

UCH-FC
DOC-Q
0648
C.A.

**“DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA
ACUICULTURA CHILENA”**

Facultad de Ciencias
Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de
Doctor en Química

Por

Sandra Orellana Donoso

Enero, 2009

Director de Tesis:

María Inés Toral Ponce



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

SANDRA LORENA ORELLANA DONOSO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 Noviembre de 2008.

Director de Tesis:

Dra. María Inés Toral Ponce

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Campos

Dra. Soledad Bollo

Dra. Edith Hevia

Dr. Hugo Pinochet



The image shows four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dotted line. To the right of the signatures is a circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS" at the top, "BIBLIOTECA CENTRAL" in the middle, and "U. DE CHILE" at the bottom.

DEDICATORIA



"A mis padres a quienes siempre he amado, les agradezco su comprensión y apoyo incondicional en cada momento de mi vida"

*"El éxito no es el resultado de la combustión espontánea.
Uno mismo debe aprender a generar el fuego."
(Gabrielle Colette)*

RESUMEN BIOGRÁFICO



Sandra Orellana Donoso nació en Santiago de Chile el 20 de Enero de 1980, recibió su enseñanza básica en el Colegio Nuestra Sra. de Lourdes y media en el Liceo N°1 Javiera Carrera. A la edad de 19 años ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Química. En 2004 ingresó al programa de Doctorado en Química de la misma Universidad, donde bajo la tutela de la Prof. María Inés Toral, desarrolló su tesis doctoral sobre determinación de antibióticos de interés veterinario. La licenciada Orellana se ha desempeñado durante sus estudios de pregrado y postgrado como ayudante y profesor de laboratorio, así también como ayudante de cátedra de diferentes cursos de Química General , Química Analítica y Análisis Instrumental tanto en la Universidad de Chile como en la Universidad Nacional Andrés Bello.



AGRADECIMIENTOS

A lo largo del tiempo que ha durado esta tesis, han sido muchas las personas que, de una u otra manera, me han auxiliado a realizar este trabajo de tesis. Por ello, es mi deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

La Prof. M^a Inés Toral por su infinito apoyo, constante dedicación, paciencia, comprensión y guía durante este trabajo, y por haberme entregado su experiencia en mi formación como científica. Al final de la tesis, puedo decir que ha sido una gran tutora, pero que todavía ha sido mucho mejor amiga.

A todos los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, los profesores Dr. Marcelo Campos, Dr. Hugo Pinochet, Dra. Soledad Bollo y Dra. Edith Hevia, por su buena disposición y dedicación en evaluar este trabajo de tesis.

A todos los profesores del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que han aportado a mi formación profesional.

A las becas de Doctorado, Luis Sepúlveda de la Facultad de Ciencias, al proyecto MECESUP 0-408 y a CONICYT por otorgarme la beca doctoral y término de tesis, con la cual me fue posible finalizar este trabajo. A los proyectos FONDECYT 1020692 y 1070905 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación.

Mis agradecimientos más sinceros a la Directora de Postgrado de la Facultad de Ciencias Dra. M^a Cecilia Rojas y al Dr. Nicolás Yutronic por su confianza y estímulo en el desarrollo de este trabajo.



A todos aquellos que me apoyaron a realizar el trabajo experimental, particularmente a los profesores Dr. Marcelo Campos, Dr. Pablo Richter, Erika Lang y Dr. César Soto. Una mención especial para Luis Torres, Segundo Leiva, Juan Carlos Machuca, Marisol Maira e Inés Saavedra por su gran disposición y ayuda entregada cuando más lo necesitaba.

A quienes me apoyaron tanto científica como personalmente a Rodrigo Segura, Jorge Rivas, Estrella Puig, Carla Toledo, Libby Morales, Lorena Barros y Paula Reyes. Al Grupo de Química Analítica del Laboratorio Dr. Alfonso Morales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en especial a Grisel Sánchez y Carola Rivera.

A todos mis amigos dentro y fuera de la Universidad de Chile, en particular a M^a Luisa Cerón y a Victoria Ortega por su sincera amistad y a Luis Felipe Ortiz, por su valorable ayuda en la elaboración computacional de este escrito.

A mi compañero de vida Marcelo Muñoz, por entregarme su amor, comprensión y por darme la fuerza e inspiración necesaria para completar mis estudios.

A la familia Muñoz Flores, quienes abrieron las puertas de su hogar entregándome su cariño y amistad.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia, particularmente a mis padres por el esfuerzo y apoyo brindado durante mi vida Fanor Orellana y Lucía Donoso, a mis hermanas Andrea y Bárbara, a mi cuñado Toto y sobrinos Ethel y Kenneth por apoyarme incondicionalmente todos estos años.

GRACIAS A TODOS

LISTA DE MATERIAS

LISTA DE MATERIAS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ASPECTOS GENERALES.....	1
1.1.1. Control de residuos	3
1.1.2. Determinación de antibióticos	13
1.2. COLORANTES, Y SU ACCIÓN COMO CONTRAIÓN EN LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS	17
1.3. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA	19
1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
1.5. OBJETIVOS	26
1.5.1. Objetivo General	26
1.5.2. Objetivos Específicos	26
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
2.1. REACTIVOS.....	28
2.2. MATERIALES	31
2.3. APARATOS E INSTRUMENTOS	31
2.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	33
2.4.1. Preparación de soluciones.....	33
2.4.2. Efecto de la naturaleza del solvente sobre la solubilidad de cada antibiótico	36
2.4.3. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los antibióticos en estudio....	36
2.4.4. Ensayos preliminares en la formación de pares iónicos en solución acuosa.....	37
2.4.5. Efecto de la luz del laboratorio sobre la estabilidad en el tiempo de VC y OTC.....	37
2.4.6. Procedimiento general para la determinación de pares iónicos vía preconcentración líquido-líquido	38

2.4.7.	Optimizaciones preliminares de las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido, en la determinación de pares iónicos. Metodología univariabes	38
2.4.8.	Optimización de las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido en la formación de pares iónicos. Metodología multivariabes	39
2.4.9.	Curva de calibración del par iónico VC-OTC. Muestras sintéticas	40
2.4.10.	Estudio de interferentes	40
2.4.11.	Extracción de OTC desde muestras de salmón	41
2.4.12.	Aplicación y validación del método en muestras de salmón Atlántico.....	43
2.4.13.	Determinación del coeficiente de distribución (K_D) de VC	43
2.4.14.	Obtención de espectros de RMN y preparación de las muestras VC, OTC y VC-OTC.....	44
2.4.15.	Obtención de espectros de IR y preparación de las muestras VC, OTC y VC-OTC.....	45
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.1.	EFFECTOS DE LA NATURALEZA DEL SOLVENTE SOBRE LA SOLUBILIDAD DE CADA ANTIBIÓTICO.....	46
3.2.	EFFECTO DEL pH SOBRE LA CONDUCTA ESPECTRAL DE LOS ANTIBIÓTICOS EN ESTUDIO.....	55
3.2.1.	Efecto del pH en el comportamiento espectral de OTC.....	55
3.2.2.	Efecto del pH en el comportamiento espectral de OXO y FLU.....	60
3.3.	ENSAYOS PRELIMINARES EN LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS EN SOLUCIÓN ACUOSA	61
3.4.	DETERMINACIÓN DE PARES IÓNICOS VÍA PRECONCENTRACIÓN LÍQUIDA-LÍQUIDA	63
3.4.1.	Ensayos preliminares en la extracción del par iónico OTC-colorantes aniónicos	63
3.4.2.	Ensayos preliminares en la formación de pares iónicos OTC-colorantes catiónicos, medios ligeramente básicos.....	66
3.4.3.	Selección de extractante.....	69
3.4.4.	Características del violeta cristal.....	71
3.5.	ASIGNACIÓN DE LAS SEÑALES DE VC Y OTC POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES.....	73
3.5.1.	Asignación de las señales de OTC por ^1H RMN.....	73
3.5.2.	Asignación de las señales de VC por ^1H RMN	74
3.5.3.	Asignación señales VC y OTC en medios básicos. NaOH.....	75

3.5.4.	Asignación señales VC en medios básicos. Tetraborato de sodio.....	78
3.5.5.	Asignación señales VC y OTC en medios básicos. NH ₃	80
3.5.6.	Experimentos de RMN bidimensionales	87
3.6.	ASIGNACIÓN DE SEÑALES POR ESPECTROSCOPIA INFRAROJA.....	89
3.7.	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO EN LA FORMACIÓN DEL PAR IÓNICO VC-OTC	92
3.7.1.	Cálculo de la constante de distribución para el colorante VC.....	93
3.7.2.	Efecto de la luz del laboratorio sobre la estabilidad en el tiempo de VC y OTC.....	94
3.8.	OPTIMIZACIONES PRELIMINARES DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN LA FORMACIÓN DEL PAR IÓNICO VC-OTC. METODOLOGÍA UNIVARIABLES	96
3.8.1.	Efecto de la concentración de NH ₃ en la formación del par iónico VC-OTC 97	
3.8.2.	Efecto de la concentración del colorante utilizado como contraión.....	98
3.8.3.	Efecto del número de etapas de extracción sobre la señal analítica de VC-OTC.....	99
3.8.4.	Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica de VC-OTC.....	99
3.8.5.	Efecto del volumen fase acuosa sobre la señal analítica de VC-OTC	100
3.9.	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN LA FORMACIÓN PAR IÓNICO VC-OTC. METODOLOGÍA MULTIVARIABLES. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL.....	102
3.10.	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES ESPECTRALES.....	107
3.10.1.	Selección de orden de la derivada.....	107
3.10.2.	Selección del factor de suavizado.....	110
3.10.3.	Selección del factor de escala	111
3.10.4.	Cuantificación de VC-OTC mediante "zero-crossing".....	113
3.11.	ESTUDIO DE INTERFERENTES.....	117
3.12.	APLICACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS DE SALMÓN ATLÁNTICO	124
4.	CONCLUSIONES	133
5.	PROYECCIONES DE LA TESIS DOCTORAL	138
6.	BIBLIOGRAFÍA	140
	ANEXO I: PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES.....	154
	ANEXO II: PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES.....	155
	ANEXO III: PUBLICACIONES	156

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Límites máximos residuales establecidos por mercados regulados en carne y piel de pescado.....	6
Tabla 2: Reactivos utilizados para la determinación de antibióticos.....	28
Tabla 3: Reactivos utilizados para el estudio de colorantes.	28
Tabla 4: Reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis.	29
Tabla 5: Solventes utilizados para el desarrollo de esta tesis.	29
Tabla 6: Reactivos utilizados para el estudio de interferentes.....	30
Tabla 7: Análisis cualitativo de las solubilidades para cada antibiótico a concentración $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.....	48
Tabla 8: Parámetros analíticos. Determinación individual de OTC, y determinación simultánea de OXO y FLU en ausencia de OTC.	53
Tabla 9: Resultados preliminares en la formación de par iónico OTC con colorantes aniónicos.	66
Tabla 10: Diferentes colorantes catiónicos en diferentes medios ligeramente básicos.	67
Tabla 11: Tiempos de relajación de VC, comparados con los tiempos de relajación del par iónico VC-OTC.	84
Tabla 12: Tiempos de relajación de OTC, comparados con los tiempos de relajación del par iónico VC-OTC.	86
Tabla 13: Principales señales de VC y OTC.	90
Tabla 14: Diseño Experimental y respuesta en unidades de derivada (UD).	103
Tabla 15: Variables espectrales seleccionadas.	113
Tabla 16: Parámetros analíticos instrumentales. Determinación de OTC a través de VC-OTC a λ 380,0 nm.	115
Tabla 17: Determinación de OTC a través de VC-OTC a diferentes concentraciones.....	116
Tabla 18: Estructuras interferentes tipo productos farmacéuticos y sustancias no autorizadas.	120
Tabla 19: Estructuras interferentes tipo contaminantes.....	123
Tabla 20: Parámetros analíticos del método aplicado. Determinación de OTC a través de par iónico VC-OTC a λ 272,5 nm.....	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de oxitetraciclina.....	7
Figura 2: Estructuras de quinolonas. a) Ácido oxolínico. b) Flumequina.	10
Figura 3: Estructura de florfenicol.	11
Figura 4: Estructura de eritromicina.....	13
Figura 5: Espectro clásico de una mezcla de dos analitos hipotéticos y sus derivadas de primer y segundo orden.	22
Figura 6: Métodos de cuantificación de la señal analítica.	23
Figura 7: Espectros de absorción oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.....	49
Figura 8: Espectros de absorción ácido oxolínico $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.....	49
Figura 9: Espectros de absorción flumequina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.....	50
Figura 10: Espectros de absorción OTC, OXO y FLU $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en ACN.....	51
Figura 11: Espectros derivados de primer orden de OTC, OXO, FLU. Concentración entre $4,0 \times 10^{-5}$ y $8,0 \times 10^{-5}$ mol/L.....	52
Figura 12: a) Espectros de absorción OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en ACN, a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de OTC en ACN, a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 360,0 nm.	54
Figura 13: Equilibrios ácido - base del antibiótico oxitetraciclina.....	56
Figura 14: Espectros de absorción oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a diferentes pH, en amortiguador Britton Robinson.	56
Figura 15: Esquema de los valores de pKa del antibiótico OTC.	58
Figura 16: Espectros de absorción oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a pH 5,0; 12,0 y de la forma básica a neutra, en amortiguador Britton Robinson.	59
Figura 17: Espectros de absorción quinolonas $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a diferentes pH, en amortiguador Britton Robinson. a) Ácido oxolínico. b) Flumequina.....	60
Figura 18: Espectros de absorción de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L, OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L y de la mezcla VC-OTC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L- $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L., en amortiguador Britton Robinson pH 9,0.....	62

Figura 19: Espectros de absorción del par iónico AM-OTC en amortiguador Britton Robinson pH 6,0. Concentración AM: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y de OTC: $8,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L..... 64

Figura 20: Espectros de absorción del par iónico ABT-OTC. (a) Medio NaOH. (b) Sin amortiguación. Concentración ABT: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y de OTC: $8,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L..... 65

Figura 21: Espectros de absorción del par iónico VC-OTC, leídos contra VC en diferentes medios de pH básicos. a) Amortiguador Britton-Robinson. b) Medio NaOH $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. c) Medio NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. d) Medio tetraborato de sodio $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L..... 68

Figura 22: Espectros de absorción del par iónico VC-OTC en diferentes extractantes orgánicos en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. a) cloroformo, b) diclorometano, c) 1,2 dicloroetano, d) tetracloruro de carbono. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L..... 69

Figura 23: Espectros de absorción de la extracción de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L, OTC $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L y VC-OTC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L - $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L en cloroformo en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$ 71

Figura 24: Estructura del colorante violeta cristal, y equilibrio ácido-base..... 72

Figura 25: Espectro de ^1H RMN en D_2O de OTC-sólido Sigma..... 74

Figura 26: Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-sólido Merck..... 75

Figura 27: Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-medio NaOH extraído en cloroformo..... 76

Figura 28: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio NaOH..... 77

Figura 29: Espectros de ^1H RMN en $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ de OTC-sólido Sigma..... 78

Figura 30: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-medio tetraborato extraído en cloroformo.. 79

Figura 31: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio tetraborato extraído en cloroformo..... 79

Figura 32: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 de VC medio amoniacal extraído en cloroformo.. 80

Figura 33: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio amoniacal..... 81

Figura 34: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 -DMSO- d_6 de OTC sólido Sigma. a) Medio agua destilada. b) Medio agua destilada/ NH_3 82

Figura 35: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 . a) VC y VC-OTC. b) OTC y VC-OTC. Medio amoniacal..... 83

Figura 36: Esquema de la posible formación del par iónico VC-OTC..... 85

Figura 37: Espectro bidimensional COSY del par iónico VC-OTC en CDCl_3 . Medio amoniacal.... 88

Figura 38: Espectro bidimensional ROESY del par iónico VC-OTC en CDCl_3 . Medio amoniacal. 88

Figura 39: Espectros bidimensionales ROESY del par iónico VC-OTC en CDCl_3 . Medio amoniacoal. a) Gráfico entre 6.0 a 7.33 ppm. b) Gráfico entre 7.0 a 7.6 ppm	89
Figura 40: Espectros IR medio amoniacoal. (a) Par iónico VC-OTC (b) VC	91
Figura 41: Espectros clásicos del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes concentraciones de OTC. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L	93
Figura 42: a) Espectros de absorción de OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de OTC, a $\lambda_{\text{máx}}$ 364,0 nm.	95
Figura 43: a) Espectros de absorción de VC $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de VC, a $\lambda_{\text{máx}}$ 380,0 nm	95
Figura 44: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$ a) Espectros derivados en rango de longitud de onda 190-800 nm. b) Zoom de espectros derivados entre 300 y 550 nm. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L	97
Figura 45: a) Espectros de segundas derivadas de VC-OTC $8,0 \times 10^{-6}$ - $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$, a diferentes tiempos de extracción. b) Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica a $\lambda_{\text{máx}}$ 380,0 nm	100
Figura 46: a) Espectros de segundas derivadas de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$, a diferentes tiempos de extracción. b) Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica a $\lambda_{\text{máx}}$ 380,0 nm.	100
Figura 47: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$, volumen acuoso de 100 mL. Concentración VC: $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$ y $6,0 \times 10^{-7}$ mol/L	101
Figura 48: Gráfico de Pareto para VC-OTC	104
Figura 49: Superficie de respuesta estimada para VC-OTC. (a) Variables: concentración VC y cantidad de NH_3 agregado. (b) Variables: volumen extractante y tiempo de extracción	105
Figura 50: Gráfico de efectos principales para VC-OTC.	106
Figura 51: a) Espectros derivados de primer orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$. b) Zoom de la Figura 48. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.	108
Figura 52: a) Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$. b) Zoom de la Figura 49. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.	108
Figura 53: Espectros derivados de tercer orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacoal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y	

20,0x10⁻⁷ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000. 109

Figura 54: Espectros derivados de cuarto orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH 9,0±0,2. Concentración VC: 1,5x10⁻⁵ mol/L y OTC: 4,0x10⁻⁷, 8,0x10⁻⁷, 12,0x10⁻⁷, 16,0x10⁻⁷ y 20,0x10⁻⁷ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000. 109

Figura 55: Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH 9,0±0,2. (a) Factor de suavizado de 5.000. (b) Factor de suavizado de 10.000. (c) Factor de suavizado de 20.000. (d) Factor de suavizado de 40.000. Concentración VC: 1,5x10⁻⁵ mol/L y OTC: 4,0x10⁻⁷, 8,0x10⁻⁷, 12,0x10⁻⁷, 16,0x10⁻⁷ y 20,0x10⁻⁷ mol/L. Factor de escala 10.000. 111

Figura 56: Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH 9,0±0,2. (a) Factor de escala 1.000. (b) Factor de escala 10.000. (c) Factor de escala 100.000. (d) Factor de escala 1.000.000. Concentración VC: 1,5x10⁻⁵ mol/L y OTC: 4,0x10⁻⁷, 8,0x10⁻⁷, 12,0x10⁻⁷, 16,0x10⁻⁷ y 20,0x10⁻⁷ mol/L. Factor de suavizado de 20.000. 112

Figura 57: a) Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH 9,0±0,2. Concentración VC: 1,5x10⁻⁵ mol/L y OTC: 4,0x10⁻⁷, 8,0x10⁻⁷, 12,0x10⁻⁷, 16,0x10⁻⁷ y 20,0x10⁻⁷ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 10.000. b) Gráfica de la curva de calibración del par iónico VC-OTC. 114

Figura 58: Espectros de interferentes tipo productos farmacéuticos a una concentración 6,0x10⁻⁵ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden. 118

Figura 59: Espectros de interferentes tipo sustancias no autorizadas a una concentración 6,0x10⁻⁵ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden. 118

Figura 60: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en presencia de una concentración constante de interferentes tipo productos farmacéuticos y de sustancias no autorizadas. a) Sustancias que no interfieren en la señal del par iónico. b) Sustancias que interfieren en la señal del par iónico. Concentración VC 1,5x10⁻⁵ mol/L equivalente a 6.120 µg/L y OTC 4,0x10⁻⁷ mol/L equivalente a 200 µg/L. 119

Figura 61: Espectros de interferentes tipo contaminantes industriales a una concentración 6,0x10⁻⁵ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden. 121

Figura 62: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC, en presencia de una concentración constante de interferentes tipo contaminantes. Concentración VC 1,5x10⁻⁵ mol/L equivalente a 6.120 µg/L y OTC 4,0x10⁻⁷ mol/L equivalente a 200 µg/L. 122

Figura 63: Espectros del VC, de la extracción de muestras blancos de músculo de salmón, eluidos con diferentes solventes y comparados con VC de muestras sintéticas. Concentración VC 1,5x10⁻⁵ mol/L. a) Espectros de absorción. b) Espectros derivados. 125

Figura 64: Comparación de los espectros de absorción del VC; VC/oxalico y matriz VC/oxalico medio amoniacal pH 9,0±0,2. 126

Figura 65: a) Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en músculo de salmón en medio amoniacal pH 9,0±0,2. Concentración VC: 1,5x10⁻⁵ mol/L y OTC: 1,2x10⁻⁸, 1,6x10⁻⁸, 2,0x10⁻⁸, 4,0x10⁻⁸ y 6,0x10⁻⁸ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 10.000. b) Zoom de la Figura 61. Concentraciones OTC: 1,2x10⁻⁸, 1,6x10⁻⁸, 2,0x10⁻⁸, mol/L. c) Zoom de la Figura 61. Concentraciones OTC: 2,0x10⁻⁸, 4,0x10⁻⁸, 6,0x10⁻⁸, mol/L. d) Gráfica de la curva de calibración del par iónico VC-OTC. 128

LISTA DE ABREVIATURAS

LMR	Límite Máximo Residual
Sernapesca	Servicio Nacional de Pesca
UV-Vis	Ultravioleta Visible
TLC	Cromatografía capa fina
HPLC¹	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CE	Electroforesis Capilar
GC	Cromatografía Gases
LLE	Extracción Líquido-Líquido
SPE	Extracción Fase Sólida
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
T₁	Tiempo de Relajación o Relajación Longitudinal
IR	Infrarrojo
UD	Unidad de Derivada
COSY²	Espectroscopía de Correlación
ROESY³	Espectroscopía del efecto rotacional nuclear Overhauser

De las siglas en inglés:

¹ "High Performance Liquid Chromatography"

² "Correlation Spectroscopy"

³ "Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy"

RESUMEN

En los últimos 30 años la industria salmonera, tanto nacional como mundial, ha crecido aceleradamente transformándose en una de las experiencias bio-tecnológicas más exitosas. Sin embargo, este rápido crecimiento ha traído consigo diversos problemas de tipo sanitario. Para enfrentar enfermedades de origen bacteriano, se han utilizado diversos fármacos antimicrobianos de uso veterinario mezclados con el alimento, produciendo una gran contaminación en el medio acuático con grandes cantidades de droga activa.

Tanto esta contaminación, como la presencia de antibióticos en el producto final, trae asociado problemas para la salud humana. Es por ello que existen normativas vigentes en Chile y en los principales países exportadores e importadores de salmón, que normalizan la cantidad máxima permitida de algunos antibióticos en carne y piel de pescado destinadas al consumo humano.

En este contexto, es necesario disponer de métodos de determinación cuantitativos simples y de baja sofisticación instrumental.

Durante la realización de esta tesis, se desarrollaron metodologías por espectrofotometría derivada de primer orden, para la determinación individual o simultánea de pares de los tres antibióticos comúnmente utilizados en la acuicultura chilena, oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina. La proyección de la aplicación de

estos métodos, sería en alimento de peces, porque las concentraciones de estos antibióticos en estas matrices son mayores a los límites de cuantificación encontrados de $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Por otra parte, se desarrolló un método analítico basado en la formación de par iónico para la determinación de oxitetraciclina en músculo de salmón, utilizando una técnica de determinación sencilla y de bajo costo instrumental como es la espectrofotometría derivada. Para ello, se incorporó un colorante de gran conjugación, violeta cristal que interactuó con oxitetraciclina en medio amoniacal mediante una interacción de tipo electrostática. Luego el par iónico fue extraído en cloroformo y la evaluación de la señal analítica se realizó en dicho solvente por espectrofotometría derivada de segundo orden.

La formación del par iónico VC-OTC, se confirmó por técnicas espectroscópicas, ^1H RMN, cálculos de T_1 , resonancia bidimensional y por FT-IR.

La optimización de las variables fisicoquímicas y de extracción se realizaron por las metodologías univariadas y por diseño experimental factorial, en un rango de concentración del antibiótico entre $4,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$. De estas optimizaciones, se obtuvieron los siguientes resultados: concentración de VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L, concentración de NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L (pH $9,0 \pm 0,2$), volumen de extractante 6 mL y tiempo de extracción 4 minutos. De esta manera, se logró preconcentrar al antibiótico obteniéndose límites de cuantificación en músculo de salmón de 71 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, los cuales se encuentran bajo los límites máximos residuales de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, para oxitetraciclina, que estipula la norma chilena para este tipo de matrices.

ABSTRACT

Over the past 30 years the salmon industry, both domestically and globally, has grown rapidly, becoming one of the most successful bio-technological experiences. However, this rapid growth has brought diverse problem of sanitary type. To deal with diseases of bacterial origin, several antibiotics veterinary has been used mixed with food. These facts produce pollution in the aquatic environment with large amounts of active drug.

These contaminations, along with the presence of these antibiotics in the final product, produce human health problems. It is for this reason that Chilean law regulates the maximum concentration allowed of some of these antibiotics in fish meat and skin destined for human consumption.

In this context, it becomes necessary to have quantitative methods of determination for this type of antibiotics, considering that these need to be simple, of low instrumental sophistication.

During the realization of this thesis, methodologies were developed by spectrophotometry derivative of the first order, for determining individual or simultaneous pairs of the three antibiotics commonly used in the Chilean aquaculture, oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine. The projection of the implementation of these methods, it is in food fish, because the concentrations of these antibiotics in these

matrices are higher than the limits of quantification found of 5.0×10^{-6} mol/L.

On the other hand, an analytical methodology was developed, based on ion-pair formation for the determination of oxytetracycline (OTC) in salmon muscle, using a simple and inexpensive instrumental such as derivative spectrophotometry. In this methodology incorporates the use of the well known dye crystal violet (CV), which interacts with oxytetracycline by electrostatic interactions in an ammonia medium. Then the ion-pair formed is extracted into chloroform. The analytical signals were evaluated in the same solvent by second order derivative spectrophotometric technique.

The formation of the ion-pair CV-OTC was confirmed by spectroscopic techniques which included ^1H NMR, two dimensions spectroscopy and FT-IR.

The optimizations of the physical-chemical and extraction variables were performed by univariate and methodologies for experimental factorial design, in a range of concentration of the antibiotic between 4.0×10^{-7} and 20.0×10^{-7} mol/L. The optimizations given the following results: VC concentration of 1.5×10^{-5} mol/L, concentration of NH_3 2.0×10^{-4} mol/L (pH 9.0 ± 0.2), extracting volume of 6 mL and time extraction 4 minutes. In this way, we were able to obtain the antibiotic preconcentration limits of quantification in muscle of salmon of 71 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, which is below the maximum residual of 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, for oxytetracycline, which stipulates the standard for this type of Chilean matrixes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

En el curso de los últimos 30 años la industria salmonera, tanto nacional como mundial, ha experimentado una acelerada expansión, en cuanto a tecnología, producción y comercialización. Chile, al tener un amplio borde costero, se ha constituido en un importante productor y exportador de salmones, lo que hace que este recurso sea de gran relevancia para nuestra economía. En la actualidad, Chile es el segundo productor mundial de salmones, sólo superado por Noruega. De acuerdo con un informe elaborado por Salmón Chile, las exportaciones totales de salmón y trucha en el período enero a noviembre de 2007 acumularon 354.877 toneladas, volumen mayor en 4,5 % veces, respecto del exportado en el mismo período de 2006 (Salmón Chile, 2008). Con lo que respecta a este año, un informe reciente, señala que las exportaciones de salmón y trucha aumentaron un 11% a febrero de 2008, respecto a igual periodo del año anterior, las cuales totalizaron 104.637 toneladas netas de salmón y trucha durante los dos primeros meses del año.

Las especies cultivadas en Chile son: salmón Cereza (*oncorhynchus masou*), salmón Rey (*oncorhynchus tshawytscha*), salmón Rosado (*oncorhynchus gorbusscha*), trucha Café (*salmo trutta*), trucha Arco iris (*oncorhynchus mykiss*), salmón Coho (*oncorhynchus kisutch*) y salmón Atlántico (*salmo salar*), siendo las tres últimas las más comercializadas. De estas especies, el salmón Atlántico tiene particular

importancia, debido a que se cosecha en todas las épocas del año y es el de mayor exportación, siendo Japón el principal mercado de destino, seguido por Estados Unidos y la Unión Europea (Aqua Noticias, 2008; Sernapesca, 1999).

El rápido crecimiento de la industria salmonera, ha traído como consecuencia diversos problemas de tipo sanitario que afectan la producción de estas especies, como es la presencia de enfermedades parasitarias, virales y bacterianas (Benbrook, 2002; Miranda y Zemelman, 2002^a), siendo estas últimas las responsables del 40 al 45% de las mortalidades totales de peces salmonídeos en cultivo (Cabello, 2004). En este contexto, las medidas de prevención y control de enfermedades bacterianas son fundamentales, existiendo hoy en día diversas soluciones. En este contexto, la industria farmacéutica ha desarrollado productos químicos biológicamente activos destinados al control de patógenos, permitiendo minimizar las pérdidas económicas generadas por estas enfermedades. Entre los productos farmacéuticos actualmente disponibles se encuentran: vacunas, antibióticos y sulfas que pueden actuar en forma individual y/o en conjunto, existiendo diferentes formas de administración, entre ellas:

- *Tratamiento vía oral*: El antibiótico es suministrado en el alimento.
- *Tratamiento por baño*: El medicamento es adicionado al agua de la unidad de cultivo a tratar, cerrando previamente la entrada y salida de agua para lograr un volumen de agua conocido y constante, por lo general dura 1 hora. Una vez finalizado el tratamiento, se restaura el flujo normal de agua.
- *Tratamiento por flujo*: En este caso, se prepara una solución estándar del medicamento, el cual es adicionado en la entrada de agua de la unidad de cultivo a tratar, para que se diluya por un tiempo determinado (normalmente 1 hora).
- *Tratamiento por inyección*: Normalmente utilizado para tratar un número reducido de

peces, generalmente adultos valiosos (reproductores). El medicamento puede ser inyectado por diferentes vías: subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

Debido a las características farmacocinéticas de los antibióticos, la dosis efectiva varía según el fármaco antimicrobiano y de la vía de administración. A modo de ejemplo, en trucha arcoiris, tras una administración oral de una dosis de 75 mg/Kg de oxitetraciclina el 5,6% es absorbido y tras una administración intramuscular de una dosis de 60 mg/Kg, el 85% es absorbido (USP, 2003).

En Chile y tal como ocurrió en Noruega, los esfuerzos de disminuir los volúmenes de fármacos, están orientados al desarrollo de vacunas más efectivas para el control de enfermedades, conscientes que la prevención es la mejor estrategia contra las enfermedades.

1.1.1. Control de residuos

Desde su descubrimiento, el uso de fármacos antimicrobianos se ha masificado a nivel mundial, tanto en la medicina humana como veterinaria, utilizándose comúnmente como agentes terapéuticos para combatir enfermedades infecciosas de tipo bacterianas. En el caso veterinario, 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. Su uso y abuso generalizado en salmonicultura provoca distintos problemas, como es la aparición de resistencia bacteriana tanto en las especies cultivadas como en los entornos acuáticos donde se desarrolle la

actividad, tema de bastante preocupación a nivel mundial. La administración de estas drogas en general, se realiza integrándolas a la alimentación (Cravedi y col., 1987). Debido a la baja absorción y digestibilidad de los fármacos por esta vía, se genera una considerable contaminación del medio acuático y sedimentos, debido al alto contenido de fecas con altas dosis de antibióticos y de grandes cantidades de alimentos no consumidos por los salmones en cautiverio.

Los primeros intentos de control de infecciones bacterianas en peces, se efectuaron a fines de los años 30, mediante el empleo de sulfonamidas en explotaciones acuícolas de los Estados Unidos. En forma paralela, se inició la investigación de los posibles efectos nocivos que implica la presencia de concentraciones residuales de fármacos en los productos de origen animal destinados al consumo humano (Burka y col., 1997). Actualmente, se conoce que la presencia de concentraciones residuales de fármacos antimicrobianos en músculo de salmón, pueden desencadenar efectos adversos en la salud humana. Estos riesgos se centran fundamentalmente en reacciones de hipersensibilidad en la piel, faringe y genitales; efectos tóxicos específicos; alteraciones en la flora intestinal humana y generación de cepas resistentes (Cabello, 2004). la cual ha avanzado en forma creciente y se ha convertido en la actualidad, en la mayor amenaza para la salud pública. La exposición a los fármacos antimicrobianos puede fundamentalmente alterar tanto la salud humana, animal y la ecología microbiana del medio ambiente, así como también todo el ambiente que los rodea (tierra, aire y agua).

Es por esto que es de vital importancia detectar trazas de fármacos antimicrobianos y disponer de un programa eficaz de control de residuos en tejidos de

peces, ya que además de tener un beneficio directo sobre la protección a la salud, permite que un país pueda participar con mayor confianza en la comunidad de naciones que comercializan estos alimentos. Es así que, organismos internacionales tales como 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*, han normado sobre el uso racional de antibióticos, antiparasitarios, entre otros, recomendando en materias de calidad y protección alimentaria, destinadas a proteger la salud del consumidor y garantizar que el intercambio entre los países se base en prácticas conjuntas. Esto ha llevado a la actualización de las reglamentaciones existentes en Chile, de acuerdo a los nuevos criterios de armonización mundial.

En el caso de los fármacos antimicrobianos, la comisión del *Codex Alimentarius* fija distintos parámetros que permiten asegurar la inocuidad de los alimentos. Entre ellos el Límite Máximo Residual (LMR), que se define como la concentración máxima de residuos resultantes del uso de un medicamento veterinario, (expresada en mg/Kg del peso del producto fresco), que recomienda como legalmente permisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo (Sernapesca, 2005).

En Chile, el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) tiene la misión de aplicar y hacer cumplir las normas que rigen a las actividades pesqueras y cuenta con un programa de aseguramiento de calidad (PAC) que contempla la presencia de residuos. De acuerdo al programa de control de fármacos, los LMRs permitidos por mercados regulados en carne y piel de pescados son presentados en la Tabla 1¹.

¹ Sernapesca, 2005. "Programa control de fármacos".

Tabla 1: Límites máximos residuales establecidos por mercados regulados en carne y piel de pescado.

Productos Farmacéuticos	USA	Unión Europea	Japón	Chile
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
Sulfas (Sulfadoxina)	Ausencia	100 µg/Kg	Ausencia	-
Trimetoprim	Ausencia	50 µg/Kg	Ausencia	-
Florfenicol	Ausencia	1000 µg/Kg	Ausencia	1000 µg/Kg
Eritromicina	Ausencia	200 µg/Kg	Ausencia	200 µg/Kg
Enrofloxacino	Ausencia	100 µg/Kg	Ausencia	-
Amoxicilina	Ausencia	50 µg/Kg	Ausencia	-
Espiramicina	Ausencia	Ausencia	200 µg/Kg	-
Ivermectina	Ausencia	Ausencia	Ausencia	-
Benzoato de Emamectina	Ausencia	100 µg/Kg	Ausencia	100 µg/Kg

Los antimicrobianos utilizados para el control de las enfermedades en la acuicultura chilena, principalmente en la industria del salmón, son los mismos que se utilizan en otros países donde el cultivo del salmón es una actividad económica importante. Sin embargo, los LMRs para cada uno de los fármacos difieren entre los países productores de especies acuícolas. Para ello, los productores de estas especies destinadas a exportación, han debido cumplir con las normativas impuestas por los países importadores. Los antibióticos comúnmente utilizados en la acuicultura chilena y

verificados por sus programas de aseguramiento de calidad en la determinación de control de residuos en toda época del año son oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina.

Oxitetraciclina (OTC), antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las tetraciclinas (TCAs), fue estudiado para su potencial utilización en acuicultura mucho después de que estuviese disponible para su uso en medicina humana (Oka y col., 2000; Miranda y Zemelman, 2002^b). Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de las proteínas bacterianas por fijarse a la subunidad 30s del ribosoma (Chopra y Roberts, 2001).

En la Figura 1 se muestra la estructura de OTC, la cual presenta un esqueleto de hidronaftaceno que contiene cuatro anillos fundidos. En general, las tetraciclinas son agentes quelantes y su actividad antibacteriana y sus propiedades farmacocinéticas están influenciadas por la quelación de iones metálicos. El sitio de quelación incluye el sistema β -dicetona (posición 11 y 12), y los grupos enol (posición 1 y 3) y carboxamida (posición 2) del anillo A (Chopra y Roberts, 2001).

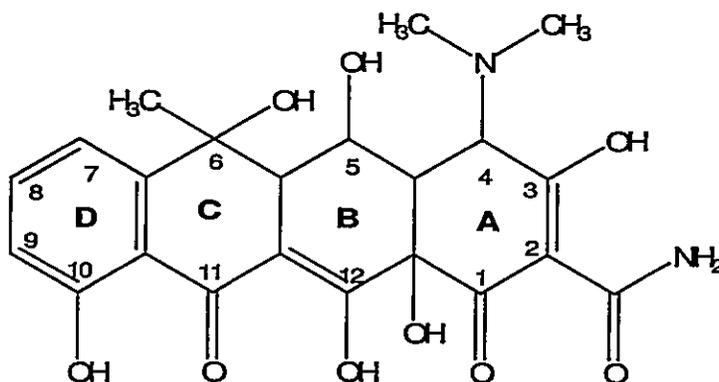


Figura 1: Estructura de oxitetraciclina.

OTC, es una molécula que posee propiedades ácido base, debido a la presencia de grupos hidroxilos y amino, siendo la especie predominante dependiente del pH. De acuerdo a la literatura OTC presenta tres valores de pKa, el primero corresponde al C₃-OH (pKa₁ 3,2), el segundo al C₄-N (CH₃)₂ (pKa₂ 7,5), y el tercero al C₁₀-OH (pKa₃ 8,9) (Qiang y Adams, 2004).

Además, este compuesto es soluble en ácidos, bases, alcoholes y solventes orgánicos polares y es extraíble con algunos solventes orgánicos tales como *n*-butanol y etil acetato. No obstante, es inestable a pH altamente ácidos o básicos, cuando es sometida a elevadas temperaturas por largos períodos de tiempo y en medios de alta humedad. Bajo estas condiciones, OTC puede experimentar epimerizaciones y formar mezclas de otras TCAs (Oka y col., 2000). Sin embargo, bajo un ajuste adecuado de las condiciones de trabajo, este compuesto es estable entre 1 a 6 meses, lo que permite realizar su determinación analítica (Mulders y Van de Lagemaat 1989; Cinquina y col., 2003; Lykkeberg y col., 2004; Fletouris y Papapanagiotou, 2008).

Como se mencionó anteriormente, las TCAs tienen gran capacidad de formar complejos con cationes di y trivalentes (Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, VO²⁺, Eu³⁺), (Brion y col., 1986; de Paula y col., 1999; Liu y col., 2002; Arias y col., 2005) debido a la presencia de grupos cetónicos y enoles. Estos complejos pueden interactuar con los grupos silanoles de la sílica gel durante una separación cromatográfica, provocando picos mal definidos de TCAs. Con el fin de eliminar esta interferencia, al eluyente se han agregado agentes quelantes, tales como ácido oxálico y sales de EDTA para la formación de complejos con cationes metálicos y así evitar la interacción de éstos con la fase estacionaria (Stolker y Brinkman, 2005).

Por otra parte, OTC ha sido determinada en diversas matrices, por ejemplo en formulaciones farmacéuticas, miel, muestras de tejido animal, orina, plasma, leche, huevos, (Oka y col., 2000), matrices medioambientales; aguas y suelos (Zhu y col., 2001; Halling-Sørensen y col., 2003; Pouliquen y col., 2007), por diferentes técnicas de separación cromatográficas, entre ellas: capa fina (TLC) fase reversa, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia, UV, arreglo de díodos, masa (MS) y electroforesis capilar (CE), alcanzando límites de detección entre 0,05 y 0,1 mg/Kg (Croubels y col., 1994; Touraki y col. 1995; Pouliquen y col., 1997; Blanchflower y col., 1997; Oka y col., 1998; Coyne y col., 2004; Wen y col., 2006).

Otro grupo de agentes antimicrobianos utilizados ampliamente en la industria salmonera son las quinolonas. Éstas, pertenecen a un grupo de antibióticos que tienen en común la presencia de un anillo 4-quinolona-3-carboxilato (anillo pirimidínico), cuyo sitio de acción es la enzima bacteriana ADN girasa o topoisomerasa II. Las quinolonas inhiben algunas de las actividades catalíticas de la ADN girasa bacteriana (Hooper, 1999). En este contexto, las quinolonas ejercen su toxicidad sobre la célula bacteriana, estabilizando el ADN de doble hebra que ha sido roto por la ADN girasa, de manera que el posterior ligamiento no puede ocurrir. Entre las quinolonas utilizadas en la industria salmonera se encuentran el **ácido oxolínico (OXO)** (Figura 3-a) y la **flumequina (FLU)** (Figura 3-b). Esta última corresponde al grupo de las fluoroquinolonas, que contienen un átomo de flúor en la posición 6 mejorando la penetración celular y la afinidad por la ADN girasa (Bryskier y Chantot, 1995; Hernández-Arteseros y col., 2002).

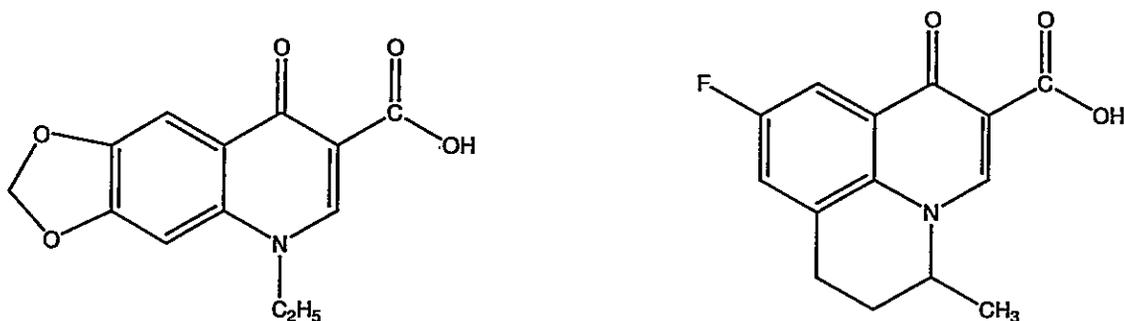


Figura 2: Estructuras de quinolonas. a) Ácido oxolínico. b) Flumequina.

Generalmente, la determinación de estos antibióticos se ha realizado por diversas técnicas a pH cercano a la neutralidad, con el objeto de favorecer sus estabildades. (Bryskier y Chantot, 1995; Ramos y col., 2003). Estas quinolonas son solubles en solventes orgánicos polares, en medios ácidos y básicos acuosos. Asimismo, presentan propiedades ácido base al poseer un grupo ácido carboxílico, con un pka cercano a 7,0 (Luetzhof y col., 2000; Turiel y col., 2003).

De acuerdo al review de Hernández-Arteseros y col., 2002, OXO y FLU han sido determinadas generalmente en tejido muscular animal, ya sea en pescado, pollo, cerdos, aves de corral, bovinos, pero también se ha reportado la presencia de estos antibióticos en huevos, leche y miel. La separación cromatográfica de quinolonas se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida (LC), utilizando detectores de UV-Vis, fluorescencia (FI) o masa (MS), siendo la más utilizada la determinación con detección FI por ser más sensible y selectiva que la detección UV y MS. La cromatografía gaseosa con detector de masa (GC-MS) se ha utilizado como una herramienta de confirmación después de la determinación por LC-FI, así como para la cuantificación de quinolonas ácidas. Los límites de detección alcanzados por estas técnicas de determinación están entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que para TLC se encuentran en el

orden del mg/Kg. También este grupo de antibióticos han sido determinados por métodos no cromatográficos tales como; técnicas de luminiscencia e inmunoensayos, siendo más bien utilizados como métodos de "screening".

Otros antibióticos utilizados periódicamente en la industria salmonera, son **florfenicol (FLOR)** y **eritromicina (ERY)**. Pese a que la determinación de dichos fármacos no son consideradas en esta tesis, se dará un breve resumen de su utilización.

FLOR, es un antibiótico bacteriostático sintético de amplio espectro (Figura 4), con un rango de actividad similar a la de cloranfenicol, sin embargo, no conlleva el riesgo de inducir anemia aplásica en humanos, enfermedad asociada con cloranfenicol.

El mecanismo de acción de FLOR es inhibir la síntesis proteica por unión al ribosomas 70S, como se demostró en un sistema libre de células. Esta es la base de la toxicidad selectiva del florfenicol (Macorni y col., 1990). En Chile, se utiliza para el tratamiento de enfermedades en salmón Atlántico (Hormazabal y col. 1996; Vue y col., 2002; Stolker y Brinkman, 2005).

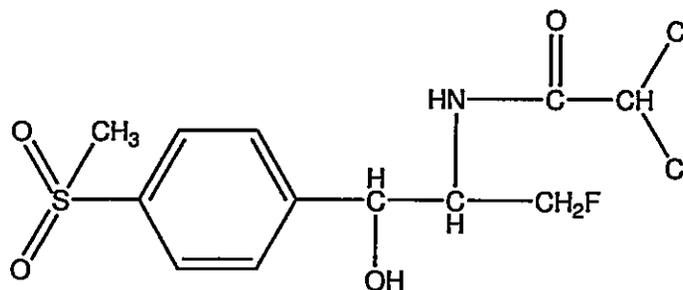


Figura 3: Estructura de florfenicol.

De acuerdo al artículo de Schwarz y col., 2004, esta molécula no es ionizable entre pH 3,0 y 9,0 y es poco soluble en soluciones acuosas. Además, por ser una molécula lipofílica FLOR presenta buena penetración en tejidos.

FLOR ha sido determinada por GC, HPLC con detección MS y UV, en sedimentos, aguas superficiales, músculo y plasma de pescado, (Nagata y Oka, 1996; Hormazabal y col. 1996; Vue y col., 2002; Sørensen y Elbæk, 2004; Schwarz y col. 2004; Pouliquen y col., 2007).

El último antibiótico autorizado en la salmonicultura chilena es ERY, fármaco perteneciente al grupo terapéutico de los macrólidos (Figura 5), cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas (Leclercq y Courvalin, 2002). Efectiva contra bacterias gram positivas. Es un antibiótico, que se utiliza extensamente en medicina humana y veterinaria, para tratar enfermedades respiratorias, o como aditivos en la alimentación para promover el crecimiento.

ERY, es una molécula básica (pKa 8,9) y lipofílica constituida por un anillo de lactona de 14 átomos y dos carbohidratos ligados vía enlaces glucosídicos (Leclercq y Courvalin, 2002; Qiang y Adams, 2004).

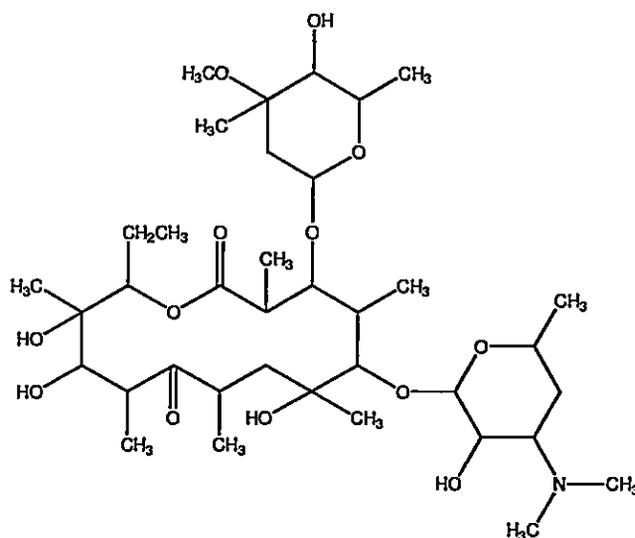


Figura 4: Estructura de eritromicina.

Diversos trabajos han sido reportados para la determinación de ERY por HPLC con detección electroquímica (Terespolsky y Kanfe, 1995) y por LC-MS, en medios ligeramente ácidos y básicos, (Dubois y col., 2001; Leclercq y Courvalin, 2002). La determinación de este antibiótico se ha realizado en diferentes matrices tales como: sangre, orina, diversos tejidos de origen animal, huevos, leche en formulaciones farmacéuticas (Horie y col., 1998; Dubois y col., 2001) y en matrices medioambientales (Hirscha y col., 1999; Schlusener y col., 2003; Yang y Carlson, 2004; Jacobsen y col., 2004;).

1.1.2. Determinación de antibióticos

Disponer de métodos analíticos que permitan determinar antibióticos que satisfagan los LMRs es de vital importancia para la salmonicultura. Actualmente, existen diversas metodologías analíticas para la determinación de concentraciones residuales de antibióticos en alimentos de origen animal. Entre ellos, métodos

microbiológicos cuantitativos (Pearson e Inglis, 1993) y los mencionados anteriormente (CE, GC, TLC, HPLC). No obstante, algunos de estos métodos no permiten alcanzar los límites máximos permitidos, requiriéndose de instrumentación más sofisticada y de alto costo con detectores altamente específicos, con el fin de obtener bajos límites de detección y alta selectividad. Para lograr las condiciones requeridas, a los cromatógrafos líquidos se les han acoplado hasta dos detectores de masa (Alfredsson y col., 2005; Sanderson y col., 2005). Sin embargo, la mayoría de estos métodos pueden presentar interferencias espectrales o señales analíticas mal definidas. Es por ello que las muestras a analizar requieren de tratamientos más avanzados de purificación, tales como; técnicas de extracción en fase sólida (SPE) o polímeros impresos moleculares (MIPS) (Díaz-Cruz y col., 2003).

En general, los métodos de determinación de antibióticos en matrices biológicas, utilizan un tratamiento de limpieza previo a la medición instrumental. Estos consisten en extracciones líquido-líquido (LLE) y/o extracciones en fase sólida (SPE). Sin embargo, los procedimientos de limpieza varían según la matriz y el solvente utilizado en la extracción. Por ejemplo, para extracción de quinolonas desde muestras de tejido animal, LLE es la técnica preferida de limpieza después de la extracción con solventes orgánicos de alto grado de pureza. Otros procedimientos de limpieza empleados para la extracción de quinolonas están basados en SPE (Touraki y col., 2001), utilizando comúnmente cartuchos de fase reversa C_{18} o C_8 , y los eluyentes comunes son una mezcla de metanol-agua básica o metanol puro. Estos procedimientos se aplican principalmente después de la lixiviación de quinolonas con solventes orgánicos polares. Además, en algunos casos los extractos se desengrasan con un solvente apolar. Un porcentaje menor de métodos cuantitativos, no realizan

limpieza a la muestra (Roudaut y Yorke, 2002; Hernández-Arteseros y col., 2002).

Para la extracción de OTC desde músculo de salmón, diversos métodos han sido publicados (Anderson y col., 2005). Sin embargo, el más utilizado es aquel que realiza la extracción acuosa con amortiguador Mcllvaine/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 Mcllvaine-EDTA pH 4,0 y la posterior percolación de OTC con ácido oxálico (Sokol y Matisova, 1998). Otras fases sólidas utilizadas en la etapa de limpieza de la muestra son aquellas que contienen soportes poliméricos de: sephadex G-25, hidrofílico-lipofílico (HLB), resina amberlita XAD-2, ciclohexil (CH), fenil y aminos (Aoyama y col., 1991; Anderson y col., 2005). Por otro lado, Coyne y col., 2004, eliminan la etapa de limpieza de la muestra, realizando la extracción de OTC desde músculo de salmón en un solo paso, siendo más bien un método de "screening".

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.

A pesar de realizar dos extracciones de OTC desde músculo de salmón y de incluir una etapa previa de limpieza a la muestra, los porcentajes de recuperación de OTC reportados varían entre un 75 y 90%. Estos resultados pueden ser atribuidos a la reactividad de este antibiótico (H. Oka y col., 2000; Instituto Salud Carlos III).

Por otra parte, se han reportado trabajos en los cuales la extracción de OTC desde músculo de salmón se realiza con solventes orgánicos polares, como por ejemplo, etil acetato y acetonitrilo que utilizan hexano para desengrasar la muestra biológica, se encuentran recuperaciones cercanas al 90% (Touraki y col., 1995; Cooper y col. 1998).

En general, estos procedimientos junto con los métodos anteriormente descritos, permiten identificar y alcanzar niveles de sensibilidad adecuados a los requerimientos del mercado, no obstante, su elevado costo en instrumentación limita su uso sólo a algunas instituciones.

Sobre la base de lo expuesto, es necesario disponer de métodos de detección cuantitativos para este tipo de antibióticos, que sean simples, de bajo costo de instrumentación y que cumplan las condiciones de calidad analítica para que puedan ser empleados en laboratorio de control.

En este contexto, el aporte de la presente tesis se centra en el desarrollo de una nueva metodología analítica basada en la formación de pares iónicos para la determinación de oxitetraciclina en músculo de salmón, utilizando una técnica de determinación sencilla y de bajo costo instrumental como es la espectrofotometría derivada. Para ello la incorporación de un colorante de gran conjugación que interactúe con oxitetraciclina, permitirá sensibilizar esta metodología y así alcanzar los LMR que estipula la norma chilena.

1.2. COLORANTES, Y SU ACCIÓN COMO CONTRA IÓN EN LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

En general, los colorantes contienen grupos funcionales aniónicos, llamados colorantes ácidos o grupos funcionales catiónicos denominados colorantes básicos. Ejemplos de colorantes ácidos son: azul ácido 78, azul de bromotimol, tartrazina, entre otros, que contienen en su estructura grupos sulfónicos, y algunos ejemplos de colorantes básicos son: rodamina B, azul de metileno, safranina O, azul básico 1 que contienen sales de aminas derivadas. Dependiendo de las características ácido base del colorante y del medio de pH en que se encuentre, éste actuará como contra ión, el cual servirá como cromóforo, para realizar determinaciones espectrofotométricas de sustancias que carecen de estos grupos (Smith y col, 1977; Amin y Issa, 1996).

Muchos colorantes orgánicos han resultado ser efectivos agentes formadores de pares iónicos, para varios tipos de sustancias, incluyendo algunos antibióticos. (Bontchev y col., 1984; Shoukry y col., 1997).

La metodología de formación de pares iónicos, se utiliza generalmente para extraer sustancias desde material biológico acuoso, formulaciones farmacéuticas, aguas residuales, entre otras. A modo de ejemplo, para la extracción de un anestésico pentacaina desde material biológico, fue necesario utilizar esta metodología (Scasnár y col., 1984).

La mayoría de los trabajos que reporta la formación de pares iónicos realiza la determinación mediante métodos espectrofotométricos, debido a que al agregar un

cromóforo de gran conjugación al sistema, la probabilidad de que ocurra la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ aumenta y la absorptividad molar se hace mayor. Amin e Issa, 2000^a realizan la determinación espectrofotométrica de compuestos farmacéuticos basado en la interacción de las drogas activas con indicador para originar un compuesto coloreado. Otra determinación espectrofotométrica basada en esta metodología es la determinación de norfloxacin, ofloxacin y ciprofloxacino en formulaciones farmacéuticas con sudan III en medio acuoso-acetona (Amin, 2000)^b. Un trabajo reciente que utiliza la técnica espectrofotométrica, reporta la detección de trazas de fluoxetina en tabletas a nivel de 0,17 mg/L (Parham y col., 2008), donde el catión fluoxetina⁺ formado en solución ácida puede formar par iónico con orange II, un colorante aniónico.

Cabe destacar que, la utilización de estas metodologías principalmente en la industria farmacéutica, ofrece diversas ventajas sobre otros métodos analíticos, en cuanto a simplicidad, rapidez, precisión y sensibilidad del orden de $\mu\text{g/mL}$. (Amin e Issa, 1999).

Otras matrices donde se aplica esta metodología, son en la extracción de iones inorgánicos desde aguas residuales (Taga y col., 1989; El-Shahawi y Aldhaheri, 1996; Rezaei, 2006). Por ejemplo, la determinación espectrofotométrica de cobre en aguas residuales usando extracción líquido-líquido en un sistema de inyección en flujo ha resultado ser una técnica sensible (0,4 mg/L), el procedimiento está basado en la formación de par iónico entre tetrabutil amonio y el anión tetratiocianato de cobre (II) (Alonso y col., 2003). Por otro lado, se ha informado que la determinación espectrofotométrica de la extracción de trazas de perclorato desde muestras de agua,

basado en la formación de par iónico con tionina, tiene un límite de detección de 23,0 ng/mL (Pourreza y Mousavi, 2005).

Para favorecer la formación del par iónico, es indispensable realizar un estudio de variables químicas tales como: concentración del contra ión, pH, fuerza iónica y constante dieléctrica, tomando además en consideración el posible impedimento estérico que presente la formación del par iónico.

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-al menos en 20 veces (Shahawi y Aldhaferi, 1996; Toral y col., 1999^a; Toral y col., 1999^b; Alonso y col., 2003).

La caracterización de pares iónicos ha sido realizada por técnicas espectroscópicas, tales como RMN, FT-IR, Raman (Chang e Irish, 1974; Reich y col., 1993; Rudolph e Irmer, 1994; Phaechamud y col., 2000).

1.3. FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA

La espectrofotometría derivada es una técnica analítica moderna de gran utilidad para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa en la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos (Karpinska, 2004). Se introdujo en la década de los cincuenta, para resolver sistemas cuyos analitos absorben en zonas cercanas, permitiendo obtener la estructura fina de las bandas espectrales. Esta técnica consiste

en la representación gráfica del cociente diferencial $dA/d\lambda$ para la primera derivada, $d^2A/d\lambda^2$ para la segunda derivada, etc., en un intervalo determinado de longitud de onda. Más adelante en la década de los ochenta, la espectrofotometría derivada intensificó su uso, con la introducción de la diferenciación electrónica. La modalidad digital tuvo un mayor desarrollo, el cual consiste en utilizar los datos del espectro de absorción, almacenándolos en la memoria del microprocesador o en un computador en línea, para luego obtener las diferentes derivadas del espectro.

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 aditividades. La diferenciación consiste en derivar la expresión de Lambert-Beer, con respecto a la longitud de onda (λ), obteniéndose la ecuación (1):

$$D^n = \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} cb \quad (1)$$

donde D^n es el valor de derivada de orden n a una determinada λ (nm), ϵ 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 aditividades se mantiene, los espectros derivados de una mezcla son la suma de los espectros derivados de cada componente individual, ecuación (2):

$$D_{mez}^n = D_1^n + D_2^n + \dots + D_x^n \quad (2)$$

donde el valor de derivada de orden n de la mezcla a una longitud de onda analítica,

$D_1^n, D_2^n, \dots, D_x^n$ son los valores de derivadas de orden n a una longitud de onda analítica del componente de la mezcla 1, 2,....., x .

Para utilizar esta técnica, es requisito que los máximos de absorción de los componentes de la mezcla tengan una diferencia mínima de 3 nm.

Es posible obtener espectros derivados de primer hasta cuarto orden del espectro de absorción, (A en función de λ). Estas representaciones gráficas entregan detalles espectrales, los cuales no son observados en un espectro de orden cero o clásico, y permite realizar medidas para determinar simultáneamente la concentración de dos o más analitos o un analito en presencia de interferentes.

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. Además, 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. En este aspecto, la primera y segunda derivada (Figura 5) son de mayor interés para el presente trabajo, ya que perturban en menor grado la sensibilidad. Por el contrario, derivadas de tercer y cuarto orden tienen menor aplicación analítica, debido a que disminuye la intensidad de la señal, si bien están más resueltas presentan un alto ruido de fondo, disminuyendo la relación señal/ruido.

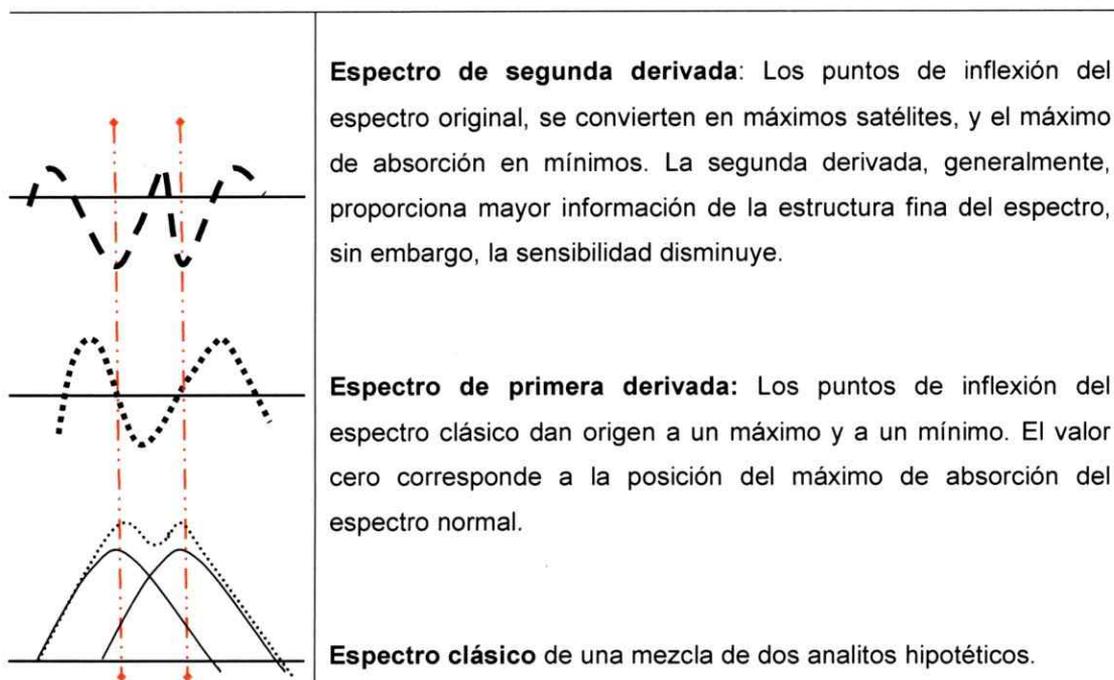


Figura 5: Espectro clásico de una mezcla de dos analitos hipotéticos y sus derivadas de primer y segundo orden.

La cuantificación de la señal analítica puede realizarse por el método “zero crossing” y por el método gráfico.

a) *Método “zero crossing”:* Se utiliza el valor absoluto del eje y del espectro derivado de un compuesto (A), a una longitud de onda donde el compuesto (B), 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 λ toda la señal analítica será atribuida al compuesto (A). Las medidas realizadas a esa longitud de onda en el espectro de la mezcla, podrán ser función solamente de la concentración del compuesto que se analiza. Cabe destacar que todas estas distancias pueden ser expresadas en unidades de longitud (cm o mm) o en unidades de derivadas (UD).

b) *Método gráfico:* En este método uno de los analitos (A) presenta un rango de

longitud de onda en que no presenta señal, pudiendo evaluarse el otro analito (B) en dicho rango. Para favorecer la sensibilidad debe seleccionarse la longitud de onda en que la señal de (B) sea más alta (Figura 6).

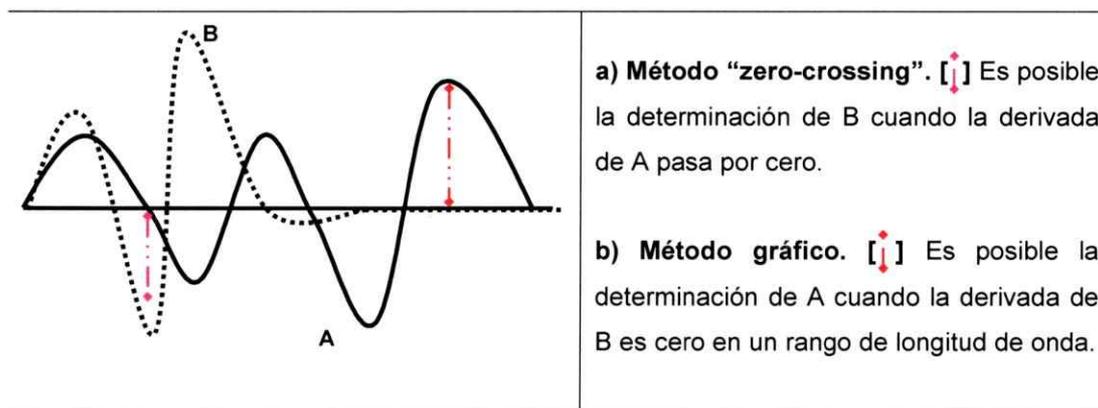


Figura 6: Métodos de cuantificación de la señal analítica.

En este trabajo de tesis se utilizan los dos métodos de cuantificación y la derivada es evaluada por la modalidad basada en el modelo matemático propuesto por Savitzky y Golay. En este modelo matemático la diferenciación y el suavizado se llevan a cabo por la resolución de mínimos cuadrados de un polinomio, minimizando el ruido de fondo asociado. Al utilizar esta modalidad se deben optimizar las siguientes variables espectrales:

- Orden de la derivada: Obtención de máxima resolución y sensibilidad, sin sacrificar la relación señal/ruido. A medida que el orden de la derivada aumenta, disminuye la señal, pero la resolución y el ruido aumentan.
- 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 máxima sensibilidad, alta relación señal/ruido y 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 sólo incide en obtener una buena lectura de la señal analítica, ya que no aumenta sensibilidad.

d) Longitud de onda analítica (λ): 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. 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).

En general, todos los parámetros se interrelacionan entre sí, por lo tanto, deberá buscarse un equilibrio entre ellos.

En lo referente a la resolución de los espectros, la espectrofotometría derivada presenta una gran ventaja ya que la estructura fina que normalmente es difícil de observar en un espectro de orden cero, se resuelve mejor en espectros derivados. En la práctica, esta técnica presenta gran utilidad ya sea, para fines de identificación y/o de cuantificación. Ésta también es utilizada en espectroscopia IR, de absorción atómica, fotometría de llama y en fluorometría (Pandey, 1989; Fernández-González y col., 2002; Wang y col., 2005).

1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

De acuerdo a los diferentes grupos cromóforos que tienen en sus estructuras oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina, se esperaría que presentaran absorciones en el UV-Vis. Frente a ello es posible establecer la determinación simultánea de pares de ellos, por espectrofotometría derivada.

A través de la formación de un par iónico entre la droga iónica oxitetraciclina y colorantes iónicos, se espera observar una modificación espectral, lo cual serviría de base para el desarrollo de nuevos métodos alternativos sensibles para la determinación de este antibiótico en músculo de salmón, para posteriormente evaluar la señal analítica por diferentes modalidades de espectrofotometría derivada UV-Vis.

Mediante una buena elección de colorantes es posible proponer nuevos métodos analíticos, selectivos, sensibles, precisos, exactos y así poder lograr la determinación a niveles de mg/L o $\mu\text{g/L}$, con instrumental de bajo costo y que además puedan ser aplicados en muestras reales.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es optimizar, desarrollar y validar nuevas metodologías analíticas, utilizando espectrofotometría de absorción molecular y/o diferentes modalidades de espectrofotometría derivada, para la determinación de antibióticos utilizados comúnmente en acuicultura chilena. Los métodos a desarrollar se basan por un lado, en la determinación simultánea de pares o tríos de oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina, aplicables a matrices de alto contenido de éstos, y en la formación de par iónico de acuerdo a una interacción de tipo electrostática entre oxitetraciclina-colorante. Este método desarrollado se aplicará en músculo de salmón.

1.5.2. Objetivos Específicos

1. Realizar ensayos preliminares.
 - ◆ Evaluar la factibilidad de determinación simultánea de pares o tríos por espectrofotometría derivada, de oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina.
 - ◆ Evaluar las variables fisicoquímicas sobre la conducta espectral de los antibióticos: pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, luz directa e indirecta, y observar la posibilidad de formación productos de degradación.
 - ◆ Evaluar la fotoestabilidad de los antibióticos.
 - ◆ Conocer la conducta espectral de colorantes, y factibilidad de ellos en la formación de pares iónicos con oxitetraciclina.
2. Caracterizar la interacción analito-colorante por RMN, FT-IR.
3. Desarrollar un método para la determinación de OTC en músculo de salmón.

- ◆ Seleccionar colorantes para la formación de pares iónicos.
 - ◆ Optimizar la extracción líquido-líquido de los pares iónicos formados.
 - ◆ Determinar el coeficiente de reparto del colorante.
 - ◆ Optimizar las variables propias de la técnica. (Longitud de onda analítica, orden de la derivada, factor de suavizado y factor de escala)
 - ◆ Conocer el efecto de interferentes sobre la señal analítica del par iónico, tales como: interferentes biológicos propios de la matriz (proteínas y lípidos), contaminantes orgánicos (aldrín, TDE, heptacloro, mirex, 2,4D, dieldrín, DDT, DDE, PCB's), sustancias prohibidas (verde de malaquita y leuco violeta cristal), además de otros antibióticos utilizados en la acuicultura chilena (ácido oxolínico, flumequina, sulfadoxina, trimetopin, florfenicol, eritromicina, enrofloxacino y benzoato de emamectina) .
 - ◆ Optimizar las etapas de extracción y limpieza en el tratamiento de la muestra de salmón.
4. Determinar parámetros analíticos (límites de detección, de cuantificación, rango de determinación, repetibilidad, exactitud)
 5. Validación de los métodos propuestos en muestras fortificadas.
 6. Comparar los resultados con métodos de referencia.
 7. Aplicar el método al análisis de muestras sintéticas y de músculo de salmón.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS

Tabla 2: Reactivos utilizados para la determinación de antibióticos.

Reactivos	Procedencia
Oxitetraciclina clorhidrato	Sigma - Aldrich p.a.
Ácido oxolínico	Sigma - Aldrich p.a.
Flumequina	Sigma - Aldrich p.a.

Tabla 3: Reactivos utilizados para el estudio de colorantes.

Reactivos	Procedencia
Violeta cristal clorhidrato	Merck p.a.
Azul de metileno	Merck p.a.
Rojo neutral	Merck p.a.
Rodamina B	Merck p.a.
Amarillo de alizarina G	Merck p.a.
Azul eriocromo	Merck p.a.
Anaranjado de bencilo	Sigma - Aldrich p.a.
Anaranjado IV	Sigma - Aldrich p.a.
Anaranjado de xilenol	Sigma - Aldrich p.a.
Anaranjado de metilo	Merck p.a.
Rojo de metilo	Merck p.a.
Azul de bromofenol	Merck p.a.
Azul de bromotimol	Merck p.a.

Tabla 4: Reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis.

Reactivos	Procedencia
Ácido clorhídrico 37%	Merck p.a.
Ácido acético glacial 100%	Merck p.a.
Ácido ortofosfórico 85%	Merck p.a.
Ácido tricloroacético	Merck p.a.
Ácido bórico	Merck p.a.
Ácido barbitúrico	Merck p.a.
Ácido cítrico monohidratado	Merck p.a.
Ácido oxálico	Merck p.a.
Hidróxido de sodio	Merck p.a.
Amoníaco 25%	Merck p.a.
Cloruro de amonio	Merck p.a.
Fosfato disódico anhidro	Merck p.a.
Ácido etilendiamina tetraacetato disódico	Merck p.a.
Carbonato de sodio	Merck p.a.
Bicarbonato de sodio	Merck p.a.
Tiosulfato de sodio	Merck p.a.
Tetraborato de sodio	Merck p.a.

Tabla 5: Solventes utilizados para el desarrollo de esta tesis.

Reactivos	Procedencia
Agua destilada	Lab. química analítica
Agua deuterada (D ₂ O) 99,8%	Merck p.a.
Etanol 99,9%	Merck p.a.
Metanol	Merck p.a.

Acetonitrilo	Merck p.a.
Cloroformo	Merck p.a.
Cloroformo deuterado 99,8%	Merck p.a.
Diclorometano	Merck p.a.
1,2 Dicloroetano	Merck p.a.
Tetraclouro de carbono	Merck p.a.
Acetona	Merck p.a.
Dimetilsulfóxido	Merck p.a.
Etilacetato	Merck p.a.

Tabla 6: Reactivos utilizados para el estudio de interferentes.

Reactivos	Procedencia
Sulfadoxina	Sigma - Aldrich p.a.
Trimetropin	Sigma - Aldrich p.a.
Eritromicina	Sigma - Aldrich p.a.
Enrofloxacino	Sigma - Aldrich p.a.
Florfenicol	Sigma - Aldrich p.a.
Aldrín	Riedel-de Haën Pestanal
Heptacloro	Riedel-de Haën Pestanal
Mirex	Riedel-de Haën Pestanal
2,4-D, (2,4- ácido acético diclorofenoxi);	Riedel-de Haën Pestanal
Dieldrin;	Riedel-de Haën Pestanal
(4,4)DDT	Riedel-de Haën Pestanal
(4,4) DDE, (Dicloro difenildicloroetileno);	Riedel-de Haën Pestanal
TDE	Poliscience Corp.
PCB`S (1254 y 1260)	*

Benzoato de emamectina	Riedel-de Haën Pestanal
Leuco violeta cristal	Sigma - Aldrich p.a.
Verde de malaquita	Sigma - Aldrich p.a.

*Solución metanólica 1.000 mg/Kg, proporcionada por Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Muestras de salmón: Se obtuvieron muestras de salmón Atlántico de siete individuos diferentes. Las muestras entregadas por la empresa Technical Laboratory Viamed S.A estaban molidas, homogenizadas y liofilizadas con una masa aproximadamente de $20 \pm 0,1$ g. Estas muestras de salmón provenían de una salmonera de la Región de los Lagos.

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 μ L, 100 - 1000 μ L]

Puntas Labopette® [10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L]

Magnetos

Cartuchos C-18, 500 mg; Varian

2.3. APARATOS E INSTRUMENTOS

Agitadores magnéticos, HANNA HI 190M

pH-metro, HANNA *Checker*

Centrífuga ROTOFIX 32, Hettich

Estufa de secado con control de temperatura, Memmert

Balanza analítica Sartorius GMBH, Gottinnhen tipo R-200D

Destilador de agua, GFL 2001/4

Rotavapor, Heidolph VV1

Bomba peristáltica, Masterfex® 4S TM modelo 7519-20

Vortex V1 plus, BOECO Germany

Baño Ultrasónico, Branson @ 2210

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 de operación incorporado Kit versión 3.7 (P/N 206-60570-04) que permite realizar la derivación de los espectros; por lo tanto, las unidades de derivadas son entregadas directamente por el software. Todos los espectros de absorción fueron obtenidos en el rango de longitud de onda de 190 a 800 nm, con un intervalo de muestreo de 0,5 nm.

Espectrofotómetro FT-IR, Perkin Elmer System 2000. Los espectros fueron obtenidos en un rango de 600 a 4000 cm⁻¹. Los datos fueron procesados con el software Grams 386 @ versión 3.01 C.

Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN), Bruker Avance 400 MHz.

Los datos fueron procesados con el software MestReC V4 [1].8.6.

2.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.4.1. Preparación de soluciones

- Solución estándar de *ácido oxolínico y flumequina* $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L. Se preparó disolviendo 0,013 g del reactivo en agua destilada desmineralizada, luego se agregó 1 mL de NaOH 0,1 mol/L, y se enrasó en un matraz de aforo de 50 mL.
- 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 435 µL de la solución patrón diluida (b) y se enrasaron con metanol en matraces de aforo de 10 mL. Las soluciones resultantes corresponden a concentraciones entre 0,6 y 3,5 µg/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.
- Soluciones estándares $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L destinadas al *estudio de colorantes*. Se prepararon disolviendo la cantidad necesaria en agua destilada desmineralizada y luego se enrasaron en un matraz de aforo de 50 mL. Soluciones de colorantes catiónicos: azul de metileno (AzM), violeta cristal (VC), rojo neutral (RN) y rodamina

B (RDB) y soluciones de colorantes aniónicos: amarillo de alizarina G (AAG), azul eriocromo (AE), anaranjado de bencilo (AB), anaranjado IV (AIV), anaranjado de xilenol (AX), anaranjado de metilo (AM), rojo de metilo (RM), azul de bromofenol (ABF) y azul de bromotimol (ABT).

- Solución amortiguadora *Britton-Robinson pH 2,0 hasta pH 12,0*. Se preparó una mezcla de solución de ácido bórico, ácido acético y ácido fosfórico, cada uno de ellos 0,1 mol/L (solución A), y una solución de NaOH 0,2 mol/L (solución B). Posteriormente, a una fracción de la solución A se agregó una fracción de la solución B hasta obtener el pH requerido.
- Solución amortiguador *ácido acético/acetato de sodio pH 5,0*. Se preparó disolviendo 14,585 g de acetato de sodio en agua destilada desmineralizada, posteriormente se agregaron 5,78 mL de ácido acético glacial y se enrasó en un matraz de aforo de 1000 mL.
- Solución amortiguador *fosfato diácido de sodio/fosfato monoácido de sodio pH 8,0*. Se preparó disolviendo 6,702 g de Na_2HPO_4 en agua destilada desmineralizada, posteriormente se agregaron 500 μL de HCl (conc.) y se enrasó en un matraz de aforo de 250 mL.
- Solución amortiguador *ácido bórico/borato de sodio pH 9,0*. Se utilizó un estándar Merck.
- Solución amortiguador *ácido barbitúrico/barbiturato de sodio pH 9,0*. Se preparó disolviendo 0,925 g de ácido dietilbarbitúrico en agua destilada desmineralizada, luego se agregaron 5,5 mL de NaOH 1,0 mol/L, y se enrasó en un matraz de aforo de 100 mL.
- Solución amortiguador *cloruro de amonio/amoníaco pH 10,0*. Se preparó disolviendo 0,268 g de cloruro de amonio en agua destilada desmineralizada, luego

se agregaron 3,3 mL de amoníaco_(conc.), y se enrasó en un matraz de aforo de 500 mL.

- Solución amortiguador *carbonato de sodio/bicarbonato de sodio pH 10,0*. Se preparó disolviendo 5,300 g de Na₂CO₃ y 4,200 g de NaHCO₃, en agua destilada desmineralizada, y se enrasó en un matraz de aforo 500 mL.
- Soluciones de *tetraborato de sodio o reactivo de Bórax y tiosulfato de sodio 0,1 mol/L*. Se prepararon de manera independiente, disolviendo 9,534 g y 6,205 g respectivamente en agua destilada desmineralizada, y se enrasó en un matraz de aforo de 250 mL.
- Solución amortiguador *Mc Ilvaine*: Se preparó disolviendo 28,400 g de fosfato disódico anhidro en agua destilada y se enrasó hasta 1000 mL. Por otro lado, se disolvió 21,000 g de ácido cítrico monohidratado en agua y se enrasó hasta 1000 mL. Ambas soluciones se mezclaron con 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*: Se preparó homogenizando 1.625 mL del amortiguador Mc Ilvaine con 3,720 g de ácido etilendiamina tetraacetato disódico (EDTA).
- Solución *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.
- Soluciones destinadas al estudio de interferentes. Se prepararon disolviendo la cantidad necesaria para que en un matraz de aforo de 25 mL se obtuviera una concentración de 100,0 mg/L para los siguientes productos farmacéuticos:

sulfadoxina, trimetopin, eritromicina, enrofloxacino, benzoato de emamectina, florfenicol, flumequina, ácido oxolínico, verde de malaquita y leuco violeta cristal. Para interferentes tipo contaminantes de aguas de cultivo de salmones la solución estándar fue de 80,0 mg/L de los siguientes interferentes: aldrín, heptacloro, mirex, 2,4-D, dieldrin, DDT, DDE, TDE, PCB'S (1254 y 1260).

2.4.2. Efecto de la naturaleza del solvente sobre la solubilidad de cada antibiótico

Se agregaron individualmente alícuotas entre 0,25 y 2,5 mL de OTC, OXO o FLU, de modo de obtener un rango de concentración final entre $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L y $10,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Luego se llevó a un volumen final de 25 mL en un matraz de aforo con diferentes solventes, entre ellos: agua, metanol, etanol, acetonitrilo, HCl, NaOH, NH_3 , cloroformo, diclorometano, acetona, dimetilsulfóxido y etilacetato. Posteriormente, se procedió a la lectura espectrofotométrica en el UV-Vis, en celdas de paso óptico de 1 cm, contra un blanco de reactivos, correspondiente al solvente utilizado.

2.4.3. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los antibióticos en estudio

El efecto del pH se realizó con amortiguador Britton-Robinson en un rango de pH entre 2,0 y 12,0, para ello se agregaron individualmente alícuotas entre 0,5 y 2,5 mL de solución de OTC, OXO o FLU de modo de obtener un rango de concentración final entre $2,0 \times 10^{-5}$ y $10,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Luego se adicionó 10 mL de la solución amortiguadora Britton-Robinson y se llevó a un volumen de aforo 25 mL con agua

destilada desmineralizada. Finalmente, se obtuvieron los espectros en la zona UV-Vis, contra un blanco de reactivos.

2.4.4. Ensayos preliminares en la formación de pares iónicos en solución acuosa

En matraces de aforo independientes de 25 mL, se agregaron alícuotas entre 20 y 250 μL de la solución estándar de colorante para obtener una concentración final entre $8,0 \times 10^{-7}$ y $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Luego se agregaron alícuotas de la solución estándar de OTC entre 50 y 200 μL de modo de obtener un rango de concentración final entre $2,0 \times 10^{-6}$ y $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y 10 mL del amortiguador Britton Robinson, con la finalidad de formar pares iónicos en solución.

Colorantes catiónicos utilizados: azul de metileno (AzM), violeta cristal (VC), rojo neutral (RN) y rodamina B (RDB). El estudio se realizó entre pH 8,0 y 10,0.

Colorantes aniónicos utilizados: amarillo de alizarina G (AAG), azul eriocromo (AE), anaranjado de bencilo (AB), anaranjado IV (AIV), anaranjado de xilenol (AX), anaranjado de metilo (AM), rojo de metilo (RM), azul de bromofenol (ABF) y azul de bromotimol (ABT). El estudio se realizó entre pH 4,0 y 7,0.

2.4.5. Efecto de la luz del laboratorio sobre la estabilidad en el tiempo de VC y OTC

Se expusieron frente a la luz ambiental, soluciones acuosas independientes de VC $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L y de OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L, medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron cada una hora, a partir del tiempo cero durante 8 horas. También se estudió la estabilidad de OTC, OXO y FLU en acetonitrilo.

2.4.6. Procedimiento general para la determinación de pares iónicos vía preconcentración líquido-líquido

En diferentes matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron alícuotas de antibiótico individual entre 20 y 100 μL 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 agregó 400 μL de la solución estándar de VC $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, y 100 μL 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 agregó 5 mL de extractante y se agitó por 5 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, el extracto orgánico se recogió en tubos de vidrio con tapa y una fracción del extracto orgánico, se llevó a medición en la zona UV- Visible, contra aire.

2.4.7. Optimizaciones preliminares de las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido, en la determinación de pares iónicos.

Metodología univariabes

Para evaluar las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido, se siguió el procedimiento experimental 2.4.6, modificando la variable en estudio.

- Optimización *del tipo de extractante*. Se utilizaron como extractante, los siguientes solventes orgánicos: diclorometano, 1,2-dicloroetano, cloroformo y tetracloruro de carbono.

- Efecto *del medio de pH* básico. Se estudió el efecto del pH entre 7,0 y 10,0, para evaluar la formación y determinación del par iónico en diferentes medios básicos con 20 mL de los siguientes amortiguadores: Britton Robinson, fosfato diácido de sodio/fosfato monoácido de sodio, ácido bórico/borato de sodio, ácido barbitúrico/barbiturato de sodio, cloruro de amonio/amoniaco y carbonato de sodio/bicarbonato de sodio. Luego se estudiaron como medio de pH, soluciones por separados de amoniaco e hidróxido de sodio 0,1 mol/L y soluciones de las sales tiosulfato y tetraborato de sodio 0,1 mol/L, a modo de obtener concentraciones finales de $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L.
- Efecto de *la concentración del colorante*. Se utilizó una concentración final en el embudo de decantación, entre $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L y $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L de contraión.
- Efecto *de la concentración de NH₃*. Se utilizaron alícuotas de NH₃ 0,1 mol/L entre 20 y 150 μ L, correspondientes a concentraciones finales entre $4,0 \times 10^{-5}$ y $3,0 \times 10^{-4}$ mol/L.
- Efecto *del número de etapas de extracción*. Se realizaron dos extracciones independientes de 5 mL con cloroformo.
- Efecto *del tiempo de extracción*. Se varió el tiempo de extracción entre 0,5 y 8 minutos.
- Efecto *del volumen fase acuosa*. Se varió el volumen acuoso entre 50 y 150 mL.

2.4.8. Optimización de las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido en la formación de pares iónicos. Metodología multivariabes

Mediante un diseño experimental estadístico, se optimizaron las condiciones experimentales para esta determinación. Esta optimización se realizó con el diseño

experimental factorial utilizando el programa computacional STATGRAPHICS Plus 5. Las variables optimizadas fueron: concentración VC entre $1,0 \times 10^{-6}$ y $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L, volumen NH_3 0,1 mol/L entre 10 y 190 μL (concentración entre $2,0 \times 10^{-5}$ y $3,8 \times 10^{-4}$ mol/L), volumen fase orgánica entre 4 y 6 mL y tiempo de extracción entre 2 y 4 minutos. El volumen de la fase acuosa se mantuvo constante en 50 mL y la concentración de OTC fue de $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L. El diseño consistió en el modelo factorial 2^n , siendo "n" el número de variables, ($n=4$) con tres réplicas, resultando un total de 51 experimentos.

2.4.9. Curva de calibración del par iónico VC-OTC. Muestras sintéticas

La curva de calibración del par iónico se realizó con 750 μL de la solución de VC $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L a concentración final de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, 100 μL NH_3 0,1 mol/L pH $9,0 \pm 0,2$, con alícuotas de una solución estándar de OTC entre 20 y 100 μL , para obtener rangos de concentraciones finales entre $4,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. El procedimiento de extracción del par iónico fue expuesto en la sección 2.4.6, utilizando 6 mL de extractante y agitando por 4 minutos para la formación del par iónico.

2.4.10. Estudio de interferentes

Este estudio se realizó en primera instancia registrando el espectro clásico de todos los interferentes estudiados a una concentración de $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Luego, se realizó el procedimiento de extracción de pares iónicos en solvente orgánico, de acuerdo al procedimiento experimental 2.4.9, a dos concentraciones constantes de OTC de $4,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L, equivalente a 200 y 795 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Las concentraciones de los interferentes estudiados fueron de acuerdo a los límites máximos residuales, establecidos por mercados regulados en carne y piel de pescado (Sernapesca, 2005) y a concentraciones superiores. Los productos farmacéuticos estudiados como interferentes son: ácido oxolínico 100,0 y 1.044 µg/L, flumequina 600,0 y 1.045 µg/L, sulfadoxina 100,0 y 1.000 µg/L, trimetropin 50,0 y 1.161 µg/L, florfenicol 100,0 y 1.432 µg/L, eritromicina 200,0 y 2.935 µg/L, enrofloxacino 100,0 y 1.420 µg/L, benzoato de emamectina 100,0 y 1.040 µg/L; sustancias no autorizadas: verde malaquita 50,0 y 1.385 µg/L y leuco violeta cristal 50,0 y 1.494 µg/L y contaminantes: aldrín 0,3 y 14,5 mg/L; heptacloro 0,3 y 15,0 mg/L; mirex 0,1 y 22,0 mg/L; 2,4 D 1,0 y 8,85 mg/L; dieldrin 0,3 y 15,2 mg/L; DDT 5,0 y 14,2 mg/L; DDE 5,0 y 12,7 mg/L; TDE 5,0 y 12,8 mg/L; PCB`s 2,0 mg/L.

2.4.11. Extracción de OTC desde muestras de salmón

La determinación de OTC en músculo de salmón se realizó de acuerdo al método 3.9 del Instituto de Salud Carlos III, con algunas modificaciones.

➤ *Preparación de la muestra y construcción curva calibración:*

Se realizó una curva de calibración en muestras de salmón Atlántico enriquecidas con OTC. Paralelamente con las muestras individuales de salmón, se preparó un blanco de reactivos, en tubos de centrifuga FALCON de 50 mL y se realizó el proceso de extracción de la siguiente forma:

- (a) La muestra de salmón molida y homogenizada se dejó descongelar y se pesaron $5,0 \pm 0,1$ g.
- (b) A la muestra blanco de reactivos se agregó 0,5 mL de agua destilada.

(c) A las muestras enriquecidas se agregaron 0,5 mL de la solución patrón de trabajo de la sección 2.4.1 (c) y se esperó como mínimo 20 minutos antes de comenzar la extracción.

(d) Luego, se añadió 20 mL de amortiguador Mc Ilvaine/EDTA y se homogenizó en un agitador por 20 minutos.

(e) Posteriormente, se agregó 2 mL de ácido tricloroacético 20% y se agitó en Vortex.

(f) Finalmente, se centrifugó a 4.000 rpm por 15 minutos.

(g) El sobrenadante se transfirió a un matraz de 50 mL a través de papel filtro de 70 μm de poro.

(h) Por último se repitió la extracción con otros 20 mL de amortiguador Mc Ilvaine/EDTA, se centrifugó, el sobrenadante se filtró en el mismo matraz, y finalmente, se mezclaron los 40 mL en el matraz.

➤ Purificación:

La purificación de la muestra se realizó de acuerdo a la cita de Fedeniuk y col., 1996.

(a) Se acondicionó un cartucho 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 4,0 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, a este extracto de OTC se le realizó el protocolo de formación del par iónico VC-OTC de acuerdo a la sección experimental 2.4.9, ajustando el pH de la extracción líquido-líquido a pH $9,0 \pm 0,2$ con amoníaco 0,1 mol/L.

2.4.12. Aplicación y validación del método en muestras de salmón Atlántico

La validación del método, se realizó fortificando con 0,5 mL de solución de OTC 1,0 mg/L, correspondiente a una concentración de 100 µg/Kg en el músculo de ocho muestras de salmón Atlántico de cinco individuos, evaluadas en diferentes días. El tratamiento de la muestra es descrito en la sección 2.4.11.

La aplicación del método se realizó con tres muestras independientes de una muestra de salmón Atlántico proporcionada por un laboratorio externo (CEPEDEQ)¹, conteniendo una concentración de OTC de 305 µg/Kg. Esta concentración fue determinada por HPLC con detector de arreglo diodos.

Para evaluar esta muestra, fue necesario realizar una dilución sólido-sólido, utilizando 1,6 g de la muestra diluida en 3,4 g de blanco, obteniendo mediante esta dilución una concentración de OTC de 100 µg/Kg. El tratamiento de la muestra es descrito en la sección 2.4.11.

2.4.13. Determinación del coeficiente de distribución (K_D) de VC

La determinación de K_D , fue realizada a partir de una curva de calibración de VC en CHCl_3 y otra curva en agua destilada utilizando como medio NH_3 0,1 mol/L en un rango de concentración entre $2,0 \times 10^{-6}$ mol/L y $10,0 \times 10^{-6}$ mol/L a 25°C. Se realizaron tres réplicas independientes para cada caso.

¹ Centro de Estudios Para el Desarrollo de la Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas - U. de Chile.

2.4.14. Obtención de espectros de RMN y preparación de las muestras VC, OTC y VC-OTC

Se prepararon muestras a partir de los estándares sólidos, disolviendo 10 mg de VC en CDCl_3 y 10 mg de OTC en D_2O . Los solventes deuterados se utilizan como referencia interna.

La preparación de las muestras extraídas de VC, consistió en disolver 10 mg del sólido en 50 mL de agua destilada utilizando medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, luego se realizaron tres extracciones de 20 mL con CHCl_3 . Posteriormente la muestra se concentró en el rotavapor, y el concentrado se disolvió en 1 mL CDCl_3 , para ser analizada por espectroscopia de ^1H RMN.

La preparación de las muestras extraídas de VC-OTC, se llevó a cabo disolviendo 10 mg de VC y 12 mg de OTC en 50 mL de agua destilada medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, para luego ser extraídos en un embudo de decantación de 100 mL tres veces con fracciones de 20 mL con CHCl_3 . Los respectivos extractos clorofórmicos se evaporaron hasta sequedad y luego fueron disueltos en 1 mL de CDCl_3 para luego ser analizada por espectroscopia de ^1H RMN.

Las muestras de OTC en CDCl_3 , se prepararon disolviendo 10 mg del sólido en 1 mL de agua destilada, medio amoniacal, luego se evaporó el solvente bajo una corriente de N_2 y finalmente el residuo sólido se disolvió en CDCl_3 , con gotas de dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$), para ser analizado por espectroscopia de ^1H RMN. Del mismo modo se preparó una muestra de OTC medio agua destilada.

Las muestras que fueron llevadas a medición de los tiempos de relajación (T_1) de protones fue necesario eliminar el O_2 . Para ello, las muestras fueron congeladas en N_2 líquido y luego se les aplicó vacío. La medición de T_1 se realizó tres veces, para luego calcular un promedio y la desviación estándar de la medición.

2.4.15. Obtención de espectros de IR y preparación de las muestras VC, OTC y VC-OTC

Se obtuvieron espectros IR de los sólidos VC y OTC en pastillas de KBr, y de VC y VC-OTC en celdas desmontables de NaCl hasta evaporación del solvente. La preparación del VC y del par iónico consistió en tomar una alícuota de 10 mL de VC y de OTC de la solución estándar $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, para obtener una concentración final de $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L en 50 mL de agua destilada con 1 mL NH_3 0,1 mol/L para alcanzar pH $9,0 \pm 0,2$. Luego se realizaron tres extracciones de 20 mL con $CHCl_3$ y posteriormente se evaporó el solvente hasta dejar aproximadamente 1 mL de muestra, para luego ser llevada a la celda de medición.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo de esta tesis se centró en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de antibióticos utilizados en acuicultura. En primera instancia, se desarrollaron métodos para la determinación simultánea de pares de los tres antibióticos comúnmente utilizados en la acuicultura chilena: OTC, OXO y FLU. Estos métodos consistieron en determinarlos por espectrofotometría derivada UV-Vis, donde se proyecta aplicarlos en alimento de peces, en que las concentraciones de estos antibióticos se encuentran a nivel de 0,1 mg/Kg. (Toral y col., 2007; Toral y col., 2006)

En la segunda parte de esta tesis se desarrolló de una metodología analítica para la determinación de OTC por formación de pares iónicos, utilizando la técnica de espectrofotometría derivada UV-Vis de segundo orden. Esta metodología se aplicó en muestras de músculo de salmón.

3.1. EFECTOS DE LA NATURALEZA DEL SOLVENTE SOBRE LA SOLUBILIDAD DE CADA ANTIBIÓTICO

Para disponer de una información global de la solubilidad de cada antibiótico, se estudió el efecto de la naturaleza del solvente sobre la solubilidad de cada antibiótico a una concentración de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, concentración que es utilizada como solución inicial en los diferentes ensayos realizados. Para ello se evaluó cualitativamente la solubilidad de cada antibiótico por separado en solventes de diferentes polaridades con constantes dieléctrica (ϵ) entre 78,5 y 4,0 (Tabla 7), en soluciones ácidas, básicas y

neutras, de acuerdo a las condiciones experimentales del punto 2.4.2.

La OTC posee diferentes grupos funcionales que le confieren características polares y ácido base. Estas propiedades le permiten a este compuesto ser soluble en la mayoría de las soluciones acuosas y solventes orgánicos polares con ϵ sobre 20.

Por el contrario, la preparación de una solución de OXO en agua, metanol, etanol, acetona, diclorometano y etilacetato presentó baja solubilidad. No obstante, en acetonitrilo y en dimetilsulfóxido no mostró dificultad para solubilizar en estos solventes apróticos a temperatura ambiente. En orden de mejorar la solubilidad de OXO en solventes acuosos, se agregó 1 mL de NaOH 0,1 mol/L en 50 mL de solución, lo cual incrementó notablemente la solubilidad debido a la ionización de la molécula.

FLU, presenta solubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos polares, debido a que en su estructura presenta un átomo de flúor, el que podría formar puentes de hidrógenos con solventes próticos, pero al igual que con OXO ésta mejoró al agregar 1 mL de NaOH 0,1 mol/L en 50 mL de solución. En consecuencia, para trabajar con los antibióticos de la familia de las quinolonas en soluciones acuosas, es necesario trabajar con la forma básica de la molécula o con solventes orgánicos apróticos. Un análisis de las solubilidades cualitativas en diferentes solventes para cada antibiótico, se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7: Análisis cualitativo de las solubilidades para cada antibiótico a concentración $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Solventes	Cte. dieléctrica ϵ , 25 °C	OTC	OXO	FLU
Agua destilada	78,5	Soluble	No soluble	No soluble
Dimetilsulfóxido	48,9	Soluble	Soluble	Soluble
Acetonitrilo	37,5	Soluble	Soluble	Soluble
Metanol	32,7	Soluble	No soluble	Soluble
Etanol	24,6	Soluble	No soluble	Poco Soluble
Acetona	20,7	Soluble	Poco soluble	Soluble
Diclorometano	8,9	Poco Soluble	Poco soluble	Soluble
Etilacetato	6,0	Poco Soluble	Poco soluble	Soluble
Cloroformo	4,7	No soluble	Poco Soluble	Soluble
HCl $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L	—	Soluble	No soluble	No soluble
NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L	—	Soluble	Soluble	Soluble
NH ₃ $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L	—	Soluble	Soluble	Soluble
Metanol en NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L	—	—	Soluble	Soluble
Etanol en NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L	—	—	Soluble	Soluble

Poco soluble= necesita de un baño ultrasonido, para solubilizar.

A partir de las soluciones estándares de los diferentes antibiótico, se prepararon soluciones entre $2,0$ y $10,0 \times 10^{-5}$ mol/L en cada solvente, con el objeto de conocer las conductas espectrales de cada antibiótico en diferentes solventes. (Figuras 7 a 9).

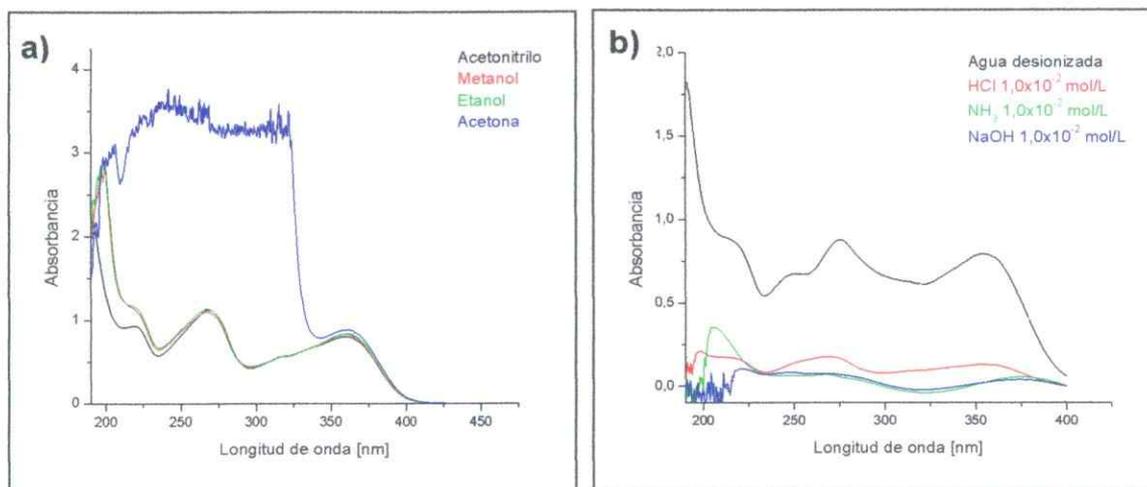


Figura 7: Espectros de absorción de oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.

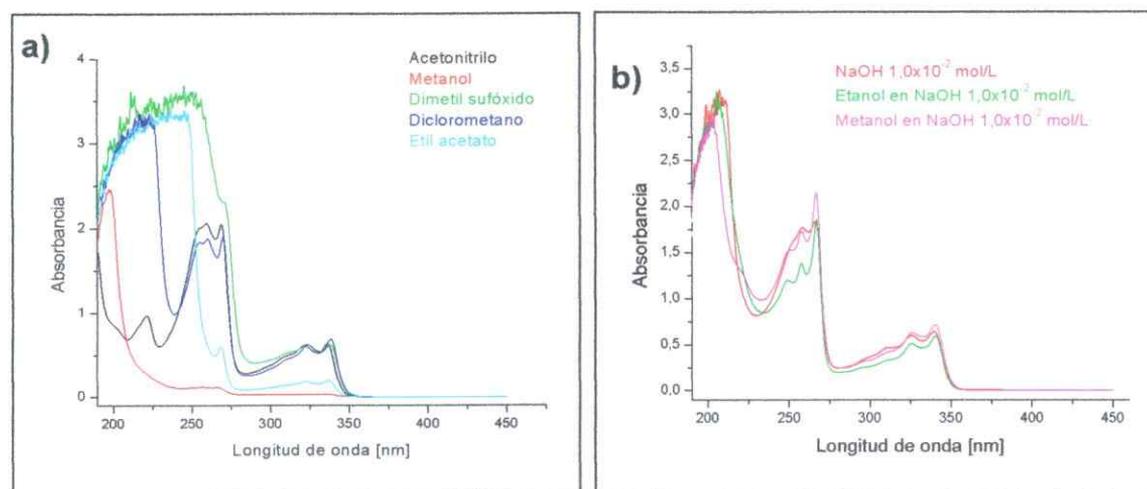


Figura 8: Espectros de absorción de ácido oxalínico $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.

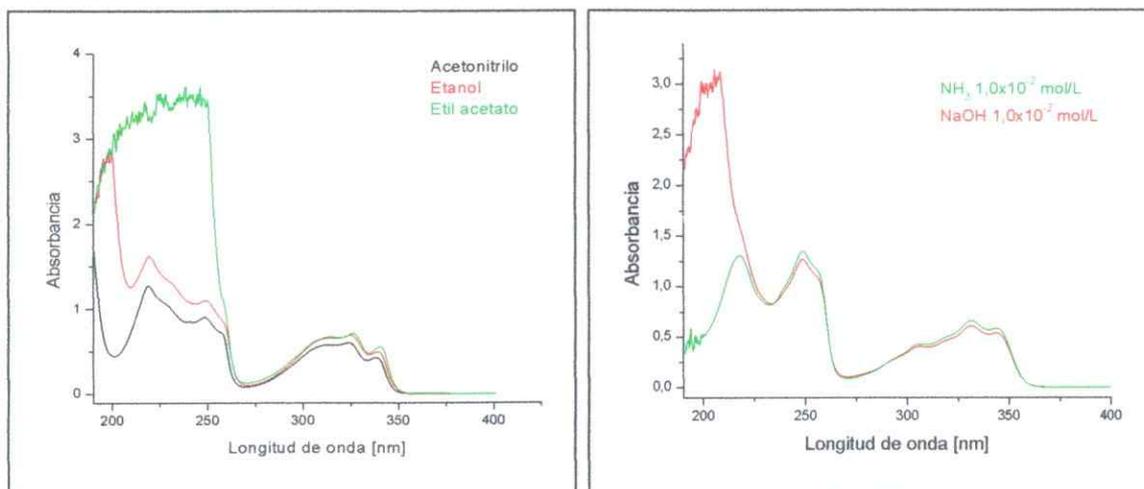


Figura 9: Espectros de absorción de flumequina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Solventes orgánicos. b) Solventes acuosos.

De acuerdo a las Figuras 7, 8 y 9, se observan cambios espectrales al utilizar solventes orgánicos o acuosos en la región UV-Vis. Para OTC, se encuentran las bandas atribuibles a grupos cetonas, amida y fenol entre 190,0 y 400,0 nm y para OXO y FLU se observan entre 190,0 y 350,0 nm, las bandas características a cetonas, ácido carboxílico y benceno (Skoog y col. 2001).

Debido a que acetonitrilo (ACN) posee una ϵ de 37,5 tiene la capacidad de disociar cada antibiótico logrando solubilizar a cada uno de ellos. Tomando en consideración estos resultados y el solapamiento de las bandas de absorción de los tres antibióticos en ACN (Figura 10), se seleccionó ACN como solvente para desarrollar métodos para la determinación individual y/o simultánea de pares de antibióticos en muestras sintéticas por espectrofotometría derivada.

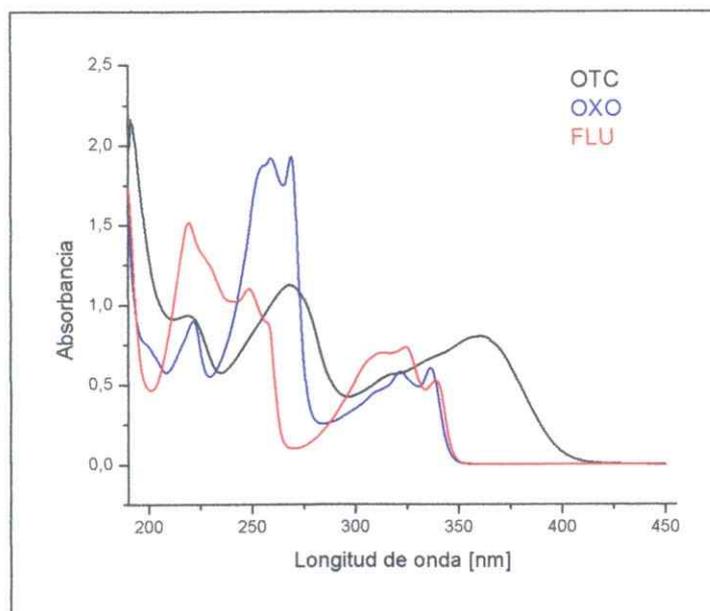


Figura 10: Espectros de absorción de OTC, OXO y FLU $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en ACN.

Considerando las conductas espectrales de los tres antibióticos, se tiene como primer método por espectrofotometría derivada de primer orden (Figura 11), la determinación de OTC a 382,2 nm utilizando el método gráfico, en presencia de OXO y FLU, debido a que en esta zona estas drogas no absorben. Por otro lado, se tiene la determinación simultánea de OXO a 274,0 nm y FLU a 288,9 nm en ausencia de OTC mediante el método “zero crossing”.

Finalmente, se tiene que en presencia de FLU es posible realizar un “screening” a 274,4 nm para detectar la presencia de OXO y/o OTC, sin embargo, si en el rango entre 362,0 y 414,0 nm no se presenta absorción indicaría que no hay presencia de OTC en el rango de concentración estudiado y la señal a 274,4 nm puede ser atribuida exclusivamente a OXO.

En todos los casos las variables espectrales seleccionadas fueron: primera derivada, por presentar mayor sensibilidad y alta relación señal/ruido, un factor de suavizado de 16.000, donde se minimiza el ruido de fondo y un factor de amplificación de 10.000 para facilitar la lectura de la señal analítica. A modo de ejemplo en la determinación de OTC, OXO y FLU, las longitudes de onda analítica seleccionadas fueron: 382,2 nm para OTC, 274,4 nm para OXO y 288,9 nm para FLU (Figura 11). Los parámetros analíticos determinados, se resumen en la Tabla 8.

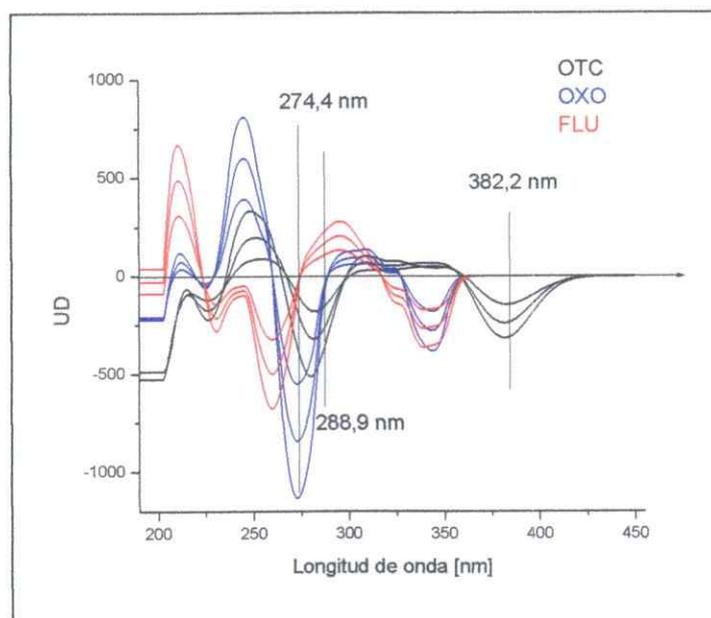


Figura 11: Espectros derivados de primer orden de OTC, OXO, FLU. Concentración entre $4,0 \times 10^{-5}$ y $8,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabla 8: Parámetros analíticos. Determinación individual de OTC, y determinación simultánea de OXO y FLU en ausencia de OTC.

	<i>OTC</i>	<i>OXO</i>	<i>FLU</i>
Longitud de onda analítica (nm)	382,2	274,4	288,9
Ecuación curva de calibración	$UD=(41,0 \pm 2,6) \times 10^5 * C - 8,2 \pm 1,6$	$UD=(1500 \pm 1) \times 10^4 * C + 9 \pm 1$	$UD=(350 \pm 2) \times 10^4 * C - 18 \pm 1$
Coefficiente de correlación (r)	0,998	0,998	0,998
Límite de detección (mol/L)*	$1,5 \times 10^{-6}$	$4,1 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^{-7}$
Límite de cuantificación (mol/L)*	$4,9 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$9,5 \times 10^{-7}$
Rango de determinación (mol/L)	$4,9 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-4}$	$9,5 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-4}$

Cabe destacar que, la aplicación de estos métodos, es para matrices en que estos antibióticos se encuentren en altas concentraciones a nivel de mg/Kg, situación que pudiera suceder en músculo de salmón con alta acumulación de antibiótico o bien en alimento de peces, siempre y cuando no se presente interferencia de la matriz.

* Criterio Límite de detección: $3\sigma/S$ y Límite de cuantificación: $10\sigma/S$, donde S es la pendiente de la ecuación lineal.

Por lo tanto, en primera instancia las muestras podrán ser evaluadas por los métodos descritos anteriormente y todas aquellas muestras que estén bajo el límite de cuantificación serán evaluadas por un método más sensible. En este contexto, se tiende a reducir el número de muestras en que se aplique un método que requiera mayor tiempo, otorgando una mayor eficiencia.

Con el solvente ya seleccionado, se realizó un estudio de estabilidad en el tiempo de los tres antibióticos en ACN a temperatura ambiente, sometidos a la luz del laboratorio. Los resultados muestran que ellos son fotoestables en las condiciones de trabajo seleccionadas, ya que no se observan corrimientos de los máximos de absorción ni variación en la altura de las bandas de absorción, en el rango de tiempo estudiado. A modo de ejemplo en la Figura 12, se observa la estabilidad en el tiempo de OTC. También se obtuvieron los espectros de absorción al quinto día y no se presentaron diferencias espectrales.

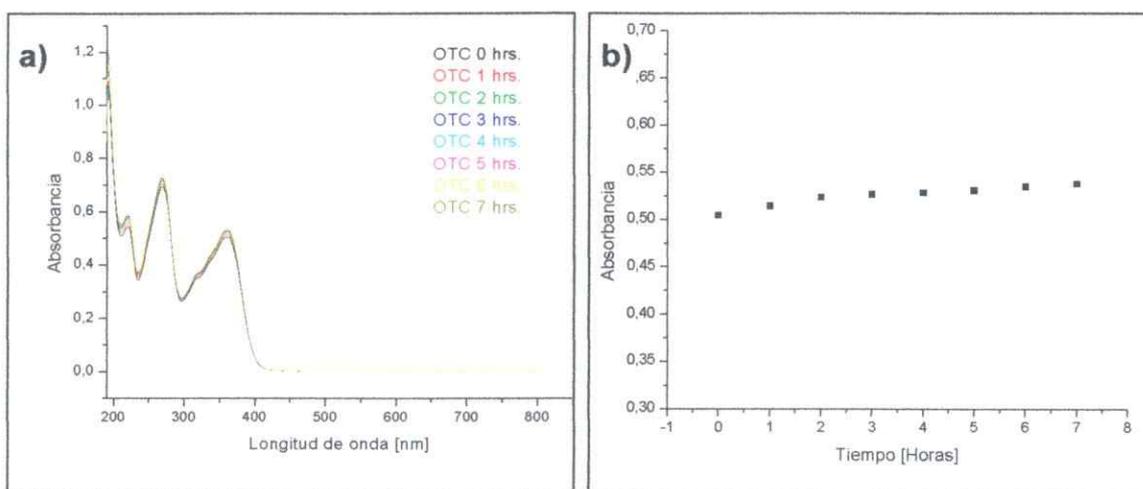


Figura 12: a) Espectros de absorción OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en ACN, a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de OTC en ACN, a $\lambda_{\text{máx}}$ 360,0 nm.

3.2. EFECTO DEL pH SOBRE LA CONDUCTA ESPECTRAL DE LOS ANTIBIÓTICOS EN ESTUDIO

El efecto del pH sobre la conducta espectral de OTC, OXO y FLU, se realizó con la finalidad de obtener las bandas espectrales de cada uno de ellos en un rango de pH 2,0 a 12,0, debido a que estos antibióticos presentan características ácido base. Las condiciones experimentales son las referidas en el punto 2.4.3.

3.2.1. Efecto del pH en el comportamiento espectral de OTC

Es conocido por literatura las características ácido base y los valores de pKa de OTC (Qiang y Adams, 2004). En la Figura 13, se presenta un esquema de los equilibrios ácido base de este antibiótico, lo que explica el variado comportamiento espectral en sus principales bandas de absorción, en la escala de pH utilizada. Es por ello que resulta de gran importancia conocer el tipo de banda y la especie con que se trabajará en el desarrollo de esta tesis. Los espectros de absorción a diferentes pH, se muestran en la Figura 14.

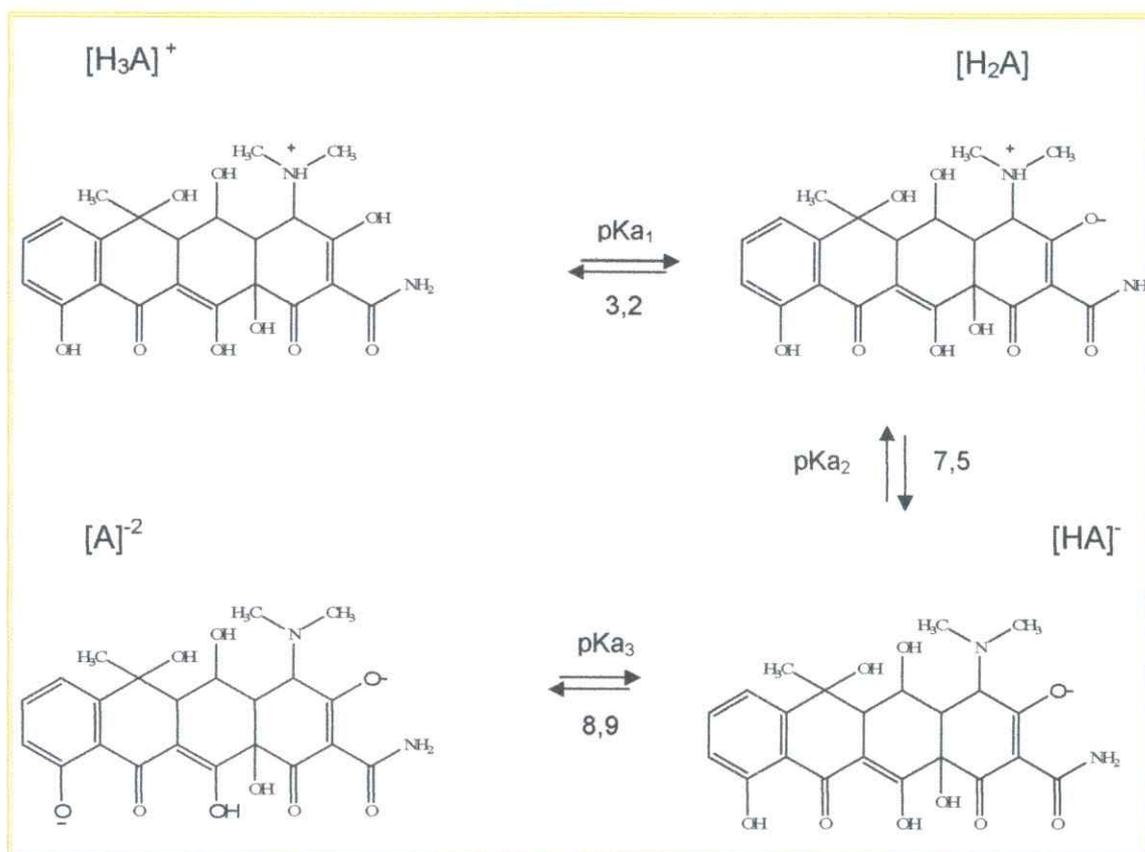


Figura 13: Equilibrios ácido - base del antibiótico oxitetraciclina.

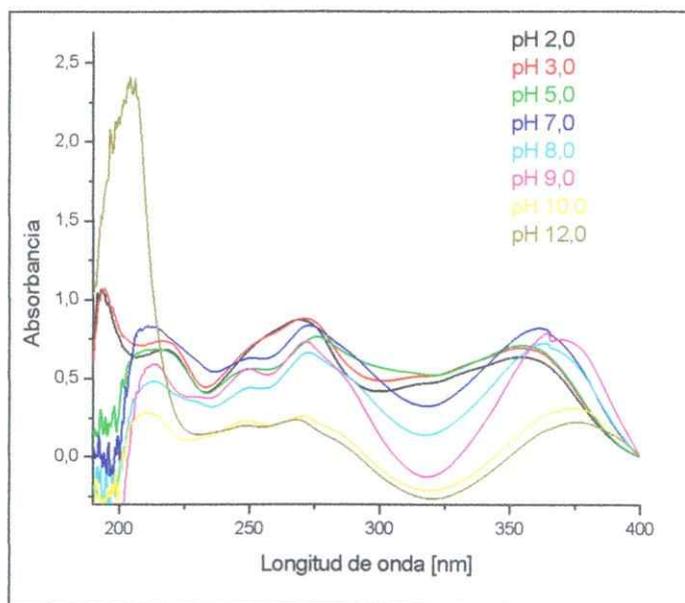


Figura 14: Espectros de absorción oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a diferentes pH, en amortiguador Britton Robinson.

La Figura 14 muestra que, entre pH 0,0 y 3,0 la especie predominante es H_3A^+ , cargada positivamente, la cual en principio podría formar una interacción electrostática con colorantes aniónicos. En tanto que en las cercanías del pK_{a1} existe una mezcla de H_3A^+ / H_2A por lo cual su espectro en dicha zona de pH, corresponde a la absorción de ambas especies. No obstante, debido a la alta acidez del protón del C_3-OH (pK_{a1}) la carga negativa de la especie H_2A es capaz de distribuirse tanto en el oxígeno del C_1 como del C_2 de la amida, formando tres especies resonantes de OTC. Es por esta razón que en las cercanías del pK_{a1} , no se favorecería algún tipo de interacción con colorantes catiónicos, debido a la deslocalización de la carga negativa, Figura 15. No obstante, en el transcurso de esta tesis se seguirá usando la estructura de la especie H_2A de OTC para esquematizar interacciones.

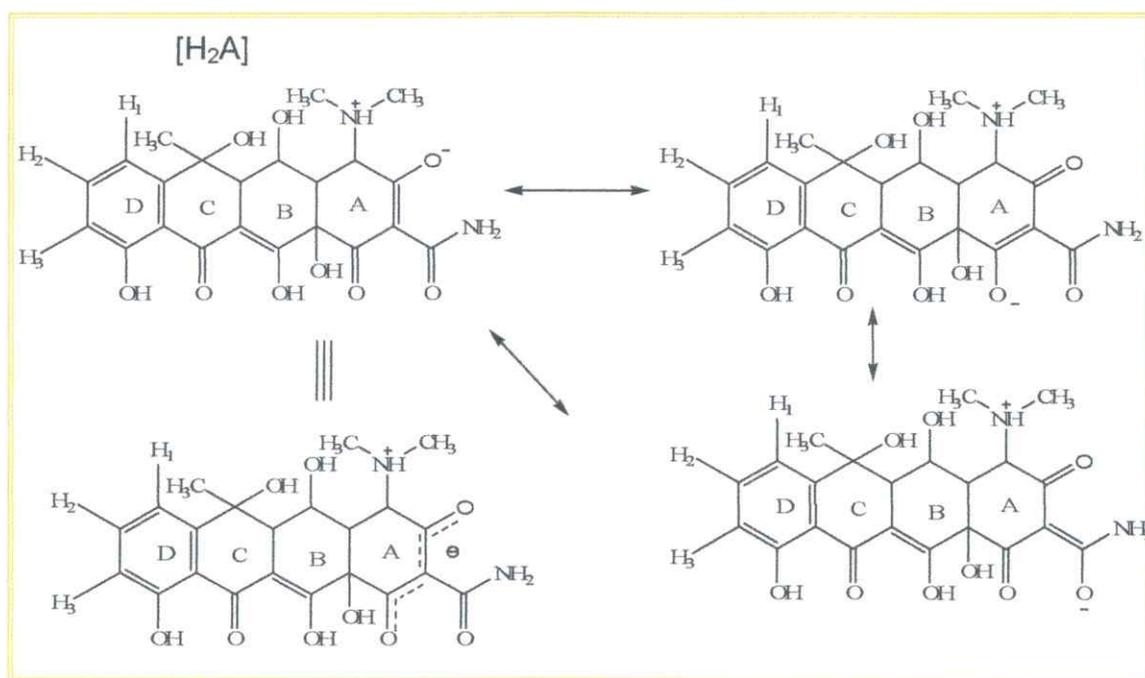


Figura 15: Estructuras resonantes de la especie H_2A de OTC.

Entre pH 4,0 y 6,5 hay un predominio de H_2A , la cual dado que presenta tanto carga positiva como negativa podría formar par iónico con colorantes catiónicos o aniónicos, y su espectro en este rango de pH corresponde a la especie H_2A . En la cercanía del pK_{a2} la absorción corresponde tanto a H_2A como a HA^- . Entre pH 8,0 y 8,5 predomina la especie aniónica HA^- de modo que el espectro obtenido en dicho rango pueda ser atribuido a HA^- . En las cercanías del tercer pK_a se tiene una mezcla de HA^-/A^{-2} , lo cual también se refleja en el espectro de absorción. Sobre pH 9,5 hay un predominio de A^{-2} , de modo que el espectro de absorción puede ser atribuido a dicha especie. La carga negativa quedaría estable en el oxígeno del C_{10} , debido a que el anillo D es un aromático. La Figura 16 esquematiza las especies predominantes en los valores de pK_a de OTC. Además, al tener esta especie cargada negativamente, la interacción electrostática con colorantes catiónicos se ve favorecida, debido a que en esa zona la molécula no presentaría impedimento estérico en la formación del par iónico; como lo sería en la zona del pK_{a1} . Sobre pH 11,0 la estabilidad de la droga es afectada como se observa en el espectro de absorción a pH 12,0, debido a que la especie es inestable.

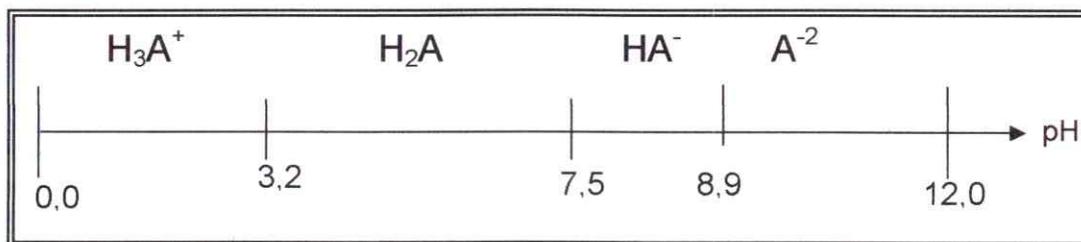


Figura 16: Esquema de los valores de pK_a del antibiótico OTC.

Por otro lado, para completar este estudio de pH, se realizó un experimento referido a la recuperación de OTC desde valores pH extremadamente alcalinos a pH

cercano a la neutralidad, donde ésta es más estable. Este experimento consistió en obtener el espectro de absorción de OTC a pH 5,0 y 12,0 y posteriormente la solución de pH 12,0 se ajustó a pH 5,0 (Figura 17). El pH se reguló con el amortiguador Britton Robinson.

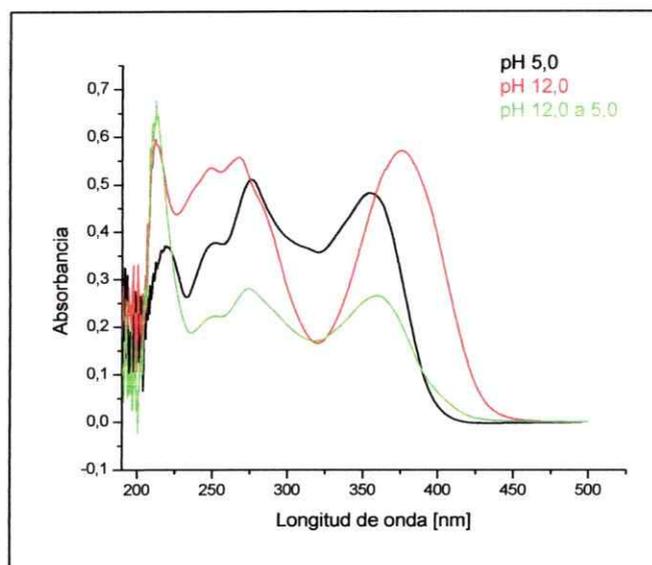


Figura 17: Espectros de absorción oxitetraciclina $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a pH 5,0; 12,0 y de la forma básica a neutra, en amortiguador Britton Robinson.

De acuerdo a la Figura 17, se observan diferencias espectrales a pH 5,0 y 12,0 produciéndose desplazamientos de los máximos de absorción, acompañado de un cambio de forma de la banda de absorción. A pH 12,0 OTC es inestable químicamente y cuando el antibiótico ha permanecido a este pH y es llevado a un pH cercano a la neutralidad se observan decaimientos en las bandas de absorción y desplazamiento de los máximos de absorción, comparado con el espectro de absorción registrado a pH 5,0. Esto indicaría que OTC es inestable a valores de pH muy alcalinos y que no es posible recuperarla cuando ha sido sometida en este medio, debido a que

probablemente se producen cambios estructurales o de descomposición.

3.2.2. Efecto del pH en el comportamiento espectral de OXO y FLU

También se estudió el efecto del pH en el comportamiento espectral de OXO y FLU. De acuerdo a la literatura OXO y FLU, presentan un valor de pKa cercano a 7 (Turiel y col, 2003), atribuible a la desprotonación del ácido carboxílico. Los espectros de absorción de OXO y FLU a diferentes pH se muestran en las Figuras 18.

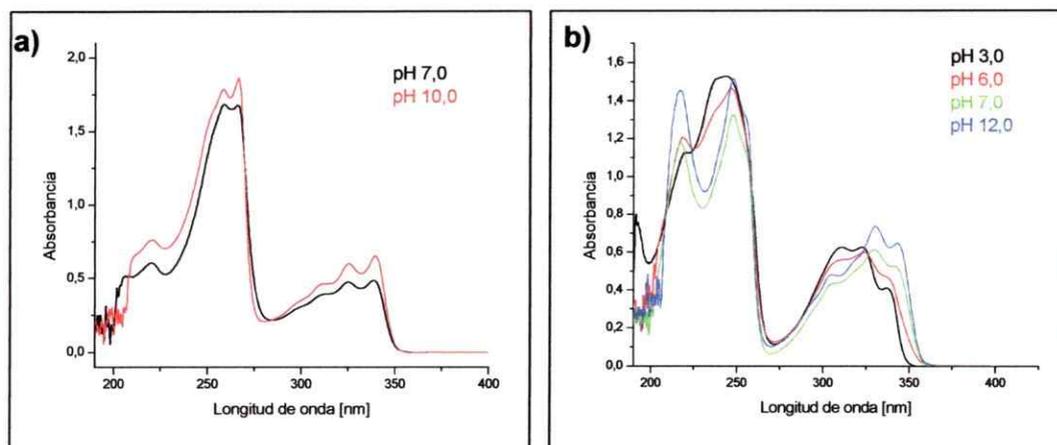


Figura 18: Espectros de absorción quinolonas $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L a diferentes pH, en amortiguador Britton Robinson. a) Ácido oxolínico. b) Flumequina.

Debido a que OXO presenta baja solubilidad entre pH 2,0 y 6,0 no es posible trabajar con la especie protonada. Por el contrario, desde pH cercanos a la neutralidad a básicos OXO es soluble y de acuerdo a lo observado en la Figura 18-a, las bandas espectrales no presentan cambios, manteniendo la forma y altura, debido a que en este rango de pH, predomina la especie desprotonada del grupo ácido carboxílico.

Con FLU, es posible obtener bandas espectrales a pH ácidos, por lo tanto, el único cambio de forma en las bandas espectrales principales, se produce en las cercanías del pKa donde se obtiene la mezcla del ácido carboxílico protonado y desprotonado entre pH 6,0 y 8,0. Esta forma de banda espectral se mantiene sobre pH 8,0 donde predomina la especie aniónica, Figura 18-b.

3.3. ENSAYOS PRELIMINARES EN LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS EN SOLUCIÓN ACUOSA

Este ensayo se realizó con la finalidad de observar modificaciones espectrales que indiquen una posible formación de par iónico de OTC con colorantes. Las condiciones experimentales fueron las citadas en el punto 2.4.4.

De acuerdo a las características estructurales y valores de pKa de OTC, se espera que a pH 5,0 OTC se encuentre cargada positiva y negativamente. A pH 5,0 la especie predominante es H_2A , por lo tanto para la formación de pares iónicos en solución acuosa se probaron diferentes colorantes aniónicos que podrían actuar como contraión: AAG, AE, AB, AIV, AX, AM, RM, ABF y ABT y colorantes catiónicos: VC, AzM, RDB y RN, los cuales podrían actuar como contraiones catiónicos. Se trabajó cada colorante individualmente, de ellos ninguno mostró formación de par iónico en solución a pH 5,0, detectable por espectrofotometría UV-Vis. Esto puede deberse a que las zonas iónicas de OTC que probablemente pudieran formar una interacción electrostática con estos colorantes, estén impedidas estéricamente.

Otro estudio, fue trabajar a pH 9,0 con colorantes catiónicos, para evitar un

medio muy alcalino. En estas condiciones las especies predominantes de OTC son HA^- y A^{2-} , sin embargo, la interacción con colorantes catiónicos, pudiese formarse a través del OH fenólico, por estar menos impedida estéricamente que la especie HA^- , desplazando el equilibrio cuantitativamente hacia una interacción de tipo electrostática. En la Figura 19, se observa que la forma y la altura de la banda de OTC en la zona donde ella absorbe, cambia cuando está en presencia de VC a pH 9,0 debido a que probablemente está ocurriendo un tipo de interacción que ensancha la banda y hace aumentar la sensibilidad de la banda espectral de OTC en solución acuosa. Este tipo de interacción no está favorecida en solución acuosa, por lo tanto se plantea realizar la extracción líquido-líquido y lectura espectral del par iónico en un solvente orgánico no miscible con el agua.

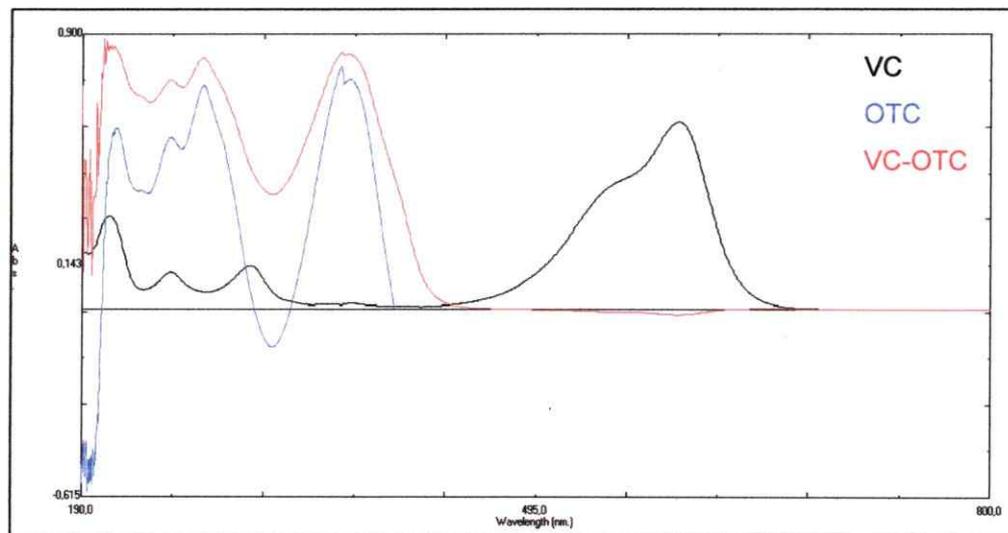


Figura 19: Espectros de absorción de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L, OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L y de la mezcla VC-OTC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L - $6,0 \times 10^{-6}$ mol/L, en amortiguador Britton Robinson pH 9,0.

3.4. DETERMINACIÓN DE PARES IÓNICOS VÍA PRECONCENTRACIÓN LÍQUIDA-LÍQUIDA

En la preconcentración líquida-líquida, se deben optimizar diversos parámetros, para permitir incrementar la sensibilidad y precisión del método a desarrollar, sin perder la exactitud y representatividad de los resultados.

Esta determinación está basada de los ensayos preliminares en solución acuosa, utilizando extracción líquida líquida, en el sentido de lograr desarrollar un método sensible y de calidad analítica. Esta modalidad se basa en la preconcentración de OTC, mediante una interacción con colorantes cromóforos por formación de pares iónicos y la posterior extracción de este par iónico en un solvente orgánico.

3.4.1. Ensayos preliminares en la extracción del par iónico OTC-colorantes aniónicos

El ensayo con colorantes aniónicos, se realizó con la finalidad de ampliar la información sobre la formación de pares iónicos con OTC. De acuerdo al artículo de Mishra y col., 1985 "las tetraciclinas forman pares iónicos con colorantes aniónicos ente pH 8,0 y 9,0 con amortiguador barbital". Ensayos preliminares de extracción con colorantes aniónicos, suponen que OTC estaría formando par iónico con anaranjado de metilo (AM) en NaOH y amortiguador Britton-Robinson pH 6,0, Figura 20. También este tipo de interacción ocurre con azul de bromotimol (ABT), sin amortiguación, en NaOH y NH₃, Figura 21.

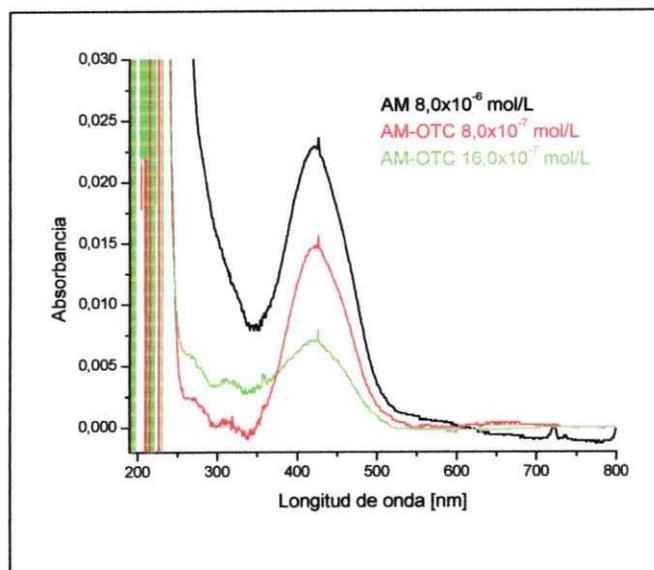


Figura 20: Espectros de absorción del par iónico AM-OTC en amortiguador Britton Robinson pH 6,0. Concentración AM: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y de OTC: $8,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

En la Figura 20, se observa una posible formación de AM-OTC con amortiguador Britton Robinson pH 6,0, presentando una banda centrada en 450,0 nm, pero este colorante fue descartado para formar par iónico con OTC, debido a que para fines analíticos las señales tienen baja absorbancia. Resultados similares se encontraron en medio básico de NaOH.

Por otro lado, al trabajar con otro colorante aniónico ABT, éste estaría formando par iónico con OTC en medio básico de NaOH y NH_3 . Esta posible formación presenta un máximo de absorción a 420,0 nm que incrementa con la cantidad de OTC agregada. A 280,0 nm ABT presenta una banda mal definida que varía su forma en presencia de OTC, corroborando por espectrofotometría UV-Vis la formación del par iónico (Figura 21-a). Con NH_3 los resultados son similares, pero la señal es aproximadamente 10 veces más baja y presenta mayor ruido de fondo. Además,

cuando se realiza la extracción sin amortiguación, (Figura 21-b), se observa una nueva banda en 600,0 nm, aunque bastante más baja que con NaOH. Esta nueva banda sería atribuible a la formación de un par iónico debido a que en esta zona el colorante no absorbe. Sin embargo, este colorante presentó problemas experimentales debido a que en la etapa de separación de las fases, éstas demoraban bastante tiempo (~ 20 min), por la formación de una interfase. Esto dificultaba la separación, no teniendo la certeza de que la extracción fuese cuantitativa. Por esta razón este colorante fue descartado para fines analíticos cuantitativos.

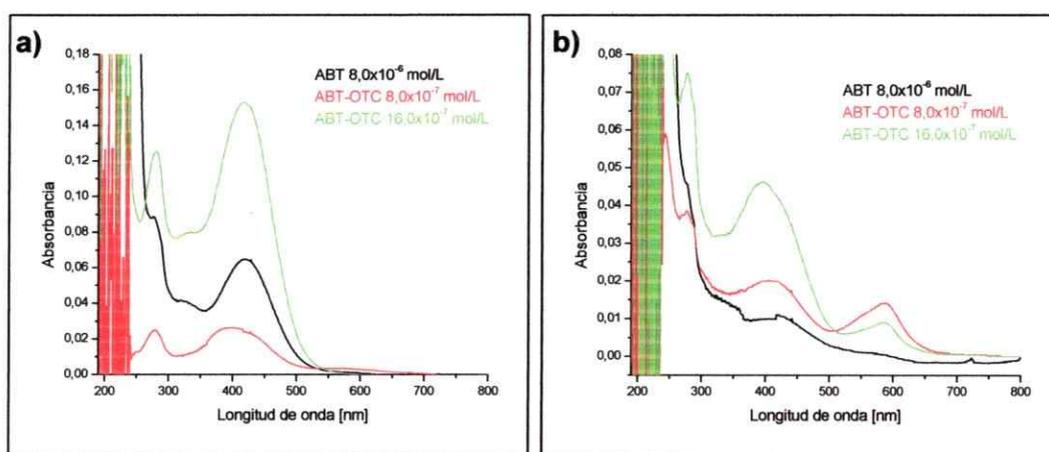


Figura 21: Espectros de absorción del par iónico ABT-OTC. (a) Medio NaOH. (b) Sin amortiguación. Concentración ABT: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y de OTC: $8,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

En la Tabla 9 se presenta un resumen de diferentes amortiguadores y especies químicas a modo de obtener diferentes valores de pH, utilizados en la extracción de OTC con los colorantes aniónicos AM y ABT.

Tabla 9: Resultados preliminares en la formación de par iónico OTC con colorantes aniónicos.

Medios de pH	AM	ABT
Sin amortiguador	X	√
Amortiguador ácido acético/acetato, pH 5,0	X	X
Amortiguador ácido barbitúrico/barbiturato, pH 9,0	X	X
Amortiguador Britton-Robinson pH 4,0	X	X
Amortiguador Britton-Robinson pH 5,0	X	X
Amortiguador Britton-Robinson pH 6,0	√	X
Amortiguador Britton-Robinson pH 7,0	X	X
Amortiguador Britton-Robinson pH 8,0	X	X
Amortiguador Mc Ilvaine pH 4,0	X	X
Amortiguador Mc Ilvaine pH 6,0	X	X
Amortiguador Mc Ilvaine pH 8,0	X	X
Amortiguador fosfato diácido/fosfato monoácido, pH 7,0	X	X
Amortiguador fosfato diácido/fosfato monoácido, pH 8,0	X	X
NaOH, pH 9,0 ± 0,2	√	√
NH ₃ , pH 9,0 ± 0,2	X	√

√: posible formación par iónico, X: no se forma par iónico.

3.4.2. Ensayos preliminares en la formación de pares iónicos OTC-colorantes catiónicos, medios ligeramente básicos

De los resultados preliminares de formación pares iónicos en solución acuosa presentados en la sección 3.3, se realizaron ensayos con diferentes colorantes catiónicos en distintos medios ligeramente básicos, de acuerdo al procedimiento experimental del punto 2.4.6. Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: Diferentes colorantes catiónicos en diferentes medios ligeramente básicos.

Medios de pH	VC	RN	RDB	AzM
Amortiguador Britton-Robinson, pH 9,0	√	X	X	X
Amortiguador fosfato diácido/fosfato monoácido, pH 8,0	X	X	X	X
Amortiguador ácido bórico/borato, pH 9,0	X	X	X	X
Amortiguador ácido barbitúrico/barbiturato, pH 9,0	X	X	X	X
Amortiguador carbonato/bicarbonato, pH 10,0	X	X	X	X
NaOH, pH 9,0 ± 0,2	√	X	X	X
NH ₃ , pH 9,0 ± 0,2	√	X	X	X
Tiosulfato sodio, pH 9,0 ± 0,2	X	X	X	X
Tetraborato sodio, pH 9,3	√	X	X	X

√: posible formación par iónico, X: no se forma par iónico.

En cuanto a los resultados obtenidos, es posible que el par iónico de OTC, se esté formando con el colorante catiónico VC, a pH cercano a 9,0, utilizando como medio, amortiguador Britton-Robinson, NaOH, NH₃ y tetraborato de sodio (Figura 22). Esta formación se atribuye al hecho, que en la zona de 590,0 nm se observa una banda ancha que incrementa su absorbancia con la cantidad de droga agregada. Igualmente ocurre en medio de tetraborato de sodio, además de la zona de longitud de onda entre 250,0 y 400,0 nm.

Los amortiguadores fueron descartados como medio de pH para realizar la extracción líquido-líquido del par iónico, debido a que las absorbancias de VC eran altas en la zona de 590,0 nm. Esto se atribuye posiblemente a una interacción más fuerte entre colorante-anión correspondiente al anión del amortiguador o al contraión

de las sales de sodio, que a una interacción colorante-antibiótico, lo que dificulta la lectura espectral de una posible formación de VC-OTC.

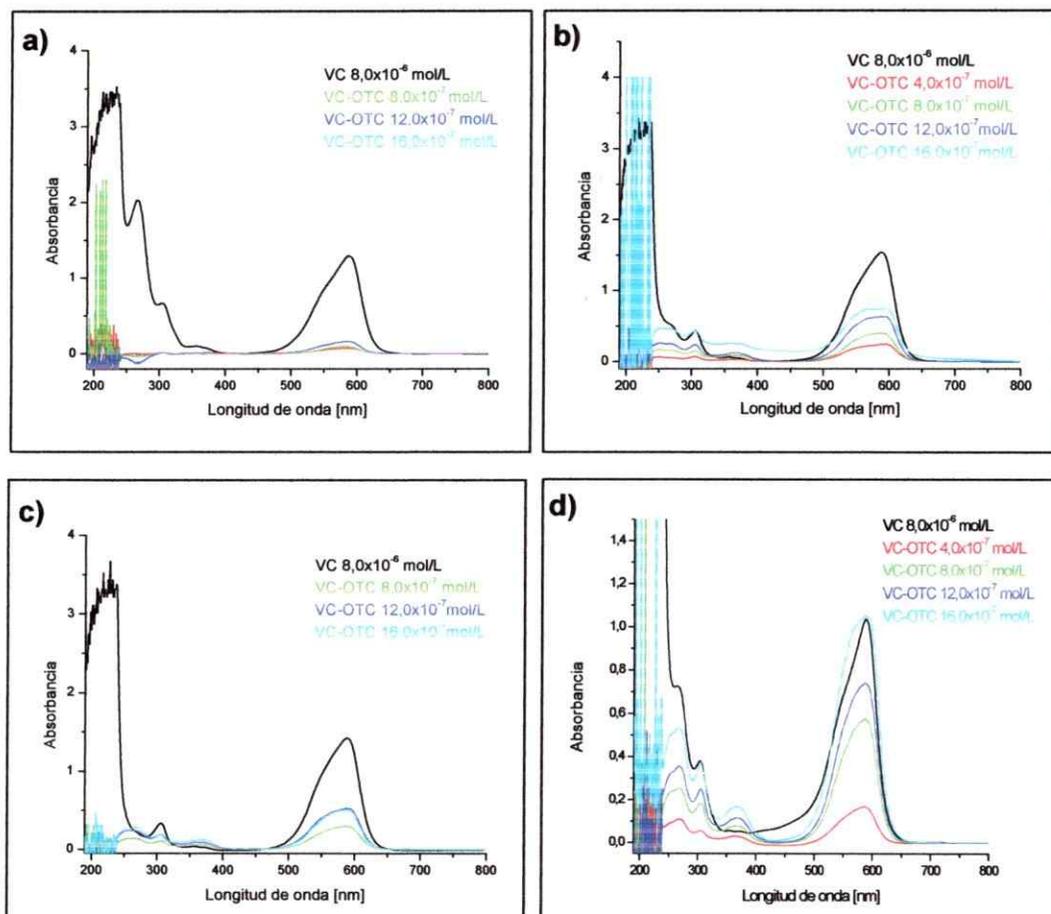


Figura 22: Espectros de absorción del par iónico VC-OTC, leídos contra blanco VC en diferentes medios de pH básicos. a) Amortiguador Britton-Robinson. b) Medio NaOH $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. c) Medio NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. d) Medio tetraborato de sodio $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

Frente a los resultados de ensayos preliminares, el colorante que estaría presentando una mejor respuesta como contraión para extraer OTC desde medio acuoso por formación de par iónico es VC, en medio básico.

3.4.3. Selección de extractante

Una variable fundamental para la LLE del par iónico, es la elección del solvente utilizado como extractante. Estos solventes orgánicos, deben ser inmiscibles con el agua, para que se produzca la separación de las fases y posteriormente se pueda obtener la señal analítica en el solvente orgánico. La Figura 23 presentan los espectros de absorción de este estudio bajo las condiciones experimentales del punto experimental 2.4.7.

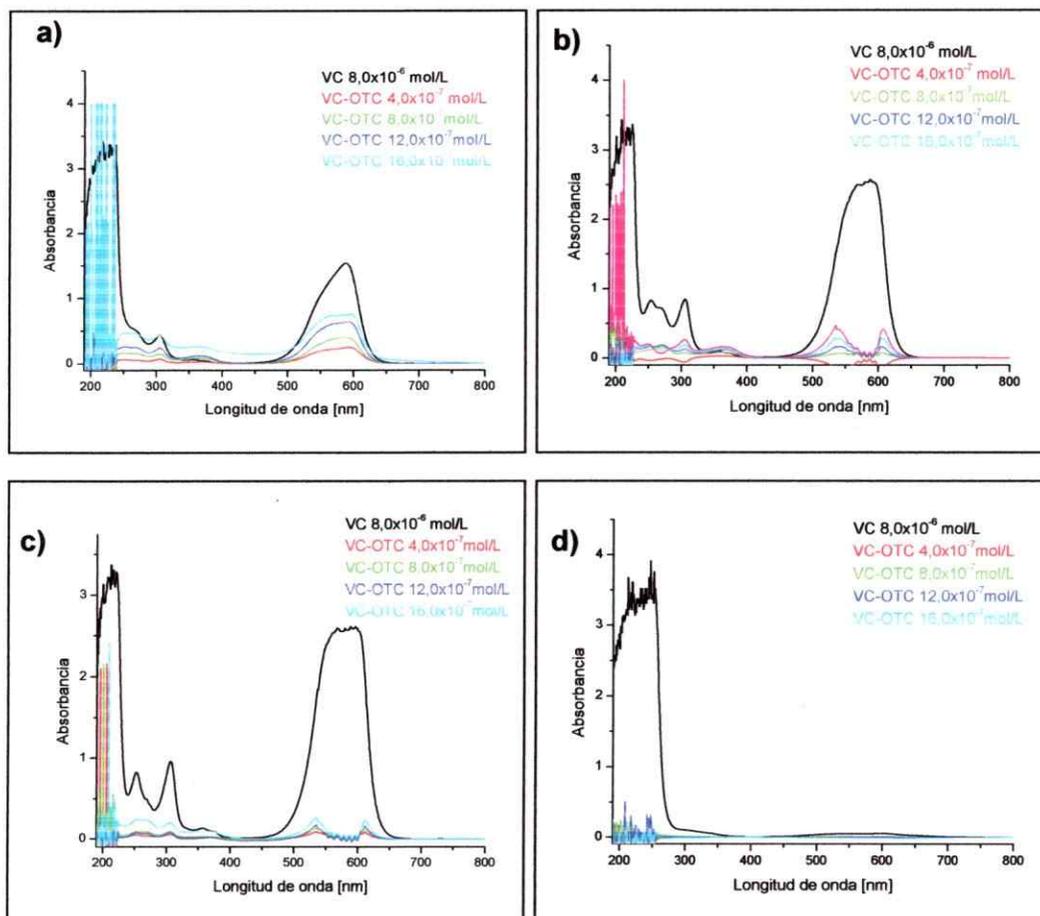


Figura 23: Espectros de absorción del par iónico VC-OTC leídas contra blanco VC, en diferentes extractantes orgánicos en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. a) cloroformo, b) diclorometano, c) 1,2 dicloroetano, d) tetracloruro de carbono. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$ y $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

Como se muestra en la Figura 23, el par iónico es extraído en solventes que presentan baja polaridad, también llamados solventes no disociadores por presentar baja ϵ (entre 10,4 y 4,7). Por el contrario el par iónico no se extrae en solventes apolares como CCl_4 ($\epsilon = 2,8$), concluyendo con estos resultados que el par iónico presenta características medianamente polares. De los tres solventes orgánicos en que se extrae el par iónico, el que mostró un mejor comportamiento espectral fue cloroformo, esto se debe, a que las señales de absorción presentan menos distorsión comparados con los otros dos solventes orgánicos empleados como extractantes, por lo cual CHCl_3 fue seleccionado para futuras determinaciones.

Antes de realizar un ensayo de las variables fisicoquímicas de extracción, se comprueba que OTC no se extrae en CHCl_3 , por lo que necesita de un contraión para ser extraída a la fase orgánica. La Figura 24 muestra los espectros de absorción de OTC (color rojo), VC (color negro) y VC-OTC (color azul) extraídos en CHCl_3 , observándose que el antibiótico no es extraído en el solvente orgánico a menos que esté en presencia de VC.

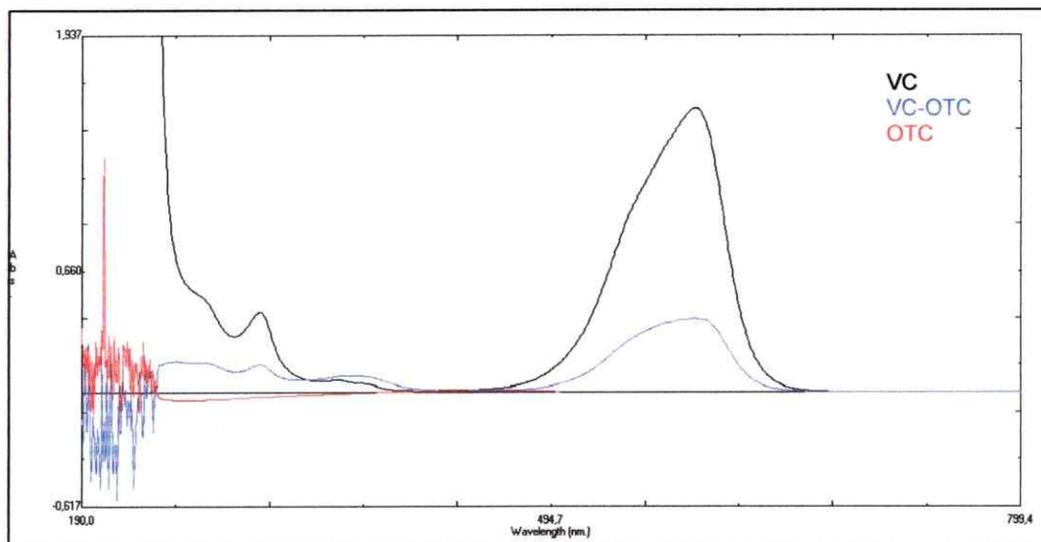


Figura 24: Espectros de absorción de la extracción de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L, OTC $16,0 \times 10^{-7}$ mol/L y VC-OTC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L - $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L en cloroformo en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$.

3.4.4. Características del violeta cristal

El colorante violeta cristal 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). También se ha encontrado un amplio uso como aditivo para inhibir mohos y hongos en el tratamiento de infecciones fúngicas. Como resultado de estas propiedades anti-hongos existe un serio potencial de la mala utilización de estos fármacos en acuicultura. Recientemente se han construido varios informes que indican el uso de VC en acuicultura (Dowling y col., 2006).

En abril de 2007, violeta cristal y su metabolito leuco violeta cristal fueron incluidos en el programa de control de sustancias no autorizadas en carne y piel de

pescado, según el programa de control de fármacos de Semapesca Chile (Semapesca, noticias 2007).

El sólido del violeta cristal contiene un protón muy ácido pK_a 1,0 Figura 25 (da Silva y col., 2005), confiriéndole a la molécula neutra un carácter apolar, esto permite que VC sea soluble en solventes orgánicos. Sin embargo, cuando este colorante es disuelto en agua, la estructura de la molécula se reordena liberando ese protón y se forma una molécula estable con la carga positiva deslocalizada en los tres grupos aminos. Estas propiedades son consideradas en la discusión de esta tesis.

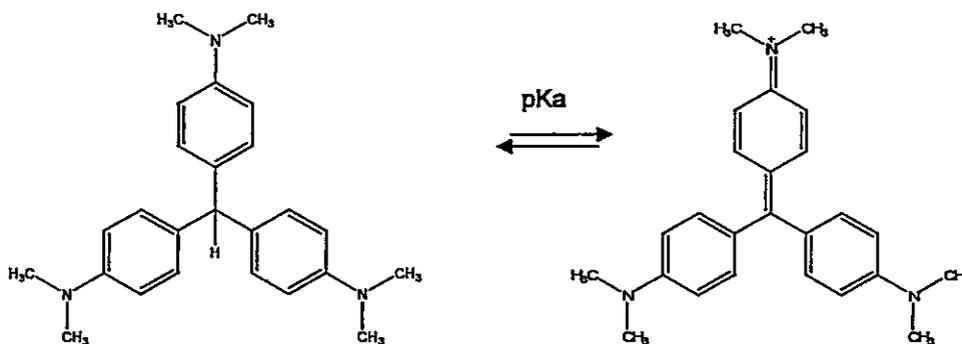


Figura 25: Estructura del colorante violeta cristal, y equilibrio ácido-base.

3.5. ASIGNACIÓN DE LAS SEÑALES DE VC Y OTC POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES

Sobre la base de los resultados obtenidos, la determinación de OTC basada en la formación de pares iónicos, se realizará con el colorante violeta cristal (VC), utilizado como contraión en medio básico, debido a que este colorante presenta una mejor respuesta espectral para fines analíticos.

Para demostrar dicha formación se utilizará la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN), tomando como criterio la comparación de las señales de los compuestos individuales con las señales de la mezcla VC-OTC. La obtención de señales o corrimientos químicos permitirá corroborar la formación del par iónico. Las muestras fueron preparadas según el procedimiento experimental 2.4.14.

3.5.1. Asignación de las señales de OTC por ^1H RMN

Se obtuvo el espectro ^1H RMN de OTC sólido estándar, utilizando como solvente agua deuterada (D_2O), Figura 26. Se identificaron las señales características del antibiótico de acuerdo al artículo de Schach von Wittenau y Blackwood, 1966, entre ellas se destacan las correspondientes a los protones del anillo aromático entre 6.90 y 7.51 ppm; un singlete en 4.25 ppm, 2.95 ppm y en 1.75 ppm, correspondientes al H C-5; al $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ y al CH_3 C-6 respectivamente, de la Figura 1.

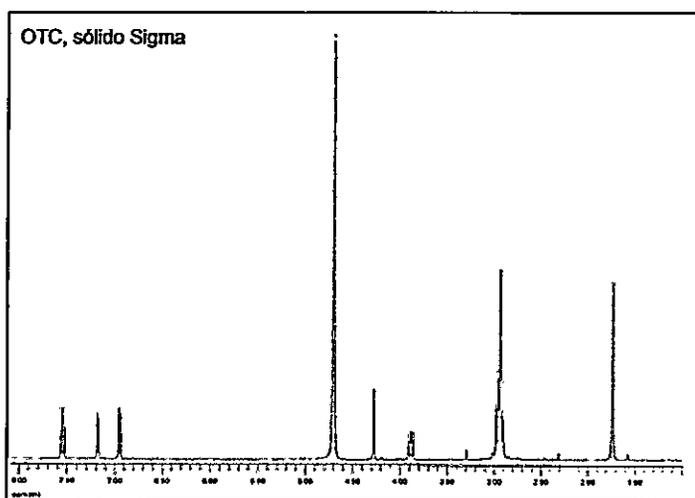


Figura 26: Espectro de ^1H RMN en D_2O de OTC-sólido Sigma

3.5.2. Asignación de las señales de VC por ^1H RMN

Se obtuvo el espectro ^1H RMN de VC sólido estándar Merck, utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3), Figura 27.

Las señales identificadas fueron: dos señales dobletes a 6.88 y 7.32 ppm, correspondientes a las señales de protones aromáticos, además de una señal singlete en 3.23 ppm correspondientes a los grupos N-Me equivalentes. Estas señales sirvieron de base para estudiar el comportamiento de VC a diferentes pH básicos, medio en que se realiza la extracción líquido-líquido.

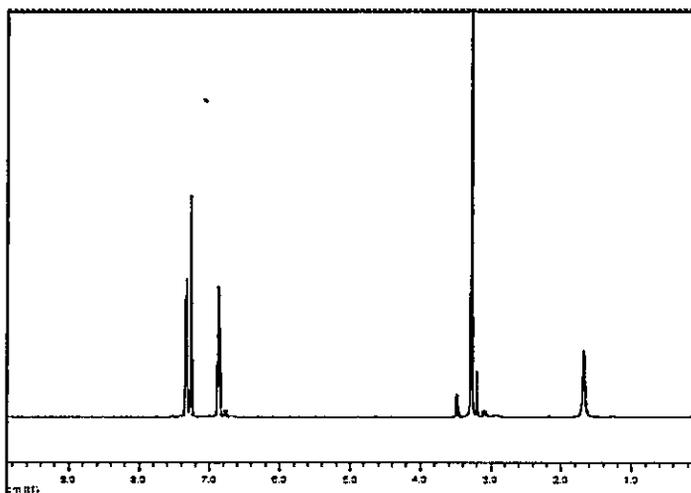


Figura 27: Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-sólido Merck.

3.5.3. Asignación señales VC y OTC en medios básicos. NaOH

De acuerdo a la Tabla 10, la posible formación del par iónico, estaría ocurriendo a pH básico con amortiguador Britton Robinson, medio de NaOH, amoniacal y de tetraborato de sodio.

Las señales protónicas de ambos compuestos fueron corroboradas en estos medios de pH, con excepción del amortiguador Britton Robinson debido a la complejidad de su solución.

En una primera instancia se obtuvieron los espectros de resonancia de VC en medio de hidróxido de sodio $\text{pH } 9,0 \pm 0,2$. Los resultados se muestran en la Figura 28, encontrándose una gran diferencia con las principales señales aromáticas del VC sólido estándar. La aparición de nuevas señales de menor intensidad asignables a protones aromáticos (entre 6,80 y 7,20 ppm), además de nuevas señales alifáticas

entre 2.50 y 3.20 ppm, sugieren la descomposición o formación de una nueva especie en menor proporción. (Figura 29). El nuevo compuesto podría ser formado por una especie resonante del VC que sugiere un déficit de electrones en el carbono terciario y que podría ser atacado por el ión hidroxilo, generando una nueva especie en menor proporción. Esto llevó a descartar este medio de pH, el que sería muy agresivo para realizar la formación del par iónico VC-OTC.

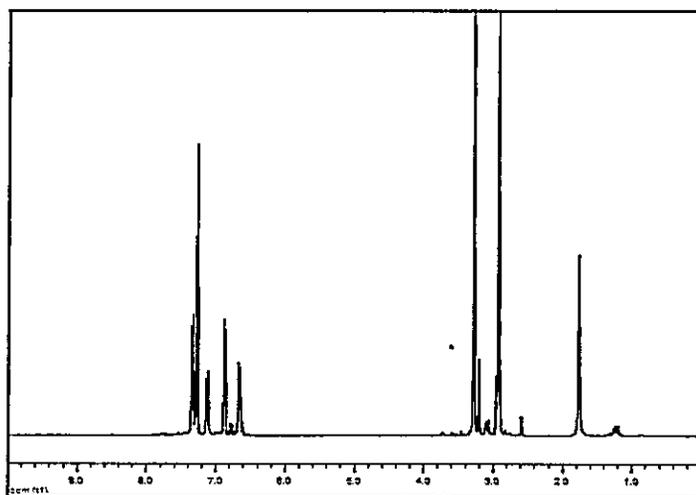


Figura 28: Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-medio NaOH extraído en cloroformo.

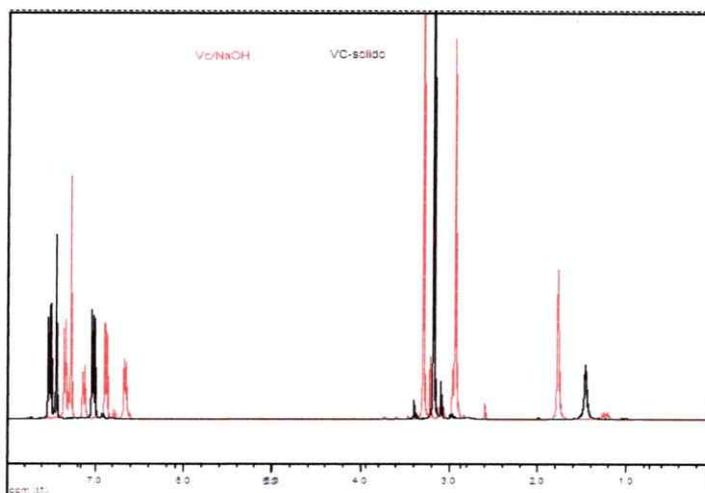


Figura 29: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio NaOH.

Luego, se obtuvo el espectro de resonancia de OTC disuelto en D_2O con una pequeña cantidad de NaOH (Figura 30), y también se observaron nuevas señales con diferente corrimiento químico, en comparación con el espectro del sólido OTC disuelto en D_2O (Figura 26), sugiriendo cambios estructurales del antibiótico en este medio. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos por ^1H RMN la utilización de NaOH como medio de pH para la formación de par iónico VC-OTC, estaría produciendo en estas condiciones la formación de nuevas especies o descomposición de ambos compuestos, y no tendría utilidad analítica.

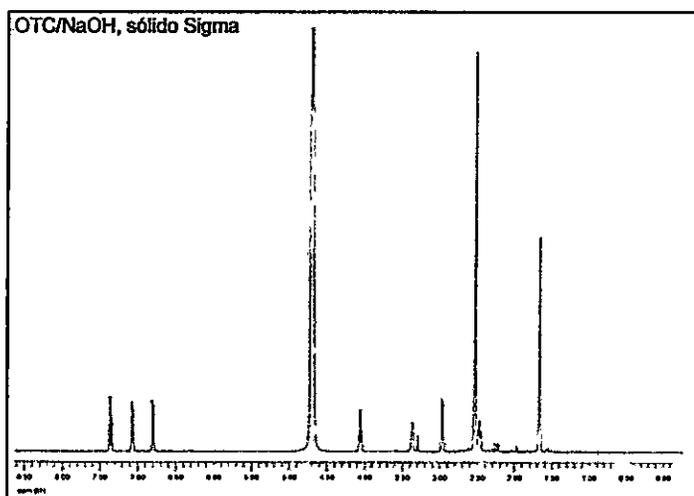


Figura 30: Espectros de ^1H RMN en $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOH}$ de OTC-sólido Sigma.

3.5.4. Asignación señales VC en medios básicos. Tetraborato de sodio

Posteriormente se realizó la identificación de señales de VC por ^1H RMN, en medio de tetraborato de sodio pH 9,3, para luego identificar la formación del posible par iónico. Los resultados obtenidos en la Figura 31, muestran un comportamiento espectral similar al encontrado en medio de NaOH (Figura 28), con la aparición de nuevas señales atribuibles a una nueva especie en menor proporción o a una posible interacción entre el medio y colorante, dificultando la identificación de las señales de protones aromáticos del colorante VC en este medio y de las nuevas señales que se encuentran entre 1.00 y 4.00 ppm (Figura 32). Esto dificulta la identificación de las señales del par iónico VC-OTC, debido a que OTC también presenta señales de protones aromáticos y sus intensidades son de menor proporción con respecto a las intensidades de VC y llevaría a confusión. Por esta razón se descarta tetraborato de sodio, a pesar de que es posible mantener constante la fuerza iónica y el pH en todo el proceso de extracción.

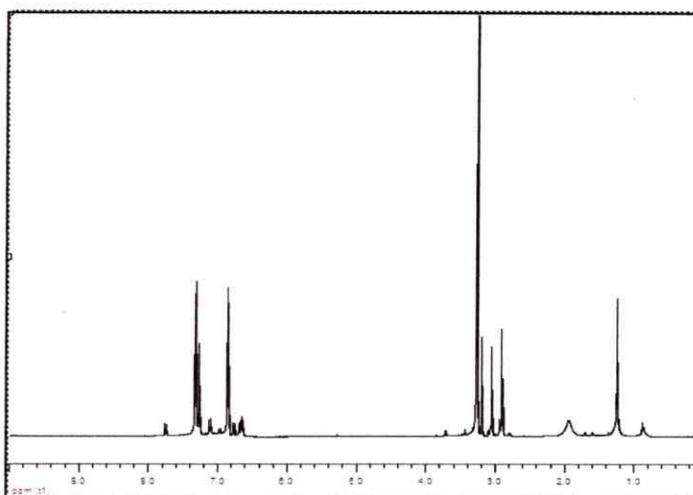


Figura 31: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 de VC-medio tetraborato extraído en cloroformo.

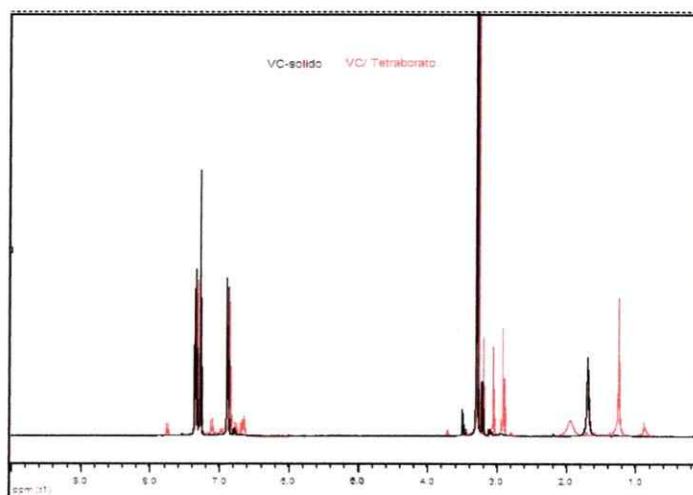


Figura 32: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio tetraborato extraído en cloroformo.

3.5.5. Asignación señales VC y OTC en medios básicos. NH_3

De acuerdo a los resultados anteriores, se siguió con la búsqueda de un medio adecuado de pH que permita la formación del par iónico, sin la producción de compuestos adicionales. Para ello se registraron espectros de ^1H RMN en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Los resultados presentados en la Figura 33, muestran que al realizar la extracción de VC medio amoniacal, éste presentó las mismas señales de protones aromáticos de VC sólido Merck disuelto en CDCl_3 , en todo el rango de medición. Asegurando que en medio amoniacal se estaría trabajando con la especie de VC que favorece la interacción con OTC, ya que al realizar la comparación espectral, no se observan corrimientos químicos, Figura 34.

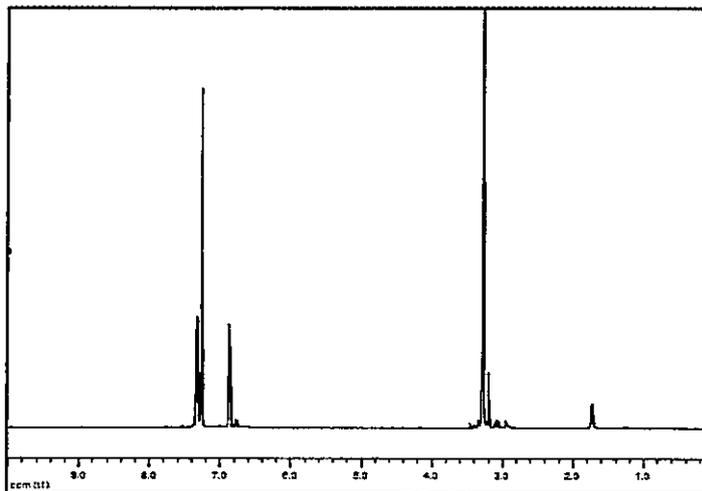


Figura 33: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 de VC medio amoniacal extraído en cloroformo.

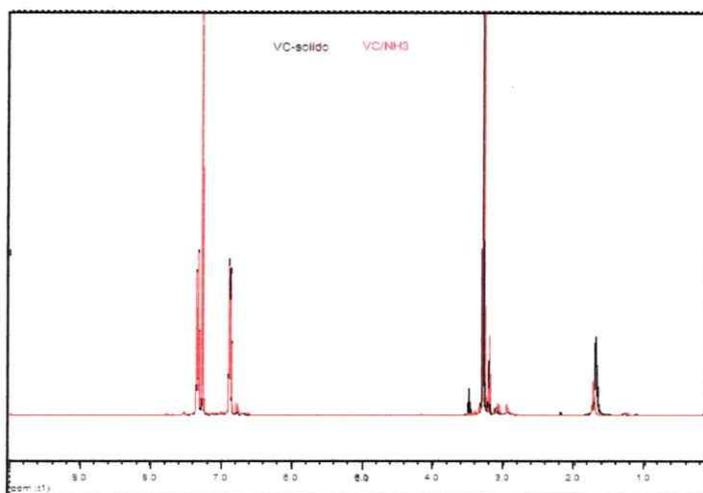


Figura 34: Comparación de los espectros de ^1H RMN VC-sólido Merck y de VC-medio amoniacal.

Para obtener los espectros de RMN del antibiótico en el mismo solvente deuterado que VC y el par iónico, fue necesario preparar las muestras de acuerdo al procedimiento experimental 2.4.14, debido a que OTC no es soluble en el solvente orgánico cloroformo. En primera instancia se obtuvieron los espectros de OTC disuelto en agua destilada y luego en medio amoniacal para verificar las señales de OTC en la forma aniónica. Los resultados se presentan en las Figuras 35, observándose que la señal en 5.11 ppm atribuible al protón fenólico de la muestra disuelta en agua destilada, no se observa cuando la muestra se disuelve en solución acuosa amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, corroborando que en estas condiciones de pH el antibiótico ya ha perdido su tercer protón ($\text{pK}_{\text{a}3}$), dejando de esta forma a OTC con exceso de electrones, en condiciones de formar una interacción tipo electrostática con VC.

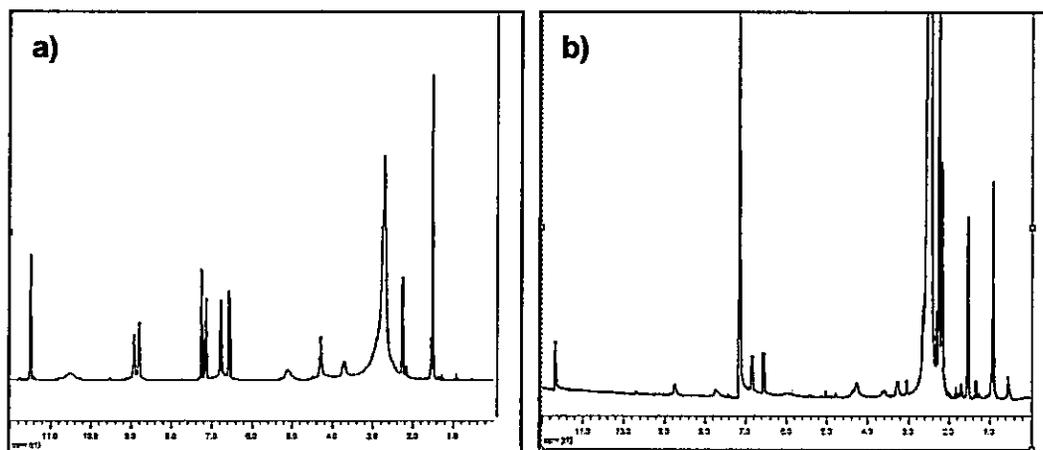


Figura 35: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 -DMSO- d_6 de OTC sólido Sigma. a) Medio agua destilada. b) Medio agua destilada/ NH_3 ³.

Luego de corroborar por ^1H RMN, que en medio amoniacal VC y OTC, se obtienen en la forma deseada para poder formar un par iónico, se realizó el espectro de resonancia de VC-OTC el que posteriormente se comparó con las señales de VC. La Figura 36-a, muestra la comparación de dichos espectros, presentándose desplazamientos en los corrimientos químicos de las señales de protones aromáticos en la mezcla, indicando una posible interacción del VC cuando está en presencia de OTC. Bajo el mismo criterio, se compararon las señales de OTC con las de VC-OTC (Figura 36-b), encontrándose también desplazamientos en los corrimientos químicos de la mezcla.

³ Preparación de la muestra descrita en la sección 2.4.14.

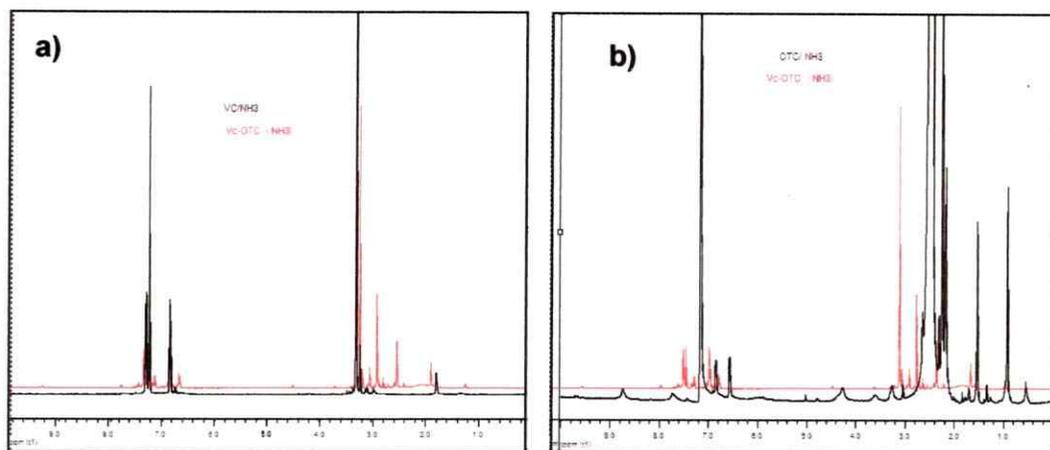


Figura 36: Espectros de ^1H RMN en CDCl_3 . a) VC y VC-OTC. b) OTC y VC-OTC. Medio amoniacal.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta estos desplazamientos en los corrimientos químicos de la mezcla de VC y OTC en medio amoniacal, se postula que estaría ocurriendo una interacción de tipo electrostática entre VC y OTC.

Para corroborar este postulado, se realizó un experimento basado en la medición de los tiempos de relajación (T_1) de VC, de los protones que podrían estar afectados por la presencia de OTC y se compararon con los T_1 de la mezcla VC-OTC (Tabla 11). De igual forma se obtuvieron los T_1 de OTC y se compararon con los de la mezcla.

Este experimento consiste en medir el tiempo que demora el sistema (spin) en volver al equilibrio luego de haber sido excitado con radiofrecuencia, la medición es de un protón con respecto a su entorno. A este proceso se le denomina tiempo de relajación o relajación longitudinal T_1 (Fufkushima y Roeder, 1981).

Tabla 11: Tiempos de relajación de VC, comparados con los tiempos de relajación del par iónico VC-OTC.

VC	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
Señal ppm	7.34		6.87	6.65	3.29	2.93
T ₁ (s)	1,26		0,92	1,26	0,78	1,34

VC/OTC	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8
Señal ppm	7.77	6.99	6.82	6.69	3.22	3.06	2.90	2.83
T ₁ (s)	2,89	1,09	0,24	1,24	0,19	1,41	1,59	1,29

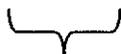
ΔT_1 Peak 1: -1,64 (s)

ΔT_1 Peak 5: 0,59 (s)

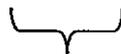
ΔT_1 Peak 3: 0,68 (s)

ΔT_1 Peak 6: 0,07 (s)

ΔT_1 Peak 4: 0,02 (s)



Señales de protones aromáticos



Señales de protones metilos

De acuerdo a los resultados de ΔT_1 , el peak 3 muestra una gran diferencia de T_1 , ya que la señal de 6.87 ppm, tiene un desplazamiento químico y disminuye considerablemente su T_1 , cuando está en presencia de OTC, indicando que los protones aromáticos del VC relajan en menor tiempo que cuando está solamente VC, debido a que está impedido para poder relajar por la interacción que tiene con OTC. Resultados similares se encontraron con la señal de 3.29 ppm correspondiente a grupos N-Me equivalentes. En todos los casos, se evidencia una disminución de T_1 , con excepción al peak 1 que presenta un leve aumento en su relajación, debido a que probablemente son los protones (H_b) del anillo aromático-A (Figura 37). Tomando en consideración los resultados obtenidos, es posible concluir que la interacción de tipo

electrostática estaría ocurriendo por la parte del anillo aromático-A del VC, donde la carga positiva se localiza en el nitrógeno y por lo tanto también se ven afectados los protones de metilos enlazados a ese nitrógeno. La Figura 37 muestra un esquema en que se corrobora el postulado de la interacción.

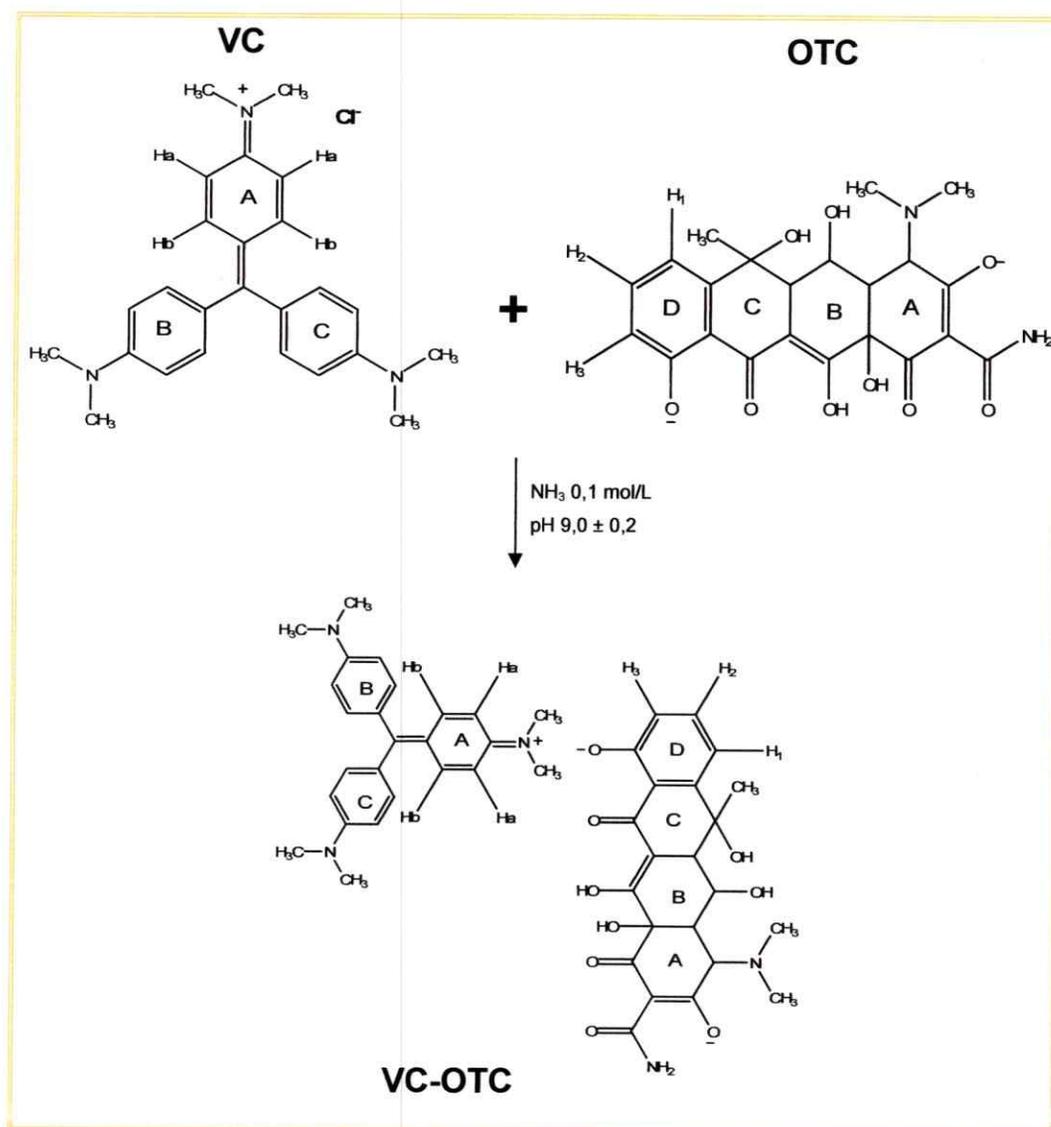


Figura 37: Esquema de la posible formación del par iónico VC-OTC.

Del mismo modo se compararon las señales de protones aromáticos de OTC, con las del par iónico VC-OTC, los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Tiempos de relajación de OTC, comparados con los tiempos de relajación del par iónico VC-OTC.

OTC	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	VC/OTC	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
Señal ppm		7.15	6.84	6.55	Señal ppm	7.77	6.99	6.82	6.69
T ₁ (s)		1,56	0,88	2,48	T ₁ (s)	2,89	1,09	0,24	1,24

ΔT_1 Peak 2: 0,47 (s)

ΔT_1 Peak 3: 0,63 (s)

ΔT_1 Peak 4: 1,24 (s)



Señales de protones aromáticos

En la Tabla 12 se informan sólo las señales de los protones aromáticos de OTC, (anillo D, Figura 36), debido a que son las señales del fenol las que evidencian una mayor diferencia de T₁. Los resultados de ΔT_1 , muestran una notoria diferencia del peak 4, debido a la disminución de T₁, correspondiente al protón fenólico H₃, del esquema de la Figura 37. En todos los casos se muestra una significativa disminución de T₁, concluyendo de esta manera que es el anillo D de OTC el que interactúa con VC. Del mismo modo, queda descartada la interacción por parte del anillo A de OTC con VC debido a la deslocalización de la carga negativa, como se discutió en la sección 3.2.1, además que probablemente en dicha zona exista impedimento estérico. Por lo tanto, por esta técnica queda confirmada la formación del par iónico VC-OTC, mediante un tipo de interacción que podría ser electrostática. En todas las mediciones la desviación estándar fue entre $3,0 \times 10^{-3}$ y $9,0 \times 10^{-3}$.

3.5.6. Experimentos de RMN bidimensionales

La espectroscopía de RMN bidimensional es una poderosa técnica que se utiliza para determinar interacciones inter e intra-moleculares. Con el fin de verificar la interacción entre el VC y OTC, se obtuvo 2D-COSY del par iónico. El espectro bidimensional demuestra que hay una interacción a través del enlace H-H de los protones aromáticos del VC (Figura 38).

Para aumentar la información conformacional, se obtuvo el espectro 2D-ROESY del par iónico (Figura 39), donde es posible observar la interacción de los protones Ha del VC con H3 de OTC, Figura 40. Esta interacción no es observada en el espectro 2D-COSY del par iónico debido a que 2D-ROESY es capaz de relacionar las señales a través del espacio a una distancia menor que 5Å; esta distancia es necesaria para confirmar estas interacciones. Mediante estos experimentos bidimensionales se verifica la existencia de la interacción electrostática entre VC-OTC.

Por lo tanto, a través de estas técnicas fue posible confirmar que la formación del par iónico ocurre de acuerdo al esquema de la Figura 37.

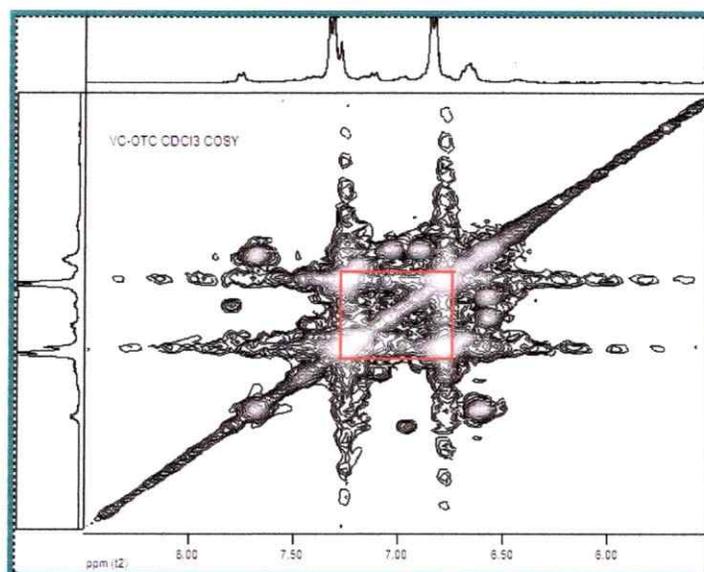


Figura 38: Espectro bidimensional COSY del par iónico VC-OTC en CDCl₃. Medio amoniacal.

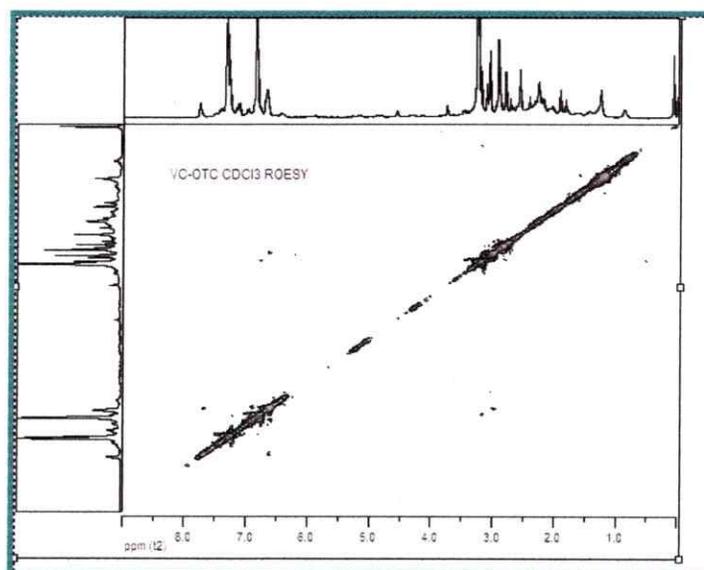


Figura 39: Espectro bidimensional ROESY del par iónico VC-OTC en CDCl₃. Medio amoniacal.

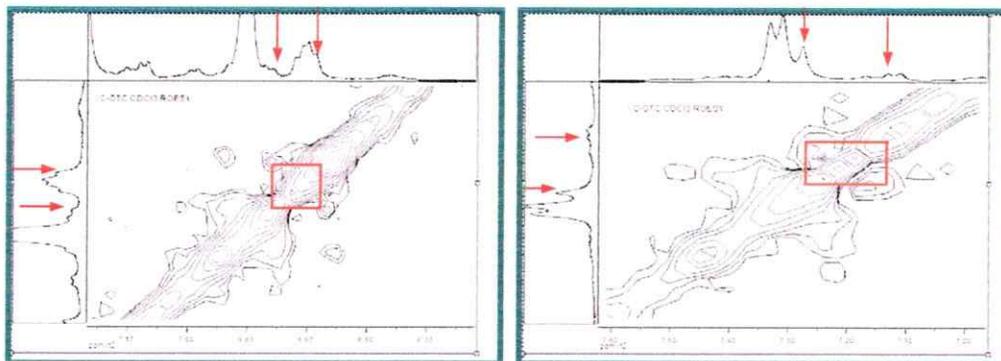


Figura 40: Espectros bidimensionales ROESY del par iónico VC-OTC en CDCl_3 . Medio amoniacal. a) Gráfico entre 6.0 a 7.33 ppm. b) Gráfico entre 7.0 a 7.6 ppm

3.6. ASIGNACIÓN DE SEÑALES POR ESPECTROSCOPIA INFRAROJA

Se realizaron mediciones por espectroscopía IR para poder identificar el par iónico, bajo el criterio de comparación de las señales de los compuestos por separado con las señales de la mezcla VC-OTC. Estas mediciones se realizaron de acuerdo al procedimiento experimental 2.4.15, en que se detalla la preparación y medición de las muestras para sólidos y para los extractos orgánicos. En primera instancia se obtuvieron los espectros IR de los sólidos estándares de VC y de OTC asignando las señales características de los grupos funcionales de cada uno de ellos. (Silverstein y Webster, 1998). Los resultados son presentados en la Tabla 13.

Tabla 13: Principales señales de VC y OTC.

	IR KBr (ν cm^{-1})
VC	Ar-CH 3.450; N-Me 2.854-2.923; Ar-C=C 1.586; N-Ar 1.365; Ar-deformaciones angulares fuera del plano bajo 900; Ar-deformaciones angulares en el plano 1.225-950.
OTC	O-H 3.440-3.330; N-Me 2.854-2.923; O=C-NH ₂ , C=O 1.672- 1.587; Ar-C=C 1.587; Ar-OH 1.250-1.150; Ar-deformaciones angulares fuera del plano bajo 900; Ar-deformaciones angulares en el plano 1.225-950.

Para hacer la comparación de las señales espectrales entre VC y VC-OTC, fue necesario obtener los espectros en las mismas condiciones experimentales, esto implica realizar la extracción de VC y VC-OTC medio amoniacaal en CHCl_3 , y luego llevar a medición hasta evaporación del solvente. La Figura 41, muestra los espectros IR, en que se comparan las principales señales de VC con las de VC-OTC, observándose que las bandas principales se mantienen, debido a que VC no es una especie dependiente del pH. No obstante, se observa un desplazamiento de frecuencias en la zona asociada a deformaciones angulares en el plano del anillo aromático, entre 1.225-950 cm^{-1} , en la solución mezcla. Entre ellas se destaca la banda de 828 cm^{-1} debido al desplazamiento que presenta cuando OTC está presente, ya que el espectro de VC muestra esta misma banda, pero a 816 cm^{-1} , indicando que es una banda sensible a la interacción de tipo electrostática entre VC y OTC.

A través de esta técnica espectroscópica, se confirma la formación del par iónico VC-OTC, ya que las bandas vibracionales asociadas al anillo-A del VC (Figura 36), se desplazan cuando está presente OTC de forma aniónica, presentando un espectro vibracional diferente, produciéndose una redistribución electrónica, Figura 41.

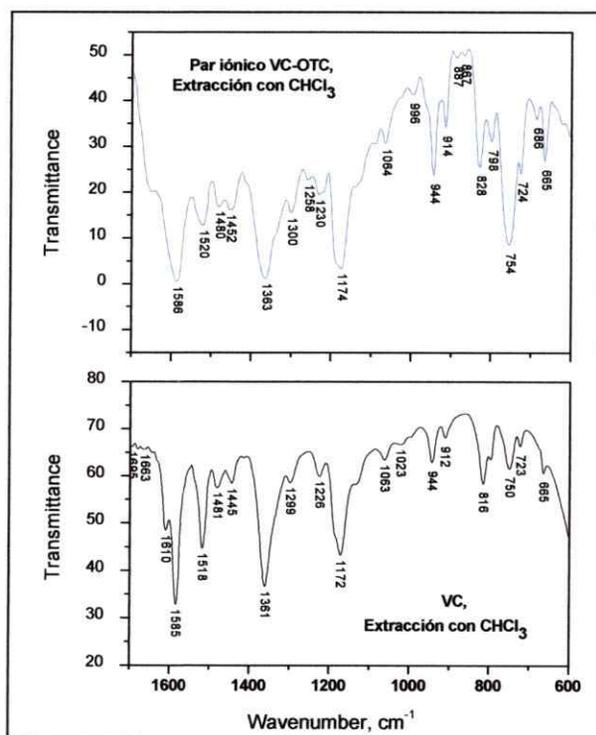


Figura 41: Espectros IR medio amoniacal. (a) Par iónico VC-OTC (b) VC

Una vez confirmada la formación del par iónico por diferentes técnicas espectroscópicas, entre ellas: espectrofotometría UV-Vis, ¹H RMN, cálculos de los tiempos de relajación (T₁) mediante ¹H RMN, y espectroscopía IR, se prosiguió con las optimizaciones del método analítico en la formación del par iónico VC-OTC medio amoniacal.

3.7. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO EN LA FORMACIÓN DEL PAR IÓNICO VC-OTC

Se obtuvieron los espectros de absorción de VC y VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, leídos contra aire (Figura 42). Anteriormente las muestras de par iónico fueron leídas contra blanco VC, sin embargo, desde ahora en adelante los extractos orgánicos de VC-OTC son registrados mediante una novedosa forma de medición que es contra aire. Esto debió realizarse porque VC se extrae en la fase orgánica y cuando el par iónico es leído contra este blanco de reactivos, la resta que debiera ser del blanco no se produce de manera reproducible ya que el par iónico tiene una mezcla VC con VC-OTC. Esta mezcla se debe, a que no es posible tener un exceso de VC por limitaciones instrumentales, en orden de evaluar cuantitativamente al VC-OTC. En la Figura 42, es posible observar la formación del par iónico VC-OTC bajo esta nueva modalidad. Esta formación se asocia al hecho que la banda electrónica del VC de 590,0 nm, cambia su forma e incrementa su absorción linealmente con la cantidad de antibiótico agregado. Además, se observa otra zona lineal atribuible a la formación del par iónico entre 360,0 y 380,0 nm, donde la banda del colorante presenta una baja absorción, pero cuando está en presencia de OTC, esta banda aumenta linealmente produciendo un cambio en la forma de la banda, asociado a un nuevo ordenamiento electrónico. Estos cambios en las bandas de absorción, confirman la existencia del par iónico VC-OTC en medio amoniacal por espectrofotometría UV-Vis (El-Brashy y col., 2004; Antonov y col., 1999).

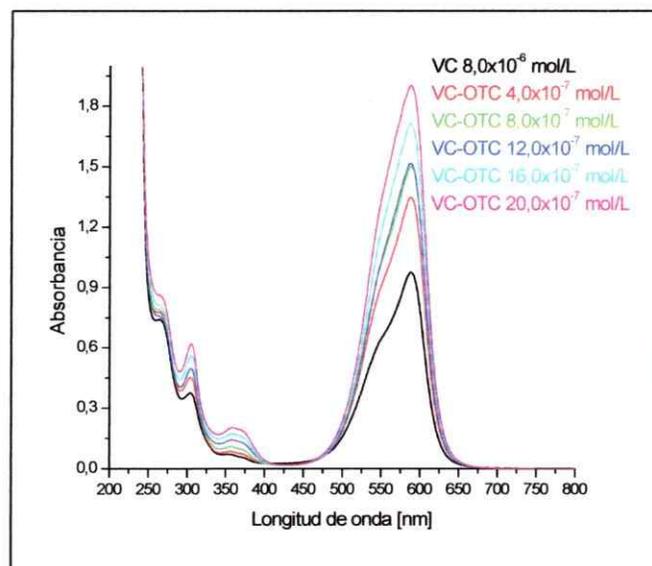


Figura 42: Espectros clásicos del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes concentraciones de OTC. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

Por otra parte, se realizó un seguimiento del pH en el transcurso de la extracción VC-OTC. Se comparó el pH de la fase acuosa antes de la extracción con el pH de la fase acuosa después de la extracción líquido-líquido y en todos los casos su valor se mantuvo en $9,0 \pm 0,4$.

3.7.1. Cálculo de la constante de distribución para el colorante VC

Debido a que el VC se distribuye tanto en la fase orgánica como en la fase acuosa, se determinó el coeficiente de distribución o reparto, K_D . Esto se debe a que VC con el grupo amino que posee, es capaz de asociarse con el agua a través de puente de hidrógeno siendo soluble en la fase acuosa. Por otro lado VC es capaz de formar par iónico con el cloruro en solventes orgánicos (Oliveira y col., 2002), siendo

parcialmente soluble en estas fases.

La relación de las concentraciones en ambas fases (C_{or} y C_{ac}) es proporcional a las respectivas solubilidades (S_{or} y S_{ac}). Cuando el equilibrio es alcanzado a una temperatura determinada, se denomina coeficiente de distribución o reparto, ecuación 3:

$$K_D = \frac{C_{or}}{C_{ac}} = \frac{S_{or}}{S_{ac}} \quad (3)$$

Se realizaron curvas de calibración independientes en cloroformo y en agua destilada a 25 °C para VC en rangos de concentraciones entre $2,0 \times 10^{-6}$ y $10,0 \times 10^{-6}$ mol/L en medio amoniacal. Con el cálculo de la relación C_{or}/C_{ac} , se obtiene un valor de $K_D = 2,2 \pm 0,2$. Este valor, indica que VC es extraído mayoritariamente en la fase orgánica. Además, así lo demuestran los espectros de absorción de VC, ya que en cloroformo la pendiente de la curva de calibración es mayor que la pendiente de la curva construida en solvente agua.

3.7.2. Efecto de la luz del laboratorio sobre la estabilidad en el tiempo de VC y OTC

En soluciones acuosas independientes de OTC y VC en medio amoniacal, se estudió el efecto de la luz del laboratorio sobre la estabilidad en el tiempo. En las Figuras 43 y 44 se muestran los espectros de absorción de una solución de OTC $6,0 \times 10^{-5}$ y VC $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L, registrando su señal en el tiempo frente a la luz directa.

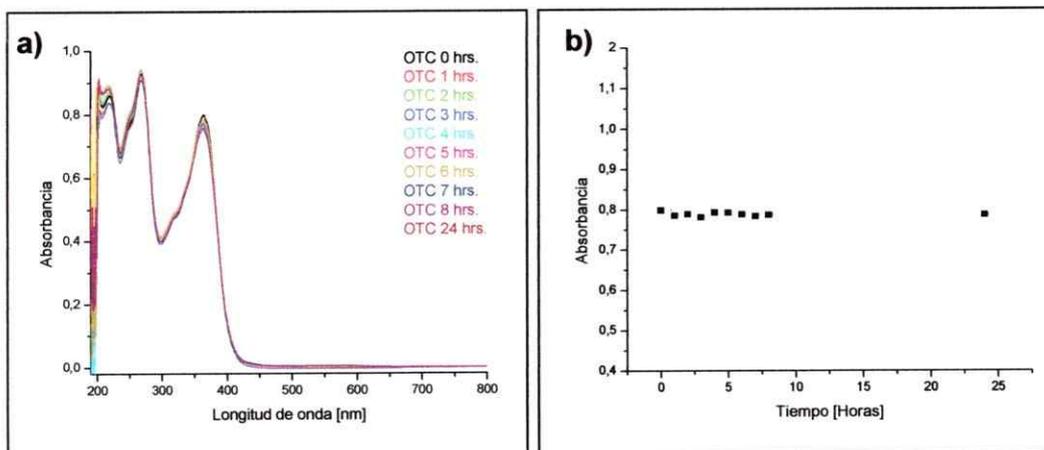


Figura 43: a) Espectros de absorción de OTC $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de OTC, a $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} 364,0$ nm.

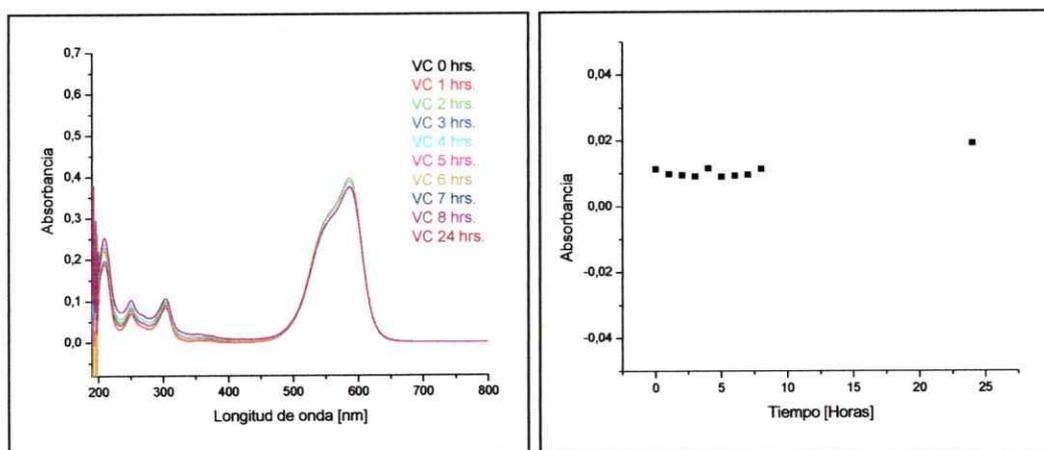


Figura 44: a) Espectros de absorción de VC $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$ a diferentes tiempos de exposición a la luz ambiental. b) Efecto del tiempo sobre la estabilidad de VC, a $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} 380,0$ nm.

Como se observa en la Figura 43, OTC en el rango de tiempo estudiado es fotoestable, debido a que no presenta corrimiento en sus bandas de absorción, al igual que VC, en la Figura 44. También se obtuvieron los espectros de absorción de VC y OTC al quinto día y no hubo diferencias espectrales.

3.8. OPTIMIZACIONES PRELIMINARES DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN LA FORMACIÓN DEL PAR IÓNICO VC-OTC. METODOLOGÍA UNIVARIABLES

Con el objeto de seleccionar una $\lambda_{analítica}$ donde la absorción corresponda sólo al par iónico VC-OTC y no a una mezcla de par iónico con colorante, se utilizó la técnica de espectrofotometría derivada para seleccionar un "zero crossing" del blanco VC, en el cual la absorción de VC-OTC permita la evaluación y la cuantificación del antibiótico.

Los espectros de absorción de VC y VC-OTC se registraron contra aire, y luego bajo un tratamiento con el software UV-PC se obtuvieron los espectros derivados. Esta nueva modalidad, se realizó con el objeto de asegurar que a la $\lambda_{analítica}$ del "zero crossing" la señal analítica corresponda sólo al par iónico. En la Figura 45, se muestran los espectros obtenidos bajo esta nueva modalidad, en que una vez registrados los espectros de absorción del par iónico, se evaluaron las segundas derivadas con un factor de suavizado 20.000 y un factor de escala 10.000, encontrándose con estas condiciones un "zero crossing" del blanco a una $\lambda_{analítica}$ de 380,0 nm, donde es cuantificable la señal del par iónico.

Al utilizar esta nueva modalidad de evaluación del par iónico se trabaja con la zona menos sensible del espectro clásico, entre 360,0 y 380,0 nm, comparado con la absorción de 590 nm, sin embargo, se optó por sacrificar este parámetro analítico con el fin de asegurar la evaluación sólo del par iónico y así evitar una mezcla de colorante con colorante-antibiótico. Además, en 590 nm se producen absorciones poco reproducibles tanto para VC como para VC-OTC.

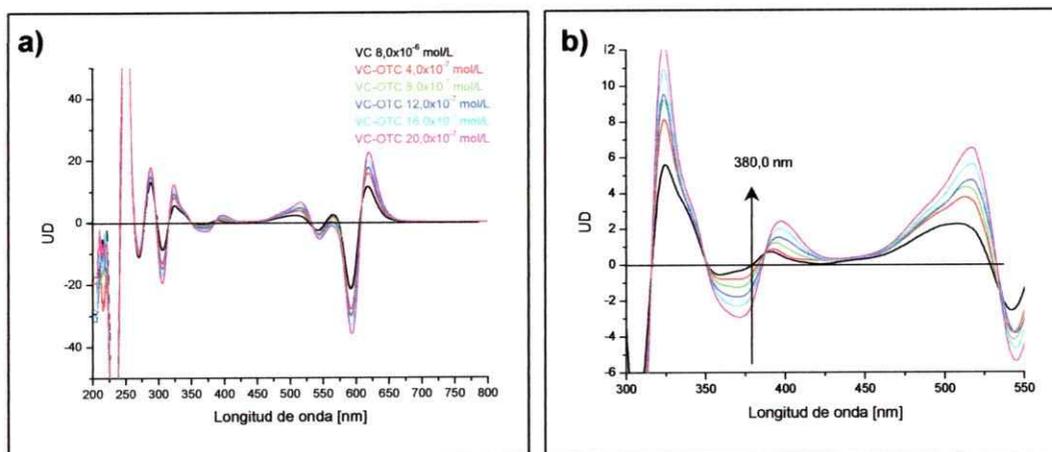


Figura 45: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$ a) Espectros derivados en rango de longitud de onda 190-800 nm. b) Zoom de espectros derivados entre 300 y 550 nm. Concentración VC: $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

3.8.1. Efecto de la concentración de NH_3 en la formación del par iónico VC-OTC

Se estudió el efecto de la cantidad de NH_3 agregado, ésta varió entre 20 y 150 μL correspondientes a concentraciones finales entre $4,0 \times 10^{-5}$ y $3,0 \times 10^{-4}$ mol/L; la formación del par iónico se realizó de acuerdo al procedimiento experimental 2.4.7. Los resultados demuestran que la formación del par iónico se favorece, cuando las condiciones de pH para realizar la extracción se mantienen en $9,0 \pm 0,4$ correspondiente a una concentración de NH_3 cercana a $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, ya que bajo estas condiciones se presentó una mejor linealidad de las concentraciones de VC-OTC con respecto a las unidades de derivadas (UD). Esto puede ser atribuido a que, para producir la formación de este par iónico, el antibiótico OTC debe encontrarse formando la especie aniónica A^{2-} , ya que en estas condiciones, OTC ha perdido su tercer protón ($\text{pK}_{\text{a}3}$), y de esta

forma pueda interaccionar con el colorante catiónico. Al utilizar cantidades superiores de NH_3 , la linealidad del par iónico se ve afectada, debido probablemente a que ocurre una descomposición parcial del antibiótico.

3.8.2. Efecto de la concentración del colorante utilizado como contraíón

La concentración del contraíón es un paso determinante en la preconcentración de antibióticos. Para favorecer la interacción del grupo amino del VC con la zona negativa de OTC es de importancia controlar las variables de pH y concentración del colorante para un rango de determinación del antibiótico. Estas concentraciones deben ser óptimas, para que los choques efectivos sean los necesarios y se produzca una interacción tipo electrostática, a modo de favorecer la formación del par iónico.

Este estudio se realizó a una concentración variable de VC entre $4,0 \times 10^{-6}$ y $10,0 \times 10^{-6}$ mol/L, manteniendo constante la concentración de OTC a $4,0 \times 10^{-7}$ mol/L, de acuerdo al procedimiento experimental 2.4.7. Estos resultados muestran que, a medida que aumenta la cantidad de VC, la formación del par iónico se ve favorecida en cuanto a la sensibilidad, debido a que la absorción de éste aumenta. Por lo tanto, como la zona de medición es a una $\lambda_{\text{analítica}}$ de 380,0 nm ("zero crossing"), no se produce limitación instrumental a pesar que la concentración de VC siga aumentando, ya que a esta $\lambda_{\text{analítica}}$ su señal es independiente de la concentración. Además, que en el espectro clásico del VC, la señal del máximo de absorción a 380,0 nm no es la banda principal.

3.8.3. Efecto del número de etapas de extracción sobre la señal analítica de VC-OTC

Se realizaron dos extracciones sucesivas de 5 mL de cloroformo con un tiempo de agitación de 5 min cada una. En cada extracto se evaluó la señal del par iónico a 380,0 nm por derivada de segundo orden, con un factor de suavizado 20.000 y factor de escala 10.000. Al evaluar las señales del par iónico de la segunda extracción, se observa que están fuera de los límites de detección. Por lo tanto, en primera instancia se trabajó con una extracción para cuantificar la señal atribuible al par iónico.

3.8.4. Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica de VC-OTC

En una extracción líquido-líquido, el tiempo de extracción es una variable relevante, debido a que es necesario conocer el tiempo en que se alcanza el equilibrio de formación del par iónico y de esta manera lograr que dicha formación sea cuantitativa para ser utilizado para fines analíticos. El efecto del tiempo de extracción se realizó con 5 mL de cloroformo variando el tiempo de agitación entre 0,5 y 8 min. En las Figuras 46 y 47 se muestran los espectros de las segundas derivadas de VC-OTC y VC con un factor de suavizado 20.000 y factor de escala 10.000. De este estudio, se concluye que la extracción alcanza el equilibrio en la formación del par iónico entre 3 y 5 minutos.

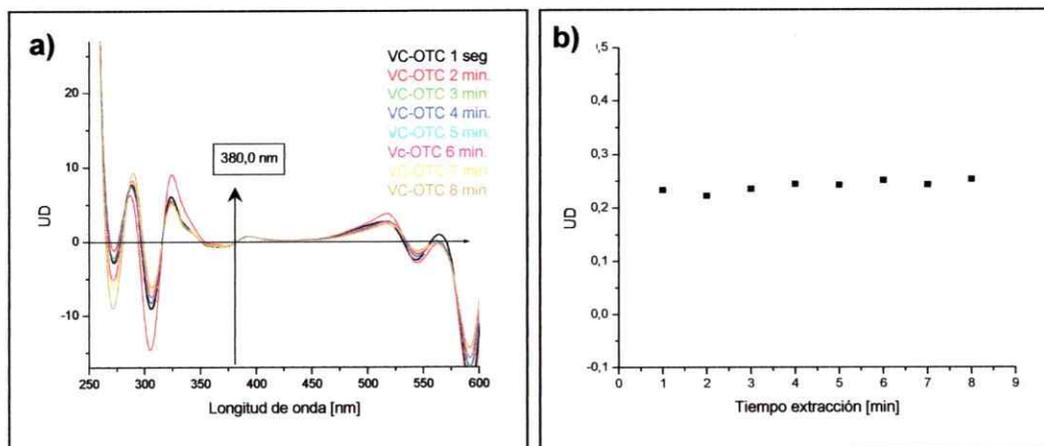


Figura 46: a) Espectros de segundas derivadas de VC-OTC $8,0 \times 10^{-6}$ - $8,0 \times 10^{-7}$ mol/L en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, a diferentes tiempos de extracción. b) Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 380,0 nm.

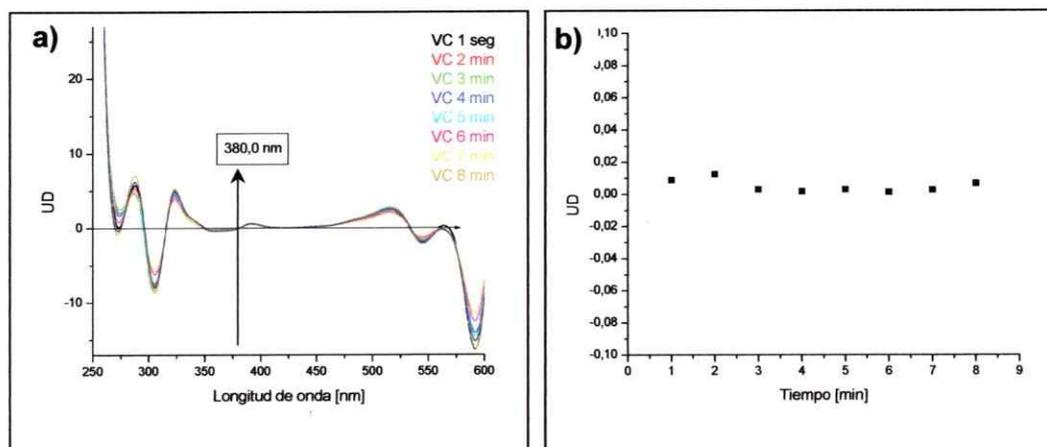


Figura 47: a) Espectros de segundas derivadas de VC $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, a diferentes tiempos de extracción. b) Efecto del tiempo de extracción sobre la señal analítica a $\lambda_{m\acute{a}x}$ 380,0 nm.

3.8.5. Efecto del volumen fase acuosa sobre la señal analítica de VC-OTC

El efecto del volumen de fase acuosa se realizó variando el volumen entre 50 y 150 mL, con todas las otras variables constantes, entre ellas la cantidad de OTC

agregada a la fase acuosa, y volumen de la fase orgánica, para observar el efecto de la preconcentración. Las condiciones experimentales son las referidas en el punto 2.4.7 de la parte experimental. Los resultados obtenidos en la Figura 48, muestra el efecto de preconcentración esperado, debido a que la concentración en 100 mL es la mitad que al utilizar 50 mL de fase acuosa. Sin embargo, la concentración en la fase orgánica se mantiene, incrementándose la sensibilidad del método en un factor de 2. Este resultado está en concordancia con el incremento de la relación fase acuosa/fase orgánica de 10 a 20. Sin embargo, se seguirá trabajando con un volumen acuoso de 50 mL para facilitar la etapa de agitación y homogenización en el matraz Erlenmeyer.

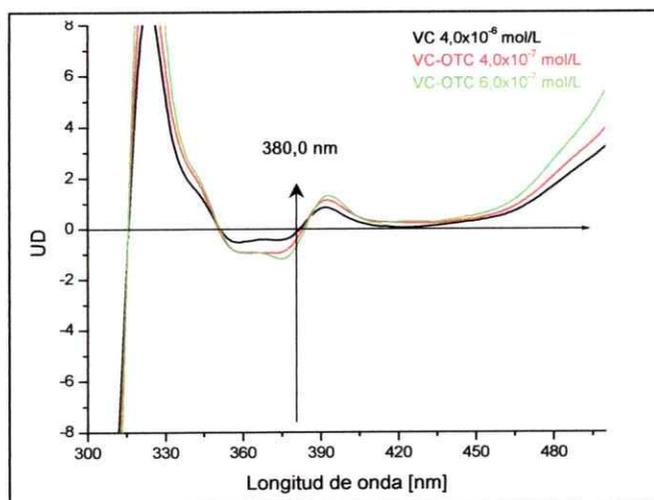


Figura 48: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, volumen acuoso de 100 mL. Concentración VC: $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$ y $6,0 \times 10^{-7}$ mol/L.

3.9. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS Y DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN LA FORMACIÓN PAR IÓNICO VC-OTC. METODOLOGÍA MULTIVARIABLES. DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL.

Sobre la base de la optimización univariable y consideraciones teóricas, 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 aleatoriamente cuatro variables de acuerdo a la sección 2.4.8, para la formación del par iónico VC-OTC, éstas son: concentración de VC, concentración NH_3 0,1 mol/L, volumen de extractante y tiempo de extracción, en el rango ya estudiado por optimización univariable. Este diseño consistió en realizar 17 experimentos (bloque), con tres réplicas cada uno, es decir 51 experimentos en total. Los resultados fueron evaluados por derivada de segundo orden, factor de suavizado 20.000 y de escala 10.000 a una $\lambda_{\text{analítica}}$ de 380,0 nm. Las unidades de derivada (UD) registradas para cada experimento se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Diseño Experimental y respuesta en unidades de derivada (UD).

Experi- mento	Conc. VC (mol/L)	Conc. NH ₃ (mol/L)	Volumen NH ₃ (μL)	Volumen orgánico (mL)	Tiempo extrac. (min)	UD		
						VC	OTC	VC-OTC
1	1,0x10 ⁻⁵	3,8x10 ⁻⁴	190	6	2	0,093	0,103	0,112
2	1,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁵	10	4	4	0,083	0,059	0,103
3	1,5x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵	10	4	2	0,838	0,744	0,696
4	1,5x10 ⁻⁵	3,8x10 ⁻⁴	190	4	4	0,387	0,417	0,510
5	1,5x10 ⁻⁵	3,8x10 ⁻⁴	190	4	2	0,333	0,304	0,348
6	1,0x10 ⁻⁶	3,8x10 ⁻⁴	190	4	4	0,078	0,074	0,088
7	1,0x10 ⁻⁶	3,8x10 ⁻⁴	190	4	2	0,426	0,328	0,382
8	1,5x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵	10	6	2	0,500	0,310	0,470
9	8,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁴	100	5	3	0,676	0,710	0,735
10	1,5x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵	10	4	4	1,303	1,348	1,215
11	1,0x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁵	10	4	2	0,098	0,132	0,142
* 12	*1,5x10 ⁻⁵	*2,0x10 ⁻⁵	10	* 6	* 4	1,254	1,362	1,137
13	1,5x10 ⁻⁵	3,8x10 ⁻⁴	190	6	2	0,916	0,818	0,745
14	1,0x10 ⁻⁶	3,8x10 ⁻⁴	190	6	4	0,113	0,157	0,123
15	1,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁵	10	6	2	0,113	0,113	0,206
16	1,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁵	10	6	4	0,200	0,167	0,176
17	1,5x10 ⁻⁵	3,8x10 ⁻⁴	190	6	4	1,200	1,288	1,250

(*) Corresponde a los valores seleccionados como óptimos donde las UD son máximas.

A partir de un análisis estadístico que considera los resultados de UD correspondiente a cada punto del diseño experimental propuesto, se obtuvieron los siguientes resultados:

a) **Gráfico de Pareto:** El gráfico de Pareto Figura 49, muestra las variables o combinaciones de ellas que presenten mayor efecto sobre la señal analítica. La línea vertical se usa para establecer qué efectos son estadísticamente significativos. En este caso hay siete efectos significativos, siendo el más importante la concentración de VC.

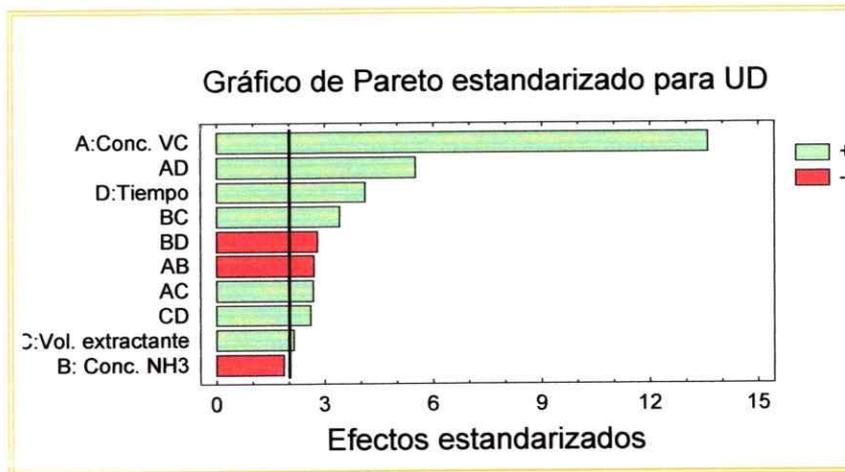


Figura 49: Gráfico de Pareto para VC-OTC

b) **Superficie de respuesta estimada:** El gráfico de superficie muestra las UD estimadas como una función de concentración de VC y volumen de amoníaco (μL). La altura de la superficie representa el valor de UD mientras los otros factores se mantienen constantes, al igual que para el gráfico de superficie 50-b en que muestran las UD estimadas como una función del volumen de extractante y tiempo de extracción. Para la gráfica 50-a, la máxima señal de UD se presenta a una mayor concentración de

VC y menor cantidad de amoníaco y para la gráfica 50-b a un volumen de extractante de 6 mL y 4 minutos de tiempo de extracción.

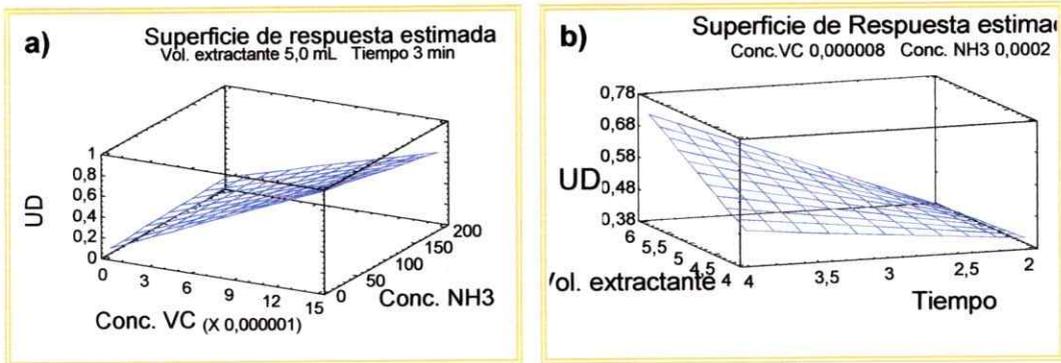


Figura 50: Superficie de respuesta estimada para VC-OTC. (a) Variables: concentración VC y cantidad de NH_3 agregado. (b) Variables: volumen extractante y tiempo de extracción.

c) Gráficos de efectos principales: Este gráfico muestra las UD estimadas como una función de cada factor experimental. En cada gráfico, el factor de interés varía desde su nivel más bajo a su nivel más alto, mientras que todos los demás factores se mantienen constantes a sus valores centrales. Al igual que en el gráfico de Pareto (Figura 49), la variable más significativa es la concentración de VC, porque es la que presenta una mayor pendiente, Figura 51.

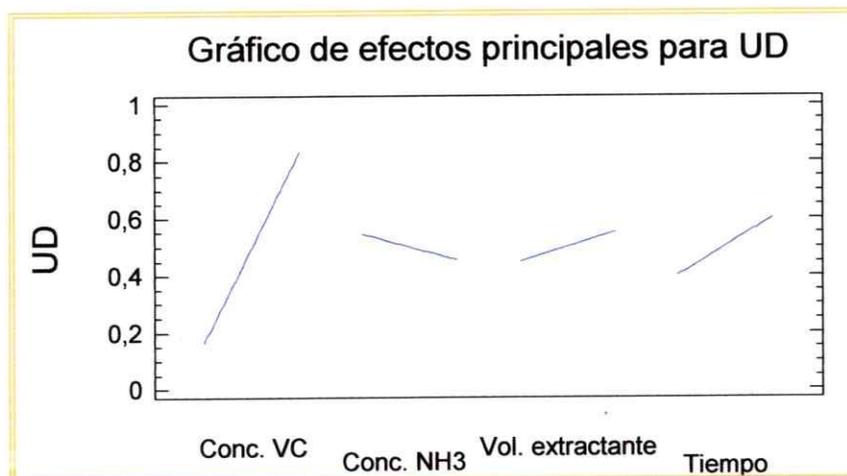


Figura 51: Gráfico de efectos principales para VC-OTC.

De acuerdo al análisis estadístico, los resultados encontrados como óptimos por el diseño experimental son: **concentración de VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L**, **concentración de NH_3 $2,0 \times 10^{-5}$ mol/L (10 μL 0,1 mol/L)**, **volumen de extractante 6 mL**, **tiempo de extracción 4 minutos**. Sin embargo, este diseño encontró que la variable, concentración de NH_3 no era significativa para que se formase el par iónico, no obstante, la cantidad de amoníaco agregada es importante para que ocurra la interacción entre VC y OTC, ya que bajo condiciones alcalinas predomina la especie totalmente desprotonada del antibiótico ($\text{pK}_{\text{a}3}$), facilitando la interacción con VC que se encuentra con carga positiva. Por estos motivos, se optó por trabajar con una concentración de NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, cercana a pH 9,0, para asegurar la óptima formación de VC-OTC.

Por lo tanto, las condiciones encontradas como óptimas por uni y multivariable, en la formación del par iónico VC-OTC son: ***“Concentración de VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L, concentración de NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L (100 μL 0,1 mol/L), volumen de extractante 6 mL, tiempo de extracción 4 minutos”***. Con las cuales se optimizaron las variables espectrales y se obtuvieron los parámetros analíticos.

3.10. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES ESPECTRALES

3.10.1. Selección de orden de la derivada

Con el objeto de seleccionar el orden de la derivada se obtuvieron desde la primera hasta la cuarta derivada para VC-OTC, (Figuras 52 a 55).

En el espectro de primera derivada, se encuentra un “zero crossing” a $\lambda_{\text{analítica}}$ 408,0 nm para la determinación del par iónico VC-OTC, sin embargo, en esta zona no se presenta una buena linealidad. En el espectro de segunda derivada se encuentra un “zero crossing” del VC a $\lambda_{\text{analítica}}$ 380,0 nm, donde es posible cuantificar el par iónico VC-OTC.

Además, en las Figuras 52 a 55, es posible apreciar que a medida que aumenta el orden de la derivada, la señal analítica disminuye, y el ruido instrumental aumenta, lo que hace más difícil la identificación de un “zero crossing” y cuantificación del par iónico. En este contexto, se seleccionó la segunda derivada por presentar zonas más definidas de cuantificación del par iónico.

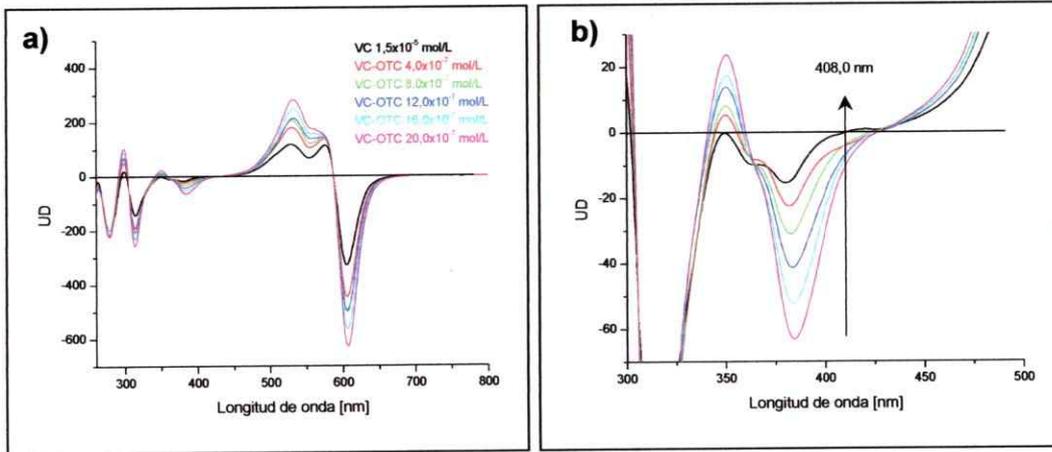


Figura 52: a) Espectros derivados de primer orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. b) Zoom de la Figura 48. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.

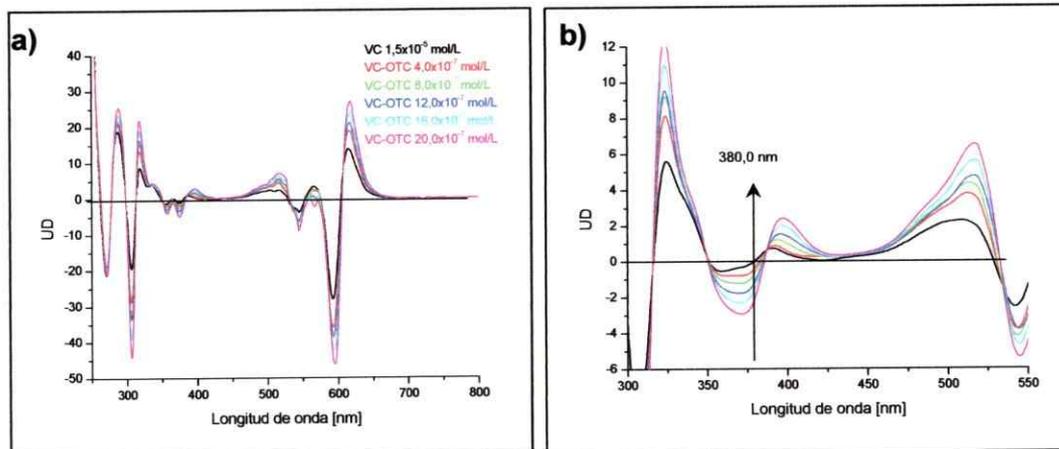


Figura 53: a) Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. b) Zoom de la Figura 49. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.

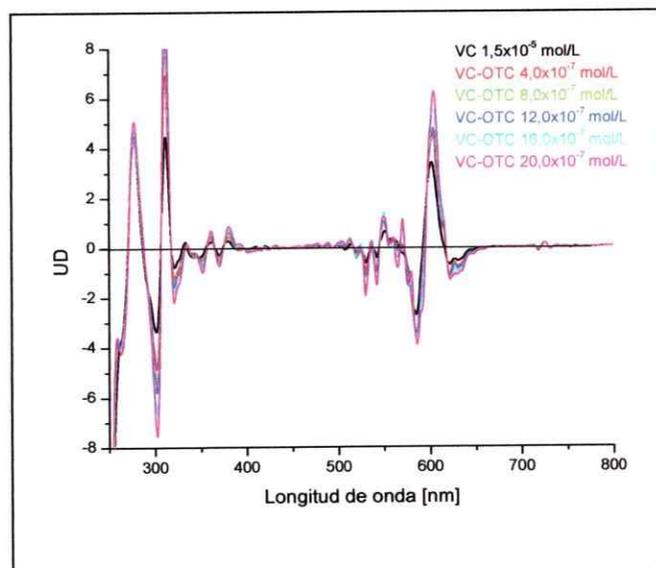


Figura 54: Espectros derivados de tercer orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.

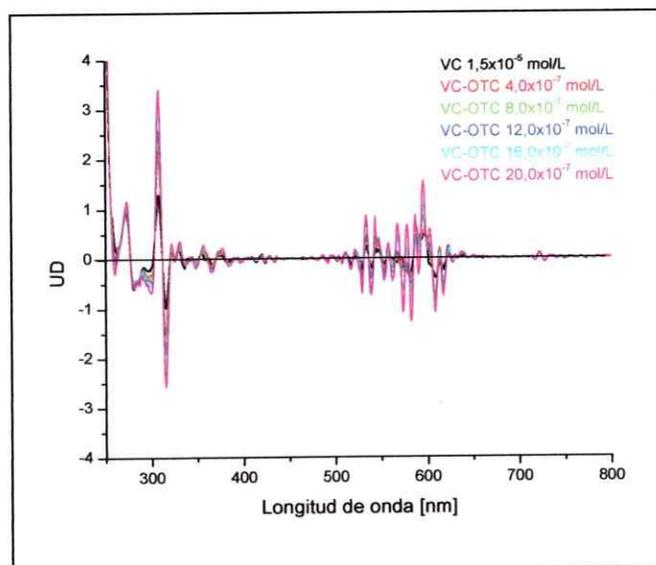


Figura 55: Espectros derivados de cuarto orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 20.000.

3.10.2. Selección del factor de suavizado

Los valores del factor de suavizado son definidos por defecto, por el software "UVPC versión 3.7", que se utiliza para la derivación. Estos valores están definidos de acuerdo al rango de longitud de onda, en el cual se realiza el barrido del espectro, éstos varían entre 5.000 y 40.000, los cuales corresponden al número de puntos utilizados para la derivación y suavizado del espectro clásico. En los espectros derivados de las Figuras 56 (a-d), se observa que a medida que aumenta el factor de suavizado, la señal analítica y el ruido instrumental disminuye mientras que la relación señal/ruido aumenta. Con el fin de encontrar un equilibrio entre la sensibilidad de la señal analítica, el ruido de fondo y una buena selección del "zero-crossing" para la determinación de VC-OTC, se seleccionó un factor de suavizado de 10.000.

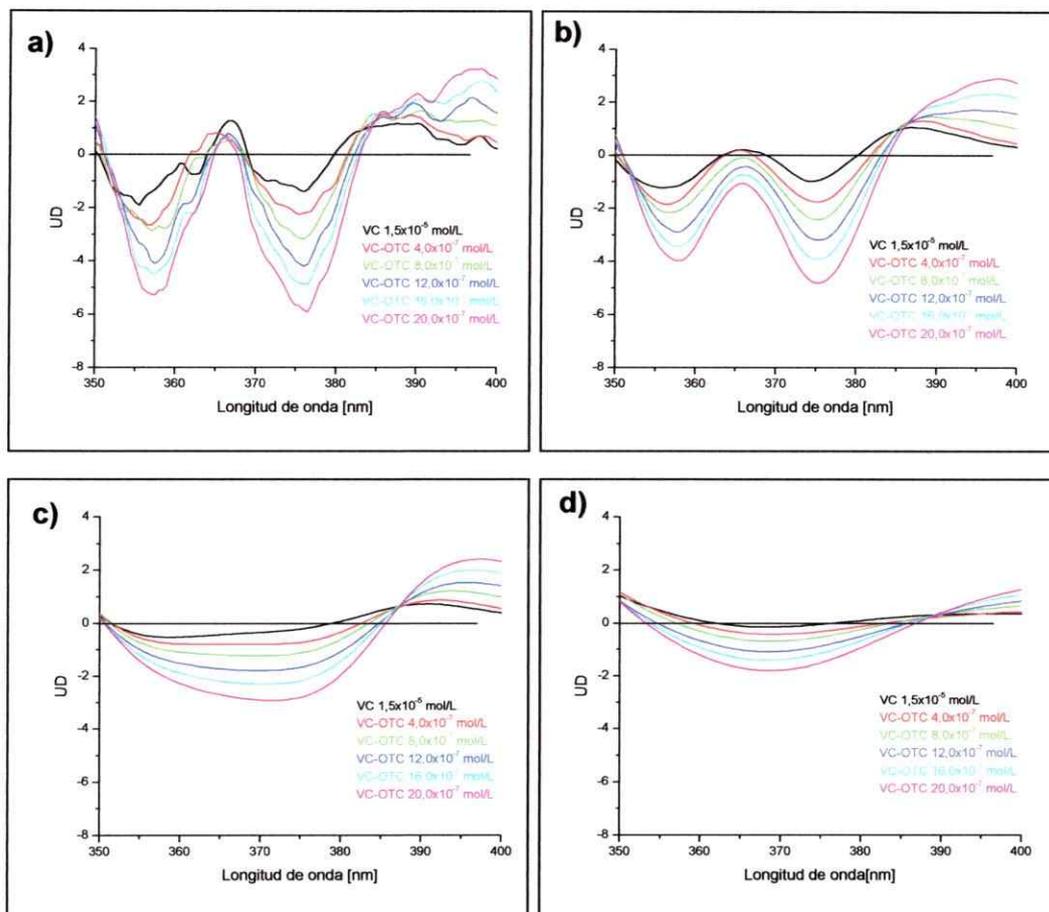


Figura 56: Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. (a) Factor de suavizado de 5.000. (b) Factor de suavizado de 10.000. (c) Factor de suavizado de 20.000. (d) Factor de suavizado de 40.000. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000.

3.10.3. Selección del factor de escala

Se obtuvieron los espectros de segundas derivadas, utilizando factores de escala de 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000, en las Figuras 57 (a-d). Estos valores están definidos por el software del espectrofotómetro, y puede variar de 10^0 a 10^{11} .

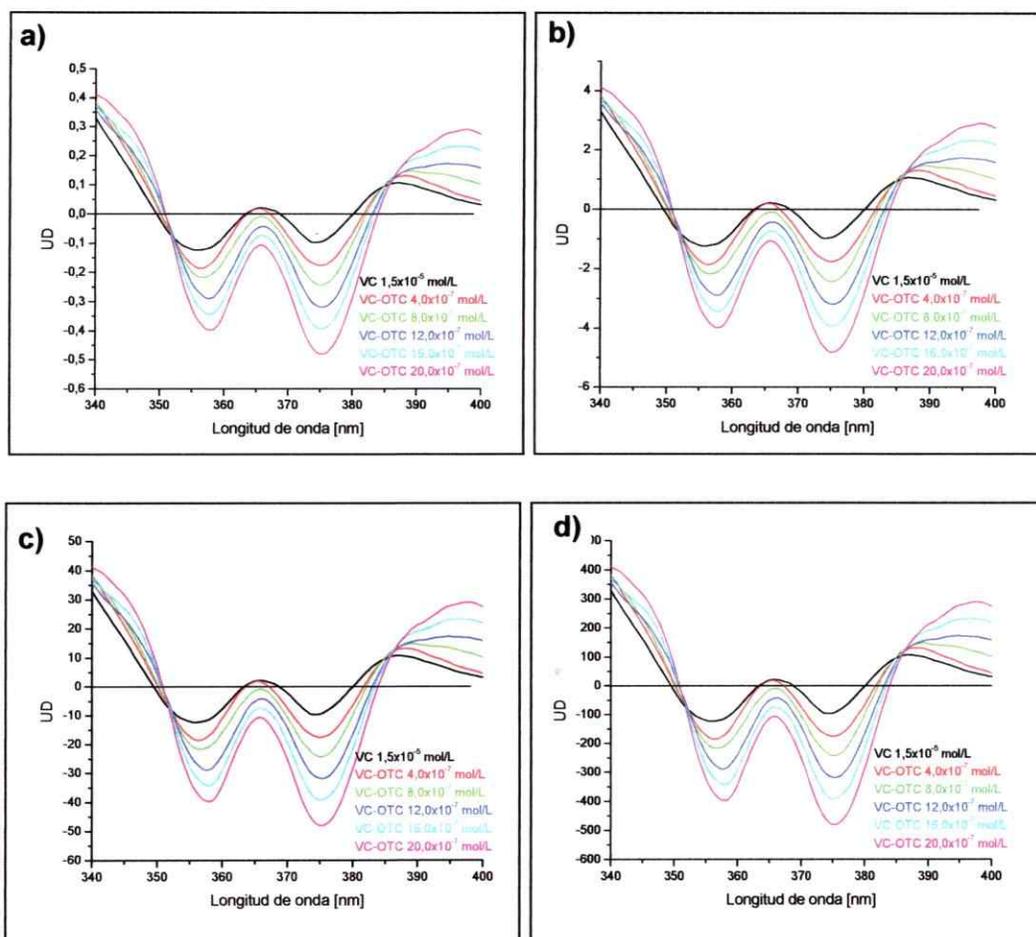


Figura 57: Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. (a) Factor de escala 1.000. (b) Factor de escala 10.000. (c) Factor de escala 100.000. (d) Factor de escala 1.000.000. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de suavizado de 20.000.

Se observa que cuando el factor de escala aumenta, la señal analítica aumenta en relación al factor de amplificación aplicado. Este factor sólo favorece la lectura, disminuyendo el error que se pueda producirse en ésta. Se seleccionó un factor de escala de 10.000, ya que, es posible favorecer la lectura de la señal analítica, lo que se evidencia en que el “zero crossing” se mantiene al igual que las formas de las bandas

derivadas y las señales se amplifican en forma proporcional. En la Tabla 15 se resumen las variables espectrales seleccionadas para esta determinación.

Tabla 15: Variables espectrales seleccionadas.

Variables espectrales	
$\lambda_{\text{analítica}}$ [nm]	380,0
Orden de la derivada	Segundo orden
Método de cuantificación	"Zero crossing"
Factor de suavizado	10.000
Factor de escala	10.000

3.10.4. Cuantificación de VC-OTC mediante "zero-crossing"

Luego de seleccionar los parámetros necesarios para la determinación cuantitativa de VC-OTC, se realizó una curva de calibración de acuerdo a la sección 2.4.9 y se graficaron a λ 380,0 nm las UD v/s concentración de OTC, (Figura 58), con el objetivo de obtener los parámetros analíticos instrumentales del par iónico. La desviación estándar del blanco fue calculada a partir de 11 blancos independientes, evaluando su señal a la λ seleccionada. En la Tabla 16 se presentan estos parámetros.

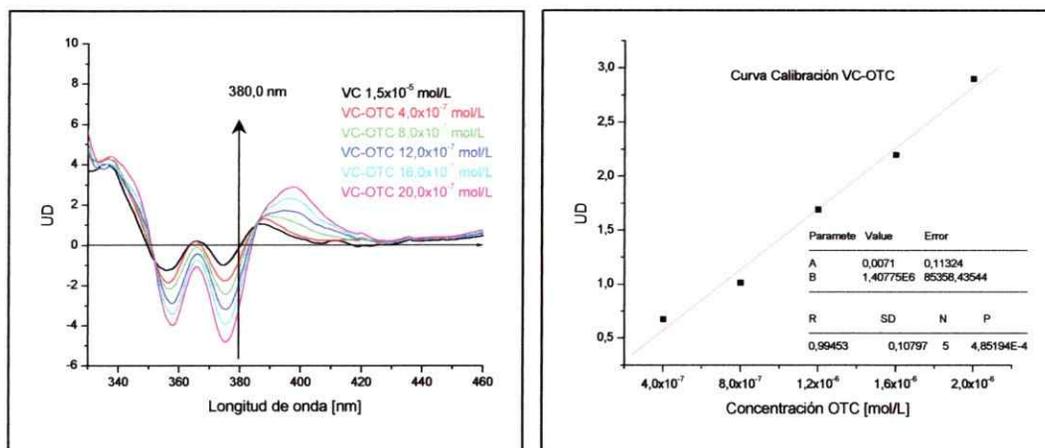


Figura 58: a) Zoom espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $4,0 \times 10^{-7}$, $8,0 \times 10^{-7}$, $12,0 \times 10^{-7}$, $16,0 \times 10^{-7}$ y $20,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 10.000. b) Gráfica de la curva de calibración del par iónico VC-OTC.

Como es posible observar en la Figura 58-b, existe una relación lineal entre la concentración de OTC agregada y las unidades de derivada del par iónico.

Tabla 16: Parámetros analíticos instrumentales. Determinación de OTC a través de VC-OTC a λ 380,0 nm.

Parámetros analíticos instrumentales	Par iónico: VC-OTC
Desviación del blanco (σ_{n-1}) *	0,008 U.D.
Ecuación, curva de calibración	UD= $(140 \pm 8) \times 10^4 \text{ } ^\circ\text{C (mol/L) + 0,007} \pm 0,11$ (UD= $695 \times 10^{12} \pm 8 \times 10^4 \text{ } ^\circ\text{C (}\mu\text{g/L) + 0,007} \pm 0,11$)
Coefficiente de correlación	0,995
Límite de detección*	$1,7 \times 10^{-8}$ mol/L (8,5 $\mu\text{g/L}$)
Límite de cuantificación*	$5,7 \times 10^{-8}$ mol/L (28,4 $\mu\text{g/L}$)
Rango de determinación	$5,7 \times 10^{-8}$ - $3,0 \times 10^{-5}$ mol/L (28,4- 15000 $\mu\text{g/L}$)

*n = 11.

De acuerdo a los límites de detección presentadas en la Tabla 16 comparados con la Tabla 8, la preconcentración del antibiótico OTC incrementó en 87 veces por efecto de introducir una LLE previa a la medición instrumental, y a la formación del par iónico. Bajo estas condiciones de preconcentración, es posible alcanzar los LMRs del antibiótico oxitetraciclina, establecidos en músculo de pescado por Semapesca, Chile.

* Criterio Límite de detección: $3\sigma/S$ y Límite de cuantificación: $10\sigma/S$, donde S es la pendiente de la ecuación lineal.

Con el objeto de evaluar la exactitud del método en que OTC puede ser determinado por formación de VC-OTC utilizando el método propuesto, se determinaron los porcentajes de recuperación de soluciones de OTC en diferentes concentraciones ($2,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$ y $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17, encontrándose recuperaciones entre 95 y 103 %, los cuales representan una buena exactitud del método.

La precisión del método analítico se evaluó a través de la desviación estándar relativa (DER). Para ello, se realizaron cinco réplicas individuales de las tres concentraciones de OTC señaladas anteriormente, las cuales se evaluaron en cinco días diferentes. Cada día se preparó y midió una réplica de cada concentración, encontrándose en todos los casos una DER < 2,0 %. Este resultado demuestra una buena reproducibilidad del método propuesto.

Tabla 17: Determinación de OTC a través de VC-OTC a diferentes concentraciones.

Agregado [mol/L]	Encontrado [mol/L]	Recuperación [%]
$*2,0 \times 10^{-7}$	$(1,96 \pm 0,02) \times 10^{-7}$	98 \pm 1
$*1,0 \times 10^{-6}$	$(1,03 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	103 \pm 2
$*4,0 \times 10^{-6}$	$(3,98 \pm 0,03) \times 10^{-6}$	95 \pm 1

*n = 5.

3.11. ESTUDIO DE INTERFERENTES

Este estudio es necesario para el desarrollo de metodologías analíticas que permitan determinar los analitos de interés en matrices que contienen otras especies químicas. Razón por la cual, se llevó a cabo un estudio del efecto de interferencia causada sobre la señal analítica del par iónico, de algunos de los productos farmacéuticos de uso veterinario destinados a la prevención, tratamiento y atenuación de las enfermedades producidas en peces, de especies que actúan como contaminantes, provenientes generalmente de la actividad industrial, tales como pesticidas, y elementos tóxicos contenidos en las aguas donde los peces son mantenidos y puedan acumularse en la carne de éstos a concentraciones que puedan producir daño al consumidor y de sustancias no autorizadas a nivel mundial en actividades de acuicultura (Sernapesca, 2005). La metodología utilizada fue la citada en la parte experimental 2.4.10. En primera instancia, para conocer las bandas de absorción de los interferentes, se obtuvieron los espectros clásicos de cada producto farmacéutico en metanol a una concentración de $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L (Figura 59-a), debido a que en sus estructuras presentan diferentes grupos cromóforos que presentan absorción en el UV (Tabla 18). La Figura 59-b, presenta los espectros de las segundas derivadas, observándose que ninguno de estos interferentes presenta absorción en la zona donde es cuantificable el par iónico (380,0 nm), exceptuando enrofloxacino, ya que presenta absorción entre 340,0 y 390,0 nm, a esta concentración. En la Figura 60 se presentan los espectros clásicos y derivados de sustancias no autorizadas, como lo es verde de malaquita y el recién incorporado leuco violeta cristal a una concentración de $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L, donde verde de malaquita presenta una pequeña absorción en la zona donde es cuantificable el par iónico.

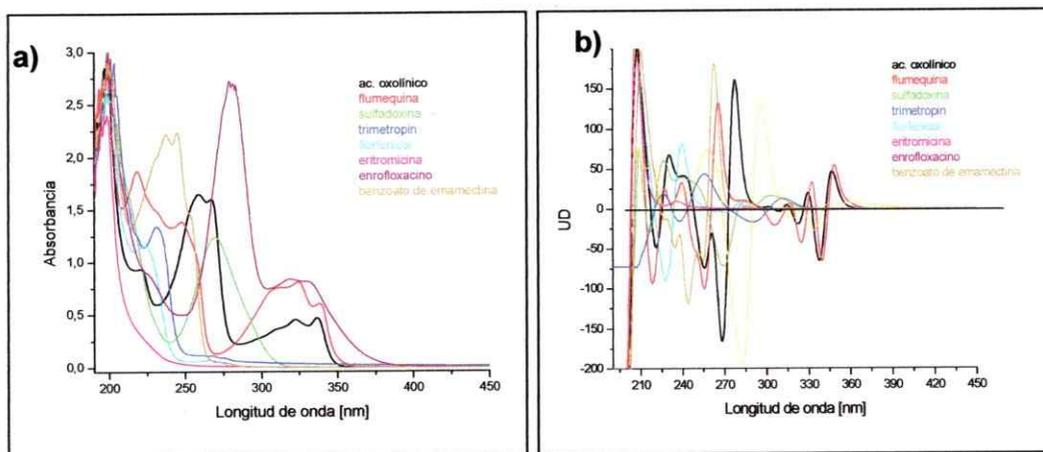


Figura 59: Espectros de interferentes tipo productos farmacéuticos a una concentración $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden.

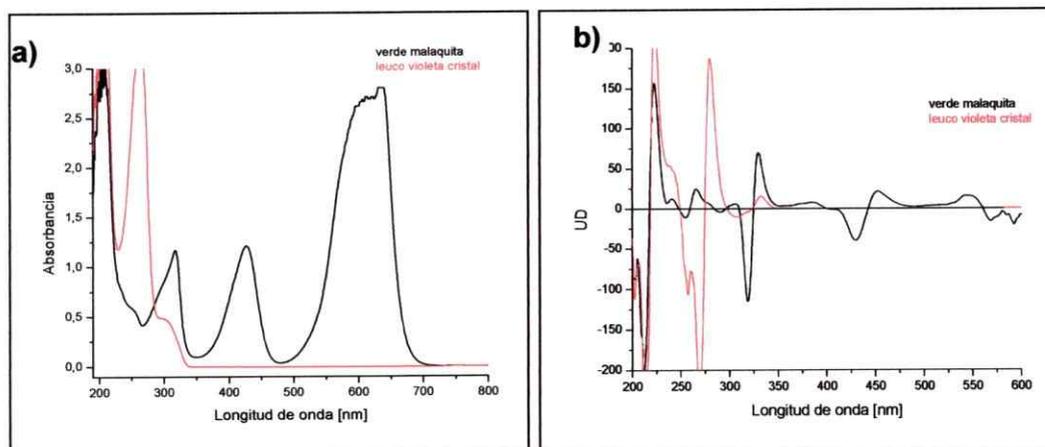


Figura 60: Espectros de interferentes tipo sustancias no autorizadas a una concentración $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden.

Una vez obtenidas las segundas derivadas y estimados los posibles interferentes de estos productos, se estudió el efecto de interferencia sobre la señal del par iónico según la parte experimental 2.4.10. Ante los resultados obtenidos, fue posible establecer que no existe interferencia sobre la señal del par iónico VC-OTC, a las concentraciones reguladas en la Unión Europea, (Sernapesca, 2005) y a

concentraciones superiores a las normadas, debido a que la banda asociada al par iónico, mantiene la misma forma cuando está en presencia de estos productos (Figura 61-a), con excepción de enrofloxacin y sulfadoxina, en que la banda asociada al par iónico VC-OTC presenta una pequeña disminución en unidades de derivada a 380,0 nm, cuando está en presencia estos antibióticos (Figura 61-b). Esta interferencia se elimina en el proceso de extracción de OTC en el músculo de salmón, debido a que se utiliza un procedimiento específico para extraer y purificar selectivamente a OTC.

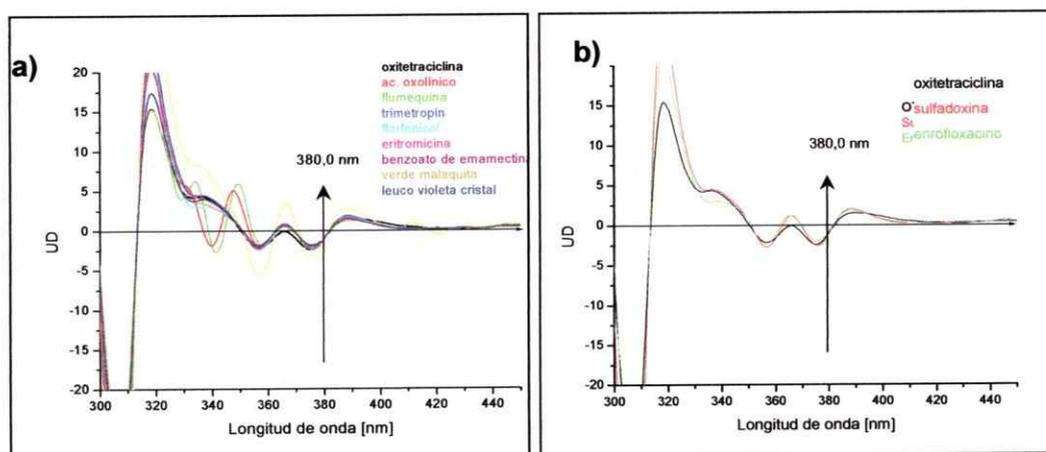
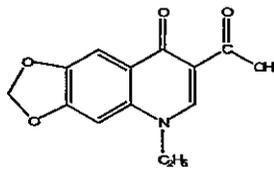
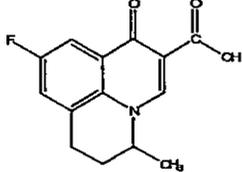
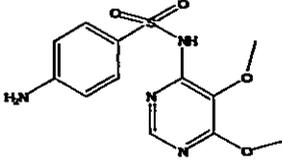
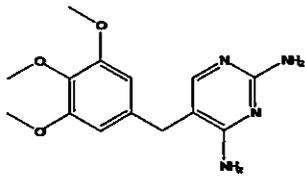
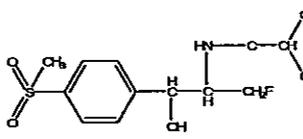
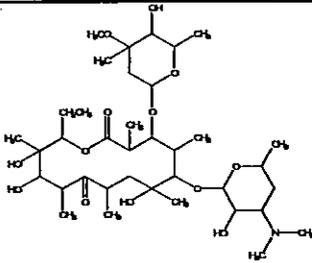
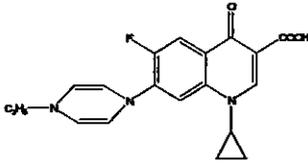
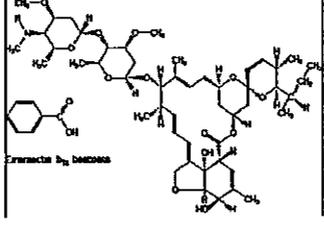
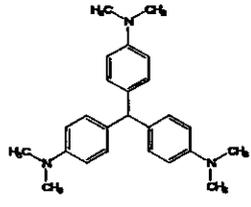
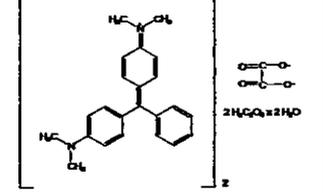


Figura 61: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en presencia de una concentración constante de interferentes tipo productos farmacéuticos y de sustancias no autorizadas⁴. a) Sustancias que no interfieren en la señal del par iónico. b) Sustancias que interfieren en la señal del par iónico. Concentración VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L equivalente a 6.120 $\mu\text{g/L}$ y OTC $4,0 \times 10^{-7}$ mol/L equivalente a 200 $\mu\text{g/L}$.

Las estructuras de los productos farmacéuticos y sustancias no autorizadas son presentadas en la Tabla 18.

⁴ Concentraciones interferentes tipo productos farmacéuticos y sustancias no autorizadas descritas sección 2.4.10.

Tabla 18: Estructuras interferentes tipo productos farmacéuticos y sustancias no autorizadas.

<p>Ácido oxolínico: pKa 7,0 C₁₃H₁₂FN₂O₃</p>	<p>Flumequina: pKa 7,0 C₁₄H₁₂FN₂O₃</p>	<p>Sulfadoxina: pKa 6,8 C₇H₁₀N₂O₂S</p>
		
<p>Trimetopin: pKa 8,5 C₁₄H₁₈N₄O₃</p>	<p>Florfenicol: pKa 7,2 C₁₂H₄Cl₂FNO₄S</p>	<p>Eritomicina: pKa 8,9 C₃₇H₆₇NO₁₃</p>
		
<p>Enrofloxacin: pKa 6,0 y 8,8 C₁₉H₁₈FN₃O₃</p>	<p>Benzoato Emamectina: pKa 7,6 C₅₆H₈₁NO₁₅</p>	<p>Leuco Violeta Cristal: C₂₅H₃₁N₃</p>
	 <p>Extracto de bayas</p>	
<p>Verde de malaquita: pKa 10,3 C₂₆H₂₈N₂O₄⁻</p>		
		

El segundo tipo de interferencia estudiada en el método analítico, fue debida a contaminantes de origen industrial y sustancias químicas, tales como pesticidas, herbicidas, entre otros. En la Figura 62, se muestran los espectros de absorción de ellos, aunque como era de esperar, la mayoría no presenta absorción en el UV debido a la falta de especies cromóforas, como ejemplo mirex, dieldrin entre otros (Tabla 19). Sin embargo, también existen contaminantes que absorben en el UV, pero no presentan absorción en 380,0 nm a pesar de utilizar una alta concentración de $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Es por esta razón que se espera que estos contaminantes no interfieran en la extracción del par iónico VC-OTC.

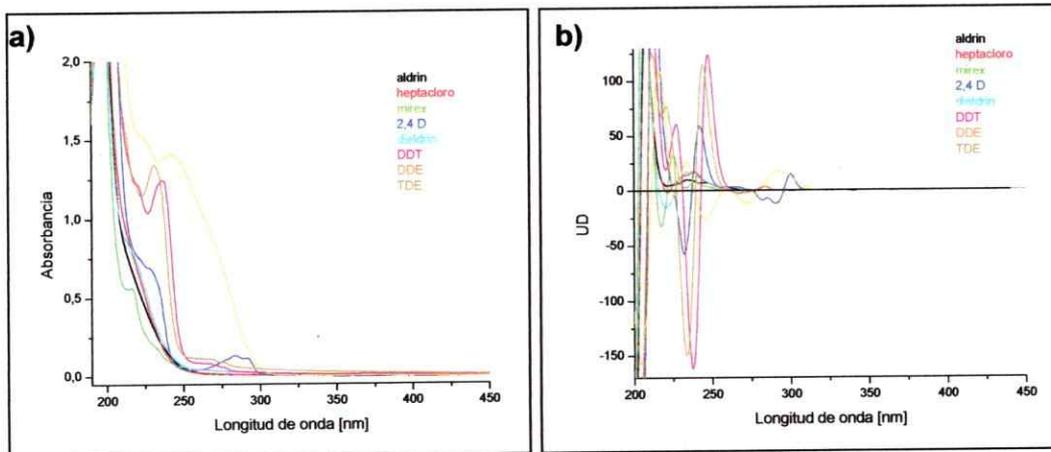


Figura 62: Espectros de interferentes tipo contaminantes industriales a una concentración $6,0 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Espectros clásicos. b) Espectros derivados de segundo orden.

Luego se realizó la metodología de extracción del par iónico en presencia de estos contaminantes a las concentraciones establecidas por Sernapesca y a concentraciones superiores. Se encontraron los resultados esperados, ya que estos contaminantes no interfieren sobre la señal analítica del par iónico, Figura 63.

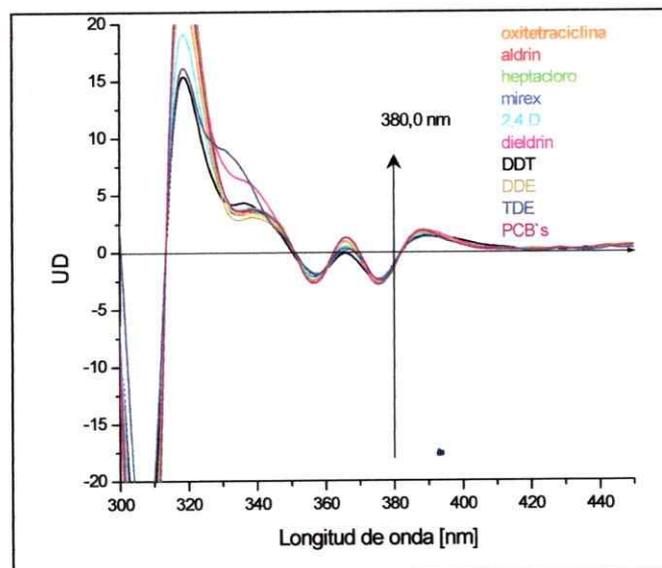
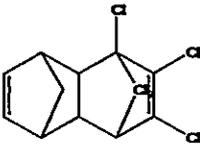
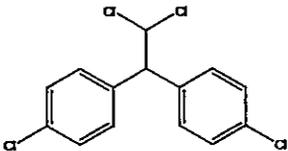
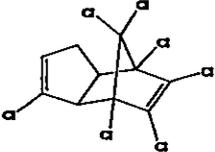
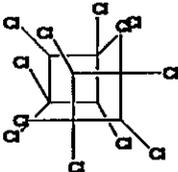
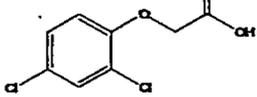
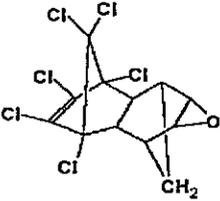
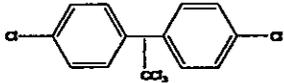
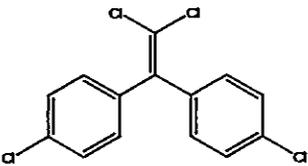
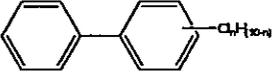


Figura 63: Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC, en presencia de una concentración constante de interferentes tipo contaminantes⁵. Concentración VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L equivalente a $6.120 \mu\text{g/L}$ y OTC $4,0 \times 10^{-7}$ mol/L equivalente a $200 \mu\text{g/L}$.

Las estructuras de los contaminantes de tipo industrial, son presentadas en la Tabla 19.

⁵ Concentraciones interferentes tipo contaminantes descritas sección 2.4.10.

Tabla 19: Estructuras interferentes tipo contaminantes.

Aldrín: $C_{11}H_9Cl_5$	TDE: $C_{14}H_{10}Cl_4$	Heptacloro: $C_{10}H_5Cl_7$
		
Mirex: $C_8H_4Cl_{12}$	2,4,D: $C_8H_6Cl_2O_3$	Dieldrín: $C_{12}H_8Cl_6$
		
DDT: $C_{14}H_{11}Cl_5$	DDE: $C_{14}H_9Cl_4$	PCB's (1254 y 1260):
		

3.12. APLICACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO EN MUESTRAS DE SALMÓN ATLÁNTICO

Se realizaron ensayos, para la extracción de oxitetraciclina desde músculo de salmón fortificados con OTC y en ausencia de éste, para luego aplicar el procedimiento de pares iónicos. En todos los casos la extracción se realizó de acuerdo al procedimiento experimental de la sección 2.4.11.

Con el objeto de eliminar los interferentes que absorban a 380,0 nm y que pudiesen afectar la determinación de OTC por el método desarrollado, debió optimizarse la etapa de purificación de la muestra. Estos ensayos consistieron en realizar diferentes protocolos de purificación del extracto de OTC utilizando un cartucho C-18, en lo que corresponde a la activación, lavado y percolación de OTC. Entre ellos se realizaron activaciones del cartucho C-18 con agua-amortiguador Mc-Ilvaine, agua-metanol para solvatar los grupos funcionales del relleno del cartucho y así lograr el estiramiento de las cadenas alquílicas de la fase reversa para que interactúen con el antibiótico. Una vez aspirado el extracto que contenía el antibiótico, el cartucho C-18 fue lavado con diferentes porciones de metanol/agua al 5% v/v, agua destilada o ambos, para eliminar los iones de las sales que podrían estar presentes. Se utilizaron diferentes soluciones que tuvieran la capacidad necesaria para percolar al antibiótico, entre ellos; ácido oxálico $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, metanol, acetonitrilo, también se ensayó la evaporación de dichos solventes para luego ser reconstituidos en metanol. Sin embargo, el protocolo de purificación que presentó una mejor respuesta frente a la metodología de pares iónicos con VC, fue la activación del cartucho C-18 con agua-metanol y la percolación del antibiótico con 4 mL de ácido oxálico, trasvasiándose los

mismos 4 mL para la formación del par iónico VC-OTC. Los otros reactivos utilizados en el proceso de purificación de la muestra no mostraron ser efectivos debido probablemente, a la percolación simultánea del antibiótico con otros iones o con fracciones de fase sólida. Este último resultado se refleja al tratar la muestra blanco de salmón, con el procedimiento de par iónico, debido a que la absorción del colorante resultó ser inusualmente alta, lo que hace suponer una interacción de VC con otros iones provenientes de la extracción con el amortiguador McIlvaine.

No obstante, con lo anterior no fue posible eliminar los interferentes que absorben a 380,0 nm, debiéndose seleccionar un nuevo “zero crossing” de VC. La Figura 64 muestra los espectros de absorción y derivados del blanco de salmón percoladas con diferentes solventes, una vez aplicado el procedimiento de formación par iónico con VC. En ellas se observan nuevas bandas de absorción en la zona de 380,0 nm, atribuibles a la propia matriz.

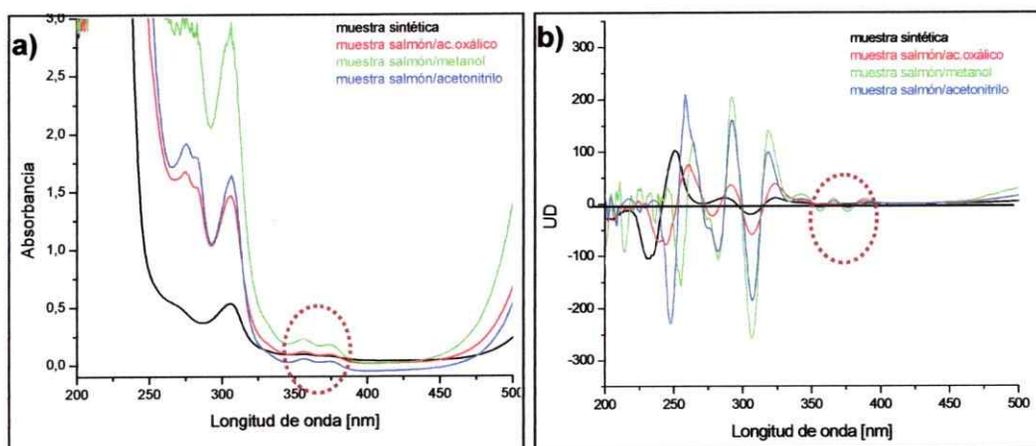


Figura 64: Espectros del VC, de la extracción de muestras blancos de músculo de salmón, eluidos con diferentes solventes y comparados con VC de muestras sintéticas. Concentración VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L. a) Espectros de absorción. b) Espectros derivados.

Para asegurar que la interferencia observada alrededor de los 380,0 nm viene dada por efecto matriz y no por interacción entre VC con el eluyente, se realizó una comparación entre los espectros de absorción de la extracción del VC sintético en medio amoniacal en relación con otra muestra de VC en las mismas condiciones en presencia de 4 mL de ácido oxálico, con la finalidad de simular el percolado de la matriz de salmón. Los resultados demuestran que ambos espectros no presentan absorción en dicha zona, siendo atribuible esta absorción únicamente a la matriz del músculo de salmón. Figura 65.

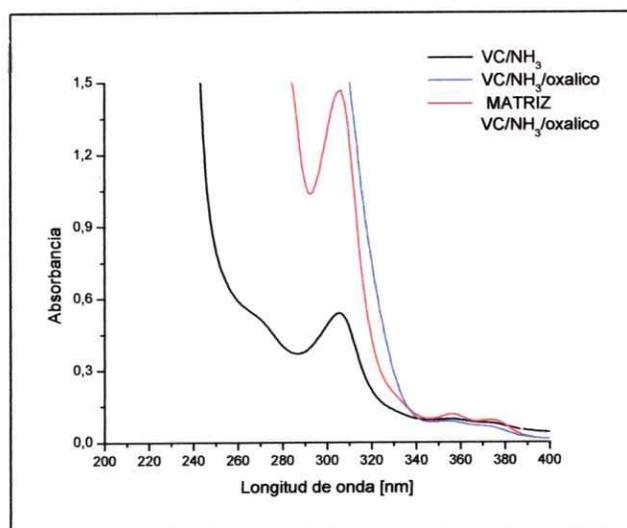


Figura 65: Comparación de los espectros de absorción del VC; VC/oxálico y matriz VC/oxálico medio amoniacal pH 9,0±0,2.

La selección de un nuevo “zero crossing”, se realizó por duplicado de dos individuos diferentes, fortificando 5,0 g de músculo de salmón con 0,5 mL de diferentes soluciones de OTC entre 0,6 y 3,0 mg/L, correspondientes a concentraciones finales en el músculo entre 60 y 300 µg/Kg. Luego la señal del par iónico en muestras de músculo

de salmón fue evaluada contra aire por espectrofotometría derivada de segundo orden, con un factor de suavizado y de escala de 10.000 (Figuras 66 a,b,c,d). En las muestras blancas de salmón correspondientes a VC leídas contra aire, se observan tres "zeros crossing", en la región UV a 272,5; 284,0 y 298,5 nm. Sin embargo, el "zero crossing" correspondiente a 272,5 nm fue donde se observó mejor linealidad entre las UD y la concentración de OTC agregada, razón por la cual se seleccionó esta longitud de onda como λ analítica. En las Figuras 66 a,b,c, se observan los espectros derivados de segundo orden para esta determinación. Tomando los valores de UD y las correspondientes concentraciones de OTC agregadas a las muestras de salmón, se elaboró la curva de calibración a λ analítica de 272,5 nm. (Figura 66-d)

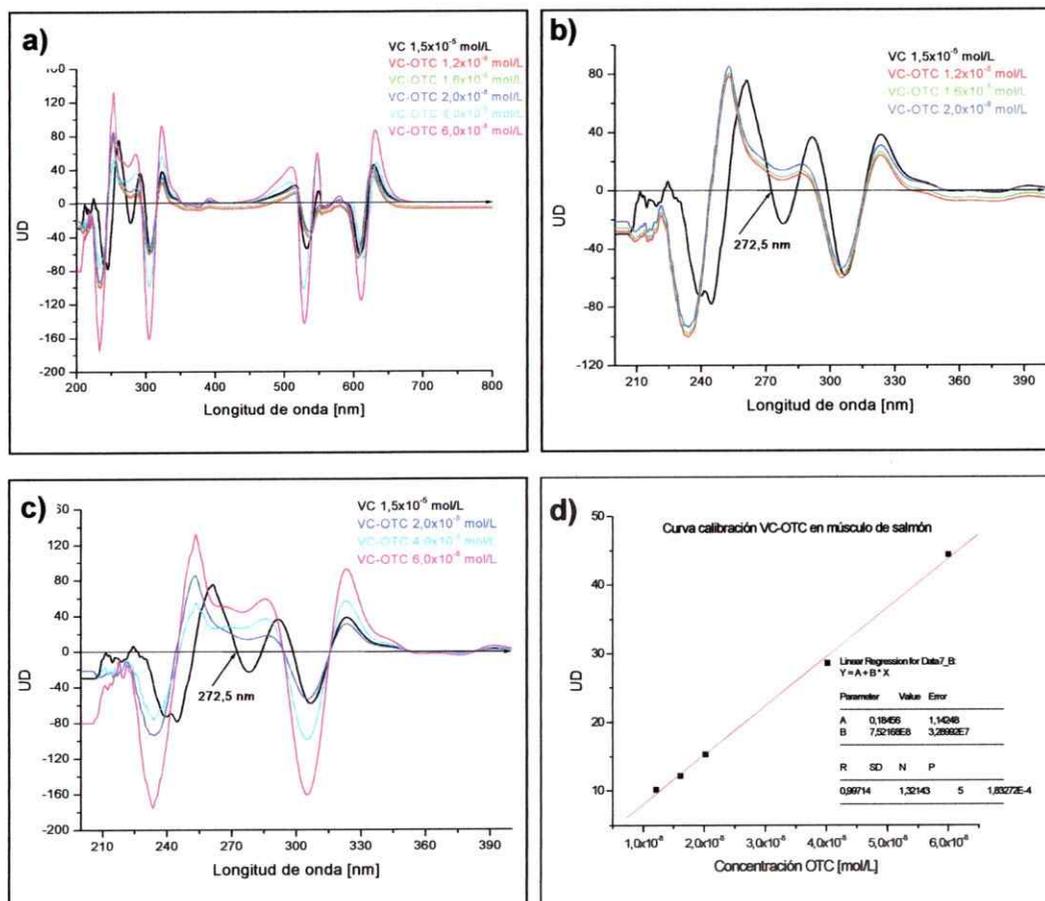


Figura 66: a) Espectros derivados de segundo orden del par iónico VC-OTC en músculo de salmón en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L y OTC: $1,2 \times 10^{-8}$, $1,6 \times 10^{-8}$, $2,0 \times 10^{-8}$, $4,0 \times 10^{-8}$ y $6,0 \times 10^{-8}$ mol/L. Factor de escala 10.000 y factor de suavizado de 10.000. b) Zoom de la Figura 61. Concentraciones OTC: $1,2 \times 10^{-8}$, $1,6 \times 10^{-8}$, $2,0 \times 10^{-8}$, mol/L. c) Zoom de la Figura 61. Concentraciones OTC: $2,0 \times 10^{-8}$, $4,0 \times 10^{-8}$, $6,0 \times 10^{-8}$, mol/L. d) Gráfica de la curva de calibración del par iónico VC-OTC.

Cabe destacar, que a pesar de no evaluar el porcentaje de extracción del antibiótico desde músculo de salmón, se consideró que ésta fue homogénea en el rango de concentración estudiado, debido a la respuesta lineal que presenta la concentración de antibiótico agregada v/s las unidades de derivada (Figura 66-d).

La desviación estándar del blanco fue calculada a partir de cinco muestras, sin antibiótico, pertenecientes a individuos diferentes de salmón Atlántico, a las que posteriormente se les aplicó la extracción con VC. Las mediciones de estas muestras se realizaron en el mismo día, Figura 67-a.

Por otra parte, al aplicar la extracción con VC a los blancos de salmón, utilizando concentraciones diferentes de colorante, se observa que se mantiene el "zero crossing" a $272,5 \pm 0,5$ nm (Figura 67-b). Estos experimentos fueron realizados durante un período de cinco meses,

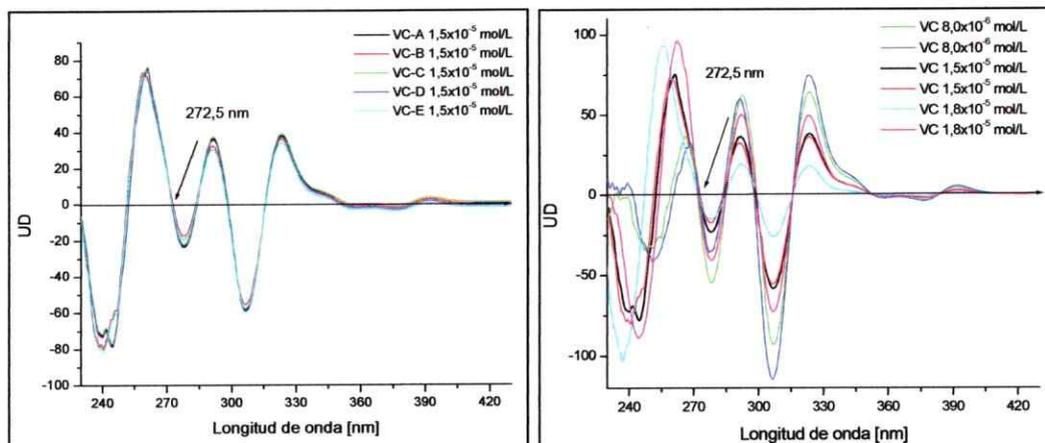


Figura 67: a) Espectros derivados de segundo orden de cinco blancos VC en músculo de salmón en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$. Concentración VC: $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L b) Espectros derivados de segundo orden de seis blancos VC en músculo de salmón en medio amoniacal pH $9,0 \pm 0,2$, registrados en diferentes días. Concentración VC entre $8,0 \times 10^{-6}$ y $1,8 \times 10^{-5}$ mol/L.

Se obtuvieron los parámetros analíticos del método propuesto, bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, los cuales se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20: Parámetros analíticos del método aplicado. Determinación de OTC a través de par iónico VC-OTC a λ 272,5 nm

Parámetros analíticos del método aplicado	Par iónico: VC-OTC
* Desviación del blanco (σ_{n-1})	1,01 U.D.
Ecuación, curva de calibración	UD= $(75 \pm 3) \times 10^7 \cdot C$ (mol/L) + $0,2 \pm 1$ (UD= $373 \times 10^{15} \pm 33 \times 10^6 \cdot C$ ($\mu\text{g/L}$) + $0,2 \pm 1$)
Coefficiente de correlación	0,997
Límite de detección*	$4,0 \times 10^{-9}$ mol/L (2,0 $\mu\text{g/L}$)
Límite de cuantificación*	$1,3 \times 10^{-8}$ mol/L (6,7 $\mu\text{g/L}$)
Rango de determinación	$1,3 \times 10^{-8}$ - $6,0 \times 10^{-8}$ mol/L (6,7 $\mu\text{g/L}$ - 30 $\mu\text{g/L}$)

* n=5

Al proyectar estos resultados de parámetros analíticos del método aplicado (mol/L) en unidades de concentración por peso de pescado ($\mu\text{g/Kg}$), se obtiene que el límite de cuantificación es de 71 $\mu\text{g/Kg}$, logrando en estas condiciones de trabajo, estar bajo la norma chilena que permite una cantidad máxima de OTC en carne y piel de pescado de 100 $\mu\text{g/Kg}$.

* Criterio Límite de detección: $3\sigma/S$ y Límite de cuantificación: $10\sigma/S$, donde S es la pendiente de la ecuación lineal.

Considerando que no existen registros de muestras certificadas en músculo de salmón, fue necesario utilizar muestras fortificadas con soluciones de OTC estándar para validar y evaluar la exactitud y precisión del método propuesto. La validación se realizó de acuerdo a los criterios utilizados en numerosos trabajos que desarrollan una metodología analítica para determinación de OTC en muestras de salmón (Pouliquen y col., 1997; Peña y col., 2003; Rupp y Anderson, 2005). Sin embargo, si el método desarrollado se aplicara en el control de los LMRs de OTC en diferentes instituciones que normen el residuo de este antibiótico, la validación se debiera realizar de acuerdo al requerimiento que utiliza Sernapesca, basado en el artículo de Cinquina y col., 2003.

El método se validó a la concentración máxima permitida de oxitetraciclina en músculo de salmón, utilizando ocho muestras de salmón Atlántico de cinco individuos evaluadas en diferentes días. Estas muestras fueron fortificadas con 0,5 mL de una solución de OTC 1,0 mg/L, correspondiente a una concentración de 100 µg/Kg en el músculo. Se encontraron recuperaciones promedio de 102 ± 3 µg/Kg, lo que corresponde a un 102% de recuperación y una reproducibilidad de 2,9 % expresada como D.E.R., demostrando ser un método analítico exacto y preciso.

La aplicación del método se realizó por triplicado con una muestra de músculo de salmón Atlántico proporcionada por laboratorio externo CEPEDQ⁶ con un contenido de 305 µg/Kg, determinada por HPLC con detector de arreglo díodos. Para evaluar esta muestra, fue necesario realizar una dilución sólido-sólido, utilizando 1,60 g de la muestra y diluida en 3,40 g de salmón sin contenido de antibiótico, obteniendo

⁶ Centro de Estudios Para El Desarrollo de la Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas - U. de Chile.

mediante esta dilución una concentración de OTC de 100 µg/Kg. A estas muestras se les aplicó la metodología de par iónico encontrándose 317±7 µg/Kg.

Debido a que no fue posible realizar el estudio de interferentes con la matriz músculo de salmón, se consideró el efecto de interferentes causado sobre la señal analítica del par iónico VC-OTC a λ 272,5 nm tomando en consideración aspectos teóricos de los interferentes estudiados.

De acuerdo a la literatura, se utilizó una extracción selectiva para OTC desde músculo de salmón con amortiguador Mc-Ilvaine/EDTA pH 4,0, por lo cual, a este pH los productos farmacéuticos no serían solubles, debido a que la mayoría de estos interferentes presenta valores de pKa sobre 7,0 (Tabla 17). Por otro lado, los interferentes de tipo contaminantes industriales no son solubles en medios acuosos, por lo tanto, al utilizar la extracción con amortiguador Mc-Ilvaine/EDTA pH 4,0 de OTC desde músculo de salmón, estos contaminantes no debieran ser extraídos.

Sin embargo, en caso que se produzca la extracción de algún interferente desde la matriz utilizando este procedimiento, la etapa de purificación de la muestra con cartucho C-18, debiera ser la que elimine esta interferencia.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral están en concordancia con los objetivos planteados al inicio de esta tesis, con los cuales es posible establecer las siguientes conclusiones.

De los ensayos preliminares de las solubilidades de OTC, OXO y FLU en solventes de diferentes polaridades a una concentración de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, así como el efecto sobre las conductas espectrales de los antibióticos en estudio, se encontró que los tres antibióticos son solubles en solventes apróticos y con constantes dieléctricas mayores a 38. Sin embargo, dimetilsulfóxido fue descartado por presentar absorción en el UV-Vis y en acetonitrilo se encontraron las bandas de absorción solapadas de los tres antibióticos. Por lo tanto, en este solvente se desarrollaron métodos por espectrofotometría derivada de primer orden para la determinación individual de OTC en presencia de OXO y FLU y simultánea de OXO y FLU en ausencia de OTC.

Los ensayos preliminares del efecto del pH sobre la conducta espectral de OTC, OXO y FLU, mostraron cambios en las bandas espectrales, de acuerdo a los valores de pKa reportados por la literatura. Para OXO, no fue posible obtener bandas espectrales en medio ácido, debido a que no es soluble a pH menor a 7,0.

Los ensayos preliminares realizados con colorantes aniónicos para la formación de pares iónicos con OTC, anaranjado de metilo y azul de bromotimol mostraron una

posible formación de par iónico en cloroformo, detectado por espectrofotometría UV-Vis. Sin embargo, estos colorantes fueron descartados para fines analíticos porque las correspondientes absorbancias son bajas y por una formación de una interfase en la etapa de separación de las fases.

Al realizar ensayos preliminares para la formación del par iónico con OTC en cloroformo con colorantes catiónicos, violeta cristal fue el único colorante que presentó dicha formación en medios básicos de NaOH, NH₃ y tetraborato de sodio. Los amortiguadores estudiados fueron descartados como medio de pH para realizar la extracción líquido-líquido del par iónico en cloroformo, debido a que las absorbancias del VC son altas, produciendo limitación instrumental, posiblemente porque ocurre una interacción más fuerte entre colorante-anión correspondiente al anión del amortiguador o al contraión de las sales de sodio, que a una interacción colorante-antibiótico, lo que dificulta la lectura espectral de la formación de VC-OTC.

La formación del par iónico fue confirmada por técnicas espectroscópicas, ¹H RMN, cálculos de los tiempos de relajación (T₁), experimentos de resonancia bidimensionales, y espectroscopía IR.

De los resultados de ¹H RMN se obtuvieron desplazamientos de las señales de la mezcla VC-OTC comparados con las señales de VC y OTC obtenidos por separados en medio amoniacal, postulando con estos resultados la interacción de tipo electrostática entre VC y OTC. Este postulado fue corroborado al observar una disminución de los T₁ de VC comparados con los T₁ de la mezcla VC-OTC, indicando que los protones del VC están impedidos para poder relajarse por la interacción que tiene

con OTC. De igual forma fueron comparados los T_1 de los protones aromáticos de OTC y en todos los casos se encontró una significativa disminución de los T_1 , cuando el antibiótico está en presencia del colorante, por lo cual es posible concluir que el anillo aromático de OTC, es el que interactúa con VC, confirmando la formación del par iónico VC-OTC, mediante un tipo de interacción electrostática. Además, la interacción fue corroborada por experimentos bidimensionales COSY y ROESY, en que se observan las interacciones de los protones aromáticos del VC con los de OTC.

Mediante espectroscopía vibracional IR, la formación del par iónico VC-OTC en medio amoniacal, también fue confirmada, ya que las bandas vibracionales asociadas al anillo-A del VC, se desplazaron cuando OTC estuvo presente de la forma aniónica, produciéndose una nueva redistribución electrónica. Estos cambios se reflejaron en un espectro vibracional diferente del VC.

Las variables fisicoquímicas y de extracción líquido-líquido se optimizaron por el método univariable y por diseño experimental factorial, encontrándose los siguientes valores óptimos para la formación de VC-OTC: concentración de VC $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L, concentración de NH_3 $2,0 \times 10^{-4}$ mol/L, volumen de extractante 6 mL y tiempo de extracción 4 min. Se trabajó con una extracción para cuantificar al par iónico y con 50 mL de fase acuosa para facilitar la etapa de agitación y homogenización en el matraz Erlenmeyer, a pesar que con 100 mL de fase acuosa se logra la preconcentración del antibiótico. Las variables espectrales optimizadas fueron derivadas de segundo orden, factor de suavizado y de escala 10.000.

Con la optimización de estas variables, mostraron que fue posible desarrollar un

método sensible a nivel de $\mu\text{g/L}$ para la determinación de OTC mediante formación de par iónico con VC, en medio amoniacal pH $9,0\pm 0,2$, utilizando una modalidad diferente e innovadora para la evaluación de la señal del par iónico, mediante espectrofotometría derivada de segundo orden.

La posibilidad de preconcentrar a OTC por formación de par iónico, permitió la obtención de límites de cuantificación en muestras sintéticas de $5,71\times 10^{-8}$ mol/L y en muestras de salmón Atlántico de $71 \mu\text{g/Kg}$. Este último valor se encuentra bajo al límite máximo permitido de $100 \mu\text{g/Kg}$ para el antibiótico oxitetraciclina en músculo de pescado, establecidos por Sernapesca, Chile.

Finalmente, es posible señalar que la combinación del uso de un colorante junto a una extracción líquido líquido, permitió la determinación de OTC a niveles de $\mu\text{g/Kg}$, por formación de par iónico con VC, utilizando la técnica de espectrofotometría derivada.

La validación del método analítico en muestras de músculo de salmón Atlántico, se realizó con una concentración de OTC de $100 \mu\text{g/Kg}$ con las cuales se encontraron recuperaciones promedio de $102\pm 3 \mu\text{g/Kg}$ de acuerdo al reporte técnico de la IUPAC, "Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis". No obstante, si se desea aplicar el método desarrollado en laboratorios de servicios para análisis de residuos farmacéuticos, la validación debiera realizarse con un número elevado de muestras reales de acuerdo al artículo de Cinquina y col., 2003, que utilizan 20 muestras reales de diferentes procedencia para corroborar la especificidad del método.

En estas condiciones, el método fue aplicado y se encontró un porcentaje de recuperación de 104 % y una desviación estándar relativa de 2,2 %, sin necesidad de recurrir a técnicas instrumentales sofisticadas. Sin embargo, se debe tener presente que el método desarrollado permite determinar al antibiótico en muestras de salmón Atlántico que contengan concentraciones de OTC entre $1,34 \times 10^{-8}$ - $6,00 \times 10^{-8}$ mol/L equivalente a 71 y 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Los métodos desarrollados lograron ser simples y de fácil implementación instrumental, debido a la posibilidad de trabajar con varias muestras de músculo de salmón Atlántico en serie y realizar el protocolo de extracción del par iónico. Para el desarrollo de este trabajo de tesis se trabajaron con un total de 16 muestras evaluadas dentro del día. En el caso de disponer de equipamiento suficiente para realizar la extracción y purificación de OTC desde músculo de salmón, y agitadores con embudos de decantación para extraer al par iónico, el número de muestras analizadas en un día podría aumentar a 32 con un mismo operador. Consecuentemente, la ventaja que presenta este método alternativo en comparación a los métodos cromatográficos acreditados en instituciones que norman el residuo de OTC, es la utilización de instrumentación simple y económica, ya que el tiempo utilizado en la etapa de extracción del antibiótico desde músculo de salmón, es el mismo.

5. PROYECCIONES DE LA TESIS DOCTORAL

Las proyecciones que deja este trabajo de tesis son la aplicación y validación del método desarrollado en otros tipos de salmón de diferentes procedencias destinados a la exportación. Además, la determinación de OTC mediante formación de VC-OTC podría también proyectarse a otros tipos de matrices biológicas y de interés ambiental.

No obstante, si se desea aplicar el método desarrollado en laboratorios de servicios para análisis de residuos farmacéuticos, la validación debiera realizarse con un número elevado de muestras reales de acuerdo al artículo de Cinquina y col., 2003, que utilizan 20 muestras reales de diferentes procedencia para corroborar la especificidad del método.

Por otro lado, para corroborar la selectividad del método desarrollado, es necesario realizar un estudio experimental de interferentes con la matriz.

La proyección de los métodos desarrollados por espectrofotometría derivada de primer orden, para la determinación individual de OTC en presencia de OXO y FLU y simultánea de OXO y FLU en ausencia de OTC sería, para matrices en que la concentración de estos antibióticos fuese mayor a los límites de cuantificación reportados en la Tabla 8. Tal condición se da en alimentos de peces, en que la combinación de estos fármacos antimicrobianos es más efectiva para remediar

diferentes enfermedades, o también podrían ser aplicados para realizar la detección de estos antibióticos en músculo de salmón, utilizándolo como método de "screening". En este contexto, se tiende a reducir el número de muestras en que se aplique un método que requiera mayor tiempo, otorgando una mayor eficiencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alfredsson G., Branzell C., Granelli K. y Lundström A. 2005.

Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta.* 529: 47-51.

Alonso A., Almendral M. J., Curto Y. y Porras M. J. 2003.

Spectrophotometric Determination of Copper in Waste Water Using Liquid-Liquid Extraction in a Flow-Injection System. *Mikrochim. Acta.* 143: 217-220.

Amin A. S. e Issa Y. M. 1996.

Selective spectrophotometric method for the determination of erythromycin and its esters in pharmaceutical formulations using gentiana violet. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 1625-1629.

Amin A. S. e Issa Y. M. 1999.

Utility of the ion-pair formation for spectrophotometric determination of terfenadine in pure form and in some pharmaceutical formulations. *Mikrochim. Acta.* 130:173-179.

Amin A. S. e Issa Y. M. 2000a.

Spectrophotometric Microdetermination of Some Pharmaceutically Important Aminoquinoline Antimalarials, as Ion-Pair Complexes. *Mikrochim. Acta.* 134: 133-138.

Amin A. S. 2000b.

Quantitation of Some Recently Introduced Antibacterial Drugs Using Sudan III as Chromogenic Reagent. *Mikrochim. Acta.* 134: 89-94.

Anderson C.R., Rupp H. S. y Wen-Hsin W. 2005.

Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1075: 23-32.

Antonov L., Gergov G., Petrov V., Kubista M. y Nygren J. 1999.

UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta*. 49: 99-106.

Aoyama R. G., McErlane K. M., Erber H., Kitts D. D. y Burt H. M. 1991.

High-performance liquid chromatographic analysis of oxytetracycline in chinook salmon following administration of medicated feed. *J. Chromatogr.* 588: 181-186.

Aqua Noticias, 2008.

<http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=22006>

Arias M., García-Falcón M.S., García-Ríos L., Mejuto J.C., Rial-Otero R. y Simal-Gándara J. 2005.

Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalent cations. *J. Food Eng.* 78: 69-73.

Benbrook Ch. 2002. Antibiotic Drug Use in U.S. 2002.

<http://www.mindfully.org/Water/Antibiotic-Aquaculture-BenbrookFeb02.htm>

Blanchflower W. J., McCracken R. J., Haggan A. S. y Kennedy D. G. 1997.

Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 692: 351-360.

Bontchev P. R., Papazova P., Confino M. y Dimova D. 1984.

Spectrophotometric method for determination of tobramycin, apramycin and kanamycin in formulations. *Mikrochim. Acta.* 84: 459-465.

Brion M., Lambs L. y Berthon G. 1986.

Metal Ion-Tetracycline Interactions in Biological Fluids. Part 6. *Formation of Copper (II) Complexes with Tetracycline and some of its Derivatives and Appraisal of their Biological Significance. *Inorg. Chim. Acta.* 123: 61-68.

Bryskier A. y Chantot J. 1995.

Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs*. 49: 16-28.

Burka J., Hammell K., Horