)	EDMA (84)	ACN (23.8)
50	MAA-HEMA (14:8)	EDMA (110)	ACN (31.2)
51	MAA-HEMA (14:10)	EDMA (120)	ACN (33.9)
52	MAA-HEMA (14:12)	EDMA (130)	ACN (36.8)

Abreviaturas: MAA: ácido metacrílico; HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato; DAEM: N,N-dietyl-2-aminoetilmetacrilato; MAM: metacrilamida; EDMA: etilen glicol dimetacrilato; TRIM: trimetil propano trimetacrilato; ACN: acetonitrilo; AIBN: azobisisobutironitrilo; ABCHC: 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo).

La selección de los monómeros y entrecruzantes se realizó de forma que la interacción con la molécula plantilla fuera máxima y que se favoreciese el reconocimiento del antibiótico en medio acuoso. Una de las principales limitaciones encontradas en esta etapa fue la baja solubilidad de la penicilina potásica en acetonitrilo, porógeno empleado en la obtención de los polímeros para favorecer las interacciones por enlace de hidrógeno. Los MIP/CP sintetizados se evaluaron en ensayos de tipo competitivo empleando PENG radiactiva [30,223]. De todos ellos, a partir de los resultados obtenidos en los radioensayos, se seleccionó una sublibrería de seis polímeros (MIP1-6, tabla 30) para evaluar su comportamiento frente a las β -lactamas fluorescentes.

4.2. EVALUACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS MIPs POR LOS DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES

Uno de los factores limitantes para la aplicación de ensayos fluorescentes en MIA utilizando conjugados marcados es la falta de reconocimiento de estas moléculas por parte de los centros activos del polímero de impronta molecular [224]. Para evaluar el grado de interacción de los derivados fluorescentes de penicilinas con los MIPs selectivos a PENG, se determinó la reactividad cruzada de cada uno de éstos

compuestos mediante ensayos de tipo competitivo utilizando PENG marcada radiactivamente.

Con este fin se incubaron los MIPs seleccionados (0.1 mg) con 1 pmol de [fenil-4(n)- 3 H]bencil-penicilina y 1 mL de una disolución de sonda fluorescente de concentración variable (1 nmol L $^{-1}$ – 1 mmol L $^{-1}$) preparada en acetonitrilo-agua (99:1, v/v) (MIPs 1, 2 y 4) o acetonitrilo-agua (98:2, v/v) (MIPs 3, 5 y 6) durante 16 h. Seguidamente, la mezcla se centrifugó evaluándose la radioactividad del sobrenadante. Este tipo de ensayo es muy sensible y proporciona una información muy útil para la posterior optimización del ensayo MIA [211].

En la figura 51 y tabla 31, se muestra el porcentaje de reactividad cruzada (RC) correspondiente a cada uno de los conjugados fluorescentes ensayados frente a la penicilina G marcada radiactivamente.

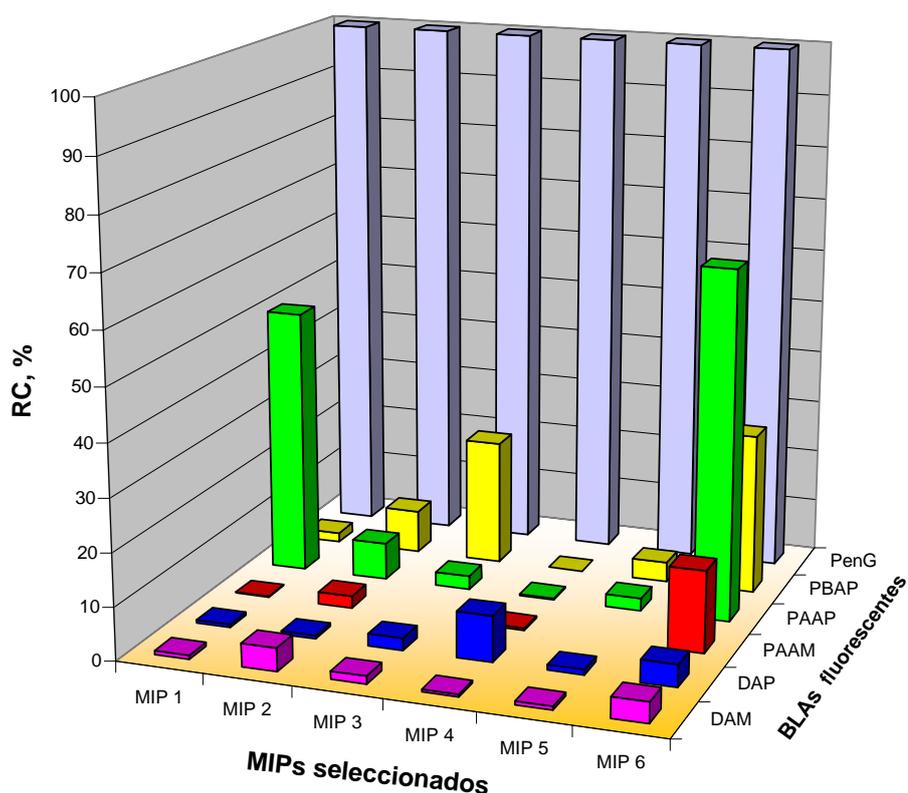


Figura 51. Reactividades cruzadas (%) de los antibióticos β -lactámicos fluorescentes vs PENG marcada radiactivamente, para los MIPs preseleccionados, obtenidas mediante radioensayos competitivos. Disolvente de ensayo: acetonitrilo-agua (99:1, v/v) para MIP 1, 2 y 4 y acetonitrilo-agua (98:2, v/v) para MIP 3, 5 y 6. [[fenil-4(n)- 3 H]bencil-penicilina] = 1 nmol L $^{-1}$ en todos los casos.

A la vista de los resultados obtenidos, los derivados del marcador fluorescente dansilado (DAP y DAM) demuestran tener poca afinidad por los sitios de unión de los seis polímeros seleccionados ($RC < 9\%$).

Tabla 31. Reactividades cruzadas (%) de los antibióticos β -lactámicos fluorescentes vs PENG marcada radiactivamente para los MIPs preseleccionados, obtenidas mediante ensayos competitivos. Disolvente de ensayo: acetonitrilo-agua (99:1, v/v) para MIP 1, 2 y 4 y acetonitrilo-agua (98:2, v/v) para MIP 3, 5 y 6. $[[\text{fenil-4}(n)\text{-}^3\text{H}]\text{bencil-penicilina}] = 1 \text{ nmol L}^{-1}$ para todos los casos.

Competidor	MIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP5	MIP6
PENG	100	100	100	100	100	100
PAAP	50.4	7.0	2.6	0.3	2.4	66.0
PAAM	0.2	2.3	n.d.	0.4	n.d.	15.5
PBAP	1.8	8.2	23.8	0.0	3.8	30.4
DAP	0.6	0.6	2.3	8.7	1.0	4.2
DAM	0.8	4.4	1.5	0.5	0.7	3.9

El MIP1 es capaz de reconocer selectivamente al derivado de pireno PAAP, mientras que el PBAP presenta un porcentaje de unión hacia el MIP6 significativo (30.4%), aunque de menor magnitud que el PAAP (66%).

La diferencia en la capacidad de unión de ambas sondas hacia los MIPs se produce probablemente a consecuencia del mayor grado de libertad conformacional del PBAP, debido a la mayor longitud del brazo espaciador existente entre la entidad fluorescente y la región penicilínica. Por otro lado, el derivado de pireno de la ampicilina (PAAM), es reconocido exclusivamente por el MIP6. De hecho, los estudios realizados con el MIP6 mostraron una baja selectividad de reconocimiento de los distintos antibióticos β -lactámicos, al contrario de lo que sucedía con el MIP1 que presentaba una elevada selectividad frente a la PENG.

Las estructuras tridimensionales de la PENG y el PAAP (figura 52) presentan una **conformación compacta** que parece ser el factor que determina la efectividad del reconocimiento de la β -lactama aril-sustituída por parte del MIP1. Concretamente, la existencia del grupo metileno en la parte bencílica de la molécula, podría ser la clave por la que la molécula huésped adopta la forma complementaria a la presentada por la cavidad específica del MIP1. De este modo, el DAP, DAM y PBAP, que no presentan

dicho grupo, adoptan una disposición espacial mucho más abierta y no son reconocidos por el polímero.

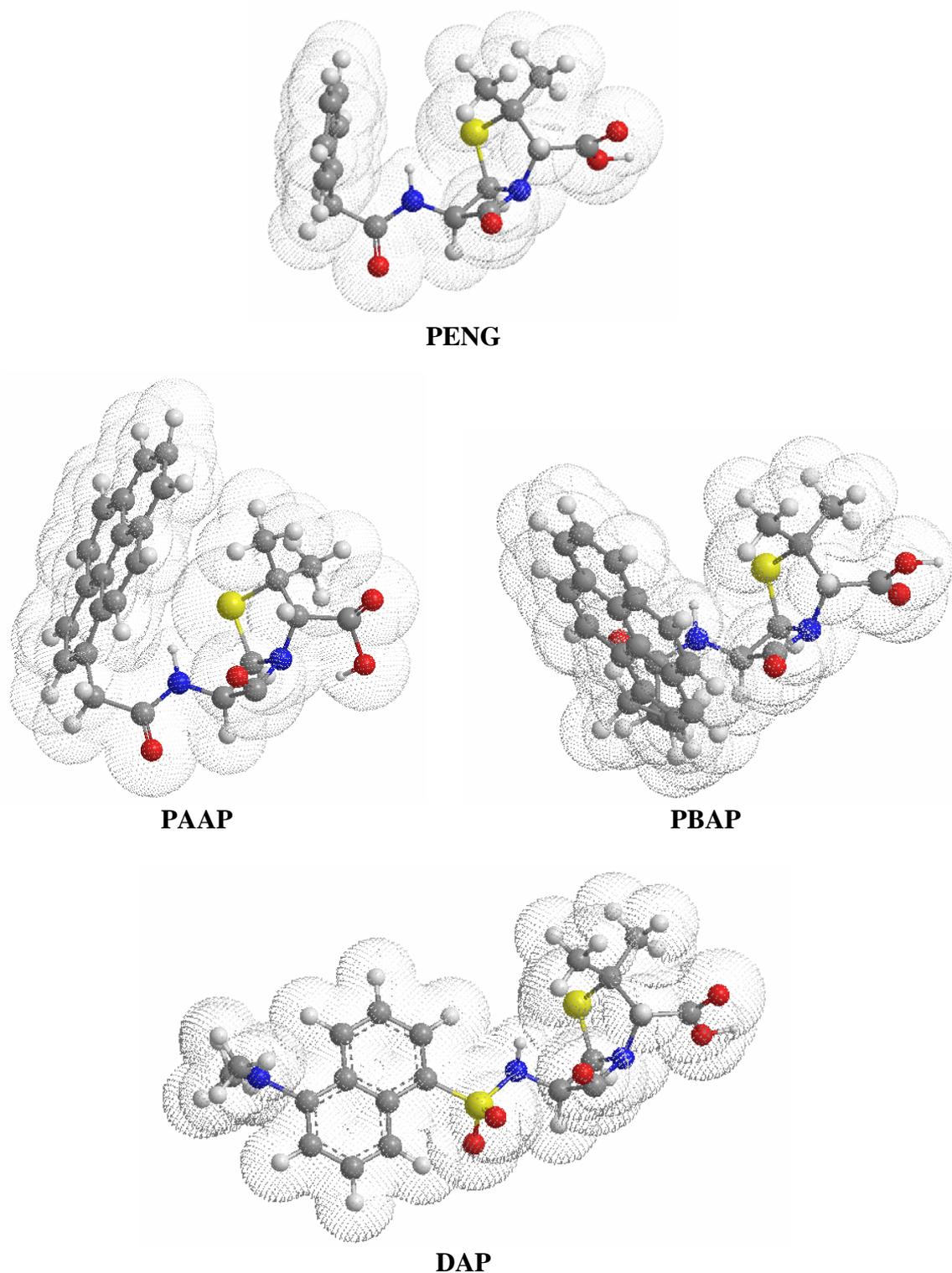


Figura 52. Estructura tridimensional de mínima energía (AM-1) para PENG, PAAP, PBAP y DAP. Con fines comparativos, se mantiene, en todas las estructuras, la misma orientación espacial del anillo tiazolinídico fusionado con el ciclo β -lactámico.

Estos resultados demuestran la importancia de la geometría molecular de los derivados fluorescentes en su reconocimiento por parte de los polímeros de impronta. De hecho, este es el primer estudio descrito en la bibliografía [222] en el que se demuestra la importancia del diseño molecular del análogo fluorescente en el éxito de los ensayos de tipo competitivo.

Por otra parte, el tamaño de la molécula también influye en el porcentaje de unión específica al polímero. Ejemplo de ello es la ausencia de interacción del PAAM (figura 17, Capítulo III, apartado 4.1.1.) y el MIP1, a pesar de poseer un grupo metileno semejante al PAAP y la PENG.

4.3. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO DE IMPRONTA MOLECULAR MIP1

4.3.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Una vez seleccionado el polímero de impresión molecular óptimo para el desarrollo del MIA, se procedió a su caracterización morfológica. Para ello, se obtuvieron imágenes superficiales del MIP1 y el CP1 mediante Microscopía de Barrido Electrónico. Las micrografías correspondientes se muestran en la figura 53.

En ambos polímeros se puede apreciar, a rasgos generales, una superficie macroporosa, que concuerda con el perfil descrito en la bibliografía [225] para MIPs sintetizados con acetonitrilo como disolvente porógeno.

Por otro lado, tanto el MIP1 como el polímero de control CP1, presentan una morfología similar a un conglomerado de pequeñas partículas pseudoesféricas que alterna pequeñas cavidades frente a otras mayores. Esta textura coincide con la que se suele obtener cuando se utiliza ácido metacrílico como monómero funcional [99].

Finalmente, cabe destacar la existencia de pequeñas diferencias superficiales entre ambos polímeros. El CP1 presenta un perfil más denso y uniforme que el MIP1, en el que se observa una superficie con mayor número de cavidades y porosidad. Esta

circunstancia vendrá dada por la diferente naturaleza de las moléculas plantilla utilizadas en la síntesis de ambos polímeros.

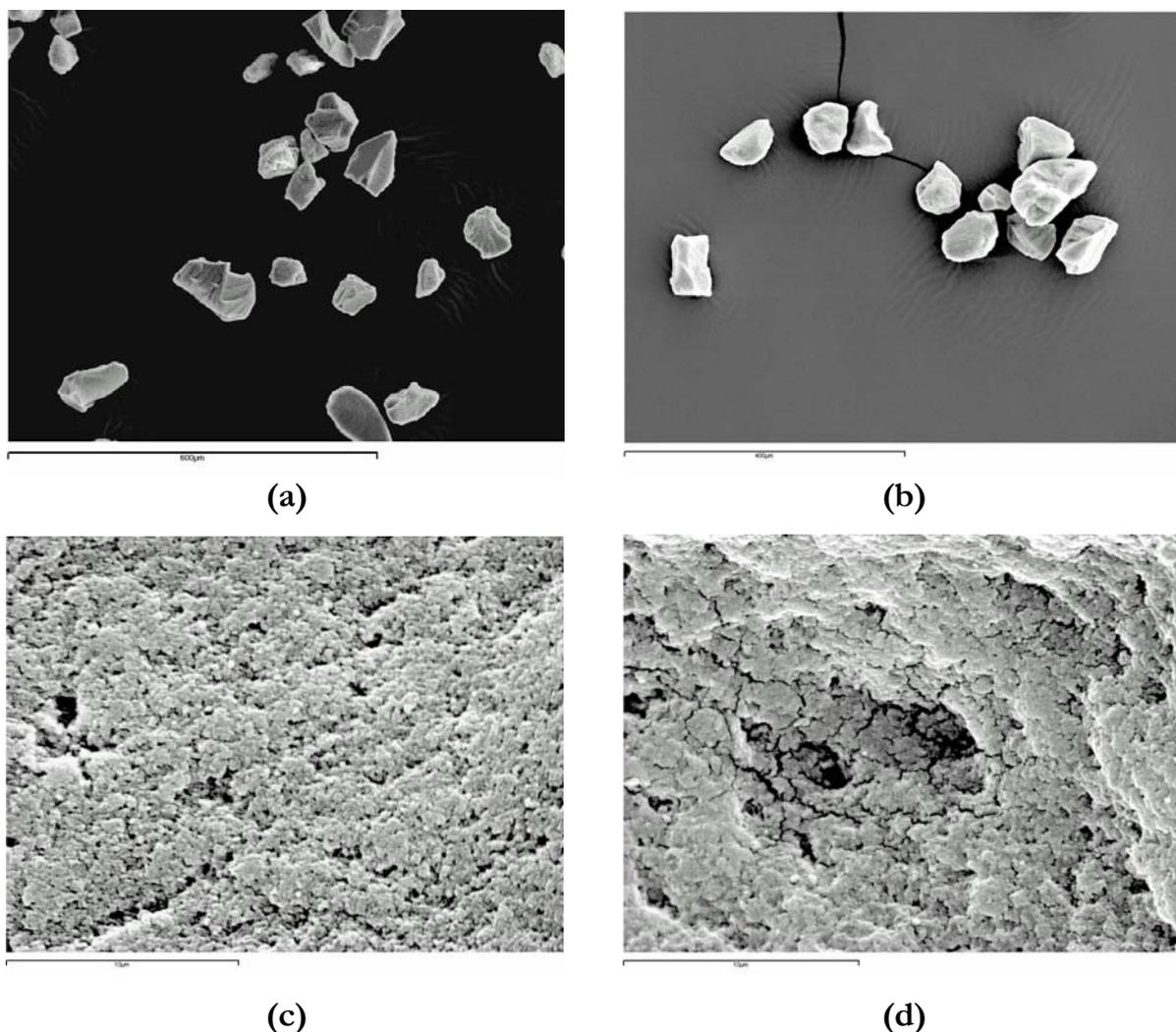


Figura 53. Micrografías de barrido electrónico del MIP1 (a) referencia de escala 600 μm y (c) referencia de escala 10 μm y CP1 (b) referencia de escala 400 μm y (d) referencia de escala 10 μm . Tamaño de partícula del MIP1 y CP1 50 – 100 μm .

4.3.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE POROSIMETRÍA DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DE NITRÓGENO

El uso de medidas de adsorción de gases para la determinación del área superficial y la distribución de tamaños de poro en materiales sólidos, está muy extendido y se ha aplicado satisfactoriamente en la caracterización de adsorbentes industriales, catalizadores, pigmentos, etc.

La medida de adsorción en la interfase gas/sólido forma también parte esencial de muchas investigaciones fundamentales y aplicadas sobre la naturaleza y el comportamiento de las superficies sólidas, como es el caso de los polímeros de impronta molecular (MIPs) [226].

El primer paso en la interpretación de una isoterma de fisisorción consiste en **identificar el tipo de isoterma**. En la figura 54 se recoge la isoterma del polímero de impronta (MIP1) y del polímero de control (CP1). Ambas isotermas se pueden clasificar como **tipo IV** según la IUPAC [227,228].

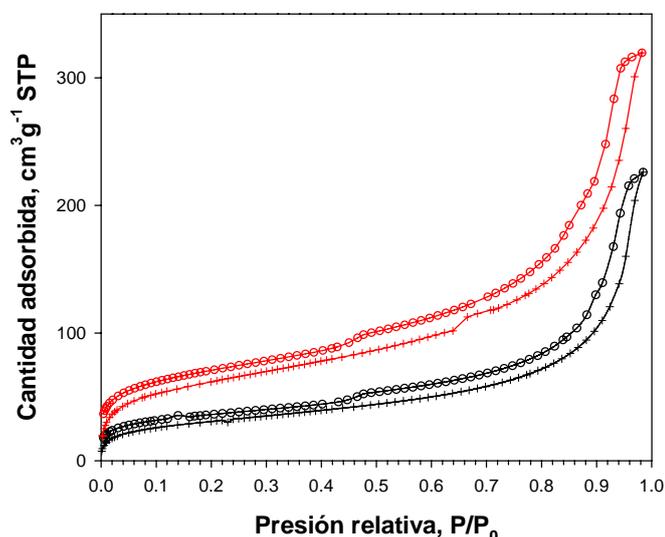


Figura 54. *Isoterma de (+) adsorción y (o) desorción de N₂ a 77 K para el (●) MIP1 y el (●) CP1 (ca. 0.2 g en peso seco) y adquiridas mediante el analizador TRISTAR 3000 (Micromeritics, Münchegladbach, Germany) después de desgasificar las muestras a 50 °C durante 2h.*

Este tipo de isoterma indica la **presencia de mesoporos** (2 – 50 nm) y se caracteriza por una parte inicial que crece exponencialmente cerca de la región $P/P_0 = 1$ lo que implica, a su vez, la existencia de **macroporos**. Esta última observación se correlaciona con los resultados obtenidos para ambos polímeros mediante espectroscopía SEM (apartado 4.3.1). Además, el hecho de que ambos materiales sean mesoporosos, confirma el hecho de que en ambos sólidos se ha realizado una impronta efectiva por parte de las dos moléculas plantilla, PENG (MIP) y Boc-L-Phe-OH (CP).

Por otro lado, las isothermas de tipo IV presentan un **bucle de histéresis** que en ambos casos es intermedio entre **H1** y **H3**. El primero se asocia habitualmente con materiales porosos formados por aglomerados o empaquetamientos compactos de esferas que dan lugar a mesoporos en forma de cilindros y el segundo, que no presenta una adsorción límite a P/P_0 alta, aparece en agregados en forma de placas que dan lugar a mesoporos en forma de rendijas [204].

Asimismo, en ambas isothermas se observa una pequeña caída hacia $P/P_0 = 0.4 - 0.5$ y se comprueba que ninguna se cierra a baja presión (histéresis a baja presión). Este fenómeno podría explicarse considerando que el adsorbato (N_2) que hay entre rendijas se va eliminando progresivamente de manera que las “láminas” que forman las rendijas se van aproximando pero sin llegar a tocarse del todo.

4.3.2.1. DETERMINACIÓN DEL ÁREA SUPERFICIAL: APLICACIÓN DEL MÉTODO BET Y REPRESENTACION “t-PLOT”

El método de **Brunauer-Emmet-Teller (BET)** de adsorción de gases, se ha convertido en el procedimiento estándar más ampliamente utilizado para la determinación del área superficial de materiales finamente divididos y porosos [229].

El cálculo del área superficial a partir de la capacidad de adsorción de una monocapa del material adsorbente, llamada con frecuencia área BET, requiere un conocimiento del **área media a_m** (área por molécula adsorbida) ocupada por la molécula de adsorbato en la monocapa (para N_2 a 77 K, $a_m = 0.1620 \text{ nm}^2$). Entonces:

$$A_s(\text{BET}) = Q_m L a_m \quad (13)$$

$$a_s(\text{BET}) = A_s(\text{BET})/m \quad (14)$$

donde A_s (BET) y a_s (BET) son las áreas superficiales total y específica, respectivamente, del adsorbente (de masa m), Q_m es la capacidad de adsorción de la monocapa y L es la constante de Avogadro.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en la tabla 32 se muestran los parámetros obtenidos a partir de la aplicación del método BET para el cálculo del área superficial de los polímeros MIP1 y CP1.

Tabla 32. Área superficial y parámetros característicos obtenidos a partir de la representación lineal de la ecuación BET para el MIP1 y el CP1 [229].

Variable	MIP1	CP1
Área (BET), m ² /g	110 ± 1	220 ± 1
Pendiente, g/cm ³ STP	0.03916 ± 0.0004	0.019675 ± 0.00009
Ordenada en el origen, g/cm ³ STP	0.00039 ± 0.00007	0.00015 ± 0.00002
C	101.25	132.50
Q _m , cm ³ /g STP	25.2834	50.4429
r	0.9992	0.9998
a _m , nm ²	0.1620	0.1620

Abreviaturas: Q_m: capacidad de la monocapa, a_m: área por molécula adsorbida (N₂, T = 77 K), C: indicador de la magnitud de la energía de interacción adsorbente-adsorbato (valor recomendado C~100).

En la figura 55 se representa la relación entre P/P₀ y 1/(Q[P₀/P-1]) de la ecuación BET para ambos polímeros.

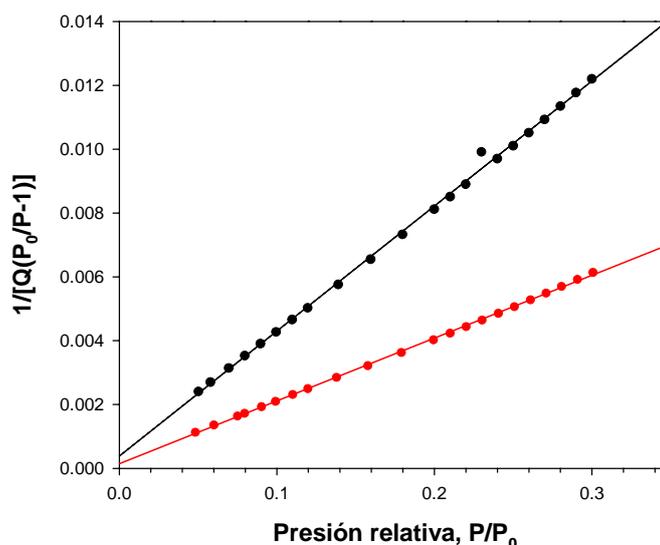


Figura 55. Representación lineal de la ecuación BET para el (●) MIP1 y el (●) CP1.

Debe tenerse en cuenta que el análisis BET no contempla la posibilidad de llenado de los **microporos**, el cual viene generalmente asociado con un valor alto de C (> 200). En este caso, el volumen de microporosidad puede evaluarse por medio de un método semi-empírico de análisis, basado en las **ecuaciones de Harkins-Jura**, denominado “**t-plot**”. La curva “**t-plot**” representa la cantidad adsorbida frente a t, es decir, el espesor de la multicapa que forma el gas adsorbido en la superficie de los poros, calculado a partir de la isoterma de adsorción.

Tabla 33. Volumen de microporos y parámetros característicos obtenidos a partir de la representación lineal “t-plot” para MIP1 y CP1 [118].

Variable	MIP1	CP1
Volumen de microporos, cm ³ /g STP	0.005417	0.020047
Área de microporo, m ² /g	12.5629	42.9464
Área de superficie externa, m ² /g	97.5007	176.6416
Intervalo de espesor, nm	0.46 – 0.70	0.50 – 0.80

Las curvas “t-plot” de la figura 56, para el MIP1 y el CP1, muestran un perfil que indica que ambos polímeros presentan un ligero llenado de microporos a bajos niveles de P/P₀ ($t < 0.4$). El volumen de microporos se obtiene por intersección de la recta que resulta de ajustar la zona lineal de la curva “t-plot” con el eje del volumen adsorbido (tabla 33). En este caso, el polímero que presenta mayor microporosidad es el CP1.

Por otra parte, en la región de mayor nivel de P/P₀ ($t > 0.5$) se observa, en ambas muestras, un cambio de pendiente que aumenta positivamente debido a la presencia de mesoporos [230,231], como ya fue confirmado por el tipo de isoterma de adsorción obtenida (tipo IV).

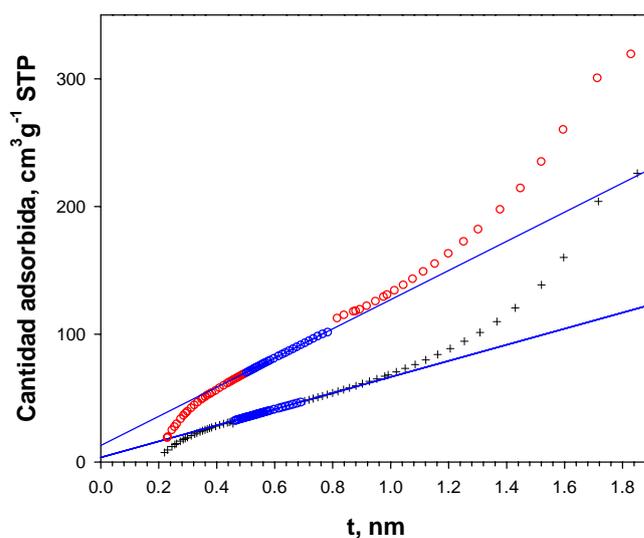


Figura 56. Curvas “t-plot” para el (●) MIP1 y el (●) CP1.

4.3.2.2. EVALUACIÓN DE LA MESOPOROSIDAD

La **distribución de tamaños de poro (PSD)** indica la distribución de los volúmenes de poro respecto a su tamaño. El cálculo de la distribución de tamaño de poro requiere un cierto número de hipótesis (forma de los poros, mecanismo de llenado, etc.).

La PSD se determina con el método de **Barret-Joyner-Halenda (BJH)** [207] sobre la curva de desorción. Éste método está basado en la ecuación de condensación capilar de Kelvin [207].

De forma estricta, su aplicación es fiable para poros de diámetro superior a 2 nm, por lo que suele emplearse en el intervalo comprendido entre 2 y 300 nm. El modelo BJH se utiliza para la evaluación de materiales mesoporosos donde el volumen total de poro se obtiene a partir de la cantidad de vapor adsorbida a una presión relativa cercana a la unidad, suponiendo que todos los poros están llenos de N₂ condensado (77K).

En la figura 57 se representan las distribuciones de poro obtenidas a partir de la rama de adsorción (a) y desorción (b) para el MIP1 y el CP1. La rama de adsorción nos da una idea del volumen de las cavidades dentro del polímero, mientras que la de desorción nos informa sobre la distribución de los poros que conectan con el exterior. Como se puede observar, ambos polímeros tienen una distribución ancha, lo cual implica que existen poros en un amplio intervalo de tamaños.

En el caso del CP1 el diámetro más probable se haya entorno a 15 nm y para el MIP1 la distribución se encuentra ligeramente desplazada hacia diámetros de poro mayores, con valores máximos en la región de 20 nm.

Este resultado podría justificarse por el hecho de que el tamaño de la plantilla de PENG es mayor que la de Boc-L-Phe-OH (ver figura 58) y, por tanto, el tamaño de poro obtenido por la impronta de PENG será ligeramente mayor que el obtenido empleando por la Boc-L-Phe-OH.

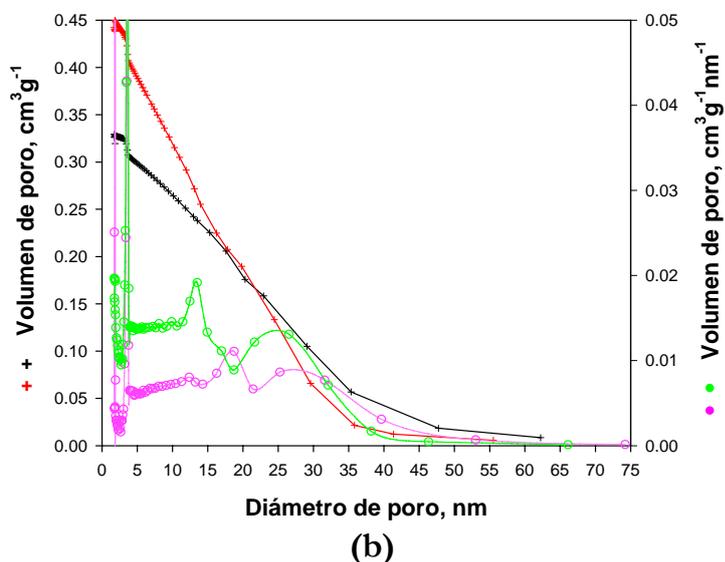
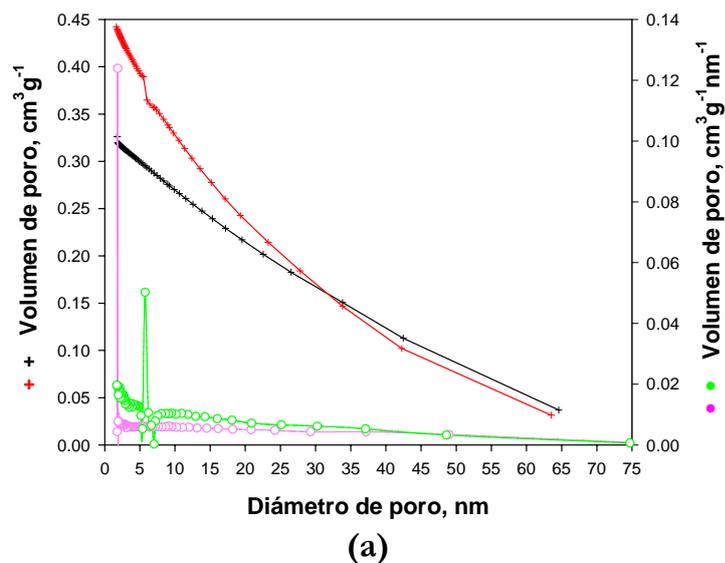


Figura 57. Distribución de mesoporos para (+, •) MIP1 y (+, •) CPI a partir de (a) la isoterma de adsorción y (b) la isoterma de desorción.

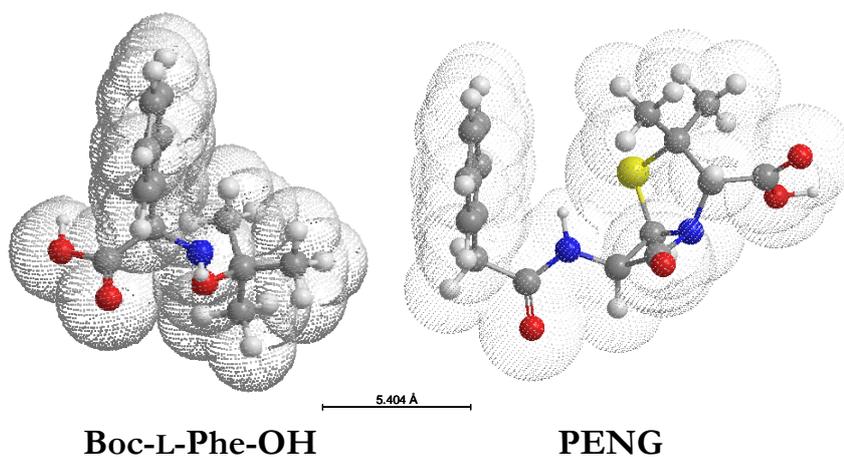


Figura 58. Estructura tridimensional de mínima energía (AM-1) para PENG y Boc-L-Phe-OH.

4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN ESPECÍFICA DEL MIP1 PARA EL PAAP

Una vez seleccionada la pareja de MIP y de penicilina fluorescente que proporcionaba la mejor respuesta, en términos de selectividad y sensibilidad, se evaluó la constante de unión del PAAP al MIP1. Para ello, se tomaron distintas concentraciones de penicilina fluorescente ($50.0 \text{ nmol L}^{-1} - 1.67 \text{ mmol L}^{-1}$) y una cantidad constante de polímero incubando la mezcla durante 7 h con agitación continua para facilitar que se alcance el equilibrio.

A continuación, se evaluó la cantidad de PAAP libre presente en el sobrenadante empleando medidas de fluorescencia. Para la obtención de las isotermas de adsorción se representó la cantidad de antibiótico fluorescente (PAAP) unido al polímero por unidad de masa (B) en función de la concentración de PAAP que queda libre (F) en disolución. Del mismo modo se evaluó la unión entre el PAAP y el polímero de control (CP1).

Como puede observarse en la figura 59A y 59B, la unión del PAAP al polímero MIP1 se ajusta una isoterma de adsorción no lineal en todo el intervalo de concentración ensayado. Esta desviación de la linealidad, observada también por otros autores [232], suele atribuirse a la naturaleza microheterogénea de los sitios de unión del luminóforo al polímero.

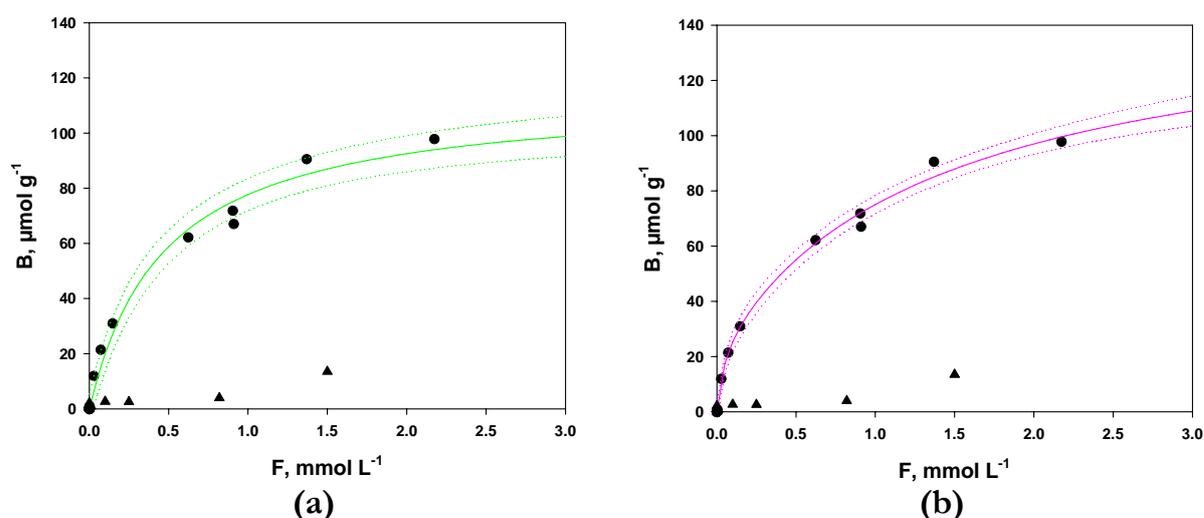


Figura 59A. Isotermas de adsorción del (●) MIP1 ($n = 34$) y (▲) del CP1 ($n = 12$) ajustadas a diferentes modelos matemáticos de adsorción : (a) Langmuir, (b) Bi-Langmuir. Resultados obtenidos con el programa Table Curve 2D 5.0, Systat Software (2004) y contrastados con el programa Sigma Plot 8.0, SPSS (2002).

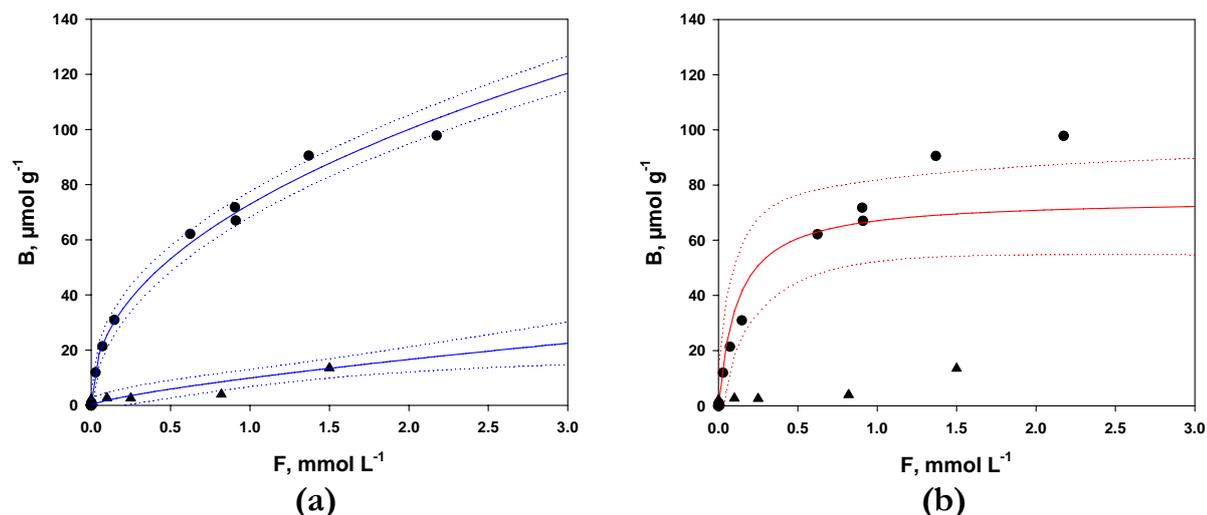


Figura 59B. (a) Freundlich y (b) Freundlich-Langmuir. Ver figura 59A.

Así, dado que las moléculas de PAAP se unen a posiciones no equivalentes de distinta accesibilidad, existirán tantas constantes de unión como tipos de centros de unión disponibles, aunque es posible calcular una constante que sea el promedio ponderado de todas ellas.

Para analizar la isoterma de adsorción obtenida debe establecerse un ajuste matemático adecuado a los puntos experimentales obtenidos. En este sentido, Sellergren [233] y otros autores [111] han descrito la aplicación de diversos modelos mecanísticos para el ajuste, que resumimos brevemente a continuación:

- **Modelo de distribución discreta.** Las isotermas de este tipo que más se han utilizado para caracterizar polímeros de impronta molecular son la *isoterma de adsorción de Langmuir (LI)* (5) y la *isoterma de adsorción de Bi-langmuir (BLI)* (6). El modelo Langmuir asume la existencia de un solo sitio de unión y una superficie homogénea, mientras que el modelo Bi-Langmuir, extensión del primero, tiene en cuenta la existencia de una superficie heterogénea con dos clases de sitios de unión.

$$B = \frac{qkF}{1 + kF} \quad (5)$$

$$B = \frac{q_1k_1F}{1 + k_1F} + \frac{q_2k_2F}{1 + k_2F} \quad (6)$$

Dado que los polímeros de impronta molecular se caracterizan por poseer centros de unión de afinidad heterogénea, la isoterma de Langmuir no proporciona

ajustes adecuados, mientras que el modelo de Bi-Langmuir, estima los parámetros de unión correctamente cuando la capacidad de unión de los dos sitios difiere significativamente ($q \times k$) [234].

- **Modelo de distribución continua.** Debido a las limitaciones de los modelos discretos para la caracterización de la unión selectiva de los MIPs, se han aplicado recientemente [116,235] modelos de distribución continua tales como la *isoterma de adsorción de Freundlich* (**FI**) (4) y la *isoterma de adsorción de Freundlich-Langmuir* (**FLI**) (7).

$$B = aF^n \quad (4)$$

$$B = \frac{qkF^n}{1 + kF^n} \quad (7)$$

El modelo de isoterma de adsorción de Freundlich aporta dos componentes que describen algunas características físicas de la unión. El factor preexponencial a puede ser considerado como una capacidad de unión genérica del polímero que engloba tanto la constante de afinidad k (L mmol⁻¹) como la densidad de sitios de unión q (μmol g⁻¹). El exponente n está relacionado con el grado de heterogeneidad del polímero. Aunque este modelo proporciona resultados mejores que los obtenidos mediante el modelo LI, la imposibilidad de describir zonas de saturación, o el valor individual de q y k , cuestionan la validez de los parámetros calculados a partir del mismo. En consecuencia, han surgido modelos híbridos que tienen en cuenta la existencia de regiones saturadas a altas concentraciones de analito como es el modelo de isoterma de adsorción Freundlich-Langmuir (FLI) [116].

De las distintas aproximaciones ensayadas, el modelo que proporciona los mejores ajustes de los datos experimentales obtenidos para adsorción del PAAP al MIP1 es el basado en la isoterma de adsorción Bi-Langmuir (6). Por otra parte, el modelo de isoterma de Freundlich fue el único que permitió ajustar los datos de adsorción del PAAP al polímero CP1. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 34.

La aplicación del **modelo Bi-Langmuir** permite ajustar de forma excelente la curva de unión del PAAP obtenida para el MIP1 y proporciona unos buenos parámetros de ajuste ($k_1 = 24 \pm 12$ L mmol⁻¹, $k_2 = 0.7 \pm 0.2$ L mmol⁻¹ y $q_1 = 24 \pm 7$

$\mu\text{mol g}^{-1}$, $q_2 = 125 \pm 7 \mu\text{mol g}^{-1}$). Como así se describe en bibliografía [175], uno de los factores limitantes a la hora de utilizar marcadores fluorescentes en MIA, es el débil reconocimiento de éstas moléculas por parte de los centros activos del polímero. En nuestro caso, el valor obtenido para la constante de unión aparente es elevado, teniendo en cuenta que el polímero de impronta molecular se sintetizó empleando como molécula plantilla el antibiótico PENG [30,222].

Tabla 34. Modelos de isoterma de adsorción calculados para el MIP1 ($n = 34$) y el CPI ($n = 12$).

Modelo isoterma	k , L mmol^{-1}	q , $\mu\text{mol g}^{-1}$	n	$q \times k$, $\mu\text{mol g}^{-1} \text{L mmol}^{-1}$	E_s	r^2
MIP1						
Freundlich	-	-	0.46 ± 0.03	73	2.11	0.9946
Langmuir	2.1 ± 0.5	114 ± 9	-	242	2.62	0.9918
Bi-Langmuir	24 ± 12	24 ± 7	-	576	1.43	0.9977
	0.7 ± 0.2	125 ± 7		88		
Freundlich-Langmuir	8 ± 7	75 ± 19	1.0 ± 0.7	630	6.63	0.9490
CPI						
Freundlich	-	-	0.8 ± 0.3	10	1.01	0.9540

Abreviaturas: k (L mmol^{-1}): constante de afinidad, q ($\mu\text{mol g}^{-1}$): densidad de sitios de unión, n : parámetro de heterogeneidad, $q \times k$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{L mmol}^{-1}$): capacidad de unión, E_s : Error estándar del ajuste. Resultados obtenidos con el programa Table Curve 2D 5.0, Systat Software (2004) y contrastados con el programa Sigma Plot 8.0, SPSS (2002).

4.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO

La detección de antibióticos β -lactámicos mediante MIA se ha llevado a cabo utilizando un sistema de análisis por *inyección en flujo* (FI), que es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en campos tan diversos como la Química Clínica, Química Farmacéutica, análisis medioambiental y de alimentos, etc. [236,237,238]

Con este fin se han optimizado las **variables hidrodinámicas** (caudal de disolución portadora y volumen de inyección de muestra) y **químicas** del sistema

como son, por ejemplo, la composición de la disolución portadora, el formato de ensayo, tiempo de incubación y concentración de polímero y penicilina fluorescente.

4.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES HIDRODINÁMICAS DEL SISTEMA EN FLUJO

4.4.1.1. EFECTO DEL CAUDAL DE LA DISOLUCIÓN PORTADORA

En primer lugar, se ha procedido a estudiar la influencia del caudal de la disolución portadora sobre la señal analítica (intensidad de fluorescencia del pico FI (i_p), anchura de pico a media altura ($w_{1/2}$) y la relación $i_p/w_{1/2}$).

En la figura 60 se muestra el efecto del caudal ($1 - 7 \text{ mL min}^{-1}$) de la disolución portadora (acetonitrilo-agua (99:1, v/v)) sobre la señal de fluorescencia obtenida inyectando $200 \mu\text{L}$ de una disolución de PAAP de 50 nmol L^{-1} .

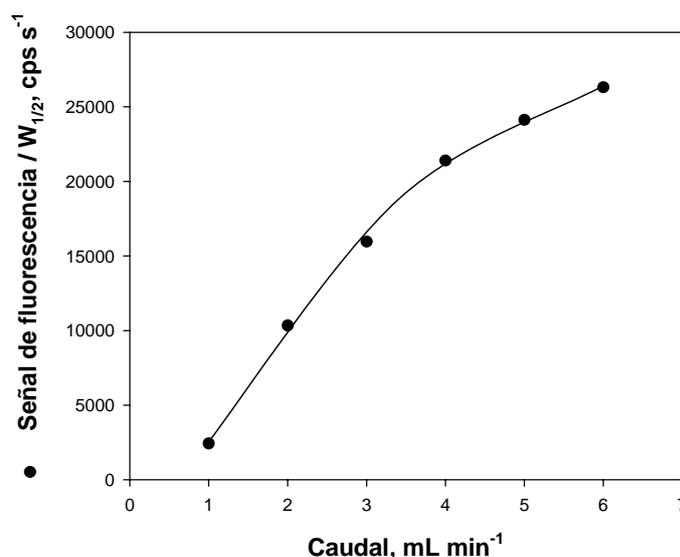


Figura 60. Efecto del caudal de la disolución portadora sobre la relación intensidad de pico (señal de fluorescencia)/anchura a semialtura. $[PAAP] = 50 \text{ nmol L}^{-1}$, disolución portadora: acetonitrilo-agua (99:1, v/v), $V_{\text{inyección}} = 200 \mu\text{L}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

La mayor sensibilidad obtenida al incrementar el caudal se atribuye a la menor dispersión del bolo de muestra en el sistema de flujo aunque también se observa una ligera disminución de la altura de los picos a medida que aumenta el caudal. Por otra parte, para valores de caudal muy elevados (7.0 mL min^{-1}) comienzan a producirse

fenómenos de sobrepresión en el sistema de flujo, lo cual dificulta notablemente el proceso de medida.

Por todo ello, se ha seleccionado un **caudal de 6.0 mL min⁻¹** como valor óptimo para la realización de determinaciones posteriores, ya que permite un muestreo rápido con una óptima sensibilidad y precisión (RSD < 1.25%).

4.4.1.2. EFECTO DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN DE MUESTRA

Una vez seleccionada la velocidad de flujo óptima de la disolución portadora, se ha estudiado la influencia del volumen de inyección de muestra sobre los parámetros del fiagrama en el intervalo comprendido entre 200 μ L y 2500 μ L.

Los resultados experimentales aparecen recogidos en la figura 61 donde se observa que, la relación entre la altura de pico (obtenida para una disolución de PAAP de 50 nmol L⁻¹) y su anchura a media altura, disminuye progresivamente a medida que aumenta el volumen de inyección debido, entre otros aspectos, a una mayor dispersión del bolo de muestra.

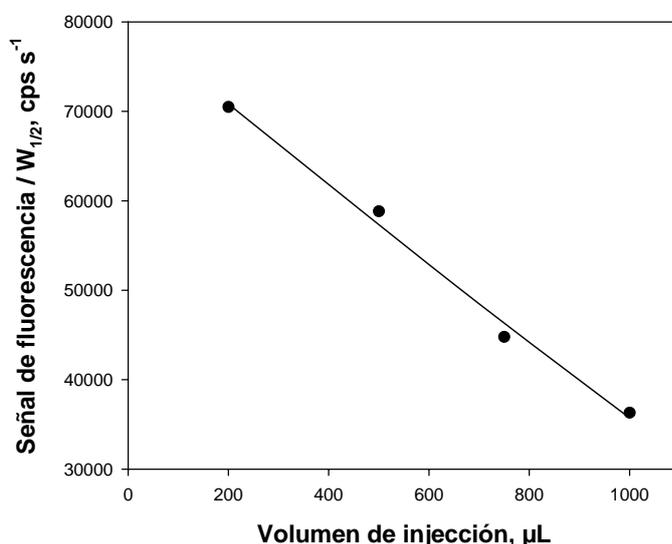


Figura 61. Efecto del volumen de inyección sobre la relación intensidad de pico (señal de fluorescencia)/anchura a semialtura. [PAAP] = 50 nmol L⁻¹, disolución portadora: acetonitrilo-agua (99:1, v/v), caudal = 6 mL min⁻¹, T = 25 °C (n = 3).

En consecuencia, se ha elegido un **volumen de inyección de 200 μ L** como valor óptimo, ya que proporciona la relación más favorable.

4.4.2. INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN DE UNIÓN SOBRE LA RESPUESTA DEL ENSAYO

El reconocimiento del polímero de impronta molecular hacia la PENG y el derivado fluorescente depende notablemente del medio en el que se realice el ensayo.

Con el fin de determinar la composición óptima de esta disolución, se llevaron a cabo diversos ensayos en discontinuo para determinar el medio en el que se conseguía la unión selectiva y óptima de la PENG a los polímeros de impronta molecular sintetizados (Grupo de Prof. M. Kempe, Lund, Suecia, Proyecto `CREAM`).

La unión selectiva (B_{MIP}/B_{CP}) se evaluó en diferentes disoluciones reguladoras, disolventes orgánicos, mezclas hidroorgánicas, etc. Además, se estudió el efecto producido por la adición de detergentes al medio de incubación. Los resultados obtenidos para el MIP1, en medio hidroorgánico, empleando radioensayos competitivos con PENG marcada radiactivamente, se recogen en la tabla 35.

Tabla 35. Evaluación de la unión selectiva de la PENG al MIP1 y al CPI en diferentes medios hidroorgánicos [223].

Disolución de unión	Variable	Intervalo ensayado	Valor óptimo	B_{MIP} , %	B_{CP} , %	B_{MIP}/B_{CP}
Disolución reguladora (pH 8.0) + modificador orgánico	MeOH	1 – 5%	-	-	-	-
	THF	1 – 5%	2%	5	3.8	< 1.3
	DMF	1 – 5%	-	-	-	-
	ACN	1 – 5%	-	-	-	-
	EtOH	1 – 5%	2%	16.5	15.8	< 1.0
Disolución reguladora + 2% EtOH	pH	3 – 6	5	7.1	5.8	< 1.3

Abreviaturas: MeOH: *metanol*, EtOH: *etanol*, THF: *tetrahidrofurano*, DMF: *dimetilformamida*, ACN: *acetonitrilo*, B_{MIP} : *señal obtenida en ausencia de analito para el MIP1*, B_{CP} : *señal máxima obtenida en ausencia de analito para el MIP1*.

El porcentaje de unión selectiva al MIP1 de la PENG en medio predominantemente acuoso resultó ser muy bajo (< 2% en todos los casos), como cabía esperar, dado que el reconocimiento molecular se produce mediante la interacción por enlace de hidrógeno de grupos específicos del antibiótico y los sitios

de unión del polímero. Al aumentar la concentración de acetonitrilo en el medio (ca. 99%) se favorecen dichas interacciones y el reconocimiento selectivo del antibiótico por el polímero [49].

Por todo ello, se decidió utilizar la mezcla **acetonitrilo-agua (99:1, v/v)** como disolución de unión [223], ya que la solubilidad del antibiótico en acetonitrilo puro es baja y, de esta forma, se facilitaría el análisis de muestras acuosas.

4.4.3. ENSAYO COMPETITIVO VS ENSAYO POR DESPLAZAMIENTO

Uno de los aspectos más importantes para el desarrollo de un ensayo es la selección del formato para llevar a cabo la determinación cuantitativa del analito.

Como ya se indicó en el apartado 1.5 de esta sección, el **formato de ensayo** utilizado habitualmente en ensayos MIA es el **competitivo directo**, no obstante, también se han desarrollado ensayos por **desplazamiento**, siguiendo el procedimiento descrito por Karube y col. [213].

Con el fin de poner a punto un ensayo por desplazamiento para la determinación de PENG, se equilibró una columna conteniendo el polímero de impronta molecular (MIP1, c.a. 5 mg) [213,206], a un caudal de 0.25 mL min^{-1} , con un exceso de PAAP ($89, 222$ o 445 nmol L^{-1} en acetonitrilo-agua (99:1, v/v)) hasta obtener una señal de fluorescencia estable (20 min). Si hay competición, la inyección del analito debe originar el desplazamiento de una cantidad equivalente del marcador adsorbido en el polímero que genera una señal analítica directamente proporcional a la cantidad de PENG presente en la muestra [239].

Las áreas de pico obtenidas tras la inyección de diferentes volúmenes de PENG, a una concentración de $43.2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, en función de la concentración de PAAP se recogen en la tabla 36. Los perfiles de respuesta obtenidos, para una concentración de PAAP de 89 nmol L^{-1} , se muestran en la figura 62.

Tabla 36. Áreas de pico obtenidas tras la inyección de diferentes volúmenes de $43.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG en una columna que contiene MIP1 equilibrado con diferentes concentraciones de PAAP ($n = 3$).

V_i , mL	[PAAP], nmol L ⁻¹		
	89	222.5	445
0.10	55 (7)	-	-
0.50	154 (15)	N.D.	-
1.00	302 (278)	320 (190)	N.D.

Abreviaturas: V_i : volumen de inyección de muestra, N.D: no detectado. El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar obtenida.

Se observa que el desplazamiento de PAAP, que tiene lugar tras la inyección de PENG, se produce en el primer ciclo de medida para todas las concentraciones de PAAP ensayadas. Sin embargo, tras una segunda inyección de antibiótico, sólo se produjo una señal apreciable, aunque no reproducible, cuando se empleó una concentración de PAAP de 89 nmol L^{-1} .

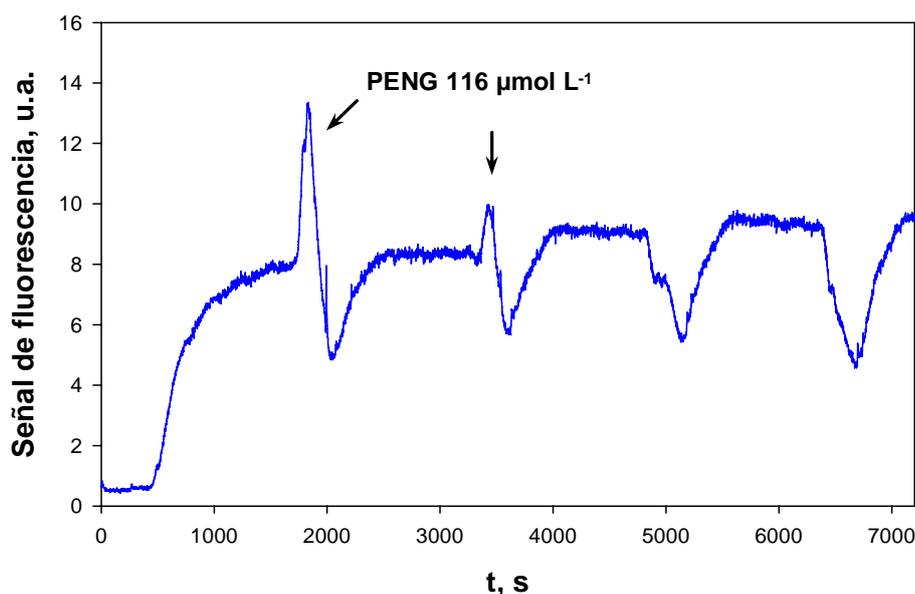


Figura 62. Perfil de respuesta obtenido mediante el ensayo por desplazamiento. MIP1 = 5 mg, disolución portadora acetonitrilo-agua (99:1, v/v) que contiene 89 nmol L^{-1} de PAAP, $[\text{PENG}] = 43.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, volumen de inyección = 1 mL, caudal = 0.25 mL min^{-1} .

Esto sugiere que la PENG, que queda retenida en el polímero tras la primera inyección, no es totalmente desplazada por el PAAP presente en la disolución portadora. De esta forma, al inyectarse una nueva alícuota de disolución de PENG en

el sistema, el número de sitios en los que se produce la competición efectiva entre el analito y el PAAP es menor y, con ello, la intensidad del pico obtenido también disminuye. Esta observación estaría de acuerdo con las dificultades encontradas a la hora de extraer cuantitativamente la molécula molde del MIP durante la etapa de lavado del mismo, que requería el empleo de mezclas de metanol y ácido acético.

Alternativamente, se llevaron a cabo ensayos basados en un formato de tipo **competitivo** (Parte Experimental 3.3.4.) evaluándose el comportamiento del mismo polímero en el intervalo de concentración $0.5 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$, incubando frente a 125 nmol L^{-1} de PAAP en presencia y en ausencia de $426 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($166.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) de PENG. A partir de la curva de unión obtenida (figura 63), se comprueba que el ensayo realizado presenta una mayor sensibilidad y reproducibilidad ($\overline{\text{RSD}} < 10\%$) que el ensayo por desplazamiento, que no resulta útil en combinación con los antibióticos fluorescentes y el polímero utilizados para esta aplicación.

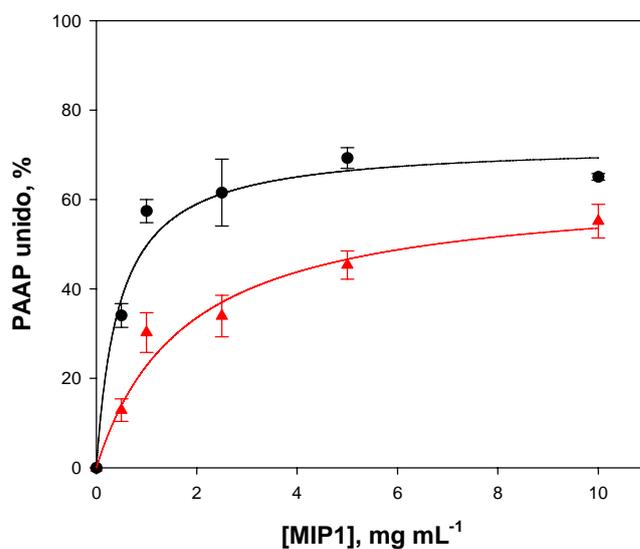


Figura 63. Curva de unión obtenida mediante un ensayo de tipo competitivo ($n = 9$, 7 h de incubación) del PAAP (125 nmol L^{-1}) al MIP1 ($0.5 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$) (●) en ausencia y (▲) en presencia de $426 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PENG. Disolución portadora acetonitrilo-agua (99:1, v/v). $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ($n = 9$).

En consecuencia, se seleccionó el **formato de tipo competitivo directo**, frente al ensayo por desplazamiento, para posteriores experimentos.

4.4.4. TIEMPO DE INCUBACIÓN

Uno de los parámetros más importantes en el desarrollo de un MIA es la optimización del tiempo de incubación necesario para que se produzca la interacción entre el derivado marcado y los sitios de unión del MIP en presencia y en ausencia del analito de interés (PENG) [240,241,242].

Para llevar a cabo este estudio, se pesaron en distintos viales 5 mg de MIP1 y CP1 que se incubaron a temperatura ambiente con 2 mL de una disolución de PAAP 250 nmol L⁻¹ (acetonitrilo-agua (99:1, v/v)). El tiempo de incubación evaluado fue entre 0 y 18 h.

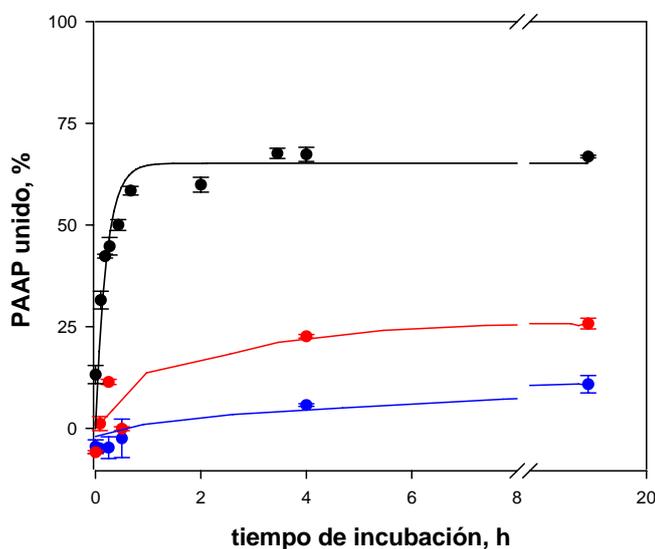


Figura 64. Efecto del tiempo de incubación en la unión del PAAP al (●) CP1 (en ausencia de PENG) y MIP1 (●) en presencia y (●) en ausencia de 426 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PENG. [PAAP] = 250 nmol L⁻¹, concentración de polímero = 2.5 mg mL⁻¹, disolución portadora: acetonitrilo-agua (99:1, v/v), T = 25 °C (n = 9).

Las muestras se prepararon por triplicado y se analizaron tres veces (n = 9). La curva de unión del PAAP en función del tiempo de incubación se recoge en la figura 64. En ella se aprecia que la cinética del proceso de unión del PAAP al polímero es más lenta en presencia de PENG, debido a la competición efectiva entre ambas especies.

En base a estos resultados, se seleccionó un **tiempo de incubación de 7 h** como valor óptimo, dado que la unión del PAAP al MIP es prácticamente constante y máxima, tanto en ausencia como en presencia de PENG.

4.4.5. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PAAP Y MIP1

4.4.5.1. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLÍMERO

Con el objeto de calcular la concentración de polímero óptima para el desarrollo de los ensayos competitivos, se incubaron 2 mL de una disolución de PAAP (250 nmol L^{-1}) con concentraciones crecientes de MIP1 o CP1 ($0 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$) en acetonitrilo-agua (99:1, v/v).

Las curvas de unión del PAAP obtenidas se muestran en la figura 65.

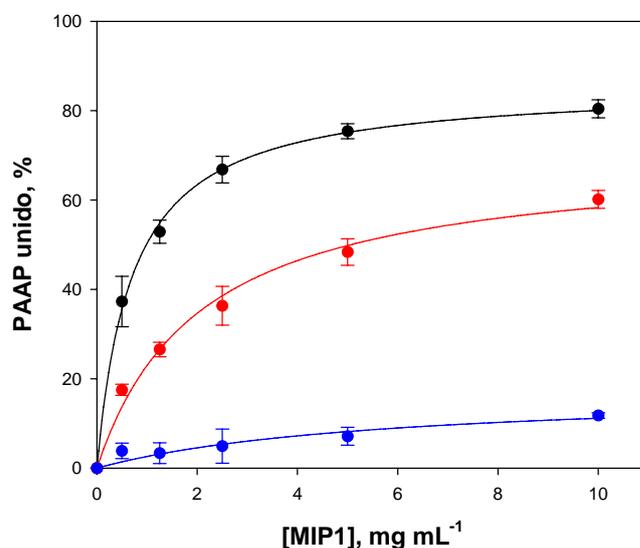


Figura 65. Curva de unión obtenida en un ensayo de tipo competitivo ($n = 9$, 7 h de incubación) para el PAAP (250 nmol L^{-1}) al (●) CP1 (en ausencia de PENG) y MIP1 ($0.5 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$) (●) en ausencia y (●) en presencia de $426 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PENG. Disolución portadora: acetonitrilo-agua (99:1, v/v). $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Como se puede observar, la unión de la sonda fluorescente al polímero control fue muy pequeña para todas las concentraciones de polímero ensayadas.

Para seleccionar la cantidad adecuada de MIP para la determinación de PENG, se evaluó el porcentaje de unión del PAAP en presencia y en ausencia de una concentración constante del antibiótico [243]. El porcentaje de unión del PAAP al polímero disminuye en presencia del analito (ver figura 65), lo cual evidencia la competición entre la sonda y la PENG por los sitios de unión selectivos del MIP.

La mayor diferencia entre la fracción de PAAP que se une al MIP1 en presencia y en ausencia de PENG corresponde a una concentración de polímero de **2.5 mg mL^{-1}**

de **MIP1**. Resultados equivalentes se obtuvieron al emplear una concentración de PAAP de 125 nmol L^{-1} .

4.4.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PENICILINA FLUORESCENTE

Para seleccionar la **concentración de PAAP** más adecuada para el MIA, se llevaron a cabo ensayos competitivos empleando diferentes concentraciones de penicilina fluorescente (125 y 250 nmol L^{-1}), una concentración de polímero de 2.5 mg mL^{-1} y una concentración de PENG comprendida en el intervalo de $5 \cdot 10^{-4} - 333.2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

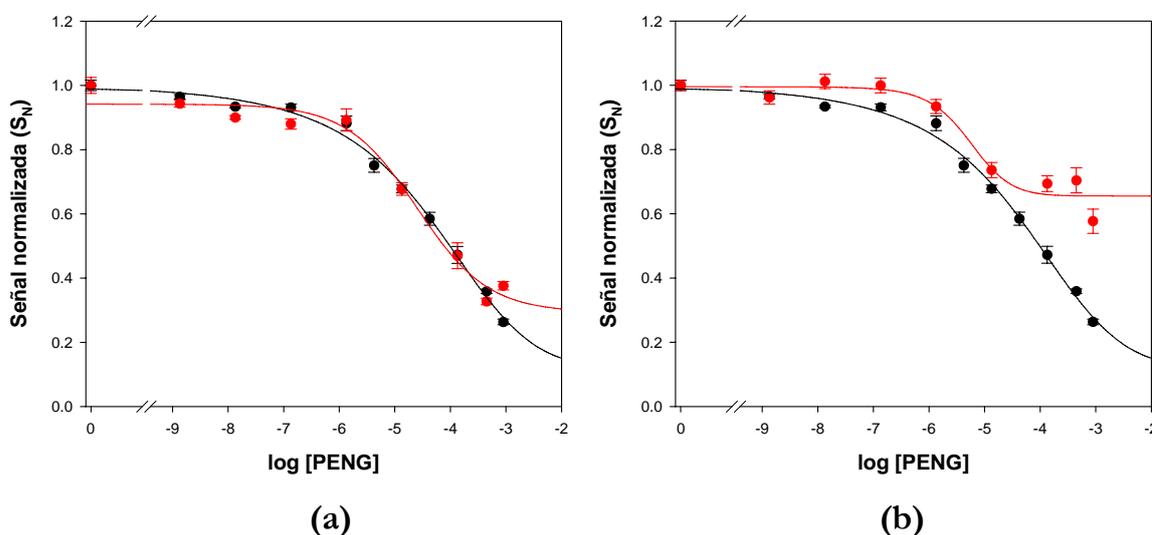


Figura 66. (a) Curvas de calibrado obtenidas empleando (●) 250 nmol L^{-1} y (●) 125 nmol L^{-1} de PAAP. (b) Curvas de calibrado obtenidas empleando las penicilinas fluorescentes (●) PAAP 250 nmol L^{-1} y (●) PBAP 250 nmol L^{-1} . $[\text{MIP1}] = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$. Disolución portadora acetonitrilo-agua (99:1, v/v), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 6$).

En la figura 66a se muestran las curvas de competición obtenidas para las distintas concentraciones ensayadas de PAAP. Se comprueba que la sensibilidad del ensayo no disminuye significativamente al hacerlo la concentración del derivado fluorescente. En consecuencia, se eligió una concentración de **PAAP de 250 nmol L^{-1}** , ya que permite obtener una mejor relación señal/ruido, una mayor reproducibilidad y una sensibilidad semejante a la obtenida empleando menores concentraciones de sonda.

Por otro lado, se realizó el mismo ensayo con otro derivado fluorescente de penicilina (**PBAP**), de menor afinidad hacia el MIP1 (ver figura 66b), para evaluar su capacidad para competir con el analito (PENG) por los sitios de unión del polímero. Como se observa en la figura, el IC_{50} obtenido empleando 250 nmol L^{-1} de PBAP es menor que el conseguido con el PAAP. No obstante, tanto el menor intervalo dinámico, como la menor relación señal/ruido hicieron descartar la utilización de esta sonda.

El ensayo también se ha llevado a cabo empleando **CP1** en vez de **MIP1**, comprobándose que no se produce competición (figura 67) [218]. Es más, la cantidad de PAAP unido al CP aumenta ligeramente al incrementarse la concentración del analito. Este resultado podría explicarse considerando que la interacción de la PENG con los grupos carboxílicos distribuidos aleatoriamente en el polímero control, aumenta la hidrofobicidad neta de la superficie del mismo favoreciéndose las interacciones no específicas con la parte aromática del marcador fluorescente.

