

U. CH - FC  
Q. Ambiental  
§ 581  
C. 1



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
OXITETRACICLINA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE PAR IÓNICO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

**Químico Ambiental**

**Nicolás Patricio Silva Izquierdo**



Director de Seminario de Título y Profesor Patrocinante: Prof. María Inés Toral Ponce

Abril de 2011  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

**NICOLÁS PATRICIO SILVA IZQUIERDO**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
OXITETRACICLINA MEDIANTE LA FORMACIÓN DE PAR IÓNICO”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

### COMISIÓN DE EVALUACIÓN

*Prof. María Inés Toral*  
**Director Seminario de Título y  
Profesor Patrocinante**

*Dr. Mauricio Isaacs*  
**Corrector**

*Dr. Paul Jara*  
**Corrector**

Firma manuscrita en azul de María Inés Toral, sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en negro de Mauricio Isaacs, sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en negro de Paul Jara, sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Abril de 2011

## RESEÑA



Todo comienza en una vieja villa ferroviaria. Nicolás nació en San Bernardo, Santiago de Chile el 25 de Mayo del 1982. Es el primer hijo entre cuatro hermanos, fruto de la unión de Sandra Izquierdo y Jaime Silva, además es nieto de los matrimonios: Héctor Silva y María Eliana, y Luis Izquierdo y Brenda, a ésta última no tuvo la suerte de conocerla, pero siempre supo que acompañaba a su madre, por lo tanto, a él también. Nicolás vive sus primeras mañanas en el jardín municipal "Sol Naciente" de la comuna El Bosque. Luego de un tiempo, ingresa al Jardín Infantil "Conejín" de la misma comuna, el cual vio, después de un tiempo, pasar por sus aulas a primos y dos hermanos suyos, Sandra y Gonzalo. Nicolás vivió en el seno de la familia Silva, que con un esfuerzo en conjunto, y a raíz de la tesón de su padre, logran que Nicolás curse su enseñanza básica en el Colegio de los Sagrados Corazones de Alameda, aquí se dio cuenta, recién a los 11 años, que amaba las explosiones en tubos de ensayo. Luego, en la enseñanza media estuvo en el Liceo salesiano Manuel Arriarán Barros, ambos colegios católicos. A los 17 años, ingresa a la carrera de Ingeniería Civil Química, en la USACH. No fue tan simple, permaneció solo 2 años. Nicolás debió rendir nuevamente la última P.A.A., del año 2002, mejorando sus puntajes, pero no cambiando su vocación, lo cual le permitió al año siguiente ingresar a la carrera de Química Ambiental de la Universidad de Chile, este periodo estuvo lleno

de noches de estudio y también de celebraciones, de alegrías familiares y también de penas, todo lo anterior le enseñó a Nicolás a nunca bajar los brazos, además siempre recibió el apoyo de sus tíos y abuelos, que confiaron a ciegas en él en todo momento. Acá conoció a la prof. María Inés Toral, quién ayudó a Nicolás académica, económica y emocionalmente y es actualmente guía de su trabajo final, en Laboratorio de Química Analítica, donde aprendió, por fin, a hablar en público. Nicolás siempre destacó por “echar una manito” con los números a amigos, compañeros, familiares y conocidos. Finalmente, este largo tiempo de tesis, ha estado acompañado por una gran persona: Daniela.





DEDICATORIA



*“Dedicado a mi familia, a quienes creyeron en mí”*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero dar las gracias al Cielo, que cuando mire hacia arriba, en momentos de amarguras y de máxima alegría, sentí que me escuchaban.

A lo largo de este periodo de Tesis, he conocido a grandes personas, a quienes quisiera agradecer. A la profesora María Inés Toral, profesora guía, que comprendió la necesidad mía de crecer, de ser persona, de ser fuerte, tendiéndome una mano, confiando en mí, enseñándome que no hay que desvanecer por muy difícil que sea el camino.

A mi familia, completa, del más viejo al más joven, que gracias a sus propias vidas, me enseñaron y tomé lo mejor de cada uno. A todos mis tíos y tías, a mis abuelos, a mis primos, a quienes que me aconsejaron, que me llamaron la atención, que me quisieron ver bien, que me ayudaron monetariamente cuando no tenía y me siguen ayudando, que simplemente me dijeron "que te vaya bien", a aquellos que siempre creyeron que era el mejor no siendo así realmente. En mi corazón todos. Muchas gracias.

A la gente del Laboratorio, empezando por quiénes siempre han estado, Don Segundo y Don Luis, por su cordialidad y bondad. A Grisel y a Valetta, que cuando necesité otro par de oídos, estuvieron ahí, buscando reactivos, "ocupa el compu, no hay problema", la moneda solidaria, siempre serviciales, muchas gracias. También, a toda la gente que pasó por el Laboratorio y me alegró el día, a los locos compañeros



con sus historias, quienes entendieron que era trabajo difícil y fueron comprensibles a la hora de medir, de lavar material, de ocupar los reactivos. También a la profesoras María Cecilia y Sylvia, por guiarme en tomar decisiones o simplemente reprenderme, por facilitar las independencias de sus laboratorios, la famosa centrifuga. Gracias al profesor Mauricio I. quien me contacto con don Italo, Jefe de Laboratorio Viamed, gracias por su colaboración.

Quiero dar gracias también a mis compañeros de carrera, Carlos S, Elizabeth S. Daniela F., Paula R., quienes me visitaron en el laboratorio, y especialmente a Karina y Camilo, por sus palabras de aliento, enseñanzas, tiempo, emociones compartidas, en fin, tantas cosas que vivimos juntos a lo largo de la carrera.

Gracias a los cabros cabros, que compartimos juntos días, noches, madrugadas, hip hop, fútbol, calle, a veces penas y carcajadas interminables, muchas historias similares y a pesar de eso, comprendieron que yo estaba haciendo una vida distinta, gracias por escucharme.

Gracias, finalmente, a Daniela, por ser mi pilar, por darme ánimo y verme como una persona que se la podía, a pesar de las adversidades que se presentaron, confió en mí siempre y estuvo conmigo. Gracias amor.

Gracias a ustedes que aún siguen conmigo y sé que me escucharán y esperan lo mejor de mí.





## INDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos generales	1
1.1.1 Medio ambiente	2
1.1.2 Legislación	6
1.1.3 La oxitetraciclina	9
1.1.4 Métodos de detección	13
1.2 Violeta cristal y formación de par iónico	15
1.3 Fundamento de la espectroscopia derivada	17
1.4 Validación de método analítico	21
1.5 Hipótesis	24
1.6 Objetivos	24
<b>II. MATERIALES Y MÉTODO</b>	<b>25</b>
2.1. Reactivos	25
2.2. Materiales	26
2.3. Aparatos e instrumentos	26
2.4. Procedimientos experimentales	27
2.4.1 Preparación de soluciones	27
2.4.2 Protocolos Generales	28
2.4.3 Comprobación de la formación de par iónico vía preconcentración líquido-líquido y curva de calibración	30
2.4.4 Implementación de la extracción de OTC desde músculo y piel de salmón	31
2.4.5 Aplicación del método en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de muestras blancos	32

2.4.6 Optimización para la reproducción de espectros en muestras blancos de músculo de salmón	32
2.4.7 Verificación de la formación de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de señales analíticas del par iónico	33
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
3.1 Comprobación de la formación de par iónico vía preconcentración líquido-líquido y curva de calibración.	34
3.2 Implementación de la extracción de OTC desde músculo y piel de salmón	43
3.3 Aplicación del método en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de muestras blancos	48
3.4 Optimización para la reproducción de espectros en muestras blancos de músculo de salmón	51
3.5 Verificación de la formación de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de señales analíticas del par iónico	58
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>V. PROYECCIONES</b>	<b>63</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64</b>
<b>VII. ANEXO</b>	<b>68</b>







## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1: Resumen Normativa actual.	7
Tabla 2: Tabla Resumen de LMR para distintos productos farmacéuticos en músculo y piel de salmón.	9
Tabla 3: Orden de los reactivos.	41
Tabla 4: Pasos intermedios.	45
Tabla 5: Valores de "zero crossing" de señales blanco de Implementación.	50
Tabla 6: Valores de "zero crossing" de señales blanco de Diseño.	53
Tabla 7: Diseño Experimental y respuesta en longitud de onda de "zero crossing".	53

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la alimentación de salmón mediante pellets.	5
Figura 2: Estructura de oxitetraciclina.	10
Figura 3: Estructura de derivados de OTC.	11
Figura 4: Equilibrio ácido – base del antibiótico oxitetraciclina.	12
Figura 5: Estructura del colorante violeta cristal.	16
Figura 6: Esquema del par iónico VC-OTC, en $\text{NH}_3$ 0,1 mol/L pH $9,0 \pm 0,2$ .	17
Figura 7: Ejemplo de determinación simultánea mediante el método "zero crossing".	19
Figura 8: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC. Ensayo 1.	34
Figura 9: Zoom de espectro de absorción clásico Señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 1.	35
Figura 10: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC. Ensayo 2.	36
Figura 11: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 2.	36

Figura 12: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC. Ensayo 3.	37
Figura 13: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 3 .	37
Figura 14: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden y gráfico de dispersión del Ensayo 1.	38
Figura 15: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas del par iónico VC-OTC y curva de calibración del Ensayo 2.	39
Figura 16: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas del par iónico VC-OTC y curva de calibración del Ensayo 3.	40
Figura 17: Implementación de la extracción de OTC desde músculo y piel de salmón.	44
Figura 18: Espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas de blancos de salmón.	49
Figura 19: Espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas de blancos de salmón. Optimización.	52
Figura 20: Gráfico de Pareto estandarizado.	54
Figura 21: Gráfico de efectos principales para el "zero crossing" .	55
Figura 22: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas De blancos de salmón. Optimización.	56
Figura 23: Señales analíticas de par iónico VC-OTC en músculo de salmón.	58
Figura 24: Zoom de espectro de señales analíticas de par iónico VC-OTC en músculo de salmón.	59
Figura 25: Espectro de absorción clásico de señales analíticas de VC, OTC y par iónico VC-OTC.	69
Figura 26: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas de VC, OTC y par iónico VC-OTC.	70
Figura 27: Zoom de espectro de absorción de segunda derivada de señales analíticas de OTC, VC y par iónico VC-OTC.	70



## LISTA DE ABREVIATURAS

CONAMA	Corporación Nacional del Medioambiente
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Presión
INFA	Informe Ambiental
ISA	Infectious Salmon Anemia
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
LMR	Límite Máximo Residual
LBGMA	Ley de Bases General del Medioambiente
LLE	Extracción Líquido-Líquido
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
OTC	Oxitetraciclina
PAC	Programa de Aseguramiento de la Calidad
RAMA	Reglamento Ambiental para la Acuicultura
RESA	Reglamento Sanitario
SEIA	Sistema de Evaluación Impacto Ambiental
SERNAPESCA	Servicio Nacional de Pesca
SPE	Extracción Fase Sólida
UD	Unidad de Derivada
UV-Vis	Ultravioleta Visible
VC	Violeta Cristal



## RESUMEN

El límite máximo residual establecido para la OTC en músculo y piel de salmón, es 100 µg/Kg. Este último valor está por sobre el límite de cuantificación de un método analítico desarrollado para la determinación de oxitetraciclina en músculo de salmón basado en la formación de par iónico con el colorante violeta cristal en medio amoniacal, utilizando la técnica de espectrofotometría derivada de segundo orden.

Para validar este método, se estudió sus fundamentos teóricos, luego se comprobó la formación del par iónico violeta cristal-oxitetraciclina mediante la reproducción de señales analíticas. En base a lo anterior, se propuso una forma distinta de realizar el procedimiento de determinación del par iónico, respecto al orden de adición de los reactivos. A continuación, se implementó este método y se identificaron los puntos críticos del proceso completo, así, se propusieron medidas para mejorar la aplicación. En seguida, se reprodujeron espectros derivados de blancos de reactivos conteniendo también el músculo y piel de salmón, constatándose una dificultad para estabilizar el "zero crossing". Por lo anterior, se realizó una optimización de las variables volumen de violeta cristal y amoníaco, encontrándose que los valores óptimos son:  $7 \times 10^{-6}$  mol/L de VC y  $2,4 \times 10^{-3}$  mol/L de  $\text{NH}_3$  para lograr valores más constantes del "zero crossing" del blanco. Finalmente, se aplicó el procedimiento completo a muestras fortificadas de músculo de salmón *salmo salar* con solución de OTC de concentraciones 3,0 µg/mL y 3,6 µg/mL y se verificó la formación del par iónico, sin embargo, no hubo diferencias entre las señales analíticas a estas dos concentraciones. Por lo tanto, se propuso un nuevo estudio de variables químicas y orden de adición de reactivos, pero ahora en presencia de ácido oxálico, antibiótico y matriz músculo de salmón.



## ABSTRACT

The maximum residual limit established for the OTC in muscle and skin of salmon, is 100 mg / kg. This last value is above the limit of quantification of an analytical method developed for the determination of oxytetracycline in salmon muscle based on ion pair formation with the dye crystal violet in ammoniacal medium using the technique of second-order derivative spectrophotometry.

To validate this method, it was studied their theoretical foundations, then tested the ion pair formation of crystal violet-oxytetracycline by reproducing the analytical signals. Based on the above, it is proposed a different way of performing the procedure for determining the ion pair on the order with respect to addition of reagents. Subsequently, this method was implemented and the critical points of the complete process were identified in order to improve the implementation. Then, the derivative spectra from reagent blank contain also muscle and skin of salmon were reproduced, being verified a difficulty to stabilize the zero crossing. In this context, an optimization of the variable volume of VC and ammonia was carried out; found that the optimum values are:  $7 \times 10^{-6}$  mol/L of VC and  $2,4 \times 10^{-3}$  mol/L of  $\text{NH}_3$  to achieve constant values of the blank "zero crossing". Finally, the complete procedure was applied to fortified samples of muscle of *salmon salar* with OTC solution of concentrations 3,0  $\mu\text{g/mL}$  and 3,6  $\mu\text{g/mL}$  and the ionic pair formation was verified, however, there were not differences among the analytic signals to these two concentrations. Therefore, it is proposed a new study of chemical variables and order of addition of reagents, but now in presence of oxalic acid, antibiotic and salmon muscle matrix.



## I. INTRODUCCION

### 1.1 Aspectos generales.

La creciente industria salmonera al sur de nuestro país se ha convertido en uno de los sectores productivos más fructíferos, gracias a las características y condiciones físicas presentes en la geografía del sur de nuestro país. A nivel nacional, se posiciona en el tercer puesto en el tema exportaciones, siendo el primero el sector minero. En lo que respecta a lo internacional, al año 2008 la exportación de salmón es liderada por Noruega y sólo a continuación se encuentran los centros de producción chilenos, (Salmón Chile, 2008). Sin embargo, debido a la aparición del virus ISA (Infectious Salmon Anemia), en el año 2007, el cual afecta al salmón causando una hemorragia interna, se produjo una notable disminución en la producción de salmónidos, la cual caería a una producción bruta de 245.000 toneladas para el año 2010, pero con un notable y efectivo repunte del 20% para el año 2011 (La Tercera, Negocios, 2010). Las especies cultivadas en Chile son: salmón Cereza, salmón Rey, salmón Rosado, trucha Café, trucha Arco iris, salmón Coho y salmón Atlántico (Aqua Noticias, 2008), siendo estas tres últimas las más importantes. De estas especies, el salmón Atlántico, el más exportado, se vió profundamente afectada su producción, motivada por la disminución en su cultivo.

El gran número de individuos involucrados en el ciclo del salmón y el aseguramiento de la producción, ha hecho necesario la administración de diversos tipos de antibióticos. El uso de fármacos antimicrobianos se ha masificado a nivel mundial en la medicina veterinaria, utilizándose comúnmente como agentes terapéuticos para combatir enfermedades infecciosas, éstos se utilizan también como

profilácticos para la prevención de cuadros infecciosos derivados de un estado de estrés, o como promotores de crecimiento para mejorar la eficacia de conversión de alimentos y disminuir el tiempo de sacrificio. Así, en Chile y tal como ocurrió en Noruega, los esfuerzos de disminuir los volúmenes de fármacos, están orientados al desarrollo de vacunas más efectivas y menos riesgosas para la salud humana.

### **1.1.1 Medioambiente.**

El entorno en que se desarrolla la acuicultura no deja de ser alterado por que haya legislación, es más, la Ley General de Bases del Medioambiente incentiva a la industria al desarrollo, siempre y cuando se haga de manera responsable el aprovechamiento de los recursos naturales. Por este motivo, y por ser una actividad que se sustenta directamente en el ambiente acuático, este sector productivo produce inevitablemente impactos en el medio natural.

La instalación de centros de cultivo de peces necesita para funcionar requerimientos de suelo y agua, éstos son fundamentales para proveer de recursos, servicios y energía a un área determinada de cultivo, lo que inevitablemente trae consigo otros efectos indirectos en el medioambiente, como alteración del paisaje natural, por ejemplo. Por otro lado, estas instalaciones producen una acumulación de materia orgánica compuesta por los restos de alimentos y por las mismas materias fecales de los organismos en cultivo (Hansen y col., 2001). Las heces y restos de alimento tienen mayores contenidos de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) que los sedimentos naturales (Merican & Phillips, 1985) por esto, algunos de los tantos efectos del aumento de la carga de materia orgánica y de los nutrientes en los sedimentos son:

eutroficación, disminución de las concentraciones de oxígeno y aumento de la demanda biológica de oxígeno, estimula la producción bacteriana y vegetal y finalmente cambia la composición química, la estructura y funciones de los sedimentos, los cuales aumentan su condición anaeróbica y reductora. También se producen alteraciones en los ciclos normales de nutrientes afectando la abundancia del fitoplancton, zooplancton y peces, incrementando el ingreso de nitrógeno (N) y fósforo (P) desde los sedimentos hacia la columna de agua, produciendo metanogénesis (formación de metano por medio de bacterias metanógenas que son anaerobias) y ácido sulfhídrico en zonas marinas (Morrisey y col., 2000). Según Suárez y Guzmán (1998) señalan que el cultivo intensivo de peces en espacios confinados, como jaulas, ha causado floraciones de microalgas que pueden llegar a ser altamente nocivas y hasta letales si se acumulan donde los peces cultivados se desarrollan.

Por otro lado, el escape de salmones desde las balsas-jaulas, tiene sus propias consecuencias en el medio acuático, pues se reconoce el hecho de que las especies invasoras (salmón cultivado) alteran directa e indirectamente la composición y diversidad de una comunidad biológica (Thompson & Townsend, 2003). Algunos impactos son: relación negativa entre el número de individuos de salmones cultivados (Coho y Shinook) y peces nativos (Arismendi y col, 2009), cambio en el ecosistema acuático natural debido al asilvestramiento de los salmones escapados (Melo y col, 2005), brote de enfermedades en salmones cultivados y silvestres, debido al confinamiento dado para los salmones y la corta distancia existente entre las distintas concesiones.



En acuicultura también se usan agentes químicos, por ejemplo para la construcción de jaulas (corrosión y anti-fijación de organismos), pigmentos integrados al alimento, desinfectantes y diferentes productos utilizados para el control de enfermedades. Entre los anteriormente mencionados, el problema mayor se presenta en el uso de medicamentos. Éstos comprenden antibióticos, fungicidas y compuestos antiparasitarios que son utilizados para el tratamiento de diversas patologías y son suministrados vía oral o como vacunas inyectables. En el caso de la administración vía oral, la mayor parte de estos compuestos termina en el ambiente, a través del alimento no ingerido y en las heces, los que pueden ser posteriormente consumidos por peces silvestres. La presencia de antibióticos en los sedimentos puede producir alteraciones en los procesos químicos de éstos pues pueden inhibir los procesos de reducción de sulfatos así como de nitrificación (Klaver y Mathews, 1994). Hoy día, se reconoce que los antibióticos pueden estar presentes a cientos de metros de los sistemas de cultivo, permanecer en el ambiente por un tiempo relativamente largo y encontrarse en peces que consumieron restos de alimentos con residuos de antibióticos (Samuelsen, 1992). Factores climáticos: temperatura del agua, velocidad del viento; dirección de corrientes marinas, factores físico-químicos propios del antibiótico: solubilidad, presión de vapor, degradabilidad, etcétera y por último las interacciones que se den entre el antibiótico y las características ambientales son las variables determinantes del transporte del contaminante a través de las aguas.

El explosivo crecimiento de la industria del salmón, con un apareamiento de diversas enfermedades bacterianas afectando la economía de esta industria, ha llevado al uso excesivo de antibiótico. Esto puede llevar a los peces silvestres a una exposición involuntaria al antibiótico, el cual se encuentra en la comida de peces y en

consecuencia, podría pasar al ser humano, como muestra la Figura 1. Respecto a esto, es importante destacar que en la salud humana también existe repercusión, pues se sabe que la presencia de concentraciones residuales de fármacos antimicrobianos en músculo de salmón, pueden desencadenar efectos centrados en reacciones de hipersensibilidad en la piel, faringe y genitales, además de efectos tóxicos específicos, también se sabe que la ingestión de carne de pez contaminada con antibióticos tiene el potencial de alterar la flora normal del tracto digestivo humano, favoreciendo la infección por patógenos como por ejemplo la salmonella. (Cabello F.C. 2003, 2004 y 2006).

Las relaciones existentes entre la acuicultura y el entorno natural son diversas y complejas, ya que hay ciertos aspectos que aún no han sido estudiados con toda la profundidad necesaria o por la falta de compilación ordenada de la información, existiendo, en consecuencia, diferentes opiniones acerca de la gravedad y las implicancias de los impactos en el medioambiente entre empresarios y ambientalistas.

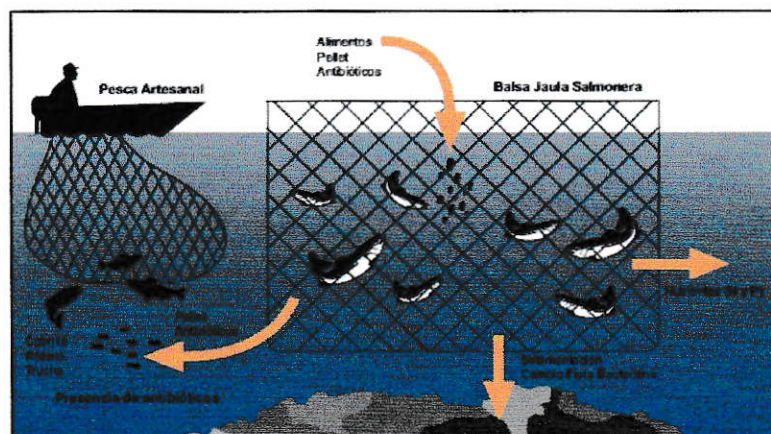


Figura 1: Esquema de la alimentación de salmón mediante pellets. La materia orgánica y los antibióticos se proyectan tanto dentro como fuera de la balsa jaula salmonera.



### 1.1.2 Legislación.

La industria salmonera chilena, a pesar de las dificultades que ha debido enfrentar estos últimos años, ha ido en aumento sostenible. Motivada por factores medioambientales y legales, la expansión nacional e internacional de la industria se ha visto favorecida desde los inicios de la producción exportable, cercana al año 1984. (Salmón Chile, 2008).

El sector pesquero ha sido pionero en la aplicación de estándares medioambientales. De forma voluntaria esta industria en acuerdo con el Gobierno, ha impulsado, creado e implementado medidas legislativas, las cuales han posibilitado la apertura de nuevos mercados para esta industria y así destacarse a nivel mundial. Además de las iniciativas propias, existe un marco regulatorio vigente el cual está encargado al Ejecutivo. Así como la minería, el sector agropecuario, la industria maderera y forestal, y los restantes sectores productivos, la acuicultura también se somete a las directrices impuestas por la legislación chilena. El principal fin de las normas es el uso responsable de los recursos naturales (Aqua Artículos, 2010).

A continuación, en la Tabla 1, se resumen los sistemas, programas o reglamentos más importantes de la normativa actual, separadas según iniciativa voluntaria u obligatoria. Cabe destacar que una vez pactada la iniciativa voluntaria entre el la Industria Pesquera y el Ejecutivo, ésta tiene carácter obligatoria.

Tabla 1: Resumen Normativa actual. El RAMA (2001) es el reglamento específico para la acuicultura. (Salmón Chile, Medioambiente, 2010). (CONAMA, Ley de Bases Generales del Medioambiente, 2009).

Iniciativas Voluntarias	Marco regulatorio impuesto por el ejecutivo
Sistema de Monitoreo Ambiental	La Ley General de Pesca y Acuicultura
Acuerdos de producción limpia	Ley de Bases General del Medioambiente (LBGMA)
Código de Buenas Prácticas, SIGES	Sistema de Evaluación impacto ambiental (SEIA)
Sistemas de certificación ISO (9001, 14000) y OHSAS	Reglamento Ambiental para la Acuicultura (RAMA)
Sistema de Vigilancia Permanente de la Normativa Salmonera – VIGÍA	Reglamento Sanitario - RESA
Programa de Gestión Zonal	Código Sanitario y regulación sectorial de agricultura y pesca

Según el RAMA los titulares de todos los centros de cultivo deberán entregar anualmente la Información Ambiental (INFA), de acuerdo a los formularios que entregue el Servicio Nacional de Pesca, el INFA es un cuerpo legal que establece la categoría del centro de cultivo según la base de su sistema productivo, producción anual, profundidad y tipo de fondo. (Aqua Artículos, 2010).

Desde la transformación de los insumos hasta la elaboración del producto final, incluyendo todas las transformaciones paralelas al proceso medular industrial, el Gobierno dicta, revisa y hace cumplir el ordenamiento medioambiental mediante leyes, normas y decretos, tales que apuntan al equilibrio social, económico y ambiental, objetivos del desarrollo sustentable. Para cumplir los objetivos del ordenamiento

ambiental, el Gobierno mediante sus organismos competentes realiza la fiscalización multisectorial de la industria pesquera. Entre los organismos subordinados que cumplen esta tarea se pueden mencionar CONAMA, Subsecretaría de Marina, el Servicio de Salud, Subsecretaría de Pesca, el Servicio Agrícola y Ganadero, y el Servicio Nacional de Pesca (Semapesca), este último ente institucional público cumple diversas funciones: ejecutar la política pesquera nacional, fiscalizar el cumplimiento de las leyes, vela por la calidad sanitaria de los productos pesqueros, propone planes de desarrollo para la pesca deportiva, ejerce la tuición de parques y reservas marinas, entre otra muchas y variadas tareas.

Las organizaciones mundiales son las entidades que norman sobre el uso racional de antibióticos, antiparasitarios, entre otros, en materias de calidad y protección alimentaria, normas destinadas a proteger la salud del consumidor y garantizar que el intercambio entre los países se base en prácticas conjuntas. En nuestro país, Semapesca cumple este rol, ya que cuenta con un programa de aseguramiento de la calidad (PAC), enmarcado en éste, el programa de control de fármacos contempla los límites máximos de residuos de fármacos en productos de origen animal. Por ejemplo, para la oxitetraciclina en músculo de salmón, el límite máximo residual (LMR), o sea la concentración máxima de residuos resultantes del uso de un medicamento veterinario, es 100 µg/Kg, o sea 100 µg de oxitetraciclina por 1 Kg de músculo y piel de salmón fresco. (Semapesca, "Programa Control de fármacos". 2005).



La Tabla 2, muestra los LMR de productos farmacéuticos establecidos por mercados internacionales regulados en carne y piel de pescado:

Tabla 2: Tabla Resumen de LMR para distintos productos farmacéuticos en músculo y piel de salmón. Estos son impuestos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través del *Codex Alimentarius*.

<i>Productos Farmacéuticos</i>	<i>USA</i>	<i>Unión Europea</i>	<i>Japón</i>	<i>Chile</i>
Oxitetraciclina	2000 µg/Kg	100 µg/Kg	200 µg/Kg	100 µg/Kg
Ácido Oxolínico	Ausencia	100 µg/Kg	Ausencia	100 µg/Kg
Flumequina	Ausencia	600 µg/Kg	Ausencia	600 µg/Kg
Florfenicol	Ausencia	1000 µg/Kg	Ausencia	1000 µg/Kg
Eritromicina	Ausencia	200 µg/Kg	Ausencia	200 µg/Kg
Benzoato de Emamectina	Ausencia	100 µg/Kg	Ausencia	100 µg/Kg

### 1.1.3 Oxitetraciclina

Este antibiótico es uno de los tantos medicamentos usados para combatir enfermedades en la acuicultura chilena, como por ejemplo, la eritromicina, el florfenicol, la flumequina, el ácido oxolínico, etc., todos éstos se encuentran normados en el programa de aseguramiento de la calidad, el cual fija el límite máximo residual para cada uno de ellos. La oxitetraciclina (OTC), es un antibiótico del grupo de las tetraciclinas para combatir enfermedades infecciosas de salmónidos, especialmente para afecciones causadas por los géneros *Renibacterium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*,

*Vibrio* como también *Rickettsias*, *Streptococcus* y *Micoplasmas*, combate el Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS), causado por *Piscirickettsia salmonis*, usado en el control de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), causado por *Renibacterium salmoninarum*, y Ulceraciones, entre otras. (Veterquímica. 2010).

Este antibiótico presenta un esqueleto de hidronaftaceno que contiene cuatro anillos fundidos. En la Figura 2 se muestra la estructura de OTC. El sitio de quelación incluye el sistema  $\beta$ -dicetona (posición 11 y 12), y los grupos enol (posición 1 y 3) y carboxamida (posición 2) del anillo A (Chopra y Roberts, 2001). En general, las tetraciclinas tienen gran capacidad de formar complejos con cationes di y trivalentes debido a la presencia de grupos cetónicos y enoles (Liu y col, 2002).

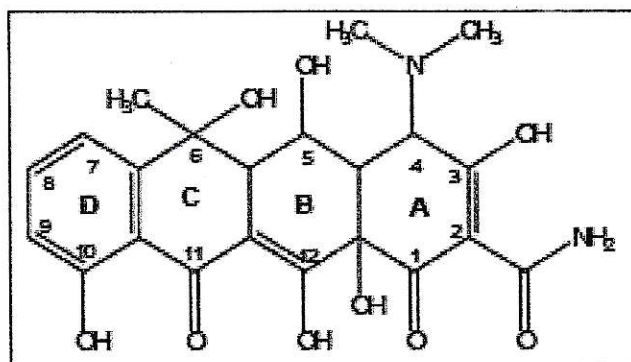


Figura 2: Estructura de oxitetraciclina.

Debido a la presencia de grupos hidroxilos y amino, OTC es una molécula que posee propiedades ácido base, siendo la especie predominante dependiente del pH. De acuerdo a la literatura OTC presenta tres valores de pKa, el primero corresponde al C<sub>3</sub>-OH (pKa<sub>1</sub> 3,2), el segundo al C<sub>4</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (pKa<sub>2</sub> 7,5), y el tercero al C<sub>10</sub>-OH (pKa<sub>3</sub> 8,9) (Qiang y Adams, 2004). Además, este compuesto es soluble en ácidos, bases, alcoholes y solventes orgánicos polares, pero es inestable a pH altamente ácidos o



básicos, cuando se expone a elevadas temperaturas por largos períodos de tiempo y en medios de alta humedad. Bajo estas condiciones, OTC puede experimentar epimerizaciones. (Oka y col, 2000), pues es sabido que las tetraciclinas al ser manejadas con disolventes a pH ácidos, sufren diferentes modificaciones en su estructura. La formación de derivados de la OTC se puede deber a la dihidratación en el carbono C<sub>6</sub>-OH, el producto es anhídridoxitetracilina, debido al medio ácido. Esta molécula es inestable en solución acuosa y puede provocar la formación de  $\alpha$  y  $\beta$  apooxitetraciclinas. Por otro lado OTC puede sufrir epimerización del carbono C<sub>4</sub> dimetilamino para formar 4-epioxitetracilina como se muestra en la Figura 3, debido a un entorno de pH ácido (2 – 6). (Khan y col. 1987).

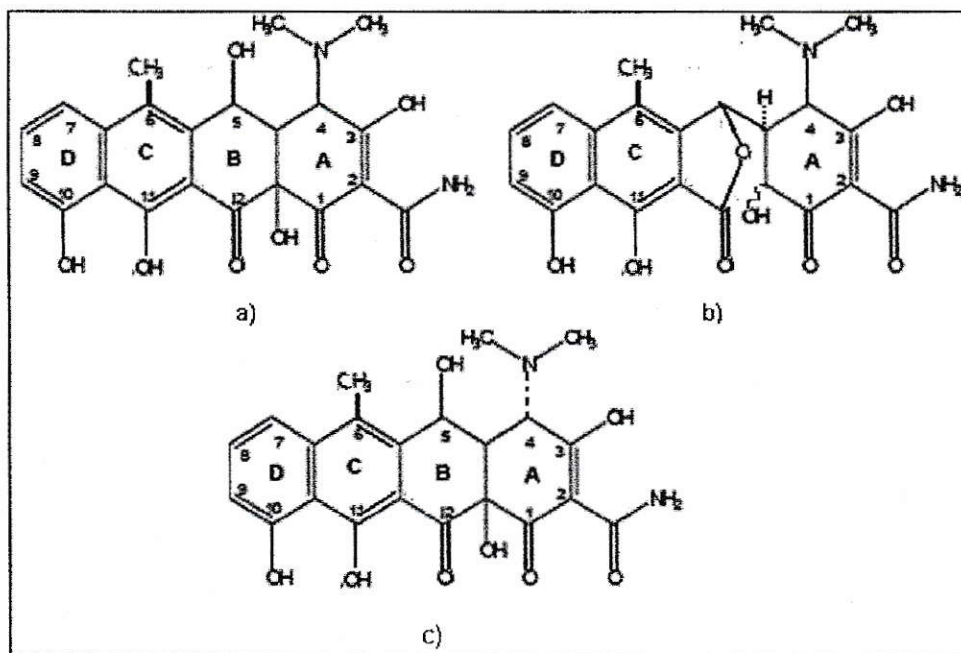


Figura 3: Estructura de derivados de OTC: a) anhídridoxitetracilina b)  $\alpha$  y  $\beta$  apooxitetraciclinas. c) 4 – epioxitetracilina.

OTC es una molécula con propiedades ácido base, debido a sus 3 valores de Constante de Acidez. En la Figura 4 se observan los equilibrios ácido base de este antibiótico, sin considerar las epimerizaciones en medio ácido. Independiente de estas transformaciones, la carga negativa del oxígeno de la especie  $[A]^{-2}$  se produce en medio básico, no viéndose alterada por cambios estructurales en zonas periféricas de la molécula.

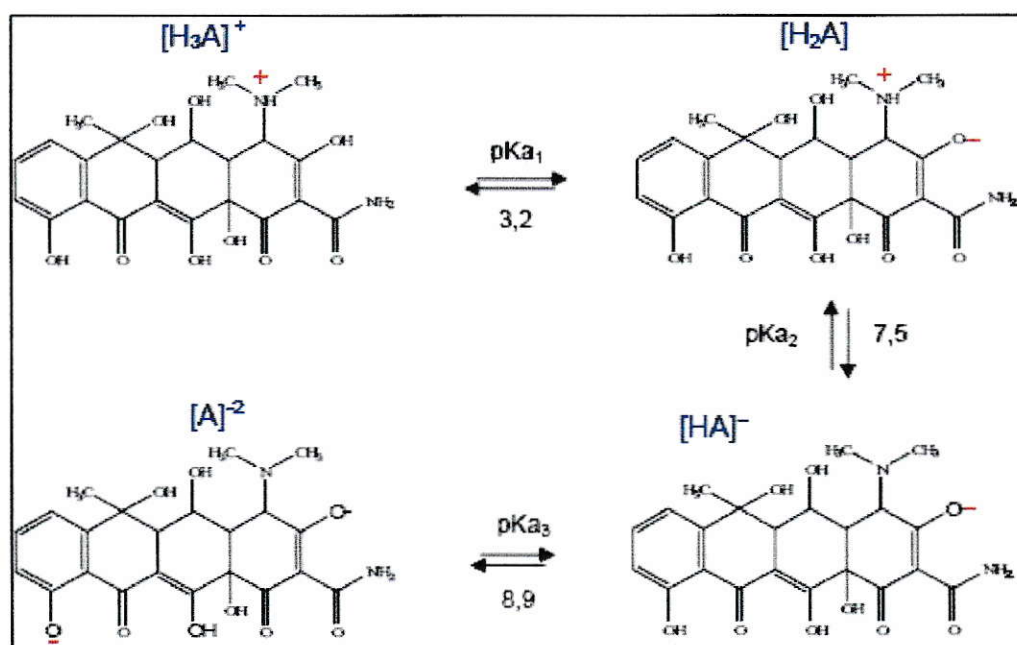


Figura 4: Equilibrio ácido – base del antibiótico oxitetraciclina.

Según el esquema anterior y en base a los pKa, se puede estimar las especies predominantes a distintos rangos de pH. Por ejemplo, entre pH 8,0 y 8,5 predomina la especie aniónica  $[HA]^-$ . En las cercanías del tercer pKa se tiene una mezcla de  $[HA]^- / [A]^{-2}$  y sobre pH 9,5 hay un predominio de  $[A]^{-2}$ . Debido a la carga negativa del oxígeno del C<sub>10</sub> unido al anillo aromático D, esta especie  $[A]^{-2}$  sería muy estable, por lo tanto sería ideal para llevar a cabo determinaciones espectrofotométricas a un pH cercano al

pKa3, ya que esta carga negativa ubicada en este oxígeno, no presenta impedimento estérico para lograr una afinidad con otra molécula cargada positivamente mediante una interacción electrostática, a pesar de los cambios estructurales que sufre OTC, los cuales se ubican lejos de la zona de interés de la molécula. El trabajo con el antibiótico se reduciría un pH fijo de 9, ya que la estabilidad de la droga se ve afectada en medios extremadamente alcalinos.

#### **1.1.4 Métodos de detección.**

Las matrices más comunes en las que se ha encontrado los medicamentos usados en acuicultura son: formulaciones farmacéuticas, tejido animal, plasma, orina, leche y matrices ambientales como agua y suelo. (Orellana S. 2009). Por esto, los métodos de detección son diversos y comprenden los métodos tradicionales instrumentales para detección de antibióticos como es Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con detector UV-Visible, de Fluorescencia (FI), de masa (MS), la Cromatografía gaseosa (GC), la electroforesis capilar (CE) y Capa fina (TLC) en fase inversa, además de métodos microbiológicos cuantitativos (Pearson e Inglis, 1993), a los cuales se le ha acoplado otro tipo de detectores altamente específicos y caros, para lograr bajos límites de detección del analito. Ocupar un método u otro dependerá del tipo de matriz, del nivel requerido para los parámetros analíticos (límite de detección, selectividad, especificidad), de las interferencias analíticas y de los recursos disponibles para realizar una cuantificación aceptable de acuerdo al objetivo específico buscado.

En general, los métodos de determinación de antibióticos en matrices biológicas, utilizan un tratamiento de limpieza previo a la medición instrumental. Éstos consisten en extracciones líquido-líquido (LLE) y/o extracciones en fase sólida (SPE). Es por lo anterior que se han ideado diferentes técnicas para extraer el analito de la matriz, y a su vez para que ésta no interfiera. Se debe tener en cuenta además el solvente en una LLE y en una SPE se pone atención en el tipo de eluyente (generalmente agua, mezcla agua-metanol, metanol, ácido oxálico, etc.). Además, los extractos que se eluyen de las columnas en fase reversa empleadas en una SPE se desengrasan o se llevan a sequedad, el motivo es que la grasa o el eluyente no interfiera en la medición y/o preconcentrar la muestra para lograr mejores parámetros analíticos.

En el caso de las tetraciclinas, la extracción se basa en la purificación por fase sólida de los extractos centrifugados y filtrados; una vez concentrado el extracto en las columnas de carbón activado, las tetraciclinas son eluidas con una solución 0,01 mol /L de ácido oxálico en acetonitrilo/metanol. Luego son nuevamente concentradas en un secador, resuspendidas en solución de ácido oxálico y analizadas por HPLC. (Reveurs y Díaz, 1994)

Para la extracción de OTC desde tejido animal el método más utilizado es aquel que realiza la extracción acuosa con amortiguador McIlvaine/EDTA pH 4,0 y la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Luego se agrega un pretratamiento de limpieza en fase sólida con cartucho C-18, acondicionado previamente con metanol y amortiguador McIlvaine-EDTA pH 4,0 y la posterior



percolación de OTC con ácido oxálico (Sokol y Matisova, 1998). El principio básico de la extracción sobre fase sólida, es transferir al analito desde la fase acuosa a la fase sólida, para ser sorbido en los sitios activos presentes en ésta. El uso de la extracción en fase sólida es una excelente vía para lograr límites de cuantificación a niveles de traza o ultra trazas.

## 1.2 Violeta Cristal y formación de par iónico.

En general, los colorantes se pueden dividir en dos grupos, los colorantes ácidos y los colorantes básicos. Los colorantes ácidos o también llamados colorantes aniónicos presentan en su estructura el grupo sulfónico. Por otro lado, los colorantes básicos o catiónicos, presentan sales de aminas derivadas. Independiente si son aniónicos o catiónicos, los colorantes han sido utilizados efectivamente para determinar iones inorgánicos, contaminantes y también antibióticos, mediante la formación de par iónico. Esta metodología, se utiliza generalmente para extraer sustancias desde distintas matrices, por ejemplo: material biológico acuoso, formulaciones farmacéuticas, aguas residuales, etcétera, mediante métodos espectrofotométricos, aprovechando que los colorantes actúan como cromóforos (contraión). Está demostrado que los colorantes pueden formar par iónico con el analito, siempre y cuando, existan las condiciones químicas, como por ejemplo: concentración del contra ión, pH, fuerza iónica y constante dieléctrica y considerando el posible impedimento estérico entre dos moléculas grandes como son un antibiótico y un colorante. Por otra parte, la extracción del par iónico desde medio acuoso, se realiza en solventes orgánicos, para ello es indispensable incluir una etapa de preconcentración vía extracción líquido-líquido, la cual incrementa la sensibilidad (Torral y col, 1999). La



caracterización de pares iónicos ha sido realizada por técnicas espectroscópicas, tales como NMR, FT-IR, Raman (Chang e Irish, 1974; Rudolph e Imer, 1994; Phaechamud y col, 2000).

El violeta cristal, es un colorante catiónico, perteneciente al grupo trifenilmetano, es utilizado ampliamente en medicina como agente antiséptico, indicado para infecciones bacterianas y como colorante en la industria textil (Oliveira y col. 2002). Es más, debido a su capacidad para inhibir mohos y hongos en el tratamiento de infecciones fúngicas, está considerado actualmente dentro del programa de control de sustancias no autorizadas en carne y piel de pescado, según el programa de control de fármacos de Semapesca.

La molécula neutra tiene un carácter apolar, esto permite que VC sea soluble en solventes orgánicos. Sin embargo y debido a que el sólido violeta cristal contiene un protón muy ácido pKa 1,0, este colorante cuando es disuelto en agua, su estructura molecular se reordena liberando ese protón y se forma una molécula estable con la carga positiva deslocalizada en los tres grupos aminos, como se muestra en la Figura 5 (Orellana S. 2009).

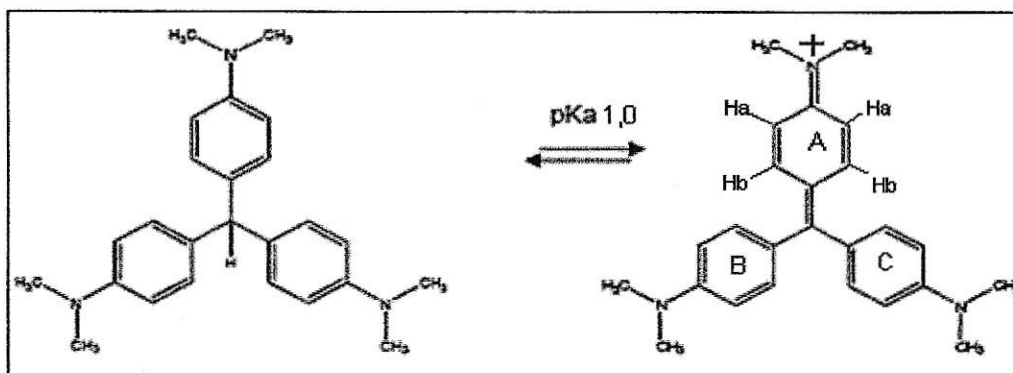


Figura 5: Estructura del colorante violeta cristal. Equilibrio ácido-base.

De acuerdo a mediciones realizadas mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protones basadas en el tiempo de relajación y el criterio de la asignación de las señales de VC, OTC y la mezcla VC-OTC, se demuestra que existe una interacción de tipo electrostática por la parte del anillo aromático-A del VC y el anillo aromático-D de la OTC, en medio amoniacal pH  $9,0 \pm 0,2$ . Además, esta interacción formada en estas condiciones entre el colorante violeta cristal y el antibiótico oxitetraciclina fue corroborada por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional y espectroscopía Infrarroja, tal como se muestra en la Figura 6. (Soto y col. 2010)

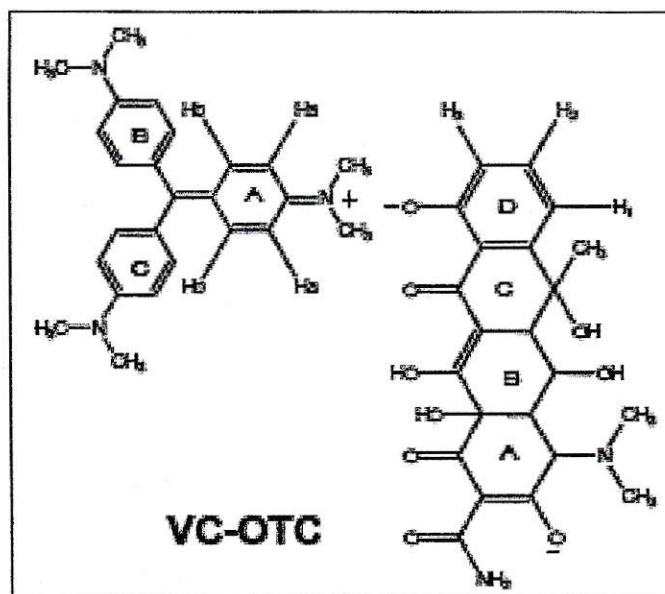


Figura 6: Esquema del par iónico VC-OTC, en  $\text{NH}_3$  0,1 mol/L pH  $9,0 \pm 0,2$ . (Espectros de absorción de las especies, Anexo)

### 1.3 Fundamento de la espectroscopía derivada.

La espectrofotometría derivada es una técnica analítica de gran utilidad para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa en la determinación de

compuestos orgánicos e inorgánicos (Karpinska, 2004). Los espectros se obtienen representando gráficamente la primera derivada o de orden mayor, de la absorbancia con respecto a la longitud de onda, en función de la longitud de onda. A menudo estas representaciones gráficas revelan detalles espectrales que se pierden en un espectro ordinario. Además se pueden realizar las medidas de concentración de un analito o más en presencia de uno o varios interferentes, con facilidad y exactitud.

Para obtener espectros derivados se utilizan una variedad de métodos. Por ejemplo para un espectrofotómetro digital controlado por un microprocesador, la diferenciación se puede llevar a cabo numéricamente utilizando el ajuste polinomial de mínimos cuadrados derivados. (Skoog y col, 2001).

En espectrofotometría derivada se mantienen todas las leyes de la espectrofotometría clásica, por ejemplo, la dependencia del valor derivado con la concentración de analito y la ley de aditividad. La diferenciación consiste en derivar la expresión de Lambert-Beer, con respecto a la longitud de onda ( $\lambda$ ), obteniéndose la ecuación (1):

$$D^n = \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} cb$$

Donde  $D^n$  es el valor de derivada de orden  $n$  a una determinada  $\lambda$  (nm),  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar (L/cm mol),  $c$  la concentración (mol/L) y  $b$  el paso de luz óptica (cm).

Como la ley de las aditividad se mantiene, los espectros derivados de una mezcla son la suma de los espectros derivados de cada componente individual, ecuación (2):

$$D^n_{mezcla} = D^n_1 + D^n_2 + \dots + D^n_X$$

donde el valor de derivada de orden  $n$  de la mezcla a una longitud de onda analítica,  $D^n_1, D^n_2, \dots, D^n_x$  son los valores de derivadas de orden  $n$  a una longitud de onda analítica del componente de la mezcla  $1, 2, \dots, x$ . Gracias a la ley de aditividad, surge la posibilidad de cuantificar la señal analítica mediante el método "zero crossing". Se utiliza el valor absoluto del eje y en unidades de derivadas (UD) del espectro derivado de un compuesto (1), a una longitud de onda donde el compuesto (2) o de una especie que se requiera eliminar la interferencia, presente un valor igual a cero en el eje x. En estas condiciones cuando ambos compuestos estén presentes, a tal longitud de onda toda la señal analítica será atribuida al compuesto (1). En la Figura 7 se muestra gráficamente el método "zero crossing".

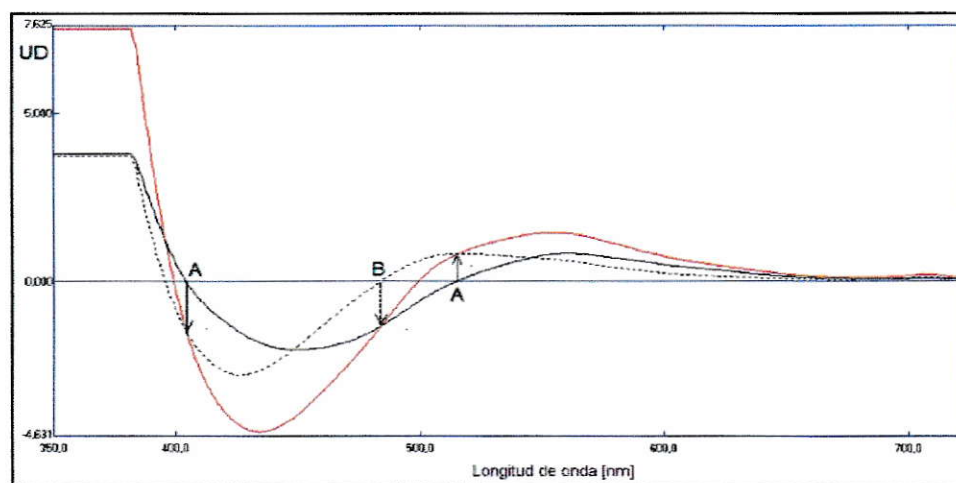


Figura 7: Ejemplo de determinación simultánea mediante el método "zero crossing". El compuesto 1 (banda de línea negra) se determina en la longitud de onda B, pues a esta longitud de onda la banda del compuesto 2 (banda de línea negra punteada) cruza el cero de unidades de derivada, o sea B es un "zero crossing" del compuesto 2. Espectro de absorción derivado.



En la resolución de espectros solapados por espectrofotometría derivada se debe considerar el orden de la derivada, ancho de las bandas adyacentes y la distancia de separación entre picos. La selección del orden de la derivada, depende de la relación señal/ruido, la cual debe ser alta. Para satisfacer esta condición las derivadas de orden inferior se ven privilegiadas frente a las de orden superior, siempre y cuando presenten bajo ruido de fondo. Las derivadas de orden 3 y 4 son más resueltas pero, poseen menor aplicación analítica debido su alto ruido de fondo. Para la resolución óptima de una gráfica de espectro derivado se deben ajustar las siguientes variables espectrales:

- a) Orden de la derivada: A medida que el orden de la derivada aumenta, disminuye la señal, pero la resolución y el ruido aumentan.
- b) Factor de suavizado: Corresponde al número de puntos utilizados para la diferenciación. Si su valor aumenta disminuyen la señal analítica, así como el ruido de fondo. Su selección debe comprometer ausencia de efectos de distorsión (deformación de la banda).
- c) Factor de escala: Amplifica la señal entre 1 a  $10^{11}$  veces, aumenta la señal analítica y el ruido de fondo en la misma proporción. Este factor no aumenta la sensibilidad.
- d) Longitud de onda analítica ( $\lambda$ ): Corresponde a la longitud de onda donde se hará la determinación de un analito en presencia de otro. La selección de las longitudes de onda analítica, depende fundamentalmente de la conducta espectral de los analitos individuales y de los interferentes. Su selección se lleva a cabo utilizando como criterios, la minimización del ruido de fondo, la proporcionalidad entre las concentraciones y los valores de la ordenada en unidades de derivadas (UD).

#### **1.4 Validación del método analítico.**

Dentro de los principios de las prácticas analíticas, se encuentra el que hace referencia a las mediciones, éstas se deberían realizar usando métodos y equipamiento que han sido probados para asegurar que se ajustan al propósito de la medición. En este contexto de prueba, se enmarca la validación de un método analítico, definido como la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (ISO/IEC 17025: 1999). En otras palabras, es un proceso que establece las características de funcionamiento y limitaciones del método y la identificación de influencias que pueden cambiar estas características y hasta que punto, cuando el método se desarrolla sin un problema particular previsto. Los requisitos para una aplicación específica son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico, por lo tanto, para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende, es preciso determinar mediante estudios de laboratorio y tratamiento estadístico de datos sus características de funcionamiento (parámetros), que pueden incluir: exactitud (sesgo), precisión (repetibilidad, reproducibilidad), selectividad/especificidad, intervalo de trabajo/rango, linealidad/función respuesta, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre, además los parámetros a determinar difieren según el alcance del método de ensayo a validar.

Luego de haber diseñado y optimizado una nueva técnica para un método analítico, y con el fin de incorporarlo a la rutina del laboratorio, el siguiente paso es validarlo, siempre que el laboratorio revise un método ya establecido para mejorarlo o

extenderlo a un nuevo problema, cuando el control de calidad indique que el método en uso ya no es efectivo o no está vigente, cuando use un método ya establecido en otro laboratorio, con diferente analista, distinto instrumental, o simplemente para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo al presentarse: un método nuevo y más barato o una norma reciente.

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables. Validar un método, implica conocer su comportamiento y su incertidumbre, de modo que el usuario esté seguro del grado de confianza que puede tener el resultado.

La posibilidad de preconcentrar el antibiótico por formación de par iónico, permitió la obtención del límite de cuantificación (concentración más pequeña que se puede realizar en medidas cuantitativas) en muestras de salmón Atlántico de 71  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Este último valor se encuentra bajo el límite máximo permitido de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para el antibiótico oxitetraciclina en músculo de pescado, establecidos por Semapesca, Chile. (Orellana S., 2009). El estudio de esta tesis se centrará en realizar observaciones, ensayos, conclusiones y propuestas, todo en términos preliminares para una posterior validación, comprobando si los métodos desarrollados son simples y fáciles de implementar instrumentalmente, más aún, con todos los antecedentes expuestos se pretende ampliar el método para salmones de distintas procedencias,

llevando acabo una validación con un número elevado de muestras reales, para corroborar la especificidad del método (Cinquina y col, 2003), la cual se define como la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz. (Normativa 657/CE. 2002). La técnica de medición usada en la presente tesis es la espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible, apoyado por espectros clásicos y derivados.



**1.5 HIPOTEISIS:** Se podría validar un nuevo método analítico desarrollado y optimizado para la determinación de oxitetraciclina en músculo de salmón mediante la formación de par iónico entre el antibiótico y el colorante violeta cristal, aplicándolo a un alto número de muestras y matrices de diferentes orígenes para ser un método estándar en control de calidad.

## 1.6 OBJETIVOS

**Objetivo general:** Validar el método de determinación de oxitetraciclina mediante formación de par iónico en salmónes de distintas procedencias, propuesto en “Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de antibióticos utilizados en la acuicultura chilena”, (Orellana S. 2009).

### **Objetivos Específicos:**

- Estudiar y conocer los fundamentos teóricos del método de determinación de oxitetraciclina mediante formación de par iónico.
- Comprobar experimentalmente los procedimientos de formación del par iónico violeta cristal-oxitetraciclina.
- Implementar la extracción de OTC desde músculo y piel de salmón (fortificación, extracción con amortiguador, filtración, purificación de la muestra, formación del par iónico y extracción líquido-líquido).
- Reproducir espectros derivados de blancos, para validar que los “zero crossing” son independiente de la procedencia del salmón.
- Verificar la formación del par iónico VC-OTC en músculo y piel de salmón, mediante la reproducción de señales analíticas correspondiente al par iónico en espectros derivados.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos.

- Oxitetraciclina clorhidrato Sigma - Aldrich p.a.
- Violeta cristal clorhidrato Merck p.a.
- Amoníaco 25% Merck p.a.
- Agua destilada.
- Metanol Merck p.a.
- Cloroformo Merck p.a.
- Ácido tricloroacético Merck p.a.
- Fosfato disódico anhidro Merck p.a.
- Ácido etilendiamina tetraacetato disódico Merck p.a.
- Ácido cítrico monohidratado Merck p.a.
- Ácido oxálico Merck p.a.
- Solución *ácido oxálico*  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L.
- Solución de *ácido tricloroacético* 20% (v/v).
- Solución amortiguador *Mc Ilvaine*.
- Solución amortiguador *Mc Ilvaine/EDTA*.
- Solución estándar de *clorhidrato de oxitetraciclina*  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L.
- Soluciones *patrones de OTC*
  - (a) *Solución patrón* 1,0 mg/mL.
  - (b) *Solución diluida* 80,0 µg/mL.
  - (c) *Soluciones de trabajo*.
- Solución estándar de *violeta cristal*  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L.

## 2.2 Materiales.

- Material de vidrio (vasos, pipetas parcial y total, matraces, embudos de decantación)
- Celdas de cuarzo 1 cm de paso óptico.
- Micro pipetas Labopette® [10 - 100 µl, 100 - 1000 µl]
- Puntas Labopette® [10 - 100 µl, 100 - 1000 µl]
- Magnetos.
- Cartuchos sep-Pack C-18.
- Tubos de centrifuga FALCON 50 mL.
- Papel filtro 70 µm de poro.

## 2.3 Aparatos e instrumentos.

- Agitadores magnéticos, HANNA HI 190M
- pH-metro, HANNA *Checker*
- Balanza analítica Sartorius GMBH, Gottinnhen tipo R-200D
- Centrifuga
- Bomba peristáltica
- Espectrofotómetro UV-Vis, SHIMADZU 1603, con lámpara de D2 y W, conectado en línea a un computador marca Hewlett Packard, que dispone de un software diseñado para la derivación de los espectros.

## 2.4 Procedimientos experimentales.

### 2.4.1 Preparación de soluciones

- Solución de *ácido oxálico*  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L. Se preparó disolviendo 1,260 g de ácido oxálico dihidratado y se enrasó en un matraz de 1000 mL con metanol.
- Solución de *ácido tricloroacético* 20% (v/v): Se preparó tomando una alícuota de 50 mL de ácido tricloroacético 3,0 mol/L y se enrasó en un matraz de 100 mL con agua destilada.
- Solución *amortiguador Mc Ilvaine*. Se preparó disolviendo 28,40 g de fosfato disódico anhidro en agua destilada y se enrasó hasta 1000 mL. Por otro lado, se disolvió 21,00 g de ácido cítrico monohidratado en agua y se enrasó hasta 1000 mL. Ambas soluciones se mezclaron en la siguiente proporción: 625 mL de fosfato disódico con 1000 mL de la solución de ácido cítrico y se comprobó que el pH fuese  $4,0 \pm 0,1$ .
- Solución *amortiguador Mc Ilvaine/EDTA* (1.625 mL de Solución amortiguador *Mc Ilvaine* homogenizados con 3,720 g de ácido etilendiamina tetraacetato disódico (EDTA).
- Solución de amoníaco 0,1 mol/L: Se preparó tomando 0,375 mL de amoníaco concentrado 25% y aforando a 50 mL con agua destilada.
- Solución estándar de *clorhidrato de oxitetraciclina*  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Se preparó disolviendo 0,025 g del reactivo en metanol p.a. y se enrasó en un matraz de aforo 50 mL.
- Preparación soluciones patrones de OTC. (Fortificado muestra salmón).  
**(a)** *Solución patrón* 1,0 mg/mL. Se preparó disolviendo 25 mg de OTC estándar en metanol y se enrasó en un matraz aforo de 25 mL. La solución resultante se guardó en el refrigerador entre 0° y 5° C. **(b)** *Solución diluida* 80,0 µg/mL. Se preparó tomando



una alícuota de 2 mL de la solución patrón madre y se enrasó en un matraz de aforo de 25 mL con metanol. **(c) Soluciones de trabajo.** Se prepararon midiendo alícuotas entre 75 y 450  $\mu\text{L}$  de la solución patrón diluida (b) y se enrasan con metanol en matraces de aforo de 10 mL. Las soluciones resultantes corresponden a concentraciones entre 0,6 y 3,6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

- Solución estándar de *violeta cristal*  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L. Se preparó disolviendo 0,020 g del reactivo en metanol p.a y se enrasó en un matraz de aforo 50 mL.

#### **2.4.2 Protocolos Generales.**

Son 2 los protocolos generales:

**Procedimiento general para la determinación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido.**

En diferentes matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron alícuotas de antibiótico individual entre 20 y 100  $\mu\text{L}$  de la solución estándar  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, para obtener rangos de concentración final entre  $4,0 \times 10^{-7}$  mol/L y  $20,0 \times 10^{-7}$  mol/L. Además, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de VC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, y 100  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_3$  0,1 mol/L, pH  $9,0 \pm 0,2$  a modo de obtener una concentración final de  $8,0 \times 10^{-6}$  mol/L y  $2,0 \times 10^{-4}$  mol/L respectivamente. Luego, se completó con agua destilada a un volumen final de 50 mL. Esta solución se homogenizó por un minuto en un agitador y posteriormente se agregaron 6 mL de extractante cloroformo y se agitaron por 4 minutos para la formación del par iónico. Posteriormente, cada solución acuosa y orgánica se transfirió a un embudo de decantación de 100 mL y se dejó en reposo

hasta la separación de las fases. Finalmente, una fracción del extracto orgánico, se llevó a medición en la zona UV- Visible, contra aire. (Orellana S. 2009)

### **Procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón.**

#### -Preparación de la muestra desde músculo de salmón.

Se realizaron curvas de calibración en muestras de salmón de distintas procedencias enriquecidas con OTC. Paralelamente con las muestras individuales de salmón, se preparó un blanco de reactivos, en tubos de centrifuga y se realizó el proceso de extracción de la siguiente forma: Se pesaron  $5,0 \pm 0,1$  gramos de salmón: a la muestra blanco de reactivos se agregaron 0,5 mL de agua destilada, a las muestras enriquecidas se agregaron 0,5 mL de la solución de trabajo (c) y se esperó 20 minutos antes de agitar. Se agregaron 20 mL de amortiguador Mc Ilvaine/EDTA y se homogenizó por 20 minutos. Posteriormente se agregaron 2 mL de ácido tricloroacético 20% y se agitó. Finalmente se centrifugó a 4.000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se filtró con un papel filtro de 70  $\mu\text{m}$  de poro. Por último se repitió la extracción con otros 20 mL de amortiguador Mc Ilvaine/EDTA, se centrifugó y ambos extractos son homogenizados para luego ser purificados. (Orellana S, 2009)

#### -Purificación.

(a) Se acondicionaron cartuchos sep-Pak C-18 pasando 6 mL de metanol y 4 mL de agua destilada, a través de una bomba peristáltica con manguera Cole- Parmer N° 13 ó 14, a una velocidad no superior a 4 mL/min, luego la muestra se aspiró y se lavó con 4 mL de agua destilada. Finalmente OTC se percoló del cartucho con 4 mL de ácido oxálico metanólico  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L.

(b) Luego, este extracto purificado de OTC se sometió al protocolo de formación del par iónico VC-OTC ajustando el pH de la extracción líquido-líquido a  $\text{pH } 9,0 \pm 0,2$  con amoníaco. (Orellana S., 2009).

#### **2.4.3 Comprobación de la formación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido.**

Se realizaron ensayos preliminares basados en el Procedimiento General para la determinación del par iónico vía pre-concentración líquido-líquido (sección 2.4.2), para llevar a cabo la formación del par iónico entre oxitetraciclina y violeta cristal. Estos ensayos preliminares tuvieron por objetivo comprobar la formación del par iónico. En estos experimentos se varió el orden de agregado de los reactivos.

En base al mismo procedimiento general de determinación de formación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido, se realizaron los siguientes ensayos en cuanto al orden de adición de los reactivos al matraz Erlenmeyer de 250 mL:

##### Ensayo 1.

Alícuotas de OTC: 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$  (OTC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), Violeta cristal (400  $\mu\text{L}$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L),  $\text{NH}_3$  (100  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L) para obtener un pH final 9,0, se llevó a un volumen final de 50 mL con agua destilada. Se incluyó un blanco de reactivos (sin OTC).

##### Ensayo 2.

Agua destilada (20 mL), alícuotas de OTC: 40, 80, 120, 160  $\mu\text{L}$  (OTC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), Violeta cristal (400  $\mu\text{L}$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L),  $\text{NH}_3$  (90  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L) para obtener un pH final 8,8, se completó con agua destilada a un volumen final de 50 mL. Se incluye un blanco de reactivos (sin OTC).

### Ensayo 3.

Agua destilada (49,4 mL),  $\text{NH}_3$  (100  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L) para obtener un pH final 9,0, violeta cristal (400  $\mu\text{L}$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), alícuotas de OTC: 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$  (OTC  $1 \times 10^{-3}$  mol/L). Se incluye un blanco de reactivos (sin OTC).

Una vez en el matraz Erlenmeyer, a los 3 ensayos se le aplicó la pre-concentración vía extracción líquido-líquido con 6 mL cloroformo. Así, se adicionó el cloroformo al mismo matraz Erlenmeyer y se agitó por 4 minutos, se traspasó toda la solución del matraz a un embudo de decantación y una vez separada la fase acuosa de la orgánica, esta última se llevó a medición espectrofotométrica medida contra aire, en cubetas de cuarzo. Se obtuvieron espectros clásicos respectivos.

#### **2.4.4 Implementación del procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón.**

El proceso general de extracción está dividido en dos partes según el protocolo general (sección 2.4.2. pag. 29): preparación de la muestra de músculo de salmón y purificación. Para llevar a cabo la implementación del procedimiento de extracción se desglosó en cinco partes o procesos fundamentales, así se tiene una visión más acabada del proceso y permite identificar posibles fuentes de incertidumbre del método. El propósito es llevar a la práctica en el laboratorio el protocolo general de extracción de OTC y así identificar y determinar posibles puntos críticos, para llevar a cabo una aplicación efectiva del método.



#### **2.4.5 Aplicación del método en músculo y piel de salmón. Reproducción de espectros derivados de muestras blancos.**

Luego de haber implementado el procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón (sección 2.4.2), se llevará a cabo la reproducción de espectros derivados de muestras blancos. Diez muestras blanco de músculo de salmón (*Salmo salar*, Pto. Montt) entregado por un laboratorio externo en ausencia del antibiótico OTC, se le aplicó el método completo: procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón según protocolo y, determinación de OTC mediante formación vía preconcentración líquido-líquido de par iónico con el colorante violeta cristal según orden propuesto. Uno de los objetivos más importantes es reproducir con exactitud un valor constante del "zero crossing" del blanco, lo que permitirá validar preliminarmente el método. Esta longitud de onda debe ser independiente de la procedencia del salmón.

#### **2.4.6 Optimización para la reproducción de espectros derivados en muestras blancos.**

Debido a que los ensayos preliminares del punto anterior, reproducción de espectros derivados de muestras blancos, arrojaron una longitud de onda medianamente variable de "zero crossing" del blanco, se realizó un estudio de variables, con el objeto de encontrar las condiciones óptimas para mejorar los valores de "zero crossing". Este estudio se realizó aplicando el método completo a muestras blanco, o sea, extracción desde músculo de salmón y luego la aplicación de la formación de par iónico. Este estudio de variables se realizó con el diseño experimental

factorial utilizando el programa computacional STATGRAPHICS Plus 5. Las variables optimizadas fueron: volumen VC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, con valores extremos de: 200 y 500  $\mu$ l (concentraciones finales:  $4,0 \times 10^{-6}$  y  $1,0 \times 10^{-5}$  mol/L respectivamente), volumen  $\text{NH}_3$  0,1 mol/L con valores extremos de: 600 y 1800  $\mu$ l (concentración finales:  $1,2 \times 10^{-3}$  y  $3,6 \times 10^{-3}$  mol/L). El volumen de la fase acuosa se mantuvo constante en 50 mL. El diseño consistió en el modelo factorial  $2^n$ , siendo "n" el número de variables ( $n=2$ ), con 2 réplicas, resultando un total de 8 experimentos.

#### **2.4.7 Verificación de la formación de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de señales analíticas del par iónico.**

Una vez ya optimizada la reproducción de espectros derivados de blanco, con sus respectivos valores de las variables amoníaco y violeta cristal, se procede a aplicar el procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón (sección 2.4.2), el cual implica fortificación con droga del músculo de salmón, extracción, centrifugación, filtración, purificación de la muestra y posteriormente llevar la muestra percolada con ácido oxálico a el Procedimiento General para la determinación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido, según el orden propuesto en la presente tesis. Para verificar la formación del par iónico se registraron 5 señales analíticas de par iónico VC-OTC y 2 señales analíticas de muestras blanco, todas las anteriores en músculo de salmón. Las 5 muestras de salmón fueron fortificadas con 0,5 mL de las soluciones de trabajo OTC (2 muestras a concentración 3  $\mu$ g/mL y 3 muestras a 3,6  $\mu$ g/mL). Volumen de amoníaco 0,1 mol/L: 1200  $\mu$ L y volumen de violeta cristal  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L: 350  $\mu$ L.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Comprobación de la formación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido.

En las Figuras 8, 10 y 12 se aprecian los espectros clásicos de la fase orgánica medida, de los Ensayos 1, 2 y 3, respectivamente.

Ensayo 1: Alícuotas solución estándar de OTC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L: 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$ , violeta cristal,  $\text{NH}_3$  (100  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L), pH final 9,0, se llevó a un volumen final de 50 mL con agua destilada. Se incluyó un blanco de reactivos (sin OTC).

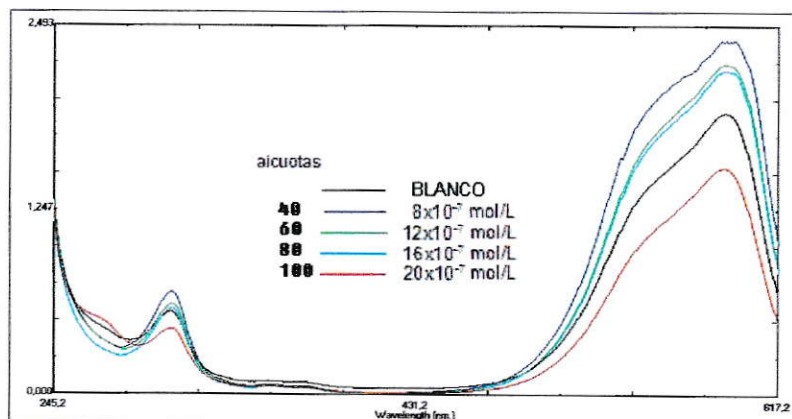


Figura 8: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC

Ensayo 1. Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $12 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  mol/L.

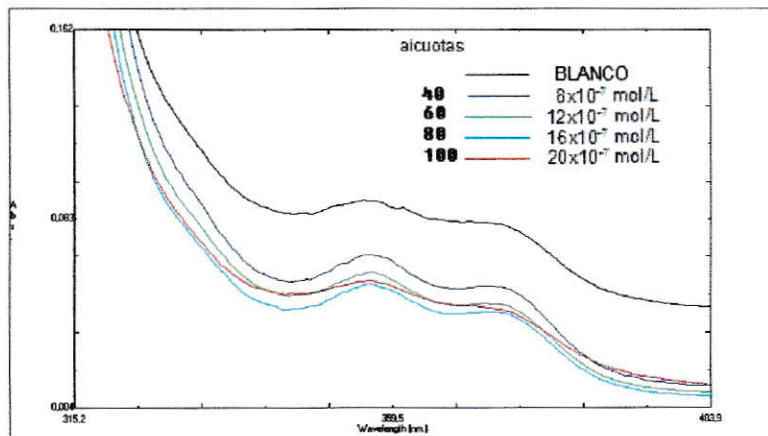


Figura 9: Zoom de espectro de absorción clásico Señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 1. Zona 315–400 nm Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $12 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  mol/L.

En la Figura 9, se aprecia que las señales del par iónico pasa por debajo de la señal del blanco, no así en las Figuras 11 y 13, todas las figuras anteriores corresponden a el zoom de la zona atribuible al par iónico

Ensayo 2: Agua destilada (20 mL), alícuotas solución estándar de OTC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L: 40, 80, 120, 160  $\mu$ L. violeta cristal (400  $\mu$ L  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L),  $\text{NH}_3$  (90  $\mu$ L 0,1 mol/L), pH final 8,8, se completó con agua destilada a un volumen final de 50 mL. Se incluyó un blanco de reactivos (sin OTC).



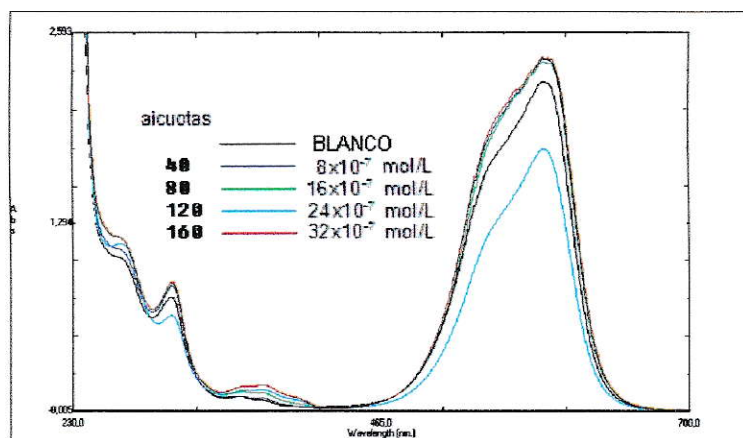


Figura 10: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC  
 Ensayo 2. Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $24 \times 10^{-7}$ ,  $32 \times 10^{-7}$  mol/L.

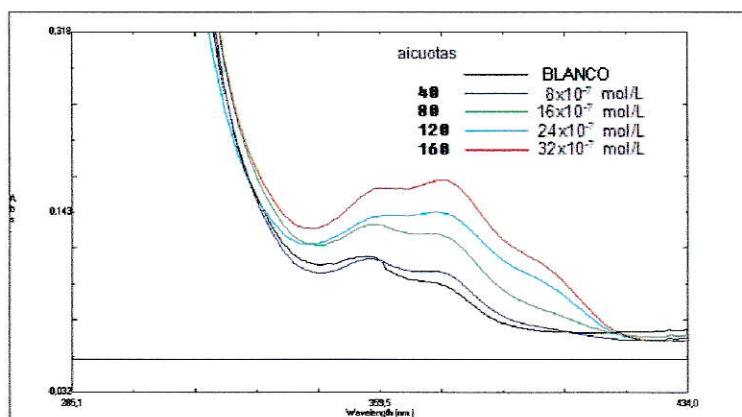


Figura 11: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 2. Zona 290-430 nm. Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $24 \times 10^{-7}$ ,  $32 \times 10^{-7}$  mol/L.

Ensayo 3: Agua destilada (49,4 mL),  $\text{NH}_3$  (100  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L) pH final 9, violeta cristal (400  $\mu\text{L}$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), alícuotas solución estándar de OTC  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L: 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{L}$ . Se incluyó un blanco de reactivos (sin OTC).

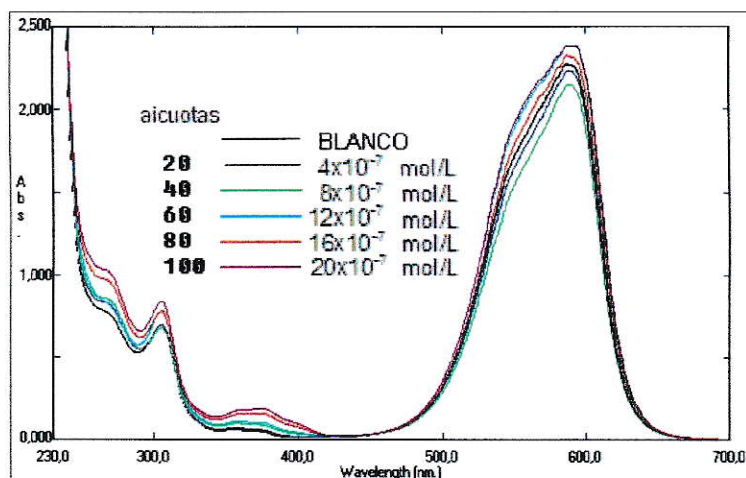


Figura 12: Espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 3. Concentraciones de OTC:  $4 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $12 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  mol/L.

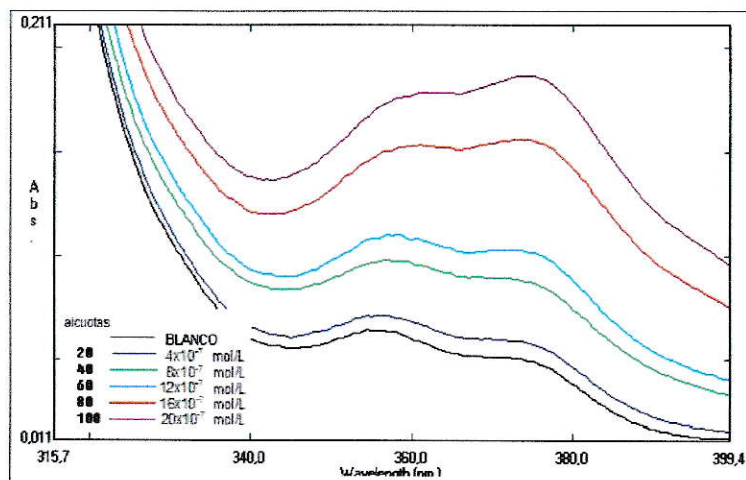


Figura 13: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas del par iónico VC-OTC Ensayo 3. Zona 315-400 nm. Concentraciones de OTC:  $4 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $12 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  mol/L. Existe una buena linealidad correlación de datos.

Una vez obtenidos los espectros clásicos de los tres ensayos, se registraron los espectros derivados de 2º orden, con factor de escala y suavizado de 10.000, tal como

se aprecia en las Figuras 14, 15 y 16, correspondientes a los Ensayos 1, 2 y 3, respectivamente. Los datos de unidades de derivadas (UD) y concentración de OTC se obtienen a partir de estos últimos espectros derivados, en los cuales el “zero crossing” del blanco entrega la longitud de onda de referencia a la cual se miden las UD con las concentraciones respectivas, de esta forma se asegura que la señal es debida únicamente al par iónico. Con estos datos se realizan las curvas de calibración.

### Ensayo 1:

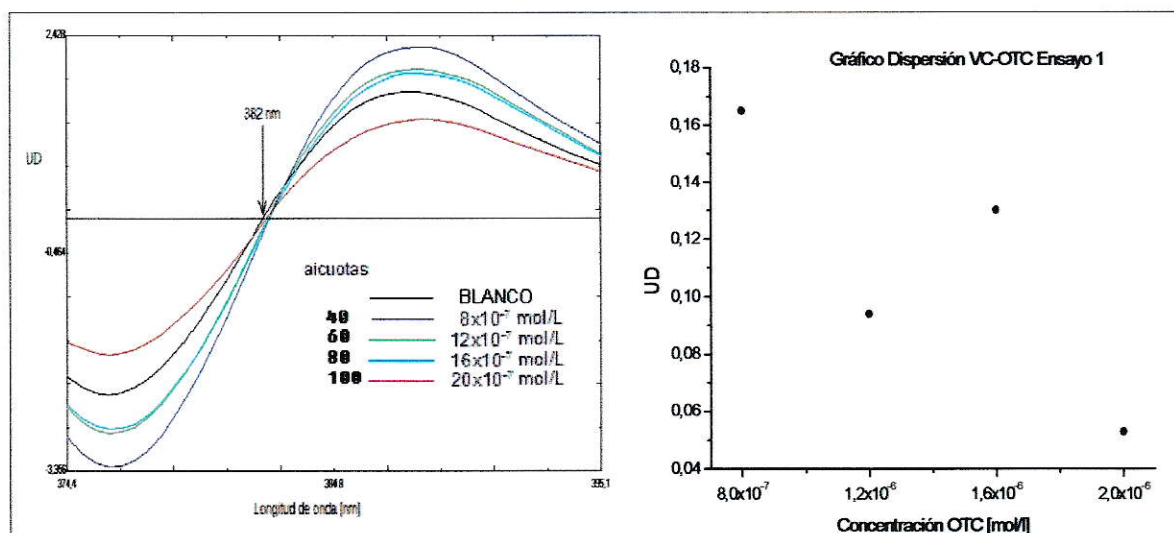


Figura 14: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden y grafico de dispersión del Ensayo 1. Zona 370-390 nm. Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $24 \times 10^{-7}$ ,  $32 \times 10^{-7}$  mol/L. A medida que aumenta el volumen de la alícuota, no aumenta las unidades de derivadas, en otras palabras no hay una correlación positiva entre la concentración de OTC y la absorbancia, de esta manera no es posible realizar una curva de calibración.

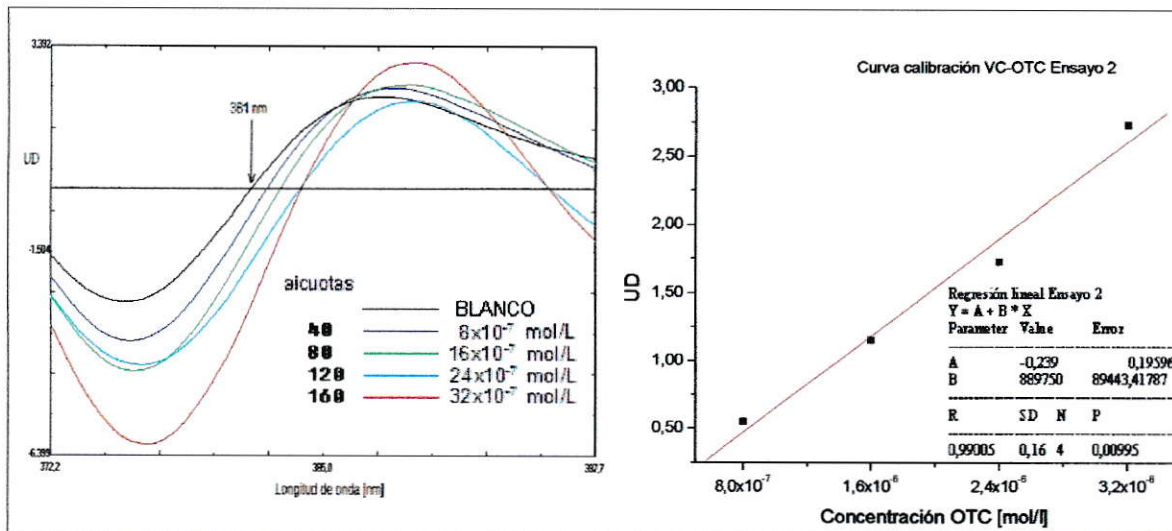
**Ensayo 2:**

Figura 15: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas del par iónico VC-OTC y Curva de calibración del Ensayo 2. Zona 370–390 nm. Concentraciones de OTC:  $8 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $24 \times 10^{-7}$ ,  $32 \times 10^{-7}$  mol/L. El gráfico muestra una buena correlación entre concentración y unidades de derivadas. (Nótese el R de la regresión lineal y del cruce de señales analíticas en el espectro de las alícuotas 80 y 120  $\mu$ L.)



### Ensayo 3:

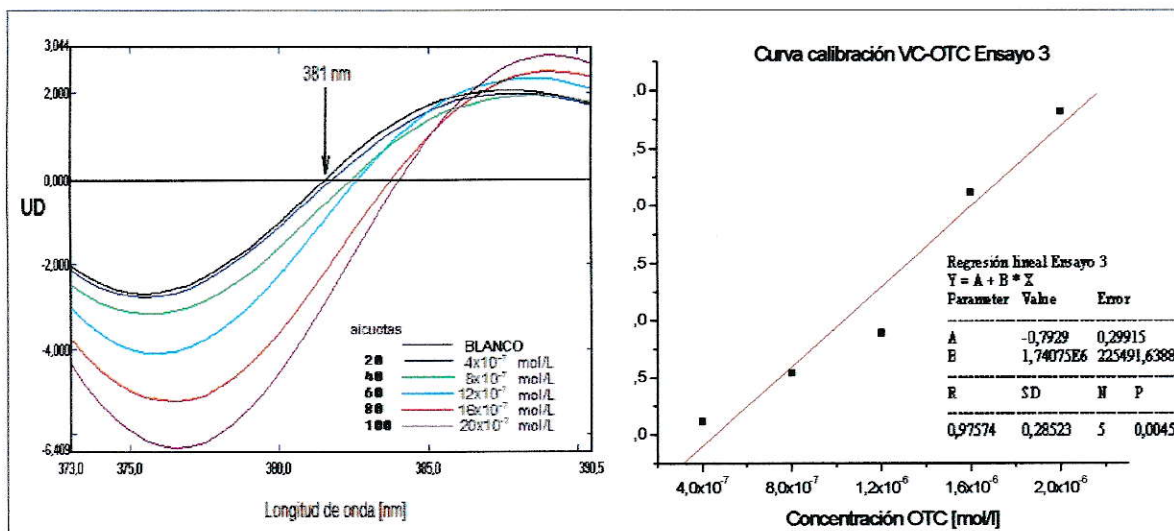


Figura 16: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de señales analíticas del par iónico VC-OTC y curva de calibración del Ensayo 3. Zona 370 - 390 nm. Concentraciones de OTC:  $4 \times 10^{-7}$ ,  $8 \times 10^{-7}$ ,  $12 \times 10^{-7}$ ,  $16 \times 10^{-7}$ ,  $20 \times 10^{-7}$  mol/L. zero crossing del blanco 381 nm.

A continuación, en la Tabla 3, se resume el orden de agregado de los reactivos al matraz Erlenmeyer de 250 mL, para los tres ensayos. Estos son representativos (10 veces como mínimo para cada ensayo):

Tabla 3: Orden de los reactivos. El Ensayo 1 representa el procedimiento general para la determinación de par iónico vía pre-concentración líquido-líquido según protocolo. Los otros ensayos son en función a obtener los mejores resultados analíticos considerando que existe una dependencia de estos últimos respecto del orden de adición de reactivos

<i>reactivos</i>	<i>Ensayo 1</i>	<i>Ensayo 2</i>	<i>Ensayo 3</i>
OTC	1º	2º	4º
VC	2º	3º	3º
amoníaco	3º	4º	2º
Agua	4º	1º - 5º	1º

Según la Tabla 3 y a modo de resumen, en el Ensayo 1 OTC se adicionó en 1º lugar, a diferencia del Ensayo 2 y Ensayo 3. Por otro lado, en estos dos últimos ensayos se agregó agua en 1º lugar a diferencia del Ensayo 1. Estas observaciones son importantes ya que se relacionan con las condiciones iniciales favorables para la formación del par iónico, pues OTC no posee el entorno químico favorable para la formación del par iónico en el Ensayo 1, como el volumen de mezcla para la homogenización y el pH adecuado. Los Ensayos 2 y 3 poseen como primer reactivo agregado el agua, lo que da un volumen para que los reactivos se mezclen efectivamente y se pueda dar una posible interacción entre OTC y VC mediante par iónico.

Según la Tabla 3 y analizando por separado los ensayos, en el Ensayo 1 (pH 9,0), OTC al ser el 1º reactivo en el matraz, queda expuesto directamente al VC y NH<sub>3</sub>, los cuales son agregados posteriormente. Este contacto directo entre la droga y el amoníaco sería muy agresivo en ausencia de agua (último reactivo en este ensayo),

considerando que los volúmenes de droga y amoníaco son del mismo orden ( $\mu\text{L}$ ). Según literatura, OTC es inestable a medios extremadamente ácidos o alcalinos. Todo lo anterior explicaría la incoherencia de las señales analíticas del antibiótico respecto al blanco observadas en el espectro clásico y por lo tanto, en el derivado, en la zona de los 360 nm, las cuales no están de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

Debido a lo anterior, se originó el Ensayo 2 (pH 8,8). Las alícuotas agregadas en este ensayo incrementan en 40  $\mu\text{L}$  en contraste al Ensayo 1 en el cual aumentan en 20  $\mu\text{L}$ , esto para notar diferencias en las señales en el espectro clásico y lograr una buena curva de calibración. Además se redujo la cantidad de amoníaco y se agregó primero 20 mL de agua para dar un volumen de mezcla. Se agregaron luego el mismo orden de reactivos, para finalmente aforar con agua. (Tabla 3, Ensayo 2,  $\text{H}_2\text{O}$  1° y 5°). Todo esto produjo espectros clásicos y derivados de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, en la zona de los 380 nm y la longitud de onda del "zero crossing" del blanco en el espectro derivado se logró tomar como referencia, lo cual permitió realizar una curva de calibración con un buen coeficiente de correlación ( $R = 0,990$ ) en su regresión lineal. La regresión lineal posee solo cuatro niveles de concentración.

Gracias a los resultados anteriores, se llevó a cabo el Ensayo 3, (pH 9,0), en el cual hay buena reproducibilidad del primer nivel de concentración, el cual es  $2 \times 10^{-7}$  mol/L y es menor que en los ensayos anteriores ( $4 \times 10^{-7}$  mol/L). El incremento en las alícuotas es de 20  $\mu\text{L}$ , menor al incremento del Ensayo 2, en el cual aumentan en 40  $\mu\text{L}$ . Estas alícuotas de OTC se agregaron como último reactivo, deduciendo que el antibiótico necesita el volumen adecuado para homogenizarse con los demás reactivos



y obtener un correcto pH. Según el espectro clásico, se interpreta que hay una efectiva formación del par iónico, debido a que no hay cruce ni contacto de señales analíticas en la zona de los 360 nm (zona de incremento de la señal, atribuible a la interacción y reordenamiento electrónico molecular entre OTC y VC al lograr la interacción). Por otro lado, el espectro derivado da una muy buena correlación positiva entre concentración y UD, lo cual está de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, produciendo una curva de calibración con  $R=0,975$ , menor al del ensayo anterior, pero con cinco y no cuatro niveles de concentración de OTC y en un menor rango. Otro aspecto importante a considerar es que en este tercer ensayo la curva de calibración posee mayor pendiente respecto al segundo ensayo (Ensayo 3:  $1,74 \times 10^6$ , Ensayo 2:  $0,88 \times 10^6$ ), en otras palabras, es más sensible la respuesta a un cambio pequeño en la concentración. Por todo lo anterior, se propone que esta forma de realizar el procedimiento de determinación de par iónico vía preconcentración líquido-líquido es la más acertada, debido a la dependencia de los resultados con el orden de adición de los reactivos.

### **3.2 Implementación del procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón.**

Para entender el fundamento teórico y práctico de este método, y además validarlo preliminarmente, el proceso completo es dividido en cinco partes fundamentales: fortificación con droga del músculo de salmón, extracción, centrifugación, filtración, purificación de la muestra. Este desglose del procedimiento general de extracción (Figura 17) dará una mejor perspectiva y consideración de la importancia de las etapas, adquiriendo adiestramiento para su ejecución.



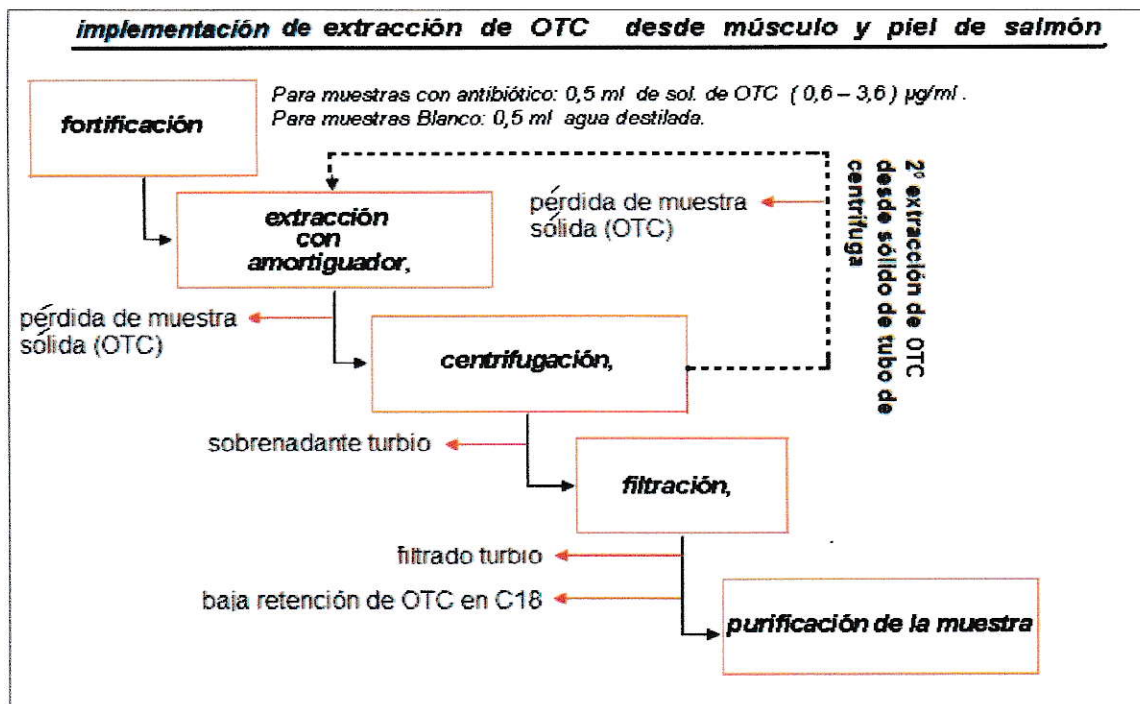


Figura 17: Implementación de la extracción de OTC desde músculo y piel de salmón. Las flechas rojas representan los resultados de los pasos intermedios, estos resultados implicarían fuentes de incertidumbre y podrían alterar la reproducibilidad de los resultados dependiendo de la forma de proceder en la etapa intermedia.

Básicamente, las etapas de la implementación, en sí, no presentaron mayores inconvenientes, más bien para los pasos intermedios o conectores, se debió prestar más atención y cuidar su realización. Estos se presentan en la Tabla 4, la cual muestra la posición entre las etapas fundamentales.

Tabla 4: Pasos Intermedios. Luego de la 2º Extracción con amortiguador procede el traspaso de todo el material al tubo de centrifuga, al igual que en la primera extracción, esto para separar la fase sólida y líquida.

ETAPA	PASO INTERMEDIO	ETAPA SIGUIENTE
EXTRACCIÓN CON AMORTIGUADOR	<i>Traspaso de material fortificado a tubo de centrifuga</i>	CENTRIFUGACIÓN
CENTRIFUGACIÓN	<i>Traspaso de sobrenadante a equipo de filtración</i>	FILTRACIÓN
	<i>Traspaso de material sólido desde el tubo de centrifuga</i>	2º EXTRACCIÓN CON AMORTIGUADOR
FILTRACIÓN	<i>Ajuste de la velocidad de flujo</i>	PURIFICACIÓN
	<i>Ajuste de la posición del Cartucho C18</i>	

En el primer paso intermedio de la Tabla 4, se debe velar por el traspaso total del material sólido y líquido, desde el vaso de la etapa extracción con amortiguador al tubo de centrifuga, sin dejar residuos de músculo en éste, de lo contrario habría una pérdida de antibiótico extraído. Una agitación fuerte con amortiguador es necesaria para homogenizar bien el músculo y extraer OTC (la desventaja es que el material sube por las paredes interiores del vaso debido al vórtice que se genera por la agitación, lo cual provoca pequeñas pérdidas de músculo no homogenizado). En el segundo paso intermedio, la atención se fija en la separación entre la parte sólida y la líquida. Cualquier mínima perturbación brusca de movimiento al momento de sacar o traspasar el sobrenadante del tubo de la centrifuga provoca una resuspensión de partículas (provenientes de la precipitación de proteínas y otros con ácido tricloroacético) que ya estaban depositadas en la superficie del músculo centrifugado. El sobrenadante turbio y en consecuencia el filtrado, de esta forma, podría afectar la medición espectrofotométrica de la muestra. Esto se podría eliminar con la filtración, siempre y cuando el equipo de filtrado sea el adecuado para una separación lenta y

eficaz. De la misma centrifugación se debe aislar para una segunda extracción el sólido que queda en el fondo del tubo. Acá, también debe ser traspasado totalmente el músculo, de lo contrario quedaría una minúscula parte del sólido sin una segunda extracción de antibiótico.

Desde la etapa filtración a la etapa purificación, se debe cuidar la velocidad del flujo en la bomba peristáltica: de la muestra y del eluyente, en este caso, ácido oxálico. Si la muestra pasa muy rápido por el cartucho de separación C18, se puede perder OTC por una baja retención, esto debido a que no es suficiente el tiempo para que el analito se adsorba en la cadena alifática de la columna, o sea para que ocurra la extracción líquido-sólido efectiva. Además, se tiene un problema de arrastre, pues si el filtrado de la etapa anterior viene turbio, también no saldrá muy translúcido al salir de la etapa purificación, esto afectaría la medición. Finalmente, el cartucho de forma angular puesto en el vaso que recibe la muestra purificada, provocaría una superficie menor de contacto entre la muestra líquida y la columna perdiéndose antibiótico.

El método y el material para cada uno de los pasos intermedios, debe ser implementado en función de obtener mayor reproducibilidad de espectros blancos, menor fuente de incertidumbre y menor pérdida de antibiótico, por esto, es fundamental esta parte en la implementación, puesto que la manera en que se lleven a cabo los pasos intermedios influirá notablemente en la reproducción de "zero crossing" de las señales de muestras blanco. Es necesario que esta longitud de onda sea poco variable y se mantenga regularmente constante a medida que se realizan numerosas pruebas aplicando el procedimiento completo de extracción.



Se desprende de todo lo anterior que existiría una forma distinta de manipular la muestra, desde el punto de vista práctico, respecto al protocolo general de extracción.

Se evitaría una pérdida de muestra, si el músculo de salmón se fortifica en el mismo tubo de centrifuga y la extracción con amortiguador se realiza en este mismo tubo, usando para esta etapa un Vortex Mixer, en vez de vasos y magnetos, esto para el primer paso intermedio. Para el traspaso de sobrenadante al equipo de filtración, se evitaría el sobrenadante turbio, si se saca lentamente ayudado con pipeta Pasteur el sobrenadante, para así lograr menos perturbación debido a movimiento y menor cantidad de partículas resuspendidas. La grasa que se genera en el tubo debe ser filtrada al último. En lo que respecta a la etapa propiamente tal de la filtración, el material de filtrado es esencial. Este sobrenadante debe ser filtrado lentamente usando también una bomba de vacío, sin tapar el papel filtro, esto se logra ocupando un embudo Büchner de porcelana con poros grandes, esto tiene dos ventajas comparativas por sobre el filtro de vidrio fritado: se reduce la velocidad de filtrado por no tapar todos los poros del papel filtro y por otro lado, se lava mas fácil y en menos tiempo, disminuyendo la probabilidad de contaminación de la muestra.

Para no perder antibiótico por trasvasije, el traspaso del material sólido entre la etapa de centrifugación y la segunda extracción con amortiguador debe ser agregando pequeñas porciones de los 20 mL de amortiguador para enjuagar el tubo de centrifuga y luego agitar vigorosamente observando que el fondo del tubo no presente material compactado. Luego de esto, este mismo tubo se lleva a homogenización y extracción nuevamente en el Vortex.



Desde la etapa de Filtración a la etapa Purificación, es conveniente fijar con firmeza el cartucho  $C_{18}$  de forma vertical y aplicar baja velocidad, esto hace más eficiente los procesos de activación de la columna y sorción de OTC, para así limpiar y preconcentrar mejor el antibiótico.

Sería conveniente tomar en cuenta que debería haber un método o idear alguno para medir no sólo cualitativamente, si no que también cuantificar la efectividad de los procesos intermedios (estadígrafos) y correlacionarlos con los resultados espectrofotométricos (analíticos), los cuales en definitiva son tan importantes como las etapas fundamentales.

### **3.3 Aplicación del método completo en músculo y piel de salmón. Reproducción de espectros derivados de muestras blancos.**

Para validar este método, uno de los factores más importantes es reproducir con poca variabilidad el "zero crossing", pues éste debería ser independiente de la procedencia del salmón. Se aplicó el procedimiento completo (extracción de OTC según protocolo y formación de par iónico propuesto) a diez muestras blancos de músculo de salmón de diferentes procedencia. Se obtuvieron los siguientes resultados:

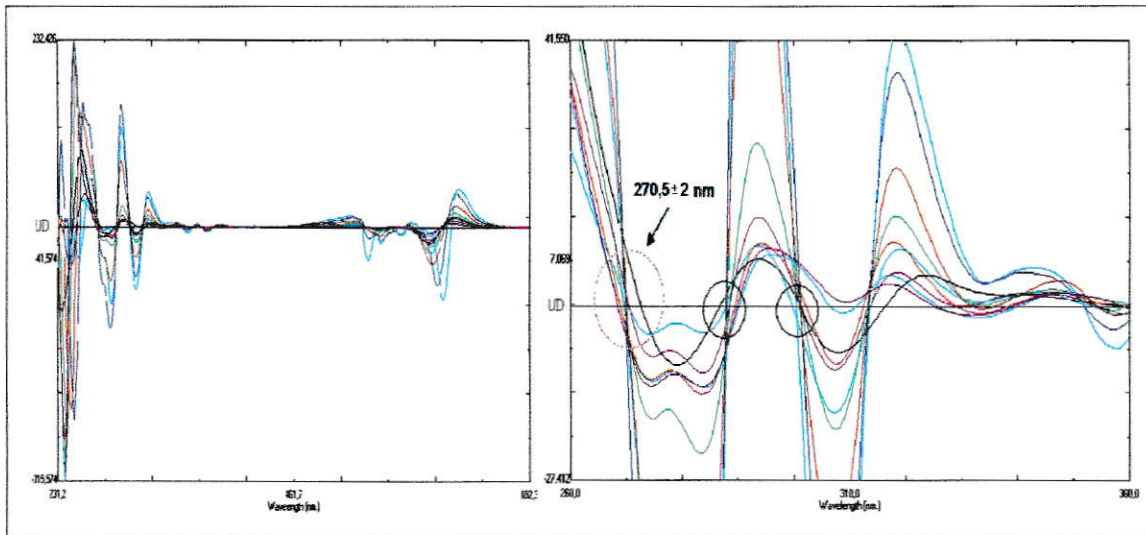


Figura 18: Espectro de absorción derivado 2º orden de Señales analíticas de blancos de salmón. Factor de suavizado y escala: 100000. A la derecha se muestra el zoom en la zona 260 nm – 360 nm. Concentración de VC  $8,0 \times 10^{-6}$  mol/L. pH  $9,0 \pm 0,4$ . Se aprecia que existen 3 “zero crossing” en el intervalo 260 nm – 310 nm.

Según la Figura 18, se aprecia que existen tres “zero crossing” en el intervalo 260 nm – 310 nm en las señales analíticas de las muestras blancos de músculo y piel de salmón. El primero aparece a los 270,5 nm, el segundo a 285 nm y el tercero en 300 nm. El primero, presenta mayor reproducibilidad y por lo tanto los dos últimos no se consideran para la presente tesis.

Es importante tratar de reproducir espectros derivados de blancos con valor de “zero crossing” fijo, independiente de las unidades de derivadas que presente la señal. Se aprecia que este objetivo no se logra en una primera aproximación, pues la longitud de onda no es fija. Lo anterior se puede atribuir a que estas señales de blancos

pertenecen a la implementación del procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón, en la cual, se realizaron ensayos preliminares a modo de prueba en condiciones variables de tipo químicas. A pesar de lo anterior, es un buen resultado considerando que se presenta una variabilidad aproximada de sólo 2 nm para el valor central 270 nm y las bandas analíticas presentan similar forma. A continuación, en la Tabla 5, se presenta el promedio y la desviación estándar de estos 10 blancos pertenecientes a la implementación del procedimiento general de extracción, y además se presenta los valores extremos de “zero crossing” y el promedio entre el valor máximo y mínimo.

Tabla 5: Valores de “zero crossing” de señales blanco de Implementación. Estos valores pertenecen a las señales analíticas de la aplicación del procedimiento completo (Figura anterior), o sea implementación de la extracción de OTC según protocolo y formación de par iónico propuesto. Nótese el valor de la desviación estándar y del valor promedio entre el mínimo y el máximo “zero crossing”.

IMPLEMENTACIÓN		
“zero crossing”	Longitud de onda (nm)	Desv. Estándar
Promedio	269,75	1,23
mínimo	268,40	
máximo	272,60	
Prom. (máx. y mín.)	270,5 ± 2,10	

Se aplicó el método y se reprodujo espectros derivados. Estos blancos proceden del resultado de la implementación del procedimiento general de extracción de OTC desde músculo y piel de salmón según el protocolo.

Según la Tabla 5, se aprecia una variabilidad del "zero crossing" a 270,5 nm, de aproximadamente  $\pm 2$  nm de diferencia respecto del valor central. Se plantean dos posibles motivos para esta longitud de onda variable: el método de ensayo y error usado en la implementación, la cual se centró en familiarizarse con la ejecución del método de extracción y la manipulación de la muestra, para llevar a cabo de mejor forma el método de extracción de OTC y la búsqueda de la cantidad exacta de amoníaco, la cual influye en el desplazamiento de bandas de señales analíticas y consecuentemente en el "zero crossing". Lo anterior se debe a que la muestra es eluída del cartucho C<sub>18</sub> con ácido oxálico en la etapa purificación del proceso de extracción de OTC y en seguida este extracto se somete al proceso de formación de par iónico, este paso es fundamental pues se debe ajustar el volumen final a un medio básico, esto, para llegar al valor de pH adecuado ( $9,0 \pm 0,2$ ). Así y todo se aprecia en la Figura 18 que la forma de las bandas son muy parecidas y todas presentan una forma específica y similar entre ellas, considerando el número de "zero crossing" existentes, independiente de la procedencia del salmón.

### **3.4 Optimización para la reproducción de espectros derivados en muestras blancos.**

Se diseñó un conjunto de experimentos con la finalidad de seleccionar las variables analíticas óptimas para esta determinación. El diseño experimental se basó en optimizar dos variables, para mantener fijo el valor de longitud de onda "zero crossing" en muestras blancos, esto permitiría validar el método, éstas variables son: volumen adicionado de VC y NH<sub>3</sub>. Este diseño consistió en realizar 4 experimentos



(bloque), con 2 réplicas cada uno, es decir 8 experimentos en total. Los resultados fueron evaluados por derivada de segundo orden, factor de suavizado 10.000 y de escala 10.000. Los espectros de estos 8 blancos se presentan en la Figura 19:

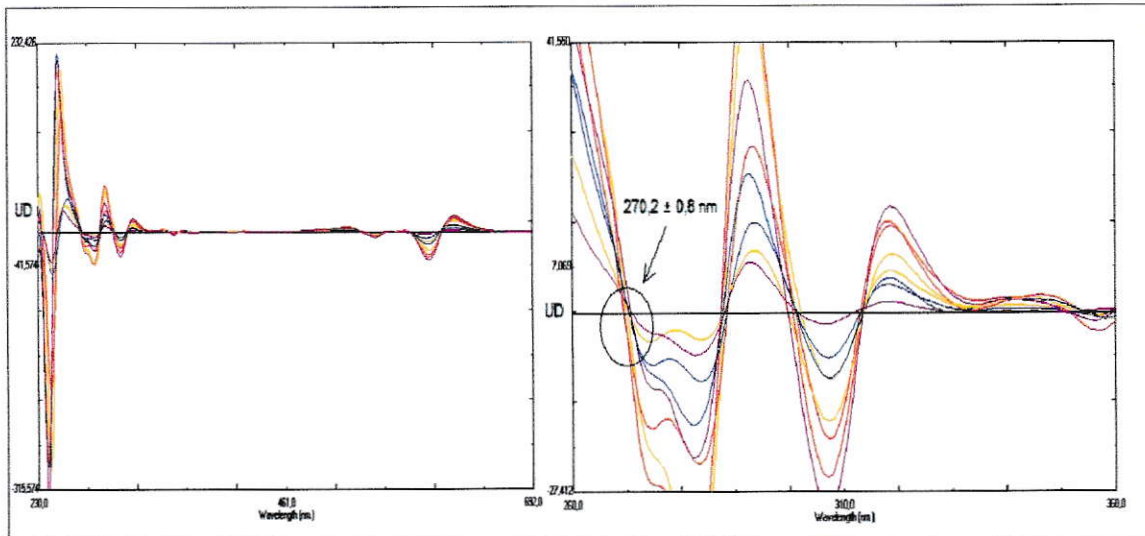


Figura 19: Espectro de absorción derivado 2º orden de Señales analíticas de blancos de salmón Optimización. Factor de suavizado y escala: 100000. A la izquierda se muestra el zoom en la zona 260 nm – 360 nm.

Con los datos anteriores de longitudes de onda (nm), se construyó la Tabla 6, en la cual se calculó el promedio y la desviación estándar de la respuesta a estos 8 experimentos:

Tabla 6: Valores de “zero crossing” de señales blanco de Diseño. Estos valores resultan de aplicar el método completo a 8 muestras blancos. Nótese el valor de la desviación estándar.

DISEÑO		
“zero crossing”	Longitud de onda (nm)	Desv. Estándar
Promedio	270,18	0,50
mínimo	269,42	
máximo	270,90	
Prom. (máx. y mín.)	270,16 ± 0,74	

Las longitudes de onda “zero crossing” registradas en la Figura 19 para cada experimento se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7: Diseño Experimental y respuesta en longitud de onda de “zero crossing” (nm).

		Variable	valor bajo	valor alto	unidades
		Volumen NH <sub>3</sub>	600	1800	μL
		Volumen VC	200	500	μL
bloque	experimento	vol. NH <sub>3</sub> (μL)	vol. VC (μL)	“zero crossing”	
1	1	600	500	270,71	
	2	600	200	270,90	
	3	1800	200	269,58	
	4	1800	500	269,42	
2	5	600	500	270,31	
	6	600	200	270,34	
	7	1800	200	270,19	
	8	1800	500	270,01	

A partir de un análisis estadístico que considera los resultados correspondientes al diseño experimental propuesto, se obtuvieron los siguientes resultados:

a) **Gráfico de Pareto:** El gráfico de Pareto, Figura 20, muestra las variables o combinaciones de ellas que presenten mayor efecto sobre la señal analítica. La línea vertical se usa para establecer la significancia. En este caso los efectos son negativos, pero no son significativos.

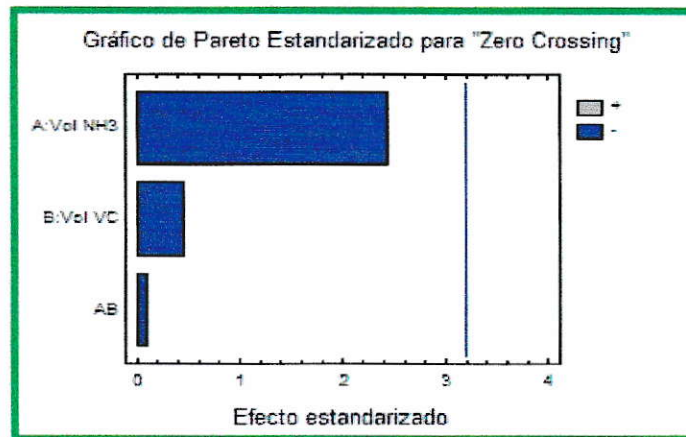


Figura 20: Gráfico de Pareto Estandarizado. Las barras azules que traspasen la línea vertical representan efectos significativos.

b) **Gráficos de efectos principales:** En la Figura 21, se muestran las respuestas "zero crossing" estimadas como una función de cada factor experimental. En cada gráfico, el factor NH<sub>3</sub> varía desde su nivel más alto a su nivel más bajo, mientras que VC mantiene la longitud de onda en valores centrales. Al igual que en el gráfico de Pareto, ambas variables tienen efectos negativos, siendo NH<sub>3</sub> el de mayor efecto en la longitud de onda "zero crossing" porque es la que presenta una mayor pendiente.

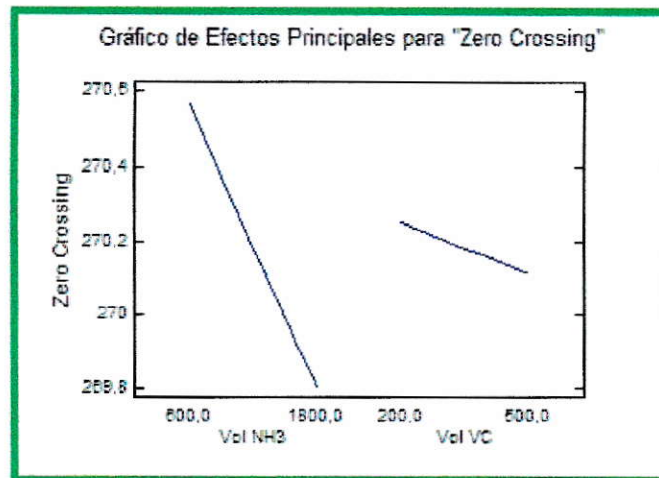


Figura 21: Gráfico de efectos principales para el "zero crossing". Al igual que el gráfico de Pareto, se muestra que ambos efectos son negativos, siendo el amoníaco más significativo que el violeta cristal.

Este diseño encontró que ambas variables no eran significativas, o sea que no tenían mayor efecto sobre la respuesta de longitud de onda. Esto último se explicaría según los valores de "zero crossing" obtenidos en la optimización, los cuales tiene un rango bien acotado si se considera que la respuesta "zero crossing" cambia numéricamente muy poco (269,8 – 270,6 nm, Figura 21) cuando ambos factores van desde el valor alto al valor bajo. La variable VC tiene menor significancia y deja aún más pequeño el intervalo de los valores de longitud de onda. Ambas variables tienen un efecto negativo en la respuesta, ya que un aumento del volumen de NH<sub>3</sub> y VC resulta en una disminución del valor de la longitud de onda. Como se busca mantener un valor constante de "zero crossing" y no una maximización de esta respuesta, los resultados encontrados como óptimos con base en el diseño experimental son:

**Volumen de VC  $1 \times 10^{-3}$  mol/L: 350  $\mu$ L, Volumen de NH<sub>3</sub> 0,1 mol/L 1200  $\mu$ L.**



Estas cantidades encontradas como óptimas, son precisamente los valores centrales del rango de volúmenes de las variables en estudio, los cuales demuestran la constancia del valor “zero crossing” de la señal blanco en torno a 270 nm. Sumado a esto, y como nuevo análisis de datos, se encuentra otro valor de “zero crossing” para el blanco, situado en torno a 381,6 nm, como se muestra en la Figura 22, la cual es un zoom del espectro perteneciente a las ocho señales analíticas de blanco de la optimización anterior:

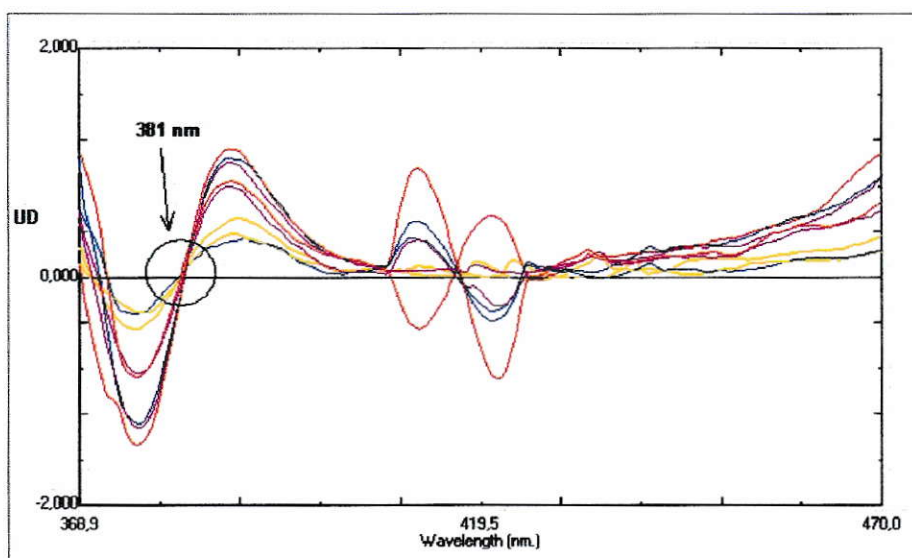


Figura 22: Zoom de espectro de absorción derivado 2º orden de Señales analíticas de blancos de salmón. Factor de suavizado y escala: 100000. Optimización. Zoom en la zona 370 nm – 470 nm.

Debido a que el diseño experimental se realizó de forma sistemática, los resultados obtenidos en la optimización implican que se estaría mejorando la reproducción de la señal analítica de los blancos de músculo de salmón en el “zero crossing”, en torno a 270,2 nm y sería menos variable en su valor. Esto se comprueba al comparar las Tablas 5 y 6, las cuales muestran el valor de la desviación estándar del

“zero crossing” y el valor máximo y mínimo de longitud de onda. Sobre estas consideraciones se desprende que el valor del “zero crossing” del blanco es más constante en la optimización, en la cual la desviación estándar es de 0,5 y en la implementación 1,23. Por otro lado, el diseño experimental arrojó longitudes de onda en un intervalo más pequeño [269,42 nm – 270,90 nm] (Tabla 6), en comparación a los blancos pertenecientes a la implementación del procedimiento general de extracción [268,40 nm – 272,60 nm] (Tabla 5).

Como nuevo análisis de los resultados, aparece otro “zero crossing” para el blanco, situado en 381,6 nm. La implicancia de esto es importante, pues con todo lo anterior, se podría eventualmente evaluar la extracción de OTC desde músculo de salmón midiendo no sólo en 270,2 nm, si no que también en la nueva longitud de onda, esto proporcionaría otra opción de medición del par iónico. Incluso, este nuevo “zero crossing”, al parecer presenta menor variabilidad, o sea sus cruces son aún más cercanos en torno al 381 nm. Con esta optimización se eliminaría un efecto matriz que impide la lectura de la señal analítica correspondiente al par iónico.

Por otro lado, el rango de volumen de amoníaco desde el valor bajo hasta el alto, es válido para dejar constante el “zero crossing” 270,2 nm de la señal analítica de la muestra blanco en músculo de salmón y cumple con la condición para obtener el pH adecuado,  $9,0 \pm 0,4$ , pero no representan los valores óptimos para formar el par iónico. Debido a lo anterior, se debería realizar un nuevo estudio de variables químicas en un diseño experimental aplicando el procedimiento completo, ahora considerando la presencia de OTC y luego suponiendo que también existe una dependencia de la formación del par iónico con el orden de adición de reactivos al matraz en presencia de

ácido oxálico, proveniente de la etapa de purificación, al igual como se propuso un orden distinto para la formación de par iónico sin consideración de la matriz.

### 3.5 Verificación de la formación de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Reproducción de espectros derivados de señales analíticas del par iónico.

A continuación, en la Figura 23, se presenta el espectro registrado por espectrofotometría derivada de las 5 muestras fortificadas y 2 blancos:

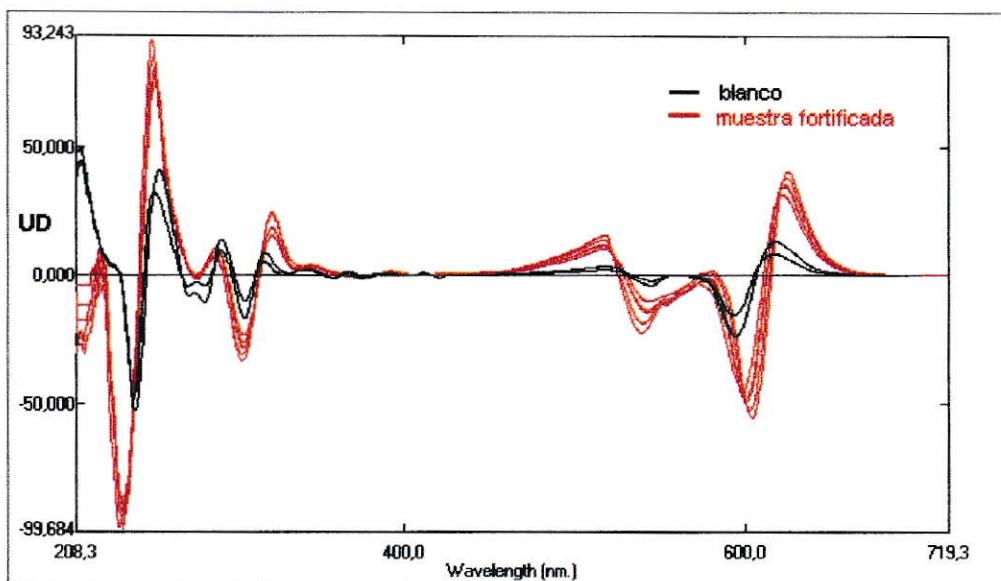


Figura 23: Señales analíticas de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Espectro de absorción derivado 2º orden. Factor de suavizado y escala: 100000. Muestras fortificadas con 0,5 mL del rango de alta concentración OTC de las soluciones de trabajo. (3 µg/mL y 3,6 µg/mL). Volumen de amoníaco 1200 µL. 0,1 mol/L.

Se puede apreciar que presentan distinto comportamiento espectral las señales del blanco y de la muestra, pero no se definen bien las distintas concentraciones, 3 µg/mL y 3,6 µg/mL, correspondientes a 300 µg y 360 µg de OTC por kilogramo de músculo de salmón o su equivalente de pescado fresco. En la Figura 24 se muestra los

respectivos “zoom” a las distintas longitudes de ondas de “zero crossing” de la muestra blanco.

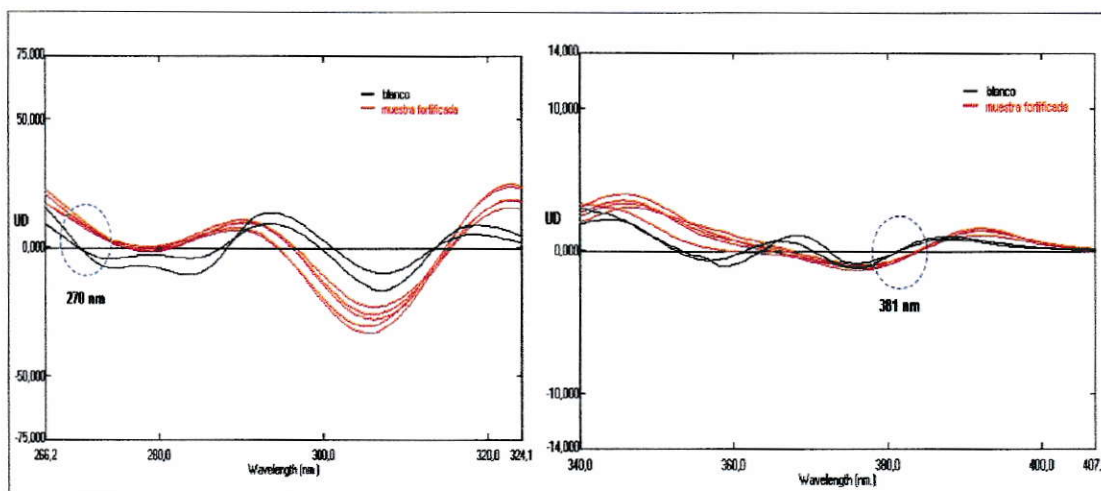


Figura 24: Zoom de espectro de señales analíticas de par iónico VC-OTC en músculo de salmón. Espectro de absorción derivado 2º orden. Factor de suavizado y escala: 100000. Zoom a la longitud de onda 270 nm y 381nm existencia de “zero crossing” fijo para los blancos.

En la Figura 24, se aprecia que no existe una notable diferencia en unidades de derivadas entre las muestras blanco y las muestras fortificadas evaluadas a 270,2 nm y 381 nm, e incluso entre las mismas muestras de distintas concentraciones, independiente de esto, la cantidad de “zero crossing” entre el blanco y las muestras son distintos, como se muestra en la Figura 23 y 24, en el rango 340 nm – 400 nm de longitud de onda, lo que hace suponer la aparición de alguna banda analítica atribuible al par iónico VC-OTC. Lo anterior corroboraría que existe una interacción entre colorante y antibiótico.



Los espectros derivados de señales de blanco y muestras fortificadas con antibiótico muestran comportamientos espectrales distintos, ya que a las longitudes de onda 270 nm y 380 nm ("zero crossing del blanco") las señales de muestras fortificadas presentan  $UD \neq 0$ . Esto debido a la presencia de antibiótico en las muestras fortificadas, el cual estaría interactuando con el colorante violeta cristal. De esta manera se estaría verificando la formación del par iónico en muestras de músculo de salmón. A pesar de lo anterior, las señales de las muestras fortificadas de distintas concentraciones no presentan mayor diferencia justo en los respectivos "zero crossing" de la señal de blanco, lo cual implicaría una baja reproducibilidad de la señal de par iónico VC-OTC. Una forma de reparar esto sería crear un nuevo diseño experimental tomando en consideración: la presencia de OTC, de ácido oxálico y el orden de estos nuevos reactivos, para así maximizar y definir mejor aún la señal atribuible al par iónico. Por otro lado, también se propone la estandarización o normalización de los procesos que poseen algún grado de variabilidad al operar, dentro de los pasos fundamentales de la extracción de antibiótico (centrifugación, filtración y purificación) ya que en estos pasos, como se explicó anteriormente podría existir pérdida de antibiótico, lo cual disminuiría la señal.

Respecto al tiempo de aplicación del método a muestras de salmón, se logró aplicar en serie el método, pero por la disponibilidad de bomba de vacío, aumentó el tiempo del proceso general de extracción de OTC, pues las muestras deben someterse individualmente, una seguida de otra, al proceso de filtración.

#### IV. CONCLUSIONES.

Según los resultados, se desprende que existe una dependencia entre la formación del par iónico y el orden en que se agregan los reactivos. El orden encontrado para lograr reproducibilidad en los resultados es agua, violeta cristal, amoníaco y finalmente OTC. Por lo tanto y como un aporte de la presente tesis, se propone una modificación al protocolo general de determinación de par iónico vía preconcentración líquido-líquido, en función de obtener reproducibilidad de las señales del par iónico VC-OTC, en el menor tiempo posible.

Otro aporte de esta tesis se enfoca a la descripción detallada del procedimiento de extracción de antibiótico desde el músculo de salmón, descripción que servirá para una aplicación efectiva del método, ya que: el proceso completo se dividió en cinco partes, esto permitió visualizar los puntos críticos y los pasos conectores, siendo la extracción y la filtración las etapas que presentan mayor fuente de error. Los cambios propuestos más importantes son: uso de vortex mixer en lugar de vasos y magnetos, en la extracción y uso de embudo Büchner con doble papel filtro en lugar del equipo con filtro de vidrio fritado, en filtración.

Otro aporte es la mejora de la reproducción de señales blancos, debido a que después de realizar una optimización de variables químicas, las condiciones encontradas son: *Volumen de VC  $1 \times 10^{-3}$  mol/L: 350  $\mu$ L, Volumen de  $NH_3$  0,1 mol/L: 1200  $\mu$ L, con esto se logró reproducir el "zero crossing" del blanco, con un valor observado de 270,2 nm, este presentó una menor variabilidad en su valor respecto al "zero crossing" de la implementación. Además, esta optimización posibilitaría evaluar la*

señal analítica del par iónico en una segunda longitud de onda de la señal blanco: 381,6 nm.

Se comprobó la formación del par iónico VC-OTC en músculo de salmón mediante la comparación de señales analíticas de las muestras blanco y muestras con antibiótico. No fue posible distinguir diferencias entre las señales correspondientes a 300 µg y 360 µg de OTC por Kg de músculo de salmón, concentraciones cercanas al límite mayor del rango lineal válido para el método (Orellana S.,2009), atribuido esto a la posible pérdida de OTC y por otro lado, a la incorporación y la presencia de los siguientes componentes: matriz, ácido oxálico y antibiótico, suponiendo que existe un nuevo orden de adición de estos reactivos para la cuantificación de OTC en músculo de salmón, aún no estudiado, incluyendo además agua, amoníaco y violeta cristal.

## V. PROYECCIONES.

Lo cambios propuestos en la implementación del método de extracción de OTC, como son manejo de muestra y cambio de material, deben ser evaluados cuantitativamente para determinar su influencia en la medición analítica final del par iónico.

Como el valor de "zero crossing" de blanco depende también del manejo de la muestra, se propone enumerar, ordenar y definir las condiciones iniciales propiamente de la muestra de salmón, como por ejemplo, cadena de frío, tiempo de refrigeración, cantidad de piel al momento de masar, cantidad de grasa y color del músculo. Estas condiciones iniciales son muy importantes tanto en la reproducción de señales blancos, como de señales de par iónico, puesto influyeron en la continuidad del presente trabajo.

Una vez eluída la muestra con antibiótico con ácido oxálico metanólico, se propone optimizar la cantidad de amoníaco agregado para contrarrestar este ácido ocupado para eluir y así, elevar el pH a  $9,0 \pm 0,2$  final.

Se propone estudiar el nuevo orden de agregado de reactivos tal como se hizo para el procedimiento general de formación de par iónico sin músculo de pez, ya que es un paso decisivo para la formación del par iónico y obtener buenas señales analíticas y así parámetros de calidad de acuerdo al objetivo requerido, en este caso, aplicar este método a un alto número de muestras y matrices de diferentes orígenes para ser un método estándar en control de calidad.



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aqua Noticias, 2008. <http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=22006>
- Aqua Artículos, 2010. Modificación al Reglamento Ambiental para la Acuicultura <http://www.aqua.cl/articulos/?id=97>
- Arismendi, I., D. Soto, B. Penaluna, C. Jara, C. Leal & J. León-Muñoz. 2009. Aquaculture, non-native salmonid invasions and associated declines of native fishes in Northern Patagonian lakes. *Freshwater Biology* : 1-13.
- Cabello F. 2003. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. Fundación Terram. 2003. [http://www.terram.cl/docs/App17\\_Antibiotics\\_y\\_Acuicultura.pdf](http://www.terram.cl/docs/App17_Antibiotics_y_Acuicultura.pdf). Análisis de Políticas Públicas No. 17, pp. 1-16.
- Cabello F. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. *Rev. Med. Chile*. 132: 1001-1006.
- Cabello F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment. Microbiol.* 2006; 8 (7), 1137–1144
- Cinquina A.L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L. y Cozzani R. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A*. 987: 227-233.
- CONAMA, Corporación Nacional del Medioambiente, 2009. Ley de Bases Generales del Medioambiente. <http://www.conama.cl/portal/1301/article-35081.html>
- Chang T.G. e Irish D. E. 1974. Ion-pair formation in aqueous solutions of silver nitrate: A Raman and infrared spectral study . *J. Solution Chem*. 3: 175-189.
- Chopra I. y Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-60.
- Hansen, P.K., Ervik, A., Schaanning, M., Johannessen, P., Aure, J., Jahnsen, T. & Stigebrandt, A. 2001. Regulating the local environmental impact of intensive marine fish farming. II. The concept of the MOM system (Modelling-Ongrowing fish farm-Monitoring). *Aquaculture*, 194, 75-92.

- ISO/IEC 17025: 1999 "General requirement for the competence of calibration and testing laboratories".
- Karpinska J. 2004. Derivative spectrophotometry—recent applications and directions of developments *Talanta* 64: 801-822.
- Khan N.H., Roets, E., Hoogmartens, J., Vanderhaeghe, H. 1987. "Quantitative analysis of oxytetracycline and related substances by high performance liquid chromatography" *J. Chromatogr.* 405, 229 – 245.
- Klaver, A.L. & Mathews, R.A. 1994. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture*, 123, 237-247.
- La Tercera, Negocios, 2010.  
[http://latercera.com/contenido/655\\_225524\\_9.shtml](http://latercera.com/contenido/655_225524_9.shtml)
- Liu R., Yang J. y Wu X. 2002. Study of the interaction between nucleic acid and oxytetracycline–Eu<sup>3+</sup> and its analytical application. *Journal of Lumin.* 96: 201-209.
- Melo, T., P. Rojas & P. Pavez. 2005. Evaluación de la posición trófica y la eficiencia de los métodos de recaptura en salmónidos escapados de centros de cultivo. Informe Final Proyecto FIP 2004-24.
- Merican, Z.O. & Phillips, M.J. 1985. Solid waste production from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, cage culture. *Aquaculture and Fisheries Management*, 16, 55-70.
- Morrissey, D.J., Gibbs, M.M., Pickmere, S.E. & Cole, R.G. 2000. Predictin impacts and recovery of marine farm sites in Stewart Island, New Zealand, from the Findlay-Watling model. *Aquaculture*, 185, 257-271.
- Normativa 657. DECISIÓN DE LA COMISIÓN EUROPEA del 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (2002/657/CE).
- Oceana. Uso y abuso de Antibióticos en la Salmonicultura. Antonia Fortt Z., Enero 2007. Documento 23. [www.oceana.org](http://www.oceana.org).
- Oka H., Ito Y. y Matsumoto H. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A.* 882: 109-133.
- Oliveira C., Branco K., Baptista M. e Indig G. 2002. Solvent and concentration effects on the visible spectra of tripara- dialkylaminosubstituted triarylmethane dyes in liquid solutions. *Spectrochim. Acta Part A.* 58: 2971- 2982.



- Orellana S., 2009. "Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de antibióticos utilizados en la acuicultura chilena". Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias. Universidad de Chile.
- Pearson M. e Inglis V. 1993. A sensitive microbioassay for the detection of antibacterial agents in the aquatic environment. *J. Fish Dis.* 16: 255-260.
- Phaechamud T., Koizumi T. y Ritthidej G. 2000. Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. *Int. J. Pharm.* 198: 97-111.
- Qiang Z. y Adams C. 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water res.* 38: 2874-2890.
- Reveurs T, Díaz R. Método de determinación de tetraciclinas en tejido por HPLC-Diode - Array. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. 1994)
- Rudolph W. e Imer G. 1994. Raman and infrared spectroscopic investigation of contact in pair formation in aqueous cadmium sulfate solutions. *J. Solution Chem.* 23: 663-684.
- Salmonchile, Mundo del salmón, Producción, Producción mundial de salmón cultivado. 2008.  
<http://www.salmonchile.cl/frontend/seccion.asp?contid=&secid=3&secoldid=3&subsecid=95&pag=1>
- Salmonchile, Medioambiente. Industria y Medioambiente. 2010.  
<http://www.salmonchile.cl/frontend/seccion.asp?contid=473&secid=6&secoldid=6&subsecid=141&pag=1>
- Samuelsen, O.B. 1992. The fate of antibiotics/ chemotherapeutics in marine aquaculture sediments. En: *Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality* (C.M. Michel & D.J. Alderman, ed.). Office International de Epizooties, Paris, pp. 162-173.
- Semapesca, Servicio Nacional de Pesca. 2005. Programa de control de fármacos. Manual de procedimientos sección 1. Programa de control de residuos. Anexo III.
- Skoog D., Holler J. y Nieman T. 2001. Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill 5° edición.
- Sokol J. y Matisova E. 1998. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solidphase extraction. *J. Chromatogr. A.* 669: 75-80

- Soto, C., Orellana, S., y M.I. Toral, "UV-vis, IR and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Studies and Characterization of Ionic-Pair Crystal Violet-Oxytetracycline", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75, 437-443 (2010)
- Suarez, B. y Guzmán, L. 1998. *Mareas Rojas y Toxinas Marinas*. Editorial Universitaria, Santiago, 77 pp.
- Thompson, RM. & CR. Townsend 2003. Impacts on stream food webs of native and exotic forest: an intercontinental comparison. *Ecology* 84: 145-161.
- Toral M.I., Richter P., Tapia A. y Hernandez J. 1999. Simultaneous determination of iron and ruthenium as ternary complexes by extractive second derivative spectrophotometry. *Talanta*. 50: 183-191
- Veterquímica. Calidad y Servicio.  
[www.veterquimica.cl/vademecum/.../terrivet80med.pdf](http://www.veterquimica.cl/vademecum/.../terrivet80med.pdf)



**ANEXO**

## ANEXO

En la Figura 25 se presenta un espectro de absorción clásico que muestra las señales analíticas de las especies oxitetraciclina, violeta cristal y el par iónico, todas estas especies son leídas en la región UV-Visible después de la extracción líquido-líquido con 6 mL de cloroformo y a un pH  $9,0 \pm 0,2$ . Enseguida, en la Figura 26 se presenta un zoom en la zona de los 360 nm. Finalmente se registra un zoom de la segunda derivada del espectro de absorción de las tres especies, en la Figura 27.

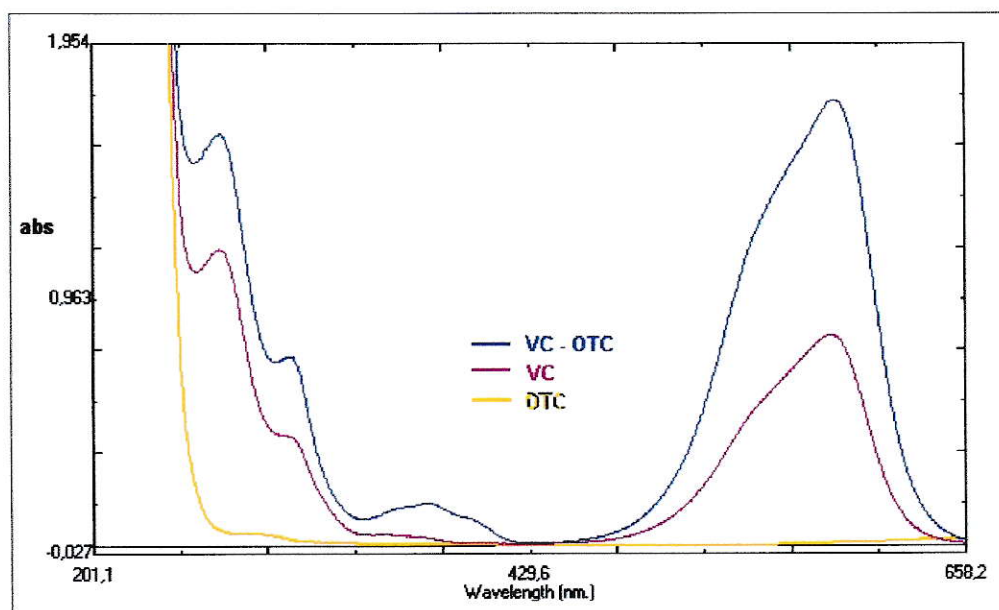


Figura 25: Espectro de absorción clásico de señales analíticas de OTC, VC y par iónico VC-OTC, registradas en cloroformo a pH  $9,0 \pm 0,2$ . Concentraciones de: OTC  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, VC  $8 \times 10^{-6}$  mol/L, VC-OTC  $2 \times 10^{-6}$  mol/L

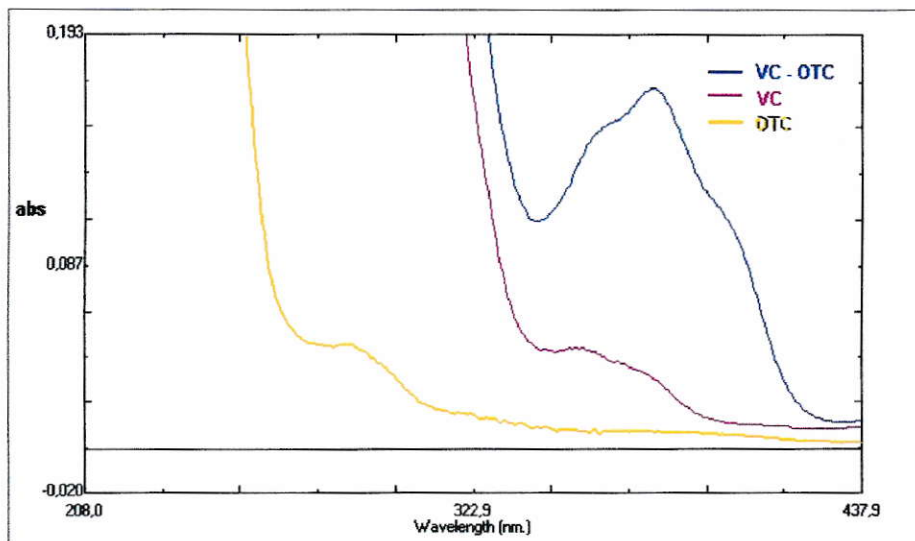


Figura 26: Zoom de espectro de absorción clásico de señales analíticas de OTC, VC y par iónico VC-OTC, registradas en cloroformo a  $\text{pH } 9,0 \pm 0,2$ . a la zona 360 nm.

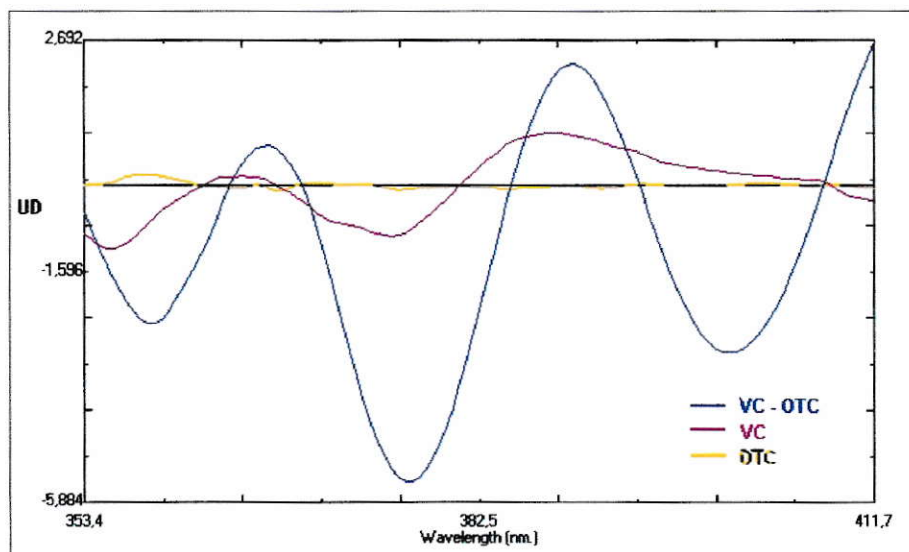


Figura 27: Zoom de espectro de absorción de segunda derivada de señales analíticas de OTC, VC y par iónico VC-OTC, registradas en cloroformo a  $\text{pH } 9,0 \pm 0,2$ . a la zona 360 nm. Factor de suavizado y escala: 100000. "Zero crossing" de VC a 381 nm