



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Química

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

EMPLEO DE NANOMATERIALES DE CARBONO, LÍQUIDOS IÓNICOS Y SU
COMBINACIÓN EN EL DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN BIOMATRICES

Farm. Anabela S. Lorenzetti

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Química

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

EMPLEO DE NANOMATERIALES DE CARBONO, LÍQUIDOS IÓNICOS Y SU
COMBINACIÓN EN EL DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN BIOMATRICES

Farm. Anabela S. Lorenzetti

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR), dependiente del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 08 de Septiembre de 2015 y el 1 de Noviembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Adriana G. Lista y la Dra. Claudia E. Domini, Profesoras Titular y Adjunta de las cátedras de Química Analítica Instrumental y Fundamental, respectivamente.”

.....

Farm. Anabela S. Lorenzetti



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el .../.../... , mereciendo
la calificación de(.....)

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Dedicatoria

A mis sobrinos.

A cada una de las personas que aportaron su granito de arena
para que esta Tesis sea una realidad.

Agradecimientos

En las siguientes líneas quisiera expresar mi gratitud a las personas más importantes durante estos últimos años.

En primer lugar agradezco a mis padres, por todo su apoyo y por haber confiado en mí siempre. Porque desde que tengo uso de razón inculcaron en mí el hábito del estudio, trabajo y responsabilidad, y sin esos tres pilares fundamentales nunca podría haber finalizado esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio y oficina, por hacer que esto no sea un trabajo y que todo sea mucho más divertido. Por los innumerables mates compartidos, risas, viajes a congresos y juntadas. Especialmente a Dami, Checho y Nati Gómez por permitirme trabajar con ellos.

A Valeria, que siempre me apoyó para que emprenda este camino.

A Alberto Escarpa, Agustín González Crevillén y la hermosa gente del laboratorio 2L2 de la Universidad de Alcalá, que me recibieron con los brazos abiertos, y con su amabilidad y cariño hicieron que me sienta como en casa. Especialmente a Tania, Silvia, Laura, Marta y Víctor.

A Naza, por festejar conmigo cada uno de mis triunfos y escuchar cada una de mis quejas y fracasos. Por acompañarme y aconsejarme. Por no dejar que baje los brazos. Por los hermosos viajes que compartimos estos años.

A Made, pilar fundamental. Gracias por dedicarme tu valioso tiempo cuando estuve a mil tratando de terminar un trabajo. Por cederme tu oreja en los tiempos difíciles y siempre apoyarme.

A mi madrina, por estar siempre presente.

A Seba, por nunca decir que no a cada una de mis locuras para cumplir con este sueño. Por acompañarme en España, por aguantarme cuando estuve cansada, de mal humor. Por ser mi compañero día a día.

A las instituciones que hicieron posible este trabajo: la Universidad Nacional del Sur por brindarme el lugar de trabajo, el CONICET por otorgarme la beca para poder realizar esta Tesis y la AUIP por otorgarme la beca de movilidad para realizar la pasantía en la UAH.

Por último, quisiera dedicar las palabras finales a mis directoras:

-Adriana: te fuiste temprano, pero sé que desde donde estés estarás leyendo estas palabras: gracias por haberme abierto las puertas del laboratorio y por haberme aceptado desde el primer día. Gracias por tu confianza y apoyo.

-Cali: Nunca voy a encontrar la manera de poder expresar en palabras la enorme gratitud que tengo hacia vos. Ese domingo en la farmacia fue un antes y un después en mi vida. Gracias por cambiar mi destino. Gracias por confiar en mí. Gracias por no dejar que nunca baje los brazos y por llevarme a la búsqueda incesante de aquello que me produce felicidad. Y, sin duda, esta Tesis me produjo mucha felicidad.

Gracias a todos,

Ana

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 hasta la actualidad, los antibióticos han salvado la vida de millones de personas. Sin embargo, su abuso y mal uso son la razón de un incesante aumento de bacterias resistentes a ellos. En lo que a la medicina veterinaria se refiere, la utilización de los antibióticos como promotores de crecimiento podría causar problemas en la salud humana ya que, en muchas ocasiones, no se respetan los tiempos de retirada establecidos por los médicos veterinarios para sacrificar los animales. Consecuentemente organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud, buscan concientizar y regular el consumo de antibióticos, tanto en humanos como en animales, a través de numerosas campañas y reglamentaciones. Por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de nuevos métodos de análisis que acompañen a estas medidas, controlando la presencia de dichos compuestos en los alimentos que ingerimos.

Esta Tesis se centró en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la extracción, preconcentración y determinación de antibióticos (tetraciclinas y macrólidos) en matrices alimentarias. El primer trabajo consistió en la utilización de metodologías de flujo continuo y técnicas de microextracción para la determinación de doxiciclina en grasa de pollo. En el segundo trabajo se desarrolló una nueva metodología de microextracción asistida por ultrasonido para la determinación de tilosina y tilmicosina, también en grasa de pollo, y su posterior análisis por electroforesis capilar. El tercer trabajo consistió en el desarrollo de un sensor electroquímico a base de grafeno para la determinación de tetraciclinas totales en muestras de agua y leche de vaca. El cuarto y último trabajo, se basó en el empleo de irradiación por microondas para la extracción de tetraciclinas en pechuga de pollo seguido de su análisis por electroforesis capilar. Para cada uno de estos trabajos, se utilizaron metodologías basadas en la Química Verde, con el objetivo de que los nuevos métodos sean rápidos, sencillos, económicos y además, generen la menor cantidad de residuos contaminantes.

ABSTRACT

Since the discovery of penicillin in 1928 to the present time, antibiotics have saved the lives of millions of people. However, their abuse and misuse are the reason for a relentless increase in bacteria resistant to them. As far as veterinary medicine is concerned, the use of antibiotics as growth promoters could cause problems in human health given that, in many cases, the withdrawal times established by veterinary doctors to sacrifice animals are not respected. Consequently, international organizations, such as the World Health Organization, seek to raise awareness and regulate the consumption of antibiotics, both in humans and in animals, through numerous campaigns and regulations. Therefore, the development of new methods of analysis that accompany these measures is very important, controlling the presence of these compounds in the food we eat.

This work focused on the development of new analytical methods for the extraction, preconcentration and determination of antibiotics (tetracyclines and macrolides) in food matrices. The first work consisted in the use of continuous flow methodologies and microextraction techniques for the determination of doxycycline in chicken fat. In the second work, a new ultrasound-assisted microextraction methodology was developed for the determination of tylosin and tilmicosin, also in chicken fat, and its subsequent analysis by capillary electrophoresis. The third work consisted in the development of a graphene-based electrochemical sensor for the determination of total tetracyclines in water samples and in cow milk. The fourth and final work, was based on the use of microwave irradiation for the extraction of tetracyclines in chicken breast followed by a capillary electrophoresis analysis. Methodologies based on Green Chemistry were used in each of these works to achieve new, simple, fast and cost effective methods which generate the least amount of polluting waste.

INDICE

Abreviaturas.....	12
Índice de Figuras	13
Índice de Tablas.....	15
Capítulo 1: Introducción	16
1.1. Antibióticos	17
1.1.1. Tetraciclinas.....	18
1.1.1.1. Mecanismo de acción	18
1.1.1.2. Propiedades fisicoquímicas.....	19
1.1.2. Macrólidos	20
1.1.2.1. Mecanismo de acción	21
1.1.2.2. Propiedades fisicoquímicas.....	21
1.2. Utilización de antibióticos en medicina veterinaria	22
1.3. Sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos	24
1.3.1. Prevención y control	25
1.3.2. Legislación	26
1.4. Métodos analíticos para determinar antibióticos a partir de biomatrices	28
1.4.1. Métodos de extracción y/o preconcentración	29
1.4.1.1. Extracción con solventes (líquido-líquido).....	30
1.4.1.2. Extracción en fase sólida (sólido-líquido)	33
1.4.2. Métodos de detección	36
Métodos de <i>screening</i>	36
Métodos analíticos cuantitativos	38
1.5. Tendencias recientes en la preparación de muestras y detección para el análisis de antibióticos a partir de biomatrices	40
Capítulo 2: Objetivos	41
Capítulo 3: Microextracción líquido-líquido en fase reversa para la determinación de doxiciclina en grasa de pollo mediante espectrofotometría UV- visible acoplada a un sistema de análisis en flujo .	44
3.1. Objetivo.....	44
3.2. Resumen.....	46
3.3. Introducción	47
3.4. Materiales y métodos	50
3.5. Resultados y discusión	51
3.6. Conclusiones.....	57

Capítulo 4: Microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonidos de macrólidos en grasa de pollo seguida de determinación electroforética.	58
4.1. Objetivo.....	59
4.2. Resumen.....	60
4.3. Introducción	61
4.4. Materiales y métodos	64
4.5. Resultados y discusión	67
4.6. Conclusiones.....	79
Capítulo 5: Sensor descartable basado en óxido de grafeno electroquímicamente reducido como herramienta para la determinación de tetraciclinas totales	80
5.1. Objetivo.....	81
5.2. Resumen.....	82
5.3. Introducción	83
5.4. Materiales y métodos	87
5.5. Resultados y discusión	90
5.6. Conclusiones.....	101
Capítulo 6: Determinación por electroforesis capilar de residuos de tetraciclinas en pechuga de pollo empleando energía de microondas.....	102
6.1. Objetivo.....	103
6.2. Resumen.....	104
6.3. Introducción	105
6.4. Materiales y métodos	108
6.5. Resultados y discusión	111
6.6. Conclusiones parciales	119
Conclusiones	120
Capítulo 7: Publicaciones.....	123
Artículos publicados	124
Capítulos de libro.....	124
Trabajos presentados a Congresos Internacionales	124
Trabajos presentados a Congresos Nacionales	125

Abreviaturas

[Bmim] BF₄: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio
[Bmim] Cl: cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
AdSDPV: voltamperometría de pulso diferencial de transferencia por adsorción
AdTDPV: voltamperometría de pulso diferencial de separación por adsorción
CE: electroforesis capilar
CTC: clortetraciclina
CZE: electroforesis capilar de zona
DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva
DOX: doxiciclina
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERGO: óxido de grafeno reducido electroquímicamente
GO: óxido de grafeno
IL: líquido iónico
LC: cromatografía líquida
LC-MS: cromatografía líquida acoplada a detector de masas
LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a detector de masas en tandem
LLE: extracción líquido-líquido
LLME: microextracción líquido-líquido
LMR: límite máximo de residuos
LOD: límite de detección
LOQ: límite de cuantificación
MAE: extracción asistida por microondas
OTC: oxitetraciclina
RP-DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa
RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
DER: desviación estándar relativa
R-USAEME: microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos en fase reversa
SDME: microextracción en gota
SPCE: electrodo serigrafiado de carbono
SPE: extracción en fase sólida
TET: tetraciclina
TILM: tilmicosina
TYL: tilosina
UE: Unión Europea
USAEME: microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos

Índice de Figuras

Figura 1: Sitio de acción de tetraciclinas y macrólidos	18
Figura 2: Tetraciclinas, estructura química	18
Figura 3: Grupos ionizables de las tetraciclinas	19
Figura 4: Estructura química de tilosina (A) y tilmicosina (B)	21
Figura 5: Especies animales productoras de alimentos incluidas en datos cuantitativos informados de 2015 a 2017.....	23
Figura 6: Cantidades de antibióticos (por clase) informados para su uso en animales durante 2015-2017 en 116 países.....	24
Figura 7: Esquema del proceso de extracción líquido-líquido	30
Figura 8: Pasos típicos de extracción en fase sólida.....	34
Figura 9: Extracción en fase sólida: Tipos de materiales soporte y adsorbentes.	35
Figura 10: Esquema de un sistema de screening	36
Figura 11: Sistemas de detección en métodos de screening o cribado	37
Figura 12: Distribución de los métodos analíticos utilizados para la determinación de antibióticos en alimentos	39
Figura 13: Sistema de inyección en flujo para determinar Doxiciclina en muestras de grasa de pollo	50
Figura 14: Espectros de grasa extraída con el solvente seleccionado.....	51
Figura 15: Espectros de extractos de grasa sin fortificar utilizando diferentes solventes de extracción	53
Figura 16: Optimización del tiempo de extracción	54
Figura 17: Equipo de Electroforesis Capilar	64
Figura 18: Etapas del proceso de microextracción: a) grasa líquida antes de la extracción, b) muestra emulsificada, c) muestra luego de centrifugar	65
Figura 19: Representación gráfica del proceso analítico completo	66
Figura 20: Electroferograma típico obtenido luego de optimizar las variables electroforéticas.....	70
Figura 21: Electrodo serigrafiado utilizado en este trabajo.....	87
Figura 22: Voltamperogramas cíclicos de tampón fosfato 50 mM pH 6,0 usando diferentes electrodos: SPE, ERGO-10 y ERGO-20.....	91
Figura 23: Imágenes SEM de (a) SPE, (b) ERGO-10, (c) ERGO-20	92
Figura 24: CV de TET 1 mM en SPE, ERGO-10 y ERGO-20.....	93
Figura 25: AdTDPV de TET 0,5 mM en 20 ciclos ERGO-SPE aplicando diferentes amplitudes de pulso.	95
Figura 26: Intensidad del pico 1 de TET 0,5 mM por AdTDPV a diferentes pH.....	96
Figura 27: Voltammogramas para ácido ascórbico 800 μ M (A), fenol 800 μ M (B) y ácido úrico 500 μ M (C)	98
Figura 28: AdTDPV de leche descremada, enriquecida con TET 30 μ M y TET 70 μ M	100
Figura 29: Detalle de las dimensiones del dispositivo de trabajo	109
Figura 30: Proceso de pretratamiento de la muestra propuesto	109
Figura 31: Análisis del tiempo de centrifugado.....	112
Figura 32: Efecto del óxido de circonio	113
Figura 33: Optimización cantidad de ZrO ₂	113
Figura 34: Electroferograma TET, OTC y DOX 20 ppm en tampón electroforético fosfato con 10 % de MeOH	115
Figura 35: Electroferograma TET, OTC y DOX 20 ppm en tampón electroforético fosfato con 10 % de ACN.....	115

Figura 36: Gráfico de Pareto correspondiente al diseño Plackett-Burman	117
Figura 37: Curvas de calibrado en solvente de extracción y sobre la muestra para las 3 TCs estudiadas	118

Índice de Tablas

Tabla 1: Tetraciclinas estudiadas en esta Tesis.....	20
Tabla 2: Macrólidos estudiados en esta Tesis.....	22
Tabla 3: Límites máximos de residuos permitidos para los alimentos estudiados en esta Tesis	27
Tabla 4: Análisis de muestras reales fortificadas aplicando el método propuesto.....	56
Tabla 5: Optimización de las variables de extracción.....	69
Tabla 6: Análisis de muestras reales fortificadas.	73
Tabla 7: Métodos analíticos previamente descritos para la extracción de antibióticos de comida de origen animal desde 1998 a 2018	74
Tabla 8: Análisis TET mediante DPV y AdTDPV en sensores SPCE y ERGO-SPCE	93
Tabla 9: Comparación de ERGO-SPCE con otros sensores basados en ERGO para la determinación de tetraciclinas.....	97
Tabla 10: Estudio de recuperación en presencia de interferentes	97
Tabla 11: Valores de recuperación en el estudio de muestras.	99
Tabla 12: Matriz para el diseño Plackett-Burman	116

Capítulo 1: Introducción

1.1. Antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos a mediados de los años treinta supuso un gran avance para la cura de enfermedades infecciosas, como neumonía, fiebre tifoidea, sífilis, tuberculosis, entre otras¹.

Los antibióticos o antimicrobianos son compuestos que pueden ser producidos por organismos vivos u obtenerse a través de síntesis químicas. Independientemente de su origen, estos compuestos inhiben la reproducción (bacteriostáticos) o provocan la muerte (bactericidas) de los microorganismos. Aquellos antibióticos que son bacteriostáticos detienen el crecimiento bacteriano y limitan la propagación de la infección. Es luego el sistema inmune el responsable de eliminar al patógeno. Por el contrario, los antimicrobianos bactericidas matan las bacterias, de manera que disminuye el número de microorganismos viables².

Existen distintos tipos de clasificaciones para agrupar a estas moléculas. Una de ellas es de acuerdo al proceso metabólico de la bacteria sobre el que actúan. Así, los antibióticos se pueden clasificar como:

- 1) Inhibidores de la síntesis de la pared celular
- 2) Alteradores de la permeabilidad de la membrana plasmática
- 3) Inhibidores de alguno de los pasos llevados a cabo durante la síntesis de proteínas
- 4) Inhibidores de la síntesis de metabolitos necesarios para el desarrollo bacteriano
- 5) Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Dentro del grupo de los inhibidores de la síntesis de proteínas, se encuentran las tetraciclinas y macrólidos. Ellos ejercen sus efectos antibacterianos contra el ribosoma bacteriano, cuyos componentes difieren estructuralmente de los del ribosoma citoplasmático de los mamíferos.

¹Torrades, S. "Farmacología. Uso y abuso de los antibióticos." OFFARM 20 (2001): 82-93.

²Pankey, G. A., and L. D. Sabath. "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections." Clinical infectious diseases 38.6 (2004): 864-870.

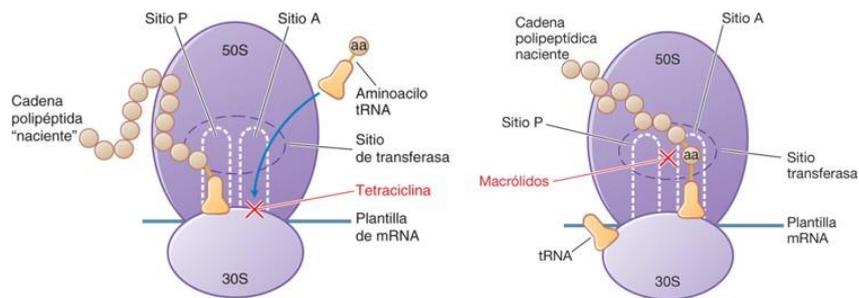
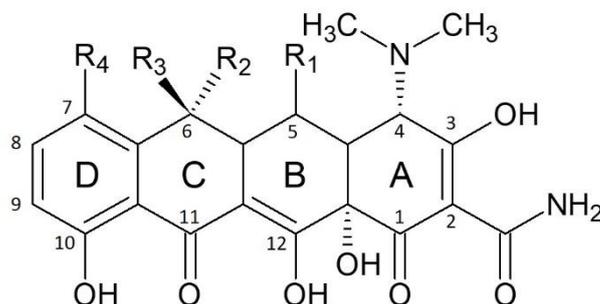


Figura 1: Sitio de acción de tetraciclinas y macrólidos

Fuente: Alfred, G. G., Louis, S. G., Theodore, W. R., & Ferid, M. (1996). *Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics (Vol. 904)*. McGraw-Hill.

1.1.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo de compuestos que poseen cuatro anillos fusionados con un sistema de dobles enlaces conjugados. Las diversas sustituciones en estos anillos explican las diferencias en la farmacocinética de cada fármaco, que se asocian a pequeñas diferencias en su eficacia clínica.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetraciclina	H	CH ₃	OH	H
Oxitetraciclina	OH	CH ₃	OH	H
Clortetraciclina	H	CH ₃	OH	Cl
Doxiciclina	OH	CH ₃	H	H

Figura 2: Tetraciclinas, estructura química

1.1.1.1. Mecanismo de acción

La entrada de estos fármacos en los microorganismos susceptibles se produce por difusión pasiva y por un mecanismo de transporte de proteínas dependiente de energía; mecanismo que es exclusivo de la membrana citoplasmática interna bacteriana. Las cepas no resistentes concentran las

tetraciclinas en el interior de la célula, donde el fármaco se une reversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (**Fig. 1**) y bloquea el acceso del grupo amino acilo-ARNt al complejo ARN-ribosoma en el lugar aceptor. Este mecanismo inhibe la síntesis de proteínas en la bacteria y de esta manera se produce la inhibición del desarrollo bacteriano.

1.1.1.2. Propiedades fisicoquímicas

Las tetraciclinas son sustancias anfóteras por poseer un grupo OH en posición 10 y un grupo amino terciario en posición 4 (**Fig. 2**). Muchas de ellas forman sales solubles en agua, tanto con ácidos como con bases³. Las sales ácidas son estables y se forman por protonación del grupo dimetilamino unido al átomo de carbono 4. Las sales básicas, en cambio, son inestables y se forman con hidróxido de sodio y potasio.

Como puede verse en la **Fig. 3**, en cada tetraciclina existen tres grupos ionizables distinguibles. Allí puede verse también que el pK_{a1} corresponde a la desprotonación de OH del sitio A, el pK_{a2} es debido a la desprotonación del grupo dimetilamino y el pK_{a3} está relacionado con los OH del sitio C.

En la **Tabla 1** se detallan algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes de este grupo de antibióticos.

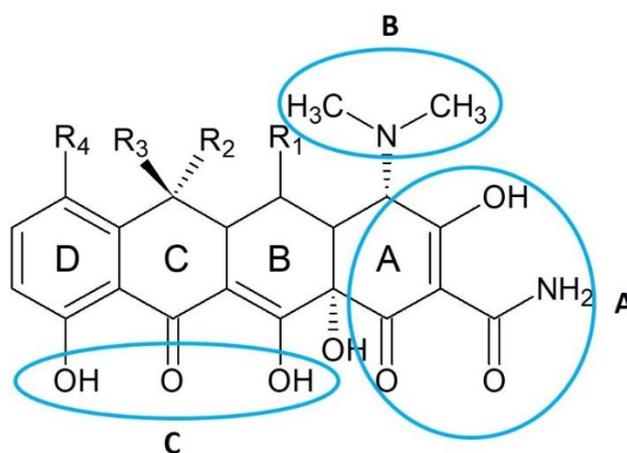


Figura 3: Grupos ionizables de las tetraciclinas

³Riviere, J. Edmond, Arthur L. Craigmill, and Stephen F. Sundlof. "Tetracyclines." *Handbook of Comparative Pharmacokinetics and Residues of Veterinary Antimicrobials*. CRC Press, 2018. 175-228.

Tabla 1: Tetraciclinas estudiadas en esta Tesis

Compuesto	Acidez (pKa)	Masa molecular (g/mol)	Abreviatura
Tetraciclina	3,3/7,7/9,7	444,4	TET
Oxitetraciclina	3,2/7,5/8,9	460,4	OXI
Clortetraciclina	4,5/7,8/9,8	478,8	CLT
Doxiciclina	3,0/7,9/9,2	444,4	DOX

1.1.2. Macrólidos

Los macrólidos son un grupo de antibióticos con estructura de lactona macrocíclica (**Fig. 4**) con dobles enlaces aislados o conjugados, unidos a uno o más desoxiazúcares. La eritromicina fue el primer fármaco de esta clase con aplicación clínica, bien como fármaco de elección o como alternativa a la penicilina en individuos alérgicos a los antibióticos β -lactámicos.

Los macrólidos de uso común en las prácticas agrícolas consisten en anillos que son estructuras de 12, 14, 16 o 17 miembros. Generalmente, son mezclas de más de un componente estructural. Los miembros representativos de la clase de antibióticos macrólidos son la tilosina y la tilmicosina.

Desde el punto de vista químico se clasifican en tres grupos de acuerdo al número de átomos en el anillo lactónico, así:

- a.) Anillo lactónico de 14 átomos: eritromicina, oleandomicina, roxitromicina, claritromicina, diritromicina y fluritromicina.
- b.) Anillo lactónico de 15 átomos: azitromicina.
- c.) Anillo lactónico de 16 átomos: espiramicina, josamicina, diacetil-midecamicina, rokitamicina, tilosina y tilmicosina⁴

⁴Bogialli, Sara, and Antonio Di Corcia. "Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395.4 (2009): 947-966.

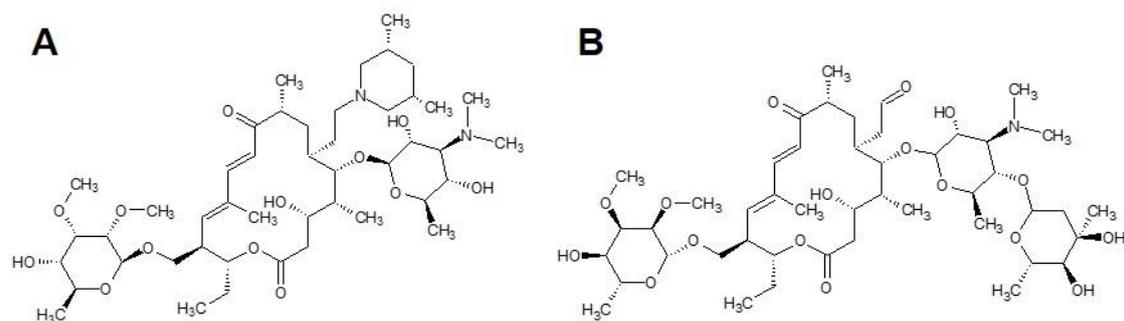


Figura 4: Estructura química de tilosina (A) y tilmicosina (B)

1.1.2.1. Mecanismo de acción

Los macrólidos se unen irreversiblemente al ribosoma bacteriano (**Fig. 1**) e inhiben la translocación en la síntesis de proteínas. También pueden interferir en otros pasos, como la transpeptidación. En general se considera que los macrólidos son bacteriostáticos, pero a dosis altas pueden ser bactericidas.

1.1.2.2. Propiedades fisicoquímicas

Los macrólidos presentan poca solubilidad en agua, tienen aspecto cristalino blanco, son bases débiles que se inactivan en medio ácido; de ahí que se presenten en forma de sales (tartratos, fosfatos, laurilsulfatos) o ésteres que son más resistentes a los ácidos y aumentan su solubilidad en agua y/o biodisponibilidad.

Debido a que la tilmicosina (TILM) es una base de Lewis con dos aminas terciarias, es altamente hidrofóbica en condiciones básicas, con una solubilidad despreciable por encima de pH 10,0 .

Los macrólidos tilosina (TYL) y TILM pueden determinarse por absorción molecular, presentando un máximo de absorción a 282 nm.

En la **Tabla 2** se detallan algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes de este grupo de antibióticos.

Tabla 2: Macrólidos estudiados en esta Tesis

Compuesto	Acidez (pKa)	Masa molecular (g/mol)	Abreviatura
Tilosina	7,73	916,12	TYL
Tilmicosina	8,18	869,15	TILM

1.2. Utilización de antibióticos en medicina veterinaria

El uso de los antibióticos en la ganadería comenzó en los años '50 con el uso de la oxitetraciclina y clortetraciclina como aditivos para piensos. Hoy en día, estos y los miembros seleccionados de las otras clases de antibióticos mencionados anteriormente se usan comúnmente como agentes de tratamiento de enfermedades activas, profilácticos o promotores del crecimiento en la ganadería. En la década de 1980, se estimó que al menos el 60% de todos los animales utilizados para comer estaban expuestos a antibióticos en algún momento de sus vidas. Con las actuales prácticas intensivas de cría de animales, esta cifra puede ser mayor⁵.

Los antibióticos son utilizados de diversas formas en medicina veterinaria:

-Utilización en forma terapéutica: para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas, de la misma manera que en la medicina humana.

-Metafilaxia: implica el control de ciertas variables clínicas de los animales, hasta que una de ellas aumenta por encima de determinado valor, previamente fijado. En este caso, todo el lote de animales es tratado para evitar un brote de la enfermedad.

-Profilaxia: implica la utilización de fármacos para la prevención de enfermedad en animales individuales o grupos de ellos.

-Utilización a concentraciones subterapéuticas: se puede utilizar con objetivos profilácticos y/o de promoción del crecimiento⁶.

El consumo mundial de antimicrobianos en la producción animal de alimentos se estimó en 63151 (\pm 1560) toneladas en 2010 y se proyecta que aumentará globalmente en un 67%, a 105596 (\pm 3605) toneladas, para 2030. Dos tercios del aumento global (67%) en el consumo de antimicrobianos se debe al creciente número de animales criados para la producción de alimentos. El tercio restante es

⁵Fedeniuk, Rick W., and Phyllis J. Shand. "Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices." *Journal of Chromatography A* 812.1-2 (1998): 3-15.

⁶<http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s0e.htm>

imputable a un cambio en las prácticas ganaderas, con una mayor proporción de animales que se prevé producir en sistemas de cría intensiva para 2030⁷.

La **Fig. 5** muestra el número de países que reportaron la utilización de agentes antimicrobianos para su uso en la producción de animales destinados a consumo humano y el tipo de especie animal. Por otro lado, la **Fig. 6** muestra las cantidades de antibióticos (por clase) informados para su uso en animales durante 2015-2017. Este estudio fue llevado a cabo por la OIE en 116 países⁸, y cabe destacar que los analitos y especies animales estudiados en esta Tesis se encuentran dentro de los más utilizados.

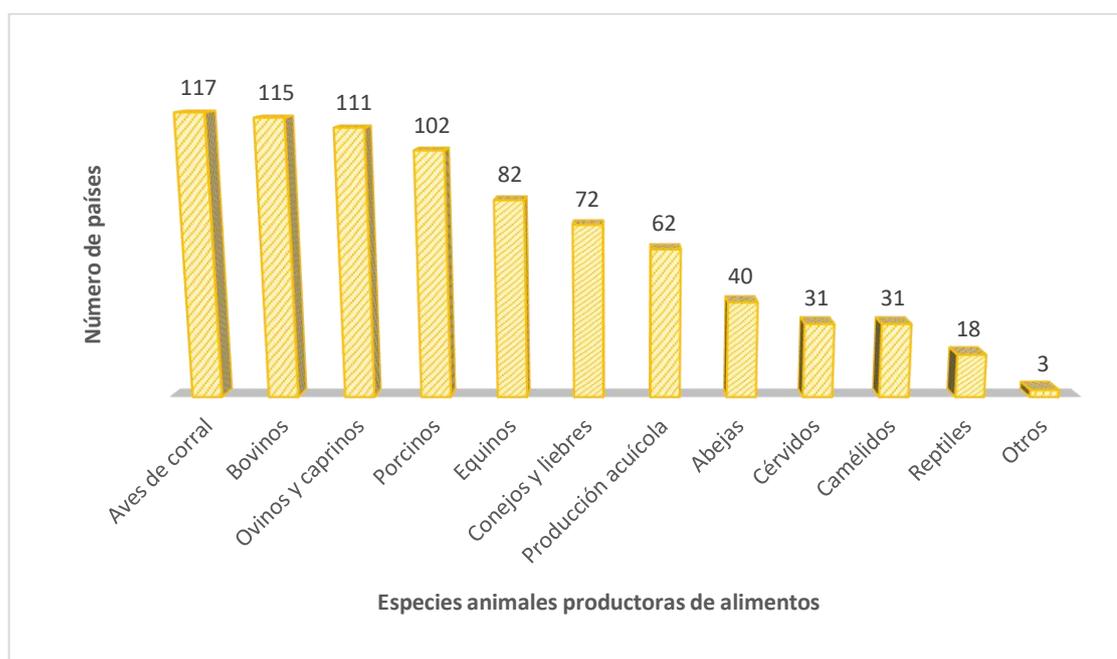


Figura 5: Especies animales productoras de alimentos incluidas en datos cuantitativos informados de 2015 a 2017

Fuente: OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals, better understanding of the global situation, 3rd report, 2018.

⁷Van Boeckel, Thomas P., et al. "Global trends in antimicrobial use in food animals." Proceedings of the National Academy of Sciences 112.18 (2015): 5649-5654.

⁸https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/Annual_Report_AMR_3.pdf

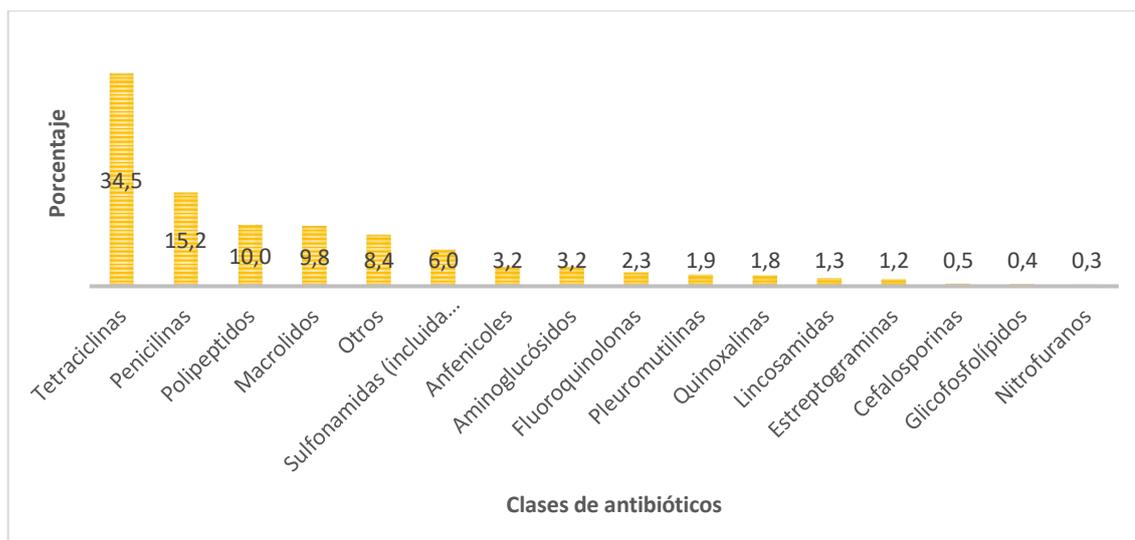


Figura 6: Cantidades de antibióticos (por clase) informados para su uso en animales durante 2015-2017 en 116 países

Adaptado a partir de OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals, better understanding of the global situation, 3rd report, 2018.

1.3. Sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos

Como se dijo anteriormente, los agentes antimicrobianos son medicamentos que se utilizan para tratar las infecciones, en concreto las de origen bacteriano. Estos medicamentos son esenciales para preservar la salud humana o la sanidad y el bienestar animal. Un uso excesivo o inadecuado de los mismos puede inducir la aparición de bacterias resistentes a la acción de estos fármacos, como se ha podido observar en el transcurso de las últimas décadas⁹. Este fenómeno, que se denomina *resistencia a los antimicrobianos*¹⁰, pone en riesgo el control de las enfermedades en todo el mundo y supone una preocupación de primer nivel tanto para la salud humana como para la sanidad animal.

La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Estas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes.

La resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad.

⁹Roca, Ignasi, et al. "The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention." *New microbes and new infections* 6 (2015): 22-29.

¹⁰Davies, Julian, and Dorothy Davies. "Origins and evolution of antibiotic resistance." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74.3 (2010): 417-433.

1.3.1. Prevención y control

La resistencia a los antibióticos se incrementa con el uso indebido y abusivo de estos fármacos y con las deficiencias de la prevención y control de las infecciones. Se pueden adoptar medidas en todos los niveles de la sociedad para reducir el impacto de este fenómeno y limitar su propagación.

La única forma de preservar la eficacia de estos medicamentos en los animales es garantizar un uso responsable y prudente, respetando las normas internacionales de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)¹¹.

Para ello, es indispensable contar con acciones coordinadas entre los sectores de la salud humana, la sanidad animal y la salud ambiental.

Para garantizar un acceso sostenible a antimicrobianos eficaces y seguros, la Asamblea Mundial de la Salud adoptó, en 2015, el Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos¹².

Este plan de acción establece que la vigilancia del consumo de antibióticos y de la resistencia a estos fármacos en humanos y animales es una estrategia clave para luchar contra la resistencia. La vigilancia del consumo de antibióticos puede ayudar a los países a identificar problemas relacionados con el uso de estos fármacos, dirigir sus intervenciones para abordar estos problemas y evaluar estas intervenciones. Con el tiempo, la vigilancia permite comparaciones entre países y dentro de ellos que ayudan a establecer objetivos comunes y a identificar tendencias cambiantes en el consumo de antibióticos.

Para prevenir y controlar la propagación de la resistencia a los antibióticos, el sector agrícola puede:

- Administrar antibióticos a los animales únicamente bajo supervisión veterinaria.
- No utilizar antibióticos para estimular el crecimiento ni para prevenir enfermedades en animales sanos.
- Vacunar a los animales para reducir la necesidad de antibióticos y utilizar alternativas a estos siempre que las haya.

¹¹<http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/>

¹²Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2015. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf> [citado el 26 de noviembre de 2018].

- Fomentar y aplicar buenas prácticas en todos los eslabones de la producción de alimentos de origen animal y vegetal.
- Fomentar la seguridad biológica en las granjas para prevenir las infecciones mediante la mejora de la higiene y el bienestar de los animales.

1.3.2. Legislación

Hoy en día, existe una creciente conciencia de la seguridad alimentaria por parte del consumidor. Como resultado, aumenta la presión sobre los laboratorios responsables del control de calidad de alimentos para verificar la presencia antibióticos en los mismos y garantizar su inocuidad para el consumo humano. El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea (UE), en su reglamento 2017/625, han establecido directivas para el control de residuos de antibióticos en animales vivos y productos animales. Los residuos se dividen en dos grupos (A y B) para los fines de monitoreo y definición de la legislación relacionada con ellos¹³.

Los «residuos de medicamentos veterinarios» se refieren a:

“Todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanecen en los alimentos obtenidos de animales a los que se les ha administrado el medicamento veterinario en cuestión¹⁴”.

El grupo A se refiere a sustancias que tienen un efecto anabólico y sustancias no autorizadas, mientras que el grupo B se refiere a medicamentos veterinarios y contaminantes. Los aminoglucósidos y macrólidos se enumeran en el Grupo B1 (sustancias antibacterianas). Las diversas subdivisiones de estos dos grupos se enumeran en la mencionada Directiva 2017/625¹⁵. El Reglamento 470/2009¹⁶ del Consejo de la UE dispone el procedimiento comunitario para el establecimiento de límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal.

La definición de límite máximo de residuos (LMR) de acuerdo con esta regulación se da como:

¹³McGlinchey, Tara A., et al. "A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices." *Analytica Chimica Acta* 624.1 (2008): 1-15.

¹⁴Cancho Grande, B., MS García Falcón, and J. Simal Gándara. "El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual the use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective o uso Dos antibióticos na alimentación animal: perspectiva actual." *CYTA-Journal of Food* 3.1 (2000): 39-47.

¹⁵<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0625&from=es>

¹⁶<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0470&from=es>

“ La concentración máxima de residuos legalmente permitida en un producto alimenticio obtenido de un animal al que se le ha administrado un medicamento veterinario”¹⁷.

La **Tabla 3** detalla los LMR establecidos por el Codex Alimentarius y la Comisión de la Unión Europea para los alimentos o tejidos y analitos estudiados en esta Tesis.

Tabla 3: Límites máximos de residuos permitidos para los alimentos estudiados en esta Tesis

Analito	Alimento/Tejido	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		Codex Alimentarius ¹⁸	Unión Europea ¹⁹
Tilmicosina	Grasa de pollo	250	75
	Pechuga	150	75
	Leche	-	50
Tilosina	Grasa de pollo	100	100
	Pechuga	100	100
	Leche	100	50
Tetraciclina	Grasa de pollo	-	-
	Pechuga	200	100
	Leche	100	100
Oxitetraciclina	Grasa de pollo	-	-
	Pechuga	200	100
	Leche	100	100
Clortetraciclina	Grasa de pollo	-	-
	Pechuga	200	100
	Leche	100	100
Doxiciclina	Grasa de pollo	-	300
	Pechuga		100
	Leche		Prohibido su uso

Por su parte, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa) en la resolución 565 del año 2015²⁰ estableció las condiciones que deben reunir las aves y las granjas avícolas productoras de aves de corral con destino a faena que se exportan a la Unión Europea. Asimismo, la presente normativa también contempla las exigencias de este mercado referidas a la ausencia de

¹⁷<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>

¹⁸<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>

¹⁹https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf

²⁰<http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/nuevos-requisitos-para-la-exportacion-de-aves-de-corral-la-union-europea>

residuos de antibióticos en las carnes y la constancia, en caso de haberse administrado, de que han sido respetados los períodos de retirada antes del sacrificio de las aves.

Por todas estas razones, es de suma importancia el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el monitoreo y control del buen uso de los antibióticos en los animales destinados a consumo humano.

1.4. Métodos analíticos para determinar antibióticos a partir de biomatrices

Como se ha mencionado anteriormente, el uso generalizado de antibióticos en las prácticas agropecuarias ha dado lugar a la posibilidad de que los residuos de estos compuestos estén presentes en los alimentos consumidos. Por esta razón, el monitoreo de residuos es necesario para asegurar que no estén presentes en niveles que puedan presentar riesgos para la salud del consumidor.

Se han desarrollado y establecido con éxito diversas metodologías analíticas para identificar y cuantificar estos compuestos. Una visión rápida de estos trabajos revela que tienen varios pasos en común²¹, siendo la preparación de la muestra el primero y más dificultoso de ellos, el cual comprende, generalmente, el 80% del tiempo total de análisis²². La preparación de la muestra es el proceso de extracción de analitos específicos de una muestra y la posterior purificación del extracto para aislar los compuestos de interés y eliminar cualquier interferencia de la matriz que pueda afectar el sistema de detección. Incluso con el avance de las técnicas de separación y detección, la preparación de la muestra es una parte fundamental del proceso analítico y es esencial para lograr resultados confiables y mantener el rendimiento del instrumento²³.

La preparación de la muestra implica una etapa de extracción, seguida de la limpieza de los extractos y/o preconcentración de los analitos. Estos pasos son indispensables para cualquier método analítico a desarrollar y varían considerablemente según las diferentes matrices, analitos y técnicas determinativas. Por último, se encuentran los pasos de detección y cuantificación.

²¹Fedeniuk, Rick W., and Phyllis J. Shand. "Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices." *Journal of Chromatography A* 812.1-2 (1998): 3-15.

²²Buszewski, Boguslaw, and Malgorzata Szultka. "Past, present, and future of solid phase extraction: a review." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 42.3 (2012): 198-213.

²³Kinsella, Brian, et al. "Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis." *Journal of Chromatography A* 1216.46 (2009): 7977-8015.

Durante el transcurso de esta sección se realizará una revisión de las principales técnicas de extracción y/o preconcentración de estos analitos y su posterior determinación.

1.4.1. Métodos de extracción y/o preconcentración

Es posible diferenciar dos grandes grupos en procesos de preparación de muestras:

- Extracción de residuos de una sola clase: El objetivo es obtener las recuperaciones máximas de los analitos en una matriz dada²⁴.
- Extracción de residuos multiclase: el objetivo principal es la extracción simultánea de tantos analitos de diferentes clases como sea posible²⁵.

Obviamente, cuanta más variación haya en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos en estudio (pKa, solubilidad, estabilidad, etc.), mayor será la dificultad para encontrar un método de extracción para todos los analitos con recuperaciones aceptables. Además, la complejidad de algunas matrices, requiere pasos de limpieza o dilución de los extractos antes de la detección para evitar los efectos de la matriz. Por lo tanto, hasta ahora, los métodos de extracción multiclase han sido relativamente escasos en comparación con los métodos de residuos de una sola clase. Sin embargo, la situación está cambiando rápidamente, y la disponibilidad de procedimientos simples de extracción multiclase está aumentando en la literatura debido al interés en aplicarlos a los programas de monitoreo de rutina que reducirían considerablemente el tiempo y el esfuerzo dedicado a la preparación de la muestra²⁶.

Otra forma de clasificación comúnmente encontrada en la literatura es de acuerdo las fases involucradas en el proceso de extracción:

- Extracción con solventes (líquido-líquido)
- Extracción en fase sólida (sólido-líquido)

²⁴Lukaszewicz, Paulina, et al. "A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique." *Analytical and bioanalytical chemistry* 410.6 (2018): 1697-1707.

²⁵Saxena, Sushil Kumar, et al. "Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS." *Food chemistry* 260 (2018): 336-343.

²⁶Moreno-Bondi, María Cruz, et al. "An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples." *Analytical and bioanalytical chemistry* 395.4 (2009): 921-946.

1.4.1.1. Extracción con solventes (líquido-líquido)

El fundamento de esta técnica se basa en la distribución o reparto de la muestra entre dos fases inmiscibles en las cuales el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes (**Fig. 7**). En la mayoría de los casos, una fase es un medio acuoso y la otra un solvente orgánico por lo que, frecuentemente, se menciona a esta técnica como *extracción con solventes orgánicos* o simplemente, *extracción con solventes*^{27 28}.

La selectividad y eficacia del proceso de extracción depende de la elección de los dos solventes inmiscibles. Los principales criterios utilizados en la selección del solvente son la inmiscibilidad entre fases y la polaridad del analito/s. Cuando se utiliza una fase acuosa y un solvente orgánico, los analitos más hidrofílicos quedarán preferiblemente en la fase acuosa y los más hidrofóbicos pasarán al solvente orgánico.

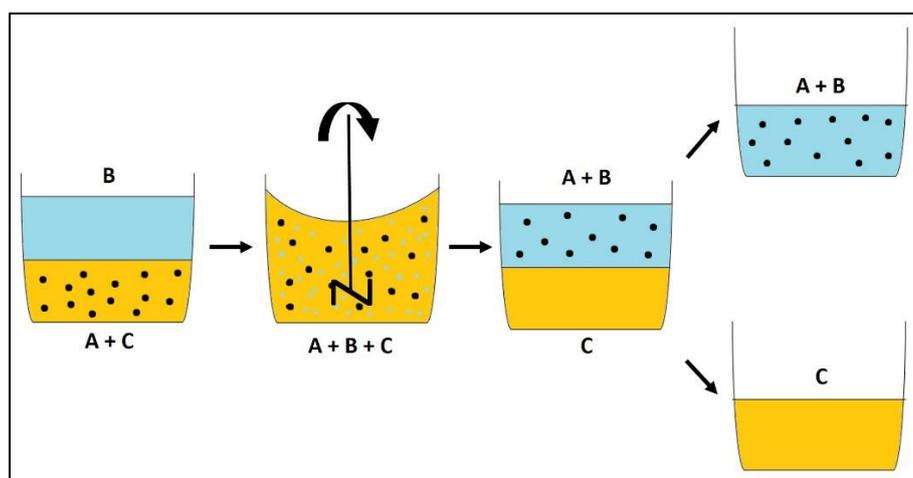


Figura 7: Esquema del proceso de extracción líquido-líquido

Mezcla de partida (A+C), agente extractante (B), analito (A), extracto (A+B) y muestra (C).

La extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) se usa ampliamente como una técnica de tratamiento previo para la separación y la preconcentración de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras acuosas. Sin embargo, algunas desventajas, tales como el uso de grandes volúmenes de muestra y solventes orgánicos tóxicos y, por lo tanto, la generación de grandes

²⁷Cela, Rafael, María del Carmen Casais, and Rosa Antonia Lorenzo. Técnicas de separación en química analítica. Síntesis, 2002.

²⁸Christian, Gary D. Química analítica. Limusa, 1981.

cantidades de residuos contaminantes hacen que la LLE sea lenta y no respetuosa con el ambiente²⁹. En este contexto, la miniaturización de la extracción líquido-líquido convencional surge como una alternativa a este tipo de extracción. En la *microextracción líquido-líquido* (LLME, del inglés *liquid-liquid microextraction*) se utilizan los principios de la extracción líquido-líquido y se aplica a volúmenes muy pequeños tanto de muestra como de agente extractante.

Generalmente, el volumen de agente extractante empleado en esta técnica oscila entre 0,5 y 500 μL ³⁰ con lo que la reducción de volumen frente a la extracción líquido-líquido convencional se encuentra comprendida entre 100 y 1000 veces. Con la utilización de esta técnica de separación se cumple con el criterio ecológico de reducir el empleo de solventes tóxicos.

Asimismo, el volumen de muestra utilizado generalmente está comprendido entre 0,5 y 25 mL y hasta 50 mL³⁰; esto supone una reducción entre 50 y 500 veces frente al volumen utilizado en las técnicas convencionales de extracción líquido-líquido, siendo muy útil para su aplicación en análisis donde la cantidad de muestra que se dispone es limitada.

Algunas variantes de LLME:

- *Microextracción en gota* (SDME, del inglés *single drop microextraction*): implica el uso de una sola gota de solvente para extraer analitos de muestras líquidas o gaseosas³¹;
- *Microextracción en punto nube* (CPME, del inglés *cloud point microextraction*): se utilizan soluciones con tensioactivos que al calentarse por encima de determinada temperatura (la cual depende del tensioactivo), tienen la capacidad de volverse turbias (punto nube) debido a la disminución de la solubilidad del tensioactivo. Al separarse las dos fases, se obtiene una fase rica en analito y tensioactivo, separada del resto de la muestra³².
- *Microextracción líquido-líquido dispersiva* (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*): una mezcla apropiada de un solvente de extracción y un dispersante se inyectan rápidamente en una muestra acuosa produciendo una solución turbia³³;

²⁹Pena-Pereira, Francisco, Isela Lavilla, and Carlos Bendicho. "Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review." *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64.1 (2009): 1-15.

³⁰Kokosa, John M. "Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2019).

³¹Kokosa, John M. "Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 71 (2015): 194-204.

³²Cordero, Bernardo Moreno, et al. "Cloud point methodology: A new approach for preconcentration and separation in hydrodynamic systems of analysis." *Talanta* 40.11 (1993): 1703-1710.

³³Rezaee, Mohammad, et al. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction." *Journal of Chromatography A* 1116.1-2 (2006): 1-9.

- *Microextracción líquido-líquido-líquido* (LLLME, del inglés *liquid-liquid-liquid microextraction*): los analitos de una muestra acuosa pasan a través de una membrana de una fase orgánica (insoluble) hacia otra fase acuosa aceptora³⁴;
- *Microextracción líquido-líquido en fibra hueca* (HF-SME, del inglés *hollow-fiber solvent microextraction*): utiliza una fibra hueca para estabilizar y proteger el solvente de extracción, y el pequeño tamaño de poro de la fibra evita que las moléculas y partículas grandes entren en la fase aceptora, lo que resulta en la limpieza de la matriz de la muestra junto con la extracción³⁵.

Además de estas variantes, han surgido nuevas variantes de microextracción, las cuales utilizan diferentes estrategias para mejorar la eficiencia de extracción: empleo de energía de ultrasonidos o microondas para asistir a la extracción, uso de líquidos iónicos como agente extractante, etc.

Hoy en día, un nuevo concepto de extracción líquido-líquido surge cuando el analito se encuentra en fase oleosa y los analitos tienen cierta hidrofilia: las *extracciones líquido-líquido en fase reversa*, en las cuales el analito se encuentra en una fase oleosa y el solvente de extracción es un medio acuoso, abriendo las puertas al análisis de nuevos analitos y muestras. Dentro de este nuevo grupo de extracciones se puede mencionar la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME, del inglés *reverse phase dispersive liquid-liquid microextraction*) como una alternativa valiosa y ecológica para reemplazar las tediosas técnicas de extracción convencionales, que consumen mucho tiempo. La RP-DLLME se basa en la dispersión de unos pocos μL de una solución acuosa, en forma de finas gotas, en la muestra hidrofóbica. La dispersión obtenida presenta una gran área de superficie de contacto entre la fase donante y aceptora, mejorando así la eficiencia de extracción³⁶. Después de la extracción (que puede durar desde unos pocos segundos a escasos minutos), las fases se separan por centrifugación y la fase acuosa enriquecida por los analitos se recupera para su posterior análisis³⁷. Por lo tanto, la fase sedimentada será una microgota acuosa que se puede inyectar directamente en una

³⁴Zhu, Lingyan, Chiew Boon Tay, and Hian Kee Lee. "Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 963.1-2 (2002): 231-237.

³⁵Xiong, Jun, and Bin Hu. "Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection." *Journal of Chromatography A* 1193.1-2 (2008): 7-18.

³⁶Hashemi, Payman, et al. "Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein." *Talanta* 80.5 (2010): 1926-1931.

³⁷Fernández, Elena, Lorena Vidal, and Antonio Canals. "Rapid determination of hydrophilic phenols in olive oil by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and screen-printed carbon electrodes." *Talanta* 181 (2018): 44-51.

columna de HPLC para fase reversa. De esta forma, se ahorra el tiempo requerido para la evaporación del solvente y la reconstitución.

1.4.1.2. Extracción en fase sólida (sólido-líquido)

La extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid phase extraction*) ha sido una de las estrategias más utilizadas en reemplazo de la clásica extracción líquido-líquido (LLE) en los análisis biológicos, de alimentos y ambientales. SPE es reconocida como una alternativa beneficiosa a la LLE, ya que supera muchos de sus inconvenientes: proporciona un menor consumo de solventes, bajos costos intrínsecos y una reducción del tiempo de procesamiento, sumado a que es posible automatizar todo el proceso. Además, la SPE no requiere separación de fases, lo que resulta en la eliminación de los errores asociados con los volúmenes de extracto medidos/inexactos, una de las principales causas de error encontradas en el análisis de extractos obtenidos por LLE³⁸.

Los principios de SPE son similares a los de LLE, e incluyen una partición de compuestos entre dos fases. En SPE, los analitos que se extraen se dividen entre un sólido (grupos funcionales hidrofóbicos se unen a superficies de partículas sólidas y funcionan como fase extractora³⁹) y un líquido (en lugar de entre dos líquidos inmiscibles como en LLE) y estos analitos deben tener una mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (paso de retención o adsorción). Los compuestos retenidos en la fase sólida se pueden eliminar en una etapa posterior, eluyendo con un solvente que posea una mayor afinidad por los analitos (etapa de elución o desorción). Los diferentes mecanismos de retención o elución se deben a las fuerzas intermoleculares entre el analito, los sitios activos en la superficie del adsorbente y la fase líquida o matriz.

El acondicionamiento de los materiales en fase sólida consiste en poner en contacto la fase adsorbente con solventes orgánicos o agua, a fin de aumentar el área de superficie efectiva y reducir las interferencias. Después de secar el adsorbente (y, posiblemente, eliminar las interferencias) las interacciones entre los analitos y el material en fase sólida se interrumpen mediante el lavado de

³⁸Plotka-Wasyłka, Justyna, et al. "Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 77 (2016): 23-43.

³⁹Christian, Gary D. *Química analítica*. Limusa, 1981.

pequeños volúmenes de solventes orgánicos, lo que conduce a la desorción de los analitos objetivo. En la **Fig. 8** se esquematizan los pasos típicos de una extracción en fase sólida.

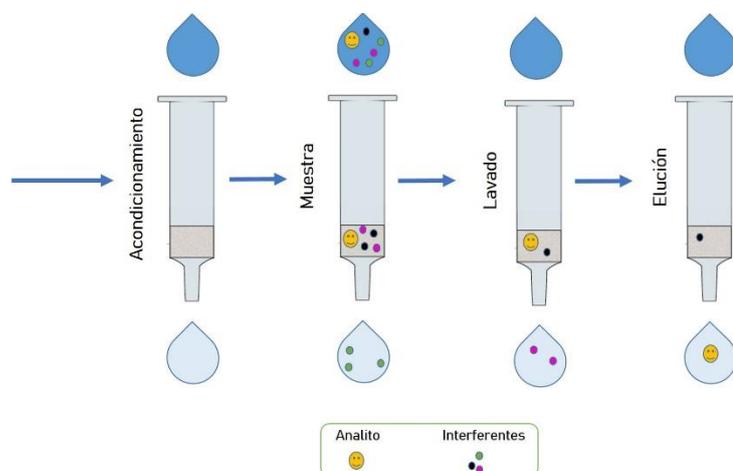


Figura 8: Pasos típicos de extracción en fase sólida

Como puede verse en la **Fig. 9**, existen diferentes tipos de soporte que cumplen la función de contener el material sólido (adsorbente). Los cartuchos han sido los soportes más utilizados desde que se comenzó a utilizar este tipo de extracción. Hoy en día, la tendencia es utilizar la menor cantidad posible de material adsorbente, tendiendo a cumplir con los principios de la química verde, por lo que las puntas de pipeta y las placas de pocillos múltiples son alternativas que se ajustan muy bien a estos propósitos.

Los adsorbentes típicos para SPE incluyen resinas de un copolímero de divinilbenceno y vinilpirrolidona (comercializada bajo el nombre Oasis® HLB) y un adsorbente polimérico funcionalizado que contiene N-vinilpirrolidona (Strata X), entre otros. Se han preferido los cartuchos Oasis HLB debido a sus buenas retenciones y a las recuperaciones altamente reproducibles de una amplia gama de compuestos, ya sean polares o no polares (debido a su mecanismo de retención hidrofóbico-hidrófilo combinado). Los cartuchos Strata X, que tienen una funcionalidad similar a los cartuchos Oasis HLB, proporcionan resultados comparables. La SPE generalmente se realiza en modo fuera de línea, pero en algunos casos se ha utilizado el acoplamiento de SPE en línea con cromatografía líquida (LC, del inglés *liquid chromatography*) a través de una válvula de conmutación de columna para la preparación de muestras semiautomatizadas con el fin de mejorar la frecuencia de muestreo. Por lo tanto, la SPE en línea podría ser más efectiva al analizar una gran cantidad de muestras en un tiempo limitado. Sin embargo, algunas desventajas de la SPE en línea incluyen el deterioro gradual de los cartuchos reutilizables y el riesgo de contaminación cruzada de las muestras.



Figura 9: Extracción en fase sólida: Tipos de materiales soporte y adsorbentes.

Entre otros aspectos de la SPE, se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar y caracterizar nuevos formatos y materiales adsorbentes avanzados para mejorar la selectividad o especificidad hacia los analitos objetivo, una mayor capacidad de absorción y una mayor estabilidad fisicoquímica o mecánica⁴⁰. En este sentido, podemos mencionar las nanopartículas (NP), que se utilizan ampliamente en varios campos de la ciencia, debido a su comportamiento único, basado en su tamaño de partícula a escala nanométrica y su utilidad en la miniaturización, se han comenzado a utilizar como un nuevo tipo de adsorbente (**Fig. 9**). Las principales ventajas de las nanopartículas son una alta relación superficie-volumen y propiedades térmicas, mecánicas y eléctricas únicas. Los exponentes más importantes de este grupo de adsorbentes son los nanomateriales a base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno, fullerenos, entre otros) y las nanofibras electrohiladas (NF).

⁴⁰Plotka-Wasyłka, Justyna, et al. "Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 77 (2016): 23-43.

1.4.2. Métodos de detección

Una vez finalizado el tratamiento de la muestra, el operador se encuentra con dos posibles caminos para finalizar el análisis:

- métodos de *screening* o cribado
- métodos confirmatorios o cuantitativos

Métodos de *screening*: se encuentran destinados a clasificar las muestras en dos grupos (positivos o negativos) de manera rápida y confiable⁴¹. Los pasos a seguir cuando se aplica este tipo de método se encuentran esquematizados en la **Fig. 10**.

Los tres objetivos principales de este tipo de métodos se pueden resumir de la siguiente manera:

- proporcionar una respuesta rápida y confiable sobre una característica específica de un objeto/sistema para la toma inmediata de decisiones;
 - minimizar o evitar las operaciones preliminares de los procesos analíticos convencionales;
- y,
- reducir el uso de instrumentos de alto costo y alto mantenimiento en el análisis de rutina.

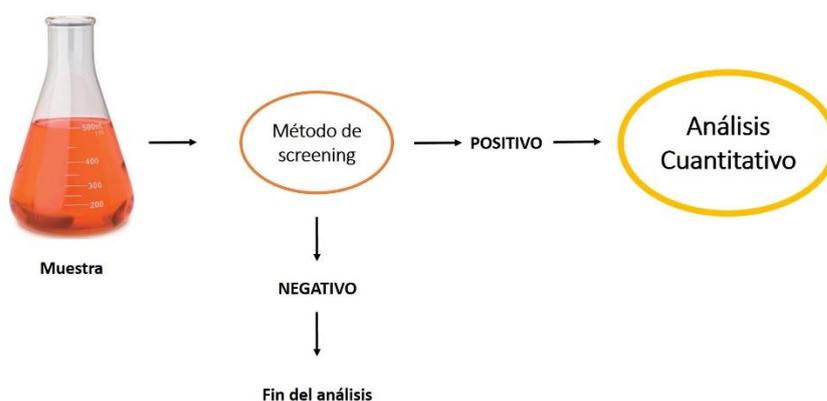


Figura 10: Esquema de un sistema de screening

⁴¹Valcárcel, M., and S. Cárdenas. "Vanguard-rearguard analytical strategies." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24.1 (2005): 67-74.

En cuanto al sistema de detección en métodos de *screening*, se pueden diferenciar dos grandes grupos: análisis cualitativo clásico o sensorial y análisis cualitativo instrumental (Fig. 11).

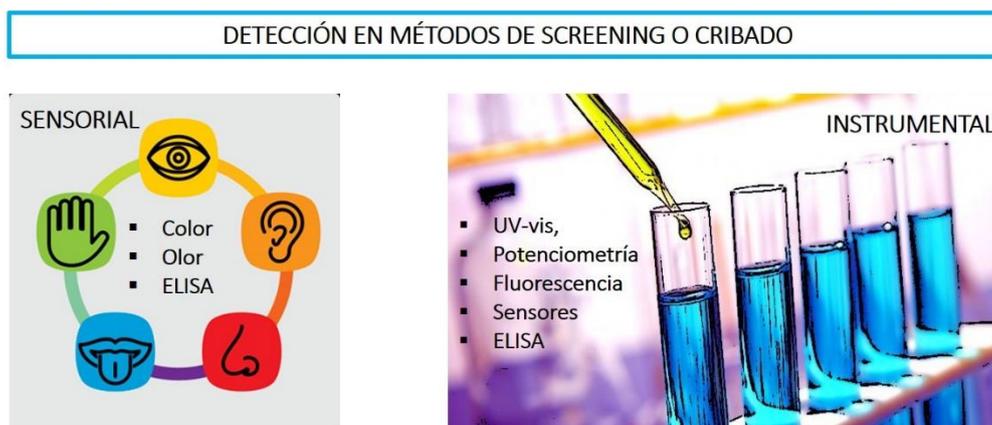


Figura 11: Sistemas de detección en métodos de screening o cribado

En el análisis cualitativo sensorial la detección se realiza en base a los sentidos (vista, olfato, etc). El sentido más utilizado es la vista y la mayoría de sistemas se basan en la aparición o no de un determinado color como resultado de una reacción ya sea química, bioquímica o inmunológica. En este tipo de sistemas, la respuesta binaria 'SI/NO' se obtiene sin ningún tratamiento de los datos, es decir, de manera directa⁴².

El otro tipo de detección es el que se obtiene por medio de un análisis cualitativo instrumental. En este caso, la respuesta se obtiene en base a una medida instrumental (colorimetría, fluorescencia, voltamperometría, etc.) y, debido a ello, la obtención de una respuesta binaria del tipo SI/NO implica un tratamiento de datos. Primero hay que establecer un valor de corte a la respuesta instrumental para la concentración correspondiente al valor al que se quiere cribar y debe compararse con la respuesta instrumental obtenida para cada muestra. Si es superior, hay analito por lo que la respuesta binaria es SI, y si el valor es inferior la respuesta binaria es NO³⁶.

El paso posterior a un ensayo positivo de *screening* o cribado, es la cuantificación de esa/s sustancia/s que se encuentra/n presente/s en la matriz de interés. Para ello, es necesario aplicar métodos de confirmación o cuantitativos:

⁴²Ruisánchez, Itziar, Esther Trullols, and F. Xavier Rius. "Validación de métodos analíticos cualitativos." *Técnicas de laboratorio (España)*. 81 (2003): 328-335.

Métodos analíticos cuantitativos son aquellos que permiten determinar qué cantidad de una sustancia específica contiene una muestra⁴³. Los métodos más utilizados se basan en la aplicación de LC acoplada a espectrometría de masas (MS)⁴⁴. La LC con detección ultravioleta (UV) también puede ser útil en la determinación de residuos de medicamentos en alimentos⁴⁵. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que todos estos métodos son costosos, consumen mucho tiempo, requieren personal entrenado y un laboratorio adecuado.

Como alternativa a este tipo de técnicas de detección, se han desarrollado métodos basados en la electroforesis capilar (CE, del inglés *capillary electrophoresis*), los cuales han demostrado ser efectivos en la detección de residuos de antibióticos⁴⁶. La CE es una buena alternativa a las técnicas cromatográficas, especialmente cuando sólo se dispone de pequeñas cantidades de muestras.

Las principales ventajas de la CE en comparación con las técnicas cromatográficas son:

- mayor eficacia de separación,
- volúmenes de muestra más pequeños (del orden de nanolitros),
- menor costo: el consumo de solventes orgánicos es menor y los capilares son más baratos que las columnas cromatográficas⁴⁷.

La CE también es adecuada para la automatización, debido a la alta frecuencia de muestreo y los múltiples modos de detección que son posibles acoplar al equipo. Por lo tanto, la CE es adecuada para controlar los residuos de antibióticos en una amplia variedad de matrices y se ha utilizado en varios estudios con diversidad de muestras biológicas.

El principal inconveniente de la CE es que no es lo suficientemente sensible en comparación con LC. Para aprovechar al máximo el poder de separación de CE para el análisis de trazas de muestras biológicas, existen varias alternativas tendientes a mejorar los límites de detección (LOD, del inglés *limit of detection*):

⁴³Christian, Gary D. Química analítica. Limusa, 1981.

⁴⁴Blasco, Cristina, Antonio Di Corcia, and Yolanda Picó. "Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Food Chemistry* 116.4 (2009): 1005-1012.

⁴⁵Benito-Peña, E., J. L. Urraca, and M. C. Moreno-Bondi. "Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 49.2 (2009): 289-294.

⁴⁶García-Campaña, Ana M., et al. "Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples." *Analytical and bioanalytical chemistry* 395.4 (2009): 967-986.

⁴⁷Díaz-Quiroz, Carlos A., et al. "Simultaneous quantification of antibiotics in wastewater from pig farms by capillary electrophoresis." *Journal of Chromatography B* 1092 (2018): 386-393.

- utilizar sistemas de detección altamente sensibles (como la detección de fluorescencia y la detección electroquímica),
- aumentar la capacidad de carga de la muestra del sistema CE: existen técnicas de concentración de analitos dentro del sistema de CE, tales como LVSS, del inglés *large volumen sample stacking*.

Estos sistemas podrían aumentar la sensibilidad del sistema CE en al menos dos órdenes de magnitud, y, de esta manera, se puede considerar la CE como una alternativa a los métodos de HPLC, con límites de detección similares⁴⁸.

La **Fig. 12** muestra un resumen de los principales métodos de detección de antibióticos reportados durante los últimos años. Como puede verse, la LC-MS es la técnica más utilizada, seguido de LC-UV y ELISA. Al mismo tiempo, el uso de biosensores, electroforesis capilar y otros métodos de detección están aumentando rápidamente⁴⁹.

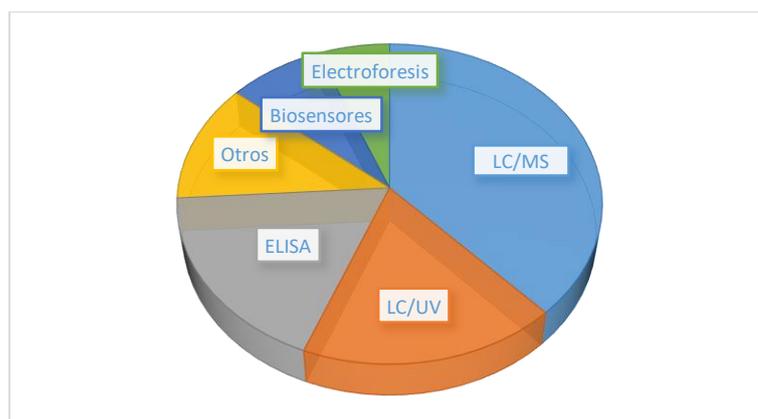


Figura 12: Distribución de los métodos analíticos utilizados para la determinación de antibióticos en alimentos

Fuente: Cháfer-Pericás, Consuelo, Angel Maquieira, and Rosa Puchades. "Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples." TrAC Trends in Analytical Chemistry 29.9 (2010): 1038-1049.

⁴⁸Hernández, M., F. Borrull, and M. Calull. "Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22.7 (2003): 416-427.

⁴⁹Cháfer-Pericás, Consuelo, Angel Maquieira, and Rosa Puchades. "Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29.9 (2010): 1038-1049.

1.5. Tendencias recientes en la preparación de muestras y detección para el análisis de antibióticos a partir de biomatrices

La introducción de la química verde⁵⁰ o ecológica a las prácticas de laboratorio, sin duda, demostró ser una fuerza impulsora en la búsqueda de nuevas soluciones metodológicas para garantizar el aumento de la calidad de los resultados y al mismo tiempo mejorar el respeto por el ambiente.

La preparación adecuada de la muestra es un aspecto clave de cualquier procedimiento analítico. Aunque todavía se están utilizando muchos métodos de extracción clásicos para el análisis de alimentos, las tendencias recientes en la preparación de muestras han evolucionado hacia:

- Uso de menor cantidad de muestra,
- Reducción o eliminación de solventes orgánicos,
- Procedimientos de extracción para compuestos multiclase.

Por otro lado, es de suma importancia destacar que, las técnicas determinativas que no utilizan solventes orgánicos o aquellas que los utilizan en volúmenes muy pequeños, son aquellas en las que los investigadores están enfocando sus estudios en la actualidad.

⁵⁰Gałaszka, Agnieszka, Zdzisław Migaszewski, and Jacek Namieśnik. "The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50 (2013): 78-84.

Capítulo 2: Objetivos

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar nuevos métodos analíticos de análisis, para la determinación de antibióticos (tetraciclinas y macrólidos) en productos destinados a la alimentación humana, con la premisa de lograr mayor simplicidad y rapidez en la obtención de información de calidad. Para ello, a su vez, se tuvieron en cuenta los principios de la química verde con el objetivo de minimizar o eliminar de los análisis químicos el uso y/o la producción de residuos peligrosos o contaminantes para el ambiente.

Este objetivo general se puede desagregar en los siguientes **objetivos particulares**:

1-Utilizar metodologías de flujo continuo y técnicas de microextracción para la determinación de doxiciclina en grasa de pollo.

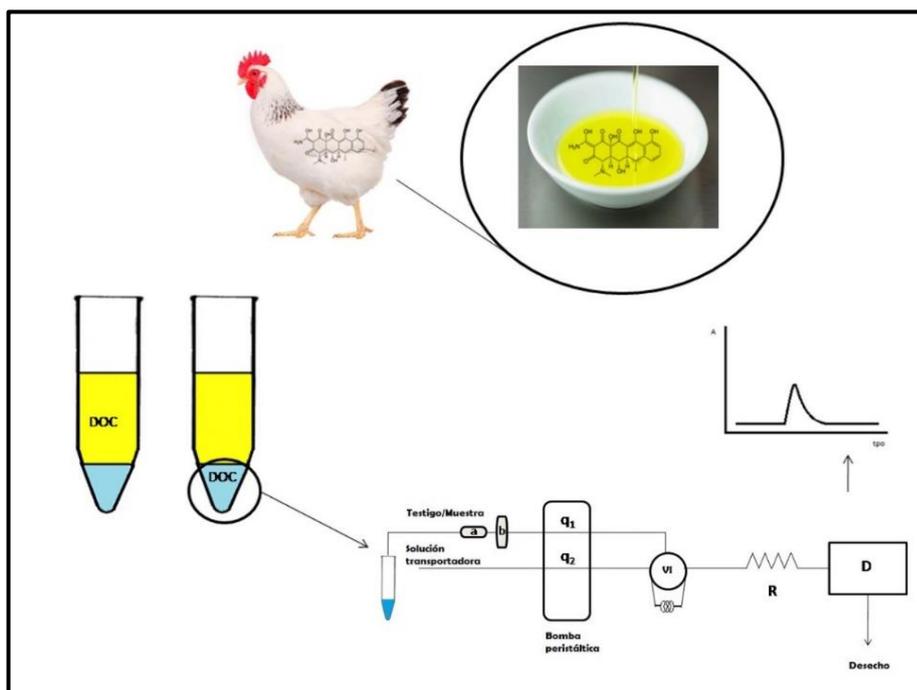
2-Desarrollar una nueva metodología de microextracción asistida por ultrasonidos para la determinación de tilosina y tilmicosina en grasa de pollo, para su posterior análisis por electroforesis capilar.

3-Desarrollar un sensor electroquímico a base de grafeno para la determinación de tetraciclinas totales

4-Emplear la irradiación por microondas para extraer tetraciclinas en pechuga de pollo y su posterior análisis por electroforesis capilar.

Resultados

Capítulo 3: Microextracción líquido-líquido en fase reversa para la determinación de doxiciclina en grasa de pollo mediante espectrofotometría UV- visible acoplada a un sistema de análisis en flujo



3.1. Objetivo

Desarrollar un nuevo método analítico para determinar doxiciclina en muestras de grasa de pollo utilizando metodologías de microextracción y análisis en flujo.

Food Chemistry 237 (2017) 506–510



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Chemistry

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



Analytical Methods

A simple and new reverse liquid-liquid microextraction for the automated spectrometric determination of doxycycline in chicken fat

 CrossMark

Anabela S. Lorenzetti, Claudia E. Domini, Adriana G. Lista*

INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina

<p>ARTICLE INFO</p> <hr/> <p><i>Article history:</i> Received 5 January 2017 Received in revised form 18 April 2017 Accepted 25 May 2017 Available online 26 May 2017</p> <hr/> <p><i>Keywords:</i> Doxycycline Reverse liquid-liquid microextraction Chicken fat samples Flow injection spectrometric determination</p>	<p>ABSTRACT</p> <hr/> <p>This work presents a new, simple and inexpensive reverse liquid-liquid microextraction of doxycycline (DOC) from chicken fat. In this just 13 min extraction methodology, acidulated water, as extraction solvent (400 μL), was used. A monochannel flow injection system was designed for the spectrometric determination of the analyte ($\lambda = 344 \text{ nm}$). The extracted solution containing DOC was loaded into the injection valve of the continuous flow manifold. A lineal range between 100 and 700 $\mu\text{g DOC kg}^{-1}$ sample was obtained. The LOD and LOQ were 33 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively. The relative standard deviation was 4.87% and the sample throughput for the entire process was 4.5 h^{-1}. As recovery values when the method was applied to real samples showed variability, the expanded uncertainties were calculated. Their values indicated that the new method is independent of the concentration of the analyte and the origin of the sample.</p> <p style="text-align: right;">© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.</p>
---	--

3.2 Resumen

Las tetraciclinas son ampliamente utilizadas para la prevención y el tratamiento de distintas enfermedades, tanto en animales como en humanos. En altas dosis, pueden causar efectos no deseados en el producto alimenticio y su ingesta ocasionar efectos teratogénicos en poblaciones particulares (embarazadas). Por lo tanto, es importante contar con métodos analíticos adecuados para contribuir al control de calidad de los alimentos, teniendo en cuenta las normativas vigentes que establecen los límites máximos de residuos (LMR) para estos analitos.

El trabajo realizado consiste en el desarrollo de un nuevo método analítico, rápido, sencillo y ecológico, para la determinación de doxiciclina (DOX), en muestras de grasa de pollo, empleando para su detección espectrofotometría UV-V. Para llevar a cabo la extracción y preconcentración del analito, se diseñó un método de microextracción líquido-líquido en fase reversa, que se acopló a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). Se logró trabajar en un intervalo lineal de concentraciones entre 100 y 700 μg de DOX por kg de muestra, en el cual está incluido el LMR para la DOX (300 $\mu\text{g kg}^{-1}$). El método fue aplicado favorablemente a muestras reales.

3.3. Introducción

Las tetraciclinas (TCs) son antibióticos de amplio espectro utilizadas para la prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas tanto en animales como en humanos⁵¹. Debido a su bajo costo y a la ausencia de efectos adversos mayores, las TCs han sido amplia e inapropiadamente utilizadas causando serios problemas. La posible presencia de sus residuos en los tejidos animales, pueden generar la evolución de los microorganismos promoviendo la resistencia a los antibióticos y generando efectos tóxicos en la salud humana⁵². Uno de los miembros de este grupo de antibióticos es la Doxiciclina (DOX), la cual es más liposoluble que otras TCs. Esta característica le confiere una mayor persistencia en el cuerpo de los animales, sobre todo en el tejido graso, donde la concentración puede alcanzar el Límite Máximo Permitido de residuos (LMR)⁵³. Estos LMR están establecidos por la Unión Europea para los diferentes tipos de tejidos animales. Para cerdos y aves de corral, sólo la DOX es regulada para grasa y piel y su concentración límite es 300 µg/Kg⁵⁴.

Las técnicas más utilizadas para la detección de TCs en diferentes matrices son la electroforesis capilar⁵⁵ y la cromatografía líquida⁵⁶, pero muy pocos de los métodos desarrollados analizan alimentos de origen animal, probablemente debido a la complejidad de la muestra⁵⁷. Referido a la determinación de DOX en muestras de grasa de pollo, sólo un trabajo ha sido publicado hasta el momento, utilizando cromatografía líquida con detección UV y espectrometría de masas⁵⁸. En ese trabajo realizado por Gajda y su grupo de investigación, extrae DOX de grasa de pollo con 3,0 mL de una solución reguladora de oxalato de pH 4,0 y 15,0 mL acetato de etilo y luego se desproteiniza con ácido tricloroacético al 20%. Esta extracción se repite dos veces más y, finalmente, los extractos se combinan para su tratamiento en una columna de SPE y su posterior análisis por LC.

El tratamiento de muestras biológicas es una de las etapas más críticas para la determinación de TCs. El procedimiento incluye un paso de extracción con un solvente adecuado, un paso de limpieza

⁵¹Samanidou, Victoria F., Konstantina I. Nikolaidou, and Ioannis N. Papadoyannis. "Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC." *Journal of separation science* 30.15 (2007): 2430-2439.

⁵²García, Inmaculada, Luis A. Sarabia, and M. Cruz Ortiz. "Detection capability of tetracyclines analysed by a fluorescence technique: comparison between bilinear and trilinear partial least squares models." *Analytica chimica acta* 501.2 (2004): 193-203.

⁵³Santos, M. D. F., et al. "Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 682.2 (1996): 301-308.

⁵⁴The European Commission. Official Journal of the European Union, L15(2377), (2010) 1–72

⁵⁵García-Ruiz, Carmen, et al. "Rapid separation of tetracycline derivatives and their main degradation products by capillary zone electrophoresis." *Electrophoresis* 22.13 (2001): 2775-2781.

⁵⁶Cinquina, A. L., et al. "Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle." *Journal of Chromatography A* 987.1-2 (2003): 227-233.

⁵⁷Anderson, Collin R., Heidi S. Rupp, and Wen-Hsin Wu. "Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1075.1-2 (2005): 23-32.

⁵⁸Gajda, Anna, et al. "Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 928 (2013): 113-120.

y uno de preconcentración. Generalmente, las metodologías de extracción utilizan una solución reguladora de pH 3,5 y un paso de homogeneización seguido de centrifugación. En algunos casos, se utiliza ultrasonido para mejorar la eficiencia de la extracción⁵⁹. En ocasiones, para aislar las TCs de los posibles interferentes de la matriz de la muestra, es requerida una extracción líquido-líquido y/o sólido-líquido^{60 61}. La extracción líquido-líquido es una metodología tradicional, usada durante muchos años para la separación y preconcentración de analitos. Tal como se ha comentado anteriormente, uno de los problemas inherentes a esta metodología es que requiere grandes volúmenes de solventes orgánicos peligrosos y en algunos casos múltiples pasos de extracción y tiempo. Por lo tanto, se han desarrollado procedimientos de miniaturización, automatización y limpieza para reemplazar los pasos convencionales de tratamiento de la muestra. Así surgió la metodología de microextracción líquido-líquido, que está siendo ampliamente utilizada. Este procedimiento simple y rápido, comentado ya en la sección 1.4.1.1., es reconocido por ser una metodología amigable con el ambiente ya que consume muy pocas cantidades de solventes orgánicos. Existen diferentes categorías de esta metodología: extracción en gota (SDME)⁶², microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)⁶³, microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME)⁶⁴ y una nueva forma, microextracción líquido-líquido en fase reversa⁶⁵ (RP-LLME). Este último, es un procedimiento simple, no dispersivo, basado en la utilización de agua como solvente de extracción, en el cual los analitos van desde la fase orgánica (usualmente muestras de aceite) a la fase acuosa. Por lo tanto, la metodología es más amigable con el ambiente, porque no son necesarios los solventes orgánicos y el costo del método es menor.

En este trabajo, se desarrolló un nuevo método de microextracción/preconcentración líquido-líquido en fase reversa para DOX en muestras de grasa de pollo. Este método es simple y rápido y representa una muy buena opción para el tratamiento de esta matriz compleja. Con el propósito de automatizar la determinación del analito, se desarrolló y optimizó un sistema monocanal de análisis por inyección en flujo (FIA) con determinación espectrofotométrica. Un volumen de la solución extraída conteniendo DOX fue acondicionado en línea e inyectado en el sistema y transportado hacia el detector,

⁵⁹Shalaby, A. R., et al. "Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver." *Food Chemistry* 124.4 (2011): 1660-1666.

⁶⁰Ibarra, Israel S., et al. "Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis." *Journal of Chromatography A* 1218.16 (2011): 2196-2202.

⁶¹Suárez, B., et al. "Solid-phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the determination of tetracyclines residues in surface water by using carbon nanotubes as sorbent material." *Journal of Chromatography A* 1175.1 (2007): 127-132.

⁶²Kokosa, John M. "Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 71 (2015): 194-204.

⁶³Saraji, Mohammad, and Malihe Khalili Boroujeni. "Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction." *Analytical and bioanalytical chemistry* 406.8 (2014): 2027-2066.

⁶⁴Hashemi, Payman, et al. "Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein." *Talanta* 80.5 (2010): 1926-1931.

⁶⁵Wang, Yifan, et al. "Simultaneous determination of furfural and its degradation products, furoic acid and maleic acid, in transformer oil by the reversed-phase vortex-assisted liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography." *Journal of separation science* 40.24 (2017): 4805-4812.

utilizando como solvente portador agua acidulada (solvente de extracción). Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas a 344 nm.

3.4. Materiales y métodos

Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas a partir de reactivos de grado analítico. Como solución extractante se utilizó agua acidulada de pH: 1,2 (HCl: 0,01 M). Las mediciones fueron realizadas utilizando un espectrofotómetro Lambda2S Perkin Elmer acoplado a un FIAS300 Perkin Elmer, con una celda de flujo 178–712 QS Hellma (volumen interno = 8 μ L, paso óptico = 10 mm). Además, se utilizó una válvula de inyección Rheodyne 5041 (bucle de muestra de 150 μ L). El reactor y el bucle de inyección fueron de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno. El sistema de inyección en flujo contenía una minicolumna de Tygon rellena de algodón (largo: 1,5 cm, d.i. 0,3 cm), seguida de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μ m de tamaño de poro (CAMEO 25). También se utilizó una centrífuga Rolco 2036, un pH-metro Orion 710A, un Vortex Velp Zx3 y un baño termostático Cole Parmer BT-15.

Muestras

Se analizaron 3 muestras de pollo de diferentes orígenes: la muestra A fue adquirida en un mercado minorista, la B fue comprada en una granja ecológica para asegurar la ausencia de doxiciclina y la C en un supermercado (muestra congelada). Todas ellas fueron adquiridas en Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina durante el año 2016.

Preparación de la muestra y procedimiento de detección

La grasa sólida fue calentada a $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fin de obtener la grasa en estado líquido, la que fue filtrada bajo vacío a través de un filtro de papel de 8 μ m de tamaño de poro. Luego se pesaron 5 g los cuales se introdujeron en un tubo de centrifuga de plástico de 15 mL. Se agregaron 400 μ L del solvente de extracción y se agitó mediante un vortex durante 10 min para favorecer el contacto entre las dos fases. Finalmente, la mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 1200 rpm y, luego, la fase inferior (fase acuosa) se introdujo en el sistema FIA que se muestra en la **Fig. 13**, realizando la detección a 344 nm.

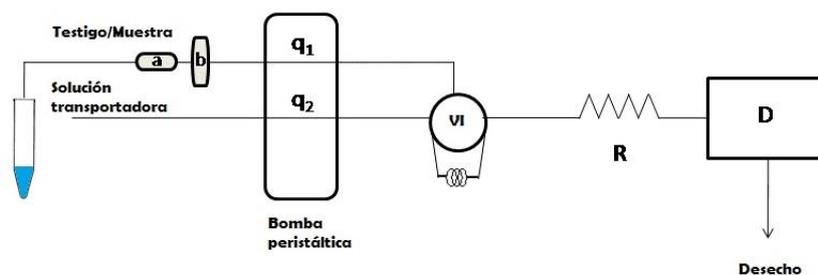


Figura 13: Sistema de inyección en flujo para determinar Doxiciclina en muestras de grasa de pollo

q_1 : caudal de carga de la muestra, q_2 : caudal del portador de la muestra, a: minicolumna de algodón, b: filtro de jeringa, VI: válvula de inyección, R: reactor anidado, D: detector (λ : 344 nm).

3.5. Resultados y discusión

Se realizó la optimización de las variables involucradas en el método teniendo en cuenta la mayor sensibilidad y reproducibilidad de la señal.

Selección de la longitud de onda de trabajo

Se registraron los espectros de absorción de DOX en diferentes solventes de extracción desde 200 a 500 nm obteniendo resultados que concuerdan con lo descrito en la literatura^{66 67}: la DOX presenta dos máximos de absorción (260 y 344 nm) trabajando bajo condiciones ácidas.

Para seleccionar la longitud de onda de trabajo, se realizaron espectros de los extractos ácidos de una muestra de grasa de pollo sin fortificar y fortificados. En la **Fig. 14** se observa que a 260 nm hay interferencias de la matriz de la muestra, por lo tanto, se selecciona 344 nm como longitud de onda de trabajo.

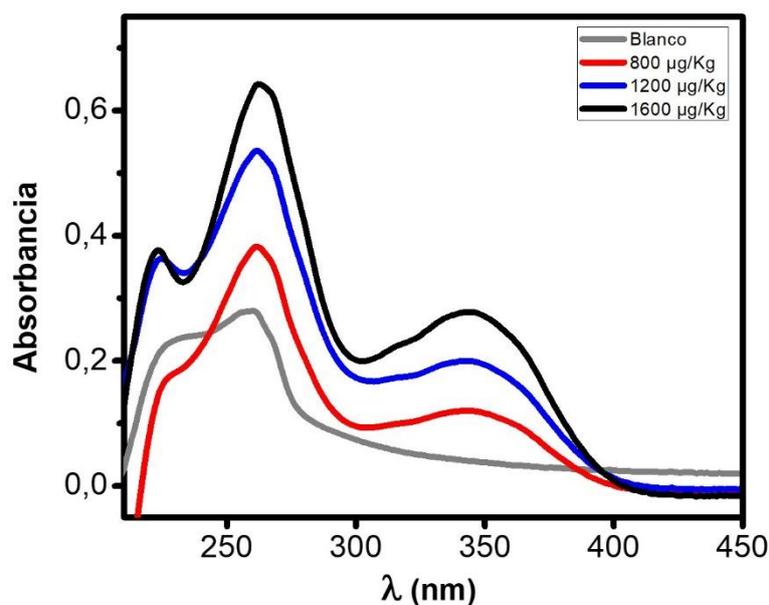


Figura 14: Espectros de grasa extraída con el solvente seleccionado

Blanco de muestra (gris) y fortificados a distintas concentraciones: 800 µg/Kg (rojo), 1200 µg/Kg (azul), 1600 µg/Kg (negro).

⁶⁶Anderson, Collin R., Heidi S. Rupp, and Wen-Hsin Wu. "Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1075.1-2 (2005): 23-32.

⁶⁷Santos, M. D. F., et al. "Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 682.2 (1996): 301-308.

Selección del solvente de extracción

La selección del solvente apropiado es el parámetro más importante de la microextracción líquido-líquido en fase reversa. Este estudio fue llevado a cabo usando diferentes soluciones de extractantes y registrando los espectros de los diferentes extractos puros y fortificados de la muestra.

Las grasas consisten en un amplio grupo de compuestos que, generalmente, son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Se comenzó a trabajar utilizando una solución reguladora de citrato de pH 4,00 debido a que éste se ha utilizado previamente para la extracción de tetraciclinas de matrices biológicas^{68 69}. Sin embargo, en este caso, el espectro del extracto puro de la muestra mostró interferencias a la longitud de onda seleccionada, probablemente debido a la co-extracción de otras especies provenientes de la matriz. Además, se evidenció falta de sensibilidad.

El estudio continuó utilizando agua como extractante. Si bien la extracción del analito mejoró, nuevamente el blanco presentó interferencias. Debido a esto, se decidió utilizar agua acidulada con ácido clorhídrico a distintos pH. Los resultados mostraron que cuanto más bajo era el pH, mayor era la extracción de DOX y menor la co-extracción de sustancias interferentes (**Fig. 15**). Esto es posible porque bajo condiciones ácidas el analito se encuentra protonado ($\text{pH} < \text{pK}_{a1}$) y tiene mayor afinidad por la fase acuosa⁷⁰. Por lo tanto, como solución extractante de trabajo se seleccionó agua a pH 1,2.

⁶⁸Lv, Yun-Kai, et al. "Preparation of doxycycline-imprinted magnetic microspheres by inverse-emulsion suspension polymerization for magnetic dispersion extraction of tetracyclines from milk samples." *Journal of separation science* 36.16 (2013): 2656-2663.

⁶⁹Samanidou, Victoria F., Konstantina I. Nikolaidou, and Ioannis N. Papadoyannis. "Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC." *Journal of separation science* 30.15 (2007): 2430-2439.

⁷⁰Anderson, Collin R., Heidi S. Rupp, and Wen-Hsin Wu. "Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1075.1-2 (2005): 23-32.

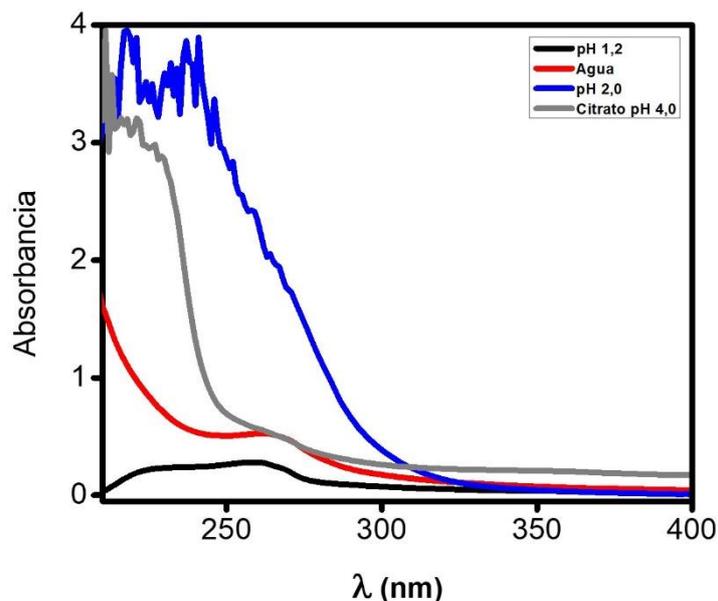


Figura 15: Espectros de extractos de grasa sin fortificar utilizando diferentes solventes de extracción

Agua pH 1,2 (negro), agua milli-Q (roja), agua pH 2,0 (azul), citrato pH 4,0 (gris).

Selección del modo y tiempo de extracción

Con el objetivo de mejorar el procedimiento de extracción, se evaluaron diferentes modos de extracción tales como baño ultrasónico, vortex y agitación magnética. Si bien es cierto que todos ellos aumentan el contacto entre dos líquidos inmiscibles, al utilizar el baño ultrasónico se observó que no se obtenían buenos resultados. Esto podría estar relacionado con la falta de uniformidad en la transmisión de la energía de ultrasonido⁷¹, causando variabilidad en los resultados. Similares resultados se obtuvieron utilizando agitación magnética. Los mejores valores de recuperación se lograron con el vortex. Esto se puede atribuir a la forma de mezcla que tiene el vortex, la cual permite la transferencia del analito a la solución acuosa de una manera más rápida y eficiente.

Usualmente, la extracción de los analitos aumenta al aumentar el tiempo de extracción, por lo que se evaluó el tiempo de extracción entre 5 y 15 minutos. Se pudo observar que tiempos mayores a 10 minutos no aumentaban considerablemente los valores de recuperación. Por lo tanto, se seleccionaron 10 min como valor óptimo (Fig. 16).

⁷¹Yiantzi, Evangelia, et al. "Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A." *Talanta* 80.5 (2010): 2057-2062.

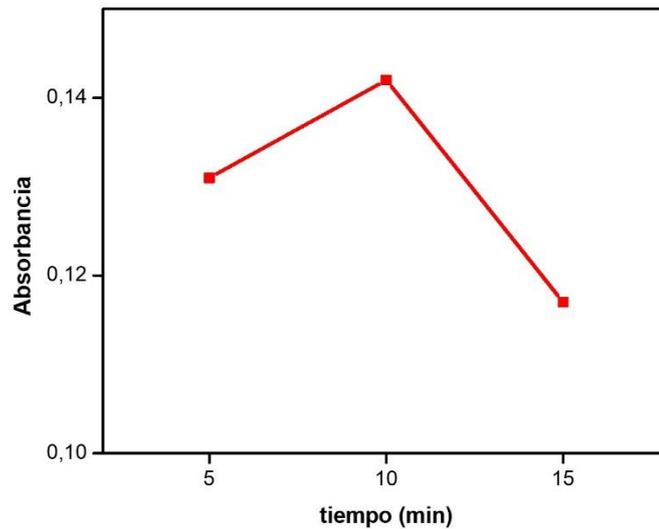


Figura 16: Optimización del tiempo de extracción

Selección del volumen del solvente de extracción

Además de la extracción, la preconcentración también fue necesaria. Por lo tanto, se evaluaron volúmenes de extractante comprendidos en el ámbito de 200 a 600 μL . Los mejores resultados se obtuvieron con 400 μL , ya que utilizando 200 μL la extracción fue incompleta y los valores de recuperación obtenidos con volúmenes entre 400 y 600 μL fueron similares, por lo que se decidió utilizar el menor volumen para obtener la mejor preconcentración.

Optimización de las variables FIA

Con el objetivo de automatizar la determinación espectrofotométrica de DOX se diseñó un sistema FIA. Se estudiaron varias configuraciones y los mejores resultados se obtuvieron con el sistema monocanal mostrado en la **Fig. 13**. El volumen del bucle de la muestra fue evaluado entre 50 y 300 μL y el volumen óptimo fue de 150 μL . Manteniendo fija esta variable, el flujo de la solución portadora fue evaluado entre 3,82 y 5,73 mL min^{-1} . La menor dispersión de la muestra se obtuvo trabajando a 5,73 mL min^{-1} , pero fue necesario un reactor antes de la celda de flujo para obtener una señal sin doubles picos. Luego de la optimización de esta última variable FIA, los mejores resultados se obtuvieron utilizando un reactor anidado de 200 mm.

Parámetros analíticos

Aplicando el método propuesto con todas las variables optimizadas, se obtuvo un intervalo lineal comprendido entre 100 y 700 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la determinación de DOX, el cual contiene el LMR (300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) establecido por la Unión Europea.

La ecuación de regresión fue $Y = (0,0002 \pm 4,4 \times 10^{-6}) X - (0,0047 \pm 0,0018)$, donde X está expresada como [$\mu\text{g DOX kg}^{-1}$ de muestra] y el coeficiente de determinación fue $R^2 = 0,998$. El límite de detección (LOD) fue $33,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ y el límite de cuantificación (LOQ) $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, ambos calculados a partir de la curva de calibrado⁷². La desviación estándar relativa, calculada a partir de 8 réplicas de la muestra fortificada con $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ fue 4,87%. El tiempo total de análisis fue de 15 minutos por muestra.

Generalmente, las tetraciclinas son compuestos no liposolubles: solo la DOX posee un $K_{o/w}$ (constante de reparto octanol-agua que da una idea de la afinidad por la fase lipídica) significativo (-0,02), por lo que sólo ella está regulada para este tipo de muestras. Por ello, la selectividad del método, respecto a otros antibióticos de la familia de las tetraciclinas, se encuentra asegurada, ya que sólo DOX podría estar presente en muestras de grasa de pollo.

Análisis de muestras reales

Con el fin de evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron diferentes muestras de grasa de pollo. Los estudios preliminares indicaron que las muestras se encontraban libres de DOX, por lo que se realizó un estudio de recuperación a tres niveles de concentración. Como puede verse en la **Tabla 4**, los valores de recuperación presentan cierta variabilidad, por lo que se decidió calcular la incertidumbre combinada y relativa (μ y $\mu\%$) para cada nivel de concentración y para muestras de diferentes orígenes⁷³. Estos valores incluyen la contribución de la precisión intermedia del método y la verificación de la veracidad. Además, la incertidumbre expandida (U) fue evaluada con un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza de 95%. Los valores obtenidos fueron mucho más bajos de lo recomendado por CAC/GL 59–2006⁷⁴ para cada nivel de concentración ($U_{\text{expandida}\%} = 16\text{--}53\%$ para $1\text{--}1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Además, las incertidumbres relativas expandidas mostraron valores estadísticamente similares ($p > 0,2$), indicando que la incertidumbre del nuevo método es independiente de la concentración del analito y del origen de la muestra. Así, se demostró la utilidad del nuevo método en este tipo de muestra, teniendo en cuenta que el paso de extracción es efectivo, simple y amigable con el ambiente.

⁷²Miller, Jane C., and James N. Miller. *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana, 1993.

⁷³Maroto, Alicia, et al. "Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays." *Analytica Chimica Acta* 440.2 (2001): 171-184.

⁷⁴CAC/GL 59 –2006. (2011). Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados (CAC/GL59 – 2006). Alimentarius, C., 1–17

Tabla 4: Análisis de muestras reales fortificadas aplicando el método propuesto.

Muestra	Agregado ($\mu\text{g /Kg}$)	Recuperación* (R)	DER	μ (comb)	μ (rel %)	U (exp%)
A	200	0,825	0,019	5,04	2,52	5,04
	300	0,787	0,013	5,39	1,80	3,59
	400	0,906	0,016	7,67	1,92	3,83
B	200	0,785	0,017	4,82	2,41	4,82
	300	0,846	0,012	4,50	1,50	3,00
	400	0,933	0,014	6,62	1,65	3,31
C	200	0,650	0,016	5,54	2,77	5,54
	300	0,683	0,018	8,71	2,90	5,81
	400	0,611	0,012	8,68	2,17	4,34

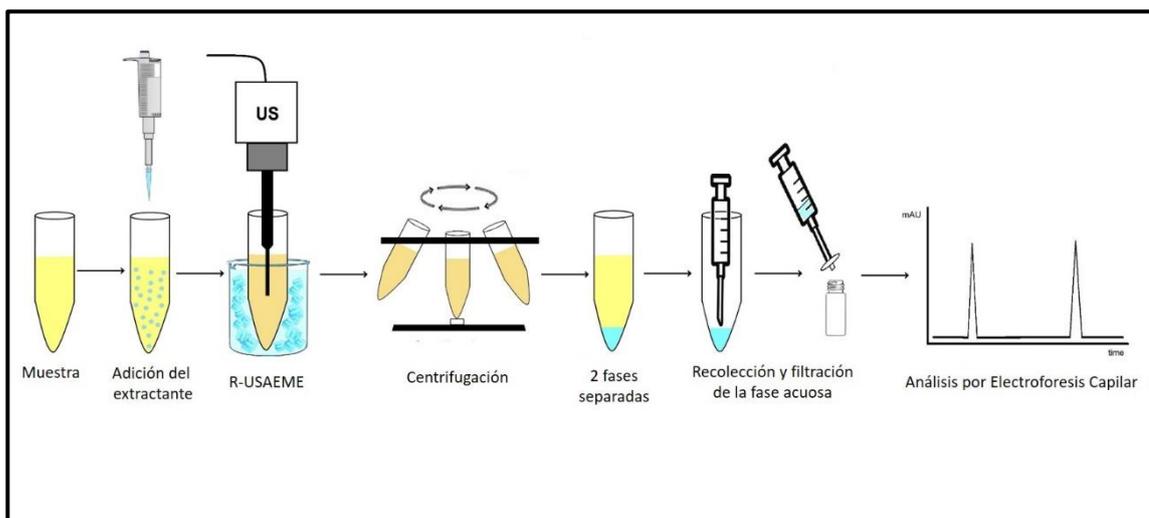
DER: Desviación estándar de las recuperaciones, *Promedio de 5 réplicas.

3.6. Conclusiones

En este trabajo se presenta un nuevo método FIA espectrométrico, automatizado, como una alternativa para determinar DOX en muestras de grasa de pollo. Es un método simple, rápido y de bajo costo. La mayor ventaja de éste método es el paso de extracción/preconcentración en el que se utiliza la metodología de microextracción líquido-líquido en fase reversa, la cual requiere solamente 400 μL de agua acidulada como solvente de extracción. El procedimiento es sencillo, limpio y la solución extraída es fácilmente introducida en el sistema FIA. Los resultados muestran buenos valores de recuperación, además de una precisión y frecuencia de muestreo satisfactorias, teniendo en cuenta el paso de extracción/preconcentración. La curva de calibrado fue construida a partir de las soluciones estándar preparadas en agua acidulada (medio de extracción). Los valores de $U_{\text{expandida}\%}$ demostraron que el método para la determinación de DOX posee incertidumbres comparables cuando es aplicado a muestras de diferentes orígenes y a diferentes niveles de concentración.

Este método selectivo es amigable con el ambiente, y solamente utiliza una determinación espectrofotométrica sin la necesidad de instrumentos sofisticados.

Capítulo 4: Microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonidos de macrólidos en grasa de pollo seguida de determinación electroforética.



4.1. Objetivo

Desarrollar una nueva metodología de microextracción asistida por ultrasonidos para la determinación de tilosina (TYL) y tilmicosina (TILM) en grasa de pollo y su posterior análisis por electroforesis capilar de zona.

LWT - Food Science and Technology 113 (2019) 108334

Contents lists available at ScienceDirect

 **LWT - Food Science and Technology**

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



Reverse ultrasound-assisted emulsification-microextraction of macrolides from chicken fat followed by electrophoretic determination

Anabela S. Lorenzetti, Adriana G. Lista¹, Claudia E. Domini*

INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, 8000, Bahía Blanca, Argentina



ARTICLE INFO

Keywords:
Reverse ultrasound-assisted emulsification-microextraction
Capillary electrophoresis
Ionic liquids
Macrolides
Chicken fat

ABSTRACT

A new microextraction methodology, called reverse ultrasound-assisted emulsification-microextraction (R-USAEME) was developed to extract Tilmicosin (TILM) and Tylosin (TYL) from chicken fat samples, prior to their determination by capillary electrophoresis with UV-detection. The R-USAEME was based on the use of an aqueous ionic liquid ([Bmim]Cl) solution with sodium tartrate and sodium phosphate as extractant, applying an ultrasound probe (91 W; 7.5 min). A good linearity was obtained in a range from 35 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with relative standard deviations (RSDs) lower than 13% using matrix-matched calibration on five chicken fat samples. The quantification limits (LOQs), ranged from 17.4 to 55.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 22.1 to 47.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for TILM and TYL respectively. The obtained recoveries were between 73 and 117%. The analytical parameters clearly showed the applicability of the method for the extraction and quantification of macrolides in this complex biological sample.

4.2. Resumen

Se desarrolló una nueva metodología, llamada microextracción por emulsificación reversa (R-USAEME) con objetivo de extraer tilmicosina (TILM) y tilosina (TYL) en muestras de grasa de pollo, previo a su determinación por electroforesis capilar.

Esta metodología se basó en la utilización de una solución acuosa de un líquido iónico (cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, [Bmim] Cl) con sales de tartrato y fosfato de sodio como extractante, aplicando una sonda de ultrasonidos (91 W; 7,5 min).

El intervalo de linealidad obtenido, utilizando curvas de calibrado realizadas sobre una matriz semejante a la muestra (matrix matched calibration), fue de 35 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, en el cual se incluye el límite máximo de residuos (LMR) permitido en esta matriz para los macrólidos mencionados. Las desviaciones estándar relativas (DER), calculadas para cinco determinaciones en muestras de grasa, fueron menores al 13%. Se obtuvieron límites de cuantificación (LOQ) comprendidos entre 17,4 y 55,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y entre 22,1 y 47,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para TILM y TYL, respectivamente, con recuperaciones entre 73 y 117 %. Los parámetros analíticos mostraron claramente la aplicabilidad del método de extracción y cuantificación de macrólidos en esta muestra biológica compleja.

4.3. Introducción

A lo largo de las últimas décadas, ha habido un aumento significativo en el uso de antibióticos en medicina veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos o como promotores del crecimiento. El uso inadecuado de estos medicamentos en diferentes tratamientos para animales puede dejar residuos en los tejidos o productos alimenticios, reacciones alérgicas en individuos hipersensibles y/o resistencia bacteriana^{75 76 77}. Los macrólidos se utilizan contra una amplia variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas⁷⁸ en el tratamiento de enfermedades respiratorias y para prevenir infecciones microbianas en bovinos, ovinos y aves de corral. Además, son moléculas lipófilas, que consisten en anillos de lactona macrocíclicos de 14 a 16 átomos de carbono unidos a moléculas de carbohidratos.

Dos de los macrólidos más utilizados en medicina veterinaria son la tilosina (TYL) y la tilmicosina (TILM). TYL es producida por el microorganismo *Streptomyces fradiae* y TILM es un compuesto semisintético obtenido de TYL⁷⁹. La presencia de residuos de estos compuestos en los productos alimenticios derivados de animales tiene un impacto significativo en la salud humana. Por lo tanto, se establecieron límites máximos de residuos (LMR) para antibióticos para cada tipo de tejido animal. Según el Reglamento de la Comisión de la Unión Europea (UE), estos límites para TYL y TILM en aves de corral son: 100 µg kg⁻¹ y 75 µg kg⁻¹ para piel y grasa, 100 µg kg⁻¹ y 1000 µg kg⁻¹ para hígado, respectivamente⁸⁰. Para la Comisión del Codex Alimentarius, estos LMR son 100 µg kg⁻¹ (grasa y piel) y 100 µg kg⁻¹ (hígado) para TYL y para TILM son 250 µg kg⁻¹, 2400 µg kg⁻¹⁸¹.

Técnicas separativas tales como cromatografía líquida (LC) o electroforesis capilar (CE) con detección ultravioleta^{82 83}, han sido utilizadas para determinar macrólidos en diferentes matrices. Hoy en día, la técnica de LC acoplada a la espectrometría de masas en modo simple o tándem (LC-MS, LC-

⁷⁵McEvoy, J. D. G. "Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control." *Analytica Chimica Acta* 473.1-2 (2002): 3-26.

⁷⁶Lozano, María Constanza, and Mary Trujillo. "Chemical residues in animal food products: an issue of public health." *Public health: methodology, environmental and systems issues. IntechOpen, Rijeka, Croatia* (2012): 163-175.

⁷⁷Wang, Jian. "Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices." *Mass spectrometry reviews* 28.1 (2009): 50-92.

⁷⁸Tao, Yanfei, et al. "Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 897 (2012): 64-71.

⁷⁹Katz, Leonard, and Richard H. Baltz. "Natural product discovery: past, present, and future." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 43.2-3 (2016): 155-176.

⁸⁰European Commission, Residues: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. (Workingdocument).SANCO/3029/99rev.4 11/07/00, (2000) 26.

⁸¹Codex Alimentarius. International food standards. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods.

⁸²García-Mayor, M. A., et al. "Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk." *Food chemistry* 134.1 (2012): 553-558.

⁸³Blackwell, Paul A., et al. "Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection." *Talanta* 64.4 (2004): 1058-1064.

MS/MS), es la técnica más comúnmente utilizada para estas determinaciones en muestras como leche, músculo⁸⁴, miel⁸⁵, huevos⁸⁶, riñón e hígado⁸⁷.

El paso más difícil en el análisis de este tipo de muestras biológicas es el tratamiento de la muestra, que consiste en la extracción/preconcentración de los analitos. Los procedimientos comunes que se utilizan para este fin son la extracción líquido-líquido (LLE)⁸⁸, la extracción en fase sólida (SPE)⁸⁹ y la extracción en fase sólida dispersiva⁹⁰, entre otros. Sin embargo, estos procedimientos son tediosos, requieren mucho tiempo y utilizan un gran volumen de solventes orgánicos tóxicos.

En este contexto, han aparecido nuevos métodos de microextracción, como la microextracción en fase líquida (LPME), ya que son más fáciles, más rápidos y más ecológicos que los procedimientos de pretratamiento de muestras convencionales. Como se ha mencionado en la sección 1.4.1.1., uno de los más utilizados es la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) presentada por Assadi y colaboradores⁹¹. A pesar de que la DLLME es un método simple y de bajo costo, que generalmente utiliza pequeñas cantidades de solventes orgánicos como extractante y/o dispersante, estos solventes siguen siendo altamente tóxicos. Para resolver este problema, el uso de solventes de extracción amigables con el ambiente, tales como líquidos iónicos (IL) y el reemplazo de los solventes dispersivos por energía de ultrasonido, vortex, temperatura, entre otros, son una buena solución⁹².

Los IL son sales orgánicas que consisten en una combinación de aniones orgánicos o inorgánicos y cationes orgánicos. Poseen propiedades características, tales como bajo punto de fusión (líquidos a temperatura ambiente), baja volatilidad, buena estabilidad térmica y baja toxicidad⁹³, que hacen posible su uso como solvente de extracción para una amplia gama de analitos.

⁸⁴Jank, Louise, et al. "High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS)." *Talanta* 144 (2015): 686-695.

⁸⁵Jin, Yue, et al. "Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Food chemistry* 221 (2017): 1298-1307.

⁸⁶Wang, Kun, et al. "A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS." *Journal of agricultural and food chemistry* 65.24 (2017): 5064-5073.

⁸⁷Rizzetti, Tiele M., et al. "A simple and fast method for the determination of 20 veterinary drug residues in bovine kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Food analytical methods* 10.4 (2017): 854-864.

⁸⁸Patyra, Ewelina, et al. "Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of tiamulin, trimethoprim, tylosin, sulfadiazine and sulfamethazine in medicated feed." *Food Additives & Contaminants: Part A* 35.5 (2018): 882-891.

⁸⁹Feng, Yao, et al. "A simple and economic method for simultaneous determination of 11 antibiotics in manure by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography." *Journal of soils and sediments* 16.9 (2016): 2242-2251.

⁹⁰Boscher, Aurore, et al. "Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1217.41 (2010): 6394-6404.

⁹¹Rezaee, Mohammad, et al. "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction." *Journal of Chromatography A* 1116.1-2 (2006): 1-9.

⁹²Barfi, Behruz, Maryam Rajabi, and Alireza Asghari. "A simple organic solvent-free liquid-liquid microextraction method for the determination of potentially toxic metals as 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino) phenol complex from food and biological samples." *Biological trace element research* 170.2 (2016): 496-507.

⁹³Pavlović, Dragana Mutavdžić, et al. "Sample preparation in analysis of pharmaceuticals." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26.11 (2007): 1062-1075.

Por otro lado, el uso de energía de ultrasonidos en lugar de solventes de dispersión mejora la DLLME; siendo esta energía una excelente herramienta para generar emulsiones finas a partir de dos líquidos inmiscibles, con una mayor transferencia de analitos entre las dos fases. Este procedimiento es denominado microextracción por emulsión asistida por ultrasonido (USAEME)⁹⁴. En la última década, el modo de extracción en fase reversa, que utiliza una solución acuosa como extractante, se ha convertido en una variante interesante del proceso de extracción tradicional, principalmente por evitar el uso de solventes orgánicos^{95 96}.

En este trabajo, se desarrolló una nueva metodología basada en el modo de microextracción en fase reversa asistida por energía de ultrasonidos acoplada a detección en electroforesis capilar para determinar TYL y TILM en muestras de grasa de pollo. La detección fue llevada a cabo por un equipo de electroforesis capilar acoplado con un detector de arreglo de diodos. En el método de microextracción, se genera una emulsión de agua en aceite (W/O) mezclando un pequeño volumen de IL, como agente extractante, y una muestra hidrófoba (grasa de pollo, a una temperatura superior a su punto de fusión). El nuevo procedimiento se denominó microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonido (R-USAEME). El proceso de extracción se mejoró agregando sales (tartrato y fosfato de sodio) a una solución acuosa de IL y usando la sonda de ultrasonido para acelerar la formación de la emulsión y aumentar el contacto entre las fases.

Es importante señalar que, según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha desarrollado una metodología de extracción para extraer TYL y TILM de muestras de grasa de pollo.

⁹⁴Regueiro, Jorge, et al. "Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters." *Journal of Chromatography A* 1190.1-2 (2008): 27-38.

⁹⁵Hashemi, Payman, et al. "Reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein." *Talanta* 80.5 (2010): 1926-1931.

⁹⁶Fernández, Elena, Lorena Vidal, and Antonio Canals. "Rapid determination of hydrophilic phenols in olive oil by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and screen-printed carbon electrodes." *Talanta* 181 (2018): 44-51.

4.4. Materiales y métodos

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los estándares TILM y TYL se adquirieron en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Se prepararon soluciones estándar individuales (1000 mg L^{-1}) en metanol (Merck, Buenos Aires, Argentina) y se mantuvieron en la oscuridad a -18°C manteniendo su estabilidad durante al menos un mes. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente mediante diluciones apropiadas de soluciones estándar individuales con metanol. Tanto el tetrafluoroborato como el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim] BF_4 y ([Bmim] Cl), así como el fosfato monobásico de sodio, el tartrato de sodio y el hidróxido de sodio se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania).

La solución reguladora electroforética se preparó diariamente disolviendo la cantidad apropiada de fosfato dibásico sódico y ácido fosfórico en agua ultrapura ($18 \text{ m}\Omega$) proporcionada por el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE. UU.).

Instrumentación

Las extracciones asistidas por ultrasonido se llevaron a cabo utilizando una sonda con punta de titanio Sonics Vibra cell VCX130 (9,5 mm de diámetro, 130 W de potencia nominal, 20 kHz de frecuencia). Se empleó una centrífuga Rolco para separar las muestras emulsionadas.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar marca MDQ Beckman Coulter (**Fig. 17**) equipado con un detector de arreglo de diodos. Los capilares también fueron Beckman Coulter. El control y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el software 32 Karat.



Figura 17: Equipo de Electroforesis Capilar

Muestras

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron cinco muestras de grasa de pollo de diferentes orígenes. La primera y la segunda (A y B) se compraron en mercados minoristas y la tercera (C) en un supermercado. Para asegurar la ausencia de antibióticos, las dos últimas muestras (D y E) fueron de granjas ecológicas de la zona de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. Todas las muestras fueron adquiridas durante 2017 en Argentina.

Preparación de la muestra y procedimiento de microextracción

La grasa de pollo se calentó a $75 \pm 1^\circ\text{C}$ en una placa calentadora y se filtró bajo vacío, a través de un filtro de papel de $22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (**Fig. 18a**). Se introdujeron 5 g en un tubo de centrifuga y se agregaron $500 \mu\text{L}$ de solvente de extracción ([Bmim] Cl, tartrato y fosfato de sodio). Posteriormente, se sumergió la sonda de ultrasonido en el tubo que contenía la mezcla y luego se colocó en un baño de hielo. Las microextracciones se realizaron a 91 W durante 7,5 minutos, aplicando ciclos ultrasónicos de 40 s (encendido)/20 s (apagado). Como resultado, se formó una emulsión de agua en aceite (W/O) (**Fig. 18b**). Luego, se centrifugó a 2500 rpm durante cinco minutos, la emulsión se rompió y de esta manera, la fase acuosa quedó dispuesta en el fondo del tubo cónico (**Fig. 18c**). Una vez que se descartó la fase oleosa, la fase acuosa se limpió con un filtro de jeringa de nylon de $0,22 \mu\text{m}$ (Gamafil, Buenos Aires, Argentina) y se recogió en un vial de CE para la posterior etapa de detección. El proceso analítico completo se ilustra en la **Fig. 19**.

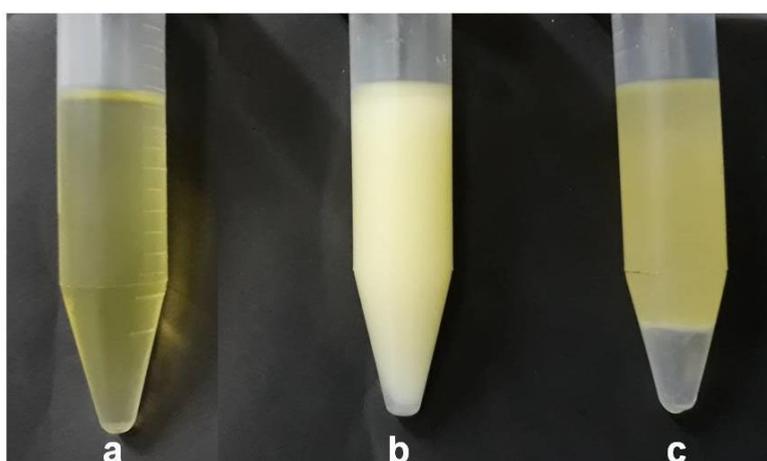


Figura 18: Etapas del proceso de microextracción: a) grasa líquida antes de la extracción, b) muestra emulsificada, c) muestra luego de centrifugar

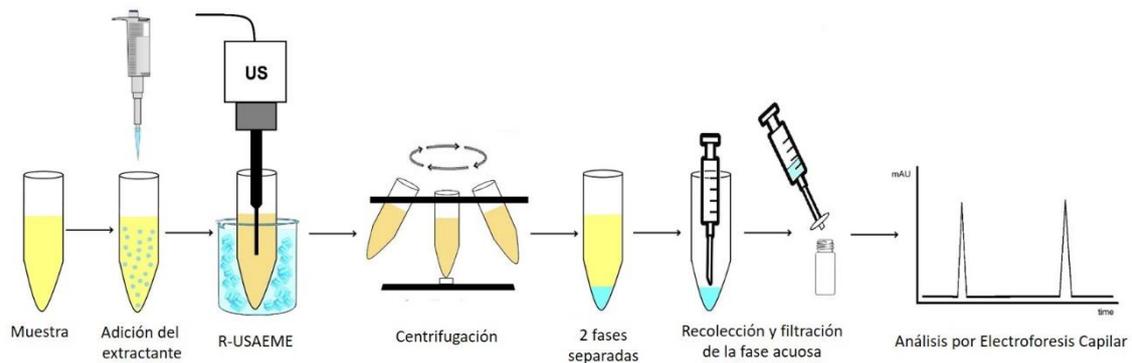


Figura 19: Representación gráfica del proceso analítico completo

Análisis por electroforesis capilar

La separación se realizó en un capilar de sílice fundida (62 cm de longitud efectiva, 50 μm d.i.) con un voltaje de separación de 22,5 kV a 25 °C. Todas las soluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño de poro antes de introducirlas en el sistema electroforético. Luego, se utilizó una mezcla de 50 mmol L^{-1} de fosfato de sodio dibásico y ácido fosfórico a pH 4,50 como electrolito soporte. El capilar se acondicionó con un lavado de 0,1 mol L^{-1} de HCl durante 5 min, agua ultrapura durante 3 min y finalmente con solución tampón durante 5 min entre medidas. Esta secuencia mejoró la reproducibilidad de la separación cuando se analizaron muestras de grasa. Se usó el modo de inyección hidrodinámica aplicando 0,8 psi durante 10 s. Los electroferogramas correspondientes a TILM y TYL se registraron a 290 nm.

Análisis estadístico de datos

Cada parámetro de las curvas de calibrado se calculó con el software ULC 2.0 (Calibración lineal univariante, Ricard Boqué, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España). Se realizaron cálculos estadísticos adicionales utilizando Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.).

4.5. Resultados y discusión

Optimización de las variables R-USAEME

Las variables del procedimiento R-USAEME se optimizaron utilizando un método univariado teniendo en cuenta como variable respuesta la resolución en la separación electroforética. Este estudio se llevó a cabo a 290 nm con muestras previamente enriquecidas en una concentración igual al LMR para TILM ($75 \mu\text{g kg}^{-1}$) y TYL ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). La fortificación de las muestras se realizó agregando la cantidad adecuada de cada analito a la muestra filtrada. Esta mezcla se homogeneizó luego durante un minuto utilizando un vórtex y se mantuvo a temperatura ambiente. El procedimiento se aplicó a muestras reales de pollo a fin de evaluar la aplicabilidad del nuevo método a dichas muestras.

Solvente de extracción

La selección del extractante es uno de los parámetros más importantes para desarrollar una extracción eficiente. Para lograr una buena extracción, factores como: baja solubilidad en la fase oleosa, alta afinidad por los analitos en estudio y fácil dispersión en el aceite durante el proceso de sonicación son imprescindibles. Además, en este caso se consideró la compatibilidad con CE.

En procedimientos de extracción de macrólidos de muestras biológicas previamente descritos, se utilizaron con éxito solventes como metanol, mezclas metanol/agua, solución tampón de McIlvaine y acetonitrilo/agua^{97 98 99}. Durante las pruebas preliminares se evaluaron los solventes mencionados anteriormente, sin embargo, no se lograron buenos resultados.

Debido al hecho de que los IL tienen una gran capacidad para extraer moléculas lipófilas¹⁰⁰, se analizaron [Bmim] BF₄ y [Bmim] Cl. Dado que las recuperaciones obtenidas (entre 49,2 y 74,8%) no fueron satisfactorias, se llevó a cabo un proceso de extracción asistido por una sonda de ultrasonidos, utilizando ambos IL. Si bien los resultados mostraron un incremento en los valores de recuperación, no fueron totalmente satisfactorios.

⁹⁷Jank, Louise, et al. "High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid–liquid extraction technique and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis (LC–MS/MS)." *Talanta* 144 (2015): 686-695.

⁹⁸Jin, Yue, et al. "Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Food chemistry* 221 (2017): 1298-1307.

⁹⁹Carmona, Eric, Vicente Andreu, and Yolanda Picó. "Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 146 (2017): 117-125.

¹⁰⁰Flieger, Jolanta, et al. "Usefulness of reversed-phase HPLC enriched with room temperature imidazolium based ionic liquids for lipophilicity determination of the newly synthesized analgesic active urea derivatives." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 66 (2012): 58-67.

Según la literatura, TYL y TILM aumentan su solubilidad en agua en su forma de sal, y siendo los tartratos y los fosfatos los más solubles^{101 102}, se decidió evaluar la adición de tartrato y fosfato de sodio para ambas soluciones de IL. Los valores de recuperación fueron adecuados, especialmente al usar [Bmim] Cl.

Finalmente, se seleccionó como método de extracción más apropiado una solución acuosa de [Bmim] Cl con tartrato y fosfato de sodio asistida con energía de ultrasonido. Los buenos resultados obtenidos con este procedimiento pueden deberse a la formación de una nueva interfase sobre la superficie hidrófoba de la muestra, cuando el catión del IL se adsorbe sobre la misma, dando lugar a una capa lipofílica¹⁰³. Además, la mayor solubilidad de las sales de TYL y TILM favorece su extracción de muestras de grasa. Por otra parte, [Bmim] Cl es menos caotrópico (los iones caotrópicos son aquellos que tienen alta afinidad por el agua y baja por los lípidos¹⁰⁴) que BF_4^- , por lo que su contacto con el aceite mejora el proceso de extracción.

El IL y ambas concentraciones de sal se optimizaron. Los intervalos estudiados y sus valores óptimos se muestran en la **Tabla 5**. Además, se evaluó el efecto del volumen de solvente de extracción en las recuperaciones de macrólidos. Para ello, se analizaron diferentes volúmenes de la mezcla de IL y sales. Los resultados mostraron que al aumentar el volumen, se obtuvieron mejores recuperaciones, sin embargo, volúmenes más altos que 500 μL produjeron un efecto de dilución.

Ultrasonido

Las variables de la sonda ultrasónica también fueron optimizadas. Se observó que al trabajar a alta potencia y/o sonicación continua, la temperatura en la muestra excedía la permitida por el fabricante del instrumento, lo que causó una interrupción en el proceso de sonicación. Por lo tanto, se evaluaron diferentes ciclos ultrasónicos, teniendo en cuenta que un ciclo ultrasónico se determina como el tiempo de sonicación (encendido) y el tiempo intermitente (apagado). Debido a que la temperatura seguía siendo alta, se usó un baño de hielo para mantener la temperatura baja y constante. Al trabajar con poca potencia y/o poco tiempo, la emulsificación fue incompleta porque no se alcanzó el suficiente contacto entre ambos líquidos inmiscibles. Esto puede ser debido al hecho de

¹⁰¹Chen, Xiaojin, et al. "Preparation and evaluation of tilmicosin-loaded hydrogenated castor oil nanoparticle suspensions of different particle sizes." *International journal of nanomedicine* 9 (2014): 2655.

¹⁰²Hamscher, Gerd, et al. "Quantitative analysis of tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in laying hens." *Journal of agricultural and food chemistry* 54.24 (2006): 9017-9023.

¹⁰³Flieger, Jolanta, et al. "Usefulness of reversed-phase HPLC enriched with room temperature imidazolium based ionic liquids for lipophilicity determination of the newly synthesized analgesic active urea derivatives." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 66 (2012): 58-67.

¹⁰⁴Wu, Bo, Yumei Zhang, and Huaping Wang. "Phase behavior for ternary systems composed of ionic liquid+ saccharides+ water." *The Journal of Physical Chemistry B* 112.20 (2008): 6426-6429.

que la viscosidad del aceite dificulta el proceso de dispersión¹⁰⁵. En conclusión, para obtener la mejor formación de emulsión, los intervalos estudiados para las variables y los valores óptimos de sonda ultrasónica se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Optimización de las variables de extracción

Variable	Intervalo estudiado	Valor óptimo
Líquido iónico [mmol L ⁻¹]	0-10	2,5
Sales [mol L ⁻¹]	0-0,05	6,25x10 ⁻³
Volumen de extractante [μL]	200-600	500
Ciclos [s]		
-on	20-60	40
-off	5-40	20
Tiempo (on+off) [min]	1-10	7,5
Potencia [W]	52-117	91

Optimización del análisis electroforético

El análisis electroforético se realizó utilizando el modo CZE (electroforesis capilar de zona). El pH de la solución tampón y su concentración se seleccionaron teniendo en cuenta la etapa de extracción. Dado que el pH del extractante era de alrededor de 5,00, se probó una solución de electrolito de pH a 2,50, 4,50 y 7,50 con una mezcla de fosfato de sodio dibásico y ácido fosfórico. A pH 2,50, las áreas de los picos fueron mayores, pero el tiempo de análisis fue demasiado largo. Cuando se usó un pH de 7,50 los picos de los analitos se solaparon con la señal del flujo electroosmótico. A pesar de que las áreas de los picos de los analitos eran ligeramente más bajas a pH 4,50, el tiempo de análisis se redujo de 22 a 14 minutos, por lo que se seleccionó este valor de pH como óptimo. Luego, se probaron otras soluciones tampón a este pH (ácido cítrico-citrato, ácido acético-acetato) y, teniendo en cuenta la reproducibilidad de las señales, los mejores resultados se obtuvieron utilizando una solución de ácido

¹⁰⁵López-García, Ignacio, Yesica Vicente-Martínez, and Manuel Hernández-Córdoba. "Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction." *Talanta* 124 (2014): 106-110.

fosfórico-fosfato. Además, se evaluó la fuerza iónica de esta solución cambiando la concentración de fosfato de sodio dibásico entre 20 y 100 mmol L⁻¹. Los mejores resultados en términos de selectividad y sensibilidad se obtuvieron trabajando con 50 mmol L⁻¹.

La optimización de las variables instrumentales se realizó variando el voltaje aplicado (entre 15 y 25 kV) y el tiempo de inyección (5, 10 y 15 s) a 0,8 psi para evaluar sus efectos en los tiempos de migración y la resolución de los picos de los analitos. Como es esperable, la resolución fue mejor con voltajes más bajos y los tiempos de migración fueron más bajos con voltajes más altos. Cuando se aplicaron 22,5 kV, se obtuvo una mejor relación entre ambos parámetros.

Respecto al tiempo de inyección, se observó que con valores mayores que 10 s, los picos en los electroferogramas se aplanaban y los tiempos de migración eran más largos. Por lo tanto, este valor fue seleccionado como óptimo, en modo de inyección hidrodinámico. Los tiempos de migración fueron 8,5 min y 14,1 min para TILM y TYL respectivamente (**Fig. 20**), teniendo en cuenta los valores óptimos de cada variable.

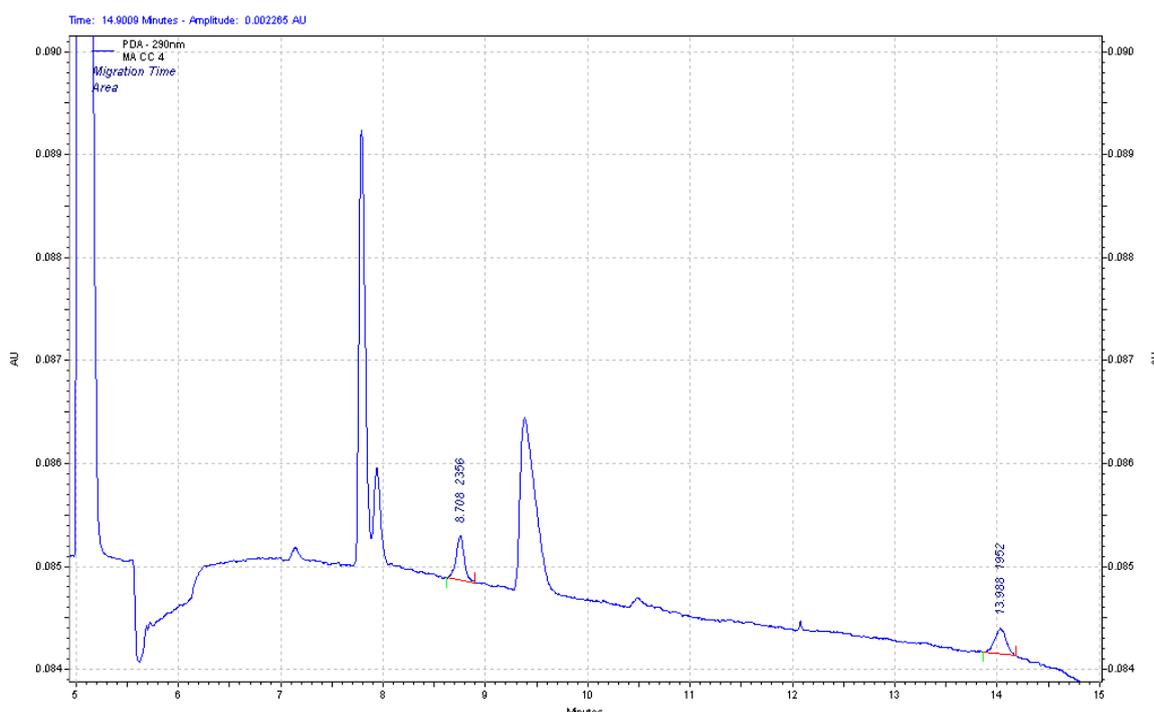


Figura 20: Electroferograma típico obtenido luego de optimizar las variables electroforéticas

Parámetros analíticos y análisis de muestras reales

Como puede verse en el apartado Muestras de la Sección 4.4, se analizaron cinco muestras diferentes de grasa de pollo. Después de aplicar el método propuesto, los analitos no fueron detectados.

Dado que las muestras presentaban una matriz compleja, fue necesario evaluar su efecto. Para este propósito, se realizó una comparación entre las pendientes de las curvas de calibrado, obtenidas utilizando soluciones estándar preparadas en solventes de extracción y las obtenidas con estándares realizados en matriz semejante a la de la muestra, trabajando en los mismos intervalos de linealidad. Las varianzas de los residuales para las mencionadas líneas de regresión fueron estadísticamente comparables (comparación realizada mediante un test F), por lo que el test-t para la comparación de pendientes fue llevado a cabo aplicando la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{b_1 - b'_1}{\sqrt{S^2 \left(\frac{1}{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \sum(x'_{i1} - \bar{x}'_1)^2} \right)}}$$

donde b_1 y b'_1 son las pendientes de las dos líneas de regresión, S^2 la varianza conjunta estimada, X y \bar{X} corresponden a la concentración de los testigos en las rectas de calibrado¹⁰⁶.

Los resultados de las cinco muestras indicaron que ambas pendientes fueron significativamente diferentes, lo que demostró la presencia de efecto matriz. Como ejemplo, el valor calculado t para TILM en la muestra C fue 12454, que era mucho mayor que el valor tabulado ($t_{(0,025; 6)} = 2,44$), lo que demuestra lo que se había observado anteriormente. Por lo tanto, la cuantificación de los analitos se realizó utilizando soluciones estándar de matriz semejante a la muestra.

Además, se evaluó la homoscedasticidad en las rectas de calibrado de estándares de matriz semejante a la muestra aplicando la prueba de Hartley¹⁰⁰, preparando cada nivel de concentración por triplicado. En todos los casos, esta condición no se cumplió. Como ejemplo, el valor calculado del estadístico F para TILM en la muestra C fue de 40,32 y F crítico $(0,05; 4; 4) = 6,59$. Dado que el valor F calculado fue mucho mayor que F crítico, las varianzas de los residuales presentaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, se utilizó el método de mínimos cuadrados ponderados para los propósitos de cuantificación en lugar del procedimiento de mínimos cuadrados ordinarios, aplicando la siguiente ecuación:

$$b = \frac{\sum(w_i(x_i - \bar{x}_w) \cdot (y_i - \bar{y}_w))}{\sum(x_i - \bar{x}_w)^2}$$

$$a = \bar{y}_w - b\bar{x}_w$$

¹⁰⁶Massart, Desiré Luc, et al. "Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A." *Applied Spectroscopy* 52 (1998): 302A.

Donde $W_i = 1/S_y^2$, $\bar{x}_w = \sum w_i x_i / \sum w_i$, $\bar{y}_w = \sum w_i y_i / \sum w_i$, x_i e y_i representan los componentes de cada punto de la recta de calibrado.

Además de la evaluación de selectividad (en términos de efectos de matriz), todo el método de validación se realizó mediante la evaluación de los siguientes parámetros analíticos: veracidad, linealidad, precisión (en términos de repetitividad), linealidad, LOD y LOQ.

La veracidad se evaluó a partir de estudios de recuperación. Las muestras fortificadas se prepararon teniendo en cuenta los valores de LMR para TILM ($75 \mu\text{g kg}^{-1}$) y TYL ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). Las concentraciones agregadas para este estudio fueron 0,5 LMR, LMR y 1,5 LMR para cada analito. Los valores obtenidos se informan en la **Tabla 6**, para las cinco muestras analizadas y los dos analitos. Como puede verse, se obtuvieron recuperaciones satisfactorias entre 73-117%, considerando el criterio de recomendación de la Unión Europea¹⁰⁷, excepto para la muestra E en la determinación de TILM. En este caso, los valores de recuperación fueron demasiado altos en los tres niveles de concentración, probablemente debido a la interacción de TILM con algunos componentes de la muestra que se extrajeron conjuntamente. Por lo tanto, TILM no se determinó en esta muestra.

La repetitividad del método se evaluó mediante el análisis de 3 réplicas de las soluciones de calibrado de matriz semejante a la muestra en los tres niveles de concentración para ambos analitos. La **Tabla 6** muestra que los valores obtenidos fueron inferiores al 20%¹⁰⁷.

La linealidad se investigó con réplicas de soluciones estándar de matriz emparejada ($n = 3$), en el intervalo entre 35 y $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ para ambos analitos ($p < 0,05$ para la prueba ANOVA).

Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) se calcularon a partir de los datos de la regresión por mínimos cuadrados ponderados¹⁰⁸. Los valores de LOD obtenidos oscilaron entre $5,2$ y $18,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ y entre $6,6$ y $12,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ para TILM y TYL, respectivamente. Respecto a los valores de LOQ, oscilaron entre $17,4$ y $55,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ y entre $22,1$ y $47,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para TILM y TYL, respectivamente. Es importante señalar que todos los valores LOQ fueron mucho más bajos que los LMR.

Los resultados obtenidos demostraron la aplicabilidad del método en la determinación de TYL y TILM en muestras de grasa de pollo.

La **Tabla 7** incluye diferentes características de los métodos analíticos descritos en la literatura para la determinación de antibióticos macrólidos, destacando el paso de extracción. Es de suma importancia mencionar que la mayoría de ellos usa grandes volúmenes de solventes orgánicos en comparación con el método propuesto que utiliza el menor volumen de solvente. Esto se puede explicar en función de la estrategia de extracción utilizada, ya que aprovecha no solo la capacidad de los

¹⁰⁷EU Commission. "Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin." *Official Journal of the European Union* (2010): L15.

¹⁰⁸Miller, Jane C., and James N. Miller. *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana, 1993.

tartratos y los fosfatos solubles en agua para mejorar la solubilidad de los macrólidos en solución acuosa, sino también porque es el único que utiliza energía de ultrasonido y IL como extractante.

Tabla 6: Análisis de muestras reales fortificadas

Muestra	Tilmicosina ^a							Tilosina ^b						
	RL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,5 LMR		LMR		1,5 LMR		RL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,5 LMR		LMR		1,5 LMR	
		R* (%)	DER (%)	R* (%)	DER (%)	R* (%)	DER (%)		R* (%)	DER (%)	R* (%)	DER (%)	R* (%)	DER (%)
A	35-200	107,0	1,7	73,0	11,1	87,0	9,1	35-200	117,0	0,5	73,0	6,2	89,4	7,6
B		93,4	0,7	98,0	4,4	101,3	12,4		99,0	3,4	86,4	4,9	108,0	5,9
C		80,3	4,0	96,5	6,7	94,5	4,1		109,0	0,9	100,9	2,4	90,9	5,5
D	50-200	88,6	7,6	75,5	11,1	94,5	6,2		83,4	2,9	92,3	6,4	96,5	2,5
E	--	--	--	--	--	--	--		87,7	7,8	86,5	11,7	83,0	10,1

RL: intervalo lineal, R*: recuperación promedio de 3 réplicas, DER: desviación estándar relativa. ^aTILM LMR: 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ^bTYL LMR: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 7: Métodos analíticos previamente descritos para la extracción de antibióticos de comida de origen animal desde 1998 a 2018

Muestra (cantidad) –Análitos- Técnica de detección	Método de extracción	Solvente de extracción Volumen del solvente de extracción		Recuperación	Párametros analíticos	Ref.
-Músculo (cerdo, vaca, oveja, caballo, ciervo, reno) -Riñón (cerdo, vaca, oveja, caballo) (3 ± 0,03 g) -Tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas, β-lactamas y macrólidos LC-MS/MS	-Extracción con solvente (agitación)	-0.1 M EDTA -70% metanol	-200 μL -15 mL	Macrólidos -Músculo de cerdo: 80–86 % -Otros músculos: 77–104 % -Riñón: 44–68 %	Músculo de cerdo LOD 3 μg kg ⁻¹ Para los macrólidos se obtuvieron los peores resultados (S/N > 8 al LMR).	109
Hígado y riñón (vaca, pollo, cordero, cerdo y conejo) (5,00 ± 0,02g) Eritromicina, TYL, espiramicina, roxitromicina, troleandomicina, TILM y josamicina LC-DAD	-Homogeneización del tejido con el solvente extractante y extracción con un cartucho Oasis HLB	-Solución reguladora EDTA-McIlvaine's	-50 mL	Recuperación en el día TILM Nivel de fortificación -100 μg kg ⁻¹ : 70% -200 μg kg ⁻¹ : 74% -300 μg kg ⁻¹ : 93% TYL Nivel de fortificación -100 μg kg ⁻¹ : 65% -200 μg kg ⁻¹ : 70% -300 μg kg ⁻¹ : 72%	CCα TILM 1005 μg kg ⁻¹ TYL 116 μg kg ⁻¹ CCβ TILM: 1010 μg kg ⁻¹ TYL : 132 μg kg ⁻¹	110
Carne (cerdo, vaca, cordero, pollo, hígado de cerdo, hígado de cordero e hígado de pollo) (2,50±0,01 g) β-agonistas, sulfanilamidas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, β-lactamas, nitroimidazoles, glucocorticoides, hormonas sexuales, cloranfenicol, sedantes y metabolito de olaquinox UPLC-MS/MS	- Vortex - Sonicación - Cartucho Waters Oasis PRiME HLB	- Acetonitrilo/agua (80/ 20, v/v)	-10 mL	Las recuperaciones promedio de todos los analitos se encuentra en el intervalo de 80 a 116%	Los límites de cuantificación estuvieron en el intervalo 0,05–3,0 μg kg ⁻¹ y los límites de detección, 0,1–10 μg kg ⁻¹	111
Músculo de pollo (2 g)	-Vortex	-1% ácido acético en ACN	-10 mL -diluído a 20 mL	-TILM 71–106% -TYL 63–119%	LOQ -TILM: 5 ng g ⁻¹ -TYL: 5 ng g ⁻¹	

¹⁰⁹Granelli, K., and C. Branzell. "Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 586.1-2 (2007): 289-295.

¹¹⁰Berrada, Houda, et al. "Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC." *Journal of Chromatography A* 1157.1-2 (2007): 281-288.

¹¹¹Zhang, Yanxia, et al. "A Multi-Class, Multi-Residue Method for Detection of Veterinary Drugs in Multiple Meat Using a Pass-Through Cleanup SPE Technique and UPLC-MS/MS Analysis." *Food analytical methods* 11.10 (2018): 2865-2884.

Fluoroquinolonas, sulfonamidas y macrólidos (TILM, TYL) LC-MS/MS		-dilución con 0,1% ácido fórmico en 20% metanol en solución acuosa			112	
Pollo y pollo frito (5,0 g) 4 antagonistas de folato, 4 benzimidazoles, 5 macrólidos, 7 poliéteres, 2 quinolonas, 7 sulfonamidas, y 8 otras clases LC-MS/MS	-Cartucho InertSep® K-solute	-Acetato de etilo -10 mL -Agua destilada -5 mL -ACN -30 mL		TILM Nivel de fortificación: 10 µg kg ⁻¹ -Pollo frito: 79% -Pollo: 71 % -Músculo: 73 % Nivel de fortificación: 50 µg kg ⁻¹ -Pollo frito: 78 % -Pollo: 72 % -Músculo: 76 %	TILM LOQ -Pollo frito: 1 µg kg ⁻¹ -Pollo: 0,4 µg kg ⁻¹ -Músculo: 0,4 µg kg ⁻¹	113
Huevos de pollo (2,0 g) Sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, nitrofuranos, β-lactamas, nitromidazoles y cloranfenicol LC-MS/MS	-Homogeneización por un rotor de dispersión de alta velocidad, con oscilación ultrasónica y centrifugación.	-ACN-H ₂ O (90:10, v/v) -7,5 mL - 0,1 mol·L ⁻¹ Na ₂ EDTA -0,5 mL		Nivel de fortificación 5 µg·kg ⁻¹ TYL 107,3 % TILM 93 % Nivel de fortificación 20 µg·kg ⁻¹ TYL 103,3 % TILM 84,8 % Nivel de fortificación 50 µg·kg ⁻¹ TYL 88,5 % TILM 80,9 %	LOD -TYL: 0,07 µg·kg ⁻¹ -TILM: 0,75 µg·kg ⁻¹ LOQ -TYL: 0,24 µg·kg ⁻¹ -TILM: 2,50 µg·kg ⁻¹	114
Músculos de cerdo, vaca y pollo (2 g) Diez macrólidos LC-MS/MS	-Extracción en fase sólida con polímeros impresos molecularmente	-Solución reguladora de borato de sodio (pH = 10) -5 mL -Acetato de etilo -10 mL		Recuperación de TILM (Pollo) en el día: Nivel de fortificación -1 µg kg ⁻¹ : 67,6 % -5 µg kg ⁻¹ : 63,0 % -20 µg kg ⁻¹ : 85,0 %	TILM (Chicken): LOD: 0,2 µg kg ⁻¹ LOQ: 0,6 µg kg ⁻¹	115
Tejido de músculo de pollo (2,0 g) LC-MS/MS	-Sistema de homogeneización FASTH21	-Buffer succinate-ácido etilendiaminotetraacético -5 mL -Acetonitrilo -10 mL		TYL 72 % TILM 58 %	LOD -TYL: 9 ng g ⁻¹ -TILM: 8 ng g ⁻¹ LOQ	

¹¹²Zhang, Meiyu, et al. "Freeze-thaw approach: A practical sample preparation strategy for residue analysis of multi-class veterinary drugs in chicken muscle." *Journal of separation science* 41.11 (2018): 2461-2472.

¹¹³Yoshikawa, Souichi, et al. "Simultaneous determination of multi-class veterinary drugs in chicken processed foods and muscle using solid-supported liquid extraction clean-up." *Journal of Chromatography B* 1057 (2017): 15-23.

¹¹⁴Wang, Kun, et al. "A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS." *Journal of agricultural and food chemistry* 65.24 (2017): 5064-5073.

¹¹⁵Song, Xuqin, et al. "Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Food chemistry* 208 (2016): 169-176.

Benzimidazoles, quinolonas, nitromidazoles, β -lactamas, macrólidos, colorantes de trifenilmetano, sulfonamidas y tetraciclinas LC-MS/MS					-TYL: 28 ng g ⁻¹ -TILM: 24 ng g ⁻¹	116
Músculo de pollo (5,0 g) Quinolonas, sulfonamidas, macrólidos, antihelmíntico, avermectinas y diamino derivados y benzatina, usado como marcador de la presencia de penicilina. UHPLC-MS/MS	-Metodología QuEChERS	-1% of ácido acético en una solución de acetonitrilo:agua (80:20, v/v).	-10,0 mL	TILM Nivel de fortificación: -20 μ g kg ⁻¹ : 75,5 % -50 μ g kg ⁻¹ : 81,4 % -100 μ g kg ⁻¹ : 90,1 % TYL Nivel de fortificación: -20 μ g kg ⁻¹ : 83,2 % -50 μ g kg ⁻¹ : 91,6 % -100 μ g kg ⁻¹ : 75,4 %	Los LODs y LOQs estuvieron en los intervalos 3,0 to 6,0 μ g kg ⁻¹ y 10,0 to 20,0 μ g kg ⁻¹ , respectivamente, excepto para TYL que muestra un LOD y LOQ de 9,0 y 30,0 μ g kg ⁻¹ .	117
Carne de ave (2g) Dihidroestreptomicina, espectinomina, espiramicina, estreptomicina, TILM y TYL LC-ESI-MS	-Extracción con un líquido a presión	-Metanol	-22 mL	En el día TILM -MRL/2: 82 % -MRL: 79 % -1.5 MRL: 83 % TYL -MRL/2: 91 % -MRL: 92 % -1.5 MRL: 94 %	LOD: 1-6 μ g kg ⁻¹ LOQ: -TILM: 10 μ g kg ⁻¹ -TYL: 5 μ g kg ⁻¹	118
Carne de ave y pescado (5 g) Eritromicina, josamicina, roxitromicina, espiramicina, TILM, troleandomicina y TYL. LC-(ESI)MS	-Extracción con un líquido a presión	-Metanol	-40 mL	Recuperación en el día TILM Nivel de fortificación -50 μ g kg ⁻¹ : 73 % -100 μ g kg ⁻¹ : 78 % -200 μ g kg ⁻¹ : 82 % TYL Nivel de fortificación -50 μ g kg ⁻¹ : 72 % -100 μ g kg ⁻¹ : 83 % -200 μ g kg ⁻¹ : 90 %	LOD TILM: 23 μ g kg ⁻¹ TYL: 18 μ g kg ⁻¹ LOQ TILM: 25 μ g kg ⁻¹ TYL: 25 μ g kg ⁻¹	119

¹¹⁶Biselli, Scarlett, et al. "A multi-class, multi-analyte method for routine analysis of 84 veterinary drugs in chicken muscle using simple extraction and LC-MS/MS." *Food Additives & Contaminants: Part A* 30.6 (2013): 921-939.

¹¹⁷López-García, Ignacio, Yesica Vicente-Martínez, and Manuel Hernández-Córdoba. "Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction." *Talanta* 124 (2014): 106-110.

¹¹⁸Berrada, Houda, et al. "Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS." *Journal of separation science* 33.4-5 (2010): 522-529.

¹¹⁹Berrada, Houda, et al. "Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography a* 1208.1-2 (2008): 83-89.

Músculo de ave (2,5 g) Epiramicina, tartrate de TYL, fosfato de oleandomicina, roxitromicina y eritromicina LC-MS	-Extracción con solvente y cartucho de intercambio catiónico	-0,3% ácido metafosfórico– metanol (7:3, v/v) -17 mL	TYL Nivel de fortificación: 50–200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Recuperación: 56 % TILM Nivel de fortificación: 40–150 Recuperación: 93 %	LOD TYL: 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ TILM: 8 $\mu\text{g L}^{-1}$	120
Animales productores de alimentos (2,5g) Espiramicina, TILM, TYL, kitasamicina, josamicina eritromicina y oleandomicina LC-UV	-Agitación manual con extracción con solvente	-0,3% ácido metafosfórico– metanol (7:3, v/v) -17 mL	TILM: 65 % TYL: 60 %	LOD -TILM: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -TYL: 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOQ -TILM: 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -TYL: 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$	121
Tejidos de pollo, vaca, cerdo y oveja (4,50–5,50 g) TILM LC-UV	-Homogenización con sonda de ultrasonido y limpieza de la muestra con un cartucho C18	-Metanol -20 \pm 1 mL -100mM solución -5 \pm 1 mL reguladora de fosfato (pH 2,5)	Grasa abdominal, TILM Conc. Fortificada -0,025 $\mu\text{g g}^{-1}$: 89% -0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$: 80% -1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$: 96%	LOD -Riñón e hígado de pollo: 0,013 $\mu\text{g g}^{-1}$ -Grasa abdominal, piel y músculo de pollo 0,0053 $\mu\text{g g}^{-1}$ -Tejido de cerdo 0,0066 $\mu\text{g g}^{-1}$ -Tejido de vaca 0,0075 $\mu\text{g g}^{-1}$ -Tejido de oveja 0,011 $\mu\text{g g}^{-1}$ LOQ -Para todos los tejidos excepto hígado y riñón de pollo 0,025 $\mu\text{g g}^{-1}$ -Hígado y riñón de pollo 0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$	122
Músculo de cerdo (5 g) TILM, TYL, espiramicina y neospiramicina LC-UV	-Extracción líquido– líquido y limpieza con cartuchos Bond Elut C18	-ACN -10 mL -Isooctano -10 mL	TILM -1/2 MRL: 61,5 % -MRL: 59,9 % -2 MRL: 58,2 % -4 MRL: 44,1 % TYL -1/2 MRL: 64,6 % -MRL: 64,2 %	LODs 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para TILM y TYL	123

¹²⁰Codony, Rosa, et al. "Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 959.1-2 (2002): 131-141.

¹²¹Leal, Carmen, et al. "Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 910.2 (2001): 285-290.

¹²²Stobba-Wiley, Carolyn M., et al. "Determination of tilmicosin residues in chicken, cattle, swine, and sheep tissues by liquid chromatography." *Journal of AOAC international* 83.4 (2000): 837-846.

¹²³Juhel-Gaugain, Murielle, Beatrice Anger, and Michel Laurentie. "Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection." *JOURNAL-AOAC INTERNATIONAL* 82 (1999): 1046-1053.

				-2 MRL: 63.0 % -4 MRL: 52.2 %		
Músculo e hígado de pollo, músculo, hígado y riñón de cerdo y músculo e hígado de vaca (5 g) Josamicina, kitasamicina, mirosamicina, espiramicina y TYL HPLC	- Extracción líquido-líquido y limpieza con cartuchos Bond Elut C18 Bond Elut SCX	-0.3% ácido metafosfórico- metanol (7:3, v/v)	-100 mL	TYL Músculo de pollo: 71,7 % Hígado de pollo: 70,8 %	LOD: 0,05 µg g ⁻¹	124
Grasa de pollo (5 g) TILM y TYL CE-DAD	-Microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonido (R-USAEME)	[Bmim]Cl, tartrato de sodio y fosfato de sodio	-500 µL	TILM: 73-107% TYL: 73-117 %	LOD -TILM: 5,2-18,9 µg kg ⁻¹ -TYL: 6,6-12,8 µg kg ⁻¹ LOQ -TILM:17,4-55,0 µg kg ⁻¹ -TYL:22,1-47,0 µg kg ⁻¹	Este trabajo

¹²⁴Horie, Masakazu, et al. "Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 812.1-2 (1998): 295-302.

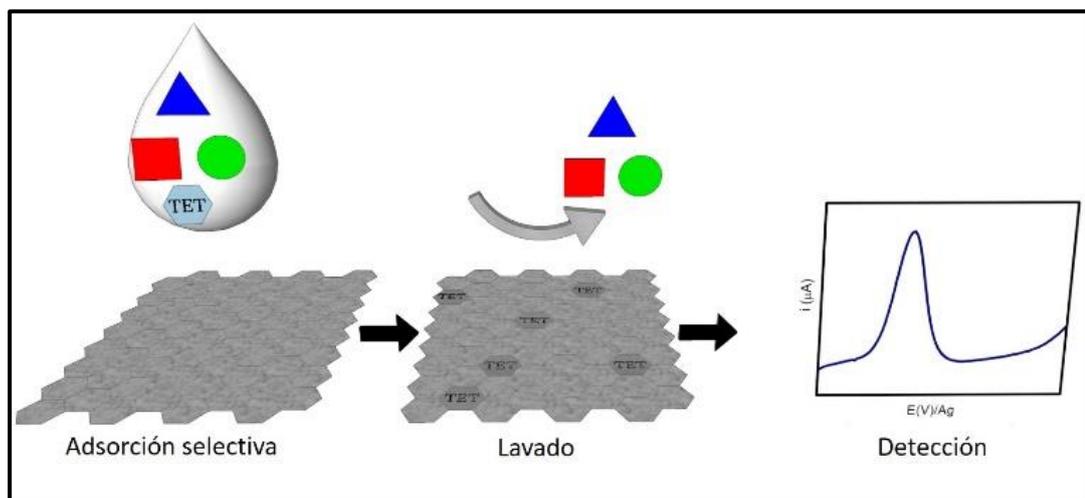
4.6. Conclusiones

Se desarrolló un nuevo método analítico para la determinación de TILM y TYL en muestras de grasa de pollo. La extracción, así como la preconcentración de los analitos usando una solución acuosa de IL como extractor y una muestra oleosa, se lograron con una nueva metodología llamada microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonidos (R-USAEME). Este procedimiento toma solo 12,5 minutos en el proceso de extracción y sin el uso de ningún solvente orgánico tóxico. El extracto se inyecta directamente en el equipo de CE, y solo toma 15 minutos completar el análisis. Los valores de DER% obtenidos fueron satisfactorios (inferior al 12,4%) y los LOQ fueron inferiores a los LMR establecidos por la legislación europea y la Comisión del Codex Alimentarius.

Por lo tanto, se ha logrado una metodología simple, rápida, de bajo costo y respetuosa con el ambiente para detectar TILM y TYL en muestras de grasa de pollo.

Este nuevo procedimiento pone en relevancia la posibilidad del desarrollo de nuevos protocolos que pueden incluir otros antibióticos lipófilos, así como grasas de otros orígenes. De esta manera, contribuye al monitoreo de los productos de origen animal con la premisa de mejorar la calidad de los alimentos para el consumo humano.

Capítulo 5: Sensor descartable basado en óxido de grafeno electroquímicamente reducido como herramienta para la determinación de tetraciclinas totales



5.1. Objetivo

Desarrollo de un sensor basado en óxido de grafeno reducido electroquímicamente para la determinación de tetraciclinas totales.



Article

Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Based Screen-Printed Electrodes for Total Tetracycline Determination by Adsorptive Transfer Stripping Differential Pulse Voltammetry

Anabela S. Lorenzetti ^{1,2}, Tania Sierra ¹, Claudia E. Domini ^{2,*}, Adriana G. Lista ^{2,†}, Agustín G. Crevillen ³ and Alberto Escarpa ^{1,4,*} 

¹ Department of Analytical Chemistry, Physical Chemistry and Chemical Engineering, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Spain; anabela.lorenzetti@gmail.com (A.S.L.); tania.sierra@edu.uah.es (T.S.)
² INQUISUR, Department of Chemistry, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina; tino_alcarria@hotmail.com
³ Department of Analytical Sciences, Faculty of Sciences, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), E-28040 Madrid, Spain; agustingcrevillen@ccia.uned.es
⁴ Chemical Research Institute “Andrés M. del Río” (IQAR), University of Alcalá, E-28805 Alcalá de Henares, Spain
* Correspondence: claudia.domini@uns.edu.ar (C.E.D.); alberto.escarpa@uah.es (A.E.)
† In memoriam.

Received: 11 November 2019; Accepted: 19 December 2019; Published: 21 December 2019 

Abstract: Disposable electrochemically reduced graphene oxide-based (ERGO) screen-printed electrodes (SPE) were developed for the determination of total tetracyclines as a sample screening approach. To this end, a selective adsorption-detection approach relied on adsorptive transfer stripping differential pulse voltammetry (AdTDPV) was devised, where the high adsorption capacity and the electrochemical properties of ERGO were simultaneously exploited. The approach was very simple, fast (6 min.), highly selective by combining the adsorptive and the electrochemical features of tetracyclines, and it used just 10 µL of the sample. The electrochemical sensor applicability was demonstrated in the analysis of environmental and food samples. The not-fully explored AdTDPV analytical possibilities on disposable nanostructured transducers become a new tool in food and environmental fields; drawing new horizons for “in-situ” analysis.

Keywords: tetracycline; adsorption; graphene; adsorptive and electrochemical selectivity; disposable sensors; sample screening

5.2. Resumen

En este trabajo, se desarrolló un sensor descartable basado en óxido de grafeno electroquímicamente reducido (ERGO-SPCE) para la determinación de tetraciclinas totales en muestras ambientales y productos lácteos. Para este fin, se utilizó un método selectivo basado en la voltamperometría de pulso diferencial por adsorción (AdTDPV), el cual, a diferencia de la DPV convencional, solo detecta aquellos analitos fuertemente adsorbidos en la superficie del electrodo. La obtención de este sensor se basó en las excelentes propiedades electroquímicas del ERGO sumadas a su alta capacidad de adsorción.

En primer lugar, las tetraciclinas se adsorben selectivamente en el ERGO-SPCE, luego el sensor se enjuaga y, finalmente, los analitos se determinan por DPV. El método es rápido (6 min) y altamente selectivo al combinar tanto las características electroquímicas como de adsorción de las tetraciclinas, y además es totalmente compatible con el análisis "in situ" usando solo 10 μL de muestra. La aplicabilidad del sensor electroquímico fue demostrada en los análisis de agua de río y leche las cuales revelaron un excelente desempeño, con valores de recuperación comprendidos entre 94-110%.

Las posibilidades analíticas de AdTDPV, no exploradas en su totalidad en transductores nanoestructurados, se convierten en una nueva herramienta en el campo de la seguridad alimentaria y veterinaria; dibujando nuevos horizontes para el análisis "in situ" de alimentos de origen animal en granjas, laboratorios industriales y gubernamentales.

5.3. Introducción

El grafeno es un alótropo de carbono compuesto de una sola capa de este elemento con un orbital sp^2 parcialmente ocupado por encima y por debajo del plano de la hoja. Este nanomaterial atrajo la atención de la comunidad científica debido a sus increíbles características, tales como: gran área de superficie ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para una sola capa); alta resistencia mecánica y alta elasticidad (módulo de Young $\approx 1100 \text{ GPa}$) excelente conductividad, tanto térmica ($5 \times 10^3 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$) como eléctrica (movilidad del portador de carga $> 200,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para grafeno suspendido libremente)¹²⁵.

Por lo general, el grafeno se puede sintetizar mediante métodos ascendentes (crecimiento epitaxial y deposición química de vapor) y métodos descendentes (exfoliación de grafito y exfoliación de óxido de grafito)¹²⁶. Entre ellos, la exfoliación del óxido de grafito es una de las rutas más prometedoras para la producción en masa de grafeno a bajo costo y alto rendimiento y para aplicaciones en las que no se requiere grafeno prístino, como el análisis químico. Mediante este enfoque, el óxido de grafito se exfolia fácilmente mediante tratamientos térmicos o mediante sonicación en agua, para luego ser reducido utilizando métodos térmicos, electroquímicos o químicos¹²⁷. Este último paso es necesario para eliminar las especies de oxígeno y recuperar la configuración sp^2 de la red de carbono. Entre las estrategias de reducción mencionadas anteriormente, la reducción electroquímica ha generado una gran expectativa ya que es un enfoque ecológico (sin utilización de reactivos), simple (solo una celda electroquímica), económico y rápido^{128 129}. El grafeno sintetizado por esta estrategia se denomina óxido de grafeno reducido electroquímicamente (ERGO).

En el campo de la química analítica, el grafeno se ha utilizado con éxito en todos los pasos analíticos: preparación de muestras, separación y detección^{130 131}. Con respecto a la preparación de muestras, el grafeno se ha aplicado en la extracción y microextracción en fase sólida debido a su excelente capacidad de adsorción^{132 133}. Estas aplicaciones se centraron principalmente en la extracción de derivados de benceno que pueden interactuar fácilmente mediante el apilamiento π - π con grafeno

¹²⁵García, Carlos D., Agustín G. Crevillén, and Alberto Escarpa, eds. *Carbon-based Nanomaterials in Analytical Chemistry*. No. 12. Royal Society of Chemistry, 2018.

¹²⁶Edwards, Rebecca S., and Karl S. Coleman. "Graphene synthesis: relationship to applications." *Nanoscale* 5.1 (2013): 38-51.

¹²⁷Dreyer, Daniel R., et al. "The chemistry of graphene oxide." *Chemical society reviews* 39.1 (2010): 228-240.

¹²⁸Toh, Shaw Yong, et al. "Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: synthesis and characterisation." *Chemical Engineering Journal* 251 (2014): 422-434.

¹²⁹Guo, Hui-Lin, et al. "A green approach to the synthesis of graphene nanosheets." *ACS nano* 3.9 (2009): 2653-2659.

¹³⁰Martin, Aida, and Alberto Escarpa. "Graphene: the cutting-edge interaction between chemistry and electrochemistry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 56 (2014): 13-26.

¹³¹Pérez-López, Briza, and Arben Merkoçi. "Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences." *Microchimica Acta* 179.1-2 (2012): 1-16.

¹³²Ibrahim, Wan Aini Wan, Hamid Rashidi Nodeh, and Mohd Marsin Sanagi. "Graphene-based materials as solid phase extraction sorbent for trace metal ions, organic compounds, and biological sample preparation." *Critical reviews in analytical chemistry* 46.4 (2016): 267-283.

¹³³Sitko, Rafal, Beata Zawisza, and Ewa Malicka. "Graphene as a new sorbent in analytical chemistry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 51 (2013): 33-43.

gracias a su gran deslocalización electrónica. Por ejemplo, se ha logrado la extracción de derivados de benceno como los PAHs¹³⁴, las tetraciclinas¹³⁵, los antibióticos de la familia de las sulfonamidas¹³⁶, entre otros, utilizando adsorbentes a base de grafeno.

Respecto al uso del grafeno para la detección electroquímica directa, este nanomaterial proporciona:

- (i) una alta tasa de transferencia heterogénea de electrones,
- (ii) propiedades electrocatalíticas con respecto a varias moléculas (debido al alto número de átomos localizados en los bordes/defectos)
- (iii) alta relación superficie/volumen, lo que aumenta la sensibilidad.

Aprovechando estas características, se han desarrollado numerosos sensores electroquímicos basados exclusivamente en grafeno para la detección directa de H₂O₂, ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, varios compuestos fenólicos, entre otros^{137 138}. Además, la combinación de tecnología de electrodo serigrafiado (SPCE) y grafeno es una estrategia de vanguardia para el análisis "in situ" y para el desarrollo de nuevos dispositivos para "puntos de atención" (POC). La tecnología SPCE proporciona dispositivos confiables, de un solo uso, que pueden modificarse fácilmente¹³⁹; el grafeno por su parte, proporciona una mejora del rendimiento electroanalítico¹⁴⁰.

Por otro lado, las tetraciclinas son un tipo de antibióticos con una estructura química derivada de un hidronaftaceno el cual contiene cuatro anillos fusionados con un grupo fenol electroactivo. Este grupo de antibióticos se ha empleado exhaustivamente en medicina humana y animal y, también, como aditivo en la alimentación animal debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana y bajo costo¹¹⁸. Dentro de esta familia, la tetraciclina (TET), la oxitetraciclina (OTC), la clortetraciclina (CTC) y la doxiciclina (DOX) son las más recetadas en veterinaria¹⁴¹. El uso intensivo y el abuso de los antibióticos, en general, y de las tetraciclinas en particular, han provocado un aumento de las cepas bacterianas resistentes a los agentes antimicrobianos, causando una alarma de salud pública en todo el mundo. Por estas razones, muchos países han legislado para establecer límites máximos de residuos

¹³⁴ Khodaei, Nader, et al. "Ultra trace analysis of PAHs by designing simple injection of large amounts of analytes through the sample reconcentration on SPME fiber after magnetic solid phase extraction." *Talanta* 147 (2016): 59-62.

¹³⁵ Wu, Xia Jun, et al. "Determination of tetracyclines in milk by graphene-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography." *Analytical Letters* 50.4 (2017): 641-650.

¹³⁶ Yan, Hongyuan, et al. "Miniaturized graphene-based pipette tip extraction coupled with liquid chromatography for the determination of sulfonamide residues in bovine milk." *Food Chemistry* 158 (2014): 239-244.

¹³⁷ Justino, Celine IL, et al. "Graphene based sensors and biosensors." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 91 (2017): 53-66.

¹³⁸ Cinti, Stefano, and Fabiana Arduini. "Graphene-based screen-printed electrochemical (bio) sensors and their applications: Efforts and criticisms." *Biosensors and Bioelectronics* 89 (2017): 107-122.

¹³⁹ Taleat, Zahra, Alireza Khoshroo, and Mohammad Mazloum-Ardakani. "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)." *Microchimica Acta* 181.9-10 (2014): 865-891.

¹⁴⁰ Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65.2 (2001): 232-260.

¹⁴¹ Pérez-Rodríguez, Michael, et al. "An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination." *Talanta* 182 (2018): 1-21.

(LMR) en alimentos derivados de animales. Además, la presencia de tetraciclinas no se limita a los alimentos, sino también al ambiente a través de las aguas residuales, ya que las plantas de tratamiento de aguas residuales no pueden eliminarlos por completo¹⁴².

Técnicas analíticas tales como HPLC, electroforesis capilar, espectrofotometría o ELISA se han empleado con éxito para la determinación de tetraciclinas residuales. Sin embargo, estas presentan algunos inconvenientes, como el proceso de pretratamiento de la muestra y/o la necesidad de un técnico de laboratorio capacitado¹⁴³. En este sentido, los sensores son una alternativa atractiva o herramientas analíticas complementarias para la detección de TETs debido a sus ventajas inherentes, como la alta selectividad, la detección rápida y la posibilidad de aplicaciones *in situ*¹⁴⁴. Un método de *screening* es el primer método que se aplica al análisis de muestras con el fin de confirmar la presencia o ausencia de residuos de antibióticos. Este procedimiento debe ser simple, sensible, rápido y de bajo costo. Además, si se necesita una extracción, debe ser muy simple y rápida¹⁴⁵.

Se han utilizado sensores electroquímicos basados en grafeno para la determinación de TET obteniendo buenas sensibilidades¹⁴⁶. Kesavan y col. detectaron TET en orina en presencia de ácido úrico (UA), el cual es altamente electroactivo, utilizando electrodos modificados con polimelamina/ERGO¹²⁴. Sun y col. determinaron TET en muestras de agua utilizando una película compuesta de grafeno/L-cisteína¹⁴⁷. Ambos trabajos utilizaron la técnica DPV y llevaron a cabo un estudio de interferencia centrado principalmente en pequeños iones inorgánicos y orgánicos, pero no en compuestos electroactivos. Otros autores fabricaron un electrodo de pasta de carbono combinando nanotubos de carbono de paredes múltiples y óxido de grafeno para la detección de TET¹⁴⁸. Allí se empleó voltamperometría de pulso diferencial de separación por adsorción (AdSDPV): primero, TET se electroacumuló y luego se analizó. El sensor se aplicó a diferentes muestras (agua de río, orina artificial sin ácido úrico y muestras farmacéuticas).

Existe una modificación de la técnica de AdSDPV llamada voltamperometría de pulso diferencial de separación por transferencia de adsorción (AdTDPV) que aún no se ha utilizado para la

¹⁴²Kumar, Mohit, et al. "Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance." *Environment international* 124 (2019): 448-461.

¹⁴³Lan, Lingyi, et al. "Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection." *Biosensors and Bioelectronics* 91 (2017): 504-514.

¹⁴⁴Huang, Danlian, et al. "Recent advances in sensors for tetracycline antibiotics and their applications." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2018).

¹⁴⁵Gaudin, Valérie. "Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin—A comprehensive review." *Biosensors and Bioelectronics* 90 (2017): 363-377.

¹⁴⁶Kesavan, Srinivasan, et al. "Determination of tetracycline in the presence of major interference in human urine samples using polymelamine/electrochemically reduced graphene oxide modified electrode." *Sensors and Actuators B: Chemical* 241 (2017): 455-465.

¹⁴⁷Sun, Xue-Mei, et al. "The electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on graphene/L-cysteine composite film." *Journal of The Electrochemical Society* 164.4 (2017): B107-B112.

¹⁴⁸Wong, Ademar, et al. "Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 757 (2015): 250-257.

determinación de TET. Esta consta de tres pasos: (i) el electrodo se sumerge en la muestra permitiendo que el analito se adsorba, (ii) el electrodo se saca de la muestra y se enjuaga, y (iii) el electrodo se sumerge en el electrolito soporte (el analito se transfiere a otra solución). Esta técnica ofrece dos ventajas: (i) los compuestos con baja adsorción pueden eliminarse fácilmente durante el lavado, por lo que se suprime su interferencia; (b) el medio de adsorción y el electrolito soporte pueden ser diferentes, lo que permite al analista optimizar las condiciones del electrolito soporte¹⁴⁹.

En este trabajo, el óxido de grafeno se redujo electroquímicamente sobre electrodos de carbono serigrafiados (ERGO-SPE, del inglés *Electrochemically Reduced Graphene Oxide - Screen Printed Carbon Electrodes*). Estos electrodos se aplicaron para la detección de tetraciclinas en muestras alimentarias y ambientales, mediante el uso de un enfoque selectivo de detección basado en la voltamperometría de pulso diferencial por transferencia de adsorción (AdTDPV). Este método combina de manera creativa la capacidad de adsorción selectiva del grafeno junto con su alto rendimiento electroquímico, mediante electrodos de carbón serigrafiados desechables (SPCE); simplificando en extremo la construcción del sensor electroquímico.

¹⁴⁹Palecek, Emil, and Martin Bartosik. "Electrochemistry of nucleic acids." *Chemical reviews* 112.6 (2012): 3427-3481.

5.4. Materiales y métodos

Reactivos y muestras

Clorhidrato de tetraciclina (TET), clorhidrato de clortetraciclina (CTC), clorhidrato de doxiciclina (DOX), clorhidrato de oxitetraciclina (OTC), cloruro de hexaaminorutenio (II) y (III), óxido de grafeno (GO, ref:763705) y ácido tricloroacético fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Hidrógeno fosfato de sodio y dihidrógeno fosfato de sodio de Panreac. El ácido ascórbico se adquirió en FlukaChemie (a través de Sigma-Aldrich). Todas las soluciones se prepararon en agua ultrapura Milli-Q.

La leche descremada fue adquirida en un mercado español. Las muestras de agua del río fueron recogidas del río Henares (España).

Instrumentación

Se utilizó un potenciostato Autolab PGSTAT204, controlado por el software Nova 1.10, para el análisis electroquímico y para la fabricación de ERGO-SPCE.

Se emplearon electrodos serigrafiados de carbono marca Dropsens (SPCEs) (DRP-110) compuestos por un electrodo de trabajo (4 mm), un contraelectrodo de carbono y un electrodo de referencia de plata (**Fig. 21**). Este tipo de SPCEs funciona como una celda electroquímica, la cual necesita un volumen mínimo de 50 μL .

Las morfologías de superficie de electrodos modificados y sin modificar se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (DSM 950, Zeiss, Alemania).

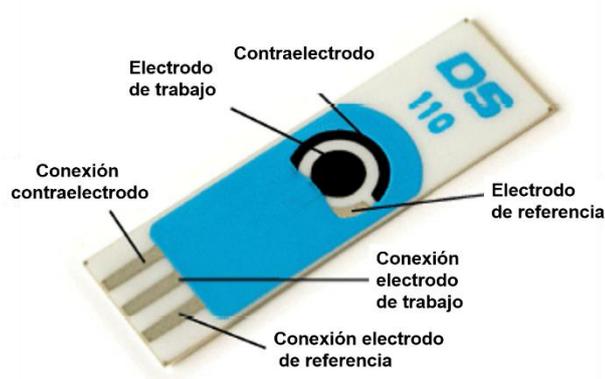


Figura 21: Electrodo serigrafiado utilizado en este trabajo

Fabricación de los sensores electroquímicos

Los electrodos serigrafados de óxido de grafeno reducido electroquímicamente (ERGO-SPCE) se fabricaron sobre un SPCE descartable. En primer lugar, GO se dispersó en agua y luego en tampón fosfato para obtener una concentración final de $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$. Las dispersiones se sonicaron usando un baño ultrasónico (Selecta Ultrasons, Cod. 3000683). Se colocaron $50 \mu\text{L}$ de esta solución en la superficie del electrodo de trabajo y luego se aplicó la técnica de voltamperometría cíclica (de $0,1$ a $-1,5 \text{ V}$ con una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} durante 20 ciclos) para obtener los ERGO-SPCEs¹⁵⁰.

Mediciones electroquímicas

La cantidad de especies que contienen oxígeno en diferentes electrodos de superficie (SPCE, ERGO-SPCE 10 ciclos y 20 ciclos) se estimó mediante el monitoreo de la reducción de especies de oxígeno usando voltamperometría cíclica (condiciones: un ciclo a 100 mV s^{-1} de 0 V a $-1,5 \text{ V}$) utilizando tampón fosfato 50 mM pH $6,0$, previamente desoxigenado mediante burbujeo con N_2 durante 20 min ¹⁵¹.

La caracterización electroquímica de tetraciclinas (concentración 1 mM) se realizó mediante voltamperometría cíclica en tampón fosfato 50 mM pH $6,0$, velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

La determinación de las tetraciclinas (TET) se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C), empleando voltamperometría de pulso diferencial de transferencia por adsorción (AdTDPV) (parámetros optimizados: amplitud de pulso de 125 mV , tiempo de pulso de $0,05 \text{ s}$, intervalo de tiempo de $0,3 \text{ s}$, potencial de paso 8 mV). Todas las mediciones se realizaron utilizando tampón fosfato 50 mM pH $6,0$. El proceso comenzó depositando $10 \mu\text{L}$ de solución de trabajo o muestra en el electrodo de trabajo manteniéndolo a un potencial de circuito abierto durante 5 minutos para permitir que los analitos se adsorban en la superficie del mismo. Después de eso, el electrodo se enjuagó con agua durante 1 minuto, seguido de la adición de $50 \mu\text{L}$ del electrolito soporte en el electrodo para llevar a cabo la medición de DPV.

Mediciones de la superficie activa del electrodo usando la ecuación de Randles-Sevcik

A la ecuación de Randles-Sevcik (a 25°C) le sigue un proceso reversible en voltamperometría cíclica:

¹⁵⁰Jampasa, Sakda, et al. "Electrochemically reduced graphene oxide-modified screen-printed carbon electrodes for a simple and highly sensitive electrochemical detection of synthetic colorants in beverages." *Talanta* 160 (2016): 113-124.

¹⁵¹Souza, Lismery P., et al. "Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode." *Journal of agricultural and food chemistry* 59.14 (2011): 7620-7625.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C D_o^{1/2} v^{1/2}$$

siendo I_p la corriente de pico anódica, n el número de transferencia de electrones, A el área de la superficie del electrodo, C la concentración, D_o el coeficiente de difusión de la sonda redox, y v la velocidad de barrido. Es posible medir el área de superficie del electrodo calculando la pendiente de la gráfica I_p vs $v^{1/2}$ con el uso de una sonda redox reversible. De esta manera, se registraron voltamperogramas cíclicos de 1 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ en solución de KNO_3 0,5 M a diferentes velocidades de barrido (de 0,01 a 0,1 V s^{-1}) de -0,8 a +0,6 V usando SPCE y ERGO-SPCEs ($n=3$) (número de electrones transferidos = 1 y $D_o = 7,74 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Preparación de la muestra

La aplicabilidad del electrodo propuesto se evaluó en agua de río y leche descremada. El agua de río fue analizada sin tratamiento previo. El tratamiento de la muestra de leche consistió en una modificación de procedimiento reportado en un trabajo previo de Y. Luo et al.¹⁵²: se colocaron 0,4 mL de leche descremada en un microtubo Eppendorf de 1,5 mL y se diluyó a 1,0 mL con agua. Luego, se agregaron 0,2 mL de ácido tricloroacético al 10% (m/v) y se mezclaron con vórtex durante 1 minuto para favorecer la precipitación de proteínas. A continuación, la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min (MiniSpin®, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después, se transfirieron 0,5 mL del sobrenadante a una unidad de filtro centrífugo Amicon® (Ultra-0,5 mL, Ultracel-10K, ref UFC501024) y se centrifugaron a 12.800 rpm durante 20 minutos para eliminar completamente las proteínas no precipitadas. La solución final se usó para la detección (ver Sección “Mediciones Electroquímicas”).

¹⁵²Luo, Yeli, et al. "A novel colorimetric aptasensor using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk." *Food Control* 54 (2015): 7-15.

5.5. Resultados y discusión

Para fines de *screening*, no es importante identificar qué tipo de tetraciclina se encuentra presente en la muestra, sino detectar la presencia de cualquier miembro de la familia de este tipo de antibióticos al nivel de los LMRs. Por lo tanto, el desarrollo de un método para la determinación de tetraciclinas totales es un enfoque pertinente.

Por otro lado, los biosensores son más selectivos y sensibles que los sensores pero, por el contrario, los últimos son más baratos y más estables que los primeros. En este sentido, AdTDPV permite a los analistas mejorar la selectividad de los sensores electroquímicos al explotar las propiedades de adsorción de la superficie de detección.

Para demostrar la utilidad de esta técnica, es necesario realizar:

- (i) una caracterización de la superficie del sensor,
- (ii) una comparación entre la respuesta del analito registrada cuando se utiliza la técnica de adsorción (AdTDPV) y aquella obtenida cuando se emplea la técnica convencional no adsorbente (DPV) y
- (iii) un estudio del desempeño analítico del sensor (con especial atención en posibles interferencias).

Caracterización ERGO-SPCE

Se prepararon dos tipos de ERGO-SPCEs variando el número de ciclos aplicados durante la reducción del óxido de grafeno (10 y 20 ciclos denominados ERGO-10 y ERGO-20, respectivamente). Dado que para la determinación de tetraciclinas totales se seleccionó AdTDPV, la influencia del número de ciclos se estudió de acuerdo con (i) la superficie activa del electrodo y (ii) la cantidad de especies de oxígeno en la superficie del mismo, lo que puede generar diferentes respuestas electroquímicas y de adsorción hacia las tetraciclinas.

Debido a que en las medidas de AdTDPV solo los analitos adsorbidos en la superficie del electrodo van a producir una señal, cuanto mayor sea la superficie del electrodo, mayor será la señal. Por esta razón, las superficies activas de ERGO-SPCEs y SPCE (control) se midieron mediante voltamperometría cíclica utilizando la ecuación de Randles-Sevcik. Las áreas de superficie resultantes de SPCE, ERGO-10 y ERGO-20 fueron de $0,215 \text{ cm}^2$, $0,333 \text{ cm}^2$ y $0,753 \text{ cm}^2$ respectivamente.

A continuación, la cantidad de especies que contienen oxígeno en la superficie del electrodo se estimó mediante voltamperometría cíclica (**Fig. 22**). Ambos ERGO-SPCEs produjeron un pico de reducción de alrededor de -0,8 V con un área similar, por lo que se infiere que el número de ciclos utilizados para la preparación de ERGO no afecta a la cantidad de especies de oxígeno en la superficie del electrodo. Sin embargo, el SPCE produjo un pico de reducción (-1,0 V) más pequeño que los obtenidos en ERGO-SPCEs. Por lo tanto, las ERGO-SPCE presentan una mayor cantidad de especies de oxígeno en la superficie que la SPCE. Por otro lado, el potencial de reducción diferente entre SPCE (-1,0 V) y ERGO-SPCEs (-0,8 V) puede estar relacionado con la presencia de diferentes tipos de especies que contienen oxígeno.

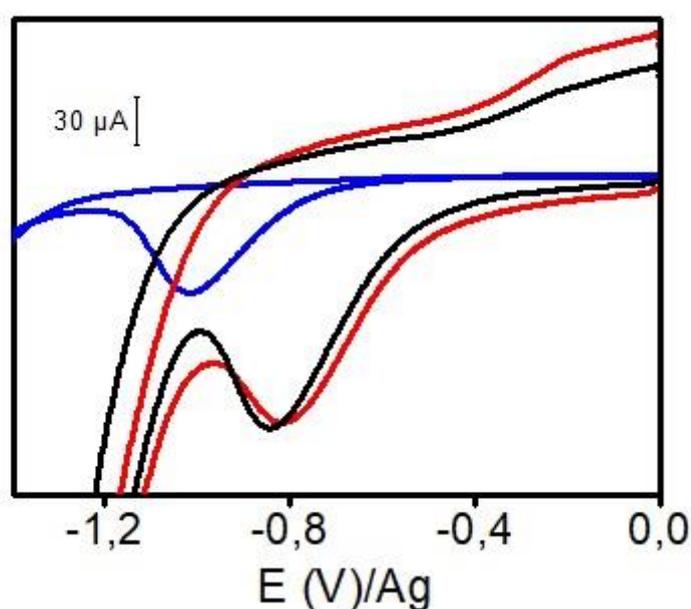


Figura 22: Voltamperogramas cíclicos de tampón fosfato 50 mM pH 6,0 usando diferentes electrodos: SPE, ERGO-10 y ERGO-20

SPE (línea azul), ERGO-10 (línea roja) y ERGO-20 (línea negra). Condiciones: velocidad de escaneo 100 mV s⁻¹

La morfología superficial tanto de ERGO-SPCEs como de SPCE también se estudió mediante SEM (**Fig. 23**). Como puede verse claramente en la **Fig. 23 b y c**, se formó una película ERGO sobre el sustrato SPCE. La superficie arrugada típica de ERGO se obtuvo debido al proceso de reducción electroquímica de óxido de grafeno y la consiguiente desoxigenación¹⁵³.

¹⁵³Moraes, Fernando C., et al. "Coupled electronic and morphologic changes in graphene oxide upon electrochemical reduction." *Carbon* 91 (2015): 11-19.

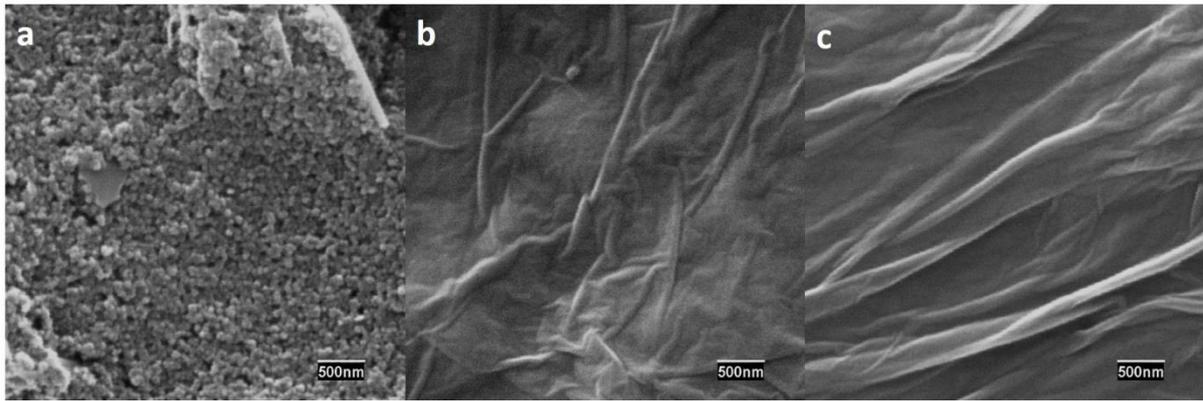


Figura 23: Imágenes SEM de (a) SPE, (b) ERGO-10, (c) ERGO-20

Comportamiento electroquímico de tetraciclinas en ERGO-SPCE

Se realizó voltamperometría cíclica (CV) para evaluar la respuesta de los electrodos modificados frente a cada tetraciclina (TET, OTC, CTC y DOX). Los voltamperogramas cíclicos produjeron dos ondas anódicas con un potencial casi idéntico para todas las tetraciclinas (**Fig. 24**). Esto significa que el grupo electroactivo de tetraciclinas es el mismo (fenol), por lo que la estimación total de ellas es posible mediante un enfoque electroquímico. Además, las ERGO-SPCEs mostraron mayores corrientes farádicas y no farádicas debido a la mayor superficie activa.

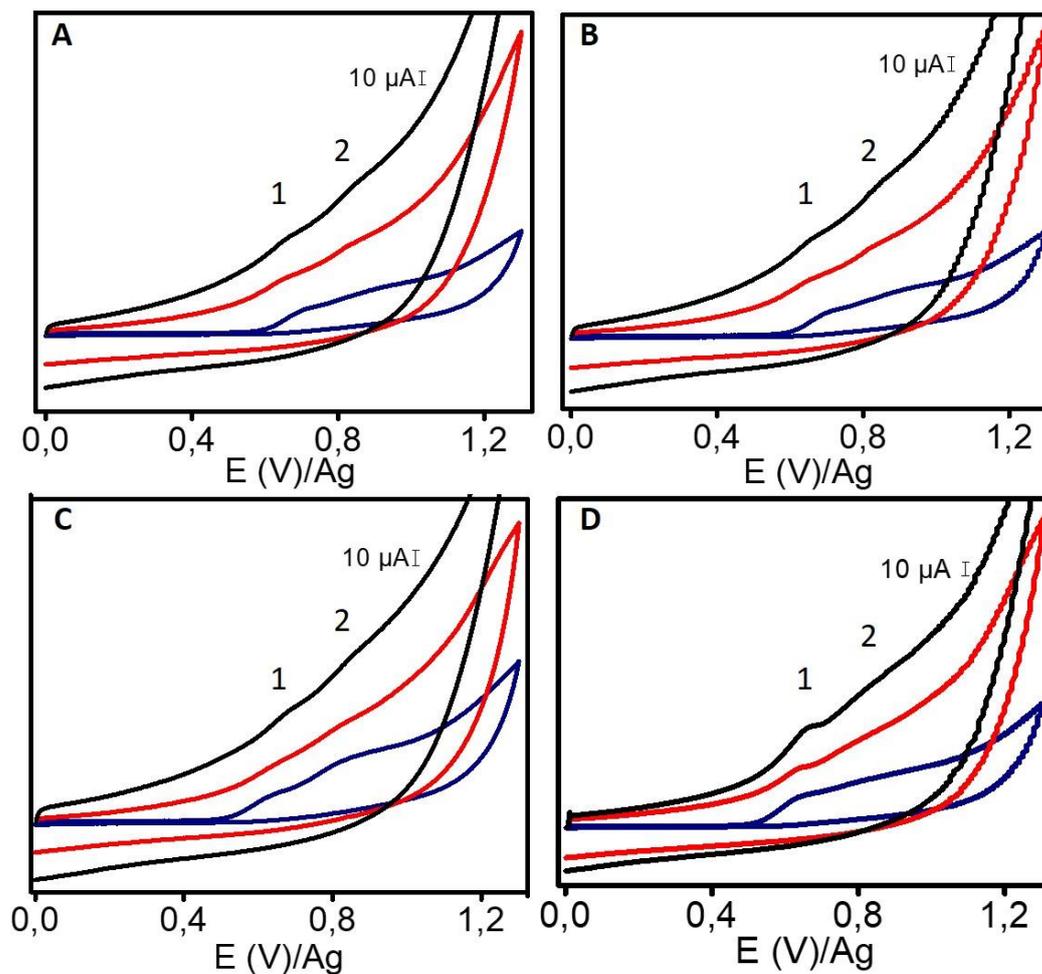


Figura 24: CV de TET 1 mM en SPE, ERGO-10 y ERGO-20.

CV de TET 1 mM en SPE (azul oscuro), ERGO-10 (rojo), ERGO-20 (negro). (A) TET, (B) OTC, (C) CTC y (D) DOX.

Condiciones: 1,0 mM de tetraciclinas en tampón fosfato 50 mM pH 6,0, velocidad de escaneo 100 mV s^{-1} 1 y 2 corresponden a los 2 picos de oxidación de las TETs.

Tabla 8: Análisis TET mediante DPV y AdTDPV en sensores SPCE y ERGO-SPCE

Electrodo	Potencial de pico (V)	DPV Altura del pico ($\times 10^8 \text{ A}$)	AdTDPV Altura del pico ($\times 10^8 \text{ A}$)
SPCE	0,58	175	4,0
ERGO-10	0,54	23,9	131
ERGO-20	0,55	28,7	218

TET 60 μM en tampón fosfato (50 mM, pH 6,0)

Como la respuesta electroquímica de las tetraciclinas es muy similar, se eligió tetraciclina (TET) como modelo. TET se analizó mediante AdTDPV utilizando SPCE y ERGO-SPCE (10 y 20 ciclos). Para demostrar conceptualmente el uso de AdTDPV, también se exploró la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) con fines comparativos. La **Tabla 8** resume los datos más importantes del análisis del pico 1 de TET a $E = +0,6$ V (el pico más selectivo).

La intensidad de pico obtenida por DPV es mucho mayor con SPCE que con ERGO. Sin embargo, esta situación se invirtió cuando se utiliza AdTDPV. Los electrodos ERGO producen señales más altas que SPCE debido a la mayor capacidad de adsorción del ERGO y la baja afinidad de TET en la superficie de SPCE de carbono. Estos resultados revelan el fuerte apilamiento π - π entre los anillos conjugados de TET y grafeno. Finalmente, ERGO-20 mostró la mayor intensidad de pico por AdTDPV, por lo que se eligió para los siguientes experimentos. Esta selección se confirmará en las secciones posteriores de acuerdo con los estudios de selectividad.

Rendimiento analítico del sensor AdTDPV-ERGO-SPCE para la determinación de tetraciclinas totales. Aplicación a muestras ambientales y alimentarias.

Se optimizó la amplitud del pulso, el tiempo de adsorción y el pH para obtener la sensibilidad más alta en el pico 1 (más selectivo). En primer lugar, se evaluó la influencia de la amplitud del pulso en la señal del pico de AdTDPV. Al aplicar amplitudes de voltaje de 25 mV a 150 mV, la mayor intensidad se obtuvo a 125 mV, por lo que se seleccionó como valor óptimo (**Fig. 25**).

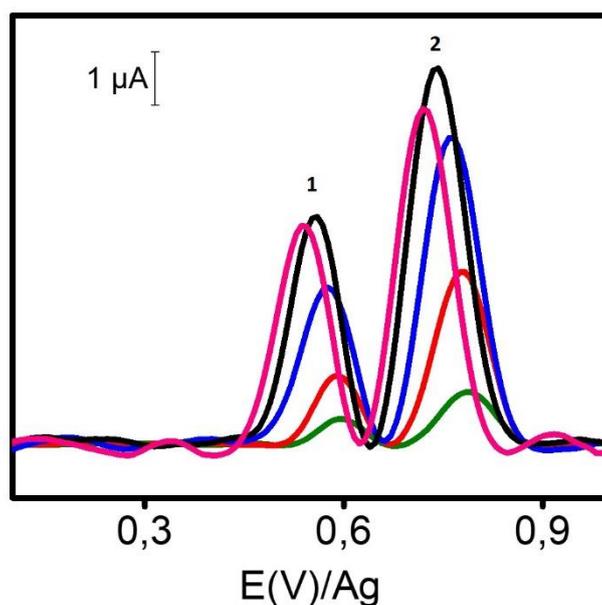


Figura 25: AdTDPV de TET 0,5 mM en 20 ciclos ERGO-SPE aplicando diferentes amplitudes de pulso.

AdTDPV de TET 0,5 mM en 20 ciclos ERGO-SPE usando amplitudes de pulso de 25 mV (verde), 50 mV (rojo), 100 mV (azul), 125 mV (negro) y 150 mV (rosa). Condiciones: tampón fosfato pH 6, 50 mM, tiempo de pulso 0,05 s, tiempo de intervalo 0,3 s, potencial de paso 8 mV, tiempo de adsorción 5 min

La influencia del tiempo de adsorción de las tetraciclinas en la superficie de ERGO-SPCE también se evaluó utilizando TET 0,5 mM durante 1, 2 y 5 min. Las intensidades máximas obtenidas fueron de 1,34 μA , 1,69 μA y 2,97 μA , respectivamente. Por lo tanto, se seleccionaron 5 min como tiempo de adsorción óptimo. Los tiempos más largos no se estudiaron porque no son útiles para enfoques de *screening*.

Finalmente, se realizó un estudio del pH de 3,5 y 9,0, utilizando TET 0,5 mM en tampón fosfato 50 mM (**Fig.26**). La señal máxima se produjo a pH 6, muy cerca del punto isoeléctrico de TET (pI 5,4)¹⁵⁴. Esto significa que las interacciones hidrófobas son dominantes en el proceso de adsorción de TET en la superficie ERGO.

¹⁵⁴Horká, Marie, et al. "CIEF separation, UV detection, and quantification of ampholytic antibiotics and bacteria from different matrices." *Analytical and bioanalytical chemistry* 406.25 (2014): 6285-6296.

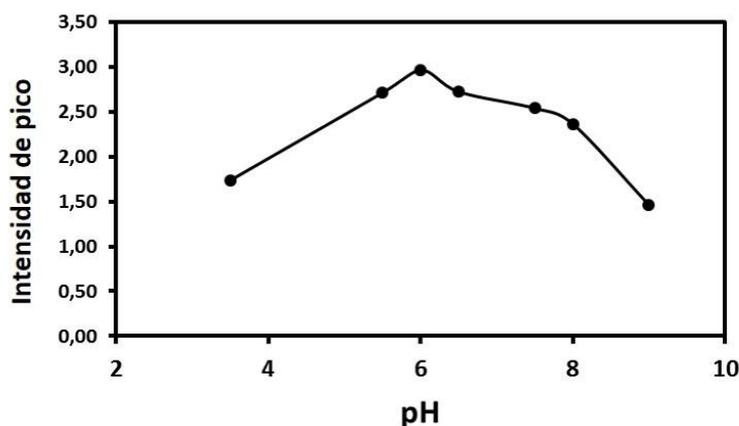


Figura 26: Intensidad del pico 1 de TET 0,5 mM por AdTDPV a diferentes pH

Condiciones: tampón fosfato 50 mM, amplitud de pulso 125 mV, tiempo de pulso 0,05 s, tiempo de intervalo 0,3 s, potencial de paso 8 mV, tiempo de adsorción 5 min.

Se construyó una curva de calibrado lineal para cada tetraciclina (curvas independientes), obteniendo intervalos lineales de 20 μM a 80 μM ($n = 4$). Estos intervalos lineales cortos son típicos de los compuestos orgánicos analizados mediante técnicas de voltamperometría por adsorción¹⁵⁵. Para desarrollar un método para la determinación de tetraciclinas totales, es obligatorio demostrar que la sensibilidad del método (pendientes de la curva de calibrado) es similar para cada una de las tetraciclinas estudiadas. Por lo tanto, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para comparar las pendientes de las diferentes líneas de regresión. Las pendientes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), por lo que la curva de calibrado de cualquiera de las tetraciclinas se puede usar para estimar las tetraciclinas totales.

Se seleccionó TET como estándar para la determinación de tetraciclinas totales y se construyó una curva de calibrado ($Y = (2,11 \pm 0,25) \times 10^{-8} X - (2,09 \pm 1,39) \times 10^{-7}$, donde X se expresó como μM , $R^2 = 0,98$). El límite de detección (LOD) fue de 12 μM calculado utilizando la desviación estándar de la ordenada al origen (criterio 3 S/N). Este LOD fue superior a los obtenidos en trabajos previamente publicados por otros autores utilizando ERGO (Tabla 9); sin embargo, en estos trabajos, el electrodo también se modificó con otros compuestos (polimelamina y L-cisteína, respectivamente), lo que hace más complejo el proceso de fabricación. Además, a diferencia del presente trabajo en el que se usaron SPCEs, los electrodos de carbono vítreo (GCE) que se utilizaron como transductores no son desechables, por lo que los electrodos deben limpiarse y modificarse entre análisis. Además, en el método propuesto se utilizan solo 10 μL de muestra.

¹⁵⁵ Sierra, Tania, et al. "Total α 1-acid glycoprotein determination in serum samples using disposable screen-printed electrodes and osmium (VI) as electrochemical tag." *Talanta* 180 (2018): 206-210.

Tabla 9: Comparación de ERGO-SPCE con otros sensores basados en ERGO para la determinación de tetraciclinas

Sensor basado en ERGO	Técnica electroquímica	¿Descartable?	LOD (μM)	LOQ (μM)	Referencia
Polymelamine-ERGO-GCE	DPV	No	2,2	5	¹⁵⁶
L-cysteine-ERGO-GCE	DPV	No	0,12	8	¹⁵⁷
MWCNT-GO-CPE	AdSDPV	No	0,36	20	¹⁵⁸
ERGO-SPE	AdTDPV	Si	12	20	Este trabajo

Debido a que el sensor desarrollado fue inicialmente pensado para la determinación de TET en muestras de alimentos, ambientales y clínicas, se estudiaron ácido ascórbico, fenol y ácido úrico como posibles interferentes. También se utilizó DPV como control. No se observaron cambios significativos en la recuperación de TET (<5%, 80 μM TET) en presencia de ácido ascórbico y fenol, utilizando una relación TET/interferencia de 1:10 (Tabla 10).

Tabla 10: Estudio de recuperación en presencia de interferentes

Interferente	Concentración (μM)	TET agregada (μM)	Encontrado* (μM)	Recuperación (%)
Fenol	800	80	82,9 \pm 7,5	104
Ácido ascórbico	800	80	77,7 \pm 4,0	97
	80	80	81,8 \pm 5,2	102
	160	80	81,6 \pm 12,9	102
	240	80	56,6 \pm 7,3	71
	500	80	34,3 \pm 10,2	43

*n=3

Como se muestra en la Fig. 27A, el ácido ascórbico produce un pequeño pico en AdTDPV y DPV, pero este pico ocurre a +0,2 V y no interfiere con el pico de la TET (selectividad electroquímica).

¹⁵⁶Kesavan, Srinivasan, et al. "Determination of tetracycline in the presence of major interference in human urine samples using polymelamine/electrochemically reduced graphene oxide modified electrode." *Sensors and Actuators B: Chemical* 241 (2017): 455-465.

¹⁵⁷Sun, Xue-Mei, et al. "The electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on graphene/L-cysteine composite film." *Journal of The Electrochemical Society* 164.4 (2017): B107-B112.

¹⁵⁸Wong, Ademar, et al. "Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 757 (2015): 250-257.

Curiosamente, en el caso del fenol es diferente porque produce un pico en DPV pero no en AdTDPV (**Fig. 27B**). Esto significa que el fenol no se adsorbe en ERGO-SPCE, por lo que este material actúa como un adsorbente selectivo de la TET respecto del fenol (selectividad de adsorción). En nuestra opinión, el mayor número de electrones π deslocalizados en la estructura de la TET respecto al fenol proporciona una interacción π - π más fuerte con la superficie del grafeno.

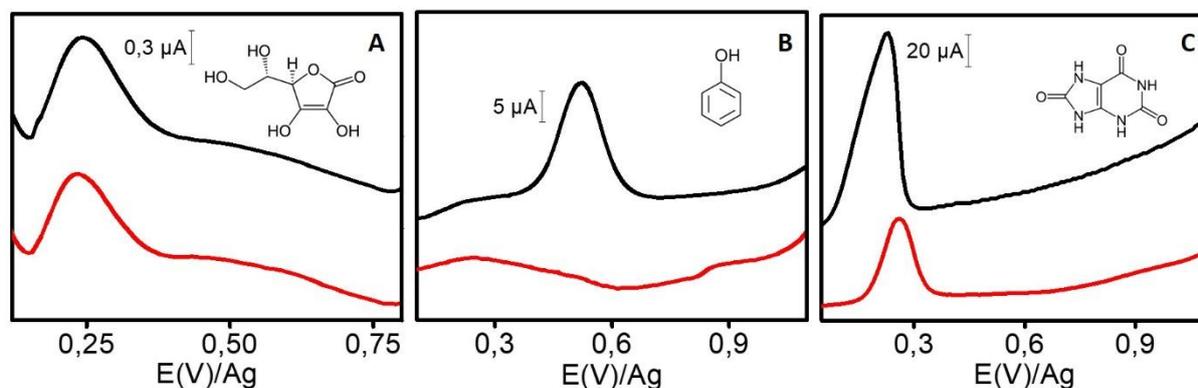


Figura 27: Voltammogramas para ácido ascórbico 800 μ M (A), fenol 800 μ M (B) y ácido úrico 500 μ M (C)

Línea roja: análisis AdTDPV, línea negra: análisis DPV. Condiciones: tampón fosfato 50 mM pH 6, amplitud de pulso 125 mV, tiempo de pulso 0,05 s, tiempo de intervalo 0,3 s, potencial de paso 8 mV y, solo para AdTDPV, tiempo de adsorción 5 min. Recuadro: estructura química de cada compuesto

Sin embargo, el ácido úrico (a 500 μ M como concentración común en muestras de orina)¹⁵⁹, produce un pico intenso en ambas técnicas (AdTDPV y DPV) (**Fig. 27C**). La fuerte capacidad de absorción del ácido úrico en la superficie del ERGO-SPCE demostró tener un claro impacto en el AdTDPV de las TET (recuperación del 43%). Al igual que la TET, el ácido úrico presenta una resonancia π -electrón en su doble anillo, por lo que provoca el fuerte apilamiento π - π entre los anillos conjugados π y el grafeno. En consecuencia, se realizó un estudio adicional para establecer la concentración máxima de ácido úrico que no interfiere en la medición. Como se muestra en la **Tabla 10**, las concentraciones de ácido úrico por encima de 160 μ M pueden interferir en la determinación de TET.

¹⁵⁹Abellán-Llobregat, Alejandra, et al. "Au-IDA microelectrodes modified with Au-doped graphene oxide for the simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid in urine samples." *Electrochimica Acta* 227 (2017): 275-284.

Tabla 11: Valores de recuperación en el estudio de muestras.

Muestra	TET agregada (μM)	Encontrado* (μM)	Recuperación (%)
Leche descremada	30	28	95 \pm 5
	70	71	102 \pm 21
Agua de río	30	33	110 \pm 10
	70	66	94 \pm 9

*n = 3

La precisión entre electrodos también se evaluó midiendo una solución TET 80 μM utilizando 5 ERGO-SPCE diferentes, obteniendo un DER del 18%. La razón principal de esta variabilidad es la diferencia en la superficie activa entre los distintos ERGO-SPCEs utilizados.

Luego, se realizó el análisis de muestras de leche y agua de río. Se realizó un pretratamiento en muestras de leche para eliminar proteínas (ver sección Preparación de la muestra). La **Fig. 28** muestra los voltamperogramas de AdTDPV para leche descremada con y sin enriquecer con TET. Claramente, se observa un pico intenso alrededor de +0,20 V en todos los voltamperogramas. Al observar el potencial máximo y relacionarlo con la bibliografía consultada, este pico correspondería al ácido úrico, que normalmente está presente en el suero de la leche en concentraciones más bajas que en la orina¹⁶⁰.

Los valores de recuperación fueron aceptables en ambas muestras analizadas y en ambos niveles de concentración como se muestra en la **Tabla 11**. Estos resultados demostraron que este método es adecuado para la evaluación de tetraciclinas totales en muestras de leche y agua.

¹⁶⁰Zuo, Ruiting, et al. "Determination of creatinine, uric and ascorbic acid in bovine milk and orange juice by hydrophilic interaction HPLC." *Food chemistry* 182 (2015): 242-245.

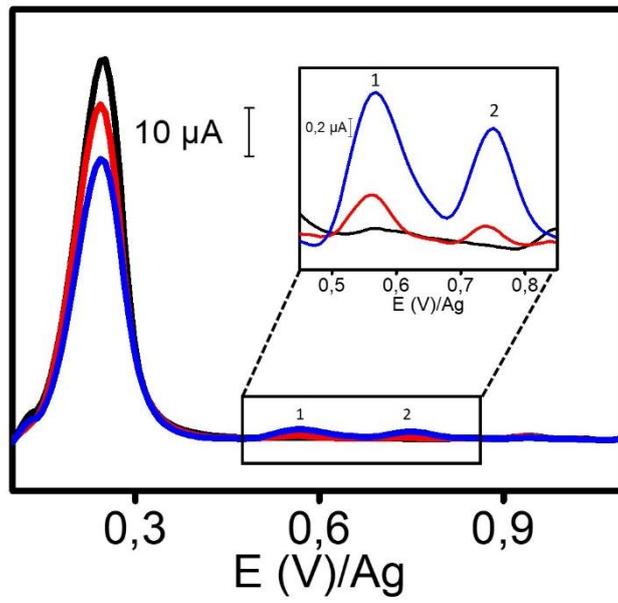


Figura 28: AdTDPV de leche descremada, enriquecida con TET 30 μM y TET 70 μM

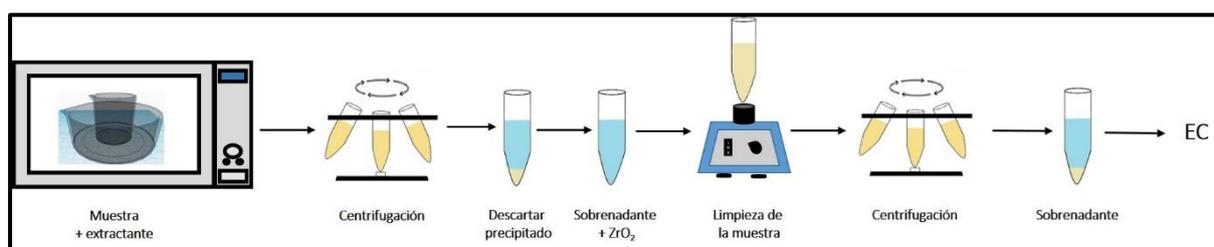
5.6. Conclusiones

Se desarrolló un sensor electroquímico basado en AdTDPV-ERGO para la determinación de tetraciclina total en muestras de leche y agua en solo 6 minutos con excelentes recuperaciones que van del 95-102% utilizando plataformas desechables serigrafiadas.

Este enfoque puede aplicarse no solo al análisis agroalimentario sino también al análisis ambiental, en el que el análisis "in situ" también es requerido. Por el contrario, la única limitación encontrada fue la utilidad del sensor para el análisis de muestras de orina con alto contenido de AU (superior a 160 μM).

AdTDPV-ERGO-SPCEs combina las propiedades de AdTDPV, la tecnología SPCE (desechabilidad, análisis "in situ" y bajo costo) y el grafeno (alta capacidad de adsorción y excelente transducción electroquímica), lo que los convierte en un enfoque prometedor para la detección electroquímica de otras moléculas de interés conteniendo grupos fenólicos en su estructura.

Capítulo 6: Determinación por electroforesis capilar de residuos de tetraciclinas en pechuga de pollo empleando energía de microondas



6.1. Objetivo

Desarrollar un nuevo método analítico para determinar tetraciclina, doxiciclina y oxitetraciclina en pechuga de pollo asistido por microondas, utilizando metodologías de extracción amigables con el ambiente, y su posterior análisis mediante electroforesis capilar.

6.2. Resumen

Con el objetivo de determinar la presencia de residuos de tetraciclinas (tetraciclina (TET), oxitetraciclina (OTC) y doxiciclina (DOX)) en muestras de carne de pollo (pechuga) destinada al consumo humano, se desarrolló un nuevo método analítico de extracción, con posterior separación mediante electroforesis capilar y detección UV-Vis.

Para ello, las muestras fueron tratadas con una mezcla de una solución acuosa ácida (HCl 0,05 M) y una pequeña cantidad de sal (Na_2SO_4) como extractante y luego se introdujeron en un microondas doméstico para realizar la extracción. Este nuevo método aprovecha estratégicamente las propiedades fisicoquímicas de las tetraciclinas, ya que en medio ácido tienen la capacidad de cargarse positivamente y, de esta manera, facilitar su transferencia hacia medios acuosos¹⁶¹. Por otro lado, la adición de Na_2SO_4 tiene como finalidad favorecer la deshidratación de la muestra, es decir, favorecer la separación de fases¹⁶². Todas las variables involucradas en el paso de extracción (concentración de HCl y su volumen, cantidad de Na_2SO_4 , potencia del microondas y tiempo de extracción) fueron optimizadas utilizando un diseño de experimentos Plackett-Burman.

En un paso posterior, se evaluó un nuevo tipo de limpieza de la muestra: adición de óxido de circonio. De esta manera, utilizando una pequeña cantidad del mismo se logró una limpieza de la muestra satisfactoria.

Una vez realizados los pasos de extracción y limpieza, la muestra tratada se introdujo directamente en el equipo de electroforesis capilar para su determinación, trabajando bajo las siguientes condiciones: solución 50 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ pH 12,0 como electrolito soporte, inyección hidrodinámica, 20 kV como voltaje de separación.

Trabajando bajo estas condiciones se obtuvieron buenos resultados: recuperaciones entre 80 y 95%, trabajando sobre rectas de calibrado realizadas con soluciones testigos en el solvente de extracción.

¹⁶¹Lorenzetti, Anabela S., Claudia E. Domini, and Adriana G. Lista. "A simple and new reverse liquid-liquid microextraction for the automated spectrometric determination of doxycycline in chicken fat." *Food chemistry* 237 (2017): 506-510.

¹⁶²Vahidi, E., F. Rashchi, and D. Moradkhani. "Recovery of zinc from an industrial zinc leach residue by solvent extraction using D2EHPA." *Minerals Engineering* 22.2 (2009): 204-206.

6.3. Introducción

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, las tetraciclinas son un grupo muy importante de antibióticos de amplio espectro que afectan a microorganismos de rápida multiplicación. Dentro de las bacterias sensibles a este tipo de antibióticos podemos incluir *Mycoplasma sp*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Haemophilus sp*; mientras que las moderadamente sensibles son *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp.*, *Salmonella sp*. También son activas contra algunos protozoarios y rickettsias¹⁶³.

Desde hace algunos años, muchos países han prohibido o regulado la utilización de antibióticos como aditivos alimentarios y promotores del crecimiento¹⁶⁴. Cada vez que un animal es tratado con un fármaco, permanecerán, al menos durante algún tiempo, pequeñas concentraciones de residuos de estos antibióticos en su cuerpo. Debido a esto, es de suma importancia el desarrollo de métodos analíticos para su determinación y control en productos destinados al consumo humano.

La preparación de muestras es una etapa clave antes de la determinación de los analitos en muestras, tales como productos alimenticios de origen animal, piensos, muestras ambientales, productos farmacéuticos y fluidos biológicos¹⁶⁵. Hoy en día, a pesar de los grandes avances realizados en las técnicas analíticas y el desarrollo de instrumentos cada vez más sensibles, los métodos de preparación de muestras siguen desempeñando un papel fundamental debido a que la mayoría de estos instrumentos no permiten introducir la muestra directamente. Por ello, son necesarios algunos pasos de pretratamiento para extraer y aislar los analitos¹⁶⁶, y así poder realizar los análisis.

La investigación de nuevos métodos de preparación de muestras no se limita solamente al desarrollo de métodos más eficientes, rápidos y con mejores límites de detección. En la actualidad, debido al enorme deterioro del ambiente, se ha generado la necesidad de buscar alternativas que conduzcan a la sustentabilidad ambiental. Para ello, los químicos analíticos utilizan diferentes herramientas relacionadas con la "química verde", concepto que contempla el diseño de productos y procesos que reduzcan la generación de sustancias peligrosas y maximicen la eficiencia en la utilización de recursos materiales y energéticos¹⁶⁷. Es por esta razón, que se tiende al menor consumo de solvente y energía y disminuir la generación de residuos.

¹⁶³Mestorino, N. (2016). Antimicrobianos en avicultura. https://www.researchgate.net/publication/305592763_ANTIMICROBIANOS_EN_AVICULTURA [accessed Aug 26 2019].

¹⁶⁴<http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/amr-es/>

¹⁶⁵Udalova, A. Yu, S. G. Dmitrienko, and V. V. Apyari. "Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics." *Journal of Analytical Chemistry* 70.6 (2015): 661-676.

¹⁶⁶Llompert, Maria, Maria Celeiro, and Thierry Dagnac. "Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 116 (2019): 136-150.

¹⁶⁷Castro, Nerlis Paola Pájaro, and Jesús Tadeo Olivero Verbel. "Química verde: un nuevo reto." *Ciencia e ingeniería Neogranadina* 21.2 (2011): 169-182.

En este contexto, durante los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas de extracción con el objetivo de disminuir el consumo de solventes y la generación de residuos tóxicos. Este capítulo está centrado particularmente en la extracción asistida por microondas (MAE) y el método "QuEChERS".

La MAE es un proceso que consiste en la transferencia de los analitos en estudio desde una matriz sólida a un solvente, el cual permite una extracción rápida y con recuperaciones comparables o superiores a los obtenidos por técnicas clásicas de calentamiento. Desde el punto de vista de la química ecológica, las principales ventajas de esta extracción consiste en disminuir significativamente las cantidades de solvente y de muestra, así como el tiempo de extracción, reduciendo así la generación de residuos, el consumo de energía y la liberación de solvente al ambiente^{168,169}. Además, un mejor control de las condiciones experimentales y tiempos de análisis más cortos evitan problemas de degradación de las muestras. Es interesante notar que el agua puede usarse como solvente en esta técnica, siendo económica, segura, ecológica y, en determinadas condiciones, tan eficiente como los solventes orgánicos¹⁷⁰.

Este tipo de extracción ha sido aplicada con éxito a diferentes contaminantes, tales como antibióticos, para ser extraídos de diferentes matrices (suelo, lodos y partículas atmosféricas)¹⁷¹, o antibióticos multiclase de los sedimentos acuíferos¹⁷².

Por su parte, el método "QuEChERS" es un procedimiento moderno de preparación de muestras propuesto por Anastassiades en 2003 para la separación de residuos de pesticidas de productos alimenticios¹⁷³. Este método incluye un paso inicial de extracción con un solvente miscible en agua (por ejemplo acetonitrilo (ACN)) en presencia de altas cantidades de sales ($MgSO_4$, NaCl) y/o soluciones reguladoras de pH. Luego, se agita y centrifuga para producir la separación de la fase líquida y una alícuota de la fase orgánica se somete a una limpieza adicional usando SPE. De esta manera, la limpieza se facilita al mezclar grandes cantidades de adsorbentes para SPE (por ejemplo, Supelclean PSA, ENVI-Carb y / o Discovery DSC-18) con el extracto. Después de la limpieza de la muestra, la mezcla se centrifuga nuevamente y el sobrenadante resultante puede analizarse directamente o puede someterse a un tratamiento adicional antes del análisis. En este método, se logra disminuir considerablemente el uso de reactivos, recursos energéticos y tiempos de análisis debido a la

¹⁶⁸ Letellier, M., and H. Budzinski. "Microwave assisted extraction of organic compounds." *Analysis* 27.3 (1999): 259-270.

¹⁶⁹ Tobiszewski, Marek, et al. "Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28.8 (2009): 943-951.

¹⁷⁰ Banik, Bimal K., and Debasish Bandyopadhyay, eds. *Advances in Microwave Chemistry*. CRC Press, 2018.

¹⁷¹ Jiao, Zhe, et al. "Microwave-assisted micro-solid-phase extraction for analysis of tetracycline antibiotics in environmental samples." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95.1 (2015): 82-91.

¹⁷² Tong, Lei, et al. "Quantitative analysis of antibiotics in aquifer sediments by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1452 (2016): 58-66.

¹⁷³ Anastassiades, Michelangelo, et al. "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce." *Journal of AOAC international* 86.2 (2003): 412-431.

simplificación y / o combinación de los procedimientos de preparación de muestras y una disminución en el tamaño de la muestra. Por lo comentado anteriormente, recibe el nombre “QuEChERS” que significa que el método es Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro¹⁷⁴ (de las siglas en inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe).

En este trabajo, se desarrolló un nuevo método analítico para la extracción de tetraciclinas en pechuga de pollo, como aporte a los análisis de control de calidad de alimentos. Esta nueva propuesta integra los beneficios de la energía de microondas, los principios de la química verde y, además, toma ciertos aspectos del método QuEChERS. En primer lugar, la muestra es tratada con un medio ácido y salino para favorecer la extracción de las tetraciclinas del tejido. Luego, con el objetivo de hacer más eficiente y rápido este proceso, el tejido y el medio extractante son expuestos a la acción de la energía de microondas. De esta manera, las tetraciclinas se separan del tejido animal y pasan a la fase líquida del medio extractante. Luego de un paso de centrifugación, se pone en contacto el sobrenadante con óxido de circonio para realizar un paso de limpieza. Por último, el extracto es finalmente introducido en el equipo de electroforesis capilar para su análisis.

¹⁷⁴Udalova, A. Yu, S. G. Dmitrienko, and V. V. Apyari. "Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics." *Journal of Analytical Chemistry* 70.6 (2015): 661-676.

6.4. Materiales y métodos

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los estándares TET, DOX y OTC se adquirieron en Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Se prepararon soluciones estándar individuales (1000 mg L^{-1}) en metanol (Merck, Buenos Aires, Argentina) y se conservaron a -18°C manteniendo su estabilidad durante al menos un mes. Las soluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente mediante diluciones apropiadas de soluciones madre con metanol. Tanto el HCl como el Na_2SO_4 , así como NaOH y ACN se compraron en Merck (Darmstadt, Alemania).

La solución reguladora electroforética se preparó diariamente disolviendo la cantidad apropiada de fosfato dibásico sódico e hidróxido de sodio en agua ultrapura ($18 \text{ m}\Omega$).

Instrumentación

Las extracciones se llevaron a cabo utilizando un microondas doméstico BGH Quick Chef B120M16 (700 W de potencia y 20 litros de capacidad), una centrífuga Arcano TDL80 y un vortex Velp Zx3.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar marca MDQ Beckman Coulter equipado con un detector de arreglo de diodos. Los capilares también fueron Beckman Coulter. El control y el procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando el software 32 Karat.

Muestras

Se analizaron muestras de pechuga de pollo de la zona de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina, adquiridas durante 2018 y 2019.

Preparación de la muestra y procedimiento de extracción

Con el objetivo de obtener un tamaño de muestra lo más pequeño y uniforme posible, la pechuga de pollo se trituró utilizando una procesadora tipo Minipimer y, luego, se homogeneizó con un mortero.

Se introdujo 5 g de muestra en un vaso de precipitado de 25,0 mL (**Fig. 29**), se agregaron 3,00 mL del solvente de extracción (HCl 0,05 M y 0,031g de Na_2SO_4) y se homogeneizó. Posteriormente, el recipiente que contenía la muestra se introdujo en un cristizador con un baño de agua a temperatura ambiente. Esta se irradió durante 2 minutos con un microondas doméstico a potencia mínima (120 W). Una vez transcurrido el tiempo de extracción, se traspasó el contenido del vaso de precipitado a un tubo de centrífuga de plástico de 15 mL, se centrifugó a 3500 rpm durante quince minutos, se descartó el precipitado y al sobrenadante se le agregó 0,1000 g de óxido de circonio. La mezcla se agitó en un

vortex durante 2 minutos y se centrifugó durante 5 minutos para obtener el extracto final (sobrenadante) el cual se limpió con un filtro de jeringa de nylon de $0,22\ \mu\text{m}$ (Gamafil, Buenos Aires, Argentina) y se recogió en un vial de CE para la posterior etapa de detección. En la **Fig. 30** se grafica el proceso de pretratamiento de la muestra completo.

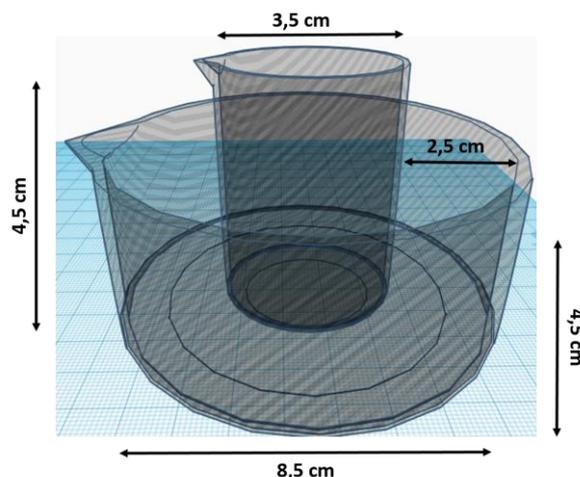


Figura 29: Detalle de las dimensiones del dispositivo de trabajo

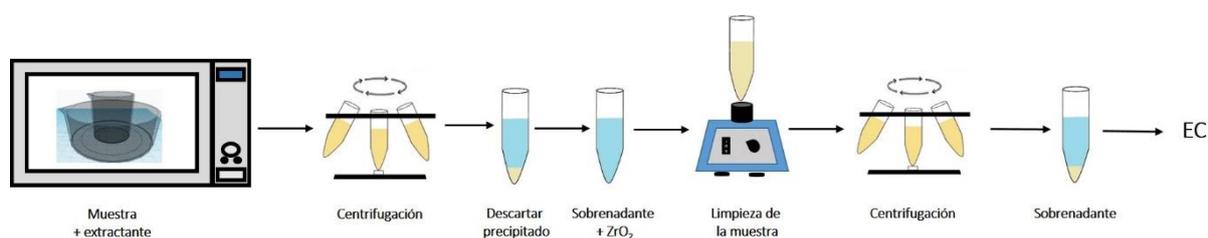


Figura 30: Proceso de pretratamiento de la muestra propuesto

Análisis por electroforesis capilar

La separación se realizó en un capilar de sílice fundida (62 cm de longitud efectiva, $50\ \mu\text{m}$ d.i.) con un voltaje de separación de 20 kV a $25\ ^\circ\text{C}$. Todas las soluciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de $0,22\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro antes de introducirlas en el sistema electroforético. Luego, se utilizó una mezcla de $50\ \text{mmol L}^{-1}$ de fosfato de sodio dibásico, $0,01\ \text{M}$ EDTA, 10 % ACN y NaOH de pH 12,0 como electrolito soporte.

El capilar se acondicionó con un lavado de $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ de NaOH durante 5 min, luego agua ultrapura durante 3 min y, finalmente, con solución tampón durante 5 min, esto se realizó antes de cada medida. Esta secuencia mejoró la reproducibilidad de la separación. Se usó un modo de inyección hidrodinámica aplicando una presión de $0,8\ \text{psi}$ durante 10 s. Los electroferogramas de las tetraciclinas se registraron a $356\ \text{nm}$.

Análisis estadístico de datos

Cada parámetro de las curvas de calibrado se calculó con el software ULC 2.0 (Calibración lineal univariante). Se realizaron cálculos estadísticos adicionales utilizando Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft, Redmond, WA, EE. UU.).

El diseño experimental, fue llevado a cabo utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1.

6.5. Resultados y discusión

6.5.1. Ensayos preliminares

Durante el desarrollo de las pruebas preliminares se evaluó el volumen de extractante recuperado y la limpieza de la muestra por ser dos de las variables que están directamente involucradas en la eficiencia de la extracción.

Volumen de extractante recuperado

Durante estos ensayos, se observó que el volumen del extractante recuperado era variable. Por esta razón, se decidió evaluar el efecto del tiempo de irradiación y de centrifugación, así como también el tipo y cantidad de sales agregadas, con la finalidad de obtener volúmenes reproducibles.

-Tiempo de irradiación: El tiempo de irradiación del microondas tiene un efecto muy importante en la eficiencia de la extracción. Se pudo observar que este tiempo tiene un efecto directo sobre el volumen de extractante recuperado y la reproducibilidad del mismo. A mayor tiempo de exposición, menor volumen de extractante recuperado y menor reproducibilidad. Esto puede explicarse debido a un aumento en la temperatura, la cual causa una mayor evaporación del solvente. Por esta razón, se implementó un baño de agua por fuera del vaso de precipitado que contiene la muestra con el fin de disminuir la evaporación (**Fig. 29**).

-Tiempo de centrifugación: Para ello se realizaron distintos experimentos, variando el tiempo de centrifugado:

- Experimento 1: 5 minutos,
- Experimento 2: 10 minutos,
- Experimento 3: 15 minutos,
- Experimento 4: 15 minutos, con posterior retiro del sobrenadante y centrifugado 5 minutos más,
- Experimento 5: 20 minutos.

Como se observa en la **Fig. 31**, 15 minutos fueron suficientes para obtener la máxima recuperación del extractante.

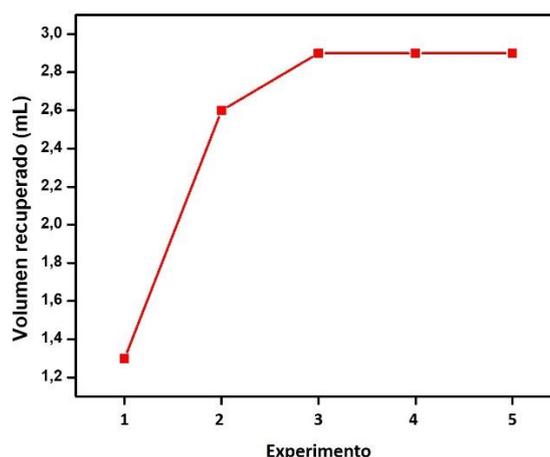


Figura 31: Análisis del tiempo de centrifugado

- Sales: En base a la literatura¹⁷⁵, se evaluó el agregado de $MgSO_4$ como aditivo en el solvente de extracción. Debido a su efecto deshidratante, ayuda a mejorar la cantidad de volumen recuperado ya que favorece la separación de la fase de la muestra y del solvente de extracción¹⁷⁶.

Al continuar con los experimentos, se debió cambiar dicha sal por Na_2SO_4 debido a la precipitación del Mg como hidróxido¹⁷⁷ dentro del capilar, ya que pH del electrolito soporte fue 12,0.

Limpeza de la muestra (“clean up”)

En esta sección, se evaluó el efecto de diferentes sistemas de limpieza sobre el extracto final de pechuga de pollo, antes de ser introducido en el equipo de electroforesis capilar para su detección y cuantificación.

Los primeros ensayos se realizaron utilizando carbón activado, nanotubos de carbono y una columna de algodón. Sin embargo, los extractos permanecían sin cambios aún después de la limpieza.

Posteriormente, basado en el método QuEChERS, que se utiliza para el análisis de pesticidas y fármacos en matrices ambientales y biológicas¹⁷⁵, se decidió evaluar si el óxido de circonio (ZrO_2) era adecuado para la limpieza de la muestra. Como los resultados obtenidos fueron satisfactorios (**Fig. 32**), se optimizó la cantidad de óxido a utilizar. Como puede observarse en la **Fig. 33**, 0,1 g de ZrO_2 resultaron ser los adecuados para la limpieza.

¹⁷⁵ Guo, Chunna, et al. "Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B* 1027 (2016): 110-118.

¹⁷⁶ Vahidi, E., F. Rashchi, and D. Moradkhani. "Recovery of zinc from an industrial zinc leach residue by solvent extraction using D2EHPA." *Minerals Engineering* 22.2 (2009): 204-206.

¹⁷⁷ Stephen, Henry, ed. Solubilities of inorganic and organic compounds. 1, Binary systems: Pt. 1. Pergamon Press, 1963.

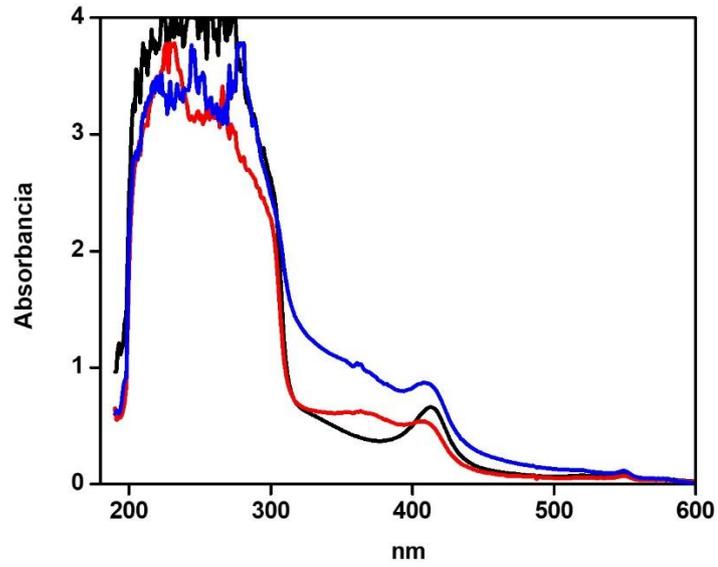


Figura 32: Efecto del óxido de circonio

La línea negra representa espectro de absorción de un extracto de la muestra sin fortificar, la línea azul un extracto de la muestra fortificada (50 ppm) antes de realizar la limpieza con ZrO_2 y la línea roja la misma muestra luego de realizar el paso de limpieza con ZrO_2 . Cantidad de ZrO_2 utilizado: 0,1 g.

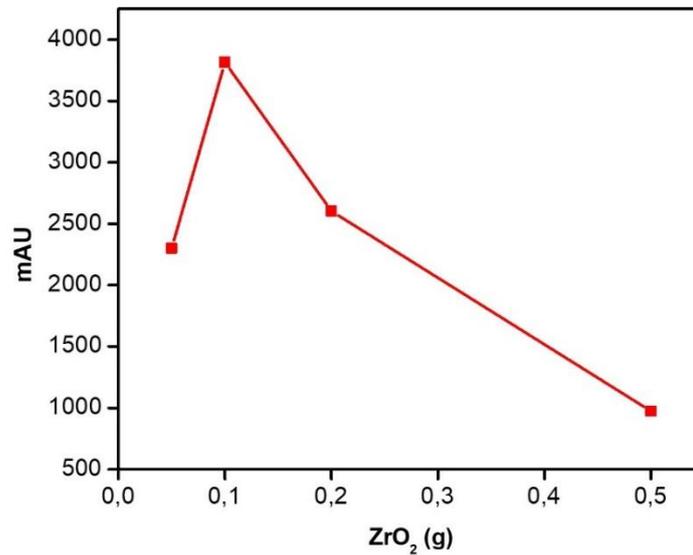


Figura 33: Optimización cantidad de ZrO_2

Lectura a 356 nm

6.5.2. Composición del buffer electroforético

Para obtener una separación adecuada de las TCs, se estudiaron las siguientes variables: pH, concentración y composición del electrolito soporte, el agregado de modificadores orgánicos, así como también si las TCs se encontraban en su estado molecular o disociado.

Se estudió la composición del electrolito soporte. Para ello se evaluaron soluciones reguladoras de borato, fosfato y carbonato de pH 12. Con estas soluciones se logró la separación de soluciones estándar de TCs. Sin embargo, al utilizar la muestra real se observó falta de resolución de los picos debido a la presencia de sustancias interferentes. Los mejores resultados fueron obtenidos con la solución reguladora de fosfato ya que se observaron mejores formas de picos y los electroferogramas mostraron una línea de base generalmente más plana que las obtenidas con carbonato y borato, lo que facilita la integración y la interpretación. Debido a ello, las soluciones de carbonato y borato fueron descartadas de los ensayos siguientes.

La selección del pH del electrolito soporte se basó en el valor de pKa de los analitos. Debido al hecho de que las TCs tienen tres valores de pKa (3,3/7,7/9,3), en un pH fuertemente alcalino, su molécula existe en su forma cargada negativamente. Debido a ello, se decidió trabajar a pH 12 para asegurar que las moléculas se encuentren completamente cargadas y así obtener una buena migración.

Luego, una vez seleccionado el electrolito soporte, con el objetivo de lograr la completa resolución de los picos y superar las interferencias de la matriz, se evaluó el efecto del agregado de ACN y MeOH como modificadores orgánicos. Así, se probaron ambos modificadores en un 10% (v/v) en la solución reguladora de fosfato de pH 12. Como puede verse en las **Fig. 34 y 35**, al emplear ACN como modificador se obtuvo una mejor resolución de los picos que utilizando metanol.

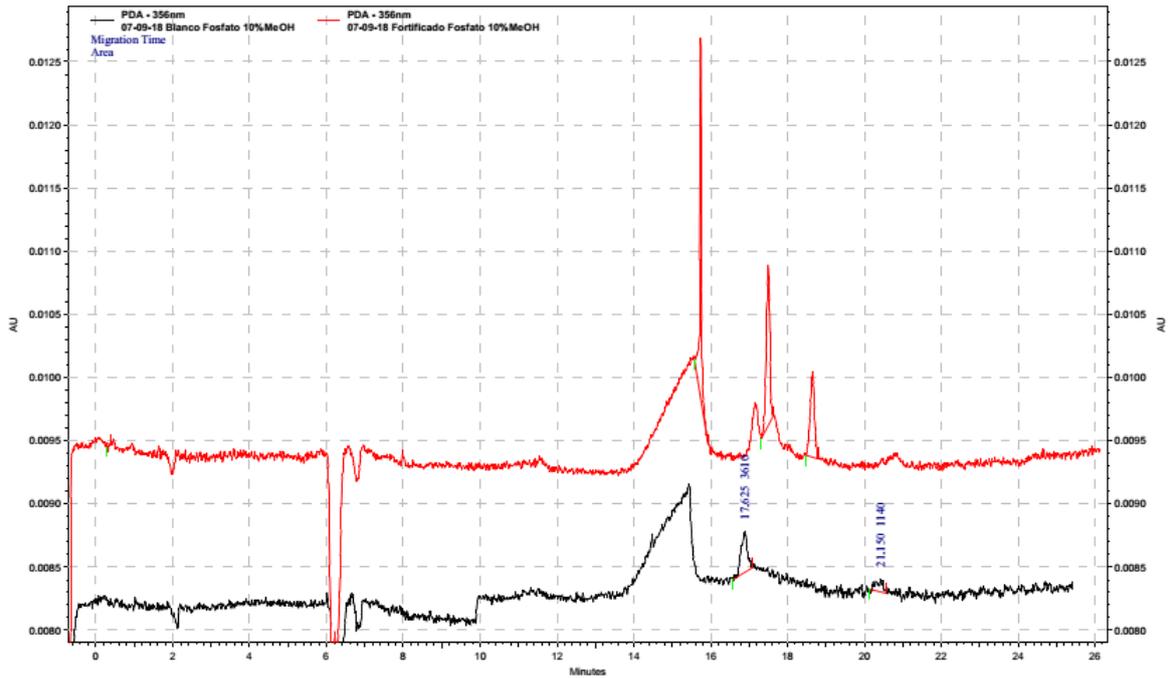


Figura 34: Electroferograma TET, OTC y DOX 20 ppm en tampón electroforético fosfato con 10 % de MeOH

Trabajando bajo estas condiciones, el tiempo de migración de TC, OTC, DOX fueron 13,2, 14,5 y 15,3 min, respectivamente.

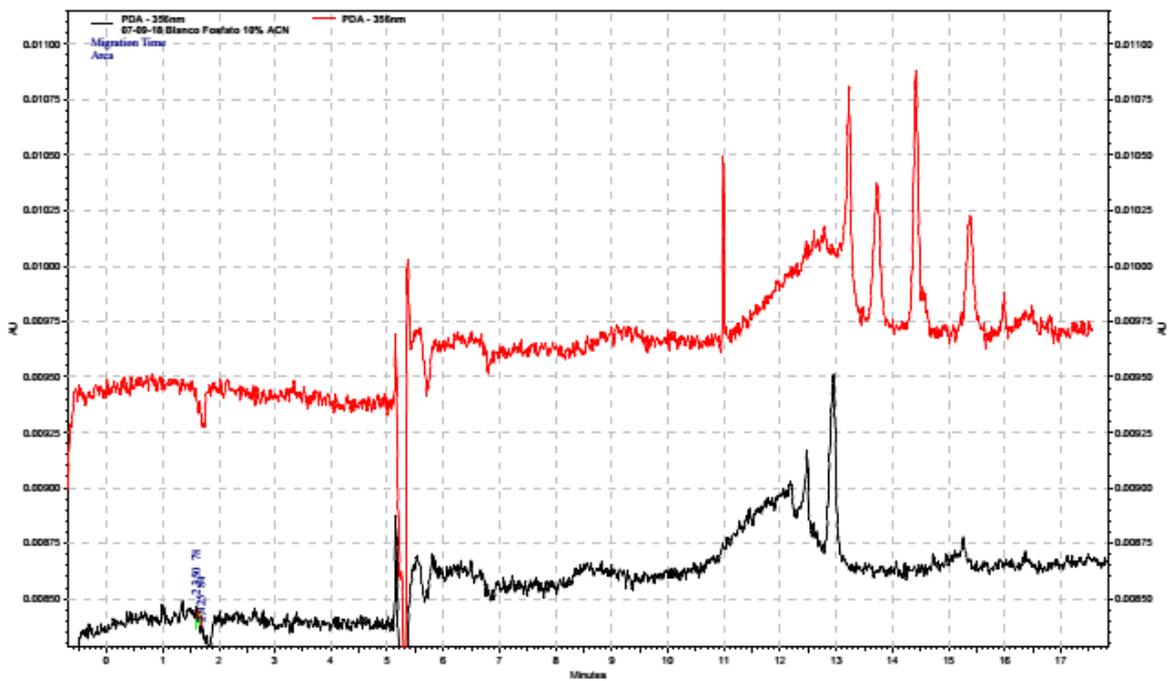


Figura 35: Electroferograma TET, OTC y DOX 20 ppm en tampón electroforético fosfato con 10 % de ACN

6.5.3. Diseño de experimentos

En general, los métodos tradicionales de optimización conocidos como optimización univariante, evalúan el efecto de una variable a la vez, manteniendo constantes todas las demás variables, sin tener en cuenta interacciones entre ellas. A lo largo de las últimas décadas, el diseño de experimentos ha desempeñado un papel importante en las aplicaciones de la química analítica debido a que genera una gran cantidad de información a partir de un número mínimo de experimentos, con la posibilidad de evaluar el efecto de la interacción entre las variables¹⁷⁸. Un tipo particular de esos diseños es el diseño de Plackett-Burman, que supone que las interacciones pueden ignorarse por completo y, por lo tanto, los efectos principales se calculan con un mínimo de experimentos¹⁷⁹.

En este trabajo se seleccionó un diseño experimental Plackett-Burman para reconocer las variables que afectan a la señal electroforética (sumatoria de áreas). El propósito de este diseño es identificar los factores que son estadísticamente significativos y cuales afectan en menor medida a la señal analítica. En este diseño se evalúan las variables en dos niveles: un nivel bajo (-1) y un nivel alto (+1), y es utilizado para evaluar hasta $k=(N-1)$ factores independientes, siendo N el número de experimentos. En la **Tabla 12** se presenta la matriz del diseño para 11 factores con 12 experimentos en orden aleatorio.

Tabla 12: Matriz para el diseño Plackett-Burman

	Potencia	tiempo	[HCl]	V HCl	g Sal	Dummies					
1	200 W	5,0 min	0,05 M	5,0 mL	0,125 g	-1	1	-1	-1	-1	1
2	200 W	2 min	0,15 M	5,0 mL	0,031 g	1	-1	-1	-1	1	1
3	200 W	5,0 min	0,15 M	3,0 mL	0,125 g	1	-1	1	-1	-1	-1
4	120 W	5,0 min	0,05 M	3,0 mL	0,031 g	1	1	1	-1	1	1
5	200 W	2 min	0,15 M	3,0 mL	0,031 g	-1	1	1	1	-1	1
6	120 W	2 min	0,05 M	5,0 mL	0,125 g	1	-1	1	1	-1	1
7	200 W	5,0 min	0,05 M	5,0 mL	0,031 g	-1	-1	1	1	1	-1
8	120 W	2 min	0,05 M	3,0 mL	0,031 g	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	120 W	2 min	0,15 M	5,0 mL	0,125 g	-1	1	1	-1	1	-1
10	200 W	2 min	0,05 M	3,0 mL	0,125 g	1	1	-1	1	1	-1
11	120 W	5,0 min	0,15 M	3,0 mL	0,125 g	-1	-1	-1	1	1	1
12	120 W	5,0 min	0,15 M	5,0 mL	0,031 g	1	1	-1	1	-1	-1

¹⁷⁸Ebrahimi-Najafabadi, Heshmatollah, Riccardo Leardi, and Mehdi Jalali-Heravi. "Experimental design in analytical chemistry—part I: theory." *Journal of AOAC International* 97.1 (2014): 3-11.

¹⁷⁹Vidal, Lorena, et al. "An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples." *Analytica chimica acta* 584.1 (2007): 189-195.

Sin embargo si el número de factores estudiados es menor que el número de factores independientes del diseño, los factores restantes pasan a ser factores imaginarios o ficticios denominados dummies. Estas variables imaginarias se utilizan para estimar el error experimental y comparar por medio de una prueba de t student qué variables son significativas. Es importante aclarar que se necesitan al menos 3 variables ficticias para proporcionar una estimación aceptable del error¹⁸⁰. La influencia en la respuesta de cualquier factor real es significativa si su efecto es mayor que el efecto crítico (calculado a partir de los dummies), donde los grados de libertad son el número de variables ficticias.

El gráfico de Pareto permite interpretar gráficamente el comportamiento de las variables y establecer si estas son estadísticamente significativas. La línea vertical en color azul representa el 95% del intervalo de confianza. Las barras que cruzan esta línea son representan los factores significativos con respecto a la variable respuesta. Como puede observarse en la **Fig. 36** ninguna de las variables, tanto reales como imaginarias, muestra efectos estadísticamente significativos en los intervalos estudiados. Algunos autores^{181,182} afirman que esto puede deberse a los ensayos de optimización previos llevados a cabo durante las etapas del desarrollo del método.

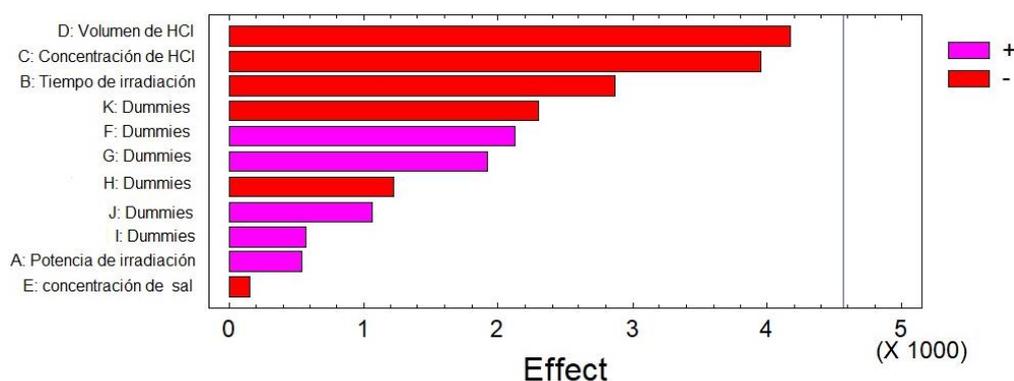


Figura 36: Gráfico de Pareto correspondiente al diseño Plackett-Burman

Como conclusión, las condiciones experimentales óptimas considerando la sumatoria de las áreas fueron: 120 W de potencia de irradiación durante 2 minutos, 3 mL de HCl 0,05 M y 0,031 g de Na₂SO₄.

¹⁸⁰Ma, Li, et al. "Optimization of arsenic extraction in rice samples by Plackett–Burman design and response surface methodology." *Food chemistry* 204 (2016): 283-288.

¹⁸¹Vidal, Lorena, et al. "Magnetic headspace adsorptive extraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry." *Analytica chimica acta* 971 (2017): 40-47.

¹⁸²Sgrist, Mirna, et al. "Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake." *Food chemistry* 134.4 (2012): 1932-1937.

6.5.4. Parámetros analíticos

Bajo las condiciones experimentales optimizadas se realizaron dos curvas de calibrado para cada analito (**Fig. 37**): una preparando las soluciones testigo en el solvente de extracción (azul) y otra sobre la muestra (roja), en el mismo intervalo lineal.

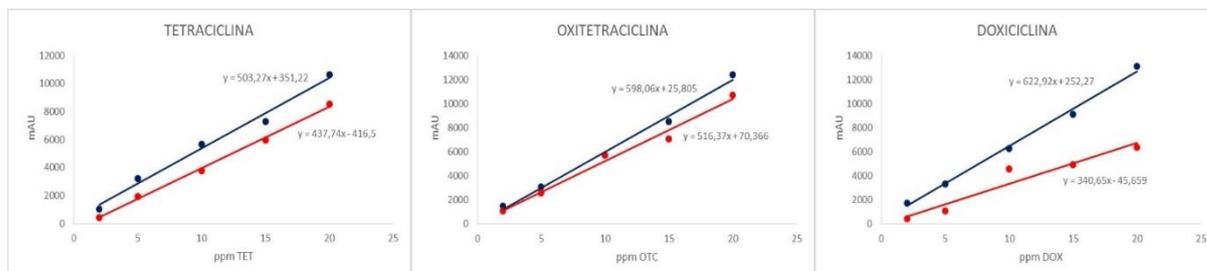


Figura 37: Curvas de calibrado en solvente de extracción y sobre la muestra para las 3 TCs estudiadas

Mediante un test de comparación de pendientes se pudo observar que, si bien las curvas para TET y OTC son estadísticamente comparables (t_{tabulado} : 2,447; $t_{\text{calculado TET}}$: 1,81, $t_{\text{calculado OTC}}$: 1,675), sin embargo, para DOX las pendientes resultaron estadísticamente distintas ($t_{\text{calculado DOX}}$: 4,53), demostrando un efecto matriz significativo ($p < 0,05$).

Por otra parte, debido a que mediante el análisis por electroforesis capilar con detección UV-vis no fue posible alcanzar el valor del LMR establecido por la legislación vigente, es necesario continuar los estudios para mejorar la capacidad analítica del método desarrollado, incluyendo una etapa de preconcentración de los extractos.

6.6. Conclusiones parciales

Se desarrolló un nuevo método analítico para la determinación de tetraciclina (TET), oxitetraciclina (OTC) y doxiciclina (DOX) en muestras de carne de pollo. La extracción es asistida por un microondas doméstico durante 2 min a una potencia de 120 W. El método propuesto es simple y eficaz ya que evita la pérdida de los analitos. Para dicho proceso se utilizó una solución de HCl como agente de extracción y una sal de Na_2SO_4 como agente deshidratante. La limpieza del extracto se llevó a cabo con ZrO_2 . Posteriormente, el extracto se inyecta directamente en el equipo de EC, y solo toma 15 minutos completar el análisis. Los porcentajes de recuperación en las muestras fueron superiores al 80%. Actualmente, se está trabajando en el sistema de preconcentración.

Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas durante el desarrollo de la investigación que se recopila en esta Tesis son las siguientes:

1) Se presenta un nuevo método FIA espectrométrico, automatizado, como una alternativa para determinar DOX en muestras de grasa de pollo. Es un método simple, rápido y de bajo costo. La mayor ventaja de éste método es el paso de extracción/preconcentración en el que se utiliza la metodología de microextracción líquido-líquido en fase reversa, la cual requiere solamente 400 μ L de agua acidulada como solvente de extracción. El procedimiento es sencillo, limpio y la solución extraída es fácilmente introducida en el sistema FIA. Los resultados muestran buenos valores de recuperación, además de una precisión y frecuencia de muestreo satisfactorias, teniendo en cuenta el paso de extracción/preconcentración. La curva de calibrado fue construida a partir de las soluciones estándar preparadas en agua acidulada (medio de extracción). Los valores de $U_{\text{expandida}}\%$ demostraron que el método para la determinación de DOX posee incertidumbres comparables cuando es aplicado a muestras de diferentes orígenes y a diferentes niveles de concentración.

Este método selectivo es amigable con el ambiente, y utiliza una determinación espectrofotométrica sin la necesidad de instrumentos sofisticados.

2) Se desarrolló un nuevo método analítico para la determinación de TILM y TYL en muestras de grasa de pollo. La extracción, así como la preconcentración de los analitos se llevaron a cabo usando una solución acuosa de IL como agente extractante, a través de una nueva metodología llamada microextracción por emulsificación reversa asistida por ultrasonidos (R-USAEME). Este procedimiento toma solo 12,5 minutos en el proceso de extracción y sin el uso de ningún solvente orgánico tóxico. El extracto se inyectó directamente en el equipo de CE, y solo toma 15 minutos completar el análisis. Los valores de DER% obtenidos fueron satisfactorios (inferior al 12,4%) y los LOQ fueron inferiores a los LMR establecidos por la legislación europea y la Comisión del Codex Alimentarius.

Por lo tanto, se ha logrado una metodología simple, rápida, de bajo costo y respetuosa con el ambiente para determinar TILM y TYL en muestras de grasa de pollo.

Este nuevo procedimiento muestra la posibilidad del desarrollo de nuevos protocolos que pueden incluir otros antibióticos lipófilos, así como grasas de otros orígenes. De esta manera, contribuye al monitoreo de productos de origen animal con la premisa de mejorar la calidad de los alimentos para el consumo humano.

3) Se desarrolló un sensor electroquímico basado en AdTDPV-ERGO para la determinación de tetraciclina total en muestras de leche en solo 6 minutos con excelentes recuperaciones que van del 95-102% utilizando plataformas desechables serigrafadas.

Este enfoque puede aplicarse no solo al análisis agroalimentario de muestras de leche, sino también al análisis ambiental de aguas naturales en el que el análisis "in situ" también es requerido.

AdTDPV-ERGO-SPCEs combina las propiedades de AdTDPV, la tecnología SPCE (desechabilidad, análisis "in situ" y bajo costo) y el grafeno (alta capacidad de adsorción y excelente transducción electroquímica), lo que los convierte en un enfoque prometedor para la detección electroquímica de otras moléculas de interés de interés conteniendo fenoles en su estructura.

4) Se desarrolló un nuevo método analítico para la determinación de tetraciclina (TET), oxitetraciclina (OTC) y doxiciclina (DOX) en muestras de carne de pollo. La extracción fue asistida por un microondas doméstico durante 2 min a una potencia de 120 W. Se desarrolló un método de extracción simple y eficaz que evita la pérdida de los analitos. Para dicho proceso se utilizó una solución de HCl como agente de extracción y una sal de Na_2SO_4 como agente deshidratante. La limpieza del extracto se llevó a cabo con ZrO_2 . Posteriormente, el extracto se inyectó directamente en el equipo de EC, y solo tomó 15 minutos completar el análisis. Los porcentajes de recuperación en las muestras fueron superiores al 80%. Actualmente, se está trabajando en el sistema de preconcentración.

Capítulo 7: Publicaciones

Artículos publicados

- **Lorenzetti, Anabela S.**, Claudia E. Domini, and Adriana G. Lista. "A simple and new reverse liquid-liquid microextraction for the automated spectrometric determination of doxycycline in chicken fat." *Food chemistry* 237 (2017): 506-510.
- Vidal, E., **Lorenzetti, A. S.**, Lista, A. G., & Domini, C. E. "Micropaper-based analytical device (μ PAD) for the simultaneous determination of nitrite and fluoride using a smartphone." *Microchemical Journal* 143 (2018): 467-473.
- **Lorenzetti, Anabela S.**, Adriana G. Lista, and Claudia E. Domini. "Reverse ultrasound-assisted emulsification-microextraction of macrolides from chicken fat followed by electrophoretic determination." *LWT* 113 (2019): 108334.
- Jesser, E., **Lorenzetti, A. S.**, Yeguerman, C., Murray, A. P., Domini, C., and Werdin-González, J. O. "Ultrasound assisted formation of essential oil nanoemulsions: Emerging alternative for *Culex pipiens pipiens* Say (Diptera: Culicidae) and *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) management." *Ultrasonics Sonochemistry* (2019): 104832.
- **Anabela S. Lorenzetti**, Tania Sierra, Claudia E. Domini, Adriana G. Lista, Agustin G. Crevillen and Alberto Escarpa. "Electrochemically reduced graphene oxide screen-printed-based electrodes for total tetracyclines determination by adsorptive transfer stripping differential pulse voltammetry". *Sensors* 2020, 20, 76.

Capítulos de libro

- Mónica B. Alvarez; **Anabela S. Lorenzetti**; Carolina C. Acebal; Adriana G. Lista; Claudia E. Domini; Bimal K Banik; Debasish Bandyopadhyay. Tracking Microwave-Assisted Sample Preparation through the last years. *Advances in Microwave Chemistry*. Londres: Taylor & Francis Group. 2018. p1 - 84. isbn 9780815375197 Banik, B. K., & Bandyopadhyay, D. (Eds.). (2018). *Advances in Microwave Chemistry*. CRC Press.

Trabajos presentados a Congresos Internacionales

- **Anabela S. Lorenzetti**, Microextracción líquido líquido en fase reversa para la determinación de Doxiciclina en grasa de pollo mediante espectrofotometría UV- Visible acoplada a un sistema de análisis en flujo. Paraguay. Encarnación. 2017. Libro. Resumen. Jornada. XXV Jornadas Jóvenes Investigadores Grupo Montevideo. Universidad Nacional de Itapúa

Trabajos presentados a Congresos Nacionales

- **LORENZETTI, ANABELA S.;** DOMINI, CLAUDIA E.; LISTA, ADRIANA G. Desarrollo de un nuevo método analítico para la determinación simultánea de tetraciclinas y macrólidos en hígado de pollo mediante Electroforesis Capilar. Argentina. La Plata. 2015. Libro. Resumen. Congreso. VIII Congreso Argentino de Química Analítica. Asociación Argentina de Químicos Analíticos
- **LORENZETTI, ANABELA S.;** DOMINI, CLAUDIA E.; LISTA, ADRIANA G. determinación electroforética de macrólidos en grasa de pollo previa microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa. Argentina. Río cuarto. 2017. Libro. Resumen. Congreso. 9º Congreso Argentino de Química Analítica. Universidad Nacional de Río Cuarto
- **ANABELA S. LORENZETTI;** TANIA SIERRA; CLAUDIA E. DOMINI; ADRIANA G. LISTA; AGUSTÍN G. CREVILLÉN; ALBERTO ESCARPA. Sensor descartable basado en óxido de grafeno electroquímicamente reducido para la determinación de tetraciclinas totales in situ. Argentina. Santa Rosa. 2019. Libro. Resumen. Congreso. 10º Congreso Argentino de Química Analítica. Universidad Nacional de La Pampa