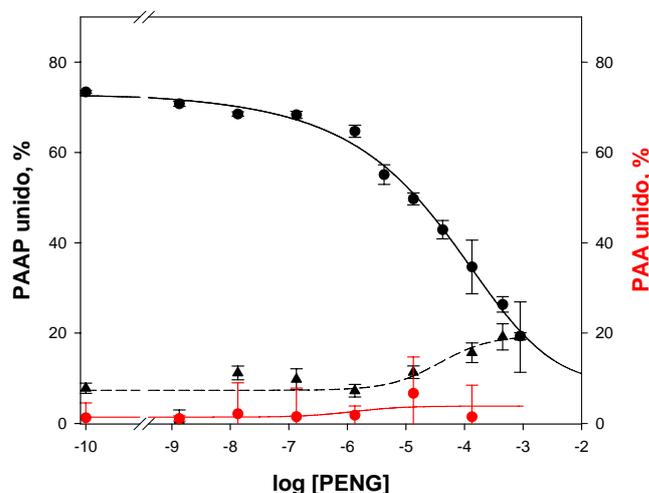


Figura 67. Curvas de calibrado obtenidas para la PENG ($5 \cdot 10^{-4} - 333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) en acetonitrilo-agua (99:1, v/v) empleando el (●) MIP1 en presencia de 250 nmol L^{-1} de PAAP, (▲) el CP1 en presencia de 250 nmol L^{-1} de PAAP y para (●) MIP1 en presencia de 250 nmol L^{-1} de PAA. 2.5 mg mL^{-1} de polímero en todos los casos, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 9$).

Para evaluar la **especificidad** de la interacción entre el PAAP y el MIP1, se realizó un ensayo competitivo empleando el **ácido 1-pirenoacético (PAA)** como competidor fluorescente (figura 67). La falta de interacción de dicha sonda con el MIP1 y, por tanto, de competición con la PENG por los sitios de unión, confirman la

necesidad de la existencia de la estructura penicilínica en la sonda para ser reconocida por el MIP.

En la tabla 37, se resumen las condiciones óptimas para la realización del fluoroensayo de tipo competitivo basado en polímeros de impronta molecular (MIA) para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

Tabla 37. *Condiciones experimentales óptimas para la determinación de penicilinas utilizando el fluoroensayo de tipo competitivo basado en polímeros de impronta molecular (MIA) utilizando el MIP1 y el derivado fluorescente de penicilina, PAAP.*

Parámetro	Variable optimizada
Concentración de polímero (MIP1)	2.5 mg mL ⁻¹
Concentración de sonda fluorescente (PAAP)	250 nmoL L ⁻¹
Disolución de unión	acetonitrilo-agua (99:1, v/v)
Volumen de muestra de incubación	2 mL
Tiempo de incubación MIP1+ PAAP/PENG	7 h
Caudal de la disolución portadora,	6 mL min ⁻¹
Volumen de muestra de inyección	200 μ L
Temperatura	25 °C

4.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL FLUOROENSAYO COMPETITIVO BASADO EN MIPs

Una vez optimizados los distintos parámetros hidrodinámicos y químicos del sistema de medida, se procedió a determinar las características analíticas del ensayo para la determinación de PENG.

4.5.1. CALIBRACIÓN DEL MIA

En la figura 68 se muestra el perfil de respuesta obtenidos con el MIA para un calibrado realizado en el intervalo de $5 \cdot 10^{-4}$ a $333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG. Como se indicó anteriormente, al aumentar la concentración de analito presente en la muestra la competición con el derivado fluorescente es más eficaz y disminuye la cantidad de PAAP unido al polímero, originándose un incremento de la señal de fluorescencia medida.

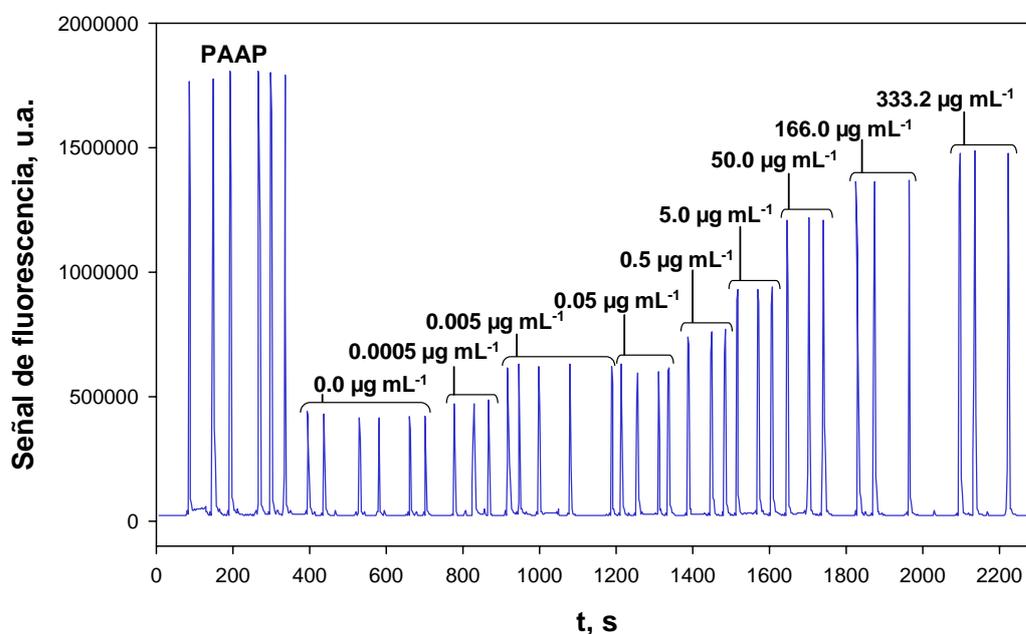


Figura 68. Perfil de respuesta obtenido para un calibrado realizado con el MIA para concentraciones de penicilina G comprendidas en el intervalo $5 \cdot 10^{-4}$ – $333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$. $[\text{MIP1}] = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$, $[\text{PAAP}] = 250 \text{ nmol L}^{-1}$, disolución portadora acetonitrilo-agua (99:1, v/v), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

No se ensayaron mayores concentraciones de PENG debido a la baja solubilidad de este analito en la mezcla hidroorgánica (acetonitrilo-agua (99:1, v/v)).

La curva de calibrado se ajustó a la ecuación 12 ($n = 9$, $r^2 = 0.990$) (Parte Experimental 3.3.4.) obteniéndose el perfil sigmoide que se muestra en la figura 69.

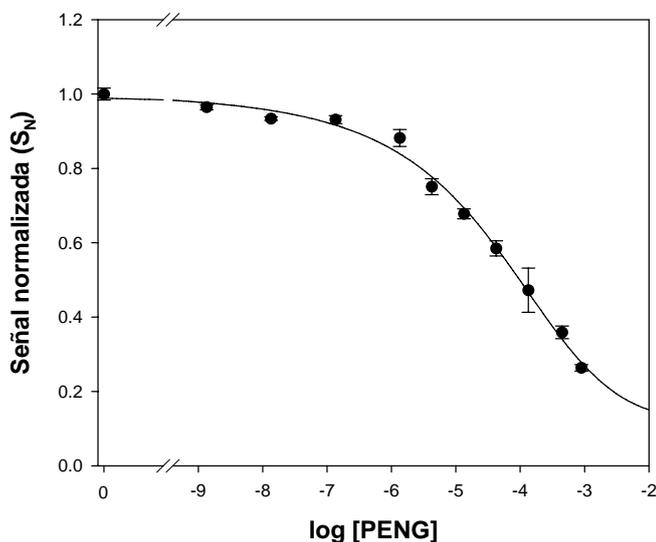


Figura 69. Curva de calibrado obtenida para la determinación de PENG empleando el MIA ($n = 9$) ($5 \cdot 10^4 - 333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$). $[\text{PAAP}] = 250 \text{ nmol L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

El valor **IC₅₀** se corresponde con una concentración de penicilina G de $0.053 \text{ mmol L}^{-1}$ ($19.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). El **límite de detección (LD)**, determinado como la concentración de analito que origina una disminución del 10% de la señal respecto del blanco, es de $0.32 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($100 \mu\text{g L}^{-1}$). El **intervalo dinámico** del ensayo está comprendido entre 3, disminución del 20% de la señal normalizada, y $890 \mu\text{mol L}^{-1}$, concentración máxima soluble en acetonitrilo-agua (99:1, v/v) de PENG ensayada ($1120 \mu\text{g mL}^{-1} - 333.2 \cdot 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$).

Actualmente, existen muy pocos trabajos basados en MIPs específicos para antibióticos β -lactámicos y ninguno basado en medidas de fluorescencia [138,170,180]. No obstante, el LD obtenido con el MIA desarrollado en esta Tesis es mejor [244], o comparable con algunos ensayos basados en polímeros de impronta molecular para la determinación de estos antimicrobianos. Por ejemplo, el LD obtenido por E.P.C. Lai y col. mediante MISPE para la determinación de cefalexina es de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ [170].

Desafortunadamente, la baja solubilidad del antibiótico en la mezcla acetonitrilo-agua (99:1, v/v) requerida para obtener un buen reconocimiento por parte del polímero desarrollado, limita de forma notable, la aplicación del ensayo desarrollado en muestras acuosas, como es el caso de la leche.

4.5.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Para evaluar la selectividad del método para la determinación de PENG, se ha determinado el porcentaje de reactividad cruzada (RC) del analito con otras especies consideradas potencialmente interferentes.

$$\%RC = \frac{IC_{50}(\text{analito})}{IC_{50}(\text{interferente})} \quad (15)$$

Se han incluido en el estudio siete antibióticos β -lactámicos y el 6-APA, todos ellos relacionados estructuralmente con la PENG. Además, se ha evaluado la RC frente al ácido clavulánico, cefalosporina y otros antibióticos de distintas familias.

En la figura 70 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para las distintas especies estudiadas. Las RC correspondientes se recogen en la tabla 38.

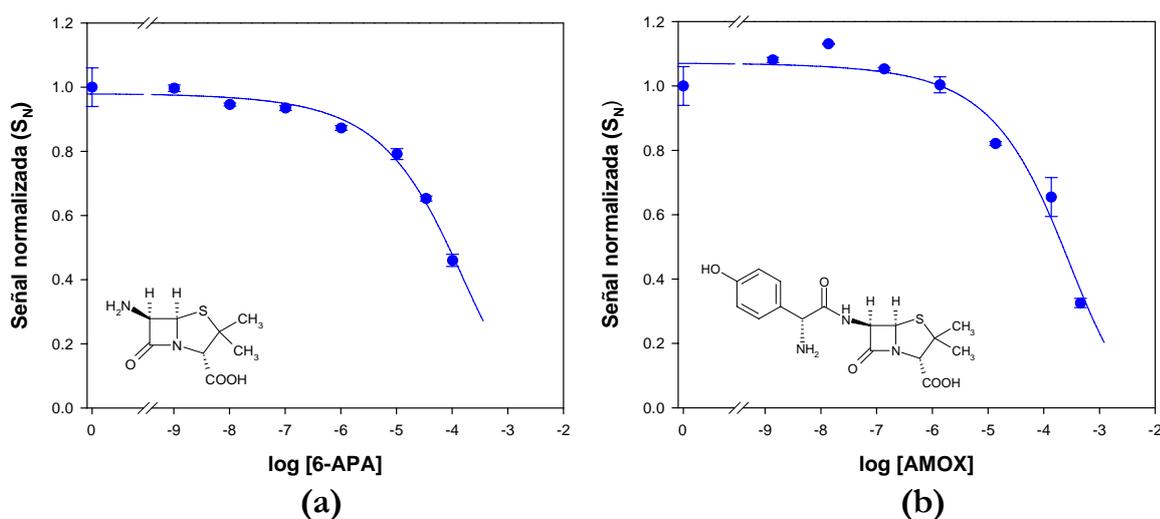


Figura 70A. Curva de calibrado normalizada correspondiente al MIA competitivo para la determinación de (a) 6-APA, (b) AMOX en acetonitrilo-agua (99:1, v/v), empleando las condiciones experimentales indicadas en la tabla 37 ($n = 3$).

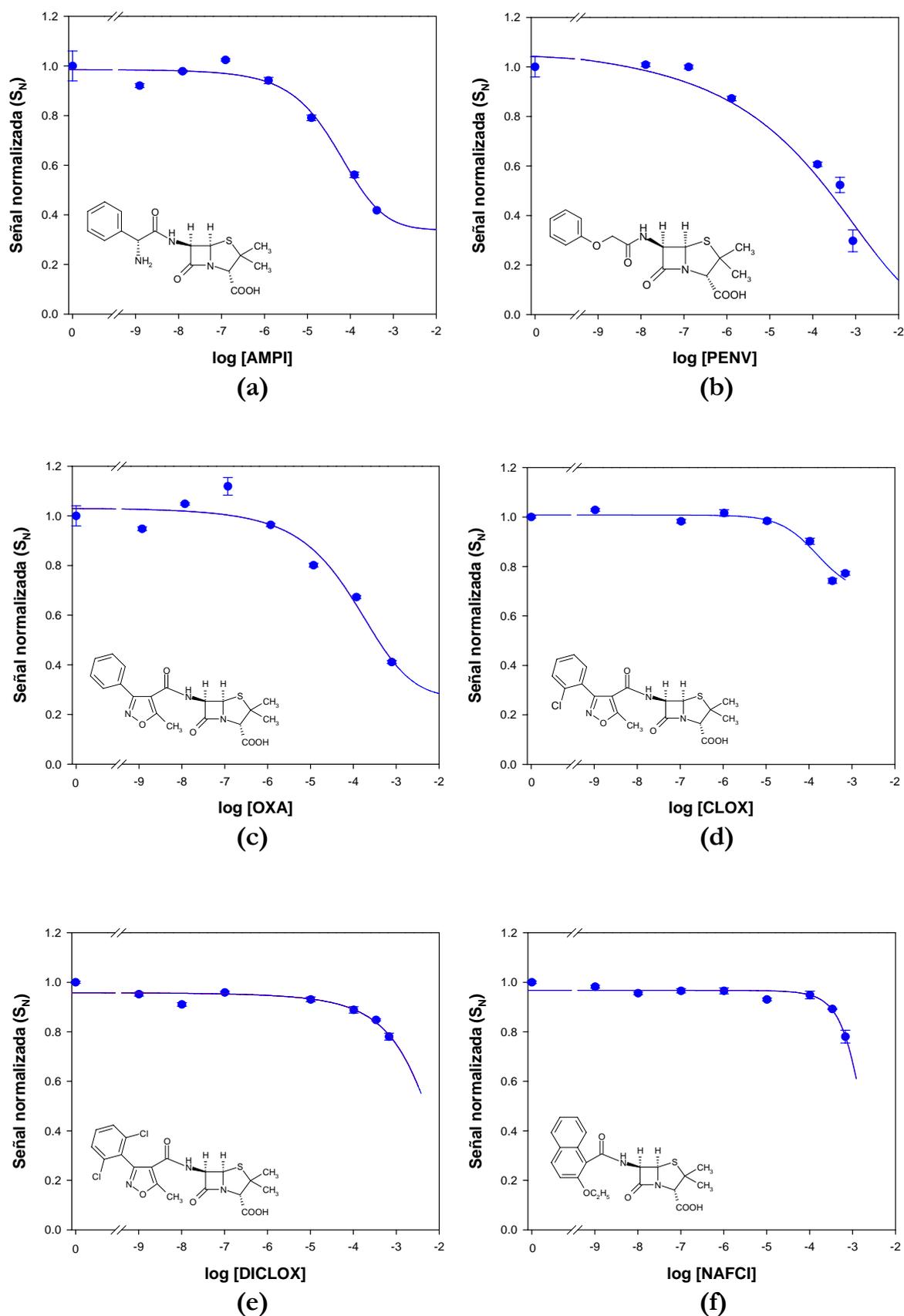


Figura 70B. Curva de calibrado normalizada correspondiente al MIA competitivo para la determinación de (a) AMPI, (b) PENV, (c) OXA, (d) CLOX, (e) DICLOX, (f) NAFCI en acetonitrilo-agua (99:1, v/v), empleando las condiciones experimentales indicadas en la tabla 37 ($n = 3$) (continuación).

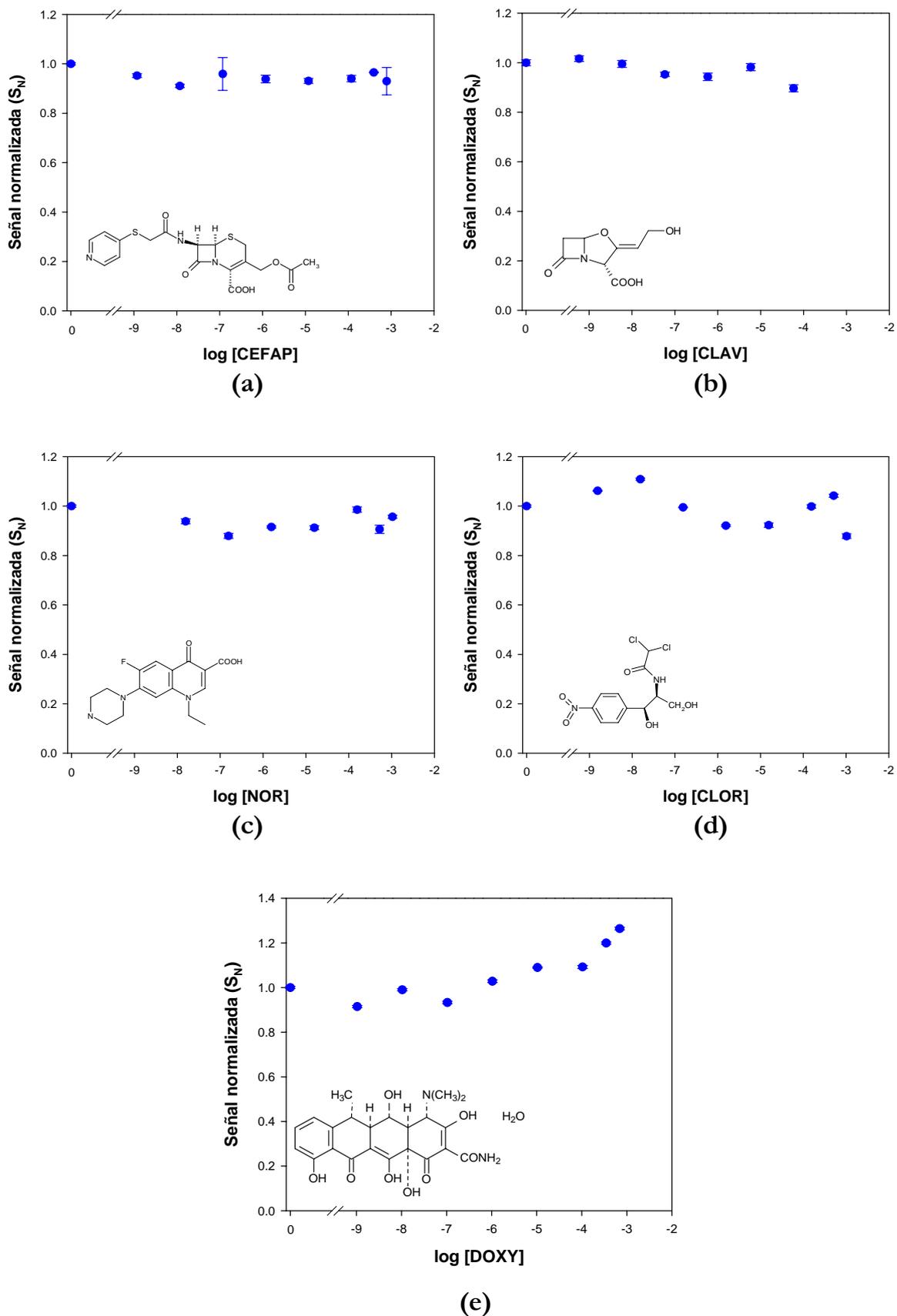


Figura 70C. Curva de calibrado normalizada correspondiente al MIA competitivo para la determinación de (a) CEFAP, (b) CLAV, (c) NOR, (d) CLOR, (e) DOXY en acetonitrilo-agua (99:1, v/v), empleando las condiciones experimentales indicadas en la tabla 37 ($n = 3$) (continuación).

Tabla 38. Reactividad cruzada relativa a PENG obtenida para los distintos antibióticos empleando el MIA de tipo competitivo.

Analito	LD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	ID, mmol L^{-1}	IC ₅₀ , mmol L^{-1}	RC, %
6-APA	0.89	0.007 – 0.65	0.092	57
AMOX	16	0.030 – 0.46 ^a	0.180	29
AMPI	4.0	0.015 – 0.41 ^a	0.140	37
PENV	0.39	0.004 – 0.86 ^a	0.130	40
OXA	6.2	0.025 – 0.63	0.250	21
CLOX	100	0.26 – 0.70 ^a	0.930	6.0
DICLOX	580	0.63 – 0.65 ^a	5.40	0.9
NAFCI	270	0.66 – 0.73 ^a	1.70	3.0
CEFAP	NC	NC	NC	NC
CLAV	NC	NC	NC	NC
NOR	NC	NC	NC	NC
CLOR	NC	NC	NC	NC
DOXY	NC	NC	NC	NC

Abreviaturas: *“Concentración máxima ensayada que depende de la solubilidad particular del antibiótico en acetronitrilo-agua (99:1, v/v), NC: no compete, 6-APA: ácido 6-aminopenicilánico, AMOX: amoxicilina, AMPI: ampicilina, PENV: penicilina V, OXA: oxacilina, CLOX: cloxacilina, DICLOX: dicloxacilina, NAFCI: nafcilina, CEFAP: cefapirina, CLAV: ácido clavulánico, NOR: norfloxacin, CLOR: cloramfenicol, DOXY: doxiciclina.*

Los resultados obtenidos demuestran que la mayor interferencia se produce por parte del 6-APA (57%) y de los antibióticos AMOX (29%), AMPI (37%) y PENV (40%). Éste último antibiótico, que no suele utilizarse en zootecnia, es el que presenta la mayor reactividad cruzada de todos los antibióticos ensayados.

Todos estos antibacterianos presentan una estructura similar a la penicilina G, un anillo β -lactámico intacto y fusionado a otro anillo tiazolidínico de 5 miembros. Además, AMOX, AMPI y PENV presentan la misma disposición plegada de la región constituida por la parte bencílica de la molécula de PENG. Este resultado reafirma la hipótesis de que la estructura tridimensional del compuesto juega un papel clave en el proceso de reconocimiento por parte del MIP.

Otras penicilinas como OXA (21%), CLOX (6%), NAFCI (3%) y DICLOX (0.9%), muestran una RC menor. El antibiótico β -lactámico CEFAP, basado en el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), no es un interferente en el ensayo desarrollado. Tampoco, el ácido clavulánico (CLAV), un inhibidor de la β -lactamasa.

Finalmente destacar que, los antimicrobianos evaluados no relacionados estructuralmente con la PENG (eg. cloramfenicol, norfloxacin, tetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina y doxiciclina) no producen ningún tipo de respuesta para concentraciones superiores a $333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, la dapsona (DDS), que resultó ser una interferencia espectral positiva en el ensayo fluorescente, tampoco interacciona con el polímero. Esta comprobación se realizó mediante la sustracción de su señal luminiscente, a las concentraciones del ensayo, de la obtenida con el PAAP.

4.5.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del MIA desarrollado para la determinación de PENG se estimó en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad calculando la *desviación estándar relativa* (RSD) de los resultados obtenidos para distintas concentraciones de analito. Este cálculo incluye únicamente el error asociado a la medida y no los correspondientes al proceso de calibración del ensayo (estimación de los parámetros de ajuste).

Para evaluar la **repetibilidad** del fluoroensayo se llevaron a cabo ensayos independientes, a tres niveles de concentración de PENG (0.05, 5.0 y $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando el mismo método de medida con idénticas variables experimentales, en el mismo laboratorio y el mismo operador, con cortos intervalos de tiempo [245].

En la tabla 39 se muestran los valores obtenidos, en términos de recuperación, para las distintas concentraciones de analito ensayadas.

Los valores de RSD obtenidos para todas las muestras patrón analizadas son comparables con los descritos en la bibliografía para sistemas analíticos basados en la utilización de polímeros de impronta molecular [246,247].

Tabla 39. Estudio de repetibilidad del inmunosensor.

PENG, $\mu\text{g mL}^{-1}$ añadidos	n	PENG*, $\mu\text{g mL}^{-1}$ recuperado	R, %	RSD, %
0.05	6	0.050 ± 0.002	92	1
5.0	6	4.8 ± 0.2	96	3
50	6	50 ± 4	99	7

* Intervalos de confianza $\pm t_{\alpha, v} \times S.D. / n^{1/2}$ al 95% de probabilidad.

Para evaluar la **reproducibilidad** de la medida, se ha realizado el ensayo en días diferentes, durante un periodo de 51 días, para una concentración de $166.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG.

Para la elaboración del gráfico de Shewhart se ha tomado como valor central la media del valor obtenido ($\overline{B/B_0}$ para $166.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG) y como límites inferiores y superiores $\pm 3 \times S.D.$ de dicho valor medio.

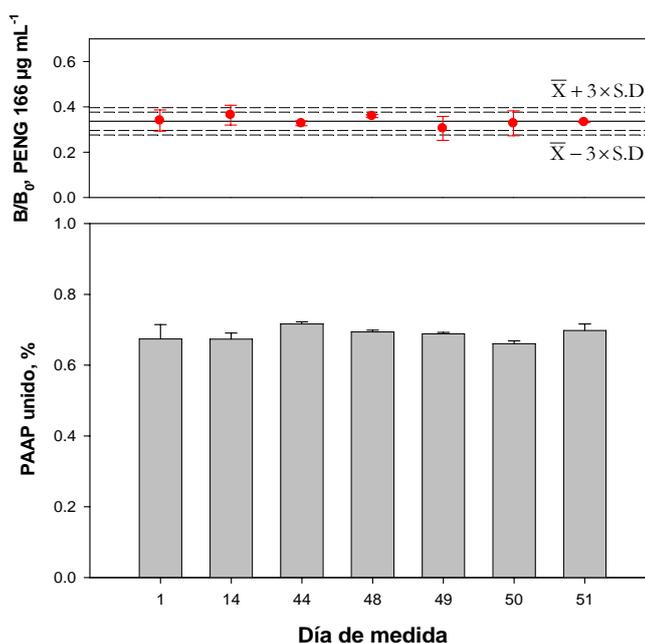


Figura 71. (■) Evaluación de la reproducibilidad del ensayo MIA en términos de porcentaje de unión del PAAP (250 nmol L^{-1}) al MIP1 (2.5 mg mL^{-1}). (●) Gráfico de control (Shewhart) construido para evaluar la variación de la respuesta del MIA (B/B_0) para una disolución patrón de PENG $166.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ en distintos días de medida ($n = 3/\text{día}$).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 71. Se puede afirmar que el fluoroensayo MIA desarrollado produce respuestas reproducibles y estables tanto en términos de señal analítica, como en la respuesta frente a la PENG.

4.5.3.1. REPRODUCIBILIDAD ENTRE LOTES DE FABRICACIÓN DEL MIP1

Para evaluar la **reproducibilidad del proceso de síntesis** del *polímero de impronta molecular* se ha comparado el porcentaje de unión obtenido para el PAAP en un lote sintetizado en Lund (Suecia) (**LOTE 1**, *fecha de fabricación*: mayo 2000) para el proyecto 'CREAM' con otro lote, sintetizado en nuestro laboratorio (**LOTE 2**, *fecha de fabricación*: marzo 2002) siguiendo procedimientos equivalentes (apartado 3.3.1. de la Parte Experimental).

Tabla 40. Estudio de reproducibilidad entre distintos lotes de MIP1 sintetizados ($n = 6$).

Lote	Polímero	PAAP unido, % (B_0)	RSD, %
1	MIP1	0.69 ± 0.02	2.9
	CP1	0.02 ± 0.05	-
2	MIP1	0.67 ± 0.03	4.5
	CP1	0.05 ± 0.04	-

* Intervalos de confianza $\pm t_{\alpha, v} \times S.D. / n^{1/2}$ al 95% de probabilidad.

Como se puede apreciar, los porcentajes de unión obtenidos para el PAAP en el MIP1, tanto para el Lote 1 como para el Lote 2, nos permiten concluir que **no existen diferencias significativas entre ambos lotes**. Esto demuestra, claramente, que el procedimiento de fabricación es reproducible y robusto, permitiendo obtener resultados precisos al trabajar con diferentes lotes de polímeros fabricados del mismo modo.

4.5.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TEMPORAL DEL MIP1

Para evaluar la estabilidad operativa del polímero sintético, se ha medido su capacidad para unir 250 nmol L^{-1} de PAAP a lo largo de un periodo de 30 meses desde la síntesis del MIP.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 72. El gráfico de Shewhart se ha obtenido eligiendo como valor central el promedio (\bar{X}) obtenido para la unión del

PAAP al polímero. Se ha seleccionado como límites inferiores y superiores $\pm 3 \times \text{S.D.}$ de \bar{X} .

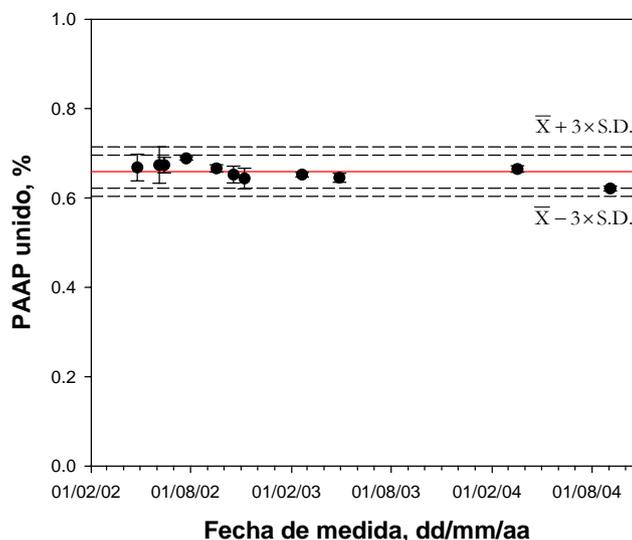


Figura 72. Medida del porcentaje de unión del PAAP al MIP1 en función del tiempo transcurrido desde la síntesis del polímero. $[\text{PAAP}] = 250 \text{ nmol L}^{-1}$, $[\text{MIP1}] = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Los resultados mostrados en la figura 72, demuestran que la capacidad de unión selectiva del polímero de impronta molecular (MIP1) se mantiene **estable** durante al menos **2 años y medio**. Durante este tiempo el MIP se conservó simplemente almacenado en botes de vidrio a temperatura ambiente y en ausencia de luz, lo cual resulta muy ventajoso frente al empleo de otro tipo de elementos de reconocimiento selectivo tales como los anticuerpos, que pueden perder sus características de reconocimiento selectivo si no son almacenados en condiciones específicas.

4.6. APLICACIÓN DEL MIA A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES

4.6.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G EN UN PREPARADO FARMACOLÓGICO

El ensayo fluorescente MIA desarrollado se ha aplicado al análisis de PENG en un preparado farmacológico. Para ello, se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1. de la Parte Experimental.

La curva de respuesta del analito patrón se ha preparado disolviendo una mezcla de *penicilina G potásica* (PENG-K) y *penicilina G procaína* (PENG-P) en acetonitrilo-agua (99:1, v/v) en la misma proporción que indica el fabricante del medicamento (1000000:3000000 UI). El calibrado obtenido se comparó con el obtenido utilizando sólo PENG-K.

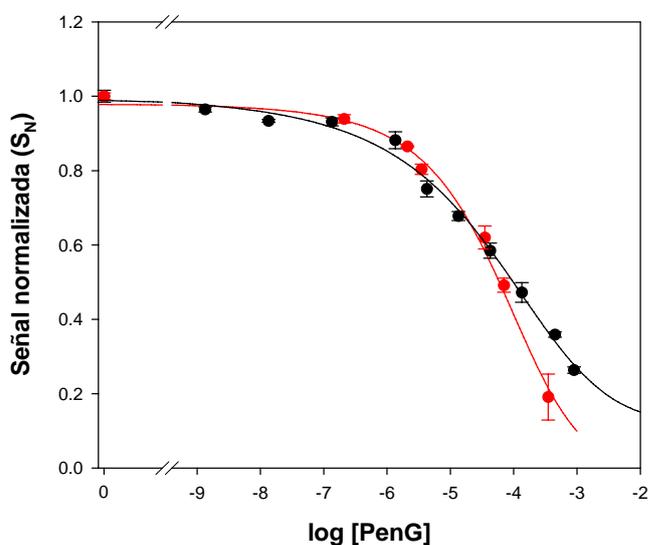


Figura 73. (●) Curvas de respuesta a PENG-K o (●) la mezcla PENG-K/PENG-P (1000000 IU:3000000 IU) con el MIP1.

Como puede observarse en la figura 73, existen diferencias significativas entre las curvas de calibrado obtenidas en ambos casos, sobretodo a concentraciones altas de analito que pueden atribuirse a la distinta fuerza iónica del medio [28,248].

Para evitar este efecto, la curva de calibrado utilizada para el análisis del fármaco se preparó empleando como disolución patrón la mezcla de PENG-K y PENG-P.

La validación del método se realizó mediante estudios de recuperación adicionando cantidades crecientes (349 y 699 mmol L⁻¹) de PENG-K/PENG-P, sobre las muestras de fármaco reconstituidas.

Tabla 41. Análisis de PENG en un preparado farmacéutico mediante el MIA desarrollado ($n = 3$).

Valor nominal*, mmol L ⁻¹	PENG, mmol mL ⁻¹ añadidos	PENG, mmol L ⁻¹ recuperado	R, %	RSD, %
347	0	318	92	11
	349	716	102	6
	699	1083	103	6

*Valor nominal: 50000 UI mL⁻¹ (PENG potásica) + 150000 UI mL⁻¹ (PENG procaína).

En la tabla 41 se muestran los valores de recuperación obtenidos que se encuentran comprendidos entre 92% y 103%. Además, los resultados se correlacionan de forma excelente con los obtenidos aplicando el método cromatográfico puesto a punto en el Capítulo VI (apartado 4.2.) de esta Memoria (figura 74).

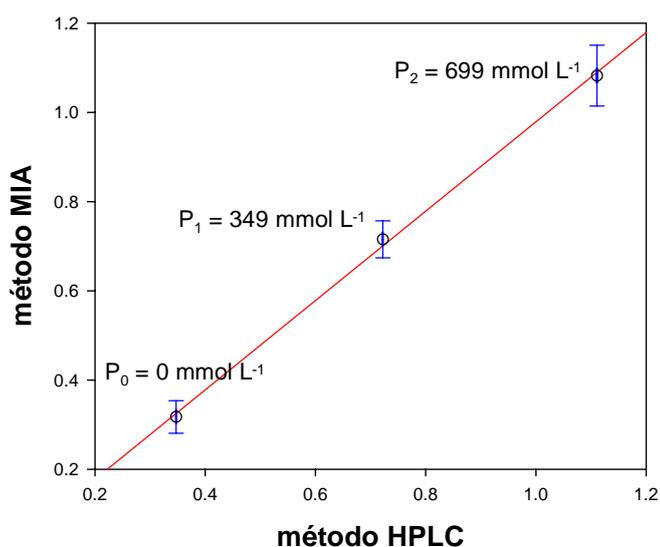


Figura 74. Recta de regresión BLS (regresión de mínimo cuadrados bivariante) para la comparación de métodos analíticos considerando errores en ambos ejes ($pte = 1.001$, $o.o. = -0.02$, $r^2 = 0.999$).

4.7. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR EMPLEANDO MIPs COMO ELEMENTOS DE RECONOCIMIENTO SELECTIVO

Tanto el sector agroalimentario como el medioambiental se encuentran entre las áreas de la ciencia que sufren una transformación continua debido al notable aumento de los niveles de automatización. El objetivo principal de dicha automatización es la obtención de sistemas de medida “in situ” rápidos y seguros, cuyas variables puedan ser fácilmente interpretadas y controladas. Estos dispositivos se denominan genéricamente **sensores**.

En este sentido, se llevaron a cabo nuevas investigaciones con el fin de evaluar la aplicabilidad del fluoroensayo MIA desarrollado para la construcción de un sensor químico de fibra óptica (optrodo).

Para ello, se examinó mediante el sistema óptico descrito en el apartado 3.3.3. de la Parte Experimental, muestras de polímero MIP1 que previamente habían sido incubadas con PAAP 250 nmol L^{-1} y diferentes concentraciones de PENG (0.5, 50, 166.6 y $333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

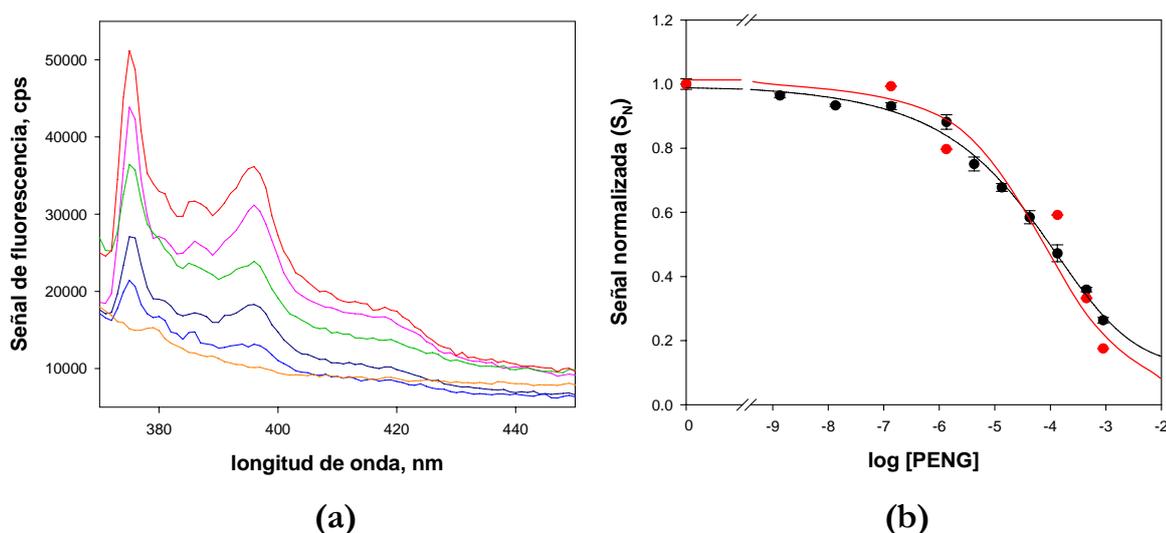


Figura 75. (a) Espectros de emisión en acetonitrilo-agua (99:1, v/v) del PAAP inmovilizado en el MIP1 en presencia de diferentes concentraciones de PENG (0.0, 0.5, 50, 166.6 y $333.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) así como el fondo obtenido para el polímero en ausencia de PAAP, λ_{exc} (PAAP) = 342 nm. (b) (●) Curva de calibrado obtenida con el sensor de fibra óptica en función de la concentración de PENG (apartado 3.3.3., Capítulo IV). (●) Curva de calibrado obtenida mediante el sistema en flujo optimizado (apartado 3.3.2., Capítulo IV) ($n = 3$).

En la figura 75 se muestran los espectros de emisión recogidos para cada una de las fracciones de polímeros medidas así como las curvas de respuesta obtenidas a $\lambda_{em} = 376$ nm. Los resultados obtenidos con el optosensor se correlacionan con los conseguidos midiendo la fluorescencia del PAAP no unido al MIP1 en el sobrenadante de la disolución de incubación empleando el sistema en flujo descrito en el apartado 3.3.2. de este capítulo.

En consecuencia, es posible demostrar la aplicabilidad del ensayo desarrollado para la fabricación de un optrodo para la determinación de PENG, con una fase sensible basada en polímeros de impronta molecular y detección indirecta mediante la monitorización de la luminiscencia de un derivado fluorescente de penicilina.

- Se ha sintetizado una librería de MIPs empleando PENG como molécula plantilla, variando la naturaleza del monómero funcional, entrecruzante, iniciador y porógeno empleados en la síntesis. A su vez, se han preparado los correspondientes polímeros de control (CP) empleando Boc-L-Phe-OH como molécula plantilla.
- Se ha evaluado la reactividad cruzada de siete derivados sintéticos fluorescentes de las penicilinas empleando ensayos competitivos con PENG marcada radiactivamente. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se puede concluir que el MIP1 obtenido empleando penicilina G (1 mmol), MAA como monómero funcional (10 mmol), TRIM como entrecruzante (15 mmol), AIBN (0.6 mmol) como iniciador y acetonitrilo (7.5 mL) como disolvente porógeno es el que proporciona mejores resultados en combinación con el PAAP.
- Se ha puesto a punto un método analítico para la determinación de penicilinas basado en un ensayo de tipo competitivo empleando un polímero de impronta molecular como elemento de reconocimiento selectivo y un derivado sintético fluorescente de las β -lactamas como competidor.
- Se ha comprobado que para el MIP1 el disolvente óptimo para el reconocimiento de la PENG es una mezcla de acetonitrilo-agua (99:1, v/v). La presencia de

mayores cantidades de agua disminuye de forma notable el reconocimiento selectivo, ya que se desfavorecen las interacciones por enlaces de hidrógeno entre el antibiótico β -lactámico y los sitios de unión del polímero.

- Se ha **caracterizado morfológicamente** la superficie y porosidad del polímero de impronta molecular MIP1, así como la del polímero de control (CP1), mediante porosimetría de adsorción/desorción de nitrógeno, comprobándose que el diámetro de poro más probable para el MIP1 es de 20 nm y para el CP1, de 15 nm, resultado que podría justificarse por el mayor tamaño que presenta la PENG (molécula plantilla del MIP1) con respecto a la Boc-L-Phe-OH (molécula plantilla del CP1).
- Se ha evaluado la **constante de unión** específica del PAAP al polímero MIP1. De los ensayos de unión realizados, se obtiene un perfil de adsorción no lineal en todo el intervalo de concentración ensayado que se ajusta a una isoterma de adsorción de tipo **Bi-Langmuir** proporcionando unos buenos parámetros de ajuste ($k_1 = 24 \pm 12 \text{ L mmol}^{-1}$, $k_2 = 0.7 \pm 0.2 \text{ L mmol}^{-1}$ y $q_1 = 24 \pm 7 \mu\text{mol g}^{-1}$, $q_2 = 125 \pm 7 \mu\text{mol g}^{-1}$). Los valores obtenidos indican que el derivado fluorescente PAAP resulta ser un excelente competidor para el desarrollo del MIA para PENG utilizando el MIP1.
- Se ha llevado a cabo un **estudio cinético** de la unión del marcador fluorescente PAAP con el MIP/CP en ausencia/presencia de PENG concluyéndose que es necesario un tiempo de incubación de 7 h para la realización del ensayo competitivo directo. Una vez transcurrido este tiempo, se mide la fluorescencia del sobrenadante empleando un sistema de inyección en flujo que permite aumentar la velocidad de muestreo frente a la realización de las medidas en discontinuo.
- El fluoroensayo MIA desarrollado permite la determinación de PENG en el intervalo de 3 a 890 $\mu\text{mol L}^{-1}$, con un **límite de detección** de 0.32 $\mu\text{mol L}^{-1}$. El **IC₅₀** (desplazamiento del 50%) corresponde a una concentración de 53 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

- Los estudios de **reactividad cruzada** (RC) demuestran que el ensayo también es sensible al ácido 6-APA (57%) y a los antibióticos AMOX (29%), AMPI (37%) y PENV (40%), que presentan una elevada semejanza estructural con la PENG. Por otra parte, la OXA (21%), CLOX (6%), NAFCI (3%) y DICLOX (0.9%) muestran una RC menor y el antibiótico β -lactámico CEPAP no es reconocido por el polímero. Asimismo, otros antimicrobianos sin estructura de tipo penicilina (cloramfenicol, norfloxacin, tetraciclina, oxitetraciclina, eritromicina y doxiciclina) no producen ningún tipo de respuesta para concentraciones superiores a 333.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Se ha comprobado que la interacción entre la sonda PAAP y el polímero se produce fundamentalmente a través del anillo β -lactámico de su estructura ya que el ácido pirenoacético (PAA), no muestra reactividad cruzada con la PENG por los sitios de unión específicos del polímero.
- Cuando se emplea el CP1 para la realización del ensayo no se produce reacción de competición entre la PENG y el PAAP, lo cual demuestra la ausencia de sitios de unión selectivos al analito en este polímero.
- Se ha evaluado la **estabilidad del polímero de impronta** realizando análisis periódicos de la unión directa del PAAP al MIP1 durante dos años y medio. Durante este tiempo, el MIP se ha mantenido seco, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se puede concluir que el fluoroensayo MIA desarrollado presenta una estabilidad operacional **superior a 865 días**.
- El ensayo fluorescente se ha aplicado con éxito a la determinación de PENG en un **preparado farmacológico**, validándose los resultados mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD).

- [1] *I Congreso Ibérico de Paleontología, XVI Jornadas de la Sociedad Española de Paleontología, Évora (Portugal) 2000.*
- [2] K. Haupt, K. Mosbach, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2495.
- [3] L. Ye, K. Haupt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1887.
- [4] N. Lavignac, C.J. Allender, K.R. Brain, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *510*, 139.
- [5] L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B* **2004**, *739*, 163.
- [6] J. Matsui, I.A. Nicholls, T. Takeuchi, *Tetrahed.-Asymm.* **1996**, *2*, 1357.
- [7] A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3769.
- [8] P.T. Vallano, V.T. Remcho, *J. Chromatogr. A* **2000**, 887, 125.
- [9] www.scirus.com (Octubre 2005).
- [10] C.F. van Nostrum, *Drug Discov. Today* **2005**, *1*, 119.
- [11] F. Lanza, B. Sellergren, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 59.
- [12] G. Wulff, W. Vesper, *J. Chromatogr.* **1978**, *167*, 171.
- [13] G. Wulff, S. Schauhoff, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395.
- [14] N. Sallacan, M. Zayats, T. Bourenko, A.B. Kharitonov, I. Willner, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 702.
- [15] G. Wulff, J. Vietmeier, *Makromol. Chem.* **1989**, *190*, 1727.
- [16] G. Wulff, W. Best, A. Akelah, *React. Polym.* **1984**, *2*, 167.
- [17] K.J. Shea, T.K. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1091.

- [18] K.J. Shea, D.Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4109.
- [19] G. Wulff, G. Wolf, *Chem. Ber.* **1986**, *119*, 1876.
- [20] G. Wulff, R. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 2799.
- [21] O. Norrlöw, M. Glad, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* **1984**, *299*, 29.
- [22] A. Guyot, M. Bartholin, *Prog. Polym. Sci.* **1982**, *8*, 277.
- [23] B. Sellergren, M. Lepisto, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5853.
- [24] S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, B.N. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 631.
- [25] M.M. Titirici, B. Sellergren, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1913.
- [26] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, *361*, 645.
- [27] L.I. Andersson, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 111.
- [28] L.I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4788.
- [29] A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 483.
- [30] J. Cederfur, Y. Pei, M. Zihui, M. Kempe, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 67.
- [31] L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9358.
- [32] R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sankasa, N. Kongyarit, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 519.
- [33] L. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, *Tetrahed. Lett.* **1984**, *25*, 5211.
- [34] I.R. Dunkin, J. Lenfeld, D.C. Sherrington, *Polymer* **1993**, *34*, 77.
- [35] S.A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E.V. Piletska, T.A. Thiele, M. Ulbricht, *Macromolecules* **2000**, *33*, 3092.
- [36] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **1994**, *664*, 276.
- [37] M. Kempe, L. Fischer, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.* **1993**, *6*, 25.
- [38] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 317.
- [39] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. Elgersma, K. Yano, I. Karube, Y.P. Parhometz, A.V. Elskaya, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10*, 959.
- [40] K. Tanabe, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro, K. Yano, I. Karube, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *22*, 2303.

- [41] K. Yano, K. Tanabe, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *363*, 111.
- [42] T. Pap, G. Horvai, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 99.
- [43] N. Hilal, V. Kochkodan, L. Al-Khatib, G. Busca, *Surf. Interface Anal.* **2002**, *33*, 672.
- [44] S.A. Piletsky, E.V. Piletska, K. Karim, K.W. Freebairn, C.H. Legge, A.P.F. Turner, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7499.
- [45] K. Sreenivasan, *Polym. Int.* **1997**, *42*, 169.
- [46] A. Kugimiya, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro, K. Yano, I. Karube, *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 1099.
- [47] P. Turkewitsch, B. Wandelt, G.D. Darling, W.S. Powell, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2025.
- [48] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 173.
- [49] B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **2001**.
- [50] G. Wulff, J. Vietmeier, H. G. Poll, *Makromol. Chem.* **1987**, *188*, 731.
- [51] M. Glad, P. Reinholdsson, K. Mosbach, *React. Polym.* **1995**, *25*, 47.
- [52] L. Ye, R. Weiss, K. Mosbach, *Macromolecules* **2000**, *33*, 8239.
- [53] S.A. Piletsky, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 94.
- [54] L. Andersson, B. Ekberg, K. Mosbach, *Tetrahed. Lett.* **1985**, *26*, 3623.
- [55] D.J. O'Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 144.
- [56] B. Sellergren, *Macromol. Chem.* **1989**, *190*, 2703.
- [57] "Optical Sensors and Switches", en V. Ramamurthy, K.S. Schanze (eds.), *Molecular and Supramolecular Photochemistry*, M. Dekker, Nueva York (EE.UU.), **2001**.
- [58] "Chemosensors for Ion and Molecular Recognition", en J.P.Y. Desvergne, A.W. Czarnik (eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda), **1997**.
- [59] C.L. Baird, D.G. Myszkka, *J. Mol. Recognit.* **2001**, *15*, 261.
- [60] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, T.L. Panasyuk, A.V. El'skaya, R. Levi, I. Karube, G. Wulff, *Macromolecules* **1998**, *31*, 2137.
- [61] B. Sellergren, L. Andersson, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3381.
- [62] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, *57*, 1742.
- [63] M. Lübke, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13342.

- [64] J.U. Klein, M.J. Whitcombe, F. Mulholland, E.N. Vulfson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2057.
- [65] M.J. Whitcombe, M.E. Rodriguez, P. Villar, E.N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7105.
- [66] S.A. Piletsky, K. Karim, E.V. Piletska, C.J. Day, K.W. Freebairn, C. Legge, A.P.F. Turner, *Analyst* **2001**, *126*, 1826.
- [67] F. Navarro-Villoslada, B. San Vicente, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 149.
- [68] A. Berezki, G. Tolokán, V. Horvai, F. Horváth, H.A.J. Lanza, B. Sellergren, *J. Chromatogr. A* **2001**, *930*, 31.
- [69] J. Wang, P.A.G. Cormack, D.C. Sherington, E. Khoshdel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5336.
- [70] K. Hosoya, K. Yoshihako, Y. Shirasu, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, J. Haginaka, *J. Chromatogr.* **1996**, *728*, 139.
- [71] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 35.
- [72] P. Li, F. Rong, X. Zhu, Y. Xie, C. Yuan, *Polym. Int.* **2003**, *52*, 1799.
- [73] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 187.
- [74] K. Haupt, A. Dzgoev, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 628.
- [75] L. Ye, K. Mosbach, *J. Amer. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2901.
- [76] T. de Boer, R. Mol, R.A. de Zeeuw, G.J. Jong, D.C. Sherington, P.A.G. Cormack, K. Ensing, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1296.
- [77] M.J. Whitcombe, C. Alexander, E. Vulfson, *Trends Food. Sci. Tech.* **1997**, *8*, 140.
- [78] R.J. Ansell, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* **1997**, *787*, 55.
- [79] E.V. Piletska, M. Romero-Guerra, A.R. Guerreiro, K. Karim, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 47.
- [80] K. Hosoya, K. Yoshizako, N. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, J. Haginaka, *Chem. Lett.* **1994**, *8*, 1437.
- [81] J. Haginaka, H. Sanbe, H. Takehira, *J. Chromatogr. A* **1999**, *857*, 117.
- [82] J. Haginaka, H. Takehira, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 331.
- [83] E. Yilmaz, K. Haupt, K. Mosbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 12.
- [84] F.G. Tamayo, M.M. Titirici, A. Martin-Esteban, B. Sellergren, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 38.

- [85] E. Yilmaz, O. Ramström, P. Möller, D. Sanchez, K. Mosbach, *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 1577.
- [86] R.E. Fairhurst, C. Chassaing, R.F. Venn, A.G. Mayes, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 1098.
- [87] T.Y. Guo, Y.Q. Xia, J. Wang, M.D. Song, B.H. Zhang, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5737.
- [88] A. Bossi, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, P.G. Righetti, A.P. Turner, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5281.
- [89] T. Panasyuk-Delaney, V.M. Mirsky, M. Ulbricht, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 157.
- [90] G. Wulff; D Oberkobusch; M.Minarík, *React. Polym.* **1985**, *3*, 261.
- [91] M. Glad, O. Norrlöw, B. Sellergren, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* **1985**, *341*, 11.
- [92] O. Prucker, R. Rühle, *Macromolecules* **1998**, *31*, 592.
- [93] O. Prucker, R. Rühle, *Macromolecules* **1998**, *31*, 602.
- [94] T. Otsu, M. Yoshida, *Makromol. Chem.-Rapid.* **1982**, *3*, 127.
- [95] I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 273.
- [96] E.C. Peters, M. Petro, F. Švec, J.M. J. Fréchet. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2288.
- [97] D. Wistuba, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 255.
- [98] L. Schweitz, P. Spégel, S. Nilsson, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 4053.
- [99] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 231.
- [100] M. Andaç, R. Say, A. Denizli, *J. Chromatogr. B* **2004**, *811*, 119.
- [101] M.L. Yang, Y.Z. Li, *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 103.
- [102] H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 203.
- [103] M.A. Gore, R.N. Karmalkar, M.G. Kulkarni, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 211.
- [104] H.Y. Wang , S.L. Xia, H. Sun , Y.K. Liu , S.K. Cao, T. Kobayashi, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 127.
- [105] Y. Lu, C. Li, X. Wang, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 53.
- [106] J. O'Mahony, A. Molinelli, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1383.
- [107] J.G. Karlsson, *Analyst* **2004**, *129*, 456.

- [108] J. Areizaga, M.M. Cortázar, J.M. Elorza, J.J. Iruin, *Polímeros*, Editorial Síntesis, Madrid (España), **2002**.
- [109] J. Yin, G. Yang, Y. Chen, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1090*, 68.
- [110] G. Paniagua González, P. Fernández Hernando, J.S. Durand Alegría, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *557*, 179.
- [111] R.J. Uempleby II, S.C. Baxter, M. Bode, J.K. Berch Jr., R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 35.
- [112] A.M. Rampey, R.J. Uempleby II, G.T. Rushton, J.C. Iseman, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1123.
- [113] C. Baggiani, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Tozzi, L. Anfossi, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504*, 43.
- [114] M. Lehmann, M. Dettling, H. Brunner, E. Günter, M. Tovar, *J. Chromatogr. B* **2004**, *808*, 43.
- [115] H. Kim, K. Kaczmariski, G. Guiochon, *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 5425.
- [116] R.J. Uempleby II, S. C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584.
- [117] I. Quiñones, B. Stanley, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1999**, *849*, 45.
- [118] Y. Chen, M. Kele, I. Quiñones, B. Sellergren, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2001**, *927*, 1.
- [119] R. J Uempleby II, K.D. Shimizu, *Polym. Prepr.* **2001**, *42*, 671.
- [120] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2025.
- [121] D. Kriz, O Ramsrom, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 345A.
- [122] L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B*, **2000**, *745*, 3.
- [123] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* **2003**, *999*, 23.
- [124] K. Haupt, *Analyst* **2001**, *126*, 747.
- [125] L. Zhu, X. Xu, *J. Chromatogr. A* **2003**, *991*, 151.
- [126] S.A. Piletsky, S. Alcock, A.P.F. Turner, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 9.
- [127] J. Xie, L. Zhu, X. Xu, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2352.
- [128] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *TrAC.* **2001**, *20*, 477.
- [129] J. Damen, D.C. Neckers, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3265.

- [130] K.J. Shea, E.A. Thompson, S.D. Pandey, P.S. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3149.
- [131] R. Müller, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Macromol. Rapid Comm.* **1993**, *14*, 637.
- [132] J. Matsui, I.A. Nicholls, I. Karube, K. Mosbach., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5414.
- [133] S.C. Liu, K. Mosbach, *Macromol. Rapid. Comm.* **1997**, *18*, 609.
- [134] R.J. Ansell, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, *57*, 1809.
- [135] D.A. Spivak, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1779.
- [136] B. Sellergren, K.J. Shea, *J. Chromatogr A* **1995**, *690*, 29.
- [137] H. Kempe, M. Kempe, *Macromol. Rapid. Comm.* **2004**, *25*, 315.
- [138] K. Skudar, O. Brüggemann, A. Wittelsberger, O. Ramström, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 327.
- [139] B.B. Prasad, S. Banerjee, *React. Funct. Polym.* **2003**, *55*, 159.
- [140] M. Kempe, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1948.
- [141] J. Matsui, Y. Miyoshi, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4404.
- [142] J. Matsui, T. Takeuchi, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 199.
- [143] O. Ramström, L. Ye, M. Krook, K. Mosbach, *Anal. Commun.* **1998**, *35*, 9.
- [144] A.E. Rachkov, S.H. Cheong, A.V. El'skaya, K. Yano, I. Karube, *Polym. Adv. Technol.* **1998**, *9*, 511.
- [145] J.L. Urraca, M.D. Marazuela, E.R. Merino, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 127.
- [146] O. Ramström, C. Yu, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 691.
- [147] J. Haginaka, C.K., *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 19.
- [148] J. Lange, D. Haberland, R. Thede, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2003**, *26*, 285.
- [149] R. Suedee, T. Srichana, J. Saelim, T. Thavornpibulbut, *Analyst* **1999**, *124*, 1003.
- [150] M. Walshe, E. Garcia, J. Howarth, M.R. Smyth, M.T. Kelly, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 119.
- [151] K. Ensing, C. Berggren, R.E. Majors, *LC GC Eur.* **2002**, *15*, 16.
- [152] J. Haginaka, *TrAC* **2005**, *24*, 407.
- [153] E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *J. Chromatogr. A* **2002**, *963*, 169.

- [154] W.M. Mullet, M. Walles, K. Levsen, J. Borlak, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. B* **2004**, *801*, 297.
- [155] G. Theodoridis, C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, A. Economou, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 69.
- [156] M.T. Muldoon, L.H. Stanker, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 803.
- [157] B. Dirion, F. Lanza, B. Sellergren, C. Chassaing, R. Venn, C. Berggren, *Chromatographia* **2002**, *56*, 237.
- [158] C. Crescenzi, S. Bayoudh, P.A.G. Cormack, T. Klein, K. Ensing, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2171.
- [159] L.I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia* **1997**, *46*, 57.
- [160] B. Sellergren, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1578.
- [161] E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *TrAC* **2006**, *25*, 143.
- [162] J.P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *522*, 137.
- [163] B. San Vicente, F. Navarro Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 115.
- [164] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1221.
- [165] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Chromatogr. B* **2004**, *813*, 137.
- [166] W.M. Mullet, M.F. Dirie, E.P.C. Lai, H. Guo, X. He, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *414*, 123.
- [167] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *552*, 81.
- [168] G. Brambilla, M. Fiori, B. Rizzo, V. Crescenzi, G. Masci, *J. Chromatogr. A* **2001**, *759*, 27.
- [169] J. Haginaka, H. Sanbe, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5206.
- [170] E.P.C. Lai, S.G. Wu, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 165.
- [171] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica*, Editorial Síntesis, Madrid (España), **2002**.
- [172] M. Quaglia, B. Sellergren, E. De Lorenzi, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1044*, 53.
- [173] M. Quaglia, E. De Lorenzi, C. Sulitzky, G. Massolini, B. Sellergren, *Analyst* **2001**, *126*, 1495.

- [174] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247.
- [175] S.A. Piletsky, A. P.F. Turner “New materials based on imprinted polymers and their application in optical sensors” en F.S. Ligler, C.A. Rowe Taitt (eds.) *Optical biosensors: Present and future*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **2002**.
- [176] K. Haupt, K. Mosbach, *TrAC* **1997**, *16*, 321.
- [177] S. McNiven, I. Karube “Toward optical sensors for biologically active molecules” en B. Sellergren (ed.) *Molecularly Imprinted Polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **2001**.
- [178] J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz García, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *405*, 67.
- [179] F.L. Dikert, H. Besenböck, M. Tortschanoff, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 149.
- [180] A. Fernández-González, R. Badía Laíño, M.E. Díaz- García, L. Guardia, A. Viale, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 247.
- [181] C.J. Percival, S. Stanley, M. Galle, A. Braithwaite, M.I. Newton, G. McHale, W. Hayes, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4225.
- [182] D.L. Rathbone, D. Su, Y. Wang, D.C. Billington, *Tetrahed. Lett.* **2000**, *41*, 123.
- [183] N.T. Greene, K.D. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5695.
- [184] T. Takeuchi, T. Mukawa, J. Matsui, M. Higashi, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3869.
- [185] D.L. Rathbone, Y. Ge, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 129.
- [186] Y. Liao, W. Wang, B. Wang, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 463.
- [187] W. Wang, S. Gao, B. Wang, *Org. Lett.* **1999**, *8*, 1209.
- [188] A.P.F. Turner, *Biosensor: McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology*, McGraw-Hill, Nueva York (EE.UU.), **1999**.
- [189] E. Toorisaka, K. Uezu, M. Goto, S. Furusaki, *Biochem. Eng. J.* **2003**, *14*, 85.
- [190] H. Ait-Haddou, S.M. Leeder, M.R. Gagné, *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 3854.
- [191] P. Pasetto, S.C. Maddock, M. Resmini, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 66.
- [192] A. Strikovskiy, J. Hradil, G. Wulff, *React. Funct. Polym.* **2003**, *53*, 49.
- [193] T. Porstmann, S.T. Kiessing, *J. Immunol. Methods* **1992**, *150*, 5.
- [194] M.L. Yarmush, A.M. Weiss, K.P. Antonsen, D.J. Odde, D.M. Yarmush, *Biotechnol. Adv.* **1992**, *10*, 413.
- [195] C.A.K. Borrebaeck, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 379.

- [196] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Muller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, *361*, 645.
- [197] J. Svenson, I.A. Nicholls, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 19.
- [198] M. Siemann, L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Agr. Food Chem.* **1996**, *44*, 141.
- [199] L.I. Andersson, R. Muller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 4788.
- [200] L. Ye, I. Surugiu, K. Haupt, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 959.
- [201] I. Surugiu, L. Ye, E. Yilmaz, A. Dzgoev, B. Danielsson, K. Mosbach, K. Haupt, *Analyst* **1999**, *125*, 13.
- [202] M. Janotta, R. Weiss, B. Mizaikoff, O. Bruggemann, L. Ye, K. Mosbach, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2001**, *80*, 75.
- [203] S. McNiven, M. Kato, R. Levi, K. Yano, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *365*, 69.
- [204] T. Takeuchi, A. Dobashi, K. Kimura, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2418.
- [205] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. El'Skaya, R. Levi, K. Yano, I. Karube, *Anal. Lett.* **1997**, *30*, 445.
- [206] J.L. Suarez-Rodríguez, M.E. Díaz-García, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 955.
- [207] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A. Bossi, K. Karim, P. Lowe, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 701.
- [208] I. Surugiu, J. Svitel, L. Ye, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 487.
- [209] S.A. Piletsky, E.V. Piletska, B.N. Chen, K. Karim, D. Weston, G. Barrett, P. Lowe, A.P.F. Turner, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4381.
- [210] I. Chianella, M. Lotierzo, S.A. Piletsky, I.E. Tohill, B.N. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1288.
- [211] K. Haupt, A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3936.
- [212] K. Haupt, *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 125.
- [213] R. Levi, S. McNiven, S.A. Piletsky, S.H. Cheong, K. Yano, I. Karube, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2017.
- [214] S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A. Bossi, K. Karim, P. Lowe, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 701.
- [215] C.F. Chow, M.H.W. Lam, M.K.P. Leung, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *466*, 17.
- [216] S. Kroeger, A.P.F. Turner, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3698.
- [217] I. Surugiu, B. Danielsson, L. Ye, K. Mosbach, K. Haupt, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 487.

- [218] B. Schollhorn, C. Maurice, G. Flohic, B. Limoges, *Analyst* **2000**, *125*, 665.
- [219] G. Orellana Moraleda, S. Aparicio Lara, M.C. Moreno Bondi, E. Benito Peña, *Patente ES 2197811*.
- [220] S.A. Piletsky, E. Terpetschnig, H.S. Anderson, I.A. Nichols and O.S. Wolfbeis, *Fres. J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 512.
- [221] G. Egidi, *Tesis Doctoral*, Universidad de Neuchâtel, **2004**.
- [222] E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, S. Aparicio, G. Orellana, J. Cederfur, M. Kempe, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2019.
- [223] Informe del proyecto CREAM “*Cartridges with Molecularly Imprinted Recognition Elements for Antibiotic Residues Monitoring in Milk*”, European Commission (“Management of the Living Resources. Key Action 1, the Food, Nutrition and Health program” (QLK1-CT-1999-00902).
- [224] S.A. Piletsky, E. Terpetschnig, H.S. Anderson, I.A. Nichols, O.S. Wolfbeis, *Fres. J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 512.
- [225] C.Y. Lin, C.C. Lin, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3997.
- [226] J.L. Urraca, J. González-Vázquez, M.C. Carbajo, M.J. Torralvo, G. Orellana, M.C. Moreno, (manuscrito en preparación).
- [227] S.J. Gregg, K.S. W. Sing, *Adsorption, surface area and porosity*, Academic Press 2ª edición, Londres (Reino Unido), **1982**.
- [228] F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing, *Adsorption by powders and porous solids: Principles, methodology and applications*, Academic Press, Londres (Reino Unido), **1999**.
- [229] K.S.W. Sing, D.H. Everett, R.A. W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603.
- [230] K.S.W Sing, *Chem. Ind.* **1968**, S1520.
- [231] B.C. Lippens, J.H. de Boer, *J. Catal.* **1965**, *4*, 319.
- [232] K. Haupt; A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3936.
- [233] Y. Chen, M. Kele, I. Quiñones, B. Sellergren, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2001**, *927*, 1.
- [234] R.J. Umpleby II, S.C. Baxter, A.M. Rampey, G.T. Rushton, Y. Chen, K.D. Shimizu, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 141.
- [235] P. Sajonz, M. Kele, G.M. Zhong, B. Sellergren, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1998**, *810*, 1.

- [236] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, "Flow-through (Bio)chemical Sensors", en *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam (Holanda), **1994**.
- [237] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, Wiley, Nueva York (EE.UU.), **1988**.
- [238] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*, E. Horwood (ed.), Christester (Reino Unido), **1987**.
- [239] J.P. Whelan, A.W. Kusterbeck, G.A. Wemhoff, R. Bredehorst, F.S. Ligler, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3561.
- [240] B. Sellergren, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry: Molecular imprinted polymers 23*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **2001**.
- [241] D. Kriz, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 71.
- [242] T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 285.
- [243] R.P. Ekins, "Immunoassay Design and Optimisation" en C.P. Price, D.J. Newman (eds.) *Principles and Practice of Immunoassay*, McMillan, Londres (Reino Unido), **1997**.
- [244] A. Fernández-González, R. Badía Laíño, M.E. Diaz-García, L. Guardia, A. Viale, *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 247.
- [245] ISO 3534-1:1993 "Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms".
- [246] J.G. Karlsson, L.I. Andersson, I.A. Nicholls, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *435*, 57.
- [247] Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, *J. Chromatogr. A* **2006**, (en prensa).
- [248] L.I. Anderson, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 111.

V.

**DESARROLLO DE UN
FLUOROINMUNOSENSOR PARA LA
DETERMINACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS**

V. DESARROLLO DE UN FLUOROINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

1. TÉCNICAS ANALÍTICAS INMUNOQUÍMICAS

1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS

1.1.1. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

1.1.1.1. Tipos de anticuerpos

1.1.2. INTERACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO

1.1.2.1. Afinidad y avidéz de un anticuerpo

1.2. TIPOS DE INMUNOENSAYOS

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS

1.4. INMUNOSENSORES

1.4.1. SOPORTES Y MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

1.5. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTÁMASAS

3.1.2. DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS

3.1.3. INMUNOREACTIVOS

3.1.4. SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN DE ANTICUERPOS

3.1.5. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

3.1.6. DISOLUCIONES

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- 3.2.1. SISTEMA DE CONTROL Y MANEJO DE FLUIDOS
- 3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS
- 3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

3.3. PROCEDIMIENTOS DE INMOVILIZACIÓN

3.4. PROCEDIMIENTO DE MEDIDA

- 3.4.1. PROTOCOLO DE ENSAYO DEL INMUNOSENSOR
- 3.4.2. DETERMINACIÓN DE PENICILINA V EN PIENSO

3.5. ANALISIS DE MUESTRAS REALES

- 3.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS RESIDUALES
- 3.5.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS PRELIMINARES

- 4.1.1. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS
- 4.1.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD: VALORACIÓN DE LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES POR LOS DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES

4.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO

- 4.2.1. DISEÑO DEL REACTOR
- 4.2.2. SELECCIÓN DEL INMUNOADSORBENTE
- 4.2.3. EFECTO DEL CAUDAL DE INMOVILIZACIÓN
- 4.2.4. EFECTO DEL VOLUMEN DE MUESTRA
- 4.2.5. INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA SOBRE LA RESPUESTA DEL INMUNOENSAYO
 - 4.2.5.1. Naturaleza de la disolución reguladora
 - 4.2.5.2. Efecto del pH
 - 4.2.5.3. Concentración de la disolución reguladora
 - 4.2.5.4. Efecto de la salinidad
- 4.2.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA
- 4.2.7. COMPETICIÓN SIMULTÁNEA VS CONSECUTIVA
- 4.2.8. TIEMPO DE INCUBACIÓN
- 4.2.9. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO-ANTICUERPO

4.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL INMUNOSENSOR

- 4.3.1. CALIBRACIÓN DEL SENSOR
- 4.3.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA
- 4.3.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA
- 4.3.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TEMPORAL DEL INMUNOSOPORTE

4.3.4.1. Estudios de reversibilidad

4.3.4.2. Estabilidad operativa del inmunosensor

4.4. APLICACIÓN DEL INMUNOSENSOR A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES

4.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G Y AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES

4.4.2. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE LECHE

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

TÉCNICAS ANALÍTICAS INMUNOQUÍMICAS

1

Las **técnicas inmunoquímicas de análisis** o **inmunoensayos**, aplicadas a la determinación de antibióticos, son de desarrollo relativamente reciente [1-3]. En un principio, los métodos inmunoquímicos fueron diseñados para el análisis de analitos de interés clínico, pero la posibilidad de producir **anticuerpos** (proteínas producidas de forma natural por el sistema inmunológico de los animales vertebrados), que reconozcan virtualmente a cualquier especie química, ha facilitado que su empleo se haya extendido a aplicaciones en el campo medioambiental y agroalimentario, entre otros.

La base de los inmunoensayos reside en la capacidad de unión del *anticuerpo* al *antígeno* (analito de interés, e.g. penicilina), unión que en casi todos los casos es cuantitativa y específica.

1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS

La mayoría de los organismos viven en medios potencialmente hostiles, de ahí que a lo largo de la evolución hayan ido desarrollando mecanismos de defensa. Este mecanismo está formado por un conjunto de células y componentes mediadores solubles que forman el *sistema inmunitario* [4].

De entre estos componentes, cabe destacar los **anticuerpos** -producidos por los *linfocitos B*- cuya función biológica es doble, pues por una parte reconocen

específica y selectivamente a la molécula invasora y por otra se unen fuertemente a ella neutralizando su actividad.

Los anticuerpos son glicoproteínas pertenecientes al grupo de las *γ -globulinas*, de ahí el nombre de *inmunoglobulinas (Igs)*, que están formadas por varias cadenas peptídicas. Su masa molecular oscila entre 150000 y 900000 D, con un contenido en carbohidratos del 2 al 15% y un punto isoeléctrico (pI) comprendido entre 4.4 y 9.5.

Las inmunoglobulinas pueden dividirse en cinco clases, en función de la estructura de sus cadenas peptídicas y el modo de activación de las funciones biológicas protectoras: inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA), M (IgM), D (IgD) y E (IgE).

De todas ellas, las inmunoglobulinas **IgGs** son las que se encuentran en mayor proporción en mamíferos y son las más utilizadas en el análisis inmunoquímico, mientras que las demás Igs no juegan un papel importante para estas aplicaciones.

En la figura 76 se muestra esquemáticamente la estructura básica de una IgG de mamífero.

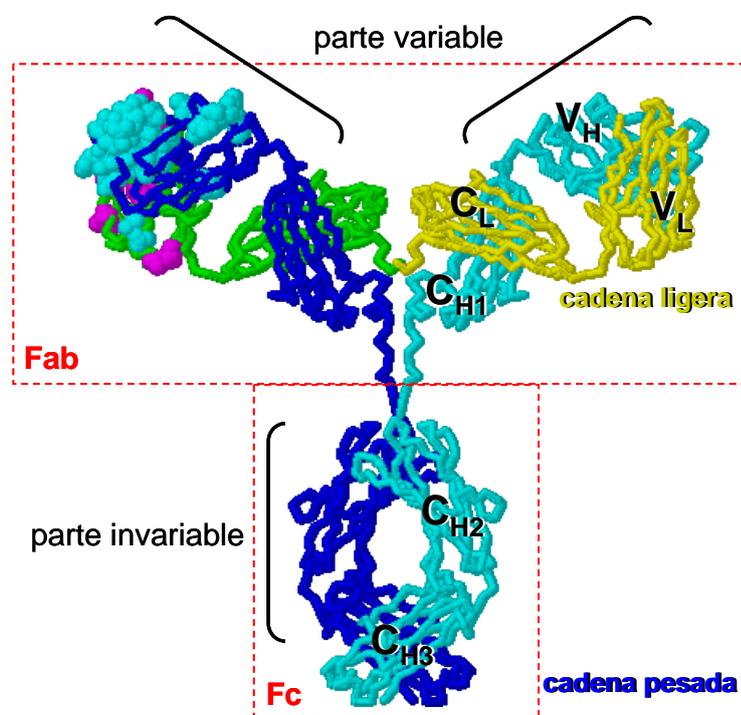


Figura 76. Estructura básica de una IgG de mamífero.

Básicamente, las IgGs están constituidas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Dos de las cadenas se denominan *pesadas* (H) y son idénticas entre sí, mientras que las otras dos son *ligeras* (L) y también iguales entre sí; así pues, los anticuerpos son moléculas bifuncionales, es decir, poseen dos sitios de reconocimiento para el antígeno.

Las cadenas presentan una *región variable* (V) situada en los dominios N terminales de cada cadena (V_L y V_H) que es la responsable de la interacción con los antígenos. También se la conoce como *dominio de unión*. Estos sitios de reconocimiento específicos y activos del anticuerpo (*parátomos*) interaccionan con la región única del antígeno capaz de unirse al anticuerpo (*epítipo*) y su secuencia de aminoácidos es distinta en función del tipo de IgG.

Por otro lado, *los dominios C terminales* son secuencias de aminoácidos que constituyen la región constante del anticuerpo y se denominan C_L o C_H según el tipo de cadena. Estas regiones presentan la misma secuencia de aminoácidos para inmunoglobulinas pertenecientes a la misma clase y sirven de anclaje a los receptores de determinadas células.

1.1.1. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

La obtención de un anticuerpo que reconozca específicamente a una especie química requiere la inmunización de un animal con dicha especie.

Si el *analito es macromolecular*, con pesos moleculares mayores de 5000 D, la inyección directa del mismo en el organismo productor de anticuerpos genera la respuesta inmune y los linfocitos del animal producen Igs capaces de unirse selectivamente al agente inyectado. Si el analito es una *molécula orgánica pequeña*, como es el caso de los antibióticos β -lactámicos, es necesario unirlo a una proteína ajena al organismo inmunizado, e inyectar el conjugado para generar una respuesta inmune.

En la terminología utilizada habitualmente, a estos compuestos de baja masa molecular se les denomina **haptenos**. Los *conjugados hapteno-proteína* capaces de producir una respuesta inmunitaria son los **inmunógenos**.

Las proteínas más utilizadas para este fin son: sero albúmina bovina (**BSA**), sero albúmina humana (**HSA**), ovoalbúmina (**OVA**), la hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (**KLH**) o IgGs de diferentes especies. Los criterios de selección de una proteína u otra se basan en su poder inmunizante (cantidad de determinantes antigénicos), solubilidad y facilidad de conjugación.

1.1.1.1. TIPOS DE ANTICUERPOS

En función del modo de obtención de los anticuerpos, estos pueden ser **monoclonales** (**MAbs**, del inglés “*Monoclonal Antibodies*”), **policlonales** (**PAbs**, del inglés “*Polyclonal Antibodies*”) o **recombinantes** (**RAbs**, del inglés “*Recombinant Antibodies*”).

Los *anticuerpos policlonales* se obtienen directamente a partir del suero de animales inmunizados y constan de una población heterogénea de Igs de distinta afinidad y selectividad hacia el hapteno frente al que se han obtenido. De hecho, únicamente una fracción de los mismos tiene afinidad por el analito [5].

Por otro lado, los *anticuerpos monoclonales* son poblaciones homogéneas de inmunoglobulinas secretadas por clones de una célula de hibridoma, que resulta de la fusión de una célula de mieloma inmortal con un linfocito B procedente de un animal inmunizado [6]. La tecnología hibridoma garantiza la producción ilimitada de MAbs con propiedades constantes [4], sin embargo, se necesita un equipamiento especial y medios de cultivos celulares especiales que incrementan su coste de producción. En consecuencia, muchos de los inmunoensayos que se comercializan hoy en día emplean todavía anticuerpos policlonales.

Una tercera posibilidad surge de los avances en las técnicas de ingeniería genética, que han propiciado el desarrollo de *anticuerpos recombinantes*. Su producción se consigue mediante la expresión de regiones funcionales de los anticuerpos en sistemas huésped relativamente simples y baratos [7], así como la modificación genética a nivel de ADN.

En la tabla 42 se resumen las principales propiedades de los tres tipos de Abs descritos [8].

Tabla 42. Propiedades más representativas de los Abs policlonales, monoclonales y recombinantes.

Propiedades	PAbs (Ab del suero)	MAbs (Ab de células de hibridomas)	RAbs (Ab producido por i. genética)
SUMINISTRO	Limitado y variable	Producción teórica ilimitada	Producción teórica ilimitada, no necesita inmunización
UNIFORMIDAD	Cambios de propiedades con diferentes sueros y sangrías	Propiedades constantes	Propiedades constantes, pueden alterarse por manipulación genética
AFINIDAD	Mezcla de Ab con diferentes afinidades, frecuentemente altas	Alta o baja, puede ser seleccionada por ensayos	Alta o baja, puede ser seleccionada por ensayos y modificarse
REACTIVIDAD CRUZADA	Variable en función de las diferentes selectividades e interacciones de baja afinidad	Diferente, depende de cada Ab individual	Diferente, depende de cada Ab individual. Puede ser modificada
CLASES Y SUBCLASES	Muchos isotipos	Un isotipo definido	Diferente, dependiendo del diseño molecular
DEMANDA DE AG	Se requiere alta pureza para un antisuero específico	Pueden ser Ags impuros o mezcla de Ags para inmunizar. Para análisis se necesitan Ags puros	Pueden ser Ags impuros o mezcla de Ags. Para análisis se necesitan Ags puros
COSTE	Bajo	Alto	Una vez establecido, bajos

1.1.2. INTERACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO

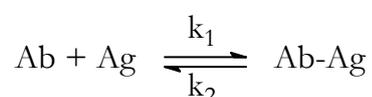
La unión entre el anticuerpo y el antígeno es una interacción reversible que se establece por fuerzas débiles entre los distintos grupos funcionales de ambos; esta unión tiene lugar en un espacio tridimensional.

Las interacciones que se producen pueden ser *hidrofóbicas* (entre grupos funcionales apolares), *dipolo-dipolo* y/o *enlace de hidrógeno* (entre grupos funcionales polares) o por *interacciones iónicas* (entre grupos funcionales cargados). Cuanto mayor es el número de interacciones que se establecen entre las moléculas y más adecuada la distancia entre los grupos funcionales implicados en su conjunto, mayor será la especificidad de unión entre el antígeno y el anticuerpo.

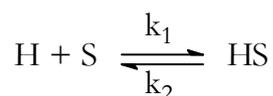
Las interacciones que se establecen entre el antígeno y el anticuerpo se pueden ver afectadas por cambios de pH, temperatura, fuerza iónica del medio, presencia de polímeros lineales, etc.. Estos factores pueden utilizarse para aumentar la especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo, disminuyendo las interacciones no deseadas o inespecíficas [9].

1.1.2.1. AFINIDAD Y AVIDEZ DE UN ANTICUERPO

La reacción de **afinidad** entre el antígeno y el anticuerpo está regida por la ley de acción de masas y puede representarse como:



donde k_1 es la constante de asociación y k_2 la constante de disociación. El análisis físico-químico de esta reacción resulta un poco complicado debido a la multivalencia de los anticuerpos ($n = 2$ para IgG, 4 para IgA y 5 para IgM) y de los antígenos. Por esto, y sólo para facilitar su estudio, se ha recurrido a la consideración teórica de la interacción de un solo sitio de combinación del anticuerpo (S) con un determinante antigénico o con una molécula de hapteno (H):



Según la ley de acción de masas, la constante de afinidad para esta reacción en el equilibrio vendría dada por:

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{HS}]}{[\text{H}][\text{S}]} \quad (16)$$

donde [HS] es la concentración molar del complejo y [H] y [S] las concentraciones (en moles/litro) de los reactantes en condiciones de equilibrio.

La energía de interacción inmunológica se puede describir también mediante otro término, la **avidez**. Éste parámetro se refiere a la fuerza total de unión entre el anticuerpo y el antígeno e incluye la suma de las afinidades de unión de todos los lugares individuales en el anticuerpo a sus epítomos. Así, la afinidad hace referencia a una unión en concreto, mientras que la avidez hace referencia al conjunto de todas las uniones que pueden producirse entre ambas moléculas. Por ejemplo, el antisuero producido al inmunizarse un individuo presenta varios tipos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigido a un tipo diferente de antígeno del antígeno original. En este caso se habla de avidez del antisuero, que es la fuerza conjunta de los distintos anticuerpos de ese antisuero que reconocen al antígeno.

1.2. TIPOS DE INMUNOENSAYOS

Los anticuerpos han solucionado el problema que se planteaba en algunas técnicas analíticas para reconocer específicamente una proteína u otros compuestos. La unión específica *antígeno (Ag)-anticuerpo (Ab)* puede utilizarse para cuantificar el compuesto, midiendo la cantidad de complejo **Ag-Ab** formado.

La unión de los antígenos con los anticuerpos da lugar a *complejos supramoleculares*, cuyo mayor tamaño produce una disminución de la solubilidad, originando su precipitación. Es posible utilizar esta propiedad para cuantificar la cantidad de complejo formado de manera análoga a la determinación de proteínas por métodos de turbidez.

Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, la interacción antígeno-anticuerpo se mide indirectamente empleando técnicas instrumentales convencionales y reactivos marcados con distintas especies fácilmente detectables: *radiactivas*, *absorbentes* o *fluorescentes*. Así, la especificidad en la determinación del compuesto de interés depende de las inmunoglobulinas, mientras que la detección se realiza gracias al marcaje de otros anticuerpos (**Ab***) [10], o empleando análogos marcados del antígeno o analito a determinar (**Ag***) [11], pudiéndose inferir la cantidad de compuesto presente en una muestra a partir de la medida de la cantidad de complejo (**Ag-Ab**)* formado.

Dada la amplitud del concepto de inmunoensayo, el número de posibles configuraciones que puede adoptar un inmunoanálisis es ciertamente enorme, hasta el punto de que su clasificación y terminología, no exenta de discrepancias, se convierte, en ocasiones, en un obstáculo para los propios especialistas [12].

Partiendo de esta base y apoyándonos en conceptos generales, los inmunoensayos se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios:

- *En función del lugar en el que se lleva a cabo la interacción analito-anticuerpo*, los inmunoensayos pueden ser **homogéneos**, cuando la reacción inmunoquímica se produce en el seno de la disolución sin que haya separación física entre el analito y el resto de componentes de la matriz o **heterogéneos**, cuando la interacción tiene lugar en la interfase entre un soporte sólido y la disolución, permitiendo la separación del analito del resto de la matriz.
- *Dependiendo del sistema auxiliar empleado para cuantificar la extensión de la interacción analito-anticuerpo* pueden clasificarse en **competitivos**, cuando el analito rivaliza con un homólogo marcado por los sitios específicos del anticuerpo, que se encuentra en cantidad limitante, y **no competitivos** en los que se incluyen todos los ensayos no basados en este principio general.
- *En función del orden de desarrollo del formato competitivo* pueden ser **directos**, cuando el analito y un hapteno marcado de estructura similar (Ag^*) se encuentran en disolución y compiten por unirse al anticuerpo que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido, o **indirectos**, cuando el hapteno análogo se encuentra inmovilizado y se añade a la disolución el analito y el anticuerpo.
- *Según el tipo de marcador utilizado en los reactivos auxiliares* podemos encontrarnos con inmunoensayos enzimáticos (**EIAs**, del inglés “*Enzyme immunoassays*”), radioinmunoensayos (**RIAs**, del inglés “*Radioimmunoassays*”) y fluoroinmunoensayos (**FIAs**, del inglés “*Fluoroimmunoassays*”), que combinan la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de los ensayos enzimáticos o las medidas radioquímicas

y la luminiscencia (fluorescencia, quimioluminiscencia), respectivamente [13]. Estas posibilidades pueden cambiarse de distinta forma dando lugar a formatos de trabajo e inmunoensayos diferentes [14-17].

No obstante, el inmunoensayo enzimático en fase heterogénea (**ELISA**, del inglés “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”) ha sido el más utilizado para la realización de diversos análisis. De hecho, los kits comerciales para la determinación de penicilinas están basados, casi en su totalidad, en este tipo de formato de ensayo (ver página 72). Desafortunadamente, la metodología ELISA presenta grandes inconvenientes cuando se desea realizar un control continuo y en tiempo real de la presencia de un contaminante en puntos de muestreo estratégicos.

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS

El inmunoensayo desarrollado en esta Tesis para el análisis de antibióticos β -lactámicos esta basado en un formato de tipo competitivo.

En este tipo de ensayo no existe una relación lineal entre la señal medida y la concentración de analito. Las curvas de calibrado, obtenidas representando la señal en función del logaritmo de la concentración de analito, tienen forma sigmoide (ver figura 77) y pueden ajustarse a la siguiente ecuación paramétrica:

$$Señal = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[analito]}{IC_{50}}\right)^b} + A_{min} \quad (17)$$

donde, A_{max} es la asíntota máxima correspondiente a la señal en ausencia de analito; A_{min} es la asíntota mínima que corresponde a la señal en exceso de analito, b es la pendiente de la curva en el punto de inflexión y el valor de IC_{50} corresponde al valor de la concentración de analito en dicho punto. Ambos valores, IC_{50} y b , son indicativos de la *sensibilidad* y del *intervalo dinámico o de trabajo* del método desarrollado.

Cuanto mayor sea la constante de afinidad del antígeno por el anticuerpo menor será el valor del IC_{50} , aunque en los ensayos de tipo competitivo este parámetro también depende de factores como la naturaleza y concentración del hapteno competidor o antígeno marcado, cantidad y actividad del anticuerpo empleado, formato del ensayo y de factores físico-químicos tales como la acidez, salinidad, etc..

En este tipo de curvas de calibrado el *intervalo dinámico o de trabajo (ID)* se define como el intervalo de concentraciones de analito que produce una señal entre el 80% y el 20% del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima (A_{max} y A_{min}).

Por lo que respecta a la *sensibilidad*, para este tipo de técnicas suele asociarse al valor mínimo de concentración de analito que genera una señal significativamente distinta a la del blanco [18]. De esta forma se considera como límite de detección (**LD**) la concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco del 10%. Cuando se emplean señales analíticas normalizadas el LD será la concentración de analito cuya señal normalizada es del 90% (Figura 77).

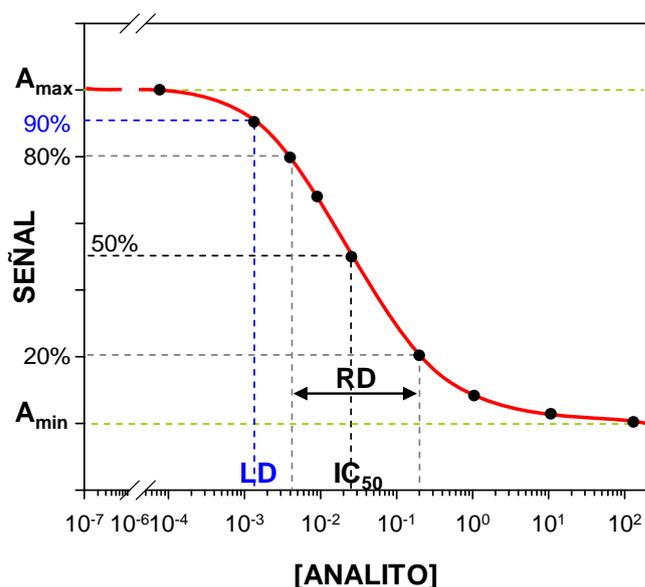


Figura 77. Curva de calibrado típica en inmunoensayos competitivos (concentración de analito expresada en unidades logarítmicas).

Por lo que respecta a la *selectividad* del ensayo, esta se define a partir de la *reactividad cruzada* (**RC**) de otros compuestos por el anticuerpo. En general, se puede decir que un compuesto interfiere sensiblemente cuando la RC es igual o superior al 10%, su interferencia es poco importante si la RC se encuentra entre el 1% y el 10% y despreciable si es $< 1\%$.

1.4. INMUNOSENSORES

Un **inmunosensor** se puede definir como un dispositivo analítico que incorpora un material inmunológicamente activo a un transductor con el propósito de detectar -reversible y selectivamente-, la concentración o actividad de especies químicas en una muestra [19].

Atendiendo a su estructura, un inmunosensor consta de dos partes principales [20-22]: un **elemento de reconocimiento** o **material inmunológicamente activo** que se encuentra en contacto directo con la muestra y estrechamente asociado (conectado o integrado) a un **transductor**. La función del elemento de reconocimiento es la de transformar la información química en una forma de energía que pueda ser medida por el transductor. La función del transductor es convertir la energía, que lleva la información química acerca de la muestra, en una señal analítica útil. En definitiva, un inmunosensor ha de ser capaz de detectar -reversible y selectivamente-, la concentración o actividad de especies químicas en cualquier tipo de muestra.

Análogamente a los inmunoensayos, existe una amplia gama de inmunosensores concebidos en base a numerosos parámetros (directos o indirectos, de ensayo competitivo y no competitivo, etc.) que, a su vez, pueden emplear una gran diversidad de soportes y métodos de inmovilización.

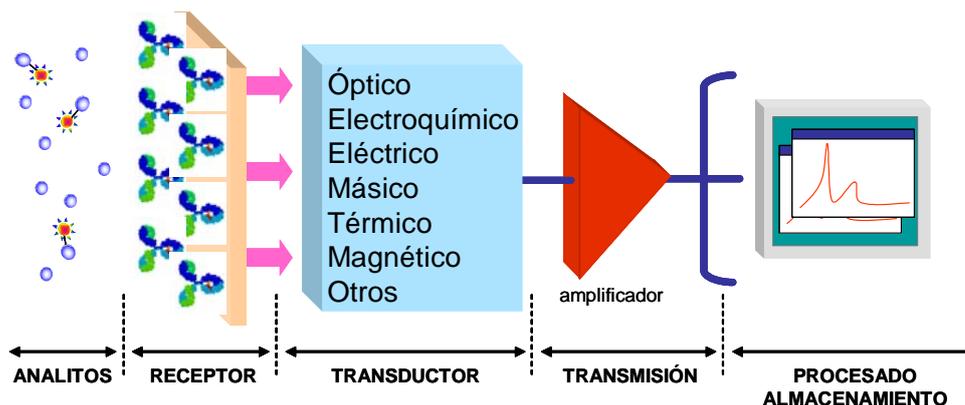


Figura 78. Componentes esenciales de un inmunosensor ideal.

No obstante, e independientemente del tipo de interacción analito-anticuerpo, los inmunosensores se pueden clasificar atendiendo al principio de funcionamiento del transductor, que puede ser: óptico, electroquímico, másico, magnético, térmicos o los basados en la medida de la radiación β (tabla 43).

Tabla 43. Clasificación de los inmunosensores de acuerdo con el principio de funcionamiento del transductor.

INMUNOSENSORES ÓPTICOS
Absorbancia
Luminiscencia
Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)
Reflectancia
Interferometría diferencial (SAR)
INMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS
Amperométricos
Potenciométricos
Voltamperométricos
Conductimétricos
Capacitivos
INMUNOSENSORES MÁSICOS
Oscilador piezoeléctrico
Onda acústica superficial (SAW)
INMUNOSENSORES MAGNÉTICOS
INMUNOSENSORES TERMOELÉCTRICOS

De entre los sensores ópticos, los más utilizados son los de resonancia de plasmón superficial (SPR), que miden directamente la interacción Ab-Ag a través de

pequeños cambios producidos en el índice de refracción por efecto de la unión del antígeno al anticuerpo. Hoy en día se comercializan equipos aptos para el análisis de antibióticos en muestras medioambientales y agroalimentarias basados en este principio de medida, como por ejemplo el BIAcore[®] (Biacore AB) [23,24]. Con el mismo sistema de transducción encontramos los biosensores de fibra óptica, en los que el componente bioactivo está inmovilizado y se miden los cambios espectroscópicos producidos al interactuar con un marcador (absorbancia, luminiscencia, índice de refracción, etc.) [25].

Los biosensores electroquímicos -potenciométricos, amperométricos, capacitivos, conductimétricos, etc.- han sido también aplicados a la determinación de antibióticos [26-28]. Estos sensores utilizan, en la práctica totalidad de los casos, una enzima para detectar indirectamente la extensión de la interacción inmunológica. Los inmunosensores piezoeléctricos detectan las inmunointeracciones de modo directo, puesto que están basados en la medida de la variación de las propiedades mecánicas – espesor y densidad- de la superficie bioactiva una vez producida la interacción. Se han descrito diversos biosensores de este tipo, algunos de los cuales han sido utilizados con éxito para el análisis de antibióticos [26]. No obstante, estos inmunosensores electroquímicos son poco utilizados debido a la imprecisión que suele obtenerse en las medidas.

Otra manera de clasificar a los inmunosensores es en función del modo en que tiene lugar la interacción Ab-Ag, diferenciándose entre inmunosensores **hidrostáticos** e **hidrodinámicos** [30]. En un inmunosensor hidrostático el elemento inmunoactivo es móvil, poniéndose en contacto con la disolución a medir simplemente por inmersión, de modo que la disolución problema permanece estática. En un inmunosensor hidrodinámico la superficie inmunoactiva es fija, y un sistema de manejo de fluidos se encarga de transportar las disoluciones de reactivos y muestra hasta dicha superficie. Los inmunosensores hidrodinámicos presentan mayor versatilidad y permiten realizar automáticamente las operaciones de medida. Un grupo representativo de este tipo de inmunosensores es el que opera en flujo.

La automatización de los métodos inmunoanalíticos constituye, en la práctica, una necesidad, sobretodo cuando se desea aplicarlos en procesos de control de materias primas, producción alimentaria y en estaciones de alarma, donde es necesario analizar un gran número de muestras de forma rápida y fiable [29]. En consecuencia, el empleo de *inmunoensayos e inmunosensores en flujo* ofrece indudables ventajas frente a los ensayos tradicionales [30]. Como se indicó anteriormente, en este caso la superficie inmunoactiva se mantiene fija y se utiliza un sistema de manejo de fluidos para transportar las disoluciones de reactivos y de muestra hasta la misma. De este modo, y empleando un dispositivo adecuado, es posible automatizar el sistema y mejorar la precisión de los resultados obtenidos con respecto a las técnicas clásicas.

Los inmunosensores en flujo suelen ser de dos tipos:

- Inyección en flujo continuo (**FI**, del inglés “*flow injection*”), en los que la disolución portadora fluye de forma continua por la inmunosuperficie inyectándose en ella las disoluciones de los reactivos empleados siguiendo un protocolo definido previamente.
- Inyección secuencial (**SI**, del inglés “*Sequential Injection*”), en este caso los reactivos se ponen en contacto de forma secuencial con la inmunosuperficie, sin que haya una disolución portadora. Este esquema es más adecuado que el anterior en el caso de que sea necesario emplear varias etapas concatenadas, cada una de ellas con caudales distintos y diferentes tiempos de incubación. De hecho, ha sido el protocolo empleado en el presente trabajo.

1.4.1. SOPORTES Y MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

En general, uno de los aspectos más relevantes relacionados con el desarrollo de inmunosensores es el relativo a la preparación de la superficie inmunológicamente activa. El material utilizado como *sopORTE* bioactivo, así como el método aplicado para la *inmovilización* de los inmunoreactivos -antígenos o anticuerpos-, va a determinar el formato del ensayo y la sensibilidad alcanzada [31].

Las *características* y *propiedades* más importantes que deben presentar los **soportes** destinados a la preparación de superficies inmunoabsorbentes son:

- Tamaño y porosidad adecuada.
- Estabilidad química.
- Alta capacidad de inmovilización.
- Bajo coste y disponibilidad comercial.
- Presentar grupos funcionales adecuados.
- Baja o nula reacción inespecífica.

En este sentido, la investigación actual sobre nuevos materiales se centra en el desarrollo de soportes que, mostrando dichas prestaciones, permitan la inmovilización de anticuerpos, enzimas, hormonas, lectinas, receptores, ácidos nucleicos, toxinas, drogas, etc. En la tabla 44 se muestran algunos de los soportes que han proporcionado mejores prestaciones para el desarrollo de inmunosensores [32].

Tabla 44. Características de soportes utilizados en el desarrollo de inmunosensores.

Fase sólida	Forma	Mecanismo de unión	Capacidad
POLIESTIRENO	placa, tubo, bolas	no covalente	250 – 500 ng cm ⁻²
POLIAMIDA (NAYLON®)	membrana	adsorción	400 µg cm ⁻²
POLIPROPILENO	placa	no covalente	ca. 300 ng cm ⁻²
CLORURO DE POLIVINILO y similares	placa, membrana	no covalente	ca. 300 ng cm ⁻² (placas)
POLICARBONATO	bolas, membrana	no covalente	ca. 300 ng cm ⁻² (bolas)
NITROCELULOSA	placa, membrana	no covalente	ca. 100 µg cm ⁻²
PROTEÍNA A, G, A/G unida a soporte	placa, bolas	no covalente	> 20 mg mL ⁻¹ para A, G, A/G (sólo Igs)
VIDRIO DE PORO CONTROLADO (CPG)	bolas	adsorción, covalente	10 – 30 mg mL ⁻¹
POLÍMERO ACTIVADO CON GRUPOS CARBOXILO O AMINO	placa, bolas	covalente, usando agentes bifuncionales	2 · 10 ¹³ – 10 ¹⁴ sitios activos cm ⁻²
SOPORTE MAGNÉTICO	bolas	depende de la superficie de las bolas	variable
SOL-GEL	gel	encapsulamiento	1 – 25 mg mL ⁻¹
AGAROSA	gel	adsorción, covalente	1 – 40 mg mL ⁻¹
PVDF	membrana	adsorción	125 µg cm ⁻²
HIDROXIAPATITO	placa vidrio	iónico	12.5 – 25 mg mL ⁻¹

Los **métodos de inmovilización** de los inmunoreactivos a los soportes son también muy variados. El modo de inmovilización es una variable de considerable importancia puesto que puede influir en la sensibilidad y especificidad del inmunosensor [33].

Cualquiera que sea el método de inmovilización elegido, éste ha de cumplir los siguientes requisitos:

- *Mantener la actividad y especificidad de la molécula.*
- *Conservar o incrementar la estabilidad del anticuerpo, importante de cara a la reutilización y almacenamiento del sensor.*
- *Asegurar la ausencia de interacciones inespecíficas del analito al soporte.*
- *Rápido y altamente reproducible.*
- *Evitar el empleo de condiciones extremas, como pH, temperatura y/o concentración salina durante el proceso de inmovilización.*

En la figura 79 se muestra un esquema de los procedimientos de inmovilización de los inmunoreactivos más utilizados en ensayos inmunoquímicos.

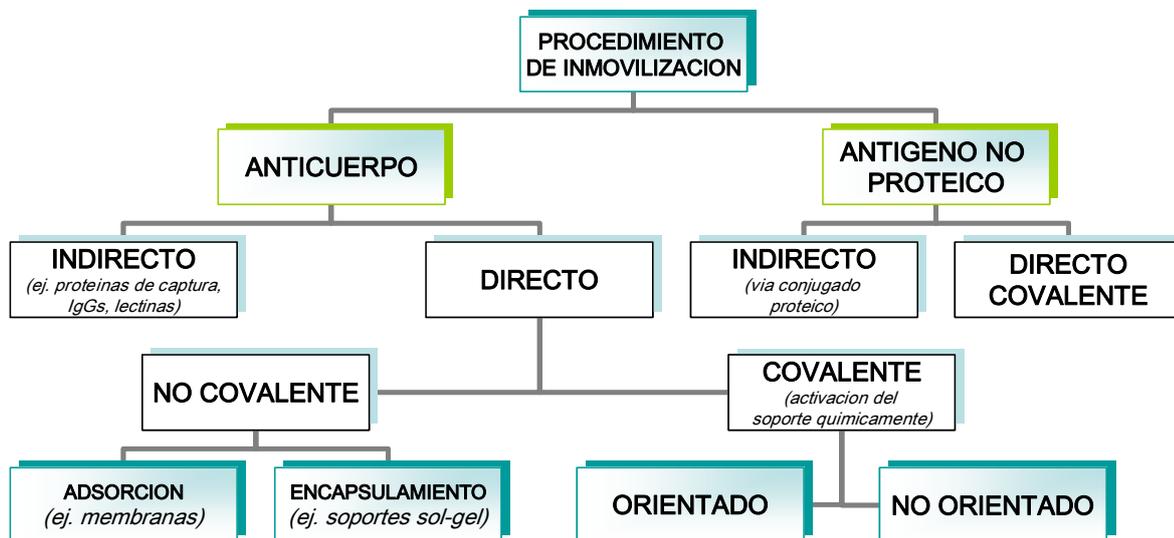


Figura 79. Esquema general de los procedimientos de inmovilización de anticuerpos y haptenos.

El principal inconveniente de los inmunosensores es la escasa reutilización de los soportes o inmunoabsorbentes empleados, debido a que éstos han de someterse a condiciones de desorción muy drásticas, necesarias cuando la afinidad entre el anticuerpo y el analito es elevada. Así, el uso de anticuerpos de muy alta afinidad conduce a sistemas prácticamente irreversibles [34], con lo que los inmunoabsorbentes son de un único uso y los inmunosensores resultan poco prácticos. Es aconsejable, por tanto, utilizar sistemas de afinidad media que aseguren la reutilización del adsorbente, aunque la disminución de la afinidad de los anticuerpos conlleve una pérdida de sensibilidad.

Hoy en día existen interesantes alternativas que permiten la utilización de anticuerpos de alta afinidad con óptimos resultados y que consisten en el empleo de sistemas de inmovilización indirecta y reversible de los mismos. Estos métodos se basan en el empleo de un reactivo (generalmente proteína A, G ó la variante recombinante A/G) inmovilizado covalentemente en un soporte inerte (como vidrio de poro controlado o un material polimérico) que presenta una elevada bioafinidad por la especie activa, normalmente inmunoglobulina G (IgG). El reconocimiento se realiza a través de la región F_c de la biomolécula, asegurando una inmovilización orientada [35,36]. Esta interacción suele ser lo suficientemente reversible como para permitir la reutilización del soporte bioactivo, evitando algunos de los problemas mencionados anteriormente. Además, gracias al empleo de nuevas disoluciones de anticuerpo en cada ensayo, la óptima sensibilidad del sistema de medida se encuentra garantizada.

Por todo ello, esta estrategia de inmovilización ha sido la seleccionada para desarrollar el inmunosensor que se presenta en esta Memoria.

1.5. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS APLICADOS AL ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

En la actualidad, la puesta a punto de inmunoensayos aplicados a la determinación de antimicrobianos ha experimentado avances notables [37].

Sin embargo, en el caso particular de los antibióticos β -lactámicos, dicho desarrollo está condicionado por las serias dificultades que plantea la producción de anticuerpos *anti-penicilinas* de elevada sensibilidad y reactividad cruzada para esta familia de compuestos [38-40].

En los últimos veinte años, se han descrito varios procedimientos para la síntesis de inmunógenos basados en la conjugación directa de penicilina G a proteínas mediante enlace covalente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los anticuerpos aislados presentan una escasa afinidad por aquellas penicilinas que aún conservan el anillo β -lactámico intacto [41-43], lo que hace necesario el empleo de una etapa previa de hidrólisis del antibiótico para la obtención de resultados óptimos.

Por otro lado, cuando se examinan los trabajos publicados en los últimos años sobre la determinación inmunoquímica de penicilinas empleando anticuerpos sensibles a la estructura 6-APA intacta, se comprueba que los análisis son poco sensibles [40,44,45] o presentan una excesiva especificidad [46-49] lo cual, en ocasiones, puede resultar una desventaja cuando se pretenden desarrollar métodos capaces de detectar a un familia de compuestos.

La tabla 45 resume las características analíticas de algunos inmunoensayos aplicados al análisis de antibióticos β -lactámicos descritos en la bibliografía, destacando con especial énfasis los aspectos comentados anteriormente.

Tabla 45. Características analíticas de algunos inmunoensayos para la determinación de algunos de los antibióticos β -lactámicos más representativos.

Analito	Muestra	Fundamento del ensayo	Características	Ref.
PENG, CLOX, CEFAP, SDA, SMA, ETPR, GENT, NEOM, ERY, TYL	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> PASA (parallel affinity sensor array): ELISA en formato ensayo competitivo indirecto <u>Anticuerpo:</u> MAbs: anti-haptenos (PENG, CLOX, CEFAP, SDA, SMA, ETPR, GENT, NEOM, ERIT y TYL) <u>Soporte:</u> Chip (tira vidrio funcionalizado con haptenos)</p>	<p><u>Detección:</u> Quimioluminiscencia Ab 2^o: IgG-HRP <u>LD:</u> 0.12 – 32 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PENG 4 $\mu\text{g L}^{-1}$)</p>	[50]
PENG, AMPI, AMOX, CLOX, CEFAP, CEFT, TICAR	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> Parallax β-lactam (IDEXX) LA fluorescente formato competitivo <u>Anticuerpo:</u> PAbs: anti-haptenos fluorescentes (PENG, CLOX y CEFT) <u>Soporte:</u> Tubos capilares de vidrio</p>	<p><u>Detección:</u> Fluorescencia <u>LD:</u> PENG: 3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ AMPI: 2.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ AMOX: 3.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ CLOX: 7.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ CEFAP: 16.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ CEFT: 33.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ <u>RC:</u> canal analítico PENG y CLOX: DICLOX 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ canal PENG: TICAR 10 $\mu\text{g L}^{-1}$</p>	[51]
PENG, CLOX	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> EIA (inmunoensayo enzimático) <u>Anticuerpo:</u> PAbs: anti-PENG hidrolizada, anti-CLOX hidrolizada</p>	<p><u>Detección:</u> Absorbancia Ab 2^o: IgG-AP (Sustrato TMB) <u>LD:</u> PENG: 0.05 ng L^{-1} CLOX: 0.1 ng L^{-1} <u>RC:</u> anti-PENG hidrolizada: PENV > 1% AMPI > 1% anti-CLOX hidrolizada: OXA 2.2%, DICLOX 0.6%</p>	[40]
ETPR, SMA, DA, CLOX	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> EIA (inmunoensayo enzimático): en formato ensayo competitivo indirecto <u>Anticuerpo:</u> MAbs: anti-haptenos (ETPR, SMA, DA, CLOX) <u>Conjugados:</u> haptenos-GOx</p>	<p><u>Detección:</u> Absorbancia Ab 2^o: IgG-HRP <u>LD:</u> ETPR: 3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ SMA: 7.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ SDA: 9.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ CLOX: 0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ <u>RC:</u> anti-CLOX: OXA 12%, DICLOX 600%</p>	[52]

Tabla 45. Características analíticas de algunos inmunoensayos para la determinación de algunos de los antibióticos β -lactámicos más representativos (continuación).

Analito	Muestra	Fundamento del ensayo	Características	Ref.
CEFX	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> FIIA (inmunoensayo en flujo modo inyección secuencial, SI)</p> <p><u>Anticuerpo:</u> PAbs: anti-CEFX</p> <p><u>Soporte:</u> Particulado Prot-G. Inmovilizada [53] (Porous Eupergit C250L)</p> <p><u>Reactor:</u> Dimensiones 20×10×3 mm</p>	<p><u>Detección:</u> Electroquímica CEFX-AP (Sustrato p.AF)</p> <p><u>LD:</u> 1 $\mu\text{g L}^{-1}$</p> <p><u>Recuperaciones:</u> 90 – 110%</p> <p><u>RC:</u> PENG, AMOX, CLOX no interfieren > 10 $\mu\text{g L}^{-1}$</p>	[54]
PENG	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> EIA (inmunoensayo enzimático)</p> <p><u>Anticuerpo:</u> PAbs: anti-AMPI</p>	<p><u>Detección:</u> Absorbancia AMPI-HRP</p> <p><u>LD:</u> PENG: 0.5 – 1.0 ng mL^{-1}</p> <p><u>Recuperaciones:</u> PENG: 89 – 97%</p> <p><u>RC:</u> AMPI (64%), AMOX (24%), OXA (100%), CLOX (29%), DICLOX (27%), NAFCl (120%)</p>	[55]
AMPI	Tampón salino	<p><u>Tipo de IA:</u> EIA (inmunoensayo enzimático):</p> <ol style="list-style-type: none"> ELISA Columna de inmovinoafinidad <p><u>Anticuerpo:</u> MAbs: anti-AMPI</p> <ol style="list-style-type: none"> MAB 3B5 MAB 1d1 	<p><u>Detección:</u> Absorbancia AMPI-HRP (Sustrato TMB)</p> <p>ELISA:</p> <p><u>LD para AMPI:</u> MAB 3B5: 11.7 ng mL^{-1} MAB 1D1: 16.6 ng mL^{-1}</p> <p><u>RC:</u> DICLOX: < 44% AMOX: 108%</p> <p>Columna de inmovinoafinidad: MAbs inmovilizados</p> <p><u>Capacidad:</u> AMPI: 6.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, CLOX: 5.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$</p>	[38]
CEFX	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> FIIA (inmunoensayo en flujo modo inyección secuencial, SI)</p> <p><u>Anticuerpo:</u> PAbs: anti-CEFX</p> <p><u>Soporte:</u> Particulado ProtG. Inmovilizada (Porous Eupergit C250L)</p> <p><u>Reactor:</u> Dimensiones 20×10×3 mm</p>	<p><u>Detección:</u> Amperométrica CEFX-AP (Sustrato p.AF)</p> <p><u>LD:</u> 1 $\mu\text{g L}^{-1}$</p> <p><u>Recuperaciones:</u> 97 ± 23%</p> <p><u>RC:</u> PENG > 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no RC otras cefalosporinas</p>	[56]

Tabla 45. Características analíticas de algunos inmunoensayos para la determinación de algunos de los antibióticos β -lactámicos más representativos (continuación).

Analito	Muestra	Fundamento del ensayo	Características	Ref.
AMPI	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> BIAcore assay (SPR) <i>inmunoensayo directo</i></p> <p><u>Anticuerpo:</u> MAbs: anti-AMPI hidrolizada</p>	<p><u>Detección:</u> sensible a cambios de densidad másica</p> <p><u>LD:</u> AMPI (<i>hidrólisis química</i>) 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ AMPI (<i>hidrólisis química</i>) 33.0 $\mu\text{g L}^{-1}$</p> <p><u>RC:</u> OXA, PENV, PENM, AMOX, CLOX, DICLOX, NAFCl, PENG, (30 – 325%) no RC cefalosporinas,</p>	[24]
CEFX, PENG, PENV, AMPI, AMOX, OXA, CLOX, DICLOX	Leche	<p><u>Tipo de IA:</u> ELISA <i>(en formato ensayo competitivo indirecto)</i></p> <p><u>Anticuerpo:</u> PABs: anti-6-APA <i>inmunógeno 6-APA-KLH</i></p> <p><u>Conjugado:</u> 6-APA-OVA</p>	<p><u>Detección:</u> Absorbancia Ab 2^o: IgG-AP (<i>Sustrato pNF</i>)</p> <p><u>RC:</u> PENG, PENV, AMPI (290%); AMOX (220%), OXA, DICLOX (100%), CEFX (3%)</p> <p><u>Purificación:</u> cromatografía inmunoafinidad degrada los IgGs desarrollados</p>	[57]

Abreviaturas: PENG: penicilina G; AMOX: amoxicilina, AMPI: ampicilina, CEFAP: cefapirina, CLOX: cloxacilina, OXA: oxacilina, DICLOX: dicloxacilina, PENV: penicilina V, CEFT: cefotiofur, ETPr: estreptomina, SDA: sulfadiazina, SMA: sulfametazina, GENT: gentamicina, NEOM: neomicina, ERY: eritromicina, TICAR: ticarcilina, CEFX: cefalexina, PENM: penetamato, TYL: tilosina, RC: reactividad cruzada, ELISA: inmunoensayo enzimático en fase heterogénea, IA: inmunoensayo, EIA: inmunoensayo enzimático, FIA: inmunoensayo en flujo, SI: inyección secuencial, SPR: resonancia de plasmón superficial, MAbs: anticuerpos monoclonales, PABs: anticuerpos policlonales, IgG-HRP: inmunoglobulina G conjugada a la enzima peroxidasa de rábano, IgG-AP: inmunoglobulina G conjugada a la enzima fosfatasa alcalina, Prot. G: proteína G, hapteno-GOx: glucosa oxidasa conjugada al hapteno, CEFX-AP: fosfatasa alcalina conjugada a cefalexina, AMPI-HRP: peroxidasa de rábano conjugada a ampicilina, 6-APA-KLH: hemocianina del molusco "Megathura crenulata" conjugada al ácido 6-aminopenicilánico, 6-APA-OVA: ovoalbúmina conjugada al ácido 6-aminopenicilánico, pAF: p-aminofenol, pNF: p-nitrofenol.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

2

Como ya se expuso en la Introducción (apartado 1, Capítulo V), los inconvenientes asociados a las técnicas convencionales de detección de antibióticos β -lactámicos y la necesidad de analizar un número de muestras cada vez más elevado ha favorecido el desarrollo de nuevos métodos analíticos en los que la rapidez, la economía, la aplicación directa de la muestra y la posibilidad de automatización son los aspectos de mayor interés.

En este sentido, los biosensores en flujo basados en métodos inmunoquímicos y/o enzimáticos son los representantes más significativos de esta tendencia. Entre ellos, los primeros han sido los más utilizados, después de los métodos cromatográficos, ya que combinan el empleo de sistemas de detección ópticos o electroquímicos con las propiedades particulares de los materiales inmunológicos, dando lugar a métodos de análisis de antibióticos rápidos, específicos y de elevada sensibilidad.

Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de inmunosensores sensibles a penicilinas ha sido muy limitado debido, principalmente, a los problemas asociados a la fabricación de anticuerpos selectivos a estos antibióticos dada la extremada reactividad del anillo β -lactámico frente a ataques nucleófilos.

Además, dicha inestabilidad es también un inconveniente para la síntesis y purificación de trazadores fluorescentes análogos de penicilinas, como quedó recogido en el capítulo III de esta Memoria. De hecho, no tenemos constancia de la existencia,

hasta el momento, de ningún ensayo inmunoquímico basado en el empleo de antígenos fluorescentes de penicilinas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en éste Capítulo se describe la fabricación de un inmunosensor para la cuantificación de antibióticos β -lactámicos de tipo *penicilinas*. Dicho biosensor está basado en un formato competitivo directo en el que el antibiótico compite por los sitios específicos de reconocimiento de diversos anticuerpos policlonales (**PAbs**), con los derivados fluorescentes de penicilinas diseñados, sintetizados y caracterizados dentro del proyecto 'CREAM'.

El ensayo se ha llevado a cabo mediante el empleo de un sistema de *análisis por inyección en flujo* (FI), totalmente automatizado, que permite una elevada velocidad de análisis, así como un aumento de la precisión de las medidas frente a los ensayos manuales.

Los objetivos concretos de éste Capítulo son:

1. Selección de la pareja *antígeno fluorescente (Ag*)/anticuerpo (Ab)* más adecuada para el desarrollo de un biosensor con óptimas prestaciones analíticas en términos de sensibilidad.
2. Selección y caracterización de inmunoabsorbentes particulados comerciales para su empleo como soportes de inmovilización de los inmunoreactivos en función de parámetros tales como la sensibilidad y reutilización del material.
3. Diseño de un sistema de inyección en flujo adecuado para la realización del inmunoensayo.
4. Estudio de los efectos de distintas variables fisicoquímicas (eg. pH, fuerza iónica) e hidrodinámicas (eg. caudal, diseño del reactor) sobre la sensibilidad y selectividad de los ensayos.
5. Caracterización analítica del inmunosensor desarrollado.

6. Evaluación de la reactividad cruzada frente a analitos relacionados estructuralmente con la penicilina G.
7. Aplicación del inmunosensor desarrollado al análisis de aguas residuales y muestras de leche enriquecidas con los antibióticos β -lactámicos de tipo penicilina.

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

a. Antibióticos β -lactámicos

- *Amoxicilina base anhidra*, en forma ácida, 87% (AMOX, Sigma).
- *Ampicilina trihidratada*, en forma de sal sódica, $\geq 86.6\%$ (AMPI, Sigma).
- *Penicilina G*, en forma de sal potásica, 95.7% (PENG, Sigma).
- *Penicilina V*, en forma de sal potásica, 93.7% (PENV, Sigma).
- *Oxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.8% (OXA, Sigma).
- *Cloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 91.8% (CLOX, Sigma).
- *Dicloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.2% (DICLOX, Sigma).
- *Nafcilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 87.9% (NAFCI, Sigma).
- *Cefapirina*, en forma de sal sódica (CEFAP, Sigma).
- *Ácido 6-aminopenicilánico*, 96% (6-APA, Aldrich).

b. Otros antibióticos

- *Enrofloxacina*, 99.7% (ENRO, Bayer AG).
- *Ciprofloxacina*, en forma de hidrocloreuro, 99.8% (CIPRO, Bayer AG).
- *Cloramfenicol*, $> 98\%$ (CLOR, Sigma).

c. Inhibidores de las β -lactamasas

- *Ácido clavulánico*, en forma de sal de litio, 94.9% (CLAV). Cedido por la Prof. M. Kempe (Lund, Suecia).

3.1.2. DERIVADOS FLUORESCENTES β -LACTÁMICOS

a. Derivados de pireno

- *Ácido [2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1-ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **PAAP** [58].
- *Ácido [2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(2R)-2-fenil-2-[(piren-1-ilacetil)amino]etanoil]amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **PAAM** [58].
- *Ácido [2S,5R,6R]-6-[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)etanoil]amino}-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **PAAX** [58].
- *Ácido [2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(4-piren-1-ilbutanoil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **PBAP** [58].
- *Ácido [2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(2R)-2-fenil-2-[(piren-1-ilbutanoil)amino]etanoil]amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **PBAM** [58].

b. Derivados de dansilo

- *Ácido [2S,5R,6R]-6-[(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonyl]amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **DAP**.
- *Ácido [2S,5R,6R]-6-[(5-(dimetilamino)-1-naftil)sulfonyl]amino-2-feniletanoil]amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, abreviadamente **DAM**.

3.1.3. INMUNOREACTIVOS

En este apartado se incluyen los anticuerpos policlonales de conejo (PABs) utilizados para el desarrollo del inmunosensor, tanto purificados como sin purificar.

- *Anticuerpo policlonal anti-APA (R543)*, obtenido a partir de la inmunización de conejos con el hapteno ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).
- *Anticuerpo policlonal anti-cefalexina (R544)*, obtenido a partir de la inmunización de conejos con el hapteno cefalexina.
- *Anticuerpo policlonal anti-penicilina G (R539)*, obtenido a partir de la inmunización de conejos con el hapteno penicilina G.

Todos estos sueros fueron obtenidos y donados por el profesor A. Amerongen del Instituto de Investigación Agrotecnológico (ATO) de la Universidad y Centro de Investigación de Wageningen (WUR) en Wageningen (Holanda).

- *Anticuerpo policlonal purificado anti-penicilina G (pPGv)*, obtenido a partir de la inmunización de conejos con el hapteno penicilina G y suministrado por Pabsproductions (Alemania).
- *Anticuerpo policlonal anti-2,4-D (p24D)*, obtenido a partir de la inmunización de conejos con el hapteno ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Donado por el profesor S. A. Eremin de la Facultad de Química de la Universidad Estatal, Lomonosov (Rusia).

3.1.4. SOPORTES DE INMOVILIZACIÓN DE ANTICUERPOS

- *Inmunoadsorbente Ultralink[®] Immobilized Protein A Plus (PA, Pierce)*. Este soporte consiste en partículas de un copolímero bis-acrilamida/azlactona con proteína A inmovilizada covalentemente.
- *Inmunoadsorbente Ultralink[®] Immobilized Protein A/G Plus (PAG, Pierce)*. Este soporte consiste en partículas de un copolímero bis-acrilamida/azlactona con proteína A/G inmovilizada covalentemente. Esta proteína recombinante está diseñada para unirse a una gran variedad de Igs (en mayor medida, IgGs) de diferentes especies animales y muestra una capacidad de unión superior a las proteínas A o G por separado [59].

- *Immunoabsorbente Prosep[®]-A Media* (CPGA, Millipore). Este soporte consiste en partículas de vidrio de poro controlado con proteína A inmovilizada covalentemente.

3.1.5. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

a. Disolventes orgánicos

- Metanol, 99.8% para HPLC (SDS).
- Acetonitrilo, > 99.8% para HPLC (SDS).

b. Reactivos para la preparación de disoluciones reguladoras

- Monohidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Dihidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Carbonato base anhidra, en forma de sal sódica, 99% p.a. (Riedel-de Haën).
- Bicarbonato, en forma de sal sódica, 99.7% p.a. (Riedel-de Haën).
- Glicina, 99% p.a. (**Gly**, Sigma).
- Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano, 99.8% (**TRIS**, Fluka).
- Ácido clorhídrico, 35% p.a. (Panreac).
- Ácido sulfúrico, 96% p.a. (Merck).
- Hidróxido sódico, 99% p.a. (Panreac).
- Cloruro sódico, 99% p.a. (Merck).
- Cloruro potásico, 99% p.a. (Fluka).

c. Otros reactivos

- Sulfato de amonio, 99% p.a. (Fluka).
- Agua purificada Milli-Q (Millipore).

3.1.6. DISOLUCIONES

Todas las disoluciones acuosas se han preparado utilizando agua purificada mediante un sistema milli-Q (Millipore).

a. Preparación de las disoluciones patrón de antibióticos, derivados fluorescentes β -lactámicos y anticuerpos

- *Disolución patrón de antibióticos 0.8 g L^{-1}* : Se disuelve la cantidad adecuada del compuesto en 10 mL de agua pura conservándose a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante no más de 15 días. Las disoluciones de trabajo, de menor concentración, se preparan diariamente por dilución de la disolución patrón con tampón fosfato 20 mmol L^{-1} , pH 8.0.
- *Disolución patrón de derivados fluorescentes β -lactámicos 0.2 g L^{-1}* : Se disuelve 1 mg de sonda fluorescente en 5 mL de acetonitrilo. Se mantiene en atmósfera inerte (argón) a -20°C . Las disoluciones de menor concentración, se preparan diariamente por dilución de la disolución patrón con tampón fosfato (PB) 20 mmol L^{-1} , pH 8.0.
- *Disolución de trabajo de anticuerpo. R543, R544, R539*: Se preparan diariamente por dilución directa con tampón fosfato (PB) 20 mmol L^{-1} , pH 8.0. *pPGv, p24D*: Se realiza una dilución a partir de disoluciones patrón del anticuerpo (liofilizado previamente y reconstituido en agua milli-Q).

b. Disoluciones reguladoras

- *Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 20 mmol L^{-1} , pH 8.0 (PB).*
- *Disolución reguladora Gly/HCl 0.1 mol L^{-1} , pH 2.0 (Gly/HCl).*
- *Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 mol L^{-1} , NaCl 138 mmol L^{-1} , KCl 2.7 mmol L^{-1} , pH 8.0 (PBS).*
- *Disolución reguladora Gly/NaOH 1.5 mol L^{-1} , NaCl 3 mol L^{-1} , pH 8.0 (Gly/NaOH).*
- *Disolución reguladora TRIS/HCl 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0 (TRIS/HCl).*
- *Disolución reguladora $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 50 mmol L^{-1} , pH 9.6 (CB).*

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

3.2.1. SISTEMA DE CONTROL Y MANEJO DE FLUIDOS

Para la consecución de las etapas implicadas en el desarrollo del inmunosensor en flujo: selección del anticuerpo y del antígeno marcado (derivado fluorescente β -lactámico), elección del inmunosoporte y formato de ensayo, etc., se utilizó un sistema de manejo de fluidos (figura 80 y 83).

El dispositivo consta de una **bomba automática de pistón**, con una jeringa de 2.5 mL, conectada a una **válvula de distribución** de 8 canales (*“syringe pump”*, módulo 50300 de Kloehn Co. (Las Vegas, NV)). Además, se dispone de una **válvula de distribución adicional** de 8 canales (*“intellect valve system”*, módulo 50120 de Kloehn Co. (Las Vegas, NV)), que se encuentra conectada mediante tubería de teflón de 0.8 mm de diámetro interno, a uno de los canales de la válvula del módulo 50300.

Todas las operaciones realizadas con el sistema (movimientos de cada una de las válvulas y de la jeringa, tiempos de incubación, repeticiones de ciclo, etc.) se controlan automáticamente con un ordenador utilizando el programa informático Winpump[®] versión 3.3, suministrado por el fabricante.



(a)

(b)

Figura 80. (a) Bomba automática de pistón, *“syringe pump”* modelo 50300, (b) Sistema de válvula de distribución *“intellect valve system”* modelo 50120.

3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS Y FLUORÍMETROS

- ***Espectrofotómetro Varian modelo Cary-3 Bio*** para la realización de espectros de absorbancia (UV-vis) conectado a un ordenador para la adquisición, tratamiento de datos y control del instrumento empleando el software original *Cary WinUV versión 3.1 (Varian Inc.)*.
- ***Espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-50B*** provisto de una lámpara pulsada de xenon (10 μ s anchura de pulso, 50 Hz) como fuente de excitación y un fotomultiplicador Hamamatsu R-928, de respuesta extendida al rojo, con voltaje fijado en 775 V. El instrumento está conectado a un ordenador para el almacenamiento y tratamiento de datos (Software original *FL Winlab versión 4.00.02, Perkin-Elmer Inc.*). El control de temperatura se lleva a cabo mediante un baño termostático Polyscience 9015.

3.2.3. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- Baño termostático Polyscience[®] 9015, con control digital de temperatura (± 0.5 °C).
- Bomba peristáltica de 4 canales (Gilson Miniplus 2).
- pH-metro Orion 710A/ISE dotado de un electrodo combinado de vidrio.
- Balanzas analíticas (Sartorius), con 0.1 mg de sensibilidad y Mettler AT261 DeltaRange[®], con 0.01 mg de sensibilidad.
- Célula de flujo para medidas de fluorescencia Hellma[®] modelo 176.050, con un volumen interno de 450 μ L y paso óptico 10 \times 4 mm.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Filtrador de disolventes (Afora), utilizado para el filtrado de las disoluciones empleadas con la bomba de jeringa.
- Agitador magnético/termostatizador (Ikamag Ret).
- Agitador vortex, (Bio-vortex).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Micropipetas (Biohit) regulables de émbolo capilar de 50, 100, 200, 500 y 1000 μ L.

- Micropipetas electrónicas (Biohit) regulables de 1 y 8 canales de volumen variable.
- Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore.
- Filtros de PTFE, modelo Millex-FG (Millipore, 13 mm, tamaño de poro 0.20 μm).
- Centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf AG).
- Tubos de centrífuga modelo Amicon[®] Ultra-15 PLCC (membrana de polietilsulfona 5000 Da, NMWL) (Millipore).
- Fritas de polietileno (Varian Inc., tamaño de poro 20 μm).
- Inmunoreactores de polimetacrilato de metilo de dimensiones variables: 2 \times 2 mm, 4 \times 4 mm, 4 \times 6 mm, 6 \times 10 mm y 4 \times 15mm ($\phi \times L$) fabricados en la Universidad Politécnica de Valencia (figura 81).

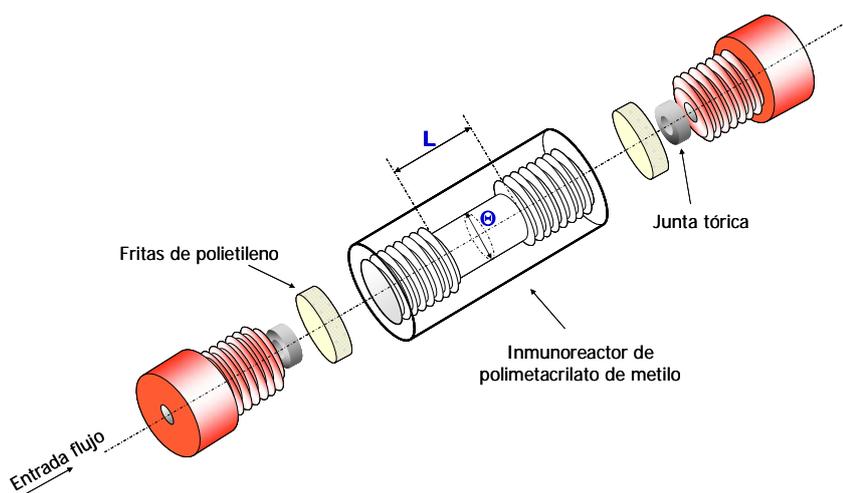


Figura 81. Esquema del reactor empleado para las medidas realizadas con el inmunosensor.

- **Programa** de tratamiento y procesado de datos *Sigma Plot 8.0*, SPSS (2002) y Microsoft Excel 2003.

3.3. PROCEDIMIENTOS DE INMOVILIZACIÓN

El procedimiento de inmovilización de los anticuerpos optimizado es de tipo reversible. En los soportes evaluados, la inmovilización tiene lugar mediante una

reacción de **bioafinidad** entre la proteína A, o la proteína recombinante A/G, y/o la fracción constante de las IgGs, de modo que se asegure la inmovilización orientada de los anticuerpos (ver figura 82).

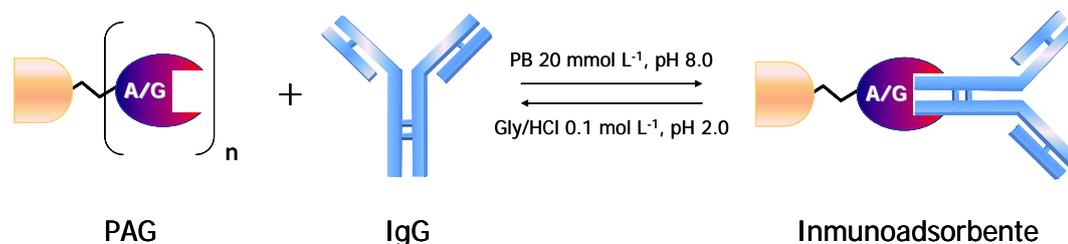


Figura 82. Procedimiento de inmovilización reversible de los anticuerpos.

A diferencia de otros procedimientos de unión de inmunoreactivos a soportes, como son la inmovilización covalente sobre materiales químicamente modificados (e.g. CPG, gel de agarosa) [60] o inmovilizaciones por absorción o atrapamiento (e.g. membranas, sol-gel) [61], la inmovilización por bioafinidad se realiza en el curso del ensayo, sin necesidad de una etapa previa de modificación química de los anticuerpos. De esta forma se evitan posibles desnaturalizaciones que afectarían irreversiblemente a su capacidad de reconocimiento.

La inmovilización del anticuerpo en los soportes seleccionados se realiza en tampón fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 8.0 (PB). Bajo estas condiciones, el soporte bioactivo tiene una capacidad de unión de IgGs muy elevada, dependiente de la especie animal de la que procedan. En el caso del PAG la afinidad por IgGs de origen humano es de 28 mg por mililitro de gel. Además, la reversibilidad de la interacción anticuerpo-soporte se consigue de manera fácil y satisfactoria mediante la utilización de una disolución desorbente de tampón Gly/HCl 0.1 mol L⁻¹ a pH 2.0.

3.4. PROCEDIMIENTO DE MEDIDA

El dispositivo experimental que se ha empleado para el desarrollo del inmunosensor sensible a antibióticos β -lactámicos, está formado por un sistema de inyección de muestras y una célula de flujo (Hellma, modelo 176.050) dispuesta en el detector fluorimétrico.

El haz de luz procedente de la lámpara pulsada de Xe (50Hz) del espectrofluorímetro pasa a través del monocromador de excitación (rendija 6 nm) hasta la célula de flujo. La radiación luminiscente procedente de la muestra atraviesa el monocromador de emisión a través de una rendija de 20 nm y se detecta con un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R-928. Las señales procedentes del mismo se conducen a un amplificador, cuya salida se registra en un ordenador provisto del software apropiado. La señal de fluorescencia se detecta de forma continua excitando en el máximo de la banda de absorción de los conjugados de penicilinas fluorescentes evaluados, midiendo la intensidad de emisión en el máximo de la banda de emisión correspondiente cada 2 segundos (eg. PAAP, $\lambda_{exc} = 342$ nm y $\lambda_{em} = 376$ nm).

El elemento sensor está formado por un reactor tubular de polimetacrilato de metilo de lecho empaquetado en el que se dispone el soporte inmunoactivo. El procedimiento de empaquetamiento de las partículas de PAG consiste en acoplar, en el orificio de salida, una frita de polietileno (diámetro 5 mm, espesor 1 mm) que se ajusta al extremo del reactor (ver figura 81). A continuación, se bombea una suspensión de las partículas del inmunosorte hasta que la cavidad central de la columna se completa y se sella mediante el ajuste de una segunda frita de polietileno en el orificio de entrada. En último lugar, la salida del reactor se conecta a la célula de flujo mediante conducciones de teflón de 0.8 mm de diámetro interno y la entrada se acopla al sistema de control y manejo de fluidos.

Dicho sistema consta de una bomba de pistón con una jeringa de 2.5 mL de capacidad conectada a una válvula de distribución de 8 vías. Los canales libres de la válvula de distribución se utilizan para aspirar o dispensar las disoluciones de reactivos

En este caso, y a diferencia de otros procedimientos, los inmunocomplejos formados en disolución (Ag - Ab y/o Ag^* - Ab) son atrapados por el soporte, con lo que las reacciones de competición se realizan en disolución.

En primer lugar se toman volúmenes fijos de disoluciones de anticuerpo, antígeno marcado y disolución problema (patrón o muestra), inyectando la mezcla resultante, previamente agitada, a través del reactor. La señal de fluorescencia que se obtiene en el espectrofotómetro es proporcional a la cantidad de Ag^* (PAAP) que no ha interactuado con el Ab .

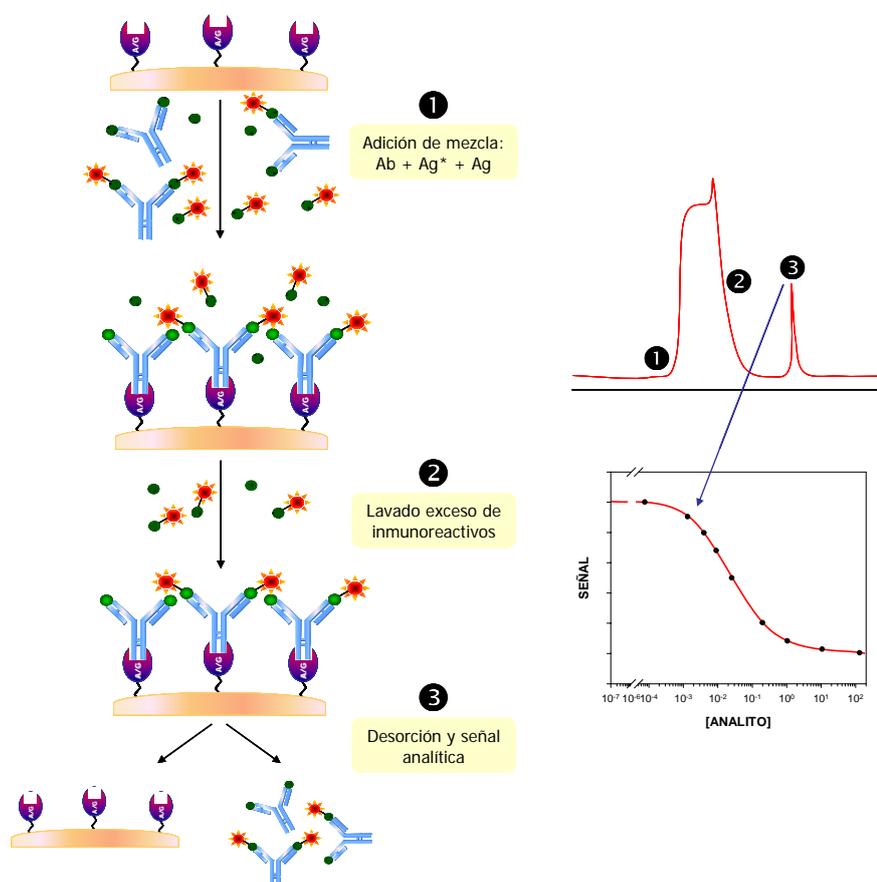


Figura 84. Esquema de las operaciones realizadas por el inmunosensor con formato competitivo directo y anticuerpo inmovilizado mediante captura del inmunocomplejo.

Seguidamente, se lava el inmunoreactor para garantizar la eliminación de especies no unidas al soporte y, posteriormente, se regenera con una disolución desorbente que rompe la unión entre la proteína A o A/G y los inmunocomplejos

arrastrándoles hasta el detector, en donde los derivados β -lactámicos fluorescentes (Ag^*), que hayan interaccionado inmunológicamente con las IgGs, originan la señal analítica (B). Finalmente, el sistema se acondiciona con una nueva disolución de lavado quedando listo para un nuevo ciclo de ensayo.

El grado de respuesta del inmunosensor se calcula empleando la ecuación (18):

$$Señal\ normalizada = S_N = \frac{B - B_\infty}{B_0 - B_\infty} \quad (18)$$

en donde B es la señal (intensidad de fluorescencia) medida en presencia de concentraciones crecientes de analito, B_∞ es la señal obtenida en presencia de un exceso de PENG y B_0 representa la señal de fluorescencia medida en ausencia de analito.

El intervalo dinámico de trabajo se estableció mediante la realización del correspondiente calibrado competitivo en el que se representa la señal normalizada, obtenida a partir de la ecuación 18, en función de la concentración de antibiótico (en escala logarítmica).

La curva de calibrado se ajustó a la ecuación paramétrica (19):

$$Señal\ normalizada = S_N = \frac{(B - B_\infty)}{(B_0 - B_\infty)} = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[analito]}{IC_{50}} \right)^b} + A_{min} \quad (19)$$

donde A_{max} corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima en ausencia de analito, IC_{50} es la concentración de antibiótico en el punto de inflexión es decir, la concentración de analito que desplaza el 50% del antígeno marcado, b es la pendiente en el punto de inflexión y A_{min} es la señal de respuesta del inmunoensayo en presencia de un exceso de antibiótico. El ajuste de dicha ecuación se llevó a cabo empleando el software *Sigma Plot 8.0* SPSS (2002).

Para la medida con el inmunoensayo en flujo, los 15 canales del sistema de doble válvula de distribución se conectan como se muestra en las figuras 83 y 85. El protocolo de ensayo utilizado para la calibración del inmunoensayo en flujo, se indica a continuación:

1. **Mezclado** en la jeringa de la muestra o patrón (0.7 mL) con la disolución de anticuerpo (0.2 mL) y la disolución de derivado β -lactámico fluorescente, Ag* (0.2 mL).
2. **Homogeneización e incubación** de la mezcla en la jeringa durante 200 s para la consecución de la reacción de competición.
3. **Inyección** en el reactor de 1 mL de la mezcla de inmunocomplejos a un caudal de 0.25 mL min⁻¹.
4. **Lavado** del reactor con 1 mL de disolución portadora, PB 20 mmol L⁻¹ (pH 8.0), a 1 mL min⁻¹ para eliminar el Ag* libre. El proceso se repite 4 veces.
5. **Desorción y elución** de los inmunocomplejos del reactor con 2.5 mL de disolución desorbente Gly/HCl 0.1 mol L⁻¹ (pH 2.0) a 0.5 mL min⁻¹. Registro de la señal analítica.
6. **Lavado** del reactor con 3 mL de PB 20 mmol L⁻¹ (pH 8.0) a 1 mL min⁻¹. Regeneración del sistema y fin del ciclo.



Figura 85. Imagen del sistema de medida utilizado para las medidas en flujo con el inmunosensor: 1. sistema de control y manejo de fluidos, 2. inmunoreactor, 3. ordenador de control del sistema de inyección, 4. espectrofluorímetro 5. ordenador de control del fluorímetro, 6. disoluciones termostatizadas de reactivos, patrones de calibrado y/o muestras.

3.5. ANALISIS DE MUESTRAS REALES

3.5.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS RESIDUALES

Las muestras de agua residual se recogen en botellas de topacio de 2.5 L (14 de mayo de 2004), a la entrada del primer asentamiento y en el efluente final de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) situada en Madrid. Las muestras se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras medir los valores correspondientes de conductividad y pH.

Para el análisis con el inmunosensor, las muestras se filtran empleando una membrana de PTFE, con un tamaño de poro de $0.45\text{ }\mu\text{m}$, para eliminar la materia suspendida que pudiera obturar el sistema automático de bombeo, y se ajusta el pH de la mismas a un valor de 8.0. A continuación, se enriquecen con cantidades conocidas de AMOX o PENG, a tres niveles de concentración (10 , 50 y $75\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), determinándose posteriormente las recuperaciones obtenidas para cada matriz y analito ensayado.

Las muestras se analizaron en paralelo utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de hilera de diodos integrados (DAD), según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1. del Capítulo VI de esta Tesis Doctoral.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE

Para ensayar la aplicabilidad del inmunoensayo desarrollado en la determinación de antibióticos β -lactámicos en matrices biológicas, se analizaron muestras de leche comercial entera y semidesnatadas pasteurizadas (Lauki[®]) y muestras de leche enriquecidas con algunas penicilinas habitualmente utilizadas en zoonosis. Estas muestras fueron preparadas y proporcionadas por L. Villegas y M. Kortabitarte del Instituto Lactológico de Lekunberri (Navarra, España) siguiendo un procedimiento acreditado en su laboratorio analítico. Dicho procedimiento se describe a continuación:

Se toman 100 g de leche en polvo (Merck, Darmstadt, Alemania) y se reconstituye, al 10%, con agua milli-Q. Cabe destacar que esta leche posee un certificado que asegura la ausencia de todo tipo de residuos de antibióticos. Posteriormente, se esteriliza en un autoclave durante 20 min a 100 °C. Después se toman alícuotas de 50 mL que se enriquecen con cantidades conocidas de penicilinas y, finalmente, se congelan a -20 °C.

Los niveles de concentración de antibióticos que poseen las muestras preparadas por el laboratorio aparecen en la tabla 46.

Para la preparación del calibrado se toman muestras de leche, libre de antibióticos, y se centrifugan durante 30 min a 13800 g y 4 °C, para eliminar la materia grasa. Seguidamente se adicionan concentraciones crecientes de la disolución patrón de PENG (2.0 g L⁻¹) a la leche desnatada diluida 1:20 con tampón fosfato (20 mmol L⁻¹, pH 8.0) para evitar el efecto matriz. Se calibra en el intervalo entre 0.0001 – 100 ng mL⁻¹ de PENG.

Para el análisis de AMOX y CLOX se repite el procedimiento descrito anteriormente obteniéndose calibrados en el intervalo de 0.0001 – 100 ng mL⁻¹ para ambos antibióticos.

El análisis de las muestras se realiza siguiendo el mismo procedimiento de preparación de muestra utilizado para las disoluciones de calibrado.

Las disoluciones de calibrado y las muestras se analizan con el inmunosensor utilizando el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1. de esta sección.

Tabla 46. Características de las muestras de leche suministradas por el Instituto Lactológico de Lekunberri (Navarra, España).

Muestra	Antibiótico	Concentración, ng mL ⁻¹	Tipo
1	PENG	150	enriquecida
2	PENG	50	enriquecida
3	AMOX	250	enriquecida
4	-	-	blanco
5	CLOX	300	enriquecida
6	CLOX	900	enriquecida
7	CLOX	2700	enriquecida

Como ya se ha indicado anteriormente, el inmunosensor para la determinación de antibióticos β -lactámicos, descrito en esta Memoria, está basado en un inmunoensayo heterogéneo con formato competitivo directo en el que el analito y una especie de estructura análoga, β -lactama fluorescente, compiten por unirse al anticuerpo que se encuentra en cantidad limitante.

4.1. ENSAYOS PRELIMINARES

4.1.1. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

A menudo, el grado de pureza de las inmunoglobulinas (IgGs) es un factor determinante a la hora de desarrollar un ensayo inmunológico.

La utilización de **anticuerpos purificados** es necesario en muchos casos por motivos como son: (1) La eliminación de sustancias que potencialmente podrían interferir en el proceso de inmovilización o detección, (2) el aumento de la efectividad de los métodos orientados a la conjugación de las IgGs con proteínas o trazadores enzimáticos, fluorogénicos, etc. y, (3) la obtención de disoluciones de anticuerpo más concentradas.

Los métodos desarrollados para la purificación de anticuerpos son muy numerosos, basándose todos ellos en alguna de las propiedades que presentan estas proteínas en disolución (tamaño molecular, solubilidad, carga eléctrica, afinidad biológica, etc.)

Los procedimientos que más se utilizan habitualmente son:

- **Precipitación de proteínas con sales.** Este método se basa en la propiedad que tienen las proteínas de precipitar cuando se aumenta, con ciertas sales, la fuerza iónica del medio. Este efecto se explica por una deshidratación de los grupos hidrófilos de la proteína y, por consiguiente, una disminución de su solubilidad. La sal que más se utiliza en este caso es el *sulfato de amonio*.
- **Cromatografía de intercambio iónico.** Se utilizan columnas empaquetadas con derivados sintéticos de la celulosa. Por ejemplo, el intercambiador aniónico basado en la dietilaminoetil celulosa (DEAE).
- **Cromatografía de afinidad.** Técnica basada en la capacidad biológica de las proteínas para unirse mediante enlace no covalente a otras moléculas (ligandos). La naturaleza química de los ligandos es muy diversa ya que pueden ser metales, moléculas orgánicas de bajo peso molecular u otras proteínas.

Los anticuerpos R543, R544 y R539 se purificaron empleando dos de los métodos descritos anteriormente: *precipitación mediante sales* (sulfato amónico) y *cromatografía de afinidad* utilizando como fase estacionaria un soporte polimérico comercial funcionalizado con proteína A (Ultralink[®] Immobilized Protein A Plus, Pierce).

Desafortunadamente, en ambos casos, tras la purificación se produjo una pérdida prácticamente total de la actividad inmunológica para todos los anticuerpos evaluados.

Este fenómeno ha sido descrito por otros autores [62]. De hecho, Leuw y col. llevaron a cabo la purificación de **anticuerpos policlonales anti-6-APA** mediante **cromatografía de afinidad** (soporte Fractogel TSK AF-CDI con 6-APA-K

inmovilizado covalentemente) y observaron que la actividad de los anticuerpos purificados desaparecía a los 4 días cuando se conservaban a 4 °C en PBS.

Este hecho demostraba la pequeña estabilidad de este tipo de anticuerpos frente a los procesos de purificación, aconsejando el empleo del anticuerpo sin purificar [57]. En nuestro caso, tras obtener resultados semejantes, se procedió igualmente a utilizar directamente los antisueros.

4.1.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD: VALORACIÓN DE LA AVIDEZ DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES POR LOS DERIVADOS β -LACTÁMICOS FLUORESCENTES

En un inmunoensayo competitivo directo es necesario evaluar la afinidad u aidez de los anticuerpos por los derivados marcados de los antígenos a determinar.

Por ello, en primer lugar, se evaluó el grado de reconocimiento de los inmunógenos disponibles frente a los distintos análogos fluorescentes de los antibióticos β -lactámicos sintetizados.

Para llevar a cabo estos análisis, se inmovilizó una cantidad constante de los distintos anticuerpos en el soporte inmunológico (Ultralink A/G) midiéndose la cantidad de inmunocomplejo formado Ab-Ag* en presencia de una concentración constante de los distintos antígenos fluorescentes evaluados (250 nmol L⁻¹).

En la tabla 47 se muestra la respuesta inmunoquímica, estimada en unidades de fluorescencia, de los pares Ab/marcador fluorescente evaluados.

Tabla 47. Evaluación de la avidéz de los antisueros R543, R544 y R539 y el anticuerpo policlonal purificado pPGv (dilución 1:550) por los derivados β -lactámicos fluorescentes (250 nmol L^{-1}) ($n=3$).

Suero	PAAP	PBAP	PAAM	PBAM	PAAX	DAP	DAM
R543* (anti-6APA)	236.1	515.2	147.0	366.6	111.8	ND	ND
R544* (anti-CEFX)	136.3	119.9	76.8	113.3	121.8	ND	ND
R539* (anti-PENG)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pPGv** (anti-PENG)	ND	ND	ND	ND	ND	NE	NE

*anticuerpos policlonales de conejo cedidos por el profesor Aart van Amerongen (ATO, Holanda), ** anticuerpos policlonales de conejo suministrados por Pabsproductions (Alemania), ND: no detectado, NE: no evaluado. 6-APA: ácido 6-aminopenicilánico, PENG: penicilina G, CEFX: cefalexina.

Con las parejas Ab-Ag* que dieron una respuesta significativa, se realizaron ensayos competitivos en ausencia y presencia de una concentración constante de PENG ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

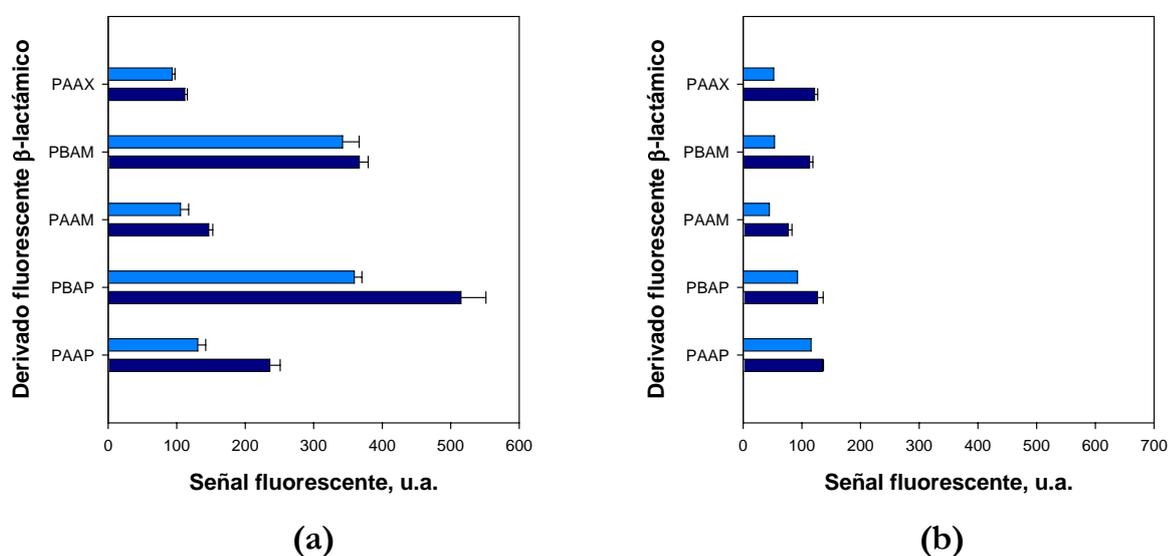


Figura 86. Evaluación de la sensibilidad de los antisueros R543 y R544 frente a los derivados fluorescentes β -lactámicos en ausencia (■) y en presencia (■) de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG. $[\text{Ag}^*] = 250 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 y R544 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 8.0$, $V_{\text{mezcla}} = 1.0 \text{ mL}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

A la vista de los resultados que se muestran en la figura 86, se comprueba que la mayor sensibilidad en ausencia de PENG se alcanza para el anticuerpo R543, el cual fue obtenido frente al hapteno 6-APA.

Por lo que respecta al antígeno marcado, las intensidades de fluorescencia obtenidas fueron mayores en el caso del PBAP, seguido del PBAM y del PAAP. Además, cabe destacar que el PBAP y el PAAP son los que compitieron más eficazmente frente a la PENG por los sitios de unión de los anticuerpos. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, se seleccionó el **antisuero R543** para el posterior desarrollo del biosensor.

Para seleccionar la sonda que permitiera obtener una mayor sensibilidad (menor valor de IC_{50}), se midió la respuesta del inmunosensor mediante ensayos competitivos para concentraciones crecientes de analito (PENG, $0.0001 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

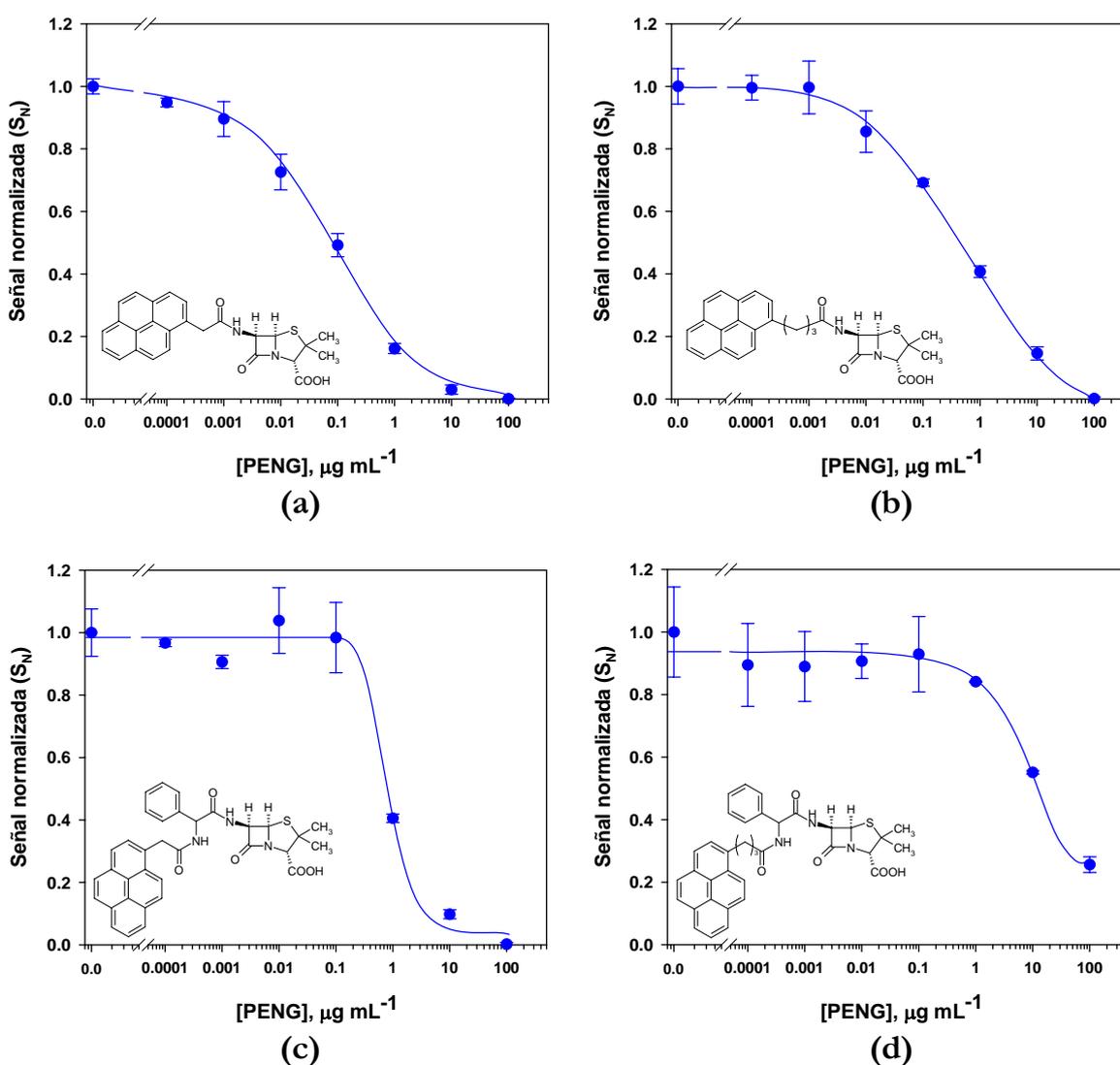


Figura 87A. Curvas de calibrado obtenidas empleando los antígenos marcados de concentración (125 nmol L^{-1}): (a) PAAP, (b) PBAP (c) PAAM, (d) PBAM y el antisuero R543. Concentraciones de PENG comprendidas en el intervalo 0.0001 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 8.0$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

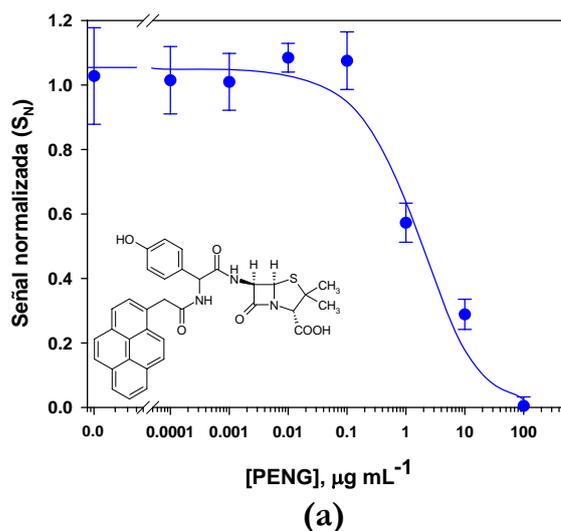


Figura 87B. Curvas de calibrado obtenidas empleando los antígenos marcados de concentración (125 nmol L^{-1}): (a) PAAX y el antisuero R543. Ver figura 87A.

En las figuras 87A y 87B se representan las curvas de competición obtenidas para los distintos marcadores ensayados (PAAP, PBAP, PAAX, PAAM y PBAM) utilizando una concentración de 125 nmol L^{-1} y una dilución de antisuero R543 de 1:550. En la tabla 48 se recogen los parámetros de ajuste a la ecuación (19) del calibrado competitivo (sección 3.4.1.) para cada una de las sondas ensayadas.

Tabla 48. Parámetros correspondientes al ajuste de los datos experimentales a la ecuación (19), utilizando PAAP, PBAP, PAAM, PBAM y PAAX como marcadores fluorescentes [Ag^*] = 125 nmol L^{-1} ($n = 3$).

Parámetro	PAAP	PBAP	PAAM	PBAM	PAAX
A_{\max}	0.979	1.014	0.982	0.926	1.048
b	0.566	0.471	1.991	0.909	0.829
$\text{IC}_{50}, \mu\text{g mL}^{-1(1)}$	0.097	0.650	0.793	10.059	1.802
A_{\min}	-0.032	-0.093	0.046	0.173	0.011
r^2	0.999	0.998	0.990	0.981	0.972

Abreviaturas: A_{\max} : asíntota máxima, b : pendiente en el punto de inflexión, IC_{50} : concentración en $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el punto de inflexión, A_{\min} : asíntota mínima, $(1)\text{RSD} = 1.0 - 17\%$.

A partir de los resultados obtenidos, se comprueba que los ensayos realizados empleando como marcador fluorescente PAAM, PBAM o PAAX presentan una baja sensibilidad para la determinación de PENG ($IC_{50} > 793 \text{ ng mL}^{-1}$). Sin embargo, las sondas PAAP y PBAP presentan menor IC_{50} al nivel de concentración ensayado.

Para comprobar cual de estas dos penicilinas fluorescentes daba lugar a inmunoensayos más sensibles, menor valor del IC_{50} , se llevó a cabo otro ensayo competitivo utilizando 25 nmol L^{-1} de PAAP y PBAP, siendo ésta la menor concentración que permite obtener una relación señal/ruido aceptable para la respuesta fluorescente del inmunosensor.

En la figura 88 se muestran las curvas de competición obtenidas en cada caso. El menor valor de IC_{50} se obtuvo para la pareja **R543/PAAP**, por lo que fue seleccionada para los ensayos posteriores (tabla 49).

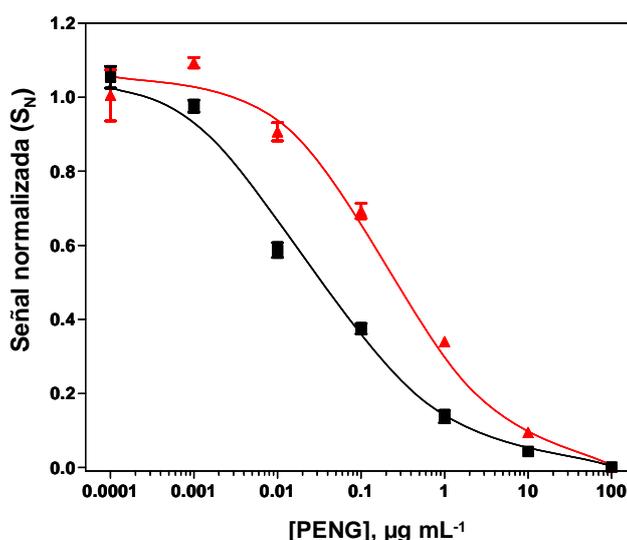


Figura 88. Curvas de calibrado obtenidas empleando los antígenos marcados PAAP 25 nmol L^{-1} (■) y PBAP 25 nmol L^{-1} (▲) y el antisuero R543. Concentraciones de PENG comprendidas en el intervalo 0.0001 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, $V_{mezcla} = 1.0 \text{ mL}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Los parámetros de ajuste a la ecuación de calibrado competitivo (sección 3.4.1.) para cada una de las sondas analizadas se recogen en la tabla 49.

Tabla 49. Parámetros correspondientes al ajuste de los datos experimentales a la ecuación (19), utilizando PAAP y PBAP como marcadores fluorescentes $[Ag^*] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$ ($n = 3$).

Parámetro	PAAP	PBAP
A_{\max}	1.058	1.035
b	0.572	0.586
$IC_{50}, \mu\text{g mL}^{-1(1)}$	0.025	0.448
A_{\min}	0.014	-0.042
r^2	0.990	0.980

Abreviaturas: A_{\max} : asíntota máxima, b : pendiente en el punto de inflexión, IC_{50} : concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en el punto de inflexión, A_{\min} : asíntota mínima, $(1)RSD = 3.4 - 10\%$.

4.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA EN FLUJO

El objetivo de esta etapa es doble. Por un lado mejorar las condiciones del ensayo y sus características, especialmente en lo que a sensibilidad se refiere y, por otro lado, conocer mejor el comportamiento del ensayo frente a determinadas condiciones físico-químicas (eg. pH, fuerza iónica), las cuales son de interés para la aplicación del mismo al análisis de muestras reales.

Para facilitar la automatización de la medida se decidió optimizar y caracterizar el biosensor empleando un sistema en flujo continuo (FI). De esta forma sería posible la determinación de estos analitos sin requerir la presencia permanente del operario.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la optimización de los parámetros más relevantes del sistema en flujo continuo.

4.2.1. DISEÑO DEL REACTOR

La cantidad de inmunosoporte empaquetado en el reactor, así como la geometría del mismo, influyen en las prestaciones del sistema analítico. En el desarrollo del inmunosensor se emplearon los inmunoabsorbentes descritos en el

apartado 3.1.4. de esta sección y se ensayaron varios diseños de inmunorretores, siempre partiendo de un dispositivo tubular de lecho empaquetado que presentase buenas propiedades hidrodinámicas.

Los reactores se fabricaron en **polimetacrilato de metilo**, con la entrada y salida provistas de una rosca de dimensiones adecuadas para el acoplamiento de los conectores utilizados habitualmente en FI. En todos los casos se dispusieron filtros de teflón en los extremos del reactor para evitar pérdidas de carga.

Los tamaños de reactor ensayados fueron de 2×2 mm, 4×4 mm, 4×6 mm, 4×10 mm y 4×15 mm (*diámetro interno \times longitud*). El inmunosoprote se empaquetó en el reactor hasta completar su capacidad estimándose, por ejemplo, que los reactores de 4×10 mm contenían 62.5 mg de soporte particulado.

A continuación se llevó a cabo el inmunoensayo de tipo competitivo midiendo la señal de fluorescencia obtenida en ausencia y en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG. En la figura 89 se muestra la señal de fluorescencia medida en estas condiciones en función de las dimensiones del reactor empleado para empaquetar el inmunosoprote.

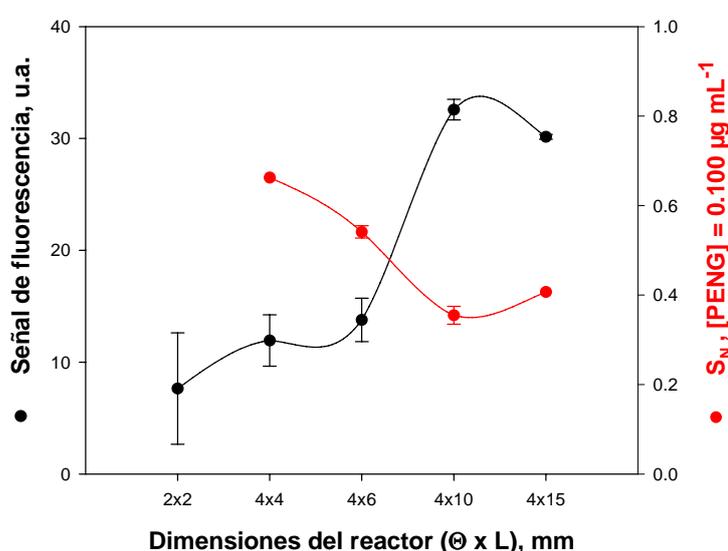


Figura 89. Efecto del tamaño del reactor en la señal medida con el inmunosensor (●) en ausencia de analito (B_0) y en la sensibilidad frente a una concentración constante del mismo (●) (100 ng mL^{-1} de PENG, B/B_0). Tamaños de reactor, mm (diámetro interno \times longitud): 2×2 mm, 4×4 mm, 4×6 mm, 4×10 mm y 4×15 mm. $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, $V_{mezcla} = 1.0 \text{ mL}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Como puede observarse, la señal de fluorescencia medida en ausencia de analito aumenta a medida que lo hacen las dimensiones del reactor hasta alcanzarse un valor máximo para un tamaño de 4×10 mm.

El empleo de reactores de mayor tamaño no supuso una mejora significativa en las intensidades de fluorescencia registradas ni en la sensibilidad del ensayo (expresado como B/B_0 para 100 ng mL^{-1}). Sin embargo, el trabajo continuado originaba una compactación excesiva del soporte, creando sobrepresiones en el sistema a los pocos ciclos de medida.

En consecuencia, se eligió el **reactor de 10 mm de longitud \times 4 mm de diámetro interno** para los ensayos, ya que permitía obtener una buena sensibilidad con menor consumo de inmunosoporte.

4.2.2. SELECCIÓN DEL INMUNOADSORBENTE

Como ya se indicó en los apartados 3.1.4. y 3.3. del presente Capítulo de esta Memoria, se han ensayado tres soportes comerciales utilizados habitualmente en cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de anticuerpos [63]. Estos materiales permiten la inmovilización orientada y reversible de las inmunoglobulinas mediante una reacción de bioafinidad entre éstos y la proteína A o A/G covalentemente ligada al soporte.

El empleo de matrices de afinidad para anticuerpos en ensayos en flujo fue aplicado por primera vez por Palmer y col. en 1992 [64]. Las ventajas de utilizar estos materiales para la fabricación de inmunoreactores en lugar de soportes con antígenos y/o anticuerpos inmovilizados se refleja claramente en los numerosos trabajos de investigación que se han publicado en los últimos años [14,29,53,54,65,66].

Estos soportes poseen unas características mecánicas y biológicas óptimas para el desarrollo del inmunosensor tales como: alta capacidad y eficacia de unión de la especie inmunológica, máxima estabilidad de inmovilización, mínima adsorción inespecífica y óptimas propiedades hidrodinámicas y físicas.

Las principales características de los inmunoadsorbentes evaluados se muestran en la tabla 50.

Tabla 50. Características de los inmunoadsorbentes ensayados [67,68].

Parámetro	PA	PAG	CPGA
Estabilidad frente al pH	1 – 13		1 – 9
Tamaño de partícula	50 – 80 μm		75 – 125 μm
Límite de exclusión	> 2000 kDa		> 340 kDa
Área superficial	250 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ de partícula		-
Tamaño de poro	1000 Å		1000 Å
Presión máxima	100 psi (6.9 Bar)		> 3000 psi (200 bar)
Material	copolímero de bis-acrilamida/azlactona		vidrio de poro controlado
Proteína ligada	proteína A	proteína A/G	proteína A
Capacidad	28 mg mL^{-1} (<i>IgG humano</i>)	> 30 mg mL^{-1} (<i>IgG humano</i>)	40 mg mL^{-1} (<i>IgG humano</i>) 37 mg mL^{-1} (<i>IgG conejo</i>)

Para evaluar la capacidad de unión del marcador a los distintos soportes, se midió la señal de fluorescencia para los inmunocomplejos Ab-Ag*, obtenidos en cada caso, empleando como disolución regeneradora Gly/HCl 0.1 mol L⁻¹, pH = 2.0.

Los resultados obtenidos en el estudio comparativo se muestran en la figura 90. Se observa que la señal analítica registrada utilizando el biosoporte CPGA es mucho mayor que para los otros soportes poliméricos. Este hecho se debe, muy probablemente, a la mayor capacidad de unión de IgGs que posee este material (> 37 mg mL^{-1} IgG de conejo) con respecto a los otros soportes particulados. Sin embargo, la reproducibilidad obtenida con el soporte CPGA para medidas realizadas a lo largo del tiempo (n = 15) resultó ser muy pequeña (RSD = 22%), al igual que con el soporte PA (RSD = 22%, n = 15).

Por ello, se ha elegido el soporte **PAG** para posteriores ensayos ya que proporciona tanto una adecuada sensibilidad como una alta reproducibilidad en las medidas (RSD < 7%, n = 15).

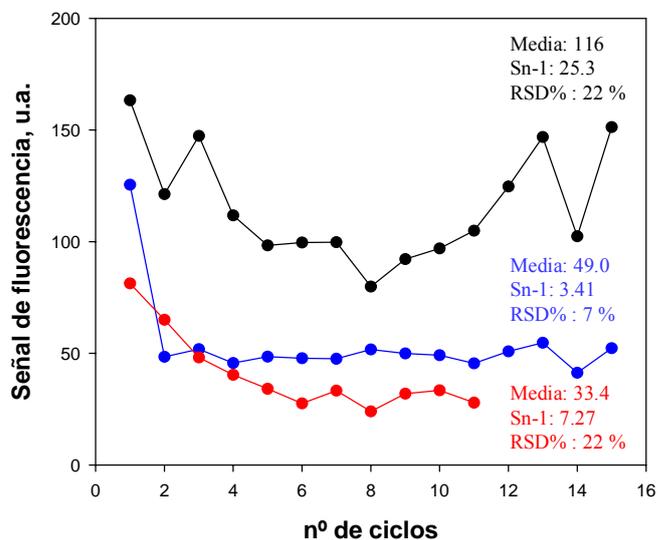


Figura 90. Valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para los inmunocomplejos Ab-PAAP (B_0) en ensayos sucesivos empleando como inmunosoportes: (●) Ultralink® Immobilized Protein A Plus (PA), (●) Ultralink® Immobilized Protein AG Plus (PAG) y (●) Prosep®-A Media (CPGA). [PAAP] = 25 nmol L⁻¹, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L⁻¹, pH = 8.0, V_{mezcla} = 1.0 mL, T = 20 °C (n = 3).

4.2.3. EFECTO DEL CAUDAL DE INMOVILIZACIÓN

Se ha estudiado el efecto del caudal de la disolución portadora (disolución reguladora PB 20 mmol L⁻¹, pH = 8.0) sobre el rendimiento de la reacción inmunológica. Con este fin, se evaluó la variación de la señal obtenida en ausencia y en presencia de PENG a caudales comprendidos entre 0.125 y 0.350 mL min⁻¹. La optimización de este parámetro hidrodinámico es muy importante ya que la unión del anticuerpo al soporte depende, en gran medida, del caudal con el que se inyecte la mezcla de inmunocomplejos (1.0 mL).

Los resultados experimentales aparecen representados en la figura 91.

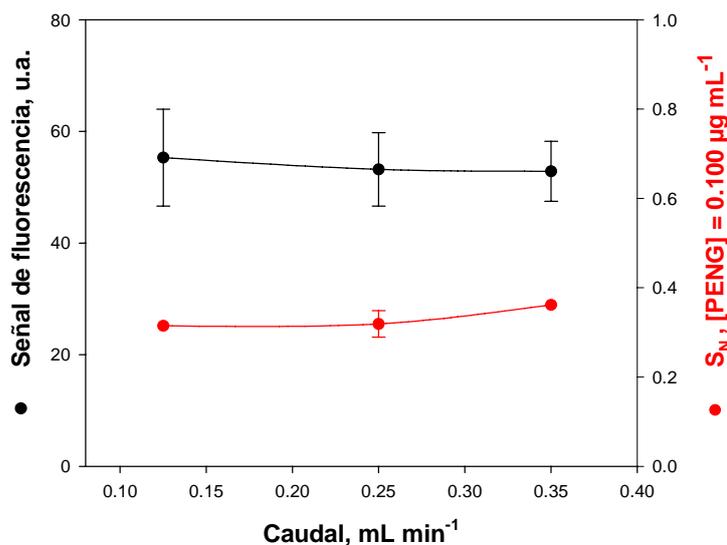


Figura 91. Efecto del caudal de inyección de la mezcla anti IgG R543 / PAAP (1.0 mL) en ausencia (●) (B_0) y presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $pH = 8.0$, $V_{mezcla} = 1.0 \text{ mL}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

A partir de los resultados obtenidos, se comprueba que la respuesta del biosensor no se modifica significativamente en el intervalo de caudales estudiados. Por todo ello, se eligió un valor óptimo de caudal de inyección de la mezcla Ag/Ab/Ag* de 0.25 mL min^{-1} , valor de compromiso entre la sensibilidad alcanzada y la duración del ensayo.

4.2.4. EFECTO DEL VOLUMEN DE MUESTRA

Una vez seleccionado el caudal óptimo para la disolución portadora, se estudió la influencia del volumen de muestra sobre la respuesta del biosensor en el intervalo comprendido entre 200 y 1200 μL . La masa de PAAP (Ag*) se mantuvo constante, 12.6 ng, en cada uno de los ensayos realizados.

El mezclado de la disolución de muestra, antígeno y anticuerpo se realizó siempre de modo automático, aspirando dentro de la jeringa 200 μL de la disolución del derivado fluorescente (Ag*), una cantidad equivalente (200 μL) de la disolución de anticuerpo (Ab) y, seguidamente, la disolución de muestra. Finalmente, se inyecta la mezcla resultante en el sistema.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 92. Se comprueba que la sensibilidad del sensor (menor B/B_0) aumenta a medida que lo hace el volumen de muestra, hasta un valor límite a partir del cual permanece constante. Paralelamente, la respuesta del biosensor en ausencia de analito disminuye de forma progresiva al aumentar el volumen de muestra, lo cual puede atribuirse al efecto de dilución del antígeno marcado que, como en cualquier equilibrio, afecta a la extensión de la reacción inmunológica.

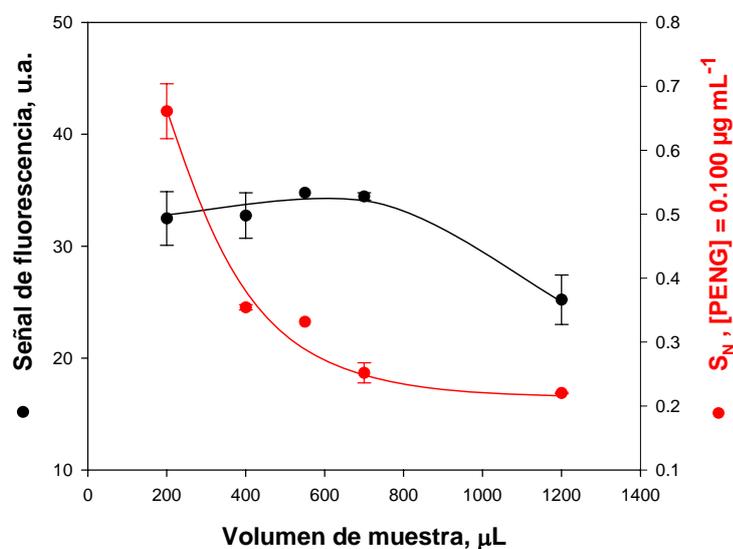


Figura 92. Efecto del volumen de muestra inyectada en ausencia (\bullet) (B_0) y presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (\bullet) (B/B_0). $[\text{PAAP}] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Por todo ello, se eligió un **volumen de inyección de muestra de 700 μL** , como valor óptimo para obtener la máxima respuesta del inmunosensor.

4.2.5. INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA SOBRE LA RESPUESTA DEL INMUNOENSAYO

La disolución reguladora ejerce un efecto notable tanto en la reacción inmunoquímica como en la unión del anticuerpo al soporte. Con el fin de determinar la naturaleza de la disolución reguladora, así como su concentración y pH óptimos para el adecuado funcionamiento del inmunoensayo, se llevaron a cabo distintos

ensayos que se describen a continuación. También, se ha evaluado el efecto de la salinidad sobre la respuesta del inmunosensor para estimar su aplicabilidad en muestras con elevada conductividad.

4.2.5.1. NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA

Se ha ensayado el efecto que producen distintas disoluciones reguladoras tales como fosfato (**PB**), tris(hidroximetil)aminometano-HCl (**TRIS**) y glicina-hidróxido sódico (**Gly/NaOH**) sobre la respuesta del inmunoensayo cuando se emplean distintos inmunosoportes.

En todos los casos se utilizaron disoluciones de pH 8.0, midiendo la respuesta del biosensor frente a una disolución de PAAP (25 nmol L^{-1}) en ausencia y en presencia de anticuerpo (dilución 1:550). La señal obtenida en el primer caso permite evaluar la unión no específica del derivado marcado al soporte.

En la figura 93 se muestran los resultados obtenidos para las distintas disoluciones ensayadas.

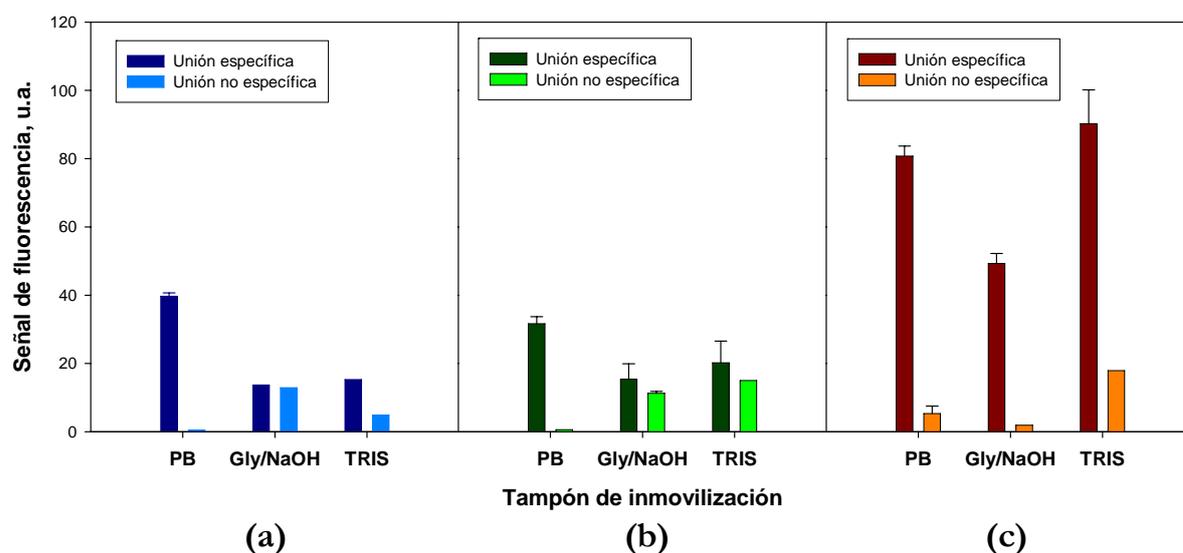


Figura 93. Influencia de la naturaleza de la disolución reguladora sobre la respuesta del inmunosensor. (a) Soporte PAG, (b) Soporte PA, (c) Soporte CPGA. [PAAP] = 25 nmol L^{-1} , anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: pH = 8.0, T = 20 °C (n = 3).

Como se comprueba, el tampón fosfato permite obtener la mayor respuesta y una unión no específica del PAAP al soporte mínima. El empleo del tampón TRIS, o Gly/NaOH, da lugar a una disminución notable de la señal analítica obtenida tanto en PAG como en PA, a la vez que se observa un incremento de la retención no específica del antígeno marcado en todos los soportes.

Por todo ello, se decidió utilizar el **tampón fosfato (PB)** para las medidas con el inmunosensor.

4.2.5.2. EFECTO DEL pH

Una vez seleccionada la naturaleza de la disolución reguladora, se determinó el pH óptimo para el funcionamiento del biosensor. Para ello, se evaluó la respuesta del mismo en el intervalo de pH comprendido entre 2.0 y 9.5. En la figura 94 se observa que el pH del tampón, influye tanto en la sensibilidad del ensayo (B/B_0 , para 100 ng mL^{-1} de PENG) como en la señal de fluorescencia máxima (B_0) obtenida en ausencia de analito.

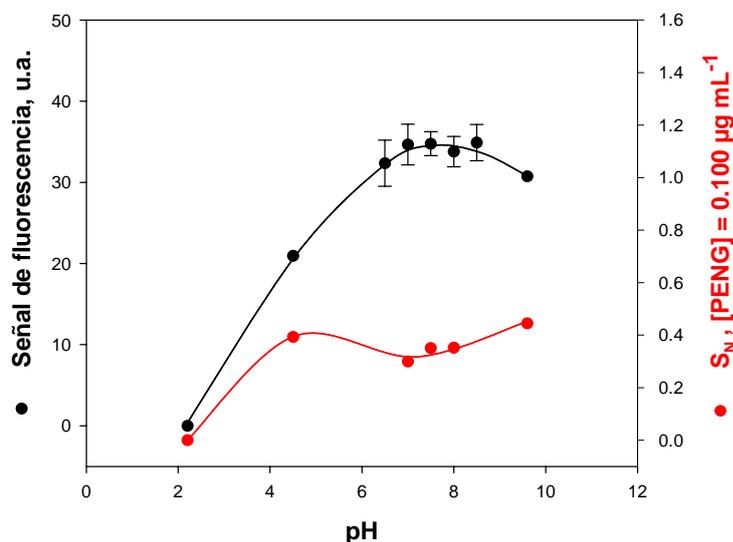


Figura 94. Efecto del pH del tampón de inmovilización en la respuesta del inmunosensor en ausencia (●) (B_0) y en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

A la vista de los resultados obtenidos, y dado que los antibióticos β -lactámicos se degradan a pH extremos ($2.0 \leq \text{pH} \leq 9.5$), se eligió un **pH de trabajo de 8.0**, valor de compromiso entre la estabilidad del analito, de los reactivos y de la sensibilidad del ensayo.

4.2.5.3. CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA

Se ha ensayado el efecto de la concentración de la disolución reguladora, PB (pH 8.0), sobre la respuesta del inmunosensor en el intervalo comprendido entre 0 y 100 mmol L^{-1} .

A partir de los resultados mostrados en la figura 95, se comprueba que la señal de fluorescencia obtenida en ausencia del analito (B_0) no se modifica significativamente al aumentar la concentración del tampón en el intervalo de 20 mmol L^{-1} a 100 mmol L^{-1} .

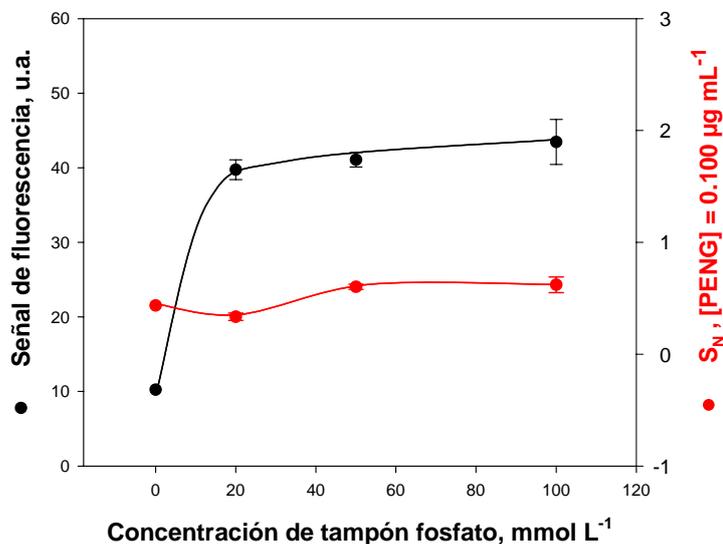


Figura 95. Efecto de la concentración de la disolución reguladora en la señal obtenida en ausencia (●) (B_0) y en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB, pH = 8.0, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Finalmente, se decidió emplear para las medidas una concentración de disolución reguladora de fosfato (PB) de 20 mmol L^{-1} .

4.2.5.4. EFECTO DE LA SALINIDAD

De acuerdo con la bibliografía [69], una elevada concentración salina en la muestra puede modificar la afinidad del anticuerpo por los analitos polares. Se procedió así a estudiar el efecto de la adición conjunta de concentraciones crecientes de cloruro sódico ($0 - 140 \text{ mmol L}^{-1}$) y cloruro potásico ($0 - 2.8 \text{ mmol L}^{-1}$) sobre la respuesta del inmunosensor. Ambas sales se utilizan en la preparación de la disolución reguladora fosfato salino (PBS), habitualmente utilizada en bioensayos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 96.

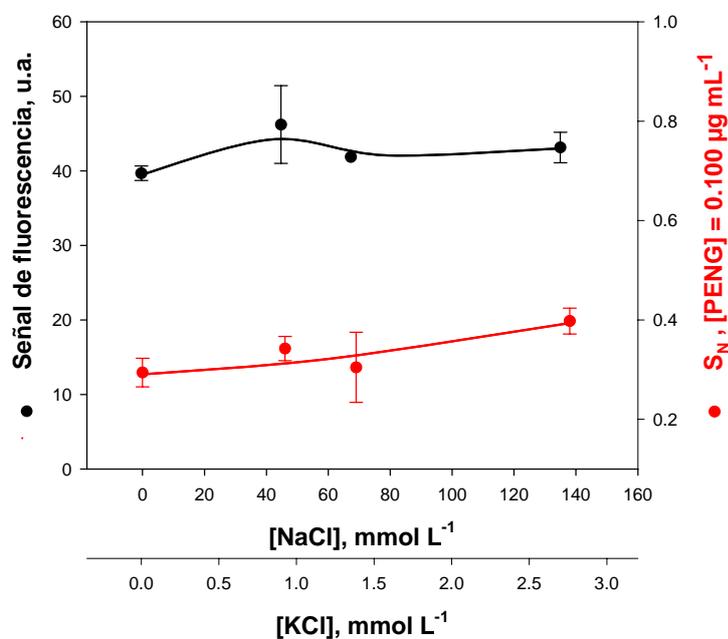


Figura 96. Efecto de la concentración salina de la disolución reguladora sobre la señal obtenida en ausencia (●) (B_0) y en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demuestran que la respuesta del inmunosensor es prácticamente constante en todo el intervalo de concentraciones iónicas estudiadas.

Esto supone que las interacciones químicas entre el antígeno y el anticuerpo son predominantemente de naturaleza no electrostática ya que, en caso contrario, un

aumento de la fuerza iónica del medio originaría una disminución de la señal obtenida en ausencia y en presencia de PENG [70].

4.2.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se ha evaluado el efecto de la temperatura sobre la respuesta obtenida con el inmunosensor en ausencia y en presencia de PENG. Este parámetro va a afectar tanto a las interacciones de bioafinidad antígeno-anticuerpo e inmunocomplejo-soporte, como a la intensidad de fluorescencia del marcador, como se discutió en el apartado 4.4.1.1. del Capítulo III de la presente Tesis Doctoral.

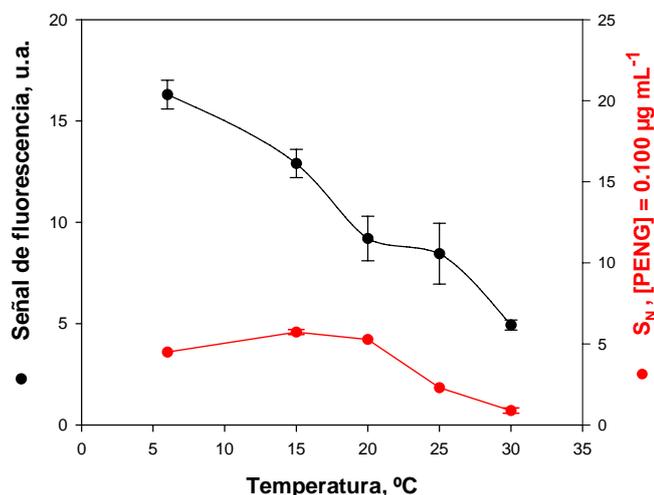


Figura 97. Efecto de la temperatura sobre la respuesta del inmunosensor en ausencia (●) (B_0) y en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 8.0$.

Como se observa en la figura 97, la señal de fluorescencia medida en ausencia de PENG (B_0) disminuye de forma continua al aumentar la temperatura, lo cual podría explicarse considerando el efecto de este parámetro sobre la fluorescencia del PAAP (ver apartado 4.4.1.1.).

Sin embargo, la señal normalizada (B/B_0) obtenida en presencia de una concentración equivalente de PENG es prácticamente la misma hasta una **temperatura de 20 °C**, eligiéndose este valor para la realización del ensayo.

4.2.7. COMPETICIÓN SIMULTÁNEA VS CONSECUTIVA

Uno de los aspectos que debe considerarse para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos competitivos en fase heterogénea, sobre todo cuando se emplean sistemas en flujo, es la secuencia en la que se va a llevar a cabo la reacción inmunoquímica de competición.

En los inmunosensores con formato de captura, se pueden establecer cuatro secuencias distintas de inyección de reactivos a través del reactor:

- MODO 1: Inyección simultánea de la mezcla Ag/Ab/Ag*.
- MODO 2: Inyección de la disolución de Ab, mezclado del Ag/Ag* y posterior inyección de los antígenos sobre el inmunosoporte que contiene el Ab inmovilizado.
- MODO 3: Mezclado del Ab/Ag, introducción de la mezcla en el reactor seguida de la inyección del Ag*.
- MODO 4: Inyección consecutiva del Ab, Ag y, por último, el Ag*.

Estas cuatro modalidades se ensayaron utilizando el anticuerpo R543 en combinación con el derivado β -lactámico fluorescente, PAAP. En todos los casos, el volumen de disolución inyectado fue de 1.0 mL, a un caudal de 0.25 mL min⁻¹. La cantidad total de anti IgG R543 utilizado correspondió a una dilución 1:550 y la concentración de PAAP fue de 25 nmol L⁻¹, manteniéndose constante en todos los casos.

En la figura 98a se muestran los resultados obtenidos para cada una de las cuatro combinaciones ensayadas en ausencia (B₀) y en presencia de 100 ng L⁻¹ de PENG (B/B₀). Se puede apreciar que la inyección simultánea de las tres especies en disolución (modo 1), así como la inyección consecutiva de anticuerpo seguido de la mezcla PENG/PAAP (modo 2) permiten obtener mayor sensibilidad en la determinación del antibiótico.

La comparación de las curvas de calibrado obtenidas empleando el modo 1, inyección simultánea de la mezcla Ag*/Ab/Ag, y el modo 2, inyección previa del anticuerpo y posterior reacción con la mezcla Ag/Ag*, se muestran en la figura 98b.

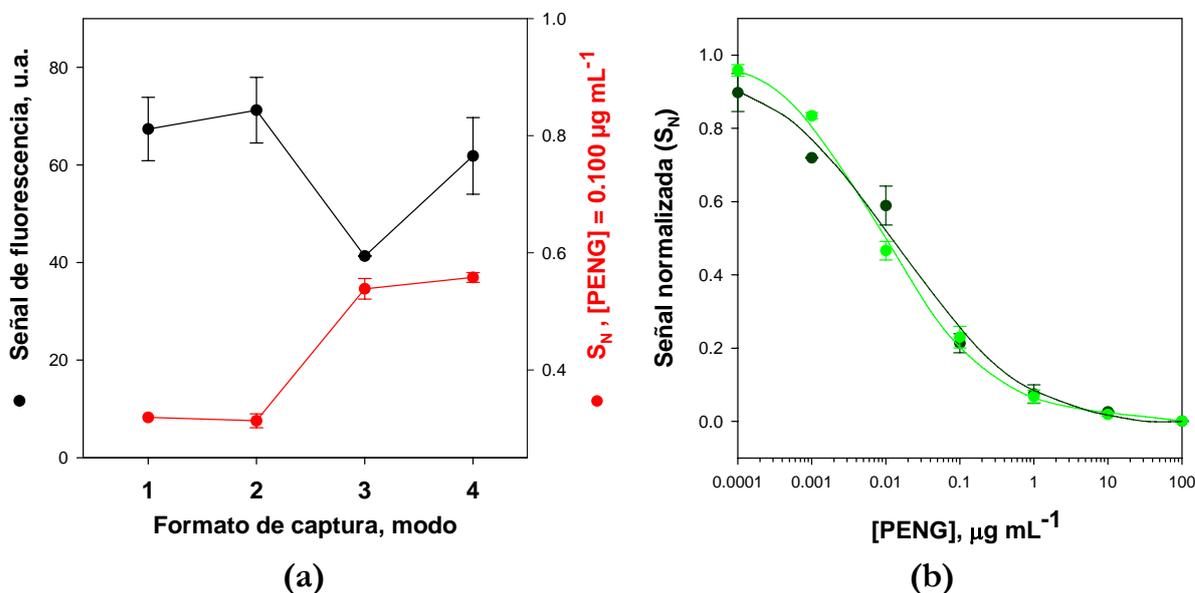


Figura 98. (a) Comparación de las cuatro modalidades de inyección de inmunoreactivos en el sensor con formato de captura en ausencia (●) (B_0) y presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0): Modo 1, inyección simultánea de la mezcla Ag/Ab/Ag*; modo 2, inyección de la disolución de Ab, mezclado del Ag/Ag* y posterior inyección de los antígenos sobre el inmunosoprote que contiene el Ab inmovilizado; modo 3, mezclado del Ab/Ag, introducción de la mezcla en el reactor seguida de la inyección del Ag*; modo 4, inyección consecutiva del Ab, Ag y, por último, Ag*. (b) Comparación de las curvas de calibrado obtenidas mediante el modo 1 (●) y 2 (●). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Se comprueba que no existen diferencias significativas en términos de sensibilidad entre las dos modalidades: IC_{50} (modo 1) = 20 ng mL^{-1} y IC_{50} (modo 2) = 24 ng mL^{-1} , lo que indica que la interacción antígeno–anticuerpo se mantiene constante, independientemente de si la inmunoglobulina se encuentra en disolución o previamente inmovilizada en el inmunoadsorbente.

Finalmente, se seleccionó como opción óptima la inyección simultánea de una mezcla de las tres especies (**modo 1**) ya que su empleo implica un tiempo de análisis menor.

4.2.8. TIEMPO DE INCUBACIÓN

Uno de los parámetros más importantes en el desarrollo de un inmunoensayo es la optimización del tiempo de incubación necesario para que se produzca la reacción de competición entre el analito libre y el derivado marcado por los sitios de unión del anticuerpo.

De hecho, se han descrito numerosos trabajos en los que se demuestra que el tiempo de interacción entre los inmunoreactivos en un inmunoensayo competitivo tiene un efecto directo sobre la sensibilidad del mismo [71-73].

En el método puesto a punto en esta Memoria, la incubación se llevó a cabo en el interior de la jeringa, tras un periodo de homogeneización de la mezcla, de acuerdo al procedimiento descrito en la Parte Experimental (apartado 3.4.1.).

Se han ensayado tiempos de incubación comprendidos entre 0 y 550 s (ver figura 99) comprobándose que, a partir de 200 s, la respuesta obtenida es constante y máxima tanto en ausencia (B_0) como en presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (B/B_0).

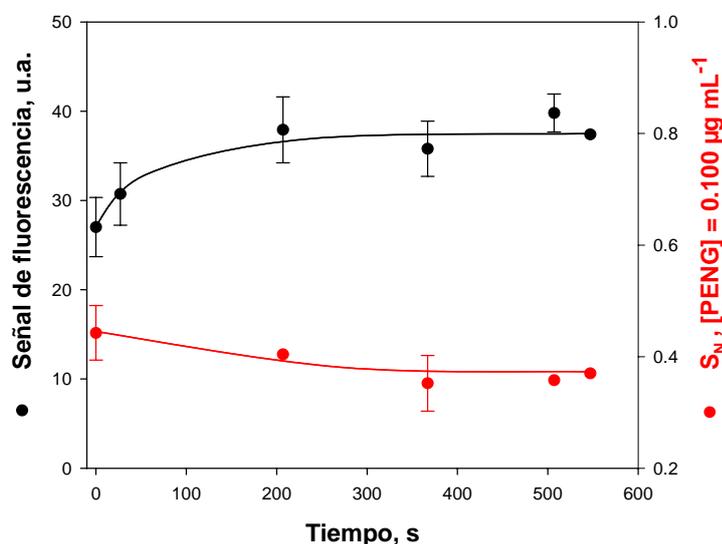


Figura 99. Efecto del tiempo de incubación de la mezcla anti IgG R543/PAAP en ausencia (●) (B_0) y presencia de 100 ng mL^{-1} de PENG (●) (B/B_0). $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, anti IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $pH = 8.0$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Por ello, se ha elegido un **tiempo de incubación de 200 s**, que incluye el mezclado, incubación e inyección de los reactivos en el inmunoadsorbente, como valor óptimo para la realización de las determinaciones posteriores, ya que permite un muestreo rápido sin que se vea afectado, significativamente, el rendimiento de la reacción inmunológica.

4.2.9. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO-ANTICUERPO

Para optimizar la **concentración de anticuerpo** adecuada para la realización del inmunoensayo se llevo a cabo, en primer lugar, la curva de dilución de la biomolécula para una concentración fija de derivado β -lactámico fluorescente ($[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$). El valor de este parámetro debe ser optimizado no sólo para la obtención de una buena sensibilidad en el ensayo, sino también para asegurar una adecuada respuesta instrumental [74].

En todos los casos, el volumen total de muestra inyectado fue de 1.0 mL a un caudal de 0.25 mL min^{-1} . El intervalo de concentración ensayado para el anticuerpo corresponde a diluciones comprendidas entre 1:2200 y 1:110. La curva de dilución obtenida se muestra en la figura 100.

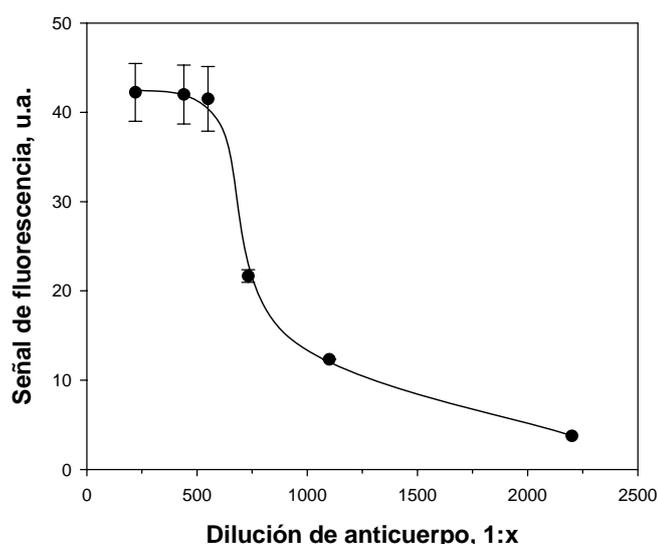


Figura 100. Curva de dilución obtenida para el inmunoensayo de PAG con inmovilización reversible. $[PAAP] = 25 \text{ nmol L}^{-1}$, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 8.0$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$).

Los resultados obtenidos demuestran que el reconocimiento del PAAP por el anticuerpo resulta máximo y constante para diluciones de anticuerpo inferiores a 1:550. Esto se debe a que, al disminuir la concentración inicial de anticuerpo, la cantidad de inmunocomplejo formado es menor, repercutiendo negativamente en la señal analítica.

Por lo tanto, se ha elegido una **dilución 1:550 de anticuerpo R543** como valor óptimo para las medidas, ya que garantiza la respuesta máxima del sensor con el mínimo gasto de antisuero.

Para seleccionar la **concentración de PAAP** más adecuada para el ensayo, se llevaron a cabo ensayos competitivos en presencia de PENG empleando diferentes concentraciones de antígeno marcado, comprendidas entre 25 y 500 nmol L⁻¹, para una dilución de anticuerpo de 1:550 [75].

En la figura 101 se muestran las curvas de competición obtenidas para cada una de las concentraciones de PAAP ensayadas. Se comprueba que al reducir la concentración de antígeno marcado, la sensibilidad del ensayo aumenta, disminuyendo tanto el IC₅₀ (ver tabla 51) como el límite de detección (LD). Asimismo, se produce un incremento del intervalo dinámico del ensayo.

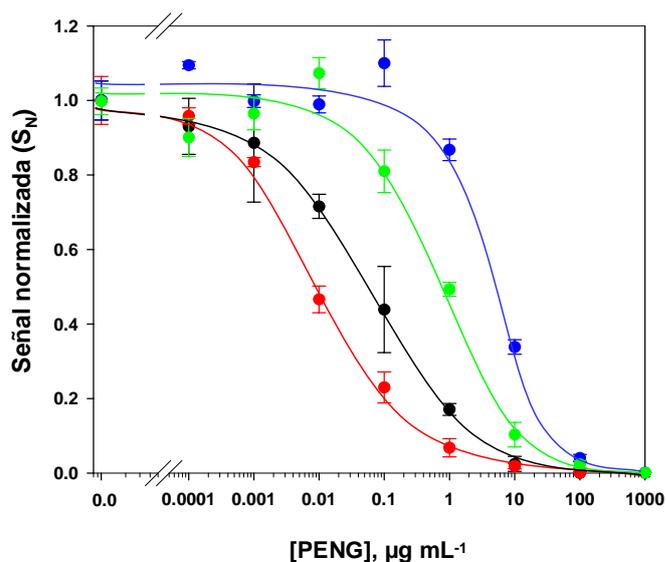


Figura 101. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas para diferentes concentraciones de PAAP: (●) 500 nmol L⁻¹, (●) 250 nmol L⁻¹, (●) 56 nmol L⁻¹, (●) 25 nmol L⁻¹. IgG R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L⁻¹, pH = 8.0, T = 20 °C (n = 3).

Tabla 51. Parámetros de ajuste a la ecuación de calibrado (19) de los datos experimentales obtenidos para diferentes concentraciones de antígeno fluorescente PAAP (25, 56, 250, 500 nmol L⁻¹) (n=3).

Parámetro	PAAP 500 nmol L ⁻¹	PAAP 250 nmol L ⁻¹	PAAP 56 nmol L ⁻¹	PAAP 25 nmol L ⁻¹
A_{\max}	1.016	0.981	0.989	1.007
b	1.138	0.855	0.485	0.763
IC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$ ⁽¹⁾	5.288	0.941	0.079	0.020
A_{\min}	0.005	-0.001	-0.042	0.017
r^2	0.981	0.986	0.999	0.999

Abreviaturas: A_{\max} : asíntota máxima, b : pendiente en el punto de inflexión, IC_{50} : concentración en $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el punto de inflexión, A_{\min} : asíntota mínima, ⁽¹⁾RSD = (4 – 15)%.

A la vista de los resultados obtenidos, se eligió una concentración del derivado fluorescente **PAAP** de **25 nmol L⁻¹** para la realización del ensayo. El empleo de esta concentración de marcador permite obtener una sensibilidad máxima ($IC_{50} = 20 \text{ ng mL}^{-1}$) proporcionando una señal de fluorescencia adecuada y reproducible en ausencia y en presencia de analito.

En la tabla 52 se resumen las condiciones óptimas para la realización del fluoroinmunoensayo en flujo de tipo competitivo para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

Tabla 52. Condiciones experimentales optimizadas del sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación de penicilina G utilizando el inmunosensor basado en la pareja Ab(R543)/Ag*(PAAP).

Parámetro	Variable optimizada
Tiempo de incubación Ab +Ag/Ag*	200 s
Dilución anticuerpo policlonal (R543)	1:550
Concentración antígeno fluorescente (PAAP)	25 nmol L ⁻¹
Inmunoadsorbente	Ultralink [®] Immobilized Protein AG Plus, (PAG)
Disolución portadora	Tampón fosfato (PB), 20 mmol L ⁻¹ , pH 8.0
Caudal de la disolución portadora	0.25 mL min ⁻¹
Disolución regeneradora	Tampón glicina (Gly/HCl), 0.1 mol L ⁻¹ , pH 2.0
Fuerza iónica (NaCl/KCl)	0.0/0.0 mmol L ⁻¹
Volumen de muestra	700 μ L
Dimensiones del reactor ($\emptyset \times L$)	4 \times 10 mm (125.7 μ L)
Temperatura	20 °C
Tiempo de análisis final/determinación	23 min

4.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL INMUNOSENSOR

Manteniendo fijos los distintos parámetros geométricos, hidrodinámicos y químicos del sistema de medida optimizados en los apartados anteriores, se procedió a determinar las características analíticas del inmunosensor óptico para la determinación de penicilina G.

4.3.1. CALIBRACIÓN DEL SENSOR

En la figura 102 se muestran los perfiles de respuesta obtenidos con el biosensor para dos calibrados consecutivos realizados en el intervalo de 0.0001 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PENG. Como se indicó anteriormente, al aumentar la concentración de analito presente en la muestra la competición con el derivado fluorescente es más eficaz y disminuye la cantidad de PAAP-Ab formado y retenido en el soporte, originándose una disminución de la señal de fluorescencia medida.

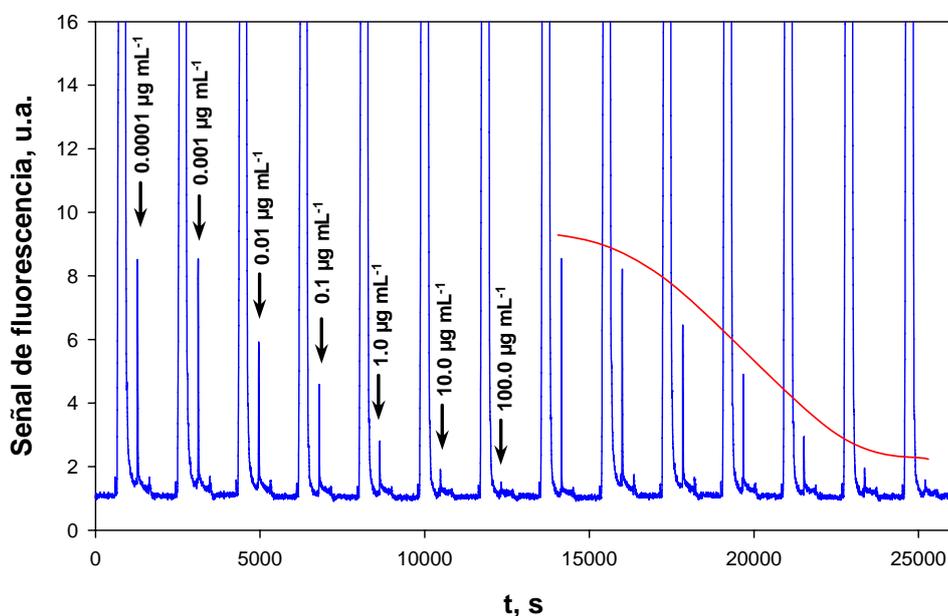


Figura 102. Perfil de respuesta obtenido para dos calibrados sucesivos realizados con el inmunosensor para concentraciones de penicilina G comprendidas en el intervalo 0.0001 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ab R543 = dilución 1:550, disolución portadora: PB 20 mmol L^{-1} , pH = 8.0, T = 20 °C (n = 3).

La curva de calibrado se ajustó a la ecuación (19), como se indica en la Parte Experimental (apartado 3.4.1.), obteniéndose el perfil sigmoide que se muestra en la figura 103.

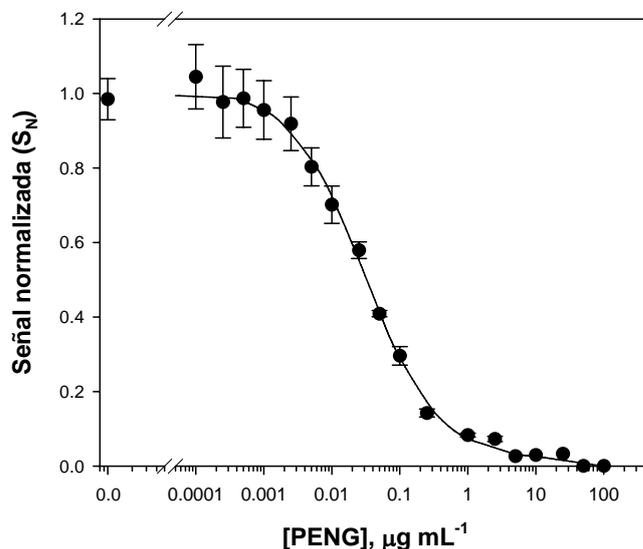


Figura 103. Curva de calibrado correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de penicilina G en PB 20 mmol L⁻¹, pH 8.0, empleando las condiciones indicadas en la tabla 52 (n = 5).

La respuesta del biosensor es muy reproducible en el intervalo de PENG estudiado, obteniéndose (20):

$$\frac{(B - B_{\infty})}{(B_0 - B_{\infty})} = \frac{1.015 - 0.016}{1 + \left(\frac{[\text{analito}]}{0.030}\right)^{0.8}} + 0.016 \quad (20)$$

(n = 5, r² = 0.998), donde la concentración de penicilina G se expresa en $\mu\text{g mL}^{-1}$. El **intervalo dinámico** (ID) del inmunosensor está comprendido entre 6.02 y 191 ng mL⁻¹.

El **límite de detección** (LD), concentración de analito que origina una disminución del 10% de la señal respecto del blanco, corresponde a un valor de 2.4 ng mL⁻¹. El valor de **IC₅₀** corresponde a una concentración de penicilina G inferior a 30 ng mL⁻¹.

El LD obtenido con el inmunosensor desarrollado es comparable [39,40], o incluso menor [38,76], que el de otros biosensores o inmunoensayos enzimáticos selectivos a penicilinas. No obstante, su sensibilidad es ligeramente inferior a la de algunos inmunosensores desarrollados para cefalexina, un antibiótico β -lactámico, u otros antimicrobianos [37,54,56,77,78].

El intervalo dinámico (ID) que presenta el fluoroinmunosensor es, sin embargo, superior al de otros biosensores descritos en la literatura [40,52].

Si comparamos los resultados obtenidos con el inmunosensor desarrollado con los proporcionados por la técnica ELISA [79] para este mismo antisuero (anti-6-APA IgG R543), se comprueba que en este caso se consigue una mejora sustancial de la sensibilidad para la determinación de PENG (tabla 53).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la semejanza estructural entre el PAAP y el analito, facilitan la competición eficaz de ambos antígenos por los sitios de unión del anticuerpo, obteniéndose sensibilidades muy superiores a las proporcionadas por el ELISA.

Tabla 53. Comparación de las sensibilidades obtenidas (IC_{50}) para los diferentes formatos de ensayo evaluados con el antisuero R543 (anti-6-APA).

ELISA		Inmunosensor	
Conjugado	IC_{50} (PENG)	Antígeno fluorescente	IC_{50} (PENG)
BSA-APA	1 mg mL ⁻¹	PAAP	30 ng mL ⁻¹
BSA-CLOX	1 mg mL ⁻¹	PBAP	448 ng mL ⁻¹
AP-CLOX	200 ng mL ⁻¹	-	-

Abreviaturas: BSA-APA: albúmina de suero bovino conjugada con ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), BSA-CLOX: albúmina de suero bovino conjugada con cloxacilina, AP-CLOX: fosfatasa alcalina conjugada con cloxacilina.

4.3.2. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

En muchas ocasiones, dependiendo del inmunógeno empleado para la inmunización del animal y del tipo de compuestos analizados, pueden producirse

reacciones cruzadas del anticuerpo con otros haptenos que presentan una estructura semejante a la del analito.

Para realizar este estudio, habitualmente se comparan las curvas de calibrado obtenidas para el analito con las correspondientes a las especies consideradas como **interferentes**.

El porcentaje de reactividad cruzada (RC) se define como (21):

$$\%RC = \frac{IC_{50}(\text{analito})}{IC_{50}(\text{interferente})} \quad (21)$$

y constituye una medida de la extensión de lo que se conoce como **interferencias específicas** sobre el ensayo.

En este trabajo se ha evaluado la reactividad cruzada del inmunosensor frente a ocho antibióticos β -lactámicos relacionados estructuralmente con el hapteno utilizado para la síntesis del inmunógeno, 6-APA. Además, se ha evaluado la RC frente al ácido clavulánico y a otros antibióticos de distintas familias que podrían encontrarse junto a las penicilinas en las muestras a analizar (eg. aguas residuales, leche).

En la figura 104 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para las distintas especies estudiadas. Las reactividades cruzadas correspondientes se recogen en la tabla 54.

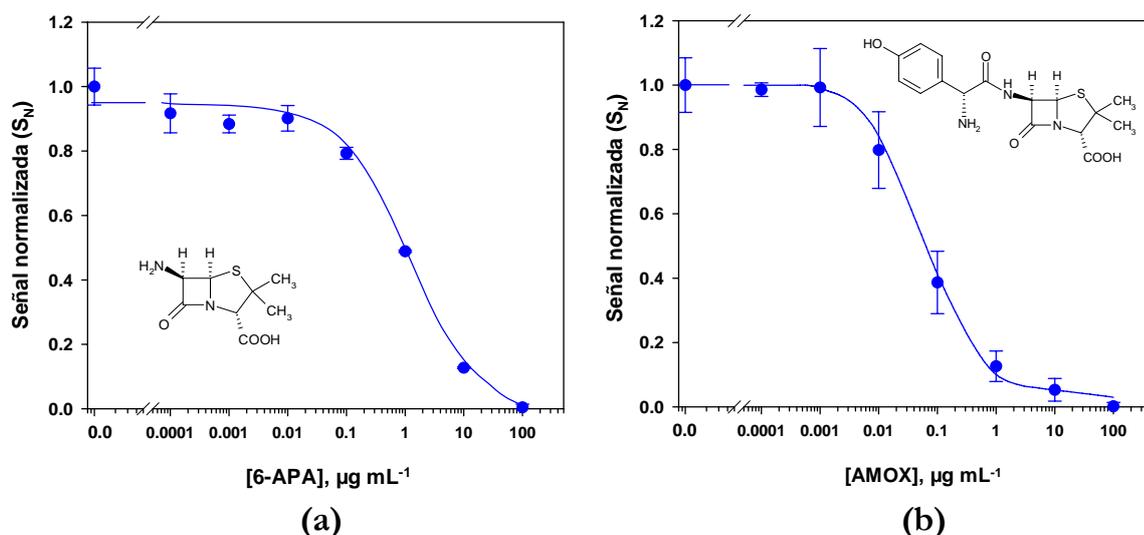


Figura 104A. Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (a) 6-APA, (b) AMOX en PB 20 mmol L⁻¹, pH 8.0, empleando las condiciones indicadas en la tabla 52 ($n = 3$).

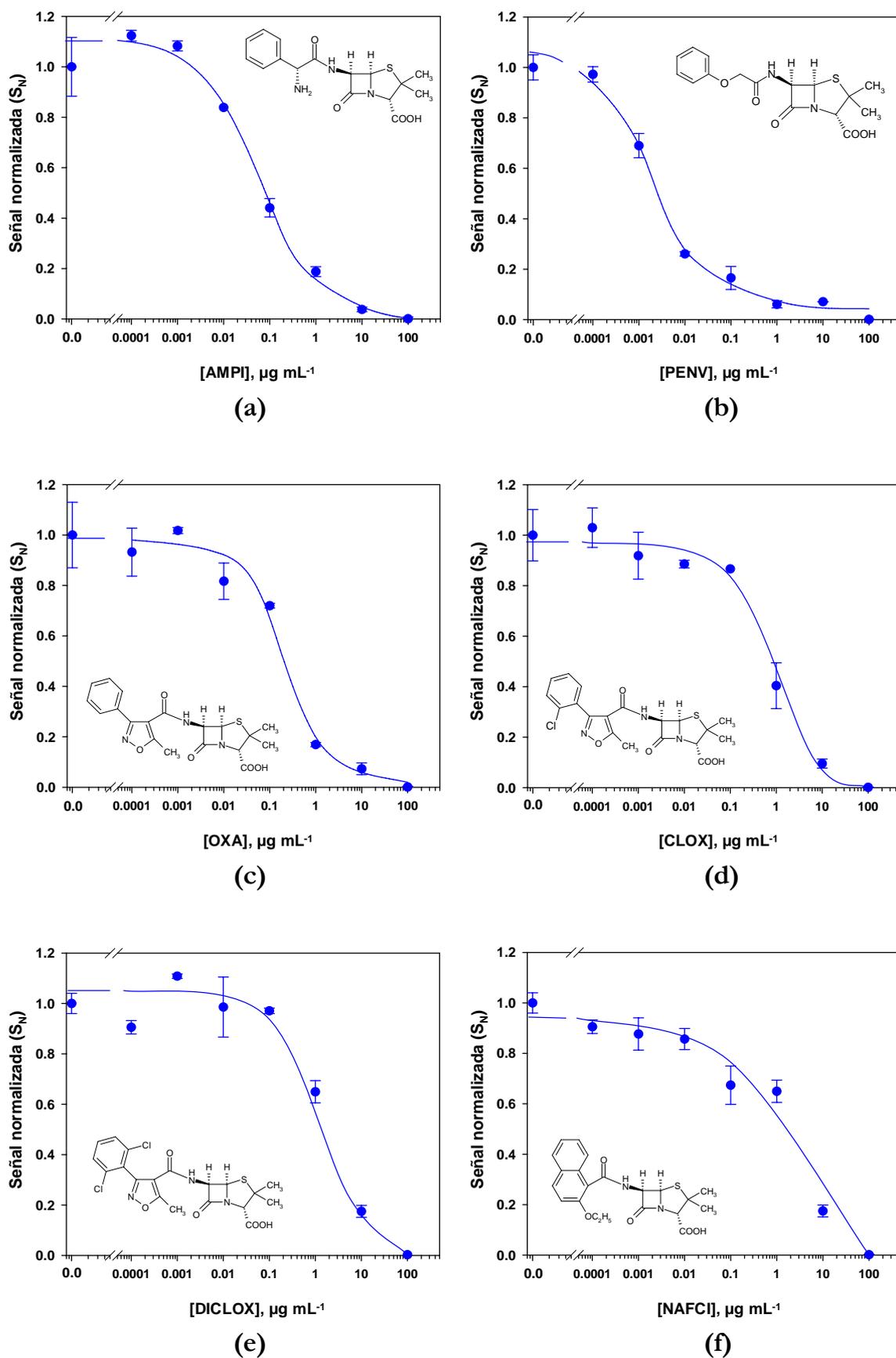


Figura 104B. Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (a) AMPI, (b) PENV, (c) OXA, (d) CLOX, (e) DICLOX, (f) NAFCI ($n=3$). Ver figura 104A.

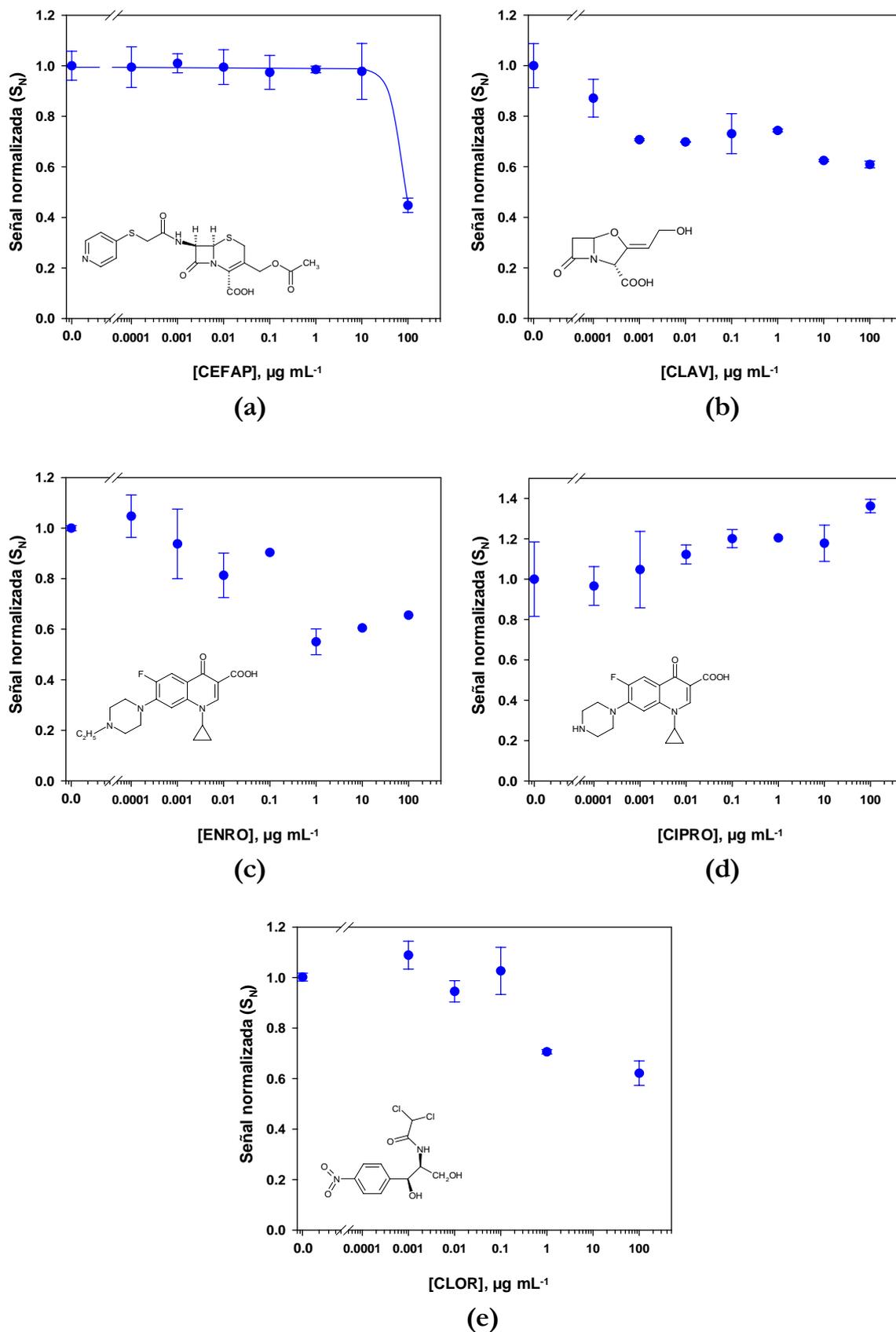


Figura 104C. Curva de calibrado normalizada correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de (a) CEFAP, (b) CLAV, (c) ENRO, (d) CIPRO, (e) CLOR ($n = 3$). Ver figura 104A.

Tabla 54. Reactividad cruzada relativa a PENG obtenida con el inmunoensayo fluorescente de tipo competitivo desarrollado para los distintos antibióticos y análogos del 6-APA.

Analito	LD, ng mL ⁻¹	ID, ng mL ⁻¹	IC ₅₀ , ng mL ⁻¹	RC, %
6-APA	13.0	116 – 7401	174	17
AMOX	6.01	13.9 – 354	58	50
AMPI	6.79	14.8 – 563	62	47
PENV	0.20	0.50 – 200	20	145
OXA	15.2	47.0 – 1022	241	12
CLOX	44.9	135 – 3213	741	3.9
DICLOX	212.6	473 – 8062	1988	1.5
NAFCI	70.0	292 – 16103	13408	< 0.002
CEFAP	NC	NC	NC	NC
CLAV	NC	NC	NC	NC
ENRO	NC	NC	NC	NC
CIPRO	NC	NC	NC	NC
CLOR	NC	NC	NC	NC

Abreviaturas: NC: *no compete*, 6-APA: ácido 6-aminopenicilánico, AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, PENV: *penicilina V*, OXA: *oxacilina*, CLOX: *cloxacilina*, DICLOX: *dicloxacilina*, NAFCI: *nafcilina*, CEFAP: *cefapirina*, CLAV: *ácido clavulánico*, ENRO: *enrofloxacina*, CIPRO: *ciprofloxacina*, CLOR: *cloramfenicol*.

Los resultados obtenidos demuestran que la mayor interferencia se produce por parte de los antibióticos que presentan la misma estructura molecular del hapteno utilizado para la producción del antisuero R543, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

Estos anticuerpos parecen reconocer a los antimicrobianos que contienen el anillo β -lactámico intacto y fusionado al anillo tiazolidínico de 5 miembros, ya que en el caso del antibiótico cefapirina, cuyo anillo β -lactámico está condensado al núcleo tiazolidínico de 6 miembros, se observa que no existe reconocimiento apreciable por parte de la inmunoglobulina anti-6-APA.

Asimismo, el ácido clavulánico, inhibidor de la β -lactamasa, y con un anillo β -lactámico en su estructura, tampoco exhibe una RC destacable, lo que reafirma la

hipótesis planteada de que el anticuerpo reconoce exclusivamente a la estructura de tipo *penicilina*.

Por otro lado, se observa que el efecto interferente es más pronunciado cuantos menos sustituyentes presenta el anillo β -lactámico a través del puente amida [80]. Ejemplo de ello es la baja sensibilidad que presenta el ensayo para el análisis de las penicilinas estructuralmente más complejas, como DICLOX (1.5%) y NAFCI (< 0.002%).

No obstante, a la vista de los resultados obtenidos para el hapteno libre 6-APA, con reactividad cruzada relativa a la PENG de tan sólo 17%, se puede afirmar que la sustitución del grupo 6-amino incrementa la interacción con el anticuerpo. Este fenómeno también ha sido observado por De Leuw y col. [57] empleando anticuerpos policlonales obtenidos también frente al hapteno 6-APA en gallinas ponedoras.

Cabe destacar que los antibióticos no β -lactámicos evaluados no presentan ninguna RC para concentraciones superiores a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Por todo ello, el inmunosensor desarrollado puede ser usado para el análisis multiresiduo de gran parte de los antibióticos pertenecientes a la familia de las penicilinas, ya que presenta una destacada especificidad de grupo [39]. Este hecho supone una ventaja para la evaluación rápida de estos compuestos en muestras ambientales y biológicas empleando el biosensor como sistema de diagnóstico.

4.3.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del fluoroinmunosensor para la determinación de PENG se estimó en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos para distintas concentraciones de analito. Para evaluar la **repetibilidad** del inmunosensor se llevaron a cabo ensayos independientes, a tres niveles de concentración de PENG (10, 50, 100 ng mL^{-1}) utilizando el mismo método de medida con idénticas variables experimentales, en el mismo laboratorio y con el mismo operador en cortos intervalos de tiempo [81].

En la tabla 55 se muestran los valores obtenidos de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos para las distintas concentraciones de analito ensayadas.

Tabla 55. Estudio de repetibilidad del inmunosensor.

PENG, ng mL ⁻¹ añadidos	n	PENG*, ng mL ⁻¹ recuperado	Recuperación, %	RSD, %
11.2	9	11.1 ± 0.2	99	3
50.0	8	51 ± 2	102	4
100.0	6	95 ± 5	95	6

* Intervalos de confianza $\pm t_{\alpha, v} \times S_{n-1} / n^{1/2}$ al 95% de probabilidad

Los valores de RSD obtenidos para todas las muestras patrón analizadas son comparables a los que aparecen descritos en la bibliografía para inmunoensayos basados en el mismo principio de medida (entre el 1% y 15%) [14,82].

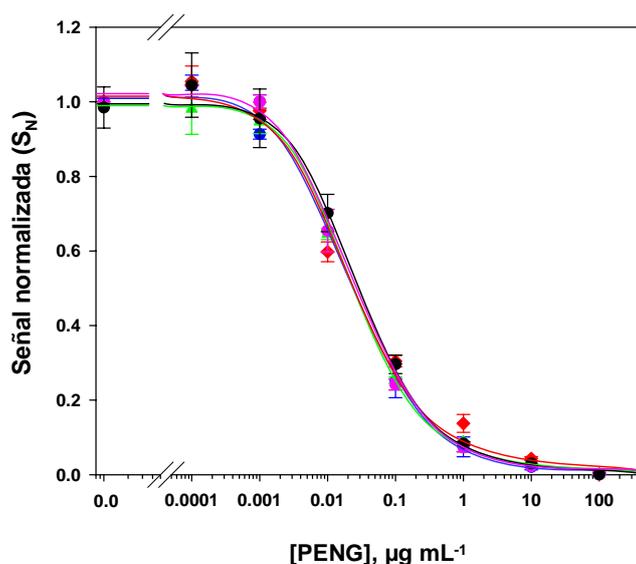


Figura 105. Curvas de calibrado normalizadas correspondientes al inmunoensayo competitivo realizado en días alternos para la evaluación de la reproducibilidad del inmunosensor: (●) 1^{er} calibrado, (◆) 2^{do} calibrado, (●) 3^{er} calibrado, (▲) 4^o calibrado, (◆) 5^o calibrado en PB 20 mmol L⁻¹, pH 8.0, empleando las condiciones indicadas en la tabla 52 ($n = 5$).

Para evaluar la **reproducibilidad** de la medida se realizaron 5 calibrados, empleando el mismo reactor, en días alternos en el intervalo de concentración 0.0001 y 100 µg mL⁻¹ de PENG. Los calibrados obtenidos en función del tiempo, ajustando los datos experimentales a la ecuación (19) se muestran en la figura 105. A partir de los

mismos, se calcula un $\overline{IC}_{50} = 24.0 \text{ ng mL}^{-1}$ con una $RSD = 17\%$. Este resultado se puede considerar satisfactorio para métodos de análisis de residuos mediante técnicas inmunológicas, en las que las desviaciones típicas suelen estar comprendidas entre el 10 y el 25% [83,84].

4.3.4. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TEMPORAL DEL INMUNOSOPORTE

4.3.4.1. ESTUDIOS DE REVERSIBILIDAD

Para que un inmunosensor sea útil desde un punto de vista práctico, ha de ser capaz de realizar medidas en continuo manteniendo sus prestaciones analíticas durante periodos de operación prolongados.

En el ensayo descrito en esta Memoria, los inmunocomplejos se retienen en el soporte a través de su interacción con la proteína A/G de manera que fue necesario evaluar la posibilidad de regenerar dicho inmunosopORTE para su utilización en ensayos sucesivos. La disolución regenerante ensayada fue Gly/HCl 0.1 mol L^{-1} pH 2.0, recomendada para su empleo en combinación con el inmunoadsorbente utilizado.

Los resultados demuestran que la señal analítica permanece constante tras sucesivas etapas de regeneración (figura 90 y 106), lo que pone de manifiesto el excelente comportamiento del soporte en base a su capacidad de inmovilización y desorción de los inmunocomplejos. Además, este resultado supera ampliamente la reusabilidad alcanzada por otros inmunosensores descritos en la bibliografía [84].

4.3.4.2. ESTABILIDAD OPERATIVA DEL INMUNOSENSOR

Para evaluar la estabilidad operativa del biosensor se ha medido su respuesta frente a ciclos sucesivos de antígeno fluorescente (PAAP, 25 nmol L^{-1}) y anticuerpo (suero R543, dilución 1:550) a lo largo de 20 días (204 ciclos de medida, uso continuado).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 106. Para la obtención del gráfico de Shewhart se ha tomado como valor central la media del valor obtenido para 100 ng mL^{-1} de PENG ($\overline{B/B_0}$) en el mismo día de la preparación del inmunosensor y como límites inferior y superior $\pm 3 \times \text{S.D.}$ de dicho valor inicial.

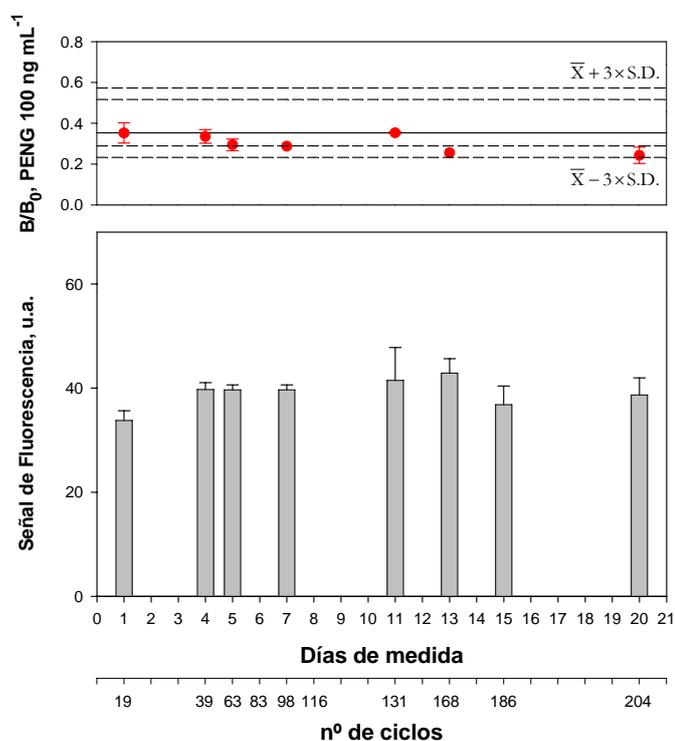


Figura 106. (■) Medida de la actividad del inmunosensor en términos de señal de fluorescencia máxima (B_0) obtenidos para PAAP (25 nmol L^{-1}) y antisuero R543 (dilución 1:550) en función de los días transcurridos (ciclos completados) desde el empaquetamiento del inmunosoporte. (●) Gráfico de control (Shewhart) construido para evaluar la variación de la respuesta del sensor (B/B_0) para una disolución patrón de PENG 100 ng mL^{-1} en función del número de ensayos realizados ($n = 3$, cada día).

A partir de los resultados mostrados, se comprueba que la bioafinidad del soporte ligado a proteína AG (PAG) no se modifica significativamente en el periodo de tiempo estudiado, 20 días (> 200 ciclos). Además, la sensibilidad del ensayo para el nivel de concentración de PENG evaluado permanece dentro de los límites de control durante este periodo de tiempo.

4.4. APLICACIÓN DEL INMUNOSENSOR A LA DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS REALES

4.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINA G Y AMOXICILINA EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES

Para evaluar la utilidad del inmunosensor desarrollado para la determinación de penicilinas en muestras reales, se ha llevado a cabo el análisis de penicilina G y amoxicilina en muestras de efluentes de depuradora, enriquecidas previamente con dichos antibióticos, a distintos niveles de concentración.

Para ello, se ha seguido el procedimiento indicado en el apartado 3.5.1. de la Parte Experimental, evaluando el porcentaje de recuperación de los antimicrobianos estudiados, en función del tipo de efluente de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR): efluente de entrada (EE) y efluente de salida (ES).

Una de las ventajas más interesantes de los inmunoensayos es la posibilidad de analizar directamente la muestra sin necesidad de preconcentración, gracias a la elevada selectividad y los bajos límites de detección obtenidos con estos métodos. Sin embargo, de cara a su aplicación directa al análisis ambiental, está limitada por la posibilidad de que se produzcan interferencias de la matriz.

Los estudios de efecto matriz se han llevado a cabo construyendo las curvas de respuesta del analito patrón, AMOX y PENG, en las diferentes muestras de agua residual analizadas, tras comprobar que se encontraban libres de ambos antimicrobianos.

En la figura 107 se muestran los perfiles de respuesta obtenidos con el inmunosensor en disolución reguladora PB (20 mmol L^{-1} , pH 8.0) y en agua residual tomada del efluente de la EDAR, en ausencia y en presencia de PENG (50 ng mL^{-1}). Los calibrados obtenidos en el agua residual (ES) y en PB para PENG y AMOX se muestran en la figura 108.

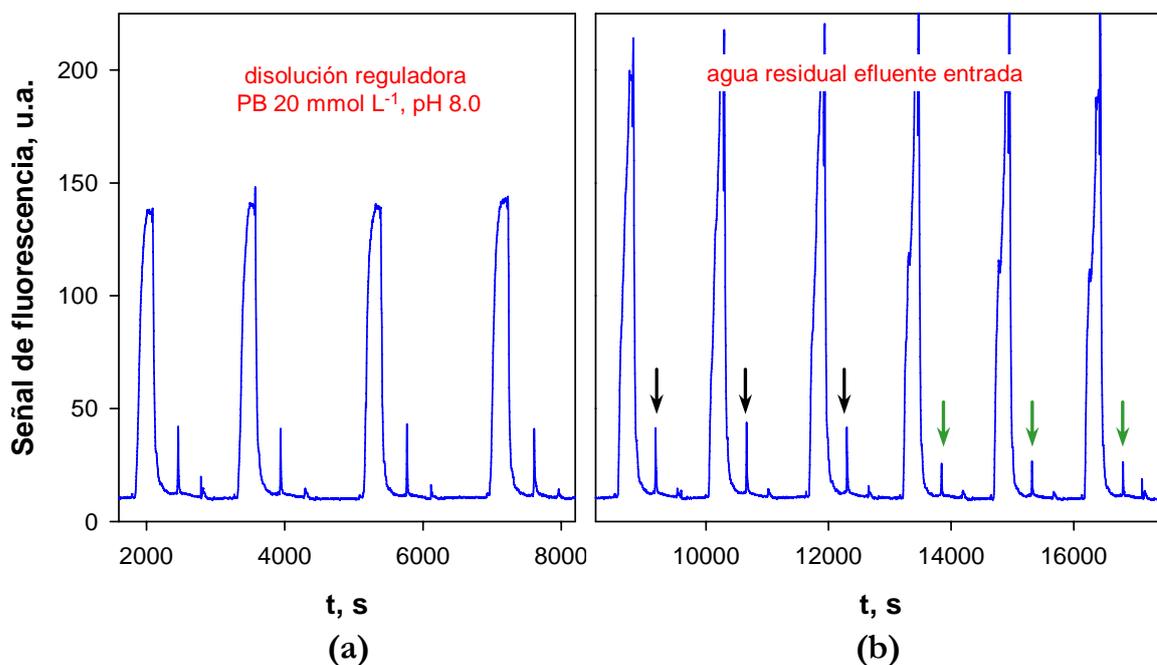


Figura 107. Perfil de respuesta obtenido con el inmunosensor para la determinación de PENG: (a) Disolución reguladora (PB, 20 mmol L⁻¹, pH 8.0) y (b) Agua residual (ES) en ausencia (→) y en presencia (→) de 50 ng mL⁻¹ de PENG.

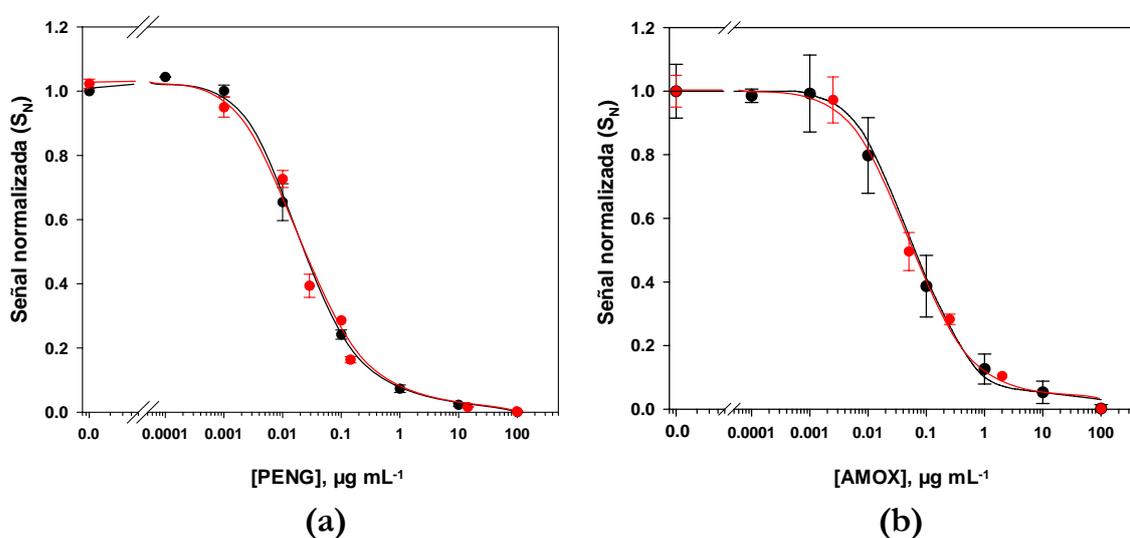


Figura 108. Estudio del efecto matriz: (a) Curva de calibrado correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de penicilina G en agua residual (ES) empleando las condiciones indicadas en la tabla 52. (b) Curva de calibrado correspondiente al inmunoensayo competitivo para la determinación de amoxicilina en agua residual (ES) empleando las condiciones indicadas en la tabla 52. (●) En disolución reguladora PB (pH=8.0, 20 mmol L⁻¹) y (●) en agua residual (ES).

Los resultados obtenidos demuestran que no existen diferencias significativas entre el calibrado obtenido con el inmunosensor en tampón fosfato (PB) y en la muestra de agua residual (ES). La ausencia de dicho efecto indica que el método no se

ve afectado por las características físicoquímicas de la matriz (fuerza iónica, etc.) o por la presencia de otras especies químicas (ácido húmicos, etc.) en la misma. En consecuencia, la cuantificación de los analitos se puede realizar directamente empleando un calibrado externo en disolución reguladora.

En la tabla 56 se muestran los valores de recuperación obtenidos para muestras de agua residual, efluente de entrada (EE) y efluente de salida (ES) de la EDAR, enriquecidas con 10, 50 y 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PENG y de AMOX.

Tabla 56. Estudio de recuperación de PENG y AMOX en aguas residuales de una estación EDAR en las condiciones óptimas de medida (tabla 52) ($n=3$).

Agua residual (EDAR)	Antibiótico	Añadido, ng mL^{-1}	INMUNOENSAYO		SPE / HPLC – DAD	
			Encontrado ng mL^{-1}	R, %	Encontrado ng mL^{-1}	R, %
Efluente entrada (EE)	PENG	10	9 ± 2	90	< LQ	-
		50	52 ± 13	104	20 ± 7	40
		75	73 ± 7	97	35 ± 8	47
	AMOX	10	12 ± 3	120	< LQ	-
		50	51 ± 4	102	< LQ	-
		75	74 ± 9	99	< LQ	-
Efluente salida (ES)	PENG	10	10 ± 1	100	< LQ	-
		50	52 ± 4	104	51 ± 3	102
		75	74 ± 7	99	70 ± 10	93
	AMOX	10	11 ± 5	110	< LQ	-
		50	50 ± 19	100	48 ± 10	96
		75	73 ± 28	97	74 ± 13	99

Como puede observarse, los porcentajes de recuperación obtenidos para ambos antibióticos fueron excelentes para todos los niveles de concentración ensayados (PENG, ca. 99% y AMOX, ca. 105%) tanto en el efluente de entrada como en el de salida.

Para validar el método, las muestras de agua se analizaron paralelamente empleando el método cromatográfico puesto a punto en el Capítulo VI (apartado 4.4.1.) de esta Memoria.

Según se puede observar en la tabla 56, la comparación entre los datos experimentales obtenidos empleando ambos métodos es excelente cuando se analizan muestras de agua del efluente de salida de la EDAR.

No obstante, las recuperaciones obtenidas por el método cromatográfico para las muestras de agua correspondientes al efluente de entrada son bajas y, en el caso de la AMOX, están por debajo del límite de cuantificación (LQ). Este hecho puede atribuirse a la gran complejidad de la matriz que afecta notablemente a la retención y elución de las penicilinas de los cartuchos de extracción en fase sólida (Oasis MAX, Varian Inc.) empleados para la preconcentración y limpieza de las muestras [85]. Este problema no afecta, sin embargo, a la respuesta del inmunosensor.

Por todo ello, queda demostrada la aplicabilidad práctica del inmunosensor descrito en esta Memoria para la realización de este tipo de análisis en muestras de aguas residuales, mostrándose como una excelente alternativa a los escasos inmunoensayos descritos en la bibliografía para la determinación de antibióticos β -lactámicos en muestras medioambientales [86].

4.4.2. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE LECHE

A fin de evaluar la aplicabilidad del inmunosensor desarrollado en muestras de interés agroalimentario, se analizaron varias penicilinas en muestras de leche certificada (Merck, Darmstadt, Alemania) enriquecidas con distintas penicilinas a varios niveles de concentración, así como una muestra de leche de vaca, tratada con PENG, tomada 96 h después del tratamiento antibiótico. En todos los casos, se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2. de la Parte Experimental.

Para evaluar el posible efecto matriz, se prepararon las curvas de calibrado empleando leche desnatada libre de antimicrobianos, directamente, o bien diluida con el tampón de ensayo (PB 20 mmol L⁻¹, pH 8.0). Las diluciones ensayadas fueron 0, 1:5, 1:10 y 1:20. Como se muestra en la figura 109, el empleo de una dilución 1:20 permite

obtener curvas de calibrado que no difieren significativamente de las obtenidas en PB. La utilización de diluciones inferiores, reduce la sensibilidad del ensayo.

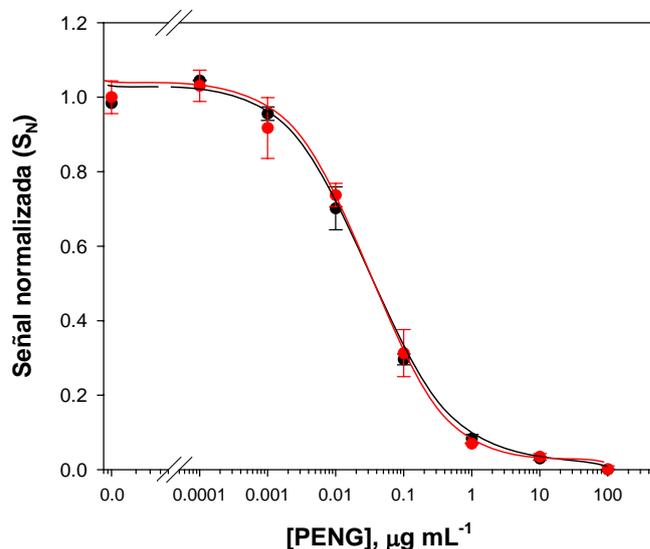


Figura 109. Evaluación del efecto matriz para el análisis de PENG en leche: Curva de calibrado correspondiente al inmunoensayo competitivo (●) en disolución reguladora PB ($\text{pH}=8.0$, 20 mmol L^{-1}) y (●) en leche (dilución 1:20) empleando las condiciones indicadas en la tabla 52.

Para realizar el análisis de las distintas penicilinas en las muestras de leche, se centrifugan a 13800 g ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 30 min, y así se elimina la materia grasa.

Seguidamente el extracto se diluye con PB (20 mmol L^{-1} , $\text{pH } 8.0$) 1:20, determinándose a continuación la recuperación de las penicilinas en cada muestra a partir del calibrado externo medido en PB.

En la tabla 57, se presentan los valores de recuperación obtenidos para las distintas muestras de leche analizadas, utilizando el inmunosensor desarrollado y los resultados del estudio de validación empleando SPE-HPLC-DAD según se describe en el Capítulo VI de la presente Memoria.

Como puede observarse, los resultados demuestran la efectividad del inmunoensayo propuesto, alcanzándose valores medios de recuperación de entre el 88 y 103%. La concentración calculada para todos los antibióticos es inferior a la concentración original debido probablemente a la degradación que estos analitos

sufren en matrices biológicas (eg. la PENG se degrada más de un 18% en menos de 16 h) [87,88].

Tabla 57. Estudio de recuperación de PENG, AMOX y CLOX en leche en las condiciones óptimas de medida (tabla 52) (n=3).

Muestra	Antibiótico	Añadido, ng mL ⁻¹	INMUNOENSAYO		SPE / HPLC – DAD	
			Encontrado ng mL ⁻¹	R, %	Encontrado ng mL ⁻¹	R, %
2	PENG	50	< LQ	-	< LQ	-
1		150	154 ± 25	103	140 ± 11 ^a	93
3	AMOX	250	< LQ	-	< LQ ^a	-
4	Blanco	-	ND	-	-	-
5	CLOX	300	< LQ	-	273 ± 5	91
6		900	< LQ	-	791 ± 10	88
7		2700	2510 ± 30	96	2443 ± 43	90

^aVolumen de muestra 45 mL.

La principal desventaja del análisis de antibióticos β-lactámicos en muestras de leche, utilizando el inmunosensor desarrollado, son los límites de detección alcanzados, ya que no son inferiores a los requeridos para detectar dichos residuos de penicilinas en leche según las directrices fijadas por la U.E. [89,90]. Esta limitación también ha sido observada por otros autores [24,76]. Por todo ello, aunque se ha demostrado la aplicabilidad del inmunoensayo en flujo para la determinación de penicilinas en leche, en trabajos futuros se deberá mejorar la sensibilidad del método, además de adaptarlo a otro tipo de muestras biológicas con menos restricciones legislativas (eg. tejido animal, LMRs = 50 – 300 μg kg⁻¹) [24,90].

- Se ha puesto a punto un inmunosensor para la determinación de penicilinas basado en un ensayo de tipo competitivo y medidas de fluorescencia mediante el empleo de un análogo fluorescente de penicilina que contiene como entidad fluorogénica un grupo pireno (PAAP). La sensibilidad de la reacción depende fundamentalmente del anticuerpo empleado. En este caso se han utilizado anticuerpos policlonales (PABs) no comerciales que interaccionan, preferentemente, con el grupo 6-aminopenicilánico (6-APA), presente en la penicilina G y en el resto de penicilinas evaluadas.
- Como dispositivo de medida óptica, para la monitorización de penicilinas, se ha utilizado un dispositivo automático de análisis por inyección secuencial, obteniéndose resultados satisfactorios.
- En el estudio analítico del inmunosensor fluorescente de penicilinas, se han optimizado distintos parámetros físico-químicos (concentración de PAAP, concentración de antisuero R543, tiempo de incubación, tipo de disolución reguladora, etc.) que afectan al inmunoensayo, así como las características hidrodinámicas del sistema de flujo (e.g. caudal y volumen de inyección de los inmunoreactivos) empleados para la automatización del método. Además, se han

evaluado tres tipos de inmunosportes comerciales en la optimización del ensayo: inmunoabsorbente *Ultralink[®] Immobilized Protein A/G Plus* (PAG), *Ultralink[®] Immobilized Protein A Plus* (PA) y *Prosep[®]-A Media* (CPGA). El primero permite obtener resultado más reproducibles, pudiéndose utilizar en más de 200 ciclos de ensayo.

- El inmunoensayo desarrollado permite la determinación de PENG en el intervalo 6.0 – 191 ng mL⁻¹, con un límite de detección inferior a otros inmunoensayos descritos en la bibliografía (2.4 ng mL⁻¹). El IC₅₀ (desplazamiento del 50% del antígeno marcado) corresponde a una concentración menor de 30 ng mL⁻¹ de PENG (RSD = 17%, n = 5).
- Los estudios de reactividad cruzada muestran que el ensayo puede también emplearse para la determinación de AMOX (50%), AMPI (47%) y PENV (145%). Por otro lado, la baja sensibilidad observada para la DICLOX (1.5%) y NAFCI (< 0.002%) demuestra que cuanto mayor es el número de sustituyentes en el grupo β -lactámico, a través del grupo amida, menor es la interacción con los anticuerpos policlonales. Asimismo, cabe destacar que los antibióticos no penicilánicos evaluados no presentan ninguna RC para concentraciones superiores a 100 μ g mL⁻¹.
- Se ha comprobado que la bioafinidad del soporte ligado a proteína AG (PAG) no se modifica significativamente en periodos de tiempo inferiores a 20 días (> 200 ciclos). Igualmente, el biosensor desarrollado muestra una gran sensibilidad en este periodo, permaneciendo dentro de los límites de control establecidos.
- Se ha estudiado el comportamiento del inmunoensayo frente a matrices complejas de aguas residuales, empleado muestras procedentes de los caudales de entrada y salida de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), los cuales contienen diversos aportes de contaminación urbana. En ninguno de los casos estudiados se observó efecto de la matriz, por lo que se puede concluir que el inmunoensayo es

apto para la evaluación de aguas residuales, siendo necesario únicamente la filtración previa de la muestra y el ajuste del pH si éste se encuentra fuera del intervalo operativo del inmunoensayo (6.0 – 8.5).

- El mismo inmunoensayo se ha aplicado a la determinación de AMOX, PENG y CLOX en muestras de leche. Para ello, se ha evaluado el efecto matriz sobre las características del ensayo, encontrándose que una dilución 1:20 de la muestra de leche desnatada es suficiente para la supresión de dicho efecto. Los valores medios de recuperación obtenidos se encuentran comprendidos entre el 88 y 103%, lo que demuestra la efectividad del ensayo propuesto. Sin embargo, la sensibilidad obtenida para este tipo de muestras debe mejorarse para así alcanzar los LMRs establecidos por las directrices de la Unión Europea para estas sustancias en este tipo de muestras.

- [1] L.H. Stanker, S. Buckley, M. Muldoon, W.A. Moats, C. Braswell, *Food Agric. Immunol.* **1998**, *10*, 121.
- [2] A. Kumar, R.M. Rocco, D.K. Leung, L.S. Jang, S. Kharadia, C. Yu, K.K. Hara-Mikami, G.M. Jang, M. Piani, *ACS Symp. Ser.* **1996**, *621*, 450.
- [3] Å. Sternesjö, G. Johnsson, *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 808.
- [4] M. Steward, D. Male, “*Immunological Techniques*”, en I. Roitt, J. Brostoff, D. Male (eds.) *Immunology*, Churchill Livingstone, Middlesex House, Londres (Reino Unido) **1989**.
- [5] O. Rojas-Espinosa, “*Anticuerpos*”, en O. Rojas-Espinosa (ed.) *Inmunología (de memoria)*, Editorial Médica Panamericana S.A., Mexico D.F. (México) **2001**.
- [6] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495.
- [7] J.C. Hall, G.M. O’Brien, S.R. Webb, “*Phase-display technology for environmental analysis*”, en D.S. Aga, E.M. Thurman (eds.) *Immunochemical Technology for Environmental Applications*, ACS Symposium Series 657, American Chemical Society, Washington, DC (EE.UU) **1997**.
- [8] J.A. Gavaldón, *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica de Valencia, **2002**.
- [9] P. Roca, J. Oliver, A.M. Rodríguez, “*Técnicas Inmunoquímicas*”, en A. Irurzun, E. Feduchi (eds.) *Bioquímica. Técnicas y Métodos*, Editorial Hélyce, Madrid (España) **2003**.
- [10] www.probes.com (Abril 2005).
- [11] E.G. Matveeda, M.P. Aguilar-Caballos, S.A. Eremin, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Analyst* **1997**, *122*, 863.
- [12] J.P. Gosling, *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1408.
- [13] D.A. Stead, *J. Chromatogr. B* **2000**, *747*, 69.

- [14] M.A. González-Martínez, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, I. Ferrer, M.P. Marco, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 386, 201.
- [15] M.A. González-Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, I. Ferrer, M.P. Marco, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 387, 227.
- [16] M.A. González-Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, J.J. Monclús, A. Montoya, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 392, 113.
- [17] Q. Yuan, J.R. Clarke, H.-R. Zhou, J.E. Linz, J.J. Pestka, L.P. Hart, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 263.
- [18] J. Jodlbauer, P. Zöllner, W. Lindler, *Chromatographia* **2000**, 51, 11.
- [19] M.A. Arnold, M.E. Meyerhoff, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1998**, 20, 149.
- [20] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 1247.
- [21] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-through (Bio)Chemical sensors*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **1994**.
- [22] J. Janata, M. Josowicz, D.M. DeVaney, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 207R.
- [23] E. Gustavsson, P. Bjurling, Å. Sternesjö, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 468, 153.
- [24] V. Gaudin, J. Fontaine, P. Maris, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 436, 191.
- [25] D.J. Monk, D. Walt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379, 931.
- [26] M. Trojanowicz, M. Wcislo, *Anal. Lett.* **2005**, 38, 523.
- [27] N.H.S. Ammida, G. Volpe, R. Draisci, *Analyst* **2004**, 129, 15.
- [28] C. WeissWichert, M. Smetazko, M. ValinaSaba, *J. Biomol. Screen.* **1997**, 2, 11.
- [29] J.L. Urraca, E. Benito-Peña, C. Pérez-Conde, M.C. Moreno-Bondi, J.J. Pestka, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3338.
- [30] M.A. González-Martínez, *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica de Valencia, **1997**.
- [31] M.A. González-Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, *TrAC* **1999**, 18, 204.
- [32] A. Dankwardt, "Immunochemical Assays in Pesticide Analysis" en R.A. Meyers (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (Reino Unido) **2000**.
- [33] B. Lu, M.R. Smyth, R. O'Kennedy, *Analyst* **1996**, 121, 29R.
- [34] B. Hock, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 177.
- [35] C.M. Rico, M.P. Fernández, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Analyst* **1995**, 120, 2589.

- [36] P.M. Krämer, B.A. Baumann, P.G. Stoks, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 187.
- [37] W. Haasnoot, G. Cazemier, M. Koets, A. van Amerongen, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488*, 53.
- [38] R. Dietrich, E. Usleber, E. Märtilbauer, *Analyst* **1998**, *123*, 2749.
- [39] E. Usleber, S. Litz, E. Märtilbauer, *Food Agr. Immunol.* **1998**, *10*, 317.
- [40] A. Grubelnik, C. Padeste, L. Tiefenauer, *Food Agr. Immunol.* **2001**, *13*, 161.
- [41] P. Singh, R. Rodgers, D.K. Leung, *Patente* EP 0144154.
- [42] P. Rohner, M. Schällibaum, J. Nicolet, *J. Food Prot.* **1985**, *48*, 59.
- [43] D.J. Blackmore, R. Jackman, J.A. Morris, EP 0309299.
- [44] R. Jackman, S.J. Mitchell, S.D. Dyer, J. Chesham, *Food Agr. Immunol.* **1991**, *3*, 3.
- [45] T. Kitagawa, T. Kanamuru, H. Wakamatsu, H. Kato, S. Yano, Y. Asanuma, *J. Biochem.* **1978**, *84*, 491.
- [46] N. Nagakura, S. Souma, T. Shimizu, Y. Yanagihara, *J. Antimicrob. Chemother.* **1991**, *28*, 357.
- [47] M.F. Shirazi, T.V. Hung, D.M. Womersley, *Aust. J. Dairy Technol.* **1991**, *46*, 88.
- [48] E. Usleber, M. Lorber, M. Straka, G. Terplan, E. Märtilbauer, *Analyst* **1994**, *119*, 2765.
- [49] R. Dietrich, E. Usleber, E. Märtilbauer, "Use of monoclonal antibodies for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk", en N. Haagsma, A. Ruiter (eds.) *Euroresidue III: Conference on Residues of Veterinary Drugs in Foods*, University of Utrecht (Holanda) **1996**.
- [50] B.G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Märtilbauer, R. Niessner, M.G. Weller, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 646.
- [51] S.P. Huth, P.S. Warholic, J.M. Devou, L.K. Chaney, G.H. Clark, *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 355.
- [52] A. Strasser, R. Dietrich, E. Usleber, E. Märtilbauer, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *495*, 11.
- [53] U.J. Meyer, D. Tran, G. Key, M. Meusel, F. Spener, *Biocatal. Biotransfor.* **1999**, *17*, 103.
- [54] U.J. Meyer, Z.L. Zhi, E. Loomans, F. Spener, M. Meusel, *Analyst* **1999**, *124*, 1605.
- [55] A. Strasser, E. Usleber, E. Schneider, R. Dietrich, C. Bürk, E. Märtilbauer, *Food Agr. Immunol.* **2003**, *15*, 135.
- [56] Z.L. Zhi, U.J. Meyer, J.W. Van der Bedem, M. Meusel, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *442*, 207.
- [57] P. de Leuw, G. Kapa, M. Petz, *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 1220.

- [58] G. Orellana Moraleda, S. Aparicio Lara, M.C. Moreno Bondi, E. Benito Peña, *Patente ES 2197811*.
- [59] M. Eliasson, A. Olsson, E. Palmcrantz, K. Wiberg, M. Inganas, B. Guss, M. Lindberg, M. Uhlen, M. Chimeric, *J. Biol. Chem.* **1989**, *263*, 4323.
- [60] J. Penalva Villegas, *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica de Valencia, **2000**.
- [61] S. Beñat Morais Ezquerro, *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica de Valencia, **1999**.
- [62] K. Huse, H.-J. Böhme, G.H. Scholz, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *51*, 217.
- [63] P. Tijssen, en R.H. Burdon, P.H. Van Knippenberg (eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam (Holanda), **1987**.
- [64] D.A. Palmer, T.E. Edmonds, N.J. Seare, *Anal. Proc.* **1992**, *29*, 98.
- [65] D. Trau, T. Theuerl, M. Wilmer, M. Meusel, F. Spener, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 499.
- [66] D.A. Palmer, M. Evans, N. Miller, M.T. French, *Analyst* **1994**, *119*, 943.
- [67] www.piercenet.com (Abril 2005).
- [68] www.millipore.com (Abril 2005).
- [69] Q.X. Li, M.S. Zhao, S.J. Gee, M.J. Kurth, J.N. Seiber, B.D. Hammock, *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1685.
- [70] R. Jefferis, I. Deverill, "The antigen antibody reaction" en C.P. Price, D.J. Newman (eds.) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, New York (EE.UU), **1991**.
- [71] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Camps, M.P. Marco, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 139.
- [72] J. Gascón, A. Oubiña, B. Ballesteros, D. Barceló, F. Camps, M.P. Marco, M.A. González-Martínez, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *347*, 149.
- [73] M.G. Weller, L. Weil, R. Niessner, *Mikrochim. Acta* **1992**, *108*, 29.
- [74] P. Pulido-Tofiño, J.M. Barrero-Moreno, M.C. Pérez-Conde, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *417*, 85.
- [75] R.P. Ekins "Immunoassay Design and Optimisation" en C.P. Price, D.J. Newman (eds) *Principles and Practice of Immunoassay*, Mc Millan, (Reino Unido), **1997**.
- [76] M. Delwiche, E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, W. Sansen, *Trans. ASAE* **2000**, *43*, 153.
- [77] P. Dillon, S. Daly, J. Browne, B. Manning, E. Loomans, A. van Amerongen, R. O'Kennedy, *Food Agric. Immunol.* **2003**, *15*, 225.

- [78] W. Haasnoot, E. Loomans, G. Cazeimer, R. Dietrich, R. Verheijen, A.A. Bergwerff, R. W. Stephany, *Food Agric. Immunol.* **2002**, *14*, 15.
- [79] E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, M. Koets, A. van Amerongen, (manuscrito en preparación).
- [80] F.J. Rowell, Z.F. Miao, R.N. Reeves, R.H. Cumming, *Analyst* **1997**, *122*, 1505.
- [81] ISO 3534-1:1993 “*Statistics-vocabulary and symbols-part 1: Probability and general statistical terms*”.
- [82] J. Meyer, Z.-Liang Zhi, E. Loomans, F. Spener, M. Meusel, *Analyst* **1999**, *124*, 1605.
- [83] G.A. Parker, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1991**, *74*, 868.
- [84] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 1344.
- [85] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. De León González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *556*, 415.
- [86] E. Benito-Peña, M. C. Moreno-Bondi, G. Orellana, A. Maquieira, A. van Amerongen, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6635.
- [87] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15.
- [88] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 406.
- [89] S.E. Aiello, *El manual Merck de Veterinaria*, 5ª edición, Océano Grupo Editorial S.A., Barcelona (España), **2000**.
- [90] Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de **1990** *por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, (DOCE L 224/1990).

VI.

DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

VI. DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

1. TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

1.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

- 1.1.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIO AL PROCESO DE EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN EN MUESTRAS DE ORIGEN AGROALIMENTARIO
- 1.1.2. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO
- 1.1.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
 - 1.1.3.1. Tipos de adsorbentes empleados en SPE
 - 1.1.3.2. Aplicaciones de SPE a la determinación de antibióticos β -lactámicos
- 1.1.4. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO
- 1.1.5. EXTRACCIÓN SÓLIDO-SÓLIDO

1.2. ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE HPLC-DAD

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- 3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS
- 3.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES
- 3.1.3. DISOLUCIONES

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- 3.2.1. CROMATOGRAFÍA
- 3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS

- 3.2.3. EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES (PLE)
- 3.2.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)
- 3.2.5. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

3.3. PROCEDIMIENTO DE MEDIDA

- 3.3.1. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
 - 3.3.1.1. Método con derivatización precolumna
 - 3.3.1.2. Método sin derivatización precolumna
- 3.3.2. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS
 - 3.3.2.1. Cartucho Oasis MAX
 - 3.3.2.2. Cartucho Bond Elut C₁₈

3.4. ANALISIS DE MUESTRAS REALES

- 3.4.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS RESIDUALES
- 3.4.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE
 - 3.4.2.1. Eliminación de la materia grasa
 - 3.4.2.2. Precipitación de proteínas en muestras de leche para la determinación de antibióticos β -lactámicos
 - 3.4.2.3. Preconcentración de muestra empleando cartuchos Oasis MAX
 - 3.4.2.4. Análisis cromatográfico
 - 3.4.2.5. Análisis de antibióticos β -lactámicos en muestras de leche
- 3.4.3. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN PIENSO

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EMPLEANDO DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

- 4.1.1. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA
 - 4.1.1.1. Ensayos previos
 - 4.1.1.2. Características espectroscópicas de los derivados β -lactámicos
 - 4.1.1.3. Estabilidad de los derivados de los antibióticos β -lactámicos
- 4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA
 - 4.1.2.1. Ensayos previos
 - 4.1.2.2. Naturaleza de la disolución reguladora
 - 4.1.2.3. Optimización del pH de la fase móvil
 - 4.1.2.4. Optimización de la temperatura de la columna
- 4.1.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO
 - 4.1.3.1. Calibrado
 - 4.1.3.2. Límites de detección y cuantificación
 - 4.1.3.3. Precisión del método cromatográfico

4.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS SIN DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

4.2.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

4.2.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO

4.2.3.1. Calibrado

4.2.3.2. Límites de detección y cuantificación

4.2.3.3. Precisión del método cromatográfico

4.2.3.4. Estudio de interferencias

4.3. ESTUDIO DE PRECONCENTRACIÓN EMPLEANDO CARTUCHOS EN FASE SÓLIDA (SPE)

4.3.1. INFLUENCIA DEL pH DE LA DISOLUCIÓN DE CARGA

4.3.2. ELECCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE LAVADO

4.3.3. ELECCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ELUCIÓN

4.3.3.1. Optimización de la inyección de los extractos de SPE: adición de un disolvente focalizador

4.3.4. CÁLCULO DEL VOLUMEN DE RUPTURA

4.4. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS REALES

4.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES

4.4.2. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE LECHE

4.4.2.1. Selección del procedimiento de extracción

4.4.2.2. Aplicación a la determinación de antibióticos β -lactámicos en leche

4.4.3. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE PIENSO

4.4.3.1. Estudios previos

4.4.3.2. Optimización de las condiciones extracción

4.4.3.3. Análisis de penicilina V en un pienso medicado

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

1

El uso de técnicas basadas en la cromatografía de líquidos acoplada a detectores UV-visible combinadas con la utilización de técnicas de extracción y de preconcentración, ha dado lugar a numerosos métodos analíticos para la determinación de antibióticos β -lactámicos en una gran variedad de muestras (biológicas, medio ambientales, industriales, farmacológicas, etc.). A continuación, se presenta un resumen de estos métodos, sus características analíticas y sus ventajas y limitaciones para el análisis de penicilinas.

1.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

De todas las etapas que constituyen el proceso de análisis, una de las más críticas es, sin duda, el **tratamiento de muestra**. Este proceso, previo al análisis, es un requisito fundamental para prácticamente todas las metodologías analíticas y resulta crítico a la hora de obtener el resultado final del análisis.

En la mayoría de los casos, el análisis cromatográfico de sustancias procedentes de muestras complejas sólo es posible tras una etapa de tratamiento de muestra que permite la eliminación de interferencias, además de concentrar los analitos, facilitando así su posterior determinación al aumentar, de forma indirecta, la sensibilidad y selectividad del método.

El procedimiento empleado para el tratamiento de muestras medioambientales o biomatrices para el análisis de antibióticos β -lactámicos está condicionado, en gran medida, por la estabilidad de éstas sustancias.

La presencia del anillo β -lactámico en las estructuras penicilínicas las convierte en sustancias altamente termolábiles y sensibles a la presencia de alcoholes y ácidos. Debido a éstas características, es necesario controlar adecuadamente el pH y la temperatura durante todas las etapas de pretratamiento para evitar la degradación de los antibióticos lo máximo posible [1].

1.1.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIO AL PROCESO DE EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN EN MUESTRAS DE ORIGEN AGROALIMENTARIO

Generalmente, en este tipo de muestras, que contienen una elevada concentración proteica y de otras sustancias (grasas, hidratos de carbono, etc.), es necesario realizar un tratamiento previo que permita separar la materia orgánica de los analitos de interés.

De este modo, el procedimiento de extracción de penicilinas en muestras líquidas de origen animal, como por ejemplo la leche, incluye un paso de **eliminación de la materia grasa** seguido de centrifugación [2-4]. En algunas circunstancias, las muestras pueden diluirse con mezclas hidroorgánicas de acetonitrilo-agua [5-9] o acetonitrilo-metanol-agua [8-10] antes de su etapa de limpieza y preconcentración.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, tanto las muestras líquidas como las semisólidas (eg. músculo, tejidos, hígado, riñón) requieren un tratamiento más exhaustivo que incluye una **etapa de desproteización** ya que los residuos de antibióticos β -lactámicos en matrices biológicas suelen estar unidos a las proteínas solubles que las constituyen [11].

Los tratamientos de desproteización de antibióticos β -lactámicos que habitualmente suelen utilizarse, están basados en el empleo de *disolventes orgánicos*, *ácidos orgánicos* o *inorgánicos y/o sales*. El acetonitrilo [12,13-14], acetona [15], isooctano [16] y

diclorometano, hexano [17] se han utilizado como disolventes de extracción obteniéndose resultados de efectividad variable con respecto a la liberación de los antimicrobianos ligados a proteínas.

En este sentido, Heller y col. [18] han descrito la extracción de PENG de diversos tejidos y animales utilizando una mezcla de acetonitrilo-agua (1:1), seguida de centrifugación. Las recuperaciones obtenidas son de 103% (RSD < 3%) en plasma, 96% (RSD < 11%) para riñón y 98% (RSD < 4%) en orina. Asimismo, Gee y col [19] han utilizado disoluciones de acetonitrilo-agua (NaCl 3%) para la extracción de antibióticos en la mismas matrices obteniendo porcentajes de recuperación del mismo orden.

Los ácidos inorgánicos y orgánicos como el ácido clorhídrico, la mezcla ácido sulfúrico/wolframato sódico ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Na}_2\text{WO}_4$) [20,21] y tricloroacético (TCA) [22,23] se han utilizado de forma extensiva como agentes precipitantes en procesos de desproteinización.

De este modo, Sorensen y col [24] describieron el análisis simultáneo de 7 penicilinas en músculo de hígado y riñón de ganado vacuno y porcino mediante la aplicación de un proceso de extracción basado en la adición de 0.68 mol L^{-1} de H_2SO_4 y de 0.68 mol L^{-1} de Na_2WO_4 de sobre la muestra homogeneizada. Las recuperaciones obtenidas están comprendidas entre 66 y 82%.

Otra opción interesante es la de incluir en la disolución precipitante sales de metales Ni (II), Cu (II) y Zn (II) (eg. NiSO_4 , CuSO_4), ya que se ha demostrado [25] que la presencia de dichos cationes pueden desestabilizar la estructura tridimensional de algunas proteínas (eg. albúmina, hexoquinona) favoreciendo la eliminación de la conformación α -hélice.

Una alternativa a las desproteinizaciones químicas es la **ultrafiltración** (UF, del inglés “*ultrafiltration*”) que consiste en un proceso de separación en el que macromoléculas disueltas en un fluido se separan de la disolución por filtración bajo presión a través de membranas selectivas fabricadas en polisulfona o acetato de celulosa. La base de la separación es el tamaño molecular, aunque la conformación y la

carga de las moléculas pueden afectar a su rendimiento. Así pues, la ultrafiltración rechaza macromoléculas, proteínas, coloides, etc., mientras que las moléculas de bajo peso molecular atraviesan la membrana.

Entre las aplicaciones más comunes de ultrafiltración cabe destacar la eliminación de proteínas y otras macromoléculas sin necesidad de utilizar procesos de precipitación permitiendo el empleo de volúmenes pequeños de muestra. Precisamente, Goto y col. [26] han optimizado un método para la determinación de tetraciclinas y penicilinas en tejido animal basado en la separación UF de los analitos de la matriz biológica. Las recuperaciones obtenidas para músculo, riñón e hígado están comprendidas entre 70 – 115% con RSD < 15%.

En la tabla 58 se presenta un resumen de las técnicas de desproteínización más utilizadas para el análisis de antibióticos β -lactámicos en muestras biológicas.

Tabla 58. Métodos de desproteínización empleadas para la extracción de antibióticos β -lactámicos de muestras de origen biológico.

Analito	Muestra	Método de desproteínización	Método de limpieza/preconcentración	Técnica analítica	Características	Ref.
AMPI	Músculo	PB, pH 4.5/TCA	SPE	HPLC-F Observaciones: Derivatización	LD: 1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ Recuperación: 85 – 98%	[27]
AMPI	Músculo	NH ₄ Ac, pH 8.5	SPE	HPLC-MS	LD: 1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$	[28]
CLOX	Leche	HCl, acetonitrilo	ELL	HPLC-UV 225 nm	LD: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperación: 75 – 93%	[29]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Músculo, hígado y riñón bovino y porcino	H ₂ SO ₄ /Na ₂ WO ₄	ELL/SPE	HPLC-UV 323 nm Observaciones: Derivatización	LD: 8.9 – 20.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperación: 58 – 82%	[24]
AMOX, AMPI, CLOX, OXA, PENG	Leche	PB, pH 9.2	ELL/SPE	LC-ESI- MS/MS	LD: 0.4 – 1.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Recuperación: 76 – 94%	[30]
PENG, OXA, CLOX, DICLOX	Leche	EtAc/PB pH 8.0	SPE	HPLC-UV 345 nm Observaciones: Derivatización	LD: 4 – 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[31]

Tabla 58. Métodos de desproteinización para la extracción de antibióticos β -lactámicos de muestras de origen biológico (continuación).

Analito	Muestra	Método de desproteinización	Método de limpieza/ preconcentración	Técnica analítica	Características	Ref.
OXA, CLOX, DICLOX	Leche	PB, pH 8.0/ H ₂ SO ₄	SPE	HPLC-UV 340 nm Observaciones: Derivatización	LD: 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[32]
AMOX	Tejidos	PB, pH 4.5/TCA	SPE	HPLC-F Observaciones: Derivatización	LD: 1.2 – 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Recuperación: 67 – 82%	[33]
OXA, CLOX, DICLOX	Queso, leche, yogurt	H ₂ SO ₄ /Na ₂ WO ₄	SPE	HPLC-UV 345 nm Observaciones: Derivatización	LD.: 5 – 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Recuperación: 75 – 93%	[34]
PENG	Plasma, hígado y orina	acetonitrilo-agua (1:1)	SPE	HPLC-MS/MS	LD: <i>Plasma:</i> 12 ng mL^{-1} <i>Hígado:</i> 10 ng g^{-1} <i>Orina:</i> 63 ng mL^{-1} Recuperación: <i>Plasma:</i> 103% <i>Hígado:</i> 96% <i>Orina:</i> 98%	[18]

Abreviaturas: PENG: *penicilina G*; AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, SPE: *extracción en fase sólida*, ELL: *extracción líquido-líquido*, TCA: *ácido tricloroacético*, PB: *tampón fosfato*, EtAc: *acetato de etilo*, NH₄Ac: *acetato de amonio*.

1.1.2. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La extracción líquido-líquido (ELL), es una de las técnicas de tratamiento de muestra más utilizada en el análisis de antibióticos, tanto en fluidos biológicos como en muestras medioambientales, debido a su simplicidad.

Una de las variables a tener en cuenta en la ELL es el disolvente orgánico utilizado como extractante. En la selección de éste se han de considerar varios aspectos como su polaridad, volatilidad y compatibilidad con las técnicas analíticas que se vayan a utilizar. En el análisis de biomatrices (eg. tejidos, hígado) para la determinación de antibióticos β -lactámicos, es frecuente el uso de hexano y diclorometano como disolvente para la extracción de penicilinas [35]. Para conseguir extractos más limpios también se ha usado combinaciones de acetonitrilo, seguido de diclorometano, hexano-acetonitrilo, agua y PB (pH 7.0) y de nuevo diclorometano [36].

La principal desventaja de esta técnica extractiva es la formación de emulsiones, por este motivo, muchas veces se incluye un paso de centrifugación, posterior a la extracción, que rompa las emulsiones y genere una mayor separación entre las dos fases.

1.1.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (SPE, del inglés “*solid-phase extraction*”) es una técnica de preparación de muestra que se basa en la adsorción selectiva de los analitos en una fase sólida.

Los objetivos principales de la SPE son reducir interferencias debidas a los componentes de la matriz (limpieza o “*clean-up*”) y preconcentrar. De este modo la SPE permite alcanzar la concentración necesaria para utilizar algunas técnicas o para mejorar la sensibilidad del método, disminuir o eliminar interferentes e incluso, cambiar la matriz en la que se encuentra el analito [37]. En la mayoría de los casos, todos estos efectos se producen simultáneamente. De cualquier manera, el proceso permite obtener disoluciones en las que los analitos se encuentran lo suficientemente concentrados para su detección posterior y libres de interferencias causadas por los componentes de la matriz.

Son muchas las ventajas que presenta la aplicación de la SPE frente a la extracción líquido-líquido: es más selectiva y sensible, se obtienen porcentajes de recuperación superiores, aumenta la eliminación de interferencias, es más reproducible, no se forman emulsiones, se puede automatizar con facilidad, disminuye el consumo de disolventes y permite evitar el empleo de disolventes tóxicos y/o peligrosos.

1.1.3.1. TIPOS DE ADSORBENTES EMPLEADOS EN SPE

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en SPE es el adsorbente utilizado. Las propiedades físico-químicas de los adsorbentes por ejemplo, como el área superficial, el diámetro, el tamaño de partícula, el volumen de poro, etc. van a determinar la eficiencia de la extracción así como la calidad global de la separación.

Idealmente, los materiales utilizados en SPE tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial y actúan de forma específica, adsorbiendo únicamente los analitos de interés sin retener otros contaminantes. Sin embargo, en muchas ocasiones, los adsorbentes de SPE no son tan selectivos y un gran número de materia endógena puede ser retenida y afectar al análisis posterior. Para evitarlo, será de gran importancia optimizar adecuadamente la naturaleza del eluyente y las condiciones de extracción [38].

Los *adsorbentes* más utilizados en SPE son los basados en **sílice** o **resinas poliméricas**, que pueden modificarse mediante la introducción de diferentes grupos funcionales. Ambos materiales se caracterizan por su rigidez, bajo coste y estabilidad.

Cabe destacar que, los adsorbentes poliméricos superan muchas de las limitaciones de las sílices funcionalizadas, ya que tienen mayor estabilidad en un intervalo de pH más amplio (1 – 14). Además, presentan una mayor capacidad de retención de los analitos. Los adsorbentes poliméricos más utilizados son los *copolímeros de estireno-divinilbenceno* (**PS-DVB** ó **SDB**), los cuales tienen una superficie hidrófoba.

Recientemente, se han desarrollado adsorbentes basados en copolímeros de divinilbenceno-pirrolidona como son “*Porapak RDX*” y “*Oasis*”. **Oasis HLB** es un polímero macroporoso obtenido a partir de los monómeros DVB (lipofílico) y VP (hidrofílico) que proporcionan el balance hidrofílico-lipofílico para la retención de compuestos orgánicos polares y no polares presentes en muestras acuosas. Las fases **Oasis MCX** y **Oasis MAX** combinan las propiedades de adsorbentes de la fase HLB con las características de un cambiador catiónico fuerte (con grupos ácido sulfónico) y un cambiador aniónico (con grupos amina cuaternaria) respectivamente.

Otra posibilidad son los adsorbentes de acceso restringido (**RAM**, del inglés “*restricted access media*”) que permiten únicamente el paso de moléculas pequeñas. En este sentido, Cass y col. [39] han propuesto un procedimiento rápido y simple, basado en HPLC-UV acoplado a una columna RAM, para el análisis de amoxicilina en plasma humano. El método permite la determinación directa del antibiótico en un tiempo inferior de 25 min con una buena selectividad, sensibilidad ($LQ < 50\text{ng mL}^{-1}$), exactitud (85%) y precisión ($RSD = 6\%$).

Por otra parte, en los últimos años se han introducido en el mercado otro tipo de adsorbentes que permiten una elevada selectividad en la extracción. Estos **sorbentes de afinidad**, basados en el reconocimiento molecular, están constituidos por un soporte inerte (resina, gel de sílice, etc.) sobre el cual están inmovilizados una enzima, hormona o anticuerpo, siendo estos últimos los más utilizados [40].

Otra posibilidad para la obtención de adsorbentes selectivos es la técnica de impronta molecular, la cual permite la preparación de polímeros macroporosos (**MIPs**) con puntos de unión selectivos, capaces de reconocer a una determinada molécula (Capítulo IV).

En la tabla 59 se presentan los adsorbentes más utilizados en extracción en fase sólida con mecanismos de interacción basados en fase reversa.

Tabla 59. Características de diferentes adsorbentes empleados en SPE [41].

Tipo de adsorbente	Estructura
1. Adsorbentes basados en sílices enlazadas	
<i>Fase reversa</i>	
Octadecilsilano (C ₁₈)	-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
Octilsilano (C ₈)	-Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃
Fenilsilano (PH)	-Si-Phe
Cianobutilsilano (CN)	-Si-(CH ₂) ₄ -CN
<i>Fases adsorbentes de intercambio iónico</i>	
Bencenosulfonilpropilsilano (SCX)	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻ Bz
Carboximetilsilano (CBA)	-Si-CH ₂ -COO ⁻
Trimetilaminopropilsilano (SAX)	-Si-(CH ₂) ₃ -N ⁺ -(CH ₃) ₃
2. Adsorbentes poliméricos	
Amberlita XAD-2	PS-DVB
Bond Elut ENV	PS-DVB
Isolute ENV+	PS-DVB
Lichrolut EN	PS-DVB
Porapak RDX	DVB-VP
Oasis HLB	DVB-VP
Oasis MAX	DVB-VP
Oasis MCX	DVB-VP

Abreviaturas: Phe: *fenilo*, Bz: *benceno*, PS-DVB: *poliestireno-divinilbenceno*, DVB-VP: *divinilbenceno-vinilpirrolidona*.

Finalmente, otros materiales utilizados en el desarrollo de soportes para SPE son los basados en fases **adsorbentes de intercambio iónico** o **carbono gratificado** (eg. Carbpak, Carbograph1, Envi. Carb., Carbograph4). Estos últimos son, en ocasiones, los únicos capaces de concentrar muchos solutos orgánicos altamente polares. De hecho, se ha empleado cartuchos de *Carbograph4* para la preconcentración de penicilinas en agua con recuperaciones próximas al 76% [42].

1.1.3.2. APLICACIÓN DE SPE A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

En el caso de las penicilinas, se han utilizado tradicionalmente adsorbentes basados en soportes de sílica. Entre las aplicaciones descritas en la bibliografía, se ha descrito el uso de cartuchos C₁₈ para el análisis de penicilinas tanto en muestras de origen animal como en aguas.

Evidentemente, las recuperaciones obtenidas dependen del tipo de muestra analizada. Así, Hong y col. [37] han observado que la mayoría de las penicilinas exhiben mayores porcentajes de recuperación en riñón (80 a 100%), hígado (73 a 93%) y suero (70 a 90%) cuando se realiza una extracción empleando una disolución de 3% NaCl-acetonitrilo, seguida de una purificación en un cartucho C₁₈ de SPE.

Por otro lado, Calamari y col. [43] describen recuperaciones del 49% para penicilinas en aguas utilizando cartuchos Bakerbond C₁₈.

En la actualidad, con el objeto de mejorar los resultados obtenidos con los cartuchos basados en sorbentes de sílice enlazada, se tiende a utilizar adsorbentes poliméricos, en especial aquellos funcionalizados con grupos polares que permiten aumentar el carácter hidrofílico del polímero (eg. Isolut ENV+ [44], Oasis MAX [45], etc.).

A modo de resumen, en la tabla 60 se recogen las características generales de distintos métodos de extracción en fase sólida aplicados a la determinación de antibióticos β -lactámicos en diversas muestras, tanto de origen biológico como medioambiental.

Tabla 60. Resumen de los principales métodos descritos en bibliografía para el análisis de antibióticos β -lactámicos en muestras agroalimentarias y medioambientales empleando SPE.

Analito	Matriz	Adsorbente	Eluyente	Técnica analítica	Características	Ref.
AMOX, AMPI, PENG, OXA, CLOX	Leche	Cartucho C ₁₈	acetonitrilo-agua (PB 50 mmol L ⁻¹) (1:1, v/v)	LC-ESI-MS/MS	LD: 0.4 – 1.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Recuperaciones: 76 – 94% RSD: 5 – 7%	[30]
¹ AMOX, ² CEFAP	Leche	Sep-Pak C ₁₈	acetonitrilo-agua (15:85, v/v)	HPLC-IPAD	LD: 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 1: 67 – 78% 2: 74 – 80%	[46]
OXA, CLOX, DICLOX	Leche	Bond-Elut C ₁₈	acetonitrilo-agua (40:60, v/v)	HPLC-UV 340 nm	LD: 2 – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 77 – 89%	[32]
PENG	Leche	Bond-Elut C ₁₈	acetonitrilo-agua (40:60, v/v)	HPLC-UV 325 nm	LD: 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 87 – 91% RSD: 18%	[47]
AMOX, AMPI, PENG, OXA, CLOX, DICLOX	Leche	Cartucho C ₁₈	acetonitrilo	HPLC-UV 323 nm	LD: 1.3 – 2.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 87 – 102% RSD: 1.8 – 8.8%	[4]
AMOX, AMPI	Leche	Cartucho C ₁₈	metanol-agua (60:40, v/v)	HPLC-F $\lambda_{\text{exc}} = 354 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$	LD: 1.0 – 1.1 ng mL^{-1} Recuperaciones: ca. 80% RSD: < 5%	[20]
PENG	Leche	Isolute C ₁₈	acetonitrilo-agua (PB 10 mmol L ⁻¹) (20:80, v/v)	HPLC-UV 320nm	Recuperaciones: 70 – 73% RSD: 8.5 – 10.9%	[2]
PENG	Leche	Bond-Elut C ₁₈	acetonitrilo-agua (PB 200 mmol L ⁻¹) (60:40, v/v)	HPLC-UV 325nm	LD: 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 70 – 81%	[21]
¹ PENG, ¹ PENV, ² OXA, ² CLOX, ² DICLOX	Leche	Cartucho C ₁₈	acetonitrilo-agua (PB) (90:10, v/v)	HPLC-UV 1: 325nm 2: 350 nm	LD: 4 – 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Recuperaciones: 60 – 73%	[31]
AMPI	Leche	Bond-Elut C ₁₈	acetonitrilo-agua (PB 100 mmol L ⁻¹) (40:60, v/v)	HPLC-UV 325 nm	LD: 3 ng mL^{-1} Recuperaciones: 42 – 59% RSD: 5%	[48]

Tabla 60. Resumen de los principales métodos descritos en bibliografía para el análisis de antibióticos β -lactámicos en muestras agroalimentarias y medioambientales empleando SPE (continuación).

Analito	Matriz	Adsorbente	Eluyente	Técnica analítica	Características	Ref.
AMOX, AMPI, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Agua residual	Oasis MAX	metanol (TBA 0.05 mol L ⁻¹)	HPLC-UV 220 nm	LD: 2.2 – 12.7 ng mL ⁻¹ Recuperaciones: 41 – 106% RSD: 0.8 – 12%	[45]
PENV	Agua	Bondesil ODS	metanol	HPLC-MS	LD: 1.1 µg L ⁻¹ Recuperaciones: 53% RSD: 13%	[49]
AMOX, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCl, DICLOX	Agua grifo	Isolut ENV+	acetonitrilo-agua-TEA (90:9.5:0.5, v/v/v)	HPLC-MS/MS	LD: 13 – 21 ng L ⁻¹ Recuperaciones: 33 – 112% RSD: < 10%	[44]
AMOX, AMPI	Agua residual hospital	Isolut ENV+	metanol-TEA (95:5) (v/v)	HPLC-MS/MS	LQ: 100 ng L ⁻¹ Recuperaciones: AMOX: 54% AMPI: 48%	[50]

Abreviaturas: AMOX: amoxicilina, AMPI: ampicilina, PENG: penicilina G; PENV: penicilina V, OXA: oxacilina, CLOX: cloxacilina, NAFCl: nafcilina, CEFAP: cefapirina, TBA: tetrabutilamonio hidrógeno sulfato, TEA: trietilamina, IPAD: detector amperométrico de pulso integrado, ESI: interfase de electronebulización.

Como puede verse en la tabla 60, las recuperaciones obtenidas para el análisis de estos antibióticos en muestras medioambientales son aún muy inferiores a las conseguidas en muestras de alimentos, sobre todo en el caso de las penicilinas anfóteras (AMOX y AMPI), siendo necesaria la búsqueda de sorbentes alternativos que permitan evitar este problema.

1.1.4. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

Probablemente, éste es el proceso de extracción más utilizado en el análisis de compuestos orgánicos en muestras sólidas. Se basa en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla es sometida a distintos procesos más o menos agresivos en función de la fortaleza de las interacciones analito-matriz.

Hay que tener en cuenta que, aunque el realizar un proceso exhaustivo aseguraría la extracción completa del analito, simultáneamente se extraería una mayor cantidad de especies interferentes que podrían dificultar la determinación final del compuesto.

Por tanto, el procedimiento de extracción debe ser optimizado en cada aplicación real tratando de emplear unas condiciones de compromiso de forma que se obtenga la mayor cantidad posible en la extracción de los analitos y mínima de otros compuestos no deseados de la matriz.

En la tabla 61 se muestra una breve descripción de algunas técnicas empleadas en la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas.

A la vista de las características destacadas para cada una de las técnicas descritas, se puede decir que no existe ninguna técnica universal que permita la extracción de cualquier compuesto orgánico en cualquier tipo de muestra de forma cuantitativa y selectiva, rápida y con un bajo coste.

Hasta el momento, los trabajos publicados para la extracción de antibióticos β -lactámicos u otras familias de antibióticos, utilizando este tipo de metodologías, es bastante limitado ya que, a excepción de la extracción soxhlet, todas ellas son técnicas relativamente nuevas.

No obstante, Shim y col. han descrito un método para la determinación de fluoroquinolonas en huevos [51] y músculo de pollo [52] utilizando extracción con fluidos supercríticos (**SFE**, del inglés “*supercritical fluid extraction*”) y posterior análisis por HPLC-FLD. Según los autores se obtienen recuperaciones entorno al 100% (RSD < 7%) para concentraciones de enrofloxacina y ciprofloxacina de 50 y 100 ng mL⁻¹.

La extracción por microondas (**MWE**, del inglés “*microwave extraction*”), existen algunos trabajos en donde se emplea como técnica extractiva para antibióticos de tipo fluoroquinolonas en muestras de suelos [53].

La extracción presurizada con disolventes (**PLE**, del inglés “*pressurized liquid extraction*”) se ha utilizado principalmente en el análisis de antibióticos en muestras de pienso. De este modo, Higgs y col. [54] han desarrollado un método basado en PLE

para la extracción de diversos antibióticos (macrólidos, tetraciclinas, sulfonamidas, etc.) en muestras de pienso, obteniendo buenos resultados en cuanto al tiempo de ejecución y consumo de disolventes.

Paralelamente, Pecorelli y col [55], Curren y col. [56] y Golet y col. [57] han propuesto diferentes metodologías de extracción presurizada para la determinación de fluoroquinolonas en pienso, riñón y suelos, respectivamente.

Tabla 61. Técnicas de extracción de compuestos orgánicos en muestras sólidas [41].

Técnica	Descripción	Ventajas	Desventajas
EXTRACCIÓN SOXHLET	<i>La muestra se coloca en una carcasa porosa y el disolvente recircula continuamente a través de ella mediante un sistema de destilación-condensación.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Método estándar. - Independiente del tipo de matriz. - Bajo coste 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado tiempo de extracción (12 – 48 h). - Gran cantidad de disolvente (300 –500 mL). - Bajo coste
EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SFE)	<i>La muestra se coloca en un cartucho de alta presión y se extrae con un fluido supercrítico (p. ej., CO₂ a presiones de 150 atm y temperaturas de 40 a 150 °C). Después de la despresurización, los analitos son recogidos en un pequeño volumen de un disolvente orgánico o sobre un soporte adecuado.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido (30 – 60 min). - El CO₂ no es tóxico. - Se puede conseguir alta selectividad modificando la presión, la temperatura y mediante la adición de un modificador. - Baja cantidad (5 – 10 mL) de disolventes orgánicos. - Automático. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tamaño de muestra limitado (<10 g). - Dependiente del tipo de matriz. - Uso de modificadores para mejora la eficiencia de la extracción. - Coste elevado.
EXTRACCIÓN CON MICROONDAS (MWE)	<i>La muestra se coloca junto con el disolvente en un reactor y la mezcla se calienta con energía de microondas.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido (15 min). - Bajo consumo de disolventes orgánicos (15 – 40 mL). - Automático (extracción secuencial de hasta 24 muestras). - Baja cantidad (5 – 10 mL) de disolventes orgánicos. - Fácil manejo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Es necesario la adición de un disolvente polar. - La limpieza posterior del extracto es necesaria. - Coste moderado.
EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES (PLE)	<i>La muestra se coloca en un cartucho y se pone en contacto con un disolvente caliente a presión elevada (por debajo de su punto de ebullición). Posteriormente el extracto es transferido a un vial de forma automática.</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido (20 – 30 min). - Baja cantidad (30 mL) de disolventes orgánicos. - Control absoluto sobre los parámetros de la extracción (temperatura, presión y potencia). - Se consiguen altas temperaturas. - No se necesitan agentes desecantes. - Se pueden procesar en 1 hora hasta 12 muestras simultáneamente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado coste inicial. - Dependiente del tipo de matriz.

1.1.5. EXTRACCIÓN SÓLIDO-SÓLIDO

La técnica de dispersión de la muestra en fase sólida (**MSPD**, “*matrix solid-phase dispersion*”) fue introducida en 1989 y ha sido aplicada a la determinación de varios compuestos (pesticidas organoclorados y organofosforados, sulfamidas, penicilinas, cefalosporinas, etc.) en muestra de pulmón, riñón, tejido muscular y leche.

En MSPD, una pequeña cantidad de muestra (ca. 5 g) se mezcla con una cantidad similar de un sorbente adecuado hasta conseguir una mezcla homogénea. Esta mezcla se coloca en un cartucho de extracción y los analitos son eluidos con una pequeña cantidad de un disolvente apropiado.

En este sentido, McGrane y col. han empleado MSPD para la determinación de residuos de penicilinas (AMOX, AMPI, PENG, CLOX y DICLOX) en muestras de tejido porcino [35]. El método desarrollado tiene un límite de detección de 20 ng g⁻¹ y las recuperaciones obtenidas oscilan entre el 40 y 90%.

Recientemente, Fagerquist y col. han propuesto un método basado en MSPD y HPLC-MS/MS para la determinación de 10 antibióticos β -lactámicos y algunos metabolitos en muestras de hígado porcino. Las recuperaciones medias obtenidas fueron superiores al 70% (RSD < 18%) [58].

1.2. ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS MEDIANTE HPLC-UV

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más utilizada para la determinación de antibióticos β -lactámicos. En los últimos tiempos los métodos utilizados para el análisis de antibióticos se basan cada vez más en el empleo de espectrometría de masas (MS) [35] como sistema de detección acoplado al HPLC. No obstante, todavía son muchos los laboratorios analíticos en los que el detector más usual es el de absorción UV/visible, utilizando detectores de longitud de onda fija ó detección mediante hilera de diodos integrados (DAD).

En consecuencia, se hace necesario el aprovechamiento adecuado de las técnicas de análisis disponibles mediante la actualización y mejora de los métodos de análisis existentes que permitan responder rápidamente y con el máximo rigor a las exigencias del sector.

La absorción UV proporciona, con frecuencia, una sensibilidad adecuada, pero los antibióticos β -lactámicos no tienen ningún cromóforo fuerte en la región del UV, absorben en agua alrededor de los 210 nm y están sujetos a interferencias de la materia coextraída.

Para solucionar este problema, se han adoptado las siguientes alternativas:

- Realizar una limpieza exhaustiva de la muestra mediante técnicas extractivas eficaces (apartado 1.1) [59]-61].
- Efectuar reacciones de derivatización pre ó postcolumna para obtener derivados que absorban más y a longitudes de onda mayores.

A modo de resumen, en la tabla 62 se recogen las características más importantes de los principales métodos aplicados al análisis de antibióticos β -lactámicos descritos en la bibliografía y basados en HPLC con detección UV-visible y derivatización precolumna.

Tabla 62. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC-UV con derivatización precolumna.

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
¹ PENG, ¹ PENV, ² OXA, ² CLOX, ² DICLOX	Leche	C ₂ acetonitrilo-agua (ác. fórmico 10 mmol L ⁻¹) gradiente	UV 1325 nm 2350 nm	LD: 4 – 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: <i>Derivatización</i> (1,2,4 -triazol + HgCl ₂)	[31]
AMPI	Leche	C ₁₈ acetonitrilo-metanol-agua (PB) isocrático	UV 325 nm	LD: 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: <i>Derivatización</i> (1,2,4 -triazol + HgCl ₂)	[62]
OXA	-	-	UV 300 nm	LD: 3.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: <i>Derivatización</i> fotoquímica	[63]

Tabla 62. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC-UV con derivatización precolumna (continuación).

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
AMOX, AMPI, PENG, CLOX	Músculo bovino	ODS 2 (columna de guarda C ₁₈) acetonitrilo-agua (PB) gradiente	UV 325 nm	LD: - Observaciones: extracción, SPE, <i>Derivatización</i> (1,2,4 -triazol + HgCl ₂)	[64]
PENG, AMPI, AMOX, CLOX, DICLOX	Tejidos	C ₁₈ acetonitrilo-agua (PB) gradiente	UV 325 nm	LD: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: MSPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 -triazol + HgCl ₂)	[35]
OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C ₈ acetonitrilo-metanol-agua (PB)	UV 340nm	LD: 2 – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 – triazol + HgCl ₂)	[32]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C ₁₈ acetonitrilo-agua (PB) gradiente	UV 323nm	LD: 1.3 – 2.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: SPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 – triazol + HgCl ₂)	[4]
AMPI	Leche	C ₁₈ acetonitrilo-metanol-agua (PB) isocrático	UV 325 nm	LD: 3 ng mL ⁻¹ Observaciones: <i>Derivatización</i> (1,2,4 – triazol + HgCl ₂)	[48]
AMOX	Músculo de trucha	C ₁₈ acetonitrilo-metanol-agua (PB) gradiente	UV 323 nm	LD: 2.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 – triazol+ HgCl ₂)	[65]
PENG, PENV, AMPI, AMOX, NAFCI, OXA, CLOX, DICLOX	Músculo	C ₈ acetonitrilo-agua (PB)	UV 325 nm	LD: 3-11 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 – triazol + HgCl ₂)	[16]
AMOX, AMPI, PENG, CLOX	Músculo bovino	C ₈ acetonitrilo-agua (PB)	UV 325 nm	LD: 2-5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: extracción, SPE, <i>derivatización</i> (1,2,4 – triazol + HgCl ₂)	[66]

Abreviaturas: AMOX: *amoxicilina*, AMPI: *ampicilina*, PENG: *penicilina G*; PENV: *penicilina V*, OXA: *oxacilina*, CLOX: *cloxacilina*, NAFCI: *naftilina*, DICLOX: *dicloxacilina*, MSPD: *dispersión de muestra en fase sólida* (del inglés “*matrix solid-phase dispersion*”), PB: *tampón fosfato*, SPE: *extracción en fase sólida* (del inglés, “*solid-phase extraction*”).

Finalmente, en la tabla 63 se recogen las características más importantes de los principales métodos aplicados al análisis de antibióticos β -lactámicos descritos en la bibliografía y basados en HPLC con detección UV-visible sin derivatización precolumna.

Tabla 63. Determinación de antibióticos β -lactámicos mediante HPLC-UV sin derivatización precolumna.

Analito	Muestra	Columna Fase móvil	Detección	Características	Ref.
PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCI, DICLOX	Hígado y riñón bovino	ODS-80 acetonitrilo-agua (PB) gradiente	UV 220 nm	LD: 0.03 0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[67]
AMOX	Suero	C_{18} acetonitrilo-agua (OSA) isocrático	UV 210 nm	LD: - Observaciones: LLE, intervalo lineal 0.2-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[68]
PENG, AMPI, CLOX, DICLOX, NAFCI	Leche	ODS-300-5 acetonitrilo-metanol-agua (KH_2SO_4) isocrático	UV 210 nm	LD: 0.03 y 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$	[32]
CEFAP, CEFTF	Leche bovina	C_{18} (columna de guarda C_{18}) acetonitrilo -agua (Tampón, SDS) gradiente	UV 290 nm	LD: 1.0 – 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, SPE	[14]
AMOX, PENG, AMPI, OXA, CLOX, DICLOX	Leche bovina	C_{18} acetonitrilo-agua (Tampón, SDS) gradiente	UV 210-290 nm.	LD: - Observaciones: desproteínizar, limpieza LC	[69]
AMOX, CEFAP, PENG, AMPI, CLOX, CEFTF	Leche bovina	a) fenil b) C_{18} a) acetonitrilo-agua (tampón, TEA) b) acetonitrilo-agua	a) UV 210-290nm b) UV 230nm y TSP-MS	LD: - Observaciones: filtrar	[70]
AMPI, AMOX	Leche bovina	C_{18} acetonitrilo-agua (Tampón, SDS)	UV 210 nm	LD: 2 – 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Observaciones: desproteínizar, limpieza LC	[60]
PENG	Leche	PLRP-S acetonitrilo-agua (PB) gradiente	UV 200 – 210 nm	LD: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$	[71]
PENG	Leche	C_{18} acetonitrilo-agua (PB) isocrático	UV 214 nm	LD: 2.6 ng mL^{-1}	[66]

Abreviaturas: AMOX: amoxicilina, AMPI: ampicilina, PENG: penicilina G; PENV: penicilina V, OXA: oxacilina, CLOX: cloxacilina, NAFCI: nafcilina, CEFAP: cefapirina, CEFTF: ceftiofur, PB: tampón fosfato, SPE: extracción en fase sólida (solid-phase extraction), OSA: ácido octanosulfónico.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS

2

El objetivo y el plan de trabajo de este Capítulo se han centrado en el desarrollo de un método cromatográfico basado en la técnica de HPLC con detección UV para la determinación de los antibióticos β -lactámicos amoxicilina, ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, dicloxacilina y nafcilina en muestras medioambientales y agroalimentarias que asegure una adecuada sensibilidad y el cumplimiento de los límites que ya estén establecidos.

Por otra parte, la metodología desarrollada se ha empleado para la validación de los dispositivos desarrollados en los capítulos IV y V de esta Memoria.

Los objetivos planteados en esta sección, son:

1. Optimización de las variables cromatográficas para la obtención de un método sensible y reproducible que permita realizar el análisis de rutina de penicilinas en un tiempo razonable.
2. Desarrollo de un método de extracción en fase sólida (SPE) que permita una limpieza y preconcentración efectiva de los analitos para así alcanzar los límites de detección requeridos por las agencias gubernamentales para estos compuestos tanto en muestras medioambientales como de origen biológico o alimentario.

3. Evaluación de distintos métodos físicos y químicos de desproteinización de leche para el análisis de antibióticos β -lactámicos en ese tipo de muestras.
4. Desarrollo de un método de extracción presurizada con disolventes (PLE) para el análisis de penicilinas en muestras complejas (pienso).
5. Aplicación del método desarrollado SPE-HPLC-DAD al análisis de antibióticos β -lactámicos en aguas residuales, leche y pienso.

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1.1. ANTIBIÓTICOS E INHIBIDORES DE LAS β -LACTAMASAS

a. Antibióticos β -lactámicos

- *Amoxicilina base anhidra*, en forma ácida, 87% (**AMOX**, Sigma).
- *Ampicilina trihidratada*, en forma de sal sódica, $\geq 86.6\%$ (**AMPI**, Sigma).
- *Penicilina G*, en forma de sal potásica, 95.7% (**PENG**, Sigma).
- *Penicilina V*, en forma de sal potásica, 93.7% (**PENV**, Sigma).
- *Oxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.8% (**OXA**, Sigma).
- *Cloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 91.8% (**CLOX**, Sigma).
- *Dicloxacilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 92.2% (**DICLOX**, Sigma).
- *Nafcilina monohidratada*, en forma de sal sódica, 87.9% (**NAFCI**, Sigma).
- *Cefapirina*, en forma de sal sódica (**CEFAP**, Sigma).

b. Otros antibióticos

- *Norfloxacin*a, en forma ácida, (**NOR**, Sigma).
- *Oxitetraciclina*, en forma de hidrocloreuro, $\geq 95\%$ (**OXY**, Sigma).
- *Doxiciclina*, en forma de hidrocloreuro, 93.7% (**DOXY**, Sigma).
- *Cloramfenicol*, $> 98\%$ (**CLOR**, Sigma).

- *Eritromicina*, en forma de sal sódica, 99.9% (**ERY**, Sigma).
- *Tetraciclina*, en forma de hidrocloruro, 95% (**TCY**, Sigma).
- *Dapsona* (4,4'-diaminodifenil sulfona), $\geq 97.0\%$ (**DDS**, Fluka).

c. Inhibidores de las β -lactamasas

- *Ácido clavulánico*, en forma de sal de litio, 94.9% (**CLAV**). Cedido por la Prof. M. Kempe (Lund, Suecia).

3.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

a. Disolventes orgánicos

- Metanol, 99.8% para HPLC (SDS).
- Acetonitrilo, $> 99.8\%$ para HPLC (SDS).
- n-hexano anhidro, 95% p.a. (Aldrich).

b. Reactivos para la preparación de disoluciones reguladoras

- Mono-hidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Di-hidrógenofosfato sódico, 99% p.a. (Aldrich).
- Tiosulfato sódico pentahidratado, 99.5% p.a. (Aldrich).
- Ácido hidrogenosulfato de tetra-n-butilamonio, 98% p.a. (**TBA**, Merck).
- Cloruro amónico, 99.8% p.a. (Merck).
- Hidróxido amónico, 99.99% p.a. (Panreac).
- Ácido acético, 99.8% para HPLC (Scharlau).
- Acetato sódico trihidratado, 100% p.a. (Probus).
- Ácido fórmico, 96% p.a. (Aldrich).
- Ácido trifluoroacético, 99% p.a. (Fluka).
- Ácido sulfúrico, 96% p.a. (Merck).
- Wolframato sódico dihidratado (Sigma).
- Sulfato de níquel (II) heptahidratado, $> 99.0\%$ (Fluka).

c. Reactivos para la reacción de derivatización

- Anhídrido benzoico, 90% p.a. (Sigma).
- Cloruro mercúrico, 99.5% p.a. (Sigma).
- 1,2,4-triazol, > 98% p.a. (Aldrich).

d. Otros reactivos

- Hidróxido sódico, 99% p.a. (Merck).
- Ácido clorhídrico, 35% p.a. (Panreac).
- Cloruro sódico, 99% p.a. (Merck).
- Agua purificada Milli-Q (Millipore).

e. Gases

- Nitrógeno C-55, 99.9995% (Carbuos metálicos).

3.1.3. DISOLUCIONES

Todas las disoluciones acuosas se han preparado utilizando agua purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore).

a. Preparación de las disoluciones patrón de antibióticos

- *Disolución patrón de antibióticos 0.8 g L⁻¹*: Se disuelve la cantidad adecuada de la penicilina en 10 mL de agua pura conservándose a 4 °C durante menos de 15 días en frasco de color topacio. Las disoluciones de trabajo, de menor concentración, se preparan diariamente por dilución de la disolución patrón en el disolvente adecuado.

b. Disoluciones empleadas como fase móvil

Método con derivatización precolumna:

- *Fase móvil acetonitrilo – agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, TBA 20 mmol L⁻¹, tiosulfato 15 mmol L⁻¹) (63:37, v/v)*: Esta disolución se prepara de forma automática con la bomba

cuaternaria del HPLC que mezcla una disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.1 mol L^{-1} pH 5.2, que contiene TBA 0.020 mol L^{-1} y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.015 mol L^{-1} , con acetonitrilo en las proporciones indicadas.

- *Fase móvil acetonitrilo – agua (acetato 0.01 mol L^{-1} , pH 5.2, TBA 20 mmol L^{-1} , tiosulfato 15 mmol L^{-1}) (63:37, v/v):* Esta disolución se prepara de forma automática con la bomba cuaternaria del HPLC que mezcla la disolución reguladora $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ 0.1 mol L^{-1} pH 5.2, que contiene TBA 0.020 mol L^{-1} y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.015 mol L^{-1} , con acetonitrilo en las proporciones indicadas.

Método sin derivatización precolumna:

- *Fase móvil agua – TFA (0.01%):* se toman $100 \mu\text{L}$ de TFA y se llevan a 1 L con agua pura. Una vez preparada la disolución, se filtra y se conserva en una botella de color topacio.
- *Fase móvil acetonitrilo – TFA (0.01%):* se toman $50 \mu\text{L}$ de TFA y se llevan a 0.5 L con acetonitrilo. Una vez preparada, se filtra y se conserva en una botella de color topacio.

c. Disoluciones empleadas en SPE

Cartuchos Oasis MAX:

- *Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.05 mol L^{-1} , pH 7.5.*
- *Disolución $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.05 mol L^{-1} , pH 7.5, al 5% en MeOH.*
- *Disolución de TBA 0.05 mol L^{-1} en MeOH.*

Cartuchos Bond Elut C_{18} :

- *Disolución reguladora $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0.*
- *Disolución NaCl 2% (p/v).*
- *Metanol – agua ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0) (60:40, v/v).*

d. Disoluciones empleadas en la reacción de derivatización

- *Disolución de anhídrido benzoico, 0.2 mol L^{-1} .*
- *Disolución derivatizante 1,2,4-triazol 2 mol L^{-1} , HgCl_2 0.001 mol L^{-1} .*

e. Disoluciones empleadas en el tratamiento de muestra

- *Disolución* H_2SO_4 4.45 mol L⁻¹.
- *Disolución* Na_2WO_4 1 mol L⁻¹.
- *Disolución saturada* de NiSO_4 en H_2SO_4 4.45 mol L⁻¹.
- *Disolución reguladora* $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB) 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0.

f. Otras disoluciones

- *Disolución* NaOH 10 mol L⁻¹.
- *Disolución* HCl 1 mol L⁻¹.
- *Disolución* MeOH al 2% en ácido fórmico.

3.2. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

3.2.1. CROMATOGRAFÍA

Las medidas se han realizado en un **cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 LC (Agilent Technologies)** que se compone de:

- Sistema de bombeo cuaternario HP 1100, con bomba de doble pistón en serie que proporciona un caudal entre 0.2 – 10 mL min⁻¹.
- Detector de matriz de diodos (DAD) HP 1100, con lámpara de deuterio y wolframio (190 – 950 nm), rendija programable (1 – 16 nm) y célula de flujo de 10 mm de paso óptico y un volumen de 13 μL que permite una presión máxima 120 bar.
- Sistema de inyección automático termostatizado HP 1100, con un intervalo de volumen de inyección 0.1 – 100 μL y equipado con un muestreador con capacidad para 100 viales de 2 mL y control de temperatura desde 4 a 55 °C.
- Desgasificador HP 1100, con un caudal máximo 10 mL min⁻¹ por canal y volumen interno 12 mL por canal.
- Termostatizador de columna HP 1100, con intervalo de temperatura desde 10 °C por debajo de la temperatura ambiente hasta 80 °C (± 0.8 °C).

- *Columnas cromatográficas:*
 - Phenomenex LUNA[®] C₁₈ (2), 5 μ m, 4.6 \times 150 mm.
 - Agilent ZORBAX[®] Eclipse[™] XDB-C8, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm.
 - AQUA[™] C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm.
- *Precolumns:*
 - Compuesta por un soporte de cartucho y cartucho Eclipse[™] XDB-C8, 5 μ m, 4.6 \times 12.5 mm y un capilar de conexión a columna (Agilent).
 - Compuesta por un soporte de cartucho y cartucho RP18, 5 μ m, 4.0 \times 3 mm (Phenomenex).
- Ordenador provisto del programa *HP ChemStation Rev A.07.01 [682]* Copyright[®] Hewlett Packard Company que incluye la interfaz de usuario 'Method & Run Control' y el procesador de datos 'Data Analysis'.

3.2.2. ESPECTROFOTÓMETROS

- *Espectrofotómetro Varian modelo Cary-3 Bio* para la realización de espectros de absorbancia (UV-vis) conectado a un ordenador para la adquisición, tratamiento de datos y control del instrumento mediante el programa *Cary Win UV* (Varian, Palo Alto, EE.UU.).

3.2.3. EXTRACCIÓN PRESURIZADA CON DISOLVENTES (PLE)

El extractor de presurización con disolventes **ASE 200 (Dionex)**, está equipado con:

- Horno para células de extracción con asiento automático y control de temperatura hasta 200 °C.
- Controlador de mezcla y sistema de bombeo de disolventes con sensor de presión (presión máxima: 20 mPa, 3000 psi).
- Carrusel con capacidad para 24 células de acero (volúmenes 1, 5, 11, 22 y 30 mL) y 26 viales recolectores (volúmenes de 40 y 60 mL).

- El instrumento está conectado a un ordenador para la adquisición y tratamiento de datos empleando el software original AutoASE™ versión 2.2 (Sunnyvale, EE.UU).



Figura 110. (a) Sistema de extracción acelerada con disolventes ASE 200 (Dionex), (b) Cromatógrafo Agilent 1100 LC.

3.2.4. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

- Cámara de vacío (Varian) con 20 entradas.
- Bomba de membrana para vacío (P-selecta).
- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE):
 - *Cartuchos Oasis® MAX (Waters)*: que contiene un soporte polimérico de intercambio aniónico n-vinilpirrolidona y divinilbenceno), 500 mg, 6 mL.
 - *Cartuchos Bond Elut C₁₈ (Varian)*: que contiene un soporte de fase reversa (sílica hidrofóbica), 500 mg, 6mL.

3.2.5. OTROS INSTRUMENTOS Y MATERIALES

- Baño termostático Polyscience® 9015, con control digital de temperatura (± 0.5 °C).
- Bomba peristáltica de 4 canales (Gilson Miniplus 2).
- pH-metro Orion 710A/ISE dotado de un electrodo combinado de vidrio.

- Balanzas analíticas (Sartorius), con 0.1 mg de sensibilidad y Metter AT261 DeltaRange[®], con 0.01 mg de sensibilidad.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta).
- Filtrador de disolventes (Afora), utilizado para el filtrado de las disoluciones empleadas en la bomba de jeringa.
- Agitador magnético/termostatizador (Ikamag Ret).
- Agitador vortex, (Bio-vortex).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Micropipetas (Biohit) regulables de émbolo capilar de 50, 100, 200, 500 y 1000 μ L.
- Micropipetas electrónicas (Biohit) regulables de 1 y 8 canales de volumen variable.
- Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore.
- Filtros de PTFE, modelo Millex-FG (Millipore, 13 mm, tamaño de poro 0.20 μ m).
- Centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf AG).
- Tubos de centrifuga modelo Amicon[®] Ultra-15 PLCC (membrana de polietilsulfona 5000 Da, NMWL) (Millipore).
- Programa de tratamiento y procesado de datos *Sigma Plot 8.0*, SPSS (2002) y Microsoft Excel 2003.

3.3. PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA

3.3.1. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

3.3.1.1. MÉTODO CON DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

a. Derivatización de los antibióticos β -lactámicos

El proceso de derivatización de penicilinas que se ha llevado a cabo en este trabajo consta de los siguientes pasos:

A 1 mL de la disolución que contiene las penicilinas se le añade 17 μ L de NaOH, 2 mol L⁻¹, para alcanzar un pH básico entre 7.8 y 8.6. A continuación, se añaden 50 μ L de anhídrido benzoico, 0.2 mol L⁻¹, y se agita la mezcla durante 5 min a

50 °C, para que se complete la reacción de acilación de los grupos amino de las penicilinas dibásicas (AMOX, AMPI).

Seguidamente, se añade 1 mL del reactivo derivatizante 1,2,4-triazol y cloruro de mercurio (II) y la mezcla se agita, protegida de la luz, durante 30 min a 65 °C.

Finalmente, la mezcla de reacción se enfría rápidamente y se conserva a 4 °C hasta su utilización.

b. Análisis cromatográfico

En este paso se realiza la separación cromatográfica y cuantificación de las penicilinas previamente derivatizadas.

Con la ayuda de una jeringa de plástico acoplada a un filtro de disco 0.45 µm de poro, se introduce la disolución de penicilinas derivatizadas en un vial de 2 mL. A continuación, el vial se coloca en el compartimento para muestras del inyector automático a una temperatura de 10 °C.

La separación se realiza en modo isocrático mediante una columna ZORBAX® Eclipse™ XDB-C8 5 µm, 4.6 × 150 mm utilizando como fase móvil la mezcla binaria acético/acetato-acetonitrilo (63:37, v/v). La temperatura de la columna se mantiene constante a 20 °C, se inyecta un volumen de muestra de 100 µL y el caudal se fija a 1 mL min⁻¹.

La detección se efectúa a 325 nm para AMPI, AMOX, PENG y PENV, y a 345 nm para DICLOX, NAFCI y OXA.

La identificación se realiza por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos para los patrones correspondientes, inyectados individualmente, en las mismas condiciones cromatográficas.

3.3.1.2. MÉTODO SIN DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

En este paso se realiza la separación cromatográfica y cuantificación de las penicilinas sin derivatizar. Las muestras a analizar se introducen en viales de 2 mL, termostatizados a una temperatura de 10 °C. El volumen de inyección es de 200 μ L, y el caudal de la fase móvil se fija a 1.5 mL min⁻¹.

Para la determinación cromatográfica, se emplea una columna LUNA[®] C₁₈ (2) (150 × 4.6 mm, 5 μ m) protegida por una precolumna RP18 (4.0 x 3.0 mm, 5 μ m) ambas de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU).

La separación se lleva a cabo en modo gradiente, utilizando como fase móvil *agua-TFA (0.01%)* (**Fase A**) y *acetonitrilo-TFA (0.01%)* (**Fase B**). En la tabla 64, se muestra el programa de gradiente utilizado para la separación de las penicilinas estudiadas.

Tabla 64. Gradiente empleado en la determinación cromatográfica.

Tiempo, min	Fase A <i>agua-TFA (0.01%)</i>	Fase B <i>acetonitrilo-TFA (0.01%)</i>
0	100	0
3	100	0
8	63	37
19	63	37
24	33	67
29	33	67

La columna se mantiene termostatizada a una temperatura de 35 °C y la detección espectrofotométrica se efectúa a 220 nm. La rendija del fotomultiplicador se fija en 8 nm y el intervalo de cada cromatograma en 24 min.

La identificación se realiza por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos para los patrones correspondientes, inyectados en las mismas condiciones cromatográficas y la cuantificación se realiza mediante calibración externa midiendo el área de pico.

3.3.2. PRECONCENTRACIÓN SELECTIVA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

3.3.2.1. CARTUCHO OASIS MAX

Para la etapa de preconcentración y limpieza el cartucho de extracción en fase sólida se coloca en una entrada de la cámara de vacío y se sigue el protocolo descrito a continuación:

a. Activación y acondicionamiento del cartucho

Para llevar a cabo este proceso, se hacen pasar, por este orden y sucesivamente, 6 mL de metanol, 6 mL de agua milli-Q y 6 mL de disolución reguladora de fosfato (PB) 0.05 mol L^{-1} , pH 7.5.

b. Carga de muestra

Una vez acondicionado el cartucho se pasa a través de ellos la muestra que contiene los antibióticos a un pH de 7.5, a un caudal constante de, aproximadamente, 5 mL min^{-1} .

c. Lavado

Para eliminar las interferencias retenidas en el cartucho, se hacen pasar a través del mismo 6 mL de una disolución reguladora PB 0.05 mol L^{-1} al 5% en metanol y pH 7.5.

d. Elución

Los analitos se eluyen empleando $2 \times 1 \text{ mL}$ de disolución metanólica que contiene 0.05 mol L^{-1} de TBA.

El extracto se filtra utilizando una membrana de nylon de $0.22 \mu\text{m}$, se diluye (1:1) con agua milli-Q y se inyecta en el HPLC.

3.3.2.2. CARTUCHO BOND ELUT C_{18}

El procedimiento optimizado para la preconcentración de los antibióticos β -lactámicos consta de las siguientes etapas:

a. Activación y acondicionamiento del cartucho

Sobre el cartucho dispuesto en la cámara de vacío se hacen pasar, por este orden, 10 mL de metanol, 10 mL de agua milli-Q, 5 mL de NaCl 2% y 5 mL de una disolución de fosfato (PB) 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0.

b. Carga de muestra

En primer lugar se ajusta el pH de la muestra que contiene los analitos a 8.0 y se pasa por el cartucho a un caudal de 3 mL min⁻¹. A continuación se pasa aire durante 5 min.

c. Elución

Una vez que el cartucho de SPE está seco, se eluyen los antibióticos con 2 × 1 mL de una disolución metanol-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0) (60:40, v/v).

El extracto se filtra utilizando una membrana de nylon de 0.22 μ m, se diluye (1:1) con agua milli-Q y se inyecta en el cromatógrafo.

3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

3.4.1. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN AGUAS RESIDUALES

Las muestras de agua residual se recogieron en botellas topacio de 2.5 L a la entrada del primer asentamiento y en el efluente final de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) situada en Madrid. Las muestras de agua correspondientes a un vertido industrial se tomaron de forma análoga en una zona industrial de Madrid. Las muestras se almacenaron a -20 °C, tras medir los valores correspondientes de conductividad y pH.

Para el análisis cromatográfico, las muestras se filtraron empleando una membrana de PTFE, con un tamaño de poro de 0.45 μ m, para eliminar la materia suspendida que pudiera obturar el sistema y se ajustó el pH de las mismas a un valor de 7.5 u 8.0, dependiendo del cartucho empleado en el proceso de preconcentración.

Se prepararon tres calibrados independientes empleando 250 mL de cada matriz de agua residual que no contenían antibióticos. Seguidamente, se lleva a cabo el proceso de preconcentración y limpieza de cada muestra y con el extracto obtenido se construye un calibrado de cinco puntos en el intervalo de 75 – 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para los estudios de recuperación, las muestras de agua libres de antibióticos se enriquecieron con cantidades conocidas de las penicilinas estudiadas a dos niveles de concentración, 25 y 75 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A continuación, se realiza la preconcentración selectiva de los antibióticos empleando el procedimiento de SPE descrito en el apartado 3.3.2. de esta sección. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE

Se han ensayado diferentes procedimientos para la extracción de antibióticos β -lactámicos de muestras de leche. Todos ellos se caracterizan por una etapa previa de eliminación de la materia grasa, seguida de un tratamiento para la precipitación de las proteínas. La metodología aplicada se describe a continuación.

3.4.2.1. ELIMINACIÓN DE LA MATERIA GRASA

Se toman muestras de leche y se transfieren a varios tubos de propileno de 50 mL. A continuación se agitan en el vortex durante 1 min. Finalmente, se centrifugan a 13800 g (4 °C) durante 30 min. Una vez centrifugada la leche, se elimina la capa de nata formada y se recoge el sobrenadante, que será sometido a diferentes procesos de extracción.

Para los estudios de recuperación, las muestras de leche libre de antibióticos se enriquecieron con cantidades conocidas de los analitos estudiados a dos niveles de concentración, 30 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.2.2. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE LECHE PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

- Desproteínización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando ácido clorhídrico.

Se toman 250 g de leche y se elimina la grasa, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. A continuación se adicionan, cuidadosamente, sobre él unas gotas de HCl 1 mol L⁻¹ hasta alcanzar un pH de 4.6. De esta forma se consigue la precipitación de proteínas de la leche, caseína fundamentalmente (80%), cuyo punto isoeléctrico se corresponde con dicho valor de pH.

A continuación, la disolución se centrifuga a 13800 g (4 °C, 30 min), recogiendo de nuevo el sobrenadante que se basicifica con NH₄OH (c) hasta alcanzar un pH de 7.5. Se procede de nuevo a la centrifugación, en las condiciones anteriores, obteniéndose finalmente el suero de la leche que se purifica y preconcentra mediante extracción en fase sólida, utilizando cartuchos Oasis MAX (apartado 3.3.4.3.).

- Desproteínización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando wolframato sódico en medio ácido.

La utilización de sales inorgánicas (eg. wolframato sódico en medio ácido) para llevar a cabo la desproteínización de la leche es un procedimiento muy extendido para el análisis de antibióticos β -lactámicos en muestras de origen animal [68].

El proceso de desproteínización se lleva a cabo sobre el extracto de leche desnatada (ca. 250 mL), obtenido según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2.1. y utilizando como disolución extractante wolframato sódico y ácido sulfúrico. Para ello, se adicionan 4 mL de H₂SO₄ 4.45 mol L⁻¹ seguido de 19 mL de wolframato sódico dihidratado (Na₂WO₄·2H₂O) 1 mol L⁻¹. La mezcla se agita vigorosamente durante 1 min y se deja reposar durante 5 min. Seguidamente, se mide el pH de la disolución ajustándose a 4.4 – 4.6, si fuera necesario.

Una vez alcanzado este pH, se agita la leche en el vortex durante 1 min y se centrifuga a 13800 g (4 °C, 30 min), consiguiéndose la separación de la fase proteica del suero lácteo.

Finalmente, el pH del suero se ajusta a 7.5, se centrifuga y se preconcentra mediante SPE utilizando los cartucho Oasis MAX (apartado 3.3.2.1.).

- *Desproteización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando wolframato sódico y sulfato de níquel en medio ácido.*

Como ya indicamos en el apartado 1.1.1. de este capítulo, la interacción de las proteínas con ciertos metales puede provocar cambios conformacionales severos en las mismas [27].

En este caso, al extracto de leche desnatada (ca. 250 mL) se le adicionan 4 mL de una disolución de H_2SO_4 4.45 mol L^{-1} saturada con NiSO_4 , seguido de 19 mL de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L^{-1} . La mezcla se centrifuga a 13800 g (4 °C, 30 min), se recoge el sobrenadante y se eleva el pH hasta 7.5 volviéndose a centrifugar. Al igual que los procedimientos anteriores, el suero obtenido se purifica y preconcentra empleando los cartuchos Oasis MAX, siguiendo con el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.1.

- *Desproteización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando acetonitrilo.*

Se realiza una dilución 1:1 del extracto de leche desnatada (ca. 100 mL) con acetonitrilo puro. La mezcla se agita en el vortex durante 1 min y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifuga (13800 g, 4 °C, 30 min) y se recoge el sobrenadante que se preconcentra mediante extracción en fase sólida, utilizando cartuchos Oasis MAX.

En este método, a diferencia de los demás, el acondicionamiento de los cartuchos se realiza con metanol, agua milli-Q y acetonitrilo-agua (50:50, v/v).

- *Desproteización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando n-hexano.*

Para este tratamiento se parte de 50 g (50 mL) de leche entera y se elimina la grasa aplicando el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2.1.. A continuación, se

toma una alícuota del sobrenadante de 34 mL y se le adicionan 34 mL de una disolución reguladora de PB 0.1 mol L⁻¹ a pH 9.2.

Después de agitar en el vortex durante 1 min, se añaden 34 mL de n-hexano y la disolución resultante se agita mecánicamente durante 10 min a una temperatura de 9 – 10 °C. Se forman dos fases, la superior, que es la fase orgánica, se elimina por succión mientras que la inferior vuelve a centrifugarse en las mismas condiciones. Por último se recoge una alícuota de 40 mL y se hace pasar a través de los cartuchos de Oasis MAX para su limpieza y preconcentración.

- Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos mediante ultracentrifugación (UF).

Se toma una porción de 10 g (ca. 10 mL) de leche desnatada y se transfiere a un dispositivo Amicon Ultra-4® o Centricon Plus-20® que incorporan una membrana de ultracentrifugación de baja adsorción. La centrifugación se lleva a cabo, siguiendo las recomendaciones del fabricante, a 4000 g durante 60 min a 10 °C. Finalmente, el filtrado resultante, ca. 7 mL, se lleva a un volumen final de 10 mL empleando agua milli-Q e inyectando 200 μ L directamente en el HPLC.

3.4.2.3. PRECONCENTRACIÓN DE MUESTRA EMPLEANDO CARTUCHOS OASIS MAX

Como ya indicamos en el apartado 3.4.2.2., el extracto de suero de leche obtenido siguiendo los distintos procedimientos de extracción ensayados (excepto UF), se purifica y preconcentra mediante extracción en fase sólida según se describe en el apartado 3.3.2.1.

3.4.2.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Las condiciones cromatográficas para la determinación de las 8 penicilinas propuestas se describe en el apartado 3.3.1.2.

Para la preparación del calibrado se toman muestras de leche, libre de antibióticos, y se centrifugan durante 30 min a 13800 g y 4 °C para eliminar la materia grasa. Seguidamente, la porción de leche desnatada se desproteiniza y preconcentra

empleando los distintos procedimientos descritos en los apartados 3.4.2.2. y 3.4.2.3.. Con el extracto obtenido se construye el calibrado de cinco puntos en el intervalo de 75 – 5000 μg .

3.4.2.5. ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS DE LECHE

Se analizaron muestras de leche y muestras de leche enriquecidas con algunas penicilinas habitualmente utilizadas en zoonosis. Estas muestras fueron preparadas y proporcionadas por L. Villegas y M. Kortabitarte del Instituto Lactológico de Lekumberri (Navarra, España) siguiendo un procedimiento certificado en su laboratorio analítico. Dicho procedimiento se describe en el Capítulo V, apartado 3.5.2. de la Parte Experimental. Además, el mismo instituto nos facilitó una muestra de leche de un animal tratado con un medicamento cuyo principio activo era PENG. El tiempo de espera previo a la recogida de muestra fue de 96 h y se adicionó azidiol como conservante.

El proceso de extracción llevado a cabo se basa en el empleo de *wolframato sódico en medio ácido* para la desproteización de la leche. Para ello, se toman muestras de leche desnatada 75 g (75mL) a las que se adicionan 1.2 mL de H_2SO_4 4.45 mol L^{-1} seguido de 5.7 mL de wolframato sódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 mol L^{-1} . La mezcla se agita vigorosamente durante 1 min y se deja reposar durante 5 min. Seguidamente, se mide el pH de la disolución ajustándose a 4.4 – 4.6, si fuera necesario. Una vez alcanzado este pH, se agita la leche en el vortex durante 1 min y se centrifuga a 13800 g (4 °C, 30 min), consiguiéndose la separación de la fase proteica del suero lácteo. Finalmente, el pH del suero se ajusta a 7.5, se centrifuga y se preconcentra mediante SPE en un cartucho Oasis MAX

3.4.3. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS DE PIENSO

Los antibióticos (AMOX y PENV) se extraen de las muestras de pienso empleando extracción presurizada con disolventes (PLE). Con este fin, se pesan 5 g de pienso de cerdos (cedido por Nutral S.A.), previamente tamizado y desecado, y se

introducen en una célula de extracción de 11 mL que contiene un filtro de celulosa. Las muestras se extraen empleando las condiciones que se indican en la tabla 65.

Tabla 65. Condiciones empleadas en la extracción acelerada con disolventes para las muestras de pienso.

Parámetro	Variable optimizada	
Disolvente de extracción	AMOX	acetoniitrilo-agua (25:75, v/v)
	PENV	acetoniitrilo-agua (50:50, v/v)
Presión	1500 psi	
Temperatura	50 °C	
Tiempo de precalentamiento	5 min	
Tiempo de calentamiento	5 min	
Volumen de "flush"	60%	
Tiempo de purga	1	
Número de ciclos	1	
Volumen de la célula	11 mL	
Tiempo total de extracción	13 min*	
Volumen de disolvente	16 mL*	

*Por muestra.

El extracto obtenido se enrasa a un volumen final de 20 mL, se filtra por una membrana de 0.25 μm y se inyecta en el cromatógrafo.

Los calibrados se preparan utilizando un extracto del pienso libre de penicilinas, obtenido mediante la técnica PLE, en el intervalo de 25 a 250 mg L^{-1} (100 a 1000 mg kg^{-1}).

Para los estudios de recuperación las muestras de pienso libre de antibiótico se enriquecen con cantidades conocidas de AMOX o PENV a dos niveles de concentración (200 y 500 mg kg^{-1}) determinándose las recuperaciones obtenidas para cada matriz y analito ensayado a partir del calibrado.

4.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EMPLEANDO DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

4.1.1. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA

La elección de un método cromatográfico con derivatización precolumna para la determinación de antibióticos β -lactámicos se basa, fundamentalmente, en dos motivos:

- La tendencia de estas moléculas a degradarse en disolución, debido a la inestabilidad del anillo β -lactámico en medios ácidos y básicos.
- La baja selectividad y sensibilidad del detector UV-VIS para estos analitos en matrices complejas. Para obtener la máxima sensibilidad, su detección mediante absorbancia UV, debe realizarse a longitudes de onda por debajo de los 280 nm lo que supone una menor selectividad debido a las elevadas interferencias, normalmente, de origen biológico que origina la matriz.

La aplicación de una reacción de derivatización precolumna, basada en la formación de mercaptocomplejos de mercurio de los antibióticos β -lactámicos, permite minimizar estos problemas.

En la figura 111 se muestra un esquema de la reacción de derivatización precolumna empleada, propuesta por Bundgaard y col. [75], para la determinación de 9 penicilinas.

La primera etapa de la reacción de derivatización, implica un paso de benzoilación de las penicilinas dibásicas o anfóteras. El anhídrido benzoico protege el grupo amino de la cadena lateral de la ampicilina y amoxicilina para formar el ácido *N*-benzoilampicilínico y *N*-benzoilamoxicilínico, respectivamente.

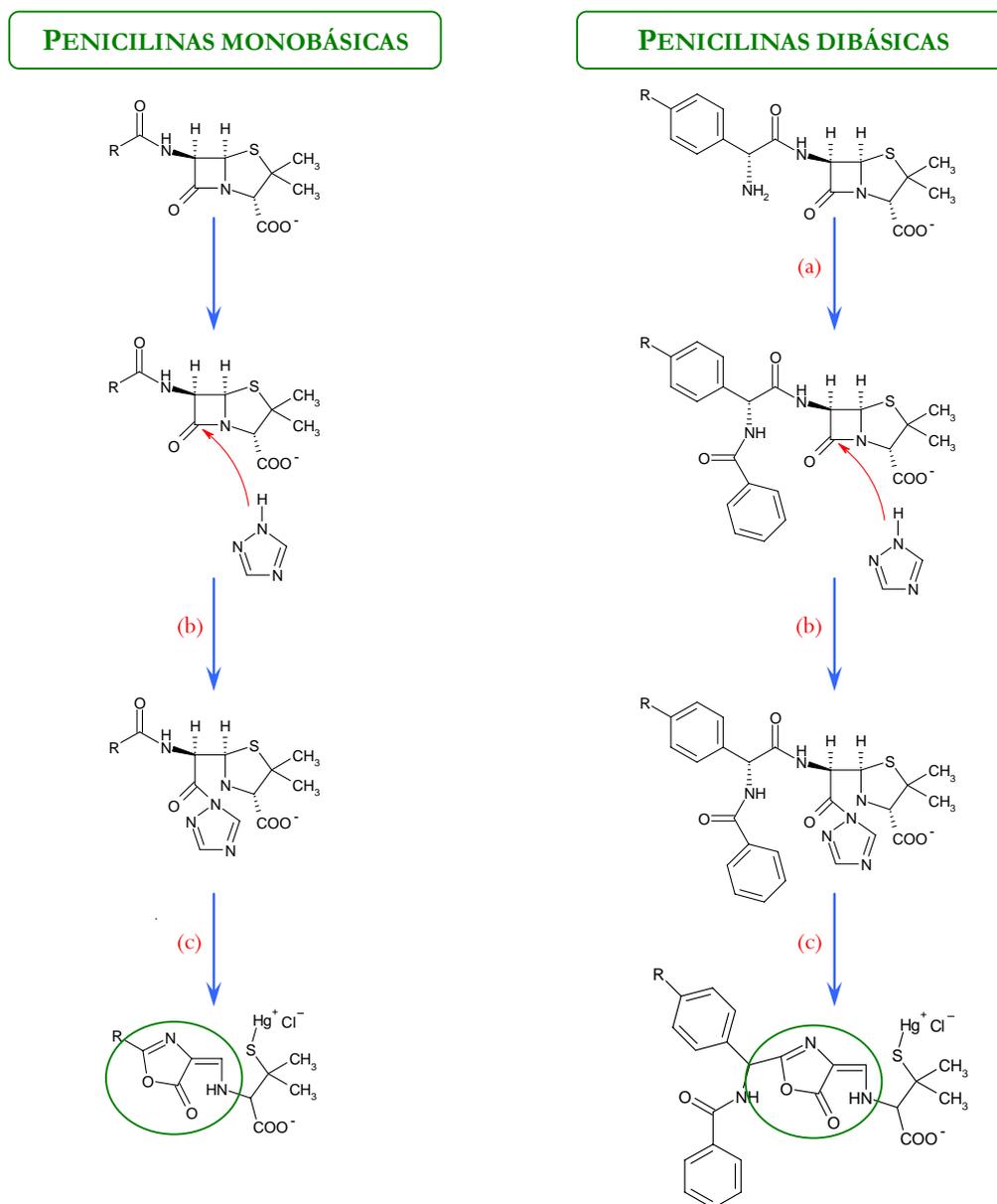


Figura 111. Derivatización de las penicilinas: (a) Reacción de benzoilación del grupo amino de la cadena lateral, pH 8 (R=H: Ampicilina; R=OH: Amoxicilina); (b) Apertura del anillo β -lactámico catalizada por 1,2,4-triazol, pH 9; (c) Formación del complejo ácido mercaptopenicilénico de mercurio (II). \bigcirc Cromóforo responsable de la absorción UV $\lambda_{m\acute{a}x}$: 325, 345 nm.

A continuación, se lleva a cabo la reacción de las penicilinas, tanto dibásicas como monobásicas, con el reactivo 1,2,4-triazol y cloruro de mercurio (II). En este paso se produce la apertura del anillo β -lactámico, debido al ataque nucleófilo del 1,2,4-triazol catalizado por el mismo.

Los productos intermedios formados reaccionan después con el cloruro de mercurio (II) dando lugar a ácidos mercaptopenicilénicos de mercurio (II), complejos con máximos de absorbancia, en la región del UV, alrededor de los 325 y 345 nm, para todas las penicilinas estudiadas.

Cabe destacar que, la primera etapa de benzoilación es totalmente imprescindible ya que la reacción directa de la ampicilina y la amoxicilina con 1,2,4-triazol origina un producto inestable, a causa de la competición por el cloruro mercúrico disponible entre su grupo tiol y amino libre.

En ésta derivatización existe la posibilidad de utilizar anhídrido acético para proteger el grupo amino de las penicilinas dibásicas. Sin embargo, los productos formados tienen características de elución significativamente diferentes a las de los derivados de las penicilinas monobásicas.

4.1.1.1. ENSAYOS PREVIOS

Para llevar a cabo el proceso de derivatización se empleó, inicialmente, el protocolo aplicado por el laboratorio de referencia de Fougères (Francia) para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

En los primeros ensayos realizados, se descubrió que era necesario el uso de **agitación mecánica uniforme** durante todo el proceso de derivatización.

Se investigó el efecto del **tiempo de incubación** con el reactivo derivatizante, 1,2,4-triazol y cloruro de mercurio (II), en el rendimiento de la reacción de derivatización. El empleo de periodos de incubación de 10 min no permitía la formación de los derivados mercaptopenicilénicos correspondientes, ya que no se observa la aparición de picos cromatográficos para ninguno de los residuos penicilínicos estudiados. Transcurridos 20 min no hay evidencia de la existencia de

picos para la ampicilina y amoxicilina, aunque sí para las 5 penicilinas restantes. A partir de 30 min, aparecen los picos cromatográficos correspondientes a las 7 penicilinas ensayadas, manteniéndose estable el producto de la derivatización hasta un tiempo de 40 min. Por todo ello, se seleccionó un tiempo óptimo de incubación con el 1,2,4-triazol y cloruro de mercurio (II) de 30 min, para así alcanzar la máxima sensibilidad sin extender demasiado el tiempo de análisis.

Tras la realización de estos estudios previos, se procedió a estudiar algunas variables determinantes del proceso de derivatización como son: condiciones del medio de reacción, temperatura de derivatización y concentración de cloruro de mercurio (II).

- **Medio de reacción**

La reacción de derivatización precolumna de las penicilinas con cloruro de mercurio (II) permite obtener una respuesta cromatográfica óptima cuando se lleva a cabo en medio acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L⁻¹) (40:60, v/v) a pH básico.

Un aumento de la proporción de acetonitrilo en el medio de reacción, daba lugar una disminución en la sensibilidad para la determinación del analito, originando la aparición de amplias colas y picos divididos. De hecho, el empleo de acetonitrilo al 100% originaba la supresión de la reacción entre los antibióticos β -lactámicos y el cloruro de mercurio (II), al igual que sucede si se emplea agua al 100%.

Finalmente, se estudió el efecto del pH del medio en el rendimiento de la reacción de derivatización. Las penicilinas usadas, a parte de reaccionar para dar el correspondiente mercapturo de mercurio, se degradan en medios fuertemente ácidos o básicos como consecuencia de la hidrólisis del anillo nucleófilo β -lactámico [72]. Se empleó por ello NaOH 2 mol L⁻¹ ya que cuando se ensayaron concentraciones superiores (5 mol L⁻¹) no aparecían los picos cromatográficos correspondientes a los derivados formados, lo cual podría explicarse teniendo en cuenta su posible degradación en este medio.

- **Efecto de la concentración de cloruro de mercurio (II)**

Se ha observado que no hay diferencias apreciables en el área de los picos cromatográficos obtenidos cuando se utilizan concentraciones: 0.5 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹ y 10 mmol L⁻¹ de HgCl₂ en la reacción de derivatización. Finalmente, la concentración elegida fue de 1 mmol L⁻¹.

- **Efecto de la variación de la temperatura de derivatización**

La variación de la temperatura de reacción tiene un efecto crítico en la formación de los mercaptoderivados.

De las tres temperaturas ensayadas durante el proceso de derivatización, 55, 65 y 75 °C, la que mayor rendimiento produjo fue la de **65 °C** dado que, a 55 °C la reacción transcurre de forma más lenta y a 75 °C favorece la hidrólisis de los antibióticos [73].

4.1.1.2. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS DERIVADOS β -LACTÁMICOS

Con el objeto de observar las diferencias espectrales entre los antibióticos β -lactámicos y sus derivados obtenidos tras la reacción con 1,2,4-triazol y cloruro de mercurio (II), se han registrado los espectros de absorción para estas especies, obteniéndose los resultados que se muestran en las figuras 112A y 112B.

En todos los casos puede apreciarse la aparición de una banda en la región UV debida a la absorción del anillo penicilénico conjugado de los derivados. Los máximos se encuentran situados alrededor de 325 nm para AMOX, AMPI, PENG, PENV y próximos a 345 nm para OXA, DICLOX y NAFCI. El desplazamiento batocrómico que presenta el máximo de longitud de onda de absorción para OXA, DICLOX y NAFCI es debido a la mayor conjugación de los enlaces de sus derivados.

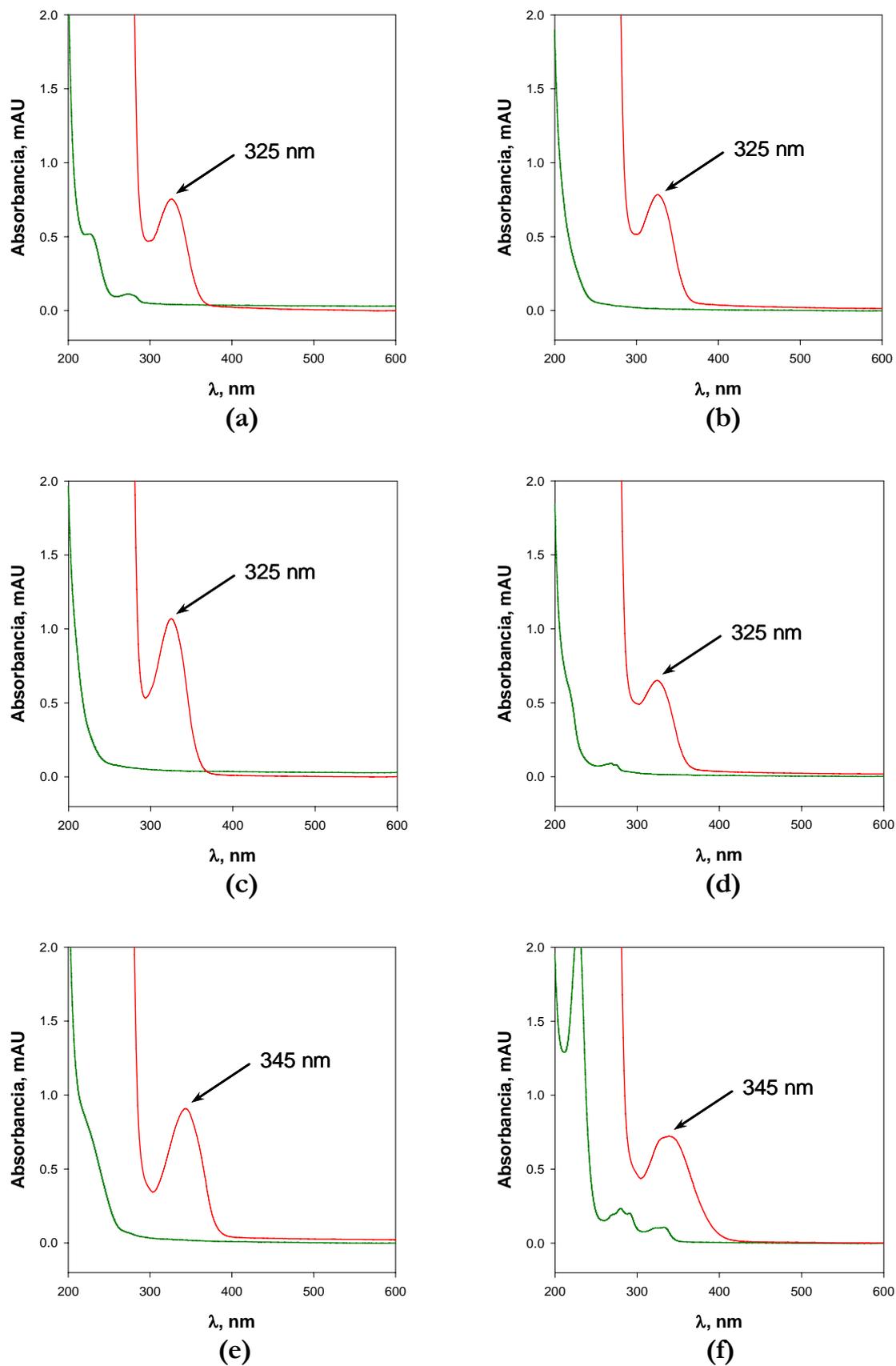


Figura 112A. Espectros de absorción UV-VIS antes (→) y después (→) de derivatizar: (a) AMOX; (b) AMPI; (c) PENG, (d) PENV; (e) OXAC; (f) NAFCL. Registrados en: acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L⁻¹) (40:60, v/v), temperatura 10.0±0.2 °C.

4.1.1.3. ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Para comprobar la estabilidad de los derivados mercapto mercúricos de los ácidos acetilpenicilénicos, se realizó un estudio evaluando la reproducibilidad y repetibilidad del área de los picos cromatográficos obtenidos, en función del tiempo transcurrido tras la reacción de derivatización.

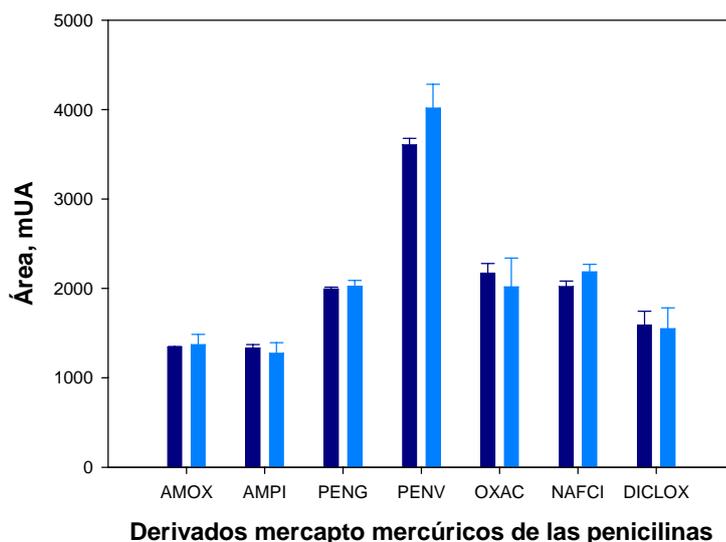


Figura 114. Estudio de estabilidad de los derivados mercapto mercúricos de los ácidos acetilpenicilénicos realizado en un mismo día (■) y a lo largo de varios días (■) ($n = 3$).

Los valores experimentales del parámetro estadístico t , a un nivel de probabilidad del 95%, calculado a partir de las medias, y las desviaciones estándar de cada área correspondiente a cada una de las 7 penicilinas medidas dentro de un mismo día y a lo largo de varios días, son menores que el tabulado para el mismo nivel de significación ($t_{\text{tab}} (\text{AMOX, PENG, PENV, AMPI}) = 2.228$, $\nu = 10$ y $t_{\text{tab}} (\text{OXAC, NAFCI, DICLOXAC}) = 2.228$, $\nu = 9$), para todas las penicilinas excepto para PENV y NAFCI.

Estos resultados demuestran que algunos de los derivados de los antibióticos en estudio (PENV y NAFCI) **no presentan la estabilidad necesaria** para ser medidos empleando tiempos de análisis superiores a 24 h.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

4.1.2.1. ENSAYOS PREVIOS

Los antibióticos β -lactámicos a estudiar, poseen naturaleza iónica, lo que hace que su separación en fase inversa sea algo diferente a la de los analitos de carácter neutro ya que obliga a la utilización de fases móviles que contengan disoluciones reguladoras.

Teniendo en cuenta este aspecto, la disolución reguladora seleccionada para un primer estudio fue, tampón fosfato 0.1 mol L^{-1} , pH 5.5, ya que ésta era la empleada por el laboratorio de referencia de Fougères (Francia) [63].

La columna seleccionada, una Zorbax Eclipse XDB-C8 para HPLC de fase inversa con fase de dimetilalquilo doblemente desactivada, proporcionó en el test de evaluación 10544 platos teóricos para tolueno, trabajando a 0.97 mL min^{-1} con fase móvil metanol-agua (80:20, v/v).

Seguidamente se procedió a ajustar el poder de elución de la fase móvil para encontrar una composición de modificador orgánico-disolución reguladora, en el que todos los antibióticos se eluyeran en un intervalo de retenciones razonable, con una resolución óptima.

El estudio se llevó a cabo trabajando en modo isocrático y las tres fases móviles ensayadas fueron:

- Fase móvil acetonitrilo-metanol-agua (PB 0.1 mol L^{-1} , pH 5.5) (30:5:65, v/v/v).
- Fase móvil acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L^{-1} , pH 5.5) (35:65, v/v).
- Fase móvil acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L^{-1} , pH 5.5) (37:63, v/v).

En la tabla 66 se recogen los tiempos de retención (t_r) y resolución (R_s) obtenida para cuatro de las ocho penicilinas ensayadas (AMOX, AMPI, PENG y PENV) empleando los distintos modificadores orgánicos ensayados.

Tabla 66. Variación de los tiempos de retención y resolución de los picos cromatográficos obtenidos para AMOX, PENG, PENV y AMPI en función del modificador orgánico.

Antibiótico	Fase móvil acetonitrilo-metanol-agua (PB 0.1 mol L ⁻¹ , pH 5.5) (30:5:65, v/v/v)*		Fase móvil acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L ⁻¹ , pH 5.5) (35:65, v/v)*		Fase móvil acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L ⁻¹ , pH 5.5) (37:63, v/v)*	
	t _r	R _s ¹	t _r	R _s	t _r	R _s
AMOX	12.8	6.55	6.69	3.87	5.71	6.40
PENG	20.7		9.67		8.11	
PENV	26.5	3.53	11.9	2.61	9.77	3.50
AMPI	35.8	4.34	15.1	2.92	11.9	3.81

*Las tres fases móviles ensayadas contienen TBA 20 mmol L⁻¹ y Na₂S₂O₃ 15 mmol L⁻¹.

Como se puede observar, en todos los casos se obtuvo una buena separación de los picos aunque cuando se emplea una mezcla ternaria el tiempo de análisis se incrementa de forma considerable, sin que por ello se obtenga una mejor resolución (R_s).

El empleo de mezclas binarias acetonitrilo-fosfato, originaba una retención menor de los derivados penicilínicos que cuando se utilizaba la mezcla acetonitrilo-metanol-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 5.5) (30:5:65, v/v/v). Esto puede atribuirse al mayor poder de elución del acetonitrilo frente al metanol. Se ensayaron dos fases con 35% y 37% de acetonitrilo, observándose que la utilización de la mezcla acetonitrilo-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 5.5) (37:63, v/v) permitía reducir el tiempo de análisis sin que la columna pierda la resolución a línea base para la mezcla de antibióticos estudiados.

Por último, señalar que, aunque el metanol sea más recomendable como modificador orgánico que el acetonitrilo (el metanol y el agua son más miscibles y la mayoría de los tampones son más solubles en mezclas metanol-agua) [74], su uso en este caso no es adecuado ya que favorece la degradación de los derivados penicilínicos [75].

¹ R_s, Resolución calculada tomando anchura de banda a media altura (1/2) mediante $R_s = \frac{2.35}{2} \frac{t_r^b - t_r^a}{w_{1/2}^a + w_{1/2}^b}$

4.1.2.2. NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA

Dado que la columna analítica contiene una fase estacionaria n-octil-sílice, el pH de trabajo deberá estar comprendido entre 2 y 8 para asegurar la estabilidad de la misma. Otros factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar un tampón para su empleo en la fase móvil son: su absorbancia UV, que debe ser nula a la longitud de onda de trabajo, su solubilidad, estabilidad, posible interacción con el equipo, con la muestra, volatilidad, etc. [74].

De las posibles disoluciones reguladoras que se pueden usar, se eligieron para el estudio el **tampón fosfato** ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (PB), con máxima capacidad tamponadora $2.1 < \text{pH} < 3.1$ y $6.2 < \text{pH} < 8.2$) y el **tampón acetato** ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$, con máxima capacidad tamponadora $3.8 < \text{pH} < 5.8$).

Tabla 67. Variación de los tiempos de retención y resolución de los picos cromatográficos obtenidos para AMOX, PENG, PENV, AMPI, OXA, NAFCI y DICLOX en función del modificador orgánico empleado en la fase móvil.

Antibiótico	Fase móvil acetonitrilo-agua (PB 0.05 mol L ⁻¹ , pH 5.2) (37:63, v/v)*		Fase móvil acetonitrilo-agua (t. acetato 0.05 mol L ⁻¹ , pH 5.2) (37:63, v/v)*		
	t _r	R _s	t _r	R _s	
AMOX	5.93	3.95	5.78	3.92	
PENG	8.63		8.22		
PENV	10.5		10.1		
AMPI	13.0		12.6		
OXA	16.6		15.8		
NAFCI	18.7		18.5		
DICLOX	33.7		1.75		2.40
			1.88		2.56
		2.40	2.91		
		1.16	2.24		
		5.62	8.45		
		32.5			

*Las tres fases móviles ensayadas contienen TBA 20 mmol L⁻¹ y Na₂S₂O₃ 15 mmol L⁻¹.

Además, tanto la fase móvil regulada por el tampón fosfato, como la regulada por el acetato, contenían **tiosulfato sódico** ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 15 mmol L⁻¹ con el objeto de estabilizar los antibióticos derivatizados y aumentar la fuerza iónica del medio. Se ha demostrado que cuando la fuerza iónica de la fase móvil es elevada, las interacciones silanofílicas se anulan favoreciendo las interacciones hidrofóbicas de los

analitos con el soporte de fase reversa [76]. La ausencia de este reactivo en la fase móvil origina la aparición de picos ensanchados, tiempos de retención no reproducibles así como intervalos lineales de trabajo muy estrechos [77]. En la tabla 67 se recogen los tiempos de retención y la resolución de las 7 penicilinas estudiadas en las concentraciones del ensayo. A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el cambio de naturaleza de la disolución reguladora no afecta en exceso a los tiempos de retención, aunque sí se aprecia una cierta mejora de la resolución entre OXA y NAFCI en medio acetato.

• **Concentración de la disolución reguladora**

Se estudió el efecto de la concentración de tampón en la retención de los derivados penicilínicos en la columna cromatográfica. Para ello, se realizaron análisis utilizando 0.1 y 0.05 mol L⁻¹ de tampón fosfato (pH 5.2) y acetato (pH 5.2) con 20 mmol L⁻¹ de TBA y 15 mmol L⁻¹ de tiosulfato sódico con un 37% de modificador orgánico. No se ensayaron concentraciones superiores a 0.1 mol L⁻¹ debido a la posibilidad de precipitación de las sales presentes al mezclarse con el modificador orgánico. En la tabla 68 se recogen los valores de tiempo de retención y resolución para las penicilinas determinadas en estas condiciones.

Tabla 68. Variación de los tiempos de retención y resolución de los picos cromatográficos obtenidos para AMOX, PENG, PENV, AMPI, OXA, NAFCI y DICLOX penicilinas en función de la concentración de la disolución reguladora: tampón fosfato (n = 6), tampón acetato (n = 5).

Antibiótico	Tampón fosfato*				Tampón acetato*			
	0.05 mol L ⁻¹		0.1 mol L ⁻¹		0.05 mol L ⁻¹		0.1 mol L ⁻¹	
	t _r	R _s	t _r	R _s	t _r	R _s	t _r	R _s
AMOX	5.5 ± 0.5	2.6	5.5 ± 0.1	2.8	7 ± 1	4	4.7 ± 0.1	2.3
PENG	7.9 ± 0.8		8.0 ± 0.1		11 ± 2		6.5 ± 0.3	
PENV	10 ± 1	2	9.7 ± 0.2	1.4	14 ± 3	3	7.9 ± 0.5	1.2
AMPI	12 ± 2		11.8 ± 0.3		17 ± 3		9.6 ± 0.1	
OXA	17 ± 2	3	15.1 ± 0.8	2.1	21 ± 4	3	11.9 ± 0.7	1.3
NAFCI	19 ± 3		16.7 ± 0.4		24 ± 5		13.6 ± 0.8	
DICLOX	34 ± 2	5	29.9 ± 0.2	4.5	36 ± 3	6	22.9 ± 0.1	3.1

*Las dos fases móviles ensayadas contienen TBA 20 mmol L⁻¹ y Na₂S₂O₃ 15 mmol L⁻¹.

A la vista de los resultados, la disolución reguladora más recomendable para la preparación de la fase móvil es el **tampón acetato 0.1 mol L⁻¹**, pues facilita una mejor resolución entre los picos correspondientes a OXA y NAFCI y un menor tiempo de análisis ($t_{\text{cromatograma}} < 24 \text{ min}$).

4.1.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA FASE MÓVIL

El pH afecta notablemente a la retención de los antibióticos en la columna cromatográfica ya que determina su grado de ionización dada la naturaleza iónica de los derivados penicilínicos analizados.

El conocimiento de los valores de pK_a de los derivados penicilínicos resulta muy útil y guía en la selección del pH de la disolución reguladora. Cuando el pH de una disolución está muy cerca de los valores de pK_a de uno o más componentes de la muestra, pequeñas variaciones en el pH (inferiores a 0.1 unidades) pueden influir notablemente en los tiempos de retención y resolución de los picos cromatográficos, lo que conduce a la obtención de métodos poco robustos. Por tanto, el pH óptimo será aquel que asegura que los grupos funcionales de un analito se encuentren en una sola forma, ionizada o no ionizada. Si no se conocen las constantes de acidez, como sucede en el caso de los derivados estudiados, se pueden aproximar a las correspondientes estructuras relacionadas, como son las penicilinas. Los pK_a para los antibióticos β -lactámicos, estudiados en esta Memoria, se recogen en la bibliografía [76,78] y se presentan en la tabla 69.

Tabla 69. Constantes de acidez de los antibióticos β -lactámicos estudiados [76,78].

Antibiótico	pK_a		
AMOX	2.8	7.2*	9.6
AMPI	2.7	7.3*	-
PENG	2.8	-	-
PENV	2.7	-	-
OXA	2.7	-	-
CLOX	2.7	-	-
NAFCI	2.7	-	-
DICLOX	2.7	-	-

* En los derivados penicilínicos este pK_a no existe al estar protegido el grupo amino por el anhídrido benzóico.

La variación de los tiempos de retención de los derivados de las penicilinas monobásicas y dibásicas con el pH es significativa. Se ha demostrado que a pH inferiores a 3.5, los t_r son independientes del pH; sin embargo, a pH 4.5, se produce una drástica disminución de la retención, debida a la disociación del grupo carboxílico de los correspondientes derivados penicilínicos.

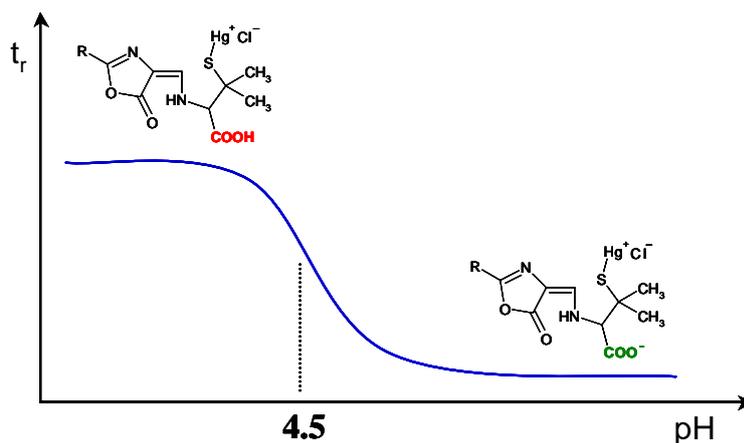


Figura 115. Influencia del pH en los tiempos de retención de los derivados penicilínicos. Condiciones: Columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 20 °C, caudal 1 mL min⁻¹, $\lambda_{\text{máx}}$ 325 nm, acetonitrilo - agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, (37:63, v/v).

Debido a la necesidad de trabajar a pH intermedios y teniendo en cuenta el comportamiento de los derivados penicilínicos a estos pH, se hace imprescindible el uso de un reactivo de asociación iónica que aumente la retención de estos compuestos, al formarse un par iónico entre el grupo carboxílico libre del derivado y el par iónico básico. El compuesto de asociación que se ha utilizado en este trabajo es el **ácido hidrógenosulfato de tetra-n-butilamonio (TBA)**.

La interacción de los derivados penicilínicos con la fase reversa en presencia de TBA puede justificarse considerando dos mecanismos de retención (figura 116):

- (a) Interacción del par iónico del derivado penicilínico con la fase reversa C₈.
- (b) Interacción mediante intercambio iónico del resto catiónico del TBA, adsorbido a la columna C₈, con el grupo carboxílico libre de los derivados penicilínicos.

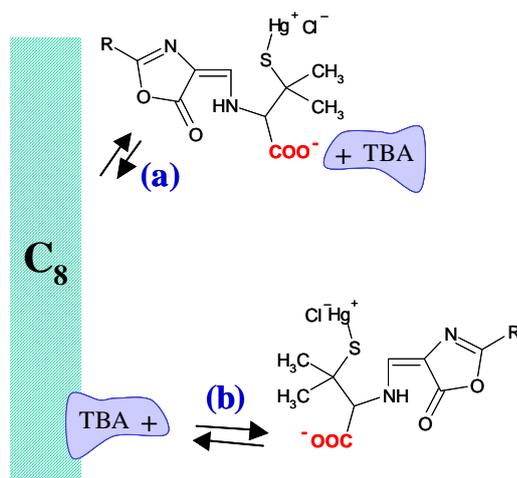


Figura 116. Influencia de la presencia de TBA en la separación cromatográfica de derivados penicilínicos.

Para el estudio de la **influencia del pH de la fase móvil** en la retención de los derivados penicilínicos, se utilizó una fase móvil de composición acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L^{-1} , TBA 20 mmol L^{-1} , tiosulfato 15 mmol L^{-1}) (37:63, v/v) en el intervalo de pH 4.8 - 5.5.

Los resultados obtenidos se presentan en figura 117.

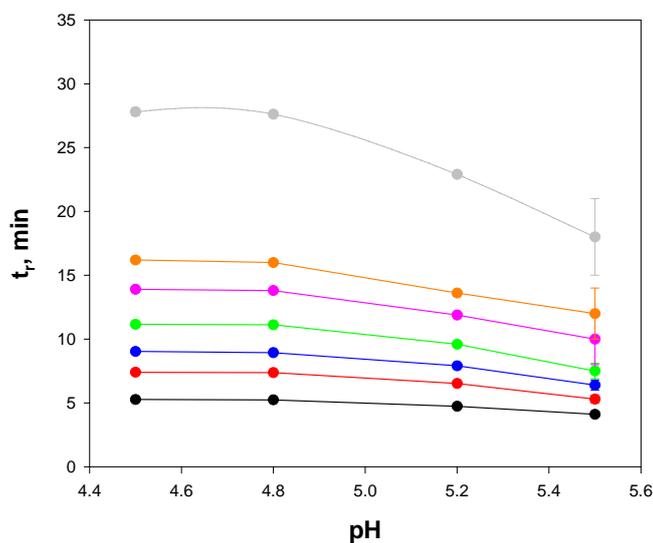


Figura 117. Variación del pH de la disolución reguladora para: ● AMOX, ● PENG, ● PENV, ● AMPI, ● OXA, ● NAFCl, ● DICLOX. Condiciones: Columna Zorbax Eclipse XDB-C8, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, caudal 1 mL min^{-1} , $\lambda_{\text{máx}}$ 325, 345 nm, acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L^{-1} , TBA 20 mmol L^{-1} , tiosulfato 15 mmol L^{-1}) (37:63, v/v).

Finalmente, teniendo en cuenta los datos obtenidos y habiendo considerado al tampón acetato como la mejor disolución reguladora, se ha seleccionado como pH óptimo 5.2, por obtenerse un tiempo de análisis inferior a 25 min, con una resolución entre picos adecuada.

- **Efecto de la concentración de TBA en la retención de los derivados penicilínicos**

Se ha estudiado la dependencia de los tiempos de retención de los derivados penicilínicos con la concentración de TBA en el intervalo 0 – 30 mmol L⁻¹, usando como fase móvil acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, tiosulfato 15 mmol L⁻¹) (37:63, v/v).

Los cambios en los valores de t_r en función del agente de asociación iónica se muestran en la figura 118.

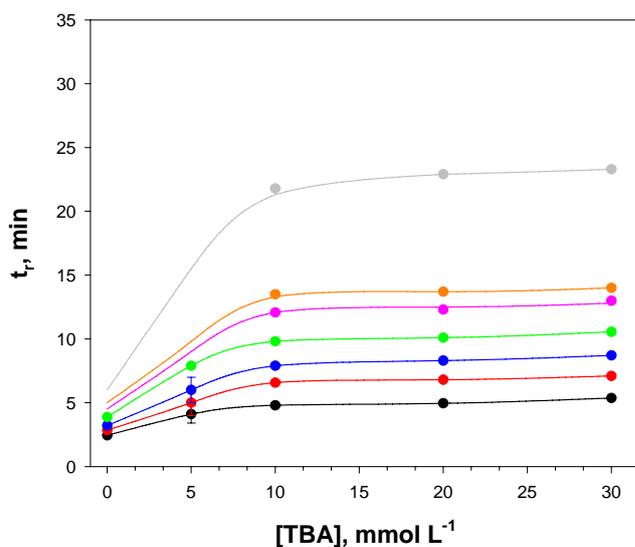


Figura 118. Variación de la concentración de TBA en la disolución reguladora para: ● AMOX, ● PENG, ● PENV, ● AMPI, ● OXA, ● NAFCl, ● DICLOX. Condiciones: Columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 20 °C, caudal 1 mL min⁻¹, $\lambda_{m\acute{a}x}$ 325, 345 nm, acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, tiosulfato 15 mmol L⁻¹)(37:63, v/v).

Como se puede observar, la variación de la concentración de TBA influye significativamente en la retención de los derivados penicilínicos estudiados. A pH 5.2, estas especies se encuentran completamente ionizadas y se retienen mayoritariamente en forma de pares iónicos, al asociarse al catión TBA⁺, mediante los mecanismos

anteriormente descritos. El incremento en la concentración de TBA, conduce a un incremento no lineal de los tiempos de retención, mejorando también su selectividad.

A la vista de los resultados obtenidos, elegimos como concentración óptima de TBA 20 mmol L⁻¹.

4.1.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA

La dependencia de los tiempos de retención con la temperatura de la columna se ha evaluado en el intervalo de temperatura 15 – 30 °C, usando como fase móvil acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, TBA 20 mmol L⁻¹ y tiosulfato sódico 15 mmol L⁻¹) (37:63, v/v).

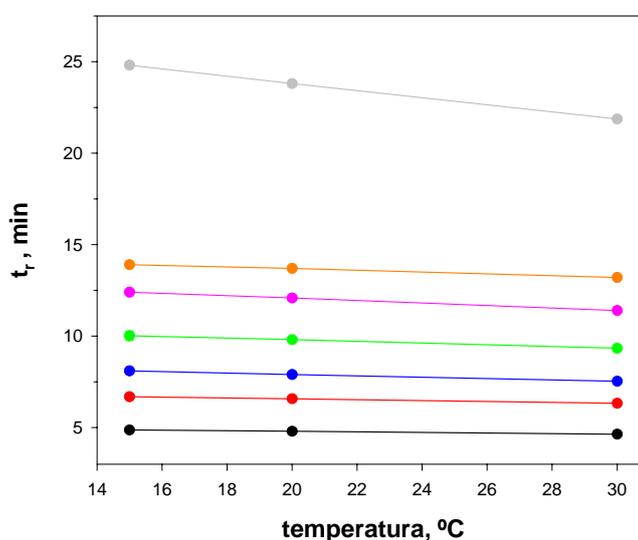


Figura 119. Variación de los tiempos de retención con la temperatura de la columna para: ● AMOX, ● PENG, ● PENV, ● AMPI, ● OXA, ● NAFCI, ● DICLOX. Condiciones: Columna Zorbax Eclipse XDB-C8, acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, TBA 20 mmol L⁻¹, tiosulfato sódico 15 mmol L⁻¹) (37:63, v/v), caudal 1 mL min⁻¹, $\lambda_{m\acute{a}x}$ 325, 345 nm.

Los resultados muestran que la retención de los derivados penicilínicos cambia ligeramente con la temperatura siendo la retención menor a 30 °C. Esta variación puede atribuirse a la influencia de la temperatura sobre los mecanismos de retención de éstos compuestos de naturaleza iónica. Cada uno de estos procesos va a responder de manera distinta a los cambios de temperatura (e.g. cambios en las interacciones

hidrofóbicas con la columna, cambio en la ionización de los componentes de la muestra, cambios del pH y pK_a , etc.).

Finalmente, se ha escogido una **temperatura de 20 °C** como compromiso entre el tiempo necesario para desarrollar el cromatograma y una resolución aceptable.

En la figura 120 se presenta un cromatograma obtenido para los siete mercaptoderivados de las penicilinas estudiadas en las **condiciones óptimas** del método cromatográfico evaluado.

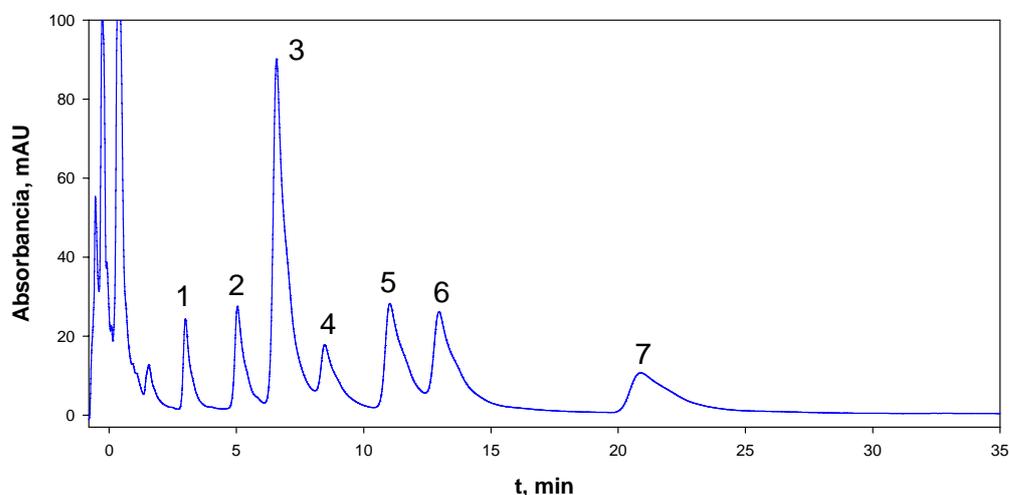


Figura 120. Cromatograma obtenido para los siete derivados de penicilinas estudiadas: (1) AMOX, (2) PENG, (3) PENV, (4) AMPI, (5) OXA, (6) NAFCI, (7) DICLOX. Condiciones: Columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 20 °C, caudal 1 mL min⁻¹, $\lambda_{m\acute{a}x}$ 325, 345 nm, acetonitrilo-agua (t. acetato 0.1 mol L⁻¹, pH 5.2, TBA 20 mmol L⁻¹ tiosulfato 15 mmol L⁻¹) (37:63, v/v).

4.1.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO

4.1.3.1. CALIBRADO

El calibrado se ha realizado a partir de las disoluciones madre de los antibióticos con concentración comprendida entre 0.8 – 1.0 g L⁻¹. Mediante dilución y posterior derivatización, se han preparado disoluciones patrón en un intervalo de concentración comprendido entre 150 – 15000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMOX, AMPI, PENG, OXA, NAFCI y DICLOX y entre 800 – 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para PENV.

En la tabla 70 se recogen la características analíticas de los calibrados obtenidos. Los intervalos de confianza de las pendientes y de las ordenadas en el origen se han calculado para un nivel de significación del 95%.

Tabla 70. Parámetros cromatográficos y características analíticas para la determinación de antibióticos β -lactámicos mediante el método cromatográfico con derivatización precolumna.

Analito	Parámetros de calibración*			* k^2	* R_s
	ordenada, mUA	pendiente, $\mu\text{g L}^{-1}$	r		
AMOX	-0.2 ± 3.0	0.0751 ± 0.0005	0.999	2.2 ± 0.2	2.7
PENG	2 ± 2	0.1262 ± 0.0003	0.999	3.5 ± 0.5	1.6
PENV	-5 ± 3	0.1068 ± 0.0001	0.999	4.4 ± 0.2	1.6
AMPI	-5 ± 3	0.1479 ± 0.0005	0.999	5.6 ± 0.5	1.9
OXA	1 ± 2	0.1771 ± 0.0003	0.999	7.2 ± 0.7	1.2
NAFCI	-3 ± 6	0.212 ± 0.001	0.999	8.4 ± 0.9	4.1
DICLOX	-1 ± 1	0.139 ± 0.001	0.999	15.0 ± 0.3	

*Intervalo lineal de concentración estudiado ($150 - 15000 \mu\text{g L}^{-1}$ para AMOX, PENG, AMPI, OXA, NAFCI, DICLOX y $800 - 80000 \mu\text{g L}^{-1}$ para PENV); 2k : factor de retención y R_s : resolución.

4.1.3.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

- **Límite de detección (LD)**

Es la cantidad mínima de antibiótico β -lactámico detectable y corresponde a la concentración o flujo másico que origina una señal 3 veces mayor que el valor del ruido de alta frecuencia de la línea base [79].

Para determinarlo, se analizan cromatográficamente disoluciones, sucesivamente diluidas, de los analitos, hasta que la señal se confunde con el ruido. De esta manera, se establece una correspondencia entre alturas siendo posible conocer la concentración correspondiente a 3 veces la altura del ruido.

² k, Factor de retención calculado según $k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$, siendo t_0 el t_r de un compuesto no retenido.

Los resultados obtenidos para las distintas penicilinas analizadas se muestran en la tabla 71.

- **Límite de cuantificación (LQ)**

Es la cantidad mínima de antibiótico β -lactámico que es determinable. Se determina del mismo modo que el límite de detección (LD), calculando la concentración que corresponda con 10 veces la altura del ruido. Los resultados se muestran en la tabla 71.

Tabla 71. Límites de detección y cuantificación obtenidos con el método cromatográfico con derivatización precolumna optimizado para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

Antibiótico	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$
AMOX	24	80
AMPI	16	53
PENG	17	56
PENV	56	188
OXA	32	105
NAFCI	46	155
DICLOX	83	276

4.1.3.3. PRECISIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Se ha evaluado la **repetibilidad** del proceso cromatográfico en términos de la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a 5 inyecciones de una disolución de penicilinas (AMOX, PENG, AMPI, OXA, NAFCI, DICLOX $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ y PENV $40 \mu\text{g mL}^{-1}$), obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 72.

También se ha evaluado la **reproducibilidad** del método analítico desarrollado inyectando una muestra de control (AMOX, PENG, AMPI, OXA, NAFCI, DICLOX $15 \mu\text{g L}^{-1}$ y PENV $40 \mu\text{g L}^{-1}$), preparada en diferentes días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 72.

Tabla 72. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad del proceso cromatográfico para la determinación de antibióticos β -lactámicos ($n = 3$).

Antibiótico	Añadida, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Repetibilidad (en el día)		Reproducibilidad (entre días)	
		R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	15	94	1 ^a	96	8 ^b
PENG	15	93	1 ^a	94	3 ^b
PENV	40	91	2 ^a	86	7 ^b
AMPI	15	102	3 ^a	95	9 ^b
OXA	15	95	5 ^b	103	16 ^c
NAFCI	15	96	3 ^b	93	4 ^c
DICLOX	15	84	10 ^b	94	15 ^c

^a $n = 7$, ^b $n = 5$, ^c $n = 6$.

4.2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS SIN DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNNA

4.2.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Se han registrado los espectros de absorción de los distintos antibióticos β -lactámicos objeto de estudio, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 121.

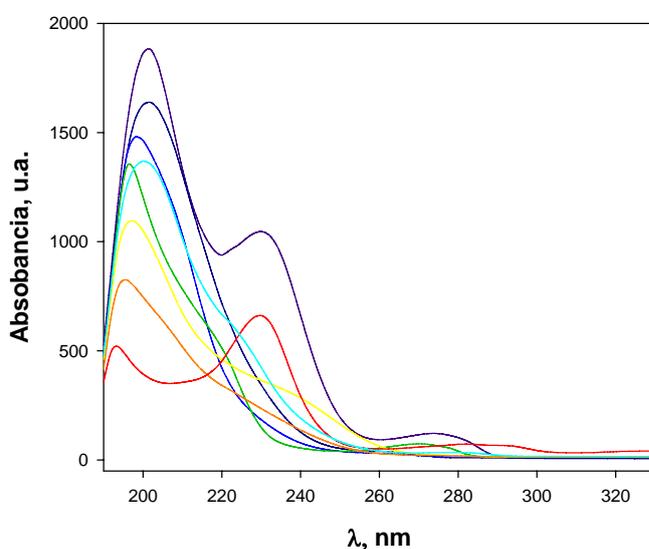


Figura 121. Espectros de absorción ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) de: (■) AMOX, (■) AMPI, (■) PENG, (■) PENV, (■) OXA, (■) CLOX, (■) NAFCI y (■) DICLOX. Las medidas de absorbancia se adquirieron en continuo durante un cromatograma. Condiciones: Columna Phenomenex LUNA® C18, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$, caudal 1.5 mL min^{-1} , modo gradiente acetonitrilo- agua (0.01% TFA).

En los espectros que se muestran, aparece un máximo de absorción entorno a 200 nm para todos los antibióticos; sin embargo, a esa longitud de onda, el acetonitrilo presenta una mayor absorción.

Dado que la absorción del disolvente orgánico disminuye a medida que aumenta la longitud de onda, se escogió **220 nm** [14,80,81] como valor óptimo de trabajo, valor de compromiso entre la absorción de los antibióticos y la fase móvil.

4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La mayoría de los métodos cromatográficos basados en la detección UV-visible para la determinación de penicilinas, especialmente en muestras de origen alimentario, requieren una etapa previa de derivatización utilizando reactivos tóxicos, como el mercurio (Hg) [4,82]. Para evitar este inconveniente, algunos autores han desarrollado métodos cromatográficos para la separación y determinación de antibióticos β -lactámicos sin derivatización, utilizando una columna C_{18} y gradiente de elución [14,68,83].

En este estudio, se han evaluado dos columnas cromatográficas para la separación de los antibióticos seleccionados (AMOX, AMPI, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCI y DICLOX):

- **LUNATM C_{18} (2)** (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), columna constituida por sílice ultrapura 99.999% en forma de partículas de alta simetría, funcionalizadas uniformemente con grupos octadecilsilanos y sin grupos silanoles libres. Su eficacia permanece constante para fases móviles con pH comprendidos entre 1 y 10 [39].
- **AQUATM C_{18}** (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), columna que posee grupos funcionales hidrofílicos que permiten la separación de compuestos polares utilizando fases móviles con contenido elevado en disolvente acuoso [39].

Se han ensayado diferentes condiciones de elución, tanto en *modo isocrático* como *gradiente*, utilizando mezclas de acetonitrilo-agua (0.01% TFA). Para seleccionar el procedimiento de separación más adecuado, se han evaluado diferentes parámetros experimentales como son: el *factor de retención* (**k**) y la *resolución* (**R_s**).

La aplicación de una elución en **modo isocrático** empleando tanto la columna LUNATM como la AQUATM, no permitió la separación de las 8 penicilinas en un corto intervalo de tiempo y con una resolución entre picos adecuada ($R_s > 1.5$) (figura 122).

En consecuencia, se evaluaron varios procedimientos en **modo gradiente**, utilizando la misma mezcla binaria de acetonitrilo-agua (0.01% TFA), a fin de obtener

un método que permita la separación de todos los compuestos en un tiempo apropiado ($t_{\text{cromatograma}} < 25 \text{ min}$) [74].

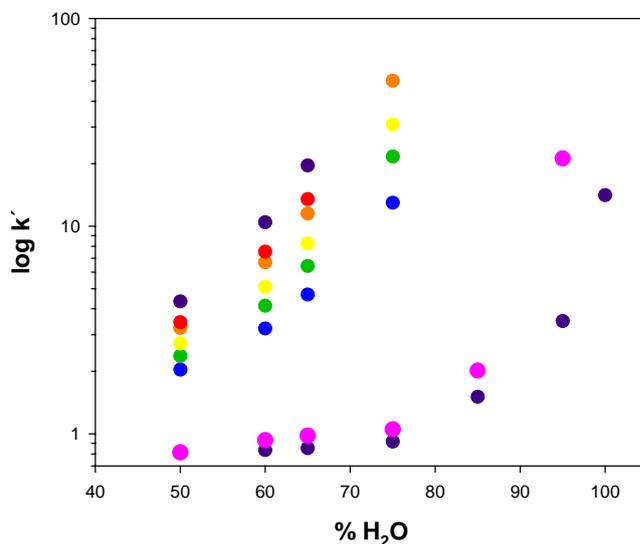


Figura 122. Variación del factor de retención (k) en función del porcentaje de agua (TFA 0.01%) en la fase móvil (resto acetonitrilo (TFA 0.01%)) de: (●) AMOX, (●) AMPI, (●) PENG, (●) PENV, (●) OXA, (●) CLOX, (●) NAFCI y (●) DICLOX. Condiciones: Columna Phenomenex LUNA[®] C18, 5 μm , 4.6 \times 150 mm, caudal 1.5 mL min^{-1} , $\lambda = 220 \text{ nm}$.

Los mejores resultados se obtuvieron empleando *agua-TFA (0.01%) (Fase A)* y *acetonitrilo-TFA (0.01%) (Fase B)*, de modo:

0% B (3 min), 0 – 37% B (5 min), 37% B (11 min), 37 – 67% B (5 min), 67% solvent B (5 min).

En la tabla 73 se muestran los valores de k y R_s obtenidos para cada analito en las dos columnas estudiadas y utilizando el programa de gradiente optimizado.

Los resultados conseguidos son similares en ambas fases estacionarias. No obstante se seleccionó la columna LUNA[™] C₁₈ (2) (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) para estudios posteriores, ya que permite realizar inyecciones de hasta 200 μL sin pérdida de resolución y/o simetría entre picos cromatográficos.

Tabla 73. Variación del factor de retención y resolución de los picos cromatográficos obtenidos para AMOX, PENG, PENV, AMPI, OXA, CLOX, NAFCI y DICLOX en función del tipo de columna cromatográfica.

Antibiótico	LUNA™		AQUA™	
	k	R _s	k	R _s
AMOX	3.7	10	2.6	8
PENG	4.5	31	3.0	31
PENV	8.3		5.5	
AMPI	9.6	6	6.6	7
OXA	10.9	5	7.8	10
CLOX	13.2	6	9.4	3
NAFCI	14.4	3	9.7	6
DICLOX	17.6	9	10.2	

Condiciones de gradiente: A (agua, 0.01% TFA) y B (acetonitrilo, 0.01% TFA) de modo: 0% B (3 min), 0-37% B (11 min), 37-67% B (5 min), 67% B (5 min).

En la figura 123 se presenta el cromatograma obtenido, para las ocho penicilinas estudiadas, empleando las condiciones cromatográficas optimizadas.

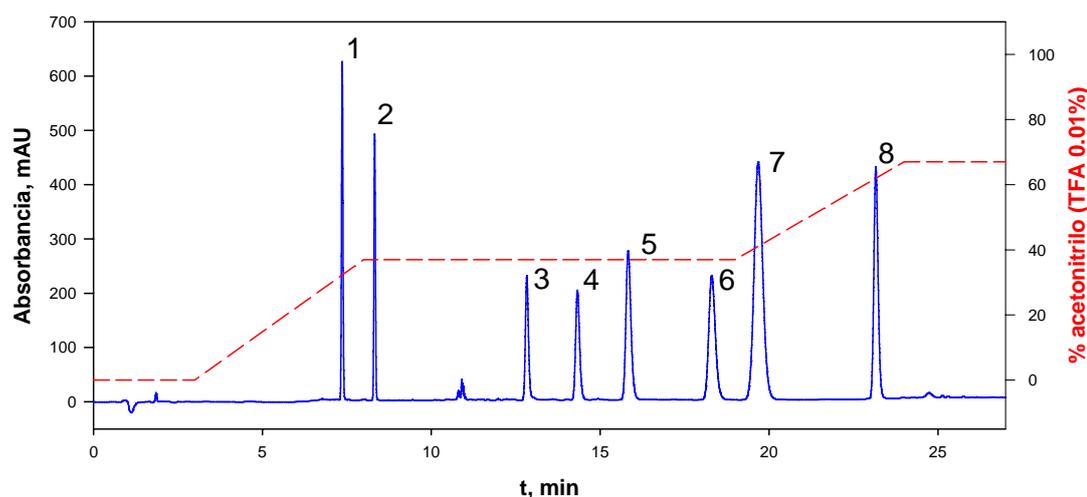


Figura 123. Cromatograma obtenido para una disolución estándar de las ocho penicilinas estudiadas ($24 \mu\text{g mL}^{-1}$): (1) AMOX, (2) PENG, (3) PENV, (4) AMPI, (5) OXA, (6) CLOX, (7) NAFCI, (8) DICLOX. Condiciones: Columna Phenomenex LUNA™ C₁₈ (2), caudal 1.5 mL min^{-1} , λ 220 nm, composición de la fase móvil: agua-acetonitrilo (TFA 0.01%) en modo gradiente (apartado 3.3.1.2.).

4.2.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO

4.2.3.1. CALIBRADO

Se ha realizado un calibrado en agua las distintas penicilinas estudiadas, en el intervalo de concentraciones 75 – 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$, a partir de disoluciones madre de antibióticos.

En la tabla 74 se muestran los parámetros característicos de las curvas de calibrado obtenidas para cada analito. Los intervalos de confianza de las pendientes y las ordenadas en el origen se han calculado para un nivel de significación del 95%.

Tabla 74. Parámetros cromatográficos y características analíticas para la determinación de antibióticos β -lactámicos mediante el método cromatográfico sin derivatización precolumna.

Analito	Parámetros de calibración*			*k	*R _s
	ordenada, mUA	pendiente, $\mu\text{g L}^{-1}$	r		
AMOX	5.5 ± 2.9	0.1071 ± 0.0006	0.9999	3.7 ± 0.1	10
AMPI	5.0 ± 1.6	0.0837 ± 0.0003	0.9999	4.5 ± 0.1	31
PENG	2.8 ± 5.4	0.0987 ± 0.0011	0.9995	8.3 ± 0.3	6
PENV	3.8 ± 1.1	0.0796 ± 0.0002	0.9999	9.6 ± 0.3	5
OXA	13.3 ± 5.2	0.1646 ± 0.0012	0.9998	10.9 ± 0.3	6
CLOX	9.0 ± 2.9	0.1698 ± 0.0006	0.9999	13.2 ± 0.4	3
NAFCI	8.8 ± 6.0	0.3039 ± 0.0009	0.9999	14.4 ± 0.4	9
DICLOX	13.2 ± 4.5	0.1914 ± 0.0009	0.9999	17.6 ± 0.5	

*Intervalo lineal de concentración estudiado (75 – 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMOX, AMPI, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCI, DICLOX); k: factor de retención y R_s: resolución.

4.2.3.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación, calculados de forma análoga al procedimiento descrito en el apartado 4.1.3.2. de esta sección, se recogen en la tabla 75.

Tabla 75. Límites de detección y cuantificación obtenidos con el método cromatográfico optimizado para la determinación de antibióticos β -lactámicos.

Antibiótico	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$
AMOX	8.9	29
AMPI	6.6	22
PENG	15	50
PENV	21	70
OXA	9.7	32
CLOX	11	36
NAFCI	7.3	24
DICLOX	19	64

4.2.3.3. PRECISIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

La precisión del método cromatográfico desarrollado para la medida de los ocho antibióticos β -lactámicos estudiados, se estimó en términos de la **repetibilidad** y de **reproducibilidad**.

La repetibilidad del proceso se evaluó a partir de la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a 3 inyecciones de una disolución de 75 y 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de penicilinas, utilizando idénticas condiciones experimentales en el mismo día de trabajo y con el mismo operador [84].

Por otra parte, la reproducibilidad del método analítico desarrollado se estimó analizando varias muestras de control ($n = 3$), a los mismos niveles de concentración, preparadas e inyectadas en distintos días.

A partir de los resultados que se muestran en la tabla 76, podemos concluir que el método cromatográfico puesto a punto proporciona la obtención de medidas precisas, con una desviación estándar relativa inferior al 6%, cuando son realizadas en días distintos.

Tabla 76. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad del proceso cromatográfico para la determinación de antibióticos β -lactámicos ($n = 3$).

Antibiótico	Concentración, ng mL ⁻¹	Repetibilidad (en el día)		Reproducibilidad (entre días)	
		R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	75	97	2	102	2
	150	94	4	96	6
AMPI	75	104	0.2	106	0.9
	150	102	4	101	2
PENG	75	95	3	98	4
	150	95	2	98	5
PENV	75	96	4	97	4
	150	96	4	96	5
OXA	75	99	0.2	96	0.3
	150	98	2	99	3
CLOX	75	101	0.1	101	3
	150	98	2	98	2
NAFCI	75	103	0.4	98	1
	150	97	0.5	96	1
DICLOX	75	101	3	100	3
	150	98	0.3	96	5

4.2.3.4. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Utilizando las condiciones cromatográficas optimizadas en el apartado 4.2.3.3., se han analizado otros antibióticos que potencialmente podrían encontrarse en el mismo tipo de matriz que las 8 penicilinas estudiadas y, por tanto, interferir en su cuantificación.

Los resultados conseguidos se muestran en la tabla 77.

Los tiempos de retención y resolución obtenidos para todos los analitos ensayados, indican que ninguno de los antibióticos ensayados interfiere con los compuestos de interés ($R_s > 1$).

Tabla 77. Tiempos de retención y resolución para los antibióticos empleados en el estudio de interferencias. Condiciones: Columna Phenomenex LUNA[®] C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, caudal 1.5 mL min⁻¹, λ 220 nm, modo gradiente acetonitrilo-agua (0.01% TFA).

Antibiótico	t _r , min	w _{1/2}	R _s
AMOX	6.46	0,0492	0,628
CLAV	6.52	0,0632	5,85
CEFAP	7.08	0,0492	2.79
AMPI	7.35	0,0477	4.13
ENRO	7.74	0,0632	0,690
TCY	7.82	0,0535	9.19
DOXY	8.69	0,0577	7,81
DDS	9.52	0,0672	6,33
CLOR	10.25	0,0682	10,6
PENG	11.75	0,0988	7,16
PENV	13.15	0,131	6.02
OXA	15.65	0,162	9.07
CLOX	17.15	0,219	3,20
NAFCI	18.55	0,291	9,66
DICLOX	22.15	0,147	

Abreviaturas: AMOX: amoxicilina, AMPI: ampicilina, PENV: penicilina V, PENG: penicilina G, OXA: oxacilina, CLOX: cloxacilina, DICLOX: dicloxacilina, NAFCI: nafcilina, CEFAP: cefapirina, CLAV: ácido clavulánico, ENRO: enrofloxacina, CIPRO: ciprofloxacina, CLOR: cloramfenicol, TCY: tetraciclina, DDS: dapsona, w_{1/2}: anchura de pico a media altura.

Finalmente destacar que, las características analíticas y la calidad de los parámetros cromatográficos obtenidos mediante este procedimiento en términos de sensibilidad, reproducibilidad, factor de retención y resolución entre picos cromatográficos, son mejores que los obtenidos mediante el método basado en la derivatización

precolumna. Por otra parte, la *rapidez* y *sencillez* de la puesta a punto del método y la ventaja que supone el no utilizar *reactivos tóxicos*, hacen de éste procedimiento una buena alternativa para la determinación cromatográfica de antibióticos β -lactámicos con detección UV-visible.

Teniendo en cuenta estos aspectos, los estudios de extracción y preconcentración optimizados en este Capítulo, se llevaron a cabo empleando este procedimiento de separación basado en **HPLC-DAD sin derivatización precolumna**.

4.3. ESTUDIO DE PRECONCENTRACIÓN EMPLEANDO CARTUCHOS EN FASE SÓLIDA (SPE)

Los valores de los LMRs establecidos por la Unión Europea para los antibióticos β -lactámicos en alimentos de origen animal [85] y las concentraciones de los mismos encontradas habitualmente en muestras medioambientales son muy inferiores a los obtenidos empleando un método cromatográfico optimizado [58,86]. Por todo ello, fue necesario poner a punto un método de preconcentración basado en extracción en fase sólida (SPE) que permitiera su aplicación para el análisis de este tipo de muestras.

Los cartucho SPE se emplean de forma habitual para la preconcentración de antibióticos sin embargo, en la mayoría de los casos, las recuperaciones obtenidas son bajas y/o poco reproducibles, sobre todo en muestras medioambientales.

Se han evaluado dos tipos de cartucho SPE para su utilización en el proceso de preconcentración y limpieza de las penicilinas estudiadas y su posterior aplicación a muestras de agua residual y de leche.

Los cartuchos seleccionados fueron:

- **Bond Elut C₁₈**, que contiene un adsorbente de *naturaleza apolar* [87] y de uso extendido en la preconcentración de penicilinas en alimentos.
- **Oasis MAX**, cuyo adsorbente posee una *naturaleza mixta*. Por una parte, tiene lugar un mecanismo en fase inversa al estar constituido por un polímero de naturaleza apolar (*N-vinil pirrolidona/divinilbenceno*) y un mecanismo de intercambio aniónico, ya que el adsorbente posee grupos catiónicos de tipo *dimetil butil amonio*.

Para establecer las condiciones óptimas del procedimiento de extracción en fase sólida (SPE), se han evaluado varios factores, como son: **pH de la muestra**, **composición de las disoluciones de lavado**, **condiciones de elución** y **volumen de ruptura** (máximo volumen de muestra que permite una recuperación cuantitativa de los analitos).

4.3.1. INFLUENCIA DEL pH DE LA DISOLUCIÓN DE CARGA

Dada la naturaleza iónica de las penicilinas, el pH va a afectar críticamente a la retención de las mismas en el cartucho.

Las penicilinas, en medio acuoso, pueden presentarse bien como especies neutras, aniónicas o, en el caso de AMOX y AMPI, de forma intermedia (especie zwitteriónica u anfotérica) debido a la presencia de un grupo carboxílico y otro amino en sus estructuras moleculares (Capítulo I).

Para evaluar la influencia del pH de la muestra en el proceso de preconcentración, se prepararon disoluciones reguladoras con pH comprendidos entre 3.0 y 8.5, conteniendo 6 μg de cada uno de los 8 antibióticos.

En la figura 124, se muestra la variación de la recuperación de cada uno de los compuestos estudiados en función del pH de la disolución de carga.

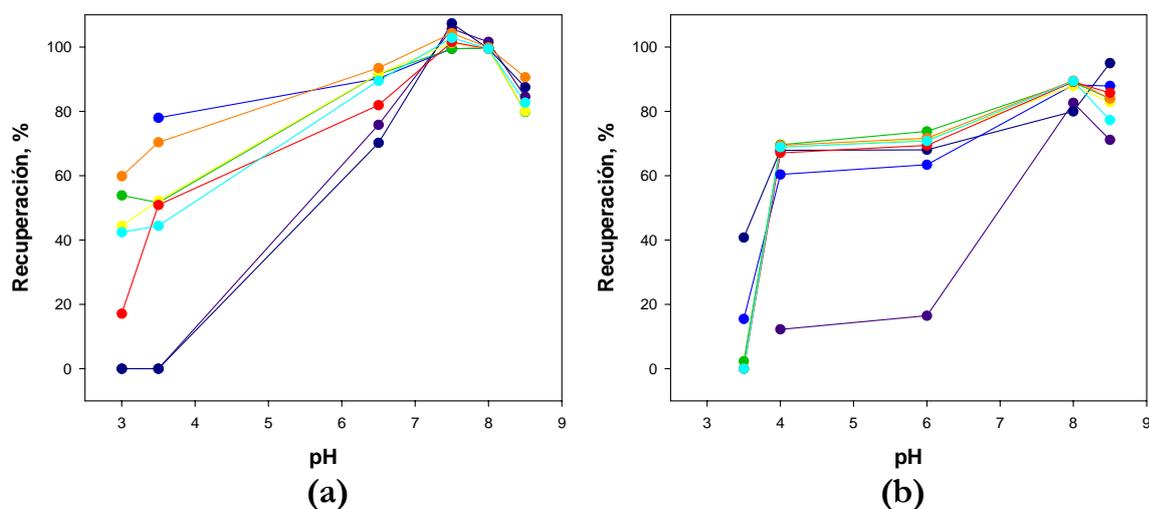


Figura 124. Influencia del pH sobre el porcentaje de recuperación de los antibióticos β -lactámicos en: (a) Cartucho Oasis MAX ($RSD = 1 - 7\%$, $n = 3$) y (b) Cartucho Bond Elut C₁₈ ($RSD = 1 - 4\%$, $n = 3$). (■) AMOX, (■) AMPI, (■) PENG, (■) PENV, (■) OXA, (■) CLOX, (■) NAFCl y (■) DICLOX. Tipo de muestra: disolución reguladora conteniendo 6 μg de cada uno de los antibióticos. Volumen de muestra: 50 mL.

En el caso de los **cartucho Oasis MAX**, los mejores resultados se obtuvieron para valores de pH entorno a 7.5 – 8.0, con recuperaciones comprendidas entre 99 y 107% (figura 124). En estas condiciones, $\text{pH} > \text{pK}_a$, las penicilinas se encuentran en su forma básica y son retenidas por el absorbente mediante el mecanismo mixto del

soporte. A pH superiores a 9.0, las recuperaciones decrecen paulatinamente, debido a la hidrólisis de las penicilinas en medio básico [72].

El comportamiento de AMOX y AMPI se explica teniendo en cuenta sus propiedades ácido-base. A bajos pH, al igual que el resto de penicilinas, se encuentran en forma ácida, con el grupo carboxílico y amino protonados, mostrando una débil retención en el soporte.

Sin embargo, a pH 7.5, cuando se hayan su forma zwitteriónica, las recuperaciones son cuantitativas, demostrando que la presencia de una carga positiva no afecta negativamente al proceso de retención.

Por otra parte, el adsorbente del **cartucho Bond Elut C₁₈** muestra una afinidad moderada por los antibióticos, que se incrementa para pH mayores de 4.0, hasta un valor máximo a pH 8.0 (figura 124).

4.3.2. ELECCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE LAVADO

El disolvente de lavado ideal será aquel que elimine las impurezas retenidas en el adsorbente, sin afectar a la retención y posterior recuperación de los analitos.

En el caso del **cartucho Oasis MAX**, se ensayaron varias mezclas hidroorgánicas de metanol-disolución tampón a diferentes pH (7.5, 8.0 y 8.5) según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.1. de la Parte Experimental.

En la tabla 78 se recogen las recuperaciones obtenidas para los tres lavados ensayados en presencia de un 5% de modificador orgánico.

El eluyente que proporciona, en términos generales, mejores porcentajes de recuperación es la mezcla metanol-agua (PB 50 mmol L⁻¹, pH 7.5) (5:95, v/v). Como se puede observar, a pH más básicos se incrementa significativamente la degradación de algunas penicilinas, en especial de la nafcilina, cuyo producto de degradación aparece al mismo tiempo de retención de la PENG, con lo que se produce una sobreestimación del porcentaje de recuperación de la misma [46].

Por otra parte, se evaluó el efecto del incremento de modificador orgánico en la disolución de lavado. Se comprobó que el empleo de cantidades de MeOH > 5% producían pérdidas para amoxicilina y ampicilina superiores al 50%.

Tabla 78. Porcentajes de recuperación obtenidos para los antibióticos β -lactámicos estudiados en función del pH de la disolución amortiguadora de la mezcla hidroorgánica utilizada (metanol 5%) para el lavado de los cartuchos Oasis MAX.

Antibiótico	Recuperación, %*		
	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
AMOX	89	89	84
AMPI	94	93	88
PENG	105	131	137
PENV	90	80	80
OXA	90	84	80
CLOX	87	90	91
NAFCI	72	54	38
DICLOX	89	87	83

*RSD = 2 – 10%, n=3.

En el caso de los **cartuchos Bond Elut C₁₈**, se descartó una etapa intermedia de lavado, ya que incluso disoluciones acuosas puras (disolución reguladora PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0), producían pérdidas significativas de los antibióticos estudiados.

4.3.3. ELECCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE ELUCIÓN

Para seleccionar el tipo más adecuado de eluyente se ensayaron, en idénticas condiciones, diferentes mezclas hidroorgánicas.

Para el **cartucho Bond Elut C₁₈**, se ensayaron diferentes proporciones de metanol-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0) (20:80, 30:70, 50:50 y 60:40, v/v) y se seleccionó como disolvente óptimo, 2 mL de la mezcla metanol-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0) (60:40, v/v).

Para los **cartuchos Oasis MAX**, siguiendo las recomendaciones del fabricante, se evaluaron diferentes mezclas de metanol o acetonitrilo con ácido acético (1 – 3%), ácido trifluoroacético (0.1 – 2%) y ácido fórmico (1 – 3%).

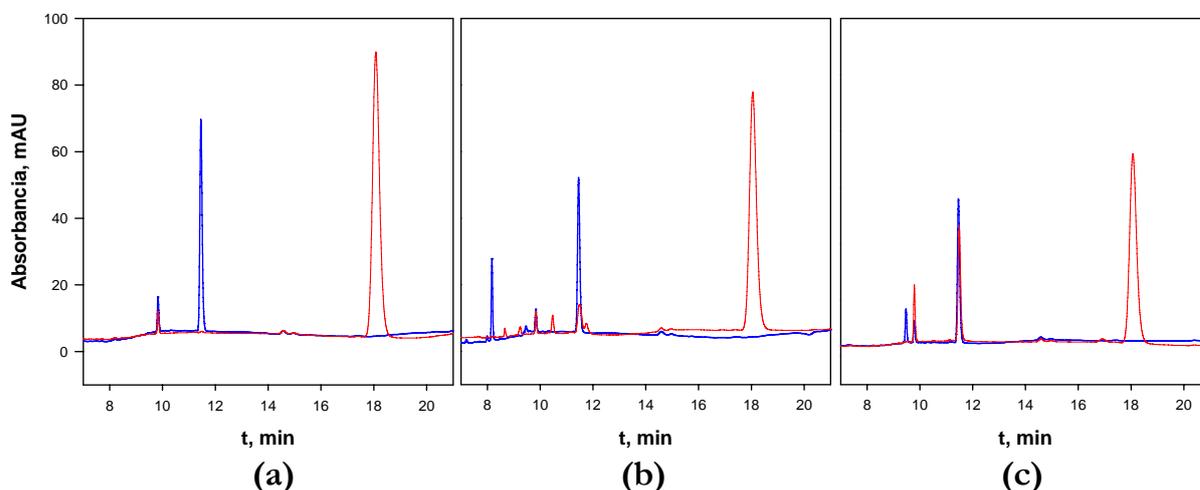


Figura 125. Influencia del pH de la disolución de elución sobre la estabilidad de la NAFCl: (a) pH 5.79, (b) 3.09 y (c) 10.61. (–) PENG y (–) NAFCl.

Las mejores recuperaciones se obtuvieron utilizando 2 mL de ácido fórmico al 2% en metanol. Desafortunadamente, la degradación de la NAFCl en esta disolución resultó ser superior al 20%, para un tiempo de análisis inferior a 7 h. Además, uno de sus productos de degradación tanto en medio ácido como básico, presenta un factor de retención similar al de la PENG (figura 125).

Teniendo en cuenta la naturaleza iónica del adsorbente y los trabajos que a este respecto se describen en la bibliografía consultada [88], la adición de iones a la disolución eluyente, tales como el ión hidróxido, borato, bicarbonato, etc., pueden favorecer la elución de las penicilinas evitando la hidrólisis observada en medios ácidos y básicos.

En este sentido, el tetra-n-butilamonio hidrógeno sulfato (TBA), par iónico con estructura y carga comparable a los grupos catiónicos de las aminas cuaternarias que forman parte de la fase estacionaria del adsorbente Oasis MAX, podría ser un candidato óptimo para conseguir una disolución metanólica neutra de alta capacidad eluotrópica [88,89] (figura 126).

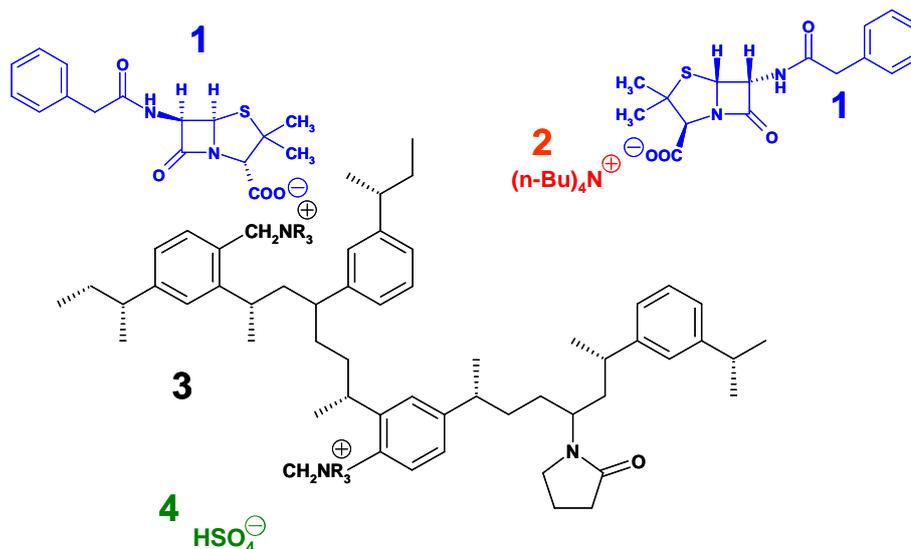


Figura 126. Estructuras de los iones implicados en el proceso de adsorción/elución de las penicilinas del cartucho Oasis MAX mediante el disolvente TBA en MeOH: (1) PENG, (2) y (4) TBA: tetra-*n*-butilamonio hidrógeno sulfato y (3) estructura polimérica del adsorbente.

Los estudios de estabilidad llevados a cabo para todas las penicilinas ensayadas en disoluciones de TBA en metanol o acetonitrilo, demostraron que ninguna de ellas presentaba indicios de degradación apreciable para un tiempo inferior a 18 h.

En la figura 127 se muestran las recuperaciones obtenidas para cada uno de los antibióticos β -lactámicos estudiados cuando se utiliza como eluyente TBA en metanol a diferentes concentraciones (0.01 – 0.2 mol L⁻¹).

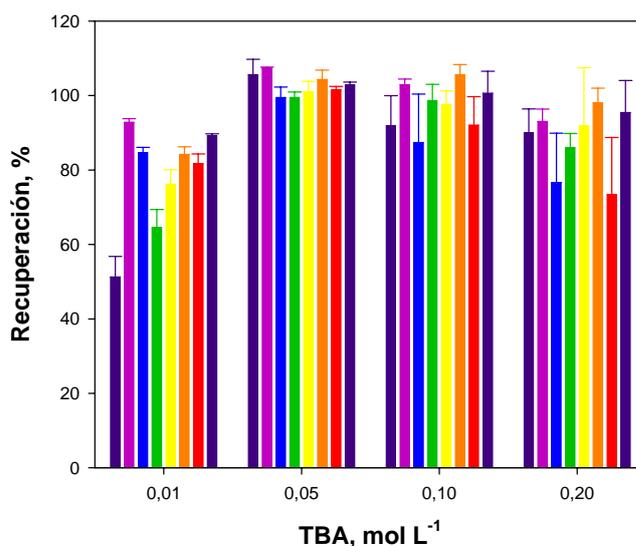


Figura 127. Efecto de la concentración de TBA en el disolvente de elución (MeOH) sobre la recuperación de los antibióticos β -lactámicos en un cartucho Oasis MAX. (■) AMOX, (■) AMPI, (■) PENG, (■) PENV, (■) OXA, (■) CLOX, (■) NAFCI y (■) DICLOX. Tipo de muestra: disolución reguladora que contiene 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno de los antibióticos. RSD = 0.2 – 4% (n=3).

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el eluyente que proporciona mejores porcentajes de recuperación para los cartuchos Oasis MAX, con una elevada reproducibilidad ($RSD = 0.2 - 4\%$), es el **TBA 0.05 mol L⁻¹ en metanol**.

4.3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA INYECCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE SPE: ADICIÓN DE UN DISOLVENTE FOCALIZADOR

Las disoluciones eluidas de ambos cartuchos contienen un porcentaje muy elevado de metanol, por lo que su inyección directa en la columna produce una importante distorsión de los picos cromatográficos.

Este fenómeno puede atribuirse al mayor poder eluotrópico de las disoluciones metanol-agua (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0) (60:40, v/v) y metanol (0.05 mol L⁻¹ de TBA) con respecto a la fase móvil.

Este problema puede solventarse mediante la evaporación del disolvente orgánico seguida de una reconstitución del extracto en la fase móvil o bien, en otro disolvente con menor poder eluotrópico [90]. Sin embargo, esta alternativa se descartó ya que se producía una descomposición importante de las penicilinas estudiadas.

Se decidió por ello realizar diluciones de los eluatos obtenidos con agua milli-Q, que actúa como **disolvente focalizador**, concentrando el pico cromatográfico y aumentando la sensibilidad del ensayo [91]. Las mezclas ensayadas de eluato-agua fueron 7:3 (v/v), 6:4 (v/v) y 1:1 (v/v), siendo esta última la que proporcionaba mejores resultados.

Finalmente, destacar que la dilución se ha realizado de modo automático por el inyector del cromatógrafo, lo que asegura una buena reproducibilidad.

En la tabla 79, se resumen las condiciones óptimas para la preconcentración, limpieza y elución de los 8 antibióticos β -lactámicos, tanto en el **cartucho Oasis MAX**, como en el Bond Elut.

Tabla 79. Condiciones optimizadas para la extracción/preconcentración de los antibióticos β -lactámicos de interés en los cartuchos Oasis MAX y Bond Elut C₁₈.

Etapa	Oasis MAX	Bond Elut C ₁₈
Preacondicionamiento	6 mL metanol	10 mL metanol
	6 mL agua milli-Q	10 mL agua milli-Q
	6 mL PB 0.05 mol L ⁻¹ , pH 7.5	5 mL NaCl 2%
	-	5 mL PB 0.1 mol L ⁻¹ , pH 8.0
Carga de muestra	filtrada y ajustada a pH 7.5	filtrada y ajustada a pH 8.0
Lavado	6 mL metanol-agua (PB 50 mmol L ⁻¹ , pH 7.5) (95:5, v/v)	-
Elución	2 mL metanol (TBA 0.05 mol L ⁻¹)	2 mL metanol-agua (PB 0.1 mol L ⁻¹) (60/40, v/v)

Abreviaturas: PB: *tampón fosfato*.

4.3.4. CÁLCULO DEL VOLUMEN DE RUPTURA

El volumen de ruptura permite conocer cual es el volumen máximo de muestra que se puede pasar a través del cartucho sin que se produzca una disminución significativa del porcentaje de recuperación del analito.

Para realizar el estudio, se han preparado diferentes disoluciones reguladoras conteniendo 6 μ g de cada antibiótico con volúmenes comprendidos entre: 10 – 500 mL (PB 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0), para cartuchos Bond Elut C₁₈ y 20 – 1000 mL (PB 50 mmol L⁻¹, pH 7.5), para cartuchos Oasis MAX.

Los resultados obtenidos para cada tipo de soporte se recogen en la figura 128, donde se representa el porcentaje de recuperación frente al volumen estudiado.

Los resultados obtenidos muestran que las recuperaciones conseguidas para 500 mL de muestra empleando cartuchos **Bond Elut C₁₈** son del orden del 80%, excepto para los antibióticos más polares, amoxicilina y ampicilina, que presentan recuperaciones entorno al 40%.

Por otro lado, el uso de cartuchos **Oasis MAX**, para la preconcentración de 1000 mL de muestra, proporciona excelentes recuperaciones superiores al 90% (RSD < 9%) para todas las penicilinas, exceptuando la AMOX, que alcanza un porcentaje de recuperación del 50%.

En estas condiciones, el empleo del **cartucho Oasis MAX** permite un factor de preconcentración de ca. 500, lo que demuestra la notable eficiencia del proceso de preconcentración atribuible a la elevada superficie específica del polímero así como su mecanismo mixto de adsorción.

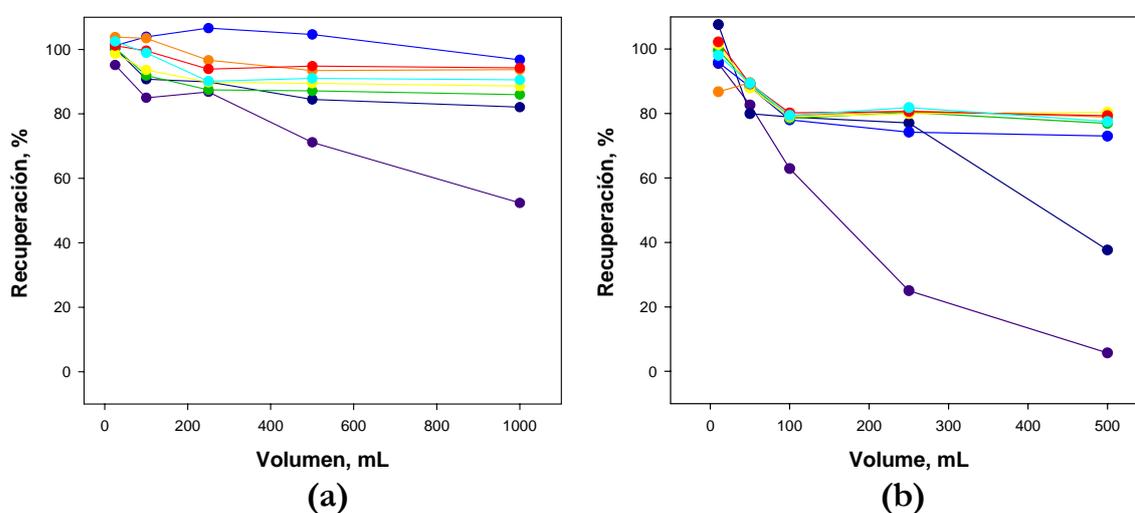


Figura 128. Influencia del volumen de muestra sobre el porcentaje de recuperación de los antibióticos β -lactámicos en: (a) Cartucho Oasis MAX (RSD = 2 – 9%, $n = 3$) y (b) Cartucho Bond Elut C₁₈ (RSD = 2 – 6%, $n = 3$). (■) AMOX, (■) AMPI, (■) PENG, (■) PENV, (■) OXA, (■) CLOX, (■) NAFCI y (■) DICLOX. Tipo de muestra: disolución reguladora que contiene 6 μ g de cada uno de los antibióticos.

Por todo ello, se ha elegido el cartucho Oasis MAX para posteriores ensayos, ya que con él se obtienen recuperaciones para todos los antibióticos evaluados comparables o incluso mejores que los descritos en bibliografía [45].

Los **límites de detección** obtenidos en agua se encuentran comprendidos entre 8 y 24 ng L^{-1} (1000 mL de muestra) y los **límites de cuantificación** entre 27 y 80 ng L^{-1} (1000 mL de muestra) (ver tabla 80).

Tabla 80. Límites de detección y cuantificación obtenidos para las ocho penicilinas de interés tras la preconcentración de 1000 mL de agua y calculados como tres veces y diez veces la relación señal/ruido, respectivamente.

Antibiótico	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ, $\mu\text{g L}^{-1}$
AMOX	0.017	0.057
AMPI	0.008	0.027
PENG	0.016	0.053
PENV	0.024	0.080
OXA	0.011	0.037
CLOX	0.012	0.040
NAFCI	0.008	0.027
DICLOX	0.021	0.070

4.4. DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN MUESTRAS REALES

4.4.1. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES

El método cromatográfico desarrollado, basado en la extracción SPE con cartuchos de mecanismo mixto Oasis MAX y cromatografía líquida con detección UV-visible (HPLC-DAD), se ha aplicado a la determinación de penicilinas en muestras de agua residual procedentes de un vertido industrial y del efluente de entrada (EE) y de salida (ES) de una estación depuradora EDAR.

En términos generales, la eficiencia del proceso de preconcentración de los antibióticos β -lactámicos en muestras de aguas residual, depende notablemente de los componentes de la matriz [49,92,93].

Teniendo en cuenta este aspecto y siguiendo el procedimiento optimizado en el apartado 4.3. de este Capítulo, se evaluó la recuperación obtenida para cada uno de los antibióticos (2.5 μ g) adicionados a 100 mL de muestra de agua residual, tras comprobar que se encontraba libre de los antimicrobianos estudiados a los límites de detección del método propuesto.

En la tabla 81 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos a para el agua residual tomada del efluente de la EDAR.

Los valores obtenidos en todos los casos son inferiores a los conseguidos para disoluciones acuosas estándar. Este hecho puede atribuirse a la elevada concentración de *materia orgánica y ácidos húmicos* de las muestras, que afecta negativamente a la retención de los antibióticos. Este efecto es más drástico en el caso de AMOX, para la que se obtienen recuperaciones inferiores al 4%, al utilizar el cartucho Bond Elut C₁₈.

No obstante, el cartucho Oasis MAX permite recuperaciones superiores al 86% para todos los compuestos (AMOX, 76%) con valores de RSD comprendidos entre 1 y 9%. Estos resultados son superiores a los obtenidos con el soporte Bond Elut C₁₈ u otros descritos en bibliografía para el mismo tipo de compuestos y muestras de la misma naturaleza [45,50,51].

Tabla 81. Comparación de los porcentajes de recuperación obtenidos en la preconcentración de 100 mL (2.5 μ g de penicilinas) de una muestra de agua residual utilizando cartuchos Bond Elut C₁₈ (Varian) y Oasis MAX (Waters) (n = 3).

Antibiótico	Bond Elut C ₁₈		Oasis MAX	
	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	4	8	76	8
AMPI	46	15	93	7
PENG	55	5	100	4
PENV	51	12	86	8
OXA	40	6	96	1
CLOX	73	2	97	2
NAFCI	60	4	91	9
DICLOX	36	3	96	3

Para calcular el volumen de ruptura de los cartuchos para este tipo de muestras, se procedió a preconcentrar diferentes cantidades de agua (25 – 500 mL) enriquecidas con 2.5 μ g de cada antibiótico.

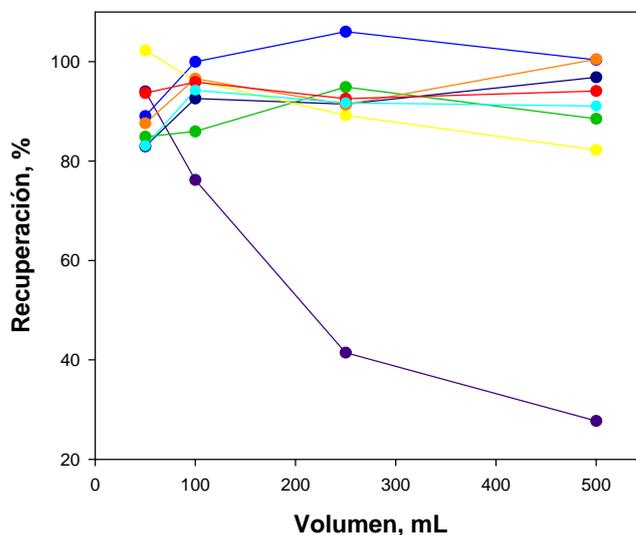


Figura 129. Influencia del volumen de muestra sobre el porcentaje de recuperación de los antibióticos β -lactámicos en un cartucho Oasis MAX. (■) AMOX, (■) AMPI, (■) PENG, (■) PENV, (■) OXA, (■) CLOX, (■) NAFCI y (■) DICLOX. Tipo de muestra: agua residual conteniendo 2.5 μ g de cada uno de los antibióticos. (RSD = 0.3 – 13%, n = 3)

Los resultados obtenidos (figura 129) indican que el volumen de ruptura para AMOX y OXA disminuye significativamente a medida que aumenta el volumen de

muestra cargada en el cartucho. Además, la percolación de volúmenes de muestra superiores a 250 mL produce una drástica saturación del cartucho SPE.

La repetibilidad y reproducibilidad del método propuesto para el análisis de muestras de aguas residuales, se ha estimado en términos de desviación estándar relativa (RSD).

Para evaluar la **repetibilidad** (en el día) del método propuesto, en términos de exactitud y precisión, se han analizado 250 mL de efluente de depuradora enriquecido con 2.5 µg de cada una de las penicilinas, según la metodología propuesta. A partir de los datos mostrados en la tabla 82, podemos concluir que el procedimiento cromatográfico desarrollado proporciona resultados satisfactorios con recuperaciones comprendidas entre 90 y 97% y valores de RSD inferiores al 7% (AMOX 44%, RSD 6%).

A continuación se estudió la **reproducibilidad** del método analizándose en tres días distintos, tres muestras independientes de aguas residuales (250 mL) enriquecidas al mismo nivel de concentración (2.5 µg). En la tabla 82 se presentan los resultados obtenidos, que demuestran la buena precisión del método (RSD 0.8 – 12%) para todos los antibióticos β-lactámicos ensayados, a excepción de la AMOX, con un eficiencia del proceso de preconcentración del 41% (RSD 9%).

Tabla 82. Repetibilidad y reproducibilidad obtenida para la preconcentración de 250 mL de agua residual ES conteniendo 2.5 µg de cada una de las penicilinas estudiadas ($n = 3$).

Antibiótico	Repetibilidad (en el día)		Reproducibilidad (entre días)	
	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	44	6	41	9
AMPI	92	1	91	2
PENG	97	3	106	12
PENV	92	3	95	5
OXA	96	7	89	11
CLOX	90	2	91	2
NAFCI	92	0.3	92	0.8
DICLOX	97	3	92	8

Paralelamente, el procedimiento desarrollado se aplicó al análisis de penicilinas en muestras de agua residual de origen industrial y urbano (efluentes de depuradora) enriquecidas con los antibióticos. Los **límites de detección** obtenidos después de la preconcentración de 250 mL de cada muestra, se recogen en la tabla 83.

Tabla 83. Límites de detección obtenidos para las ocho penicilinas de interés tras la preconcentración de 250 mL de agua residual y de distinta concentración.

Antibiótico	LD, $\mu\text{g L}^{-1}$			
	Disolución reguladora ^a	Agua residual industrial ^b	Agua residual EE ^b	Agua residual ES ^b
AMOX	0.017	5.9	ND ^c	4.2
AMPI	0.008	5.7	ND	3.7
PENG	0.016	25.6	12.4	12.7
PENV	0.024	8.3	2.5	8.0
OXA	0.011	11.2	4.3	2.8
CLOX	0.012	7.5	10.3	4.0
NAFCI	0.008	2.9	3.3	2.2
DICLOX	0.021	3.6	6.4	3.2

^a1000 mL, ^b250 mL, ^cND: *no detectado*.

Los valores obtenidos para amoxicilina y ampicilina son comparables a los descritos por Lindberg y col. en aguas residuales de origen hospitalario empleando HPLC-ESI-MS y SPE con cartuchos Isolut C₂/ENV+ [51] o incluso menores. Por ejemplo, Morse y col. [92] han descrito un método para la determinación de AMOX en aguas residuales con límites de cuantificación de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La mayor conductividad (849 $\mu\text{S cm}^{-1}$) del efluente de entrada (EE) en comparación con el efluente de salida (ES) (569 $\mu\text{S cm}^{-1}$) y el agua residual industrial (468 $\mu\text{S cm}^{-1}$), podría justificar la ausencia de retención de los antibióticos más polares (AMOX y AMPI) en el cartucho.

En la tabla 84 se muestran los valores de recuperación obtenidos para muestras de agua residual industrial y aguas EE y ES de la EDAR enriquecidas con 25 y 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los ocho antibióticos. Los cromatogramas correspondientes se muestran en la figura 130.

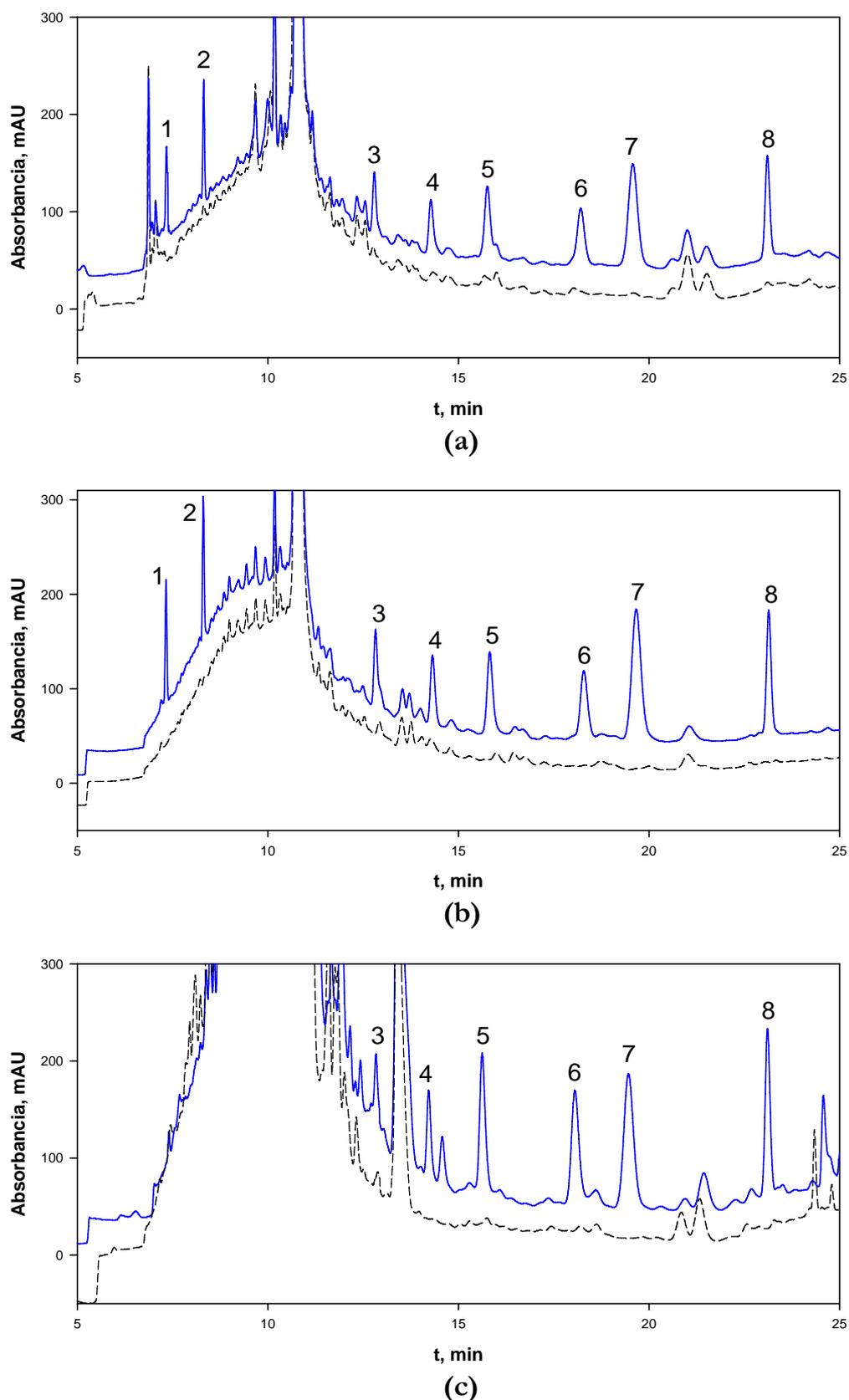


Figura 130. Cromatogramas obtenidos después de la limpieza y preconcentración de aguas residuales (250 mL) empleando cartuchos Oasis MAX: (a) agua residual industrial, (b) efluente de entrada de EDAR y (c) efluente de salida de EDAR. (--) muestra sin enriquecer y (—) muestra enriquecida con los ocho antibióticos β -lactámicos ($25 \mu\text{g L}^{-1}$): (1) AMOX, (2) AMPI, (3) PENG, (4) PENV, (5) OXA, (6) CLOX, (7) NAFCI y (8) DICLOX. Los cromatogramas correspondientes a las aguas enriquecidas se encuentran elevados 30 mAU con respecto a los cromatogramas sin enriquecer.

Tabla 84. Estudio de recuperación para las penicilinas estudiadas en aguas residuales de una estación EDAR en las condiciones óptimas de medida (tabla 24) ($n=3$).

Antibiótico	Agua residual industrial				Agua residual de estación depuradora EDAR							
					Efluente de entrada (EE)				Efluente de salida (ES)			
	25 $\mu\text{g L}^{-1}$		75 $\mu\text{g L}^{-1}$		25 $\mu\text{g L}^{-1}$		75 $\mu\text{g L}^{-1}$		25 $\mu\text{g L}^{-1}$		75 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	54	6	46	1	ND ^a	-	ND	-	39	9	45	5
AMPI	72	9	86	1	ND	-	ND	-	90	3	95	2
PENG	88	4	91	1	28	11	50	9	114	10	99	2
PENV	74	11	85	3	70	3	74	3	98	3	99	0.7
OXA	77	7	84	2	87	4	91	3	83	5	85	3
CLOX	89	12	84	7	79	7	85	4	93	2	96	3
NAFCI	85	5	86	3	66	10	66	5	93	1	95	0.6
DICLOX	78	5	82	2	80	7	81	3	87	6	97	4

^aND: *no detectado*.

Los resultados demuestran la aplicabilidad de los cartuchos Oasis MAX para la preconcentración de las penicilinas estudiadas en muestras complejas de agua residual a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$. La metodología optimizada puede aplicarse fácilmente, con la instrumentación adecuada, para una primera estimación de la presencia de estos analitos en muestras de esta naturaleza.

4.4.2. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE LECHE

4.4.2.1. SELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Como ya indicamos anteriormente, las estrategias que se utilizan para la extracción de antibióticos de muestras de leche, implican la precipitación de proteínas con disolventes orgánicos (eg. metanol, acetonitrilo), solos o en combinación con ácidos fuertes (eg. HCl, H₂SO₄, TCA). Además, se han utilizado otras metodologías preparativas, como son la desproteinización mediante sales inorgánicas, ultrafiltración (apartado 1.1.1.), etc..

Se han evaluado seis procedimientos de desproteinización de la leche diferentes para comprobar cual de ellos permitía obtener mejores recuperaciones de los antibióticos estudiados. Los procedimientos empleados se describen detalladamente en el apartado 3.3.4.2. y se indican a continuación:

- Método 1: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **ácido clorhídrico**.
- Método 2: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **wolframato sódico en medio ácido**.
- Método 3: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **wolframato sódico y sulfato de níquel en medio ácido**.
- Método 4: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **acetonitrilo**.
- Método 5: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **n-hexano**.
- Método 6: Desproteinización de la leche y extracción de los antibióticos β -lactámicos empleando **ultracentrifugación (UF)**.

Las recuperaciones se evaluaron para las ocho penicilinas (50 μ g) adicionadas a muestras de leche, tras comprobar que se encontraban libres de los antibióticos estudiados a los límites de detección del ensayo propuesto. En el caso de los métodos 4, 5 y 6 las cantidades de muestra ensayada son menores debido a las dificultades

técnicas encontradas durante la aplicación del método con volúmenes de leche de 250 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 85.

Tabla 85. Estudio de recuperación de las penicilinas estudiadas en leche en función del procedimiento de extracción aplicado.

Antibiótico	Recuperación, %							
	Método 1 ^a (HCl)	Método 2 ^b (WO ₄)	Método 3 ^c (WO ₄ /Ni ²⁺)	Método 4 ^d (ACN)	Método 5 ^e (n-hexano)	Método 6 ^f (UF)		
	250 mL	250 mL	250 mL	100 mL	50 mL	10 g		
						F1*	F2*	
AMOX	5	12	13	ND	ND	64	24	
AMPI	32	32	54	59	ND	66	25	
PENG	35	79	83	78	1	76	19	
PENV	50	86	73	66	2	67	13	
OXA	50	78	66	32	1	58	7	
CLOX	33	88	85	29	3	60	4	
NAFCI	30	56	48	12	2	51	3	
DICLOX	16	49	39	10	2	42	ND	

*F1: membrana de celulosa (AMICON Ultra-4[®]), F2: membrana de polietersulfona (CENTRICON Plus-4[®]), ^aRSD = 5 – 15%, ^{b,c}RSD = 1 – 10%, ^dRSD = 6 – 12%, ^eRSD = 8 – 30%, ^fRSD = 1 – 8%, ND: no detectado.

Como se deduce de la comparación de los distintos procedimientos utilizados, el empleo de wolframato sódico (*método 2*) como agente precipitante permite obtener mejores recuperaciones de cada antibiótico que aquellas obtenidas mediante el tratamiento con ácido clorhídrico (*método 1*) ó con los procedimientos basados en la extracción con disolventes orgánicos (*método 4 y 5*).

Por otra parte, los resultados conseguidos con el *método 3*, basado en la adición de sulfato de níquel como agente precipitante (ver apartado 1.1.1.), no suponen una mejora significativa de las recuperaciones obtenidas con el *método 2*, por lo que se descartó para futuros ensayos.

El rendimiento de extracción mediante ultrafiltración (UF), depende de la naturaleza de la membrana de exclusión molecular. Así, las recuperaciones obtenidas con la membrana de polietersulfona (CENTRICON Plus-4[®]) son muy pequeñas, debido a que se produce una adsorción no específica de las penicilinas en el filtro que aumenta en el caso de los compuestos más apolares. De hecho, cuando una disolución acuosa

de los antibióticos se hace pasar a través del mismo filtro, se obtienen recuperaciones comprendidas entre el 8 y el 92%. En el caso de la membrana de celulosa (AMICON Ultra-4®), las recuperaciones obtenidas para la preconcentración de 10 g de leche son superiores al 40% (RSD < 8%) para todos los antibióticos estudiados. Además, las recuperaciones obtenidas empleando muestras acuosas fueron del 73 – 97% (RSD < 7%), superiores a las conseguidas con la membrana de polietersulfona.

En líneas generales, estos resultados son mejores que los obtenidos con los otros procedimientos, sobretodo para las penicilinas anfotéricas AMOX y AMPI. Sin embargo, la necesidad de utilizar pequeñas cantidades de muestra supone un obstáculo para poder alcanzar los bajos límites de detección requeridos para este tipo de muestras [85].

En consecuencia, se eligió el **método 2** que consiste en la precipitación de proteínas empleando **wolframato sódico** como procedimiento de extracción ya que permitiría obtener buenos porcentajes de recuperación para elevados volúmenes de muestra.

El extracto de leche obtenido tras este proceso, se limpia y preconcentra mediante extracción en fase sólida según el procedimiento optimizado en el apartado 4.3. de este Capítulo (Parte Experimental, apartado 3.3.4.2.).

Los **límites de detección y cuantificación** obtenidos después de la extracción y preconcentración de 75 mL de muestra de leche según el método propuesto, se recogen en la tabla 86.

Los valores de LD obtenidos para las penicilinas isoxazólicas (OXA, CLOX y DICLOX) y NAFCl, son comparables a los obtenidos por otros autores mediante otros métodos cromatográficos con detección UV [14,32] y son inferiores a los LMRs establecidos por la legislación [85]. Así pues, el método puesto a punto permite la determinación de estos antibióticos sin necesidad de emplear HPLC-MS o métodos tediosos de derivatización aplicados a su análisis mediante HPLC-UV.

Sin embargo, en el caso de AMOX, AMPI y PENG, los límites de detección obtenidos se encuentran por encima de los LMRs establecidos por la legislación [85] (4

$\mu\text{g L}^{-1}$), por lo que para trabajos futuros, deben buscarse nuevas alternativas que permitan mejorar la sensibilidad del proceso cromatográfico descrito.

Tabla 86. Límites de detección y cuantificación obtenidos para las ocho penicilinas de interés tras la preconcentración de 75 mL de leche y calculados como tres y diez veces la relación señal/ruido, respectivamente.

Antibiótico	LD, ng mL ⁻¹	LQ, ng mL ⁻¹
AMOX	99.8	333
AMPI	26.6	88.7
PENG	19.2	64.1
PENV	15.4	51.5
OXA	7.3	24.2
CLOX	8.9	29.5
NAFCI	0.9	2.9
DICLOX	2.8	9.3

La precisión del método propuesto se ha evaluado en términos de **repetibilidad** (en el día) y **reproducibilidad** (entre días) analizando 75 g (ca. 75 mL) de leche enriquecida con 30 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los antibióticos estudiados, siguiendo la metodología propuesta.

A partir de los datos mostrados en la tabla 87, se comprueba que las recuperaciones conseguidas tanto en los ensayos de reproducibilidad como en los de repetibilidad son satisfactorios $> 88\%$ (RSD $< 8\%$).

Estos resultados son comparables o incluso mejores a algunos trabajos descritos en la bibliografía para el mismo tipo de compuestos y muestra, empleando HPLC-UV [33] y HPLC-ESI-MS/MS [94] y utilizando, en ambos casos, cartuchos C₁₈ como sistema de preconcentración.

En la figura 131 se presenta el cromatograma correspondiente a un extracto de leche obtenido empleando el procedimiento descrito en el apartado 4.5.2.1. (*método 2*) y el correspondiente a una muestra de leche enriquecida con 2.25 μg (30 ng mL⁻¹) de cada uno de los ocho antibióticos estudiados, analizada siguiendo el procedimiento optimizado.

Tabla 87. Estudio de recuperación realizado en muestras de leche enriquecidas con la penicilinas estudiadas (30 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) empleando el procedimiento optimizado ($n = 3$).

Antibiótico	Añadida, ng mL^{-1}	Repetibilidad (en el día)		Reproducibilidad (entre días)	
		R, %	RSD, %	R, %	RSD, %
AMOX	30	ND ^a	-	ND	-
	50	ND	-	ND	-
AMPI	30	ND	-	ND	-
	50	ND	-	ND	-
PENG	30	< LQ	-	< LQ	-
	50	103	7	104	7
PENV	30	< LQ	-	< LQ	-
	50	104	0.7	101	4
OXA	30	103	0.6	104	0.5
	50	100	0.7	99	1
CLOX	30	96	2	98	3
	50	102	8	106	8
NAFCI	30	98	0.8	99	1
	50	100	0.2	98	2
DICLOX	30	93	1	93	1
	50	93	0.6	89	5

^aND: no detectado.

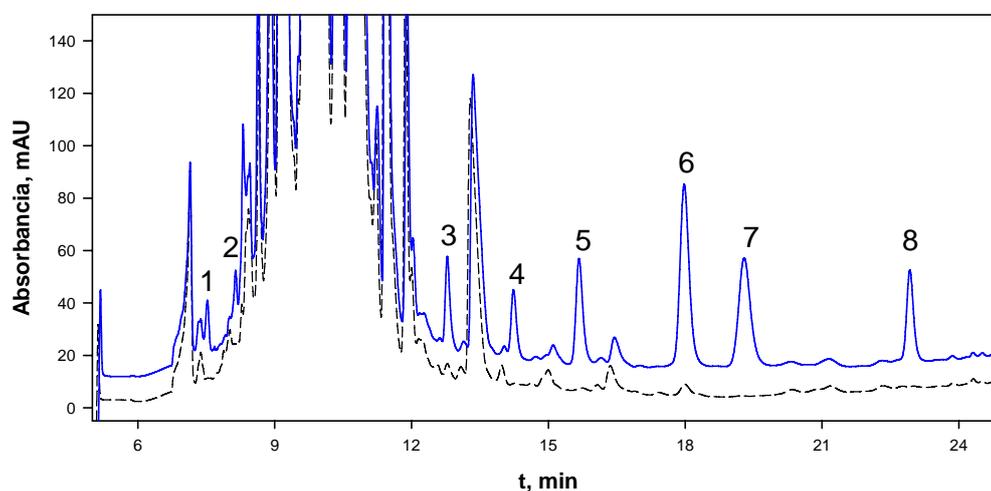


Figura 131. Cromatogramas obtenidos para 75 mL de una muestra de leche después de la extracción mediante wolframato sódico en medio ácido y preconcentración con cartuchos Oasis MAX: (--) muestra sin enriquecer y (—) muestra enriquecida con los ocho antibióticos β -lactámicos (30 $\mu\text{g L}^{-1}$): (1) AMOX, (2) AMPI, (3) PENG, (4) PENV, (5) OXA, (6) CLOX, (7) NAFCI y (8) DICLOX. Los cromatogramas correspondientes a la leche enriquecida se encuentran elevada 10 mAU con respecto al cromatograma sin enriquecer.

4.4.2.2. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS EN LECHE

Se han analizado distintas muestras de leche obtenidas siguiendo un procedimiento certificado en el Instituto Lactológico de Lekumberri (Navarra, España). Las muestras se centrifugan a 13800 g (4 °C) durante 30 min para eliminar la materia grasa y seguidamente, el extracto se desproteinizó y preconcentró siguiendo el procedimiento optimizado en este Capítulo (apartado 3.3.4. de la Parte Experimental).

En la tabla 88 se presentan las recuperaciones obtenidas para las distintas muestras de leche analizadas.

Como puede observarse, los valores obtenidos fueron excelentes para todos los antibióticos y niveles de concentración ensayados, exceptuando aquellas muestras en las que la concentración de los antibióticos era inferior a los LQ establecidos en el método cromatográfico desarrollado.

Tabla 88. Estudio de recuperación para las penicilinas estudiadas en leche en las condiciones óptimas de medida (apartado 3.4.2.2.) ($n = 3$).

Muestra	Antibiótico	Añadida, ng mL ⁻¹	Encontrada, ng mL ⁻¹	R, %	RSD, %
2	PENG	50	< LQ	ND	-
1		150 ^a	140 ± 11	93	8
4	Blanco	-	ND	ND	-
3	AMOX	250 ^a	< LQ	ND	-
5		300	273 ± 5	91	2
6		900	791 ± 10	88	1
7		2700	2443 ± 43	90	2

^aVolumen de muestra 45 mL, ^bND: no detectado.

4.4.3. DETERMINACIÓN DE PENICILINAS EN MUESTRAS DE PIENSO

4.4.3.1. ESTUDIOS PREVIOS

Antes de realizar los estudios correspondientes a la optimización del proceso de extracción de amoxicilina y penicilina V, empleando la técnica PLE, se evaluó la **estabilidad térmica** de los analitos.

Con este fin, se calentaron disoluciones de ambos antibióticos en acetonitrilo, agua y metanol durante 10 y 20 min, a 50 °C y a dos niveles de concentración, similares a los adicionados habitualmente en piensos medicados: 200 mg kg⁻¹ (50 mg L⁻¹) y 500 mg kg⁻¹ (125 mg L⁻¹).

Las disoluciones se analizaron por cromatografía y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 89. Ambas penicilinas permanecen estables cuando el disolvente es agua o acetonitrilo. Sin embargo, cuando el disolvente es metanol, se produce una degradación de ambos compuestos superior al 65% en un tiempo inferior a 20 min. En consecuencia, dicho disolvente fue descartado como posible disolución extractante.

Tabla 89. Recuperación obtenida para AMOX y PENV tras incubación a 50 °C en diferentes disolventes (RSD = 0.2 – 7%, n = 3).

Antibiótico, mg kg ⁻¹		Agua		Acetonitrilo		Metanol	
		10 min	20 min	10 min	20 min	10 min	20 min
		R, %	R, %	R, %	R, %	R, %	R, %
AMOX	200	100	99.5	100	92	81	45
	500	100	100	100	98	88	42
PENV	200	100	100	100	100	84	62
	500	100	100	100	100	76	60

Tras realizar las primeras extracciones de la muestras de pienso, se observó un importante grado de turbidez del extracto, por lo que era necesario una etapa adicional de **filtrado** antes del análisis cromatográfico.

Para descartar una posible retención inespecífica de los analitos en los filtros, se evaluaron membranas de distinta naturaleza (acetato de celulosa, fibra de vidrio y

nylon) para la filtración de 10 mL de una disolución de 50 mg L⁻¹ de AMOX y PENV. Se comprobó que las recuperaciones obtenidas eran satisfactorias en todos los casos (ca. 100%).

4.4.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Teniendo en cuenta la de estabilidad de la AMOX y la PENV en los distintos disolventes no clorados, evaluados anteriormente (apartado 4.5.3.1.), se seleccionaron agua, acetonitrilo y mezcla de ambos en distintas proporciones para llevar a cabo la extracción de los antibióticos en muestras de pienso.

Por lo que respecta a la temperatura de extracción, se seleccionó el valor de 50 °C para realizar el estudio, pues con él se asegura la estabilidad térmica de los compuestos en el tiempo que habitualmente suele durar un proceso de extracción de estas características (< 15 min).

Los ensayos se realizaron empleando 5 g de una muestra de pienso enriquecido con 200 mg kg⁻¹ y 500 mg kg⁻¹ de AMOX y PENV, según se describe en el apartado 3.4.3. de la Parte Experimental, empleando un tiempo de precalentamiento de 5 min, un volumen de flush del 60%, una presión de 1500 psi y 1 ciclo de extracción.

De acuerdo con algunos autores [95] y, al igual que en el caso de las muestras de aguas residuales y leche (apartados 3.4.1. y 3.4.2.), la calibración debe realizarse empleando disoluciones que tengan una composición lo más similar posible a la muestra. Por ello se prepararon calibrados a partir de los extractos del blanco, obtenidos en las distintas condiciones de extracción y enriquecidos con ambas penicilinas en el intervalo de 0 a 1000 mg kg⁻¹ (0 – 250 mg L⁻¹). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 90.

Según los resultados obtenidos para cada antibiótico, la mayor eficiencia de extracción para AMOX (ca. 86%) (RSD \leq 6%) se consigue con la mezcla hidroorgánica **acetonitrilo-agua (25:75, v/v)** y en el caso de PENV (ca. 95%) (RSD < 3%) para la mezcla de extracción **acetonitrilo-agua (50:50, v/v)**. Mayores proporciones de acetonitrilo disminuían la recuperación de ambos analitos ya que son

poco solubles en este disolvente. Por otra parte, un incremento del volumen de agua en la mezcla de extracción origina extractos más turbios y un incremento del efecto matriz que disminuye la sensibilidad del ensayo.

Tabla 90. Influencia de mezcla de disolventes de extracción en la recuperación de 200 y 500 mg kg⁻¹ de AMOX y PENV en pienso utilizando extracción presurizada con disolventes (PLE) (n = 3).

Mezcla de disolventes		Añadida, ng mL ⁻¹	AMOX			PENV		
ACN	Agua		Encontrada, mg kg ⁻¹	R, %	RSD, %	Encontrada, mg kg ⁻¹	R, %	RSD, %
100	0	200	5.20	3	9	84.0	42	5
		500	58.4	12	6	226	45	2
75	25	200	48.9	24	4	150	76	9
		500	111	22	5	419	84	3
50	50	200	113	57	3	190	95	2
		500	296	59	3	470	94	3
25	75	200	171	86	6	122	61	5
		500	400	80	2	301	60	7
0	100	200	97.9	50	15	83	41	13
		500	163	33	12	245	49	14

Abreviaturas: ACN: *acetonitrilo*.

El volumen total de disolvente que se va a emplear en el proceso de extracción depende de la combinación de tres factores: *número de ciclos de extracción*, *tamaño de la célula PLE* y *volumen empleado en cada extracción (flush)*. El *%flush* indica la cantidad de disolvente (calculado en % con referencia al volumen de la célula de extracción) que va a ser utilizado.

Se han ensayado dos **tamaños de célula** diferentes, 22 y 11 mL para la extracción de las penicilinas estudiadas en la misma masa de muestra (5 g de pienso). En el primer caso, el extracto obtenido se enrasó a 50 mL y en el segundo, a 20 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 132.

Las recuperaciones obtenidas demuestran que el aumento del tamaño de célula no produce mejoras significativas en la extracción. Además, los límites de detección conseguidos en el caso de emplear células de 11 mL, fueron menores que cuando se usaron las de 22 mL.

Por otra parte, el volumen necesario para llevar a cabo el mismo tipo de extracción es inferior al empleado con la célula de mayor tamaño, lo que supone una menor dilución de la muestra y menor gasto de disolvente.

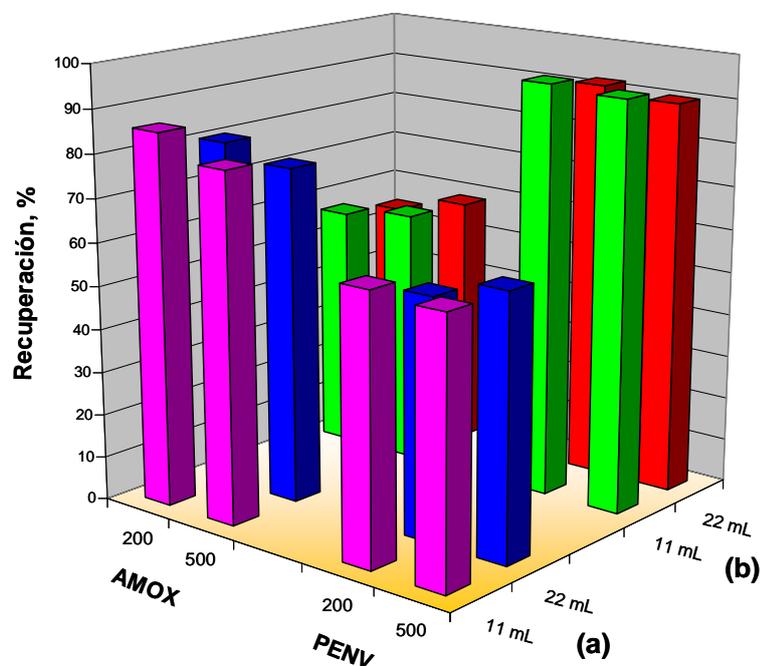


Figura 132. Influencia del tamaño de la célula de extracción PLE en la recuperación de 200 y 500 mg kg⁻¹ de AMOX y PENV en pienso. Condiciones de extracción: (a) acetonitrilo-agua (25:75, v/v) y (b) acetonitrilo-agua (50:50, v/v), T = 50 °C, P = 1500 psi, 1 ciclo, volumen de “flush” 60% (RSD = 3 – 9%, n = 3).

En general, la eficiencia de la extracción aumenta al hacerlo en **número de ciclos** en los que se efectúa el proceso, siendo el volumen total de disolvente, constante. En la figura 133, se muestran las recuperaciones obtenidas para la PENV y AMOX cuando el proceso de extracción se llevó a cabo en las mismas condiciones, empleando 1 ciclo (60% *flush*) ó 2 ciclos (120% *flush*).

Como puede observarse, un aumento del número de ciclos de extracción, no origina una mejora significativa de las recuperaciones obtenidas para ambos analitos, incrementándose el tiempo del ensayo (de 13 a 20 min), cuando se realizan 2 ciclos.

Finalmente, se seleccionó **1 ciclo de extracción** para la realización del ensayo, **60% de flush** y un **tamaño de célula de extracción de 11 mL**.

El tiempo total del proceso de extracción fue de **13 min por muestra**, inferior al descrito por Gamba y col. (50 min) para el análisis de AMOX y AMPI, empleando

como técnica de extracción agitación mecánica [96] y Gramse y col (35 min) para el análisis de PENG procaína, empleando agitación mecánica, sonicación y SPE en cartuchos Strata-X [97].

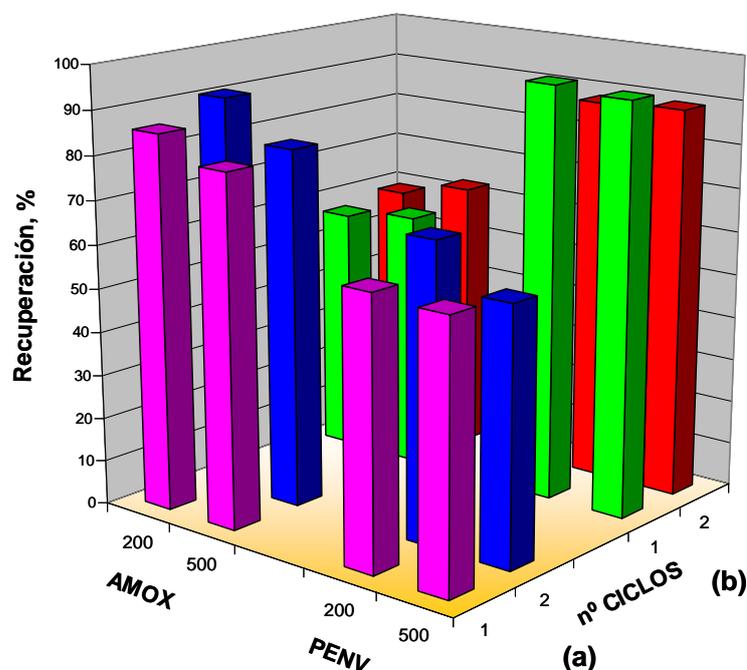


Figura 133. Influencia del n° de ciclos de extracción en la recuperación de 200 y 500 mg kg⁻¹ de AMOX y PENV en pienso. Condiciones de extracción: (a) acetonitrilo-agua (25:75, v/v) y (b) acetonitrilo-agua (50:50, v/v), T = 50 °C, P = 1500 psi, volumen de célula 11 mL, volumen de “flush” 60% (RSD = 3 – 9%, n = 3).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción de la PENV y AMOX (tabla 65, apartado 3.4.3. de la Parte Experimental), se evaluó la *repetibilidad* y *reproducibilidad* del método propuesto analizando muestras de pienso enriquecido con ambos antibióticos a 200 mg kg⁻¹ y 500 mg kg⁻¹ mediante el procedimiento optimizado en el mismo día y en días distintos.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 91, la precisión obtenida en todos los casos es excelente, con recuperaciones superiores al 80% para AMOX y al 93% para PENV. Estos datos son comparables o incluso mejores a los obtenidos empleando otras técnicas analíticas tales como ensayos microbiológicos [98], o SPE-HPLC-UV [97].

Tabla 91. Repetibilidad y reproducibilidad obtenida para muestras de pienso (5 g) enriquecidas con 200 y 500 mg kg⁻¹ de AMOX (RSD < 6%) y PENV (RSD < 3%) (n = 3).

Antibiótico	Añadida, mg kg ⁻¹	Repetibilidad (en el día)		Reproducibilidad (entre días)	
		Encontrada mg kg ⁻¹	R, %	Encontrada mg kg ⁻¹	R, %
AMOX ^a	200	168 ± 0.4	84	171 ± 10	86
	500	401 ± 1	80	401 ± 9	80
PENV ^b	200	190 ± 2	95	190 ± 4	95
	500	465 ± 1	93	470 ± 12	94

^aExtracción mediante acetoniitrilo-agua (25:75, v/v), ^bExtracción mediante acetoniitrilo-agua (50:50, v/v).

Los límites de detección y cuantificación obtenidos para AMOX son de 7.3 mg kg⁻¹ y 24.5 mg kg⁻¹, respectivamente y en el caso de PENV, el LD es de 3.4 mg kg⁻¹ y el LQ de 11.3 mg kg⁻¹. Los valores calculados son semejantes [55,96,97] o incluso mejores [99] que los obtenidos con otros procedimientos desarrollados para el mismo tipo de muestra conteniendo concentraciones similares de penicilinas.

4.4.3.3. ANALISIS DE PENICILINA V EN UN PIENSO MEDICADO

El método analítico desarrollado se ha aplicado al análisis de PENV en un pienso medicado con una concentración de ca. 250 mg kg⁻¹ según fabricante. Para ello se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado 3.4.3. de la Parte Experimental. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 134, donde se aprecia la ausencia de picos correspondientes a la matriz al tiempo de retención del analito.

En este punto, la selectividad obtenida es excelente teniendo en cuenta que los piensos son matrices complejas de alto contenido proteico y carbohidratos que dificultan la extracción cuantitativa de las drogas de interés [100].

La validación del método se realizó mediante estudios de recuperación adicionando cantidades crecientes (50 mg kg⁻¹ y 100 mg kg⁻¹) de PENV sobre las muestras de pienso medicado.

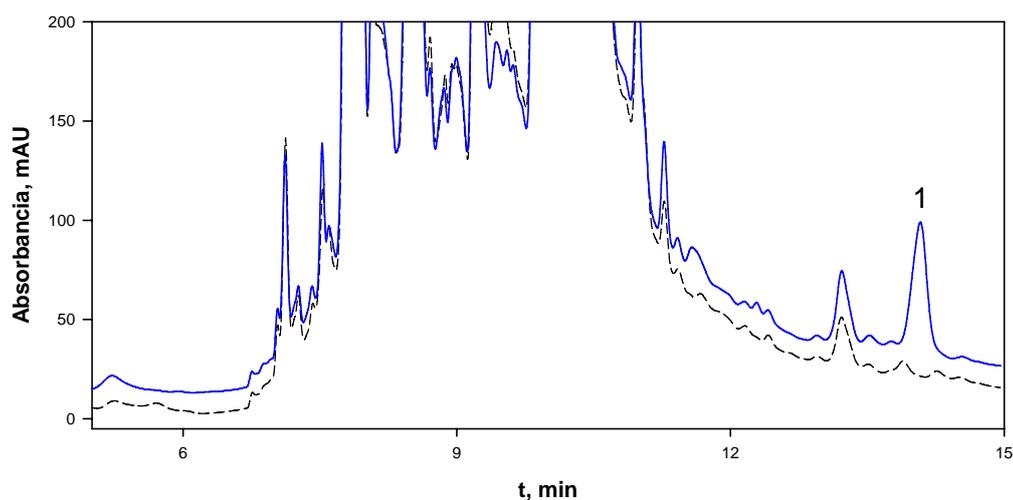


Figura 134. Cromatogramas obtenidos para los extractos conseguidos mediante PLE de (1) PENV (ca. 250 mg kg⁻¹) de 5 g de (-) pienso medicado y (--) pienso sin medicar (blanco). El cromatograma correspondiente al pienso medicado se encuentra elevado 10 mAU con respecto al cromatograma del blanco.

En la tabla 92 se muestran los valores de concentración obtenidos para PENV que no difieren de forma significativa con el declarado por el fabricante (250 ± 50 mg kg⁻¹). Además, los resultados se correlacionan perfectamente con los obtenidos aplicando el inmunoensayo propuesto en el Capítulo V de esta Memoria.

Tabla 92. Análisis de PENV en un pienso medicado mediante HPLC-DAD (n = 6) [101].

Valor nominal ^a , mg kg ⁻¹	PENV añadida, mg kg ⁻¹	PENV encontrada, mg kg ⁻¹	R, %	RSD, %
250 ± 50	0	196 ± 8	98	4
	50	240 ± 9	96	3
	100	286 ± 8	95	3

^aValor nominal del pienso medicado: 2.5 kg ton⁻¹ de penicilina V potásica.

- Se ha puesto a punto un método cromatográfico para la determinación de ocho penicilinas (amoxicilina, ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina, nafcilina y dicloxacilina) mediante HPLC-DAD aplicable al análisis de rutina. De los procedimientos cromatográficos puestos a punto, el método basado en la inyección directa de muestra, sin derivatización precolumna, presenta un mejor comportamiento en términos de *sensibilidad*, *reproducibilidad*, *factor de retención* y *resolución* entre todos los picos cromatográficos. Las condiciones empleadas permiten obtener la separación de los picos cromatográficos en un tiempo máximo de 28 min, con valores de resolución superiores a 1.5, en todos los casos.
- Se han obtenido **calibrados lineales** en el intervalo de concentraciones estudiado, para todos los antibióticos evaluados (AMOX, AMPI, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCI y DICLOX), con pendientes comprendidas entre (0.0796 ± 0.0002) y (0.3039 ± 0.0009) L μg^{-1} . Los límites de detección se encuentran comprendidos entre 6.6 – 21.1 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los de cuantificación se sitúan entre 22 y 70.3 μL^{-1} . La reproducibilidad del método cromatográfico, en términos de RSD es de 0.1 y 6%, para una concentración de antibióticos de 75 y 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.
- Se ha desarrollado un método de preconcentración basado en **extracción en fase sólida (SPE)** para los ocho antibióticos β -lactámicos estudiados, aplicándose al análisis de diferentes tipos de muestra (eg. agua, agua residual, leche). Para ello se

han evaluado dos tipos de adsorbentes: **Bond Elut C₁₈**, de naturaleza apolar, con un mecanismo de adsorción basado en fase reversa y **Oasis MAX**, de naturaleza mixta, con un mecanismo de adsorción combinado entre fase reversa e intercambio aniónico. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el cartucho de SPE Oasis MAX es el que proporciona una mejor recuperación para todos los antibióticos estudiados con valores comprendidos entre 82 y 97% (RSD = 2 – 9%), a excepción de la AMOX, con una recuperación del 52% (RSD < 8%).

- La metodología propuesta se ha aplicado al análisis de **matrices complejas de aguas residuales** empleando muestras procedentes de los caudales de entrada y salida de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), con diversos aportes de contaminación urbana. También se ha analizado un agua residual procedente de un vertido industrial. Los resultados obtenidos proporcionan buenas recuperaciones con excelentes reproducibilidades. En consecuencia, el procedimiento desarrollado es adecuado para el análisis de penicilinas en agua residual a un nivel de concentración del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ y utilizando 250 mL de muestra. Este es uno de los pocos trabajos descritos en la bibliografía que permiten la determinación de estos antibióticos en aguas residuales sin utilizar una detección por espectrometría de masa.
- El mismo procedimiento cromatográfico se ha aplicado a la determinación de las ocho penicilinas en muestras de **leche**. Para ello, se han evaluado diferentes procedimientos de precipitación de proteínas para obtener extractos limpios que puedan posteriormente ser preconcentrados adecuadamente mediante SPE.
- Se ha descartado la utilización de tratamientos de la leche con n-hexano, acetonitrilo, clorhídrico y ultrafiltración debido a las bajas recuperaciones obtenidas. De todos los procedimientos evaluados, el tratamiento con $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, para la precipitación de proteínas de la leche, permite obtener recuperaciones superiores y una mayor eliminación de la materia endógena de la leche.
- Se han obtenido, para un volumen de muestra de leche de 75 mL, recuperaciones superiores al 88% (RSD < 8%) para la familia de las isoxazolilpenicilinas (OXA,

CLOX y DICLOX) y NAFCI con límites de cuantificación ($9.3 - 29.5 \mu\text{g L}^{-1}$) por debajo de los LMRs establecidos por la legislación para este tipo de antibióticos ($30 \mu\text{g L}^{-1}$).

- Se ha puesto a punto, por primera vez, un método que utiliza la extracción acelerada con disolventes para la extracción de muestras de pienso enriquecidas con AMOX y PENV.
- Las condiciones optimizadas son las siguientes: acetonitrilo-agua (50:50, v/v), $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 1500 \text{ psi}$, tiempo de precalentamiento 5 min, volumen de “flush” 60%, célula de 11 mL, 1 ciclo de extracción para AMOX y acetonitrilo-agua (25:75, v/v), $T^a = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 1500 \text{ psi}$, tiempo de precalentamiento 5 min, volumen de “flush” 60%, célula de 11 mL, 1 ciclo de extracción para PENV. En estas condiciones se consigue la extracción cuantitativa de ambas penicilinas con excelentes precisiones.
- El método PLE optimizado, combinado con el método cromatográfico propuesto, permite una disminución drástica tanto del tiempo de análisis como de los límites de cuantificación de ambas penicilinas en este tipo de muestras, en comparación con el método oficial basado en un ensayo microbiológico.
- El método de extracción PLE desarrollado, no requiere una etapa de limpieza de muestra empleando SPE, antes de su inyección en el cromatógrafo de líquidos. A pesar de la complejidad de la matriz evaluada sólo es necesario filtrar la muestra, antes de su inyección en el cromatógrafo, empleando un material adecuado que no retenga los analitos.
- El método desarrollado utilizando PLE-HPLC-DAD permite la determinación de AMOX y PENV en muestras de pienso con un límite de detección de 7.3 y 3.4 mg Kg^{-1} respectivamente.
- Finalmente el método PLE-HPLC-DAD desarrollado se ha validado para el análisis de PENV en pienso empleando una muestra de este producto con un contenido conocido (según especificaciones del fabricante) y estudios de recuperación en muestras enriquecidas con ambos antibióticos.

- [1] D.M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F.D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 406.
- [2] J.A. Harbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *318*, 95.
- [3] K.O. Dasenbrock, W.R. LaCourse, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2415.
- [4] L.K. Sørensen, B.M. Ramussen, J.O. Boison, L. Keng, *J. Chromatogr. B* **1997**, *694*, 382.
- [5] R.F. Straub, R.D. Voyksner, *J. Chromatogr.* **1993**, *647*, 167.
- [6] K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, K.L. Anderson, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* **1993**, *614*, 123.
- [7] J. Keever, R.D. Voyksner, K.L. Tyczkowska, *J. Chromatogr.* **1998**, *794*, 57.
- [8] K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* **1989**, *490*, 101.
- [9] R.F. Straub, M. Linder, R.D. Voyksner, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3651.
- [10] R.D. Voyksner, K.L. Tyczkowska, A.L. Aronson, *J. Chromatogr.* **1991**, *567*, 389.
- [11] A. Di Corcia, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* **2002**, *974*, 53.
- [12] W.A. Moats, *J. Chromatogr.* **1992**, *593*, 15.
- [13] K. Takeba, K. Fujinuma, T. Miyazaki, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* **1998**, *812*, 205.
- [14] P.G. Schermerhorn, P.S. Chu, M.A. Ngoh, *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 973.
- [15] V. Hormazabal, M. Yndestad, *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, *18*, 2467.
- [16] E. Verdon, P. Couëdor, *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 1083.
- [17] W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt, D.G. Kennedy, *Analyst* **1994**, *119*, 2737.

- [18] D.N. Heller, M.L. Smith, O.A. Chiesa, *J. Chromatogr. B* **2006**, *830*, 91.
- [19] H.E. Gee, K.B. Ho, J. Toothill, *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 640.
- [20] W. Luo, E.B. Hansen, C.Y.W. Ang, J. Deck, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1264.
- [21] J.O.K. Boison, L.J.Y. Keng, J.D. MacNeil, *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 565.
- [22] W. Luo, C.Y.W. Ang, *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 20.
- [23] L. Okerman, S. Croubels, S. De Baere, J. Van Hoof, P. De Backer, H. De Brabander, *Food Addit Contam.* **2001**, *18*, 385.
- [24] L.K. Sørensen, L.K. Snor, T. Elkær, H. Hansen, *J. Chromatogr. B* **1999**, *734*, 307.
- [25] C.S. Romero, R. Olmo, C. Teijón, M.D. Blanco, J.M. Teijón, A. Romero, *J. Inorg Biochem* **2005**, *99*, 2395.
- [26] T. Goto, Y. Ito, S. Yamada, H. Matsumoto, H. Oka, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 193.
- [27] W. Luo, C.Y.W. Ang, H.C. Thompson, *J. Chromatogr.* **1997**, *694*, 401.
- [28] D. Hurtaud-Pessel, B. Delepine, "Residues of Veterinary Drugs in Food", en N. Haagsma, A. Ruiter (eds.) *Euroresidue III Conf.* (Veldhoven, Holanda), **1996**.
- [29] B. Pérez, C. Prats, E. Castells, M. Arboix, *J. Chromatogr. B* **1997**, *698*, 155.
- [30] S. Riediker, R.H. Stadler, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1614.
- [31] M. Marchetti, I. Schwaiger, E.R. Schmid, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 64.
- [32] E. Verdon, P. Couëdor, *J. Chromatogr. B* **1998**, *705*, 213.
- [33] C.Y.W. Ang, W. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman, H.C. Thompson, *J. AOAC. Int.* **1996**, *79*, 389.
- [34] P. Kubalec, E. Brandsteterova, A. Bednarikova, Z. Lebensm, *Unters. Forsch.* **1997**, *205*, 85.
- [35] M. McGrane, M. O'Keefe, M.R. Smyth, *Analyst* **1998**, *123*, 2779.
- [36] W.J. Blanchflower, S. Armstrong Hewitt, D. Glenn Kennedy, *Analyst* **1994**, *119*, 2595.
- [37] C.C. Hong, C.L. Lin, C.E. Tsai, F. Kondo, *Am. J. Vet. Res.* **1995**, *56*, 297.
- [38] www.phenomenex.com (Febrero 2006).
- [39] Q. B. Cass, R. F. Gomes, S. A. Calafatti, J. Pedrazolli, *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 235.
- [40] R. Dietrich, E. Usleber, E. Märtilbauer, *Analyst* **1998**, *123*, 2749.

- [41] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica*, Editorial Síntesis, Madrid (España), **2002**.
- [42] F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1391.
- [43] D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 1241.
- [44] F. Sacher, F.T. Lange, H.-J. Brauch, I. Blankenhorn, *J. Chromatogr. A* **2001**, *938*, 199.
- [45] E. Benito-Peña, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 415.
- [46] C.O. Dasenbrock, W.R. Lacourse, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2763.
- [47] E. Verdon, "Determination of penicillin G residues in milk by high performance liquid chromatography", Laboratoire des médicaments vétérinaires, Community Reference Laboratory, **1997**.
- [48] E. Verdon, P. Coëudor, *J. Pharm. Bio. Anal.* **1996**, *14*, 1201.
- [49] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* **2001**, *910*, 69.
- [50] R. Lindberg, P. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind, *Chemosphere* **2004**, *57*, 1479.
- [51] J.H. Shim, M.H. Lee, M.R. Kim, C.J. Lee, I.S. Kim, *Biochem.* **2003**, *67*, 1342.
- [52] J.H. Shim, J.Y. Shen, M.R. Kim, C.J. Lee, I. S. Kim, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7528.
- [53] S. Morales-Muñoz, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1059*, 25.
- [54] H.C. Higgins, J.D.G. McEvoy, *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 819.
- [55] I. Pecorelli, R. Galarini, R. Bibi, Al. Floridi, E. Casciarri, A. Floridi, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 81.
- [56] M.S.S. Curren, J.W. King, *J. Chromatogr. A* **2002**, *954*, 41.
- [57] E.M. Golet, A. Strehler, A.C. Alder, W. Giger, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5455.
- [58] K.C. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1473.
- [59] W.A. Moats, *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 535.
- [60] W.A. Moats, *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 41.
- [61] W.A. Moats, R. Harik-Khan, *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 49.

- [62] E. Verdon, "Determination of ampicillin residues in milk by high performance liquid chromatography", Laboratoire des médicaments vétérinaires, Community Reference Laboratory, **1996**.
- [63] A. Ibach, M. Petz, N. Mencke, R. Krebber, *Analyst* **1998**, *123*, 2763.
- [64] J.O. Boison, L.J.Y. Keng, *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 1113.
- [65] L.K. Sørensen, H. Hansen, K. Snor, *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 1345.
- [66] J.O. Boison, L.J.Y. Keng, *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 1267.
- [67] Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, K. Takeba, H. Nagase, *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 85.
- [68] X. Du, C. Li, H.K. Sun, C.H. Nightingale, D.P. Nicolau, *J Pharm Biomed Anal.* **2005**; *39*, 648.
- [69] R. Harik-Khan, W.A. Moats, *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 978.
- [70] K.L. Tyczkowska, *J. AOAC Int.* **1994**, *77*, 1122.
- [71] W.A. Moats, *J. Chromatogr.* **1990**, *507*, 177.
- [72] "Chemistry and biology of Beta-lactam antibiotics", en R.B. Morin, M. Gorman (eds.) *Penicillins and Cephalosporins: vol. 1*, Academic Press, Nueva York (EE.UU.), **1982**.
- [73] J.C. García-Glez, R. Méndez, J. Martín-Villacorta, *J. Chromatogr. A* **1998**, *812*, 213.
- [74] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2ª ed., J. Wiley & Sons Inc., New York (EE.UU.), **1997**.
- [75] J. Haginaka, J. Wakai, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1568.
- [76] H.S. Huang, J.R. Wu, M.L. Chen, *J. Chromatogr B* **1991**, *564*, 195.
- [77] J. Haginaka, J. Wakai, *Analyst* **1985**, *110*, 1185.
- [78] N.A. Botsoglou, D.J. Fletouris, *Drug residues in foods: Pharmacology, Food Safety and Analysis*, Marcel Dekker Inc., Nueva York (EE.UU.), **2000**.
- [79] M.V. Dabrio, G.P. Blanch, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, M. de Frutos, M. Herraiz, I. Martínez Castro, J. Sanz Perucha, *Cromatografía y electroforesis en columna*, Springer, Barcelona (España), **2000**.
- [80] G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 661.
- [81] K. Schügerl, G. Seidel, *J. Chromatogr. A* **1998**, *812*, 179.
- [82] C.F. Poole, *TrAC* **2003**, *22*, 362.

- [83] www.sigmaldrich.com/theReporter (Febrero 2006).
- [84] ISO 3534-1:1993. “*Statistics -Vocabulary and symbols- Part 1: Probability and general statistical terms*”.
- [85] Reglamento del Consejo 90/2377/CEE, de 26 de junio de **1990** *por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, (DOCE L 224/1990).
- [86] F.F. Reinthaler, J. Posch, G. Feierl, G. Würst, D. Haas, G. Ruckenbauer, F. Marsche, E. Marth, *Water Res.* **2003**, *37*, 1685.
- [87] E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid Phase Extraction Principles and Practice*, J. Wiley & Sons Inc., Nueva York (EE.UU.), **1998**.
- [88] C.A. Pohl, J.R. Stillian, P.E. Jackson, *J. Chromatogr. A* **1997**, *789*, 29.
- [89] T. Safni, Y. Takeuchi, H. Miwa, H. Hashimoto, Moriyama, *J. Chromatogr. A* **1999**, *850*, 65.
- [90] S. Reverté, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1010*, 225.
- [91] S. Kromidas, *Practical problem solving in HPLC*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2000**.
- [92] A. Morse, W.A. Jackson, *Water Air Soil Pollut.* **2004**, *157*, 117.
- [93] M.D. Prat, J. Benito, R. Compañó, J.A. Hernández-Arteseros, M. Granados, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1041*, 27.
- [94] F. Bruno, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3463.
- [95] L. Pallanori, C. Von Holst, C.S. Eskilsson, E. Björklund, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 161.
- [96] V. Gamba, G. Dusi, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 69.
- [97] M.J. Gramse, P.E. Jacobson, *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 679.
- [98] www.aafco.org (Marzo 2006).
- [99] Método de referencia AOAC 967.41 (Código AAFCO 074.00) en *AOAC Feed Check Samples*, **2006**.
- [100] A.A.M. Stolker, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1067*, 15.
- [101] E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondí, G. Orellana, A. Maquieira, A. van Amerongen, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6635.

VII.

CONCLUSIONES FINALES

- Se han **sintetizado siete análogos fluorescentes de las penicilinas** que contienen entidades fluorogénicas de tipo pireno y dansilo. Los análogos se han caracterizado mediante espectroscopia de absorción y emisión, en estado estacionario y con resolución temporal.
- Los ensayos microbiológicos realizados con las penicilinas fluorescentes, demuestran el carácter antibiótico de todas ellas, especialmente del *ácido [2S,5R,6R]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1-ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico*, **PAAP**.
- Se ha evaluado la aplicación de los antibióticos fluorescentes en ensayos de tipo competitivo empleando como elementos de reconocimiento anticuerpos o polímeros de impronta molecular (MIPs).
- Se ha puesto a punto un método analítico para la determinación de penicilinas basado en un **ensayo de tipo competitivo empleando un MIP** como elemento de reconocimiento selectivo y el PAAP como competidor.
- El MIP seleccionado para el ensayo se ha obtenido empleando PENG (1 mmol) como molécula molde, MAA (10 mmol) como monómero funcional, TRIM (10 mmol) como entrecruzante, AIBN (0.6 mmol) como iniciador y acetonitrilo (7.5 mL) como disolvente porógeno. Se ha obtenido un polímero de control en idénticas condiciones empleando Boc-L-Phe-OH como molécula molde.
- El medio más adecuado para el reconocimiento de las penicilinas por parte del polímero es una mezcla acetonitrilo-agua (99:1, v/v). La solubilidad de los analitos en este medio y la elevada proporción de acetonitrilo en el mismo, limitan notablemente la aplicación de este ensayo para el análisis de muestras acuosas, como la leche.
- Se ha demostrado, por primera vez en la bibliografía, la importancia del diseño molecular del análogo fluorescente en el éxito del ensayo competitivo. Los estudios realizados empleando ensayos de competición con PENG radiactiva han demostrado que, de todos los antibióticos fluorescentes sintetizados, el PAAP es el

que presenta una estructura molecular más semejante a la molécula molde. Así, esta sonda es la que muestra mayor reconocimiento por parte del polímero y compete más eficazmente con el analito por sus sitios de unión.

- El MIA desarrollado presenta un intervalo dinámico de 3 – 890 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1.12 – 333 $\mu\text{g mL}^{-1}$), con un LD de 0.32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y es el primer ensayo competitivo descrito en la bibliografía para el análisis de antibióticos β -lactámicos empleando MIPs como elementos de reconocimiento.
- Los ensayos de reactividad cruzada (RC) demuestran que sólo los antibióticos de la familia de las penicilinas son reconocidos por el MIP, especialmente aquellos que guardan una mayor semejanza estructural con la molécula molde (AMOX, AMPI y PENV).
- El ensayo fluorescente desarrollado se ha aplicado con éxito al análisis de PENG en un preparado farmacológico validándose los resultados mediante HPLC-DAD.
- Se ha puesto a punto un **inmunosensor** para la determinación de penicilinas basado en un ensayo de tipo competitivo y medidas de fluorescencia empleando anticuerpos policlonales y PAAP como competidor.
- Se han evaluado distintos anticuerpos comerciales y no comerciales para la realización del ensayo. De todos ellos, el que ha permitido conseguir mejores resultados fue el obtenido a partir de conejos inmunizados con el hapteno 6-aminopenicilánico.
- Se han evaluado siete derivados sintéticos fluorescentes, de tipo pireno o dansilo, de las penicilinas como marcadores para el ensayo de competición. Entre ellos, el PAAP es el que permite obtener una mayor sensibilidad.
- Se han evaluado distintos inmunoabsorbentes para el desarrollo del inmunosensor. De todos ellos, se ha seleccionado Ultralink[®] Immobilized AG Plus.
- El inmunosensor presenta un intervalo dinámico de 6.0 – 191 ng mL^{-1} con un LD de 2.4 ng mL^{-1} , inferior a otros inmunoensayos descritos en la bibliografía, y al LMR legislado para PENG en alimentos.

- Los estudios de RC realizados con el inmunosensor demuestran que el anticuerpo reconoce sobre todo a los antibióticos β -lactámicos que presentan mayor semejanza estructural con la PENG (AMOX, AMPI, PENV).
- El inmunosensor se ha aplicado con éxito al análisis de PENG y AMOX en aguas residuales sin necesidad de preconcentración. Los resultados se han validado empleando SPE-HPLC-DAD. Se ha comprobado que la aplicación del inmunosensor al análisis de AMOX, PENG y CLOX en leche requiere una dilución 1:20 de la muestra desnatada para evitar el efecto matriz, lo cual impide que se alcancen los LMRs fijados por la legislación para estos antibióticos en leche.
- Se comprueba que tanto el **MIP** como el **anticuerpo** empleados en esta memoria, presentan una afinidad máxima para el PAAP frente al resto de los antibióticos fluorescentes sintetizados. Por otra parte, en ambos casos los ensayos competitivos realizados con dicha sonda son los que permiten obtener una mayor sensibilidad en el análisis de PENG.
- Los estudios de reactividad cruzada realizados con MIA y el inmunosensor demuestran, por primera vez, un comportamiento semejante en ambos tipos de elementos de reconocimiento: la RC es máxima para aquellos antibióticos β -lactámicos que presentan mayor analogía estructural con la PENG lo cual demuestra que, tanto la parte 6-aminopenicilánica como el tamaño y la conformación de la molécula tienen un papel fundamental en el reconocimiento de ambos materiales.
- Se ha puesto a punto un **método cromatográfico** para la determinación de ocho penicilinas (AMOX, AMPI, PENG, PENV, OXA, CLOX, NAFCI y DICLOX) empleando SPE-HPLC-DAD, fácilmente adaptable al análisis de rutina.
- Se han evaluado dos tipos distintos de sorbentes de SPE para la preconcentración de los antibióticos en muestras medioambientales y de alimentos. De los dos materiales utilizados, Bond Elut C₁₈ (de naturaleza apolar) y Oasis MAX (de naturaleza mixta, apolar e intercambio iónico), el segundo es el que ha

proporcionado mejores recuperaciones para los antibióticos estudiados (82 – 97%, AMOX 52%).

- Se han evaluado distintos procedimientos de precipitación de proteínas en leche empleando métodos químicos (HCl, $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NiSO}_4$, acetonitrilo, n-hexano) y físicos (ultrafiltración) para la obtención de extractos limpios que se analizan mediante SPE-HPLC-DAD. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ permite obtener LQ inferiores a los LMRs fijados para la determinación de OXA, CLOX, DICLOX y NAFCl en estas muestras, cuando se analizan 75 mL de leche.
- Se ha puesto a punto un método de extracción presurizada con disolventes para la determinación de PENV y AMOX en muestras de pienso. La utilización del método PLE-HPLC-DAD permite acortar notablemente los tiempos de medida del método oficial.
- Los métodos cromatográficos desarrollados se han aplicado al análisis de aguas residuales, leche y pienso. Por otra parte, se han utilizado en la validación del MIA y del inmunosensor desarrollados en esta Memoria.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha permitido el establecimiento de nuevas líneas de investigación en el Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada de la UCM. En ellas, la más importante es la fabricación de nuevos MIPs empleando monómeros hidrofílicos que permitan el análisis de penicilinas en muestras acuosas y el desarrollo de ensayos competitivos más sensibles para la determinación de estos compuestos. Asimismo, la presente Tesis Doctoral permitió la implantación en el grupo de una línea de desarrollo de inmunosensores para el análisis de contaminantes en muestras de interés medioambiental y agroalimentario, en la que se trabaja actualmente.

VIII.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1-ALPP	1-alilpiperazina.	CEE	Comunidad Económica Europea.
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.	CEFA	Cefalosporina.
4-VP	4-vinilpiridina.	CEFAP	Cefapirina.
6-APA	Ácido 6-aminopenicilánico.	CEFQ	Cefquinona.
7-ACA	Ácido 7-aminocefalosporánico.	CEFTF	Ceftiofur.
Ab	Anticuerpo.	CEFX	Cefalexina.
ABCHC	1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo).	CEFZ	Ceftazidina.
ABDV	2,2'-azobis[(2,4-(dimetilvaleronitrilo)].	CITP	Isotacoforesis capilar (en inglés, "Capillary isotachophoresis").
ACN	Acetonitrilo.	CLAV	Ácido clavulánico.
ACVA	4,4'-azobis[(4-(ácido cianoaléxico)].	CLOF	Ácido clofibrico.
ADS	Alquil diol sílica.	CLOR	Cloramfenicol.
AFM	Microscopía de fuerza atómica (del inglés, "Atomic Force Microscopy").	CLOX	Cloxacilina.
Ag	Antígeno.	CP	Polímero de control.
AIBN	2,2'-azobis(isobutironitrilo).	CPGA	Inmunoadsorbente Prosep®-A Media.
AMOX	Amoxicilina.	CREAM	Proyecto "Cartridges with molecularly imprinted recognition elements for antibiotic residues monitoring in milk" (Ref. QLK-1999-00902).
AMPI	Ampicilina.	CZE	Electroforesis capilar de zona (del inglés, "Capillary Zone Electrophoresis").
AMPSA	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano sulfónico.	DAD	Detector de hilera de diodos integrados (del inglés, "Diode Array Detector").
APCI	Sistema interfase de ionización a presión atmosférica (del inglés, "Atmospheric Pressure Chemical Ionization").	DAEM	(Ver DEAEM).
BEZAF	Bezafibrato.	DAM	Ácido [2S,5R,6R]-6-[[5-(dimetilamino)-1-naftil]sulfonil]amino-2-feniletanoil]amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
BLS	Regresión de mínimos cuadrados bivariante.	DAP	Ácido [2S,5R,6R]-6-[[5-(dimetilamino)-1-naftil]sulfonil]amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
BPO	Peróxido de benzoílo.	DDS	Dapsona.
BPV	Buenas Prácticas Veterinarias.		
BSA	Albúmina de suero bovino.		
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.		
CCα	Ácido clavulánico.		
CE	Electroforesis capilar (del inglés, "Capillary Electrophoresis").		
CEC	Electrocromatografía capilar (del inglés, "Capillary Electrochromatography").		

DEAEM	<i>N,N'</i> -dietil aminoetil metacrilato.	FLD	Detector de fluorescencia (del inglés, " <i>Fluorescence Detector</i> ").
DICLOX	Dicloxacilina.	FPD	Detector de llama (del inglés, " <i>Flame-Photometric Detector</i> ").
DMF	Dimetilformamida.	FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (del inglés, " <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ").
DMSO	Dimetilsulfóxido.	FWMH	Anchura a mitad de altura (del inglés, " <i>Full Width at Middle Height</i> ").
DOXY	Doxiciclina.	GC	Cromatografía de gases (del inglés, " <i>Gas Chromatography</i> ").
DOXY	Doxiciclina.	HEMA	2-hidroxietil metacrilato.
DPE	Elución pulsada.	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ").
DVB	Divinilbenceno.	HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución (del inglés, " <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> ").
ECD	Detector de captura de electrones (del inglés, " <i>Electron Capture Detector</i> ").	HRP	Enzima peroxidasa de rábano (del inglés, " <i>Horseradish peroxidase</i> ").
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales.	IBUP	Ibuprofeno.
EDMA	Etilenglicol dimetacrilato.	IC₅₀	Concentración de analito en el punto de inflexión en ajustes de rectas paramétricas.
EE	Efluente de entrada.	IDA	Ingesta Diaria Admisible.
EGDMA	(Ver EDMA).	IPAD	Detector de amperométrico de pulso integrado (del inglés, " <i>Integrated Pulsed Amperometric Detector</i> ").
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase heterogénea (del inglés, " <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ").	ISEC	Cromatografía de exclusión molecular inversa (del inglés, " <i>Inverse Size-Exclusion Chromatography</i> ").
ELL	Extracción líquido líquido.	IT	Sistema interfase de trampa iónica (del inglés, " <i>Ion Trap</i> ").
EMEA	Agencia europea para la evaluación de medicamentos (del inglés, " <i>European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> ").	k	Factor de retención.
ERY	Eritromicina.	LCR	Laboratorios Comunitarios de Referencia.
ES	Efluente de salida.	LD	Límite de detección.
ESI	Sistema interfase de electronebulización (del inglés, " <i>Electrospray Ionization</i> ").		
ETPR	Estreptomicina.		
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (del inglés, " <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ").		
FI	Análisis por inyección en flujo (del inglés, " <i>Flow Injection</i> ").		

LIF	Fluorescencia inducida por láser (del inglés, " <i>Laser Induced Fluorescence</i> ").	NOR	Norfloxacina.
LMR's	Límites Máximos de Residuos.	NPD	Detector de nitrógeno-fósforo (del inglés, " <i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i> ").
MAA	Ácido metacrílico.	OSA	Ácido octanosulfónico.
MAbs	Anticuerpos monoclonales.	OXA	Oxacilina.
MAM	metacrilamida.	OXY	Oxitetraciclina.
MDAA	<i>N,N'</i> -metilen bisacrilamida.	PA	Inmunoadsorbente Ultralink® Immobilized A Plus.
MECK	Cromatografía electrocinética capilar micelar (en inglés, " <i>Micellar electrokinetic capillary chromatography</i> ").	PAA	Ác. pirenoacético (PyCH ₂ COOH).
MEFEN	Ácido meferámico.	PAAM	Ácido [2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2 <i>R</i>)-2-phenil-2-[(piren-1-ilacetil) amino]etanoil} amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
MET	Meticilina.	PAAP	Ácido [2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(piren-1-ilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
MIA	Ensayos basados en impronta molecular.	PAAX	Ácido [2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>]-6-{{(2 <i>R</i>)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)etanoil} amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
MIPs	Polímero de impronta molecular (del inglés, " <i>Molecularly Imprinted Polymers</i> ").	PABs	Anticuerpos policlonales.
MISPE	(MIP-SPE) Extracción en fase sólida basada en polímeros de impronta molecular.	PAG	Inmunoadsorbente Ultralink® Immobilized AG Plus.
MM2	Modelo de mecánica molecular.	PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (del inglés " <i>Polynuclear Aromatic Hydrocarbon</i> ").
MMA	Metilmetacrilato.	PARAC	Parafetamol.
MOPAC	Modelo semiempírico denominado paquete de modelización orbital.	PB	Sistema interfase de haz de partículas (del inglés, " <i>Particle beam</i> ").
MS	Espectrometría de masas (del inglés, " <i>Mass Spectrometry</i> ").	PB	Tampón fosfato.
MSPD	Dispersión de la muestra en fase sólida (del inglés, " <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i> ").	PBAM	Ácido [2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>]-3,3-dimetil-7-oxo-6-({(2 <i>R</i>)-2-fenil-2-[(piren-1-ilbutanoil) amino]etanoil} amino)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.
MWE	Extracción por microondas (del inglés, " <i>Microwave Extraction</i> ").		
NAFCI	Nafcilina.		
NAPX	Napraxen.		
NOEL	Nivel sin efecto adverso observado (del inglés, " <i>no-observed-effect-level</i> ").		

PBAP	Ácido [2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>]-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(4-piren-1ilbutanoil)amino]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.	Q-ToF	Sistema interfase de tandem cuadrupolo-tiempo de vida (del inglés, " <i>Quadrupole Time-of-Flight</i> ").
PBP	Proteína fijadora de penicilina (del inglés, " <i>Penicillin binding protein</i> ").	RAbs	Anticuerpos recombinantes.
PEC	Concentración ambiental prevista (del inglés, " <i>Predicted Environmental Concentration</i> ").	RAM	Material de acceso restringido (del inglés, " <i>Restricted-Access Media</i> ").
PENG	Penicilina G.	RC	Reactividad cruzada.
PENG-K	Penicilina G potásica.	RIA	Radioinmunoensayo (del inglés, " <i>Radioimmunoassay</i> ").
PENG-P	Penicilina G procaína.	RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
PENV	Penicilina V.	R_s	Resolución.
PETRA	Pentaeritriol triacrilato.	SAR	Interferometría diferencial (del inglés, " <i>Synthetic Aperture Radar</i> ").
PIPER	Piperacilina.	SAW	Onda acústica superficial (del inglés, " <i>Superficial Acoustic Wave</i> ").
PLE	Extracción presurizada con disolventes (del inglés, " <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ").	SDS	Doecil sulfato sódico.
PMI	Impronta molecular parcial.	SEM	Microscopía electrónica de barrido (del inglés, " <i>Scanning Electron Microscopy</i> ").
PNEC	Concentración prevista sin efecto (del inglés, " <i>Predicted no-effect Concentration</i> ").	SFE	Extracción con fluidos supercríticos (del inglés, " <i>Supercritical Fluid Extraction</i> ").
PPCP's	Contaminantes farmacéuticos y de productos de uso personal (del inglés, " <i>Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants</i> ").	SPE	Extracción en fase sólida (del inglés, " <i>Solid phase extraction</i> ").
PROCAI	Procaína.	SPR	Resonancia de plasmón superficial (del inglés, " <i>Surface Plasmon Resonance</i> ").
PSD	Distribución de tamaño de poros (del inglés, " <i>Pore Size Distribution</i> ").	TBA	Ácido hidrógenosulfato de tetra-n-butilamonio.
PS-DVB	(SDB) copolímeros de estireno-divinilbenceno.	TCA	Ácido tricloroacético.
PTFE	Politetrafluoroetilo.	TCY	Tetraciclina.
PVA	Polivinilalcohol.	TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés, " <i>Transmission Electron Microscope</i> ").
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo (del inglés, " <i>Quartz Crystal Microbalance</i> ").	TFA	Ácido trifluoroacético.
QqQ	Sistema interfase de triple cuadrupolo (del inglés, " <i>triple-Quadrupole</i> ").	TFMAA	Ácido trifluorometacrílico.
		THF	Tetrahidrofurano.

TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés, “ <i>Thin Layer Chromatography</i> ”).
TOP	Peroxidasa de tabaco (del inglés, “ <i>Tobacco peroxidase</i> ”).
TRIM	Trimetilpropano trimetacrilato.
TS	Sistema interfase de nebulización térmica (del inglés, “ <i>Thermospray Nebulization</i> ”).
TSA	Agar triptona soja (del inglés, “ <i>Tryptone Soya Agar</i> ”).
TYL	Tilosina.
UF	Ultrafiltración.
UI	Unidades inyectables.
WHO	Organización mundial de la salud (del inglés, “ <i>World Health Organization</i> ”).
ϵ	Coefficiente de absortividad ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).
$\lambda_{\text{exc/em}}$	Longitud de onda de excitación (exc) o emisión (em).
τ	Tiempo de vida de emisión.
Φ_{em}	Rendimiento cuántico de emisión.

IX.



ANEXO



Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a los siguientes artículos científicos y patentes de invención:

Patentes:

- G. Orellana, S. Aparicio, M.C. Moreno-Bondi y **E. Benito-Peña**, “*Síntesis de derivados fluorescentes de antibióticos β -lactámicos*”, N. de publicación: ES 2 197 811, País de prioridad: España.

Publicaciones científicas:

- M.C. Moreno-Bondi, **E. Benito-Peña**, B. San Vicente, F. Navarro-Villoslada, M.E. de León, G. Orellana, S. Aparicio, J. Molina, M. Kempe, G.C. Fiaccabrino. “*Molecularly imprinted polymers as selective recognition elements for optical sensors based on fluorescent measurements*” en *Digest of Technical papers. Transducers 03*, 2003, 975-978, IEEE, USA.
- **E. Benito-Peña**, A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, “*Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection*” en *Analytica Chimica Acta*, 2006, 556, 415-422.
- **Elena Benito-Peña**, María C. Moreno-Bondi, Guillermo Orellana, Ángel Maquieira, Aart van Amerongen, “*Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of β -lactam antibiotics*” en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 6635-6642.
- **Elena Benito-Peña**, María C. Moreno-Bondi, Santiago Aparicio, Guillermo Orellana, Josefine Cederfur, Maria Kempe, “*Molecular engineering of fluorescent penicillins for molecularly imprinted polymers assays*” en *Analytical Chemistry*, 2006, 78, 2019-2027.
- **Elena Benito-Peña**, Javier L. Urraca, María C. Moreno-Bondi, “*Development of a fast method for the analysis of penicillin V and amoxicillin in feed samples using PLE and HPLC-DAD*” (manuscrito en preparación).
- **E. Benito-Peña**, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, M. Koets, A. van Amerongen, “*Detection of β -lactam antibiotics in enzyme-linked and fluorescent immunoassays with generic antisera and assay formats*” (manuscrito en preparación).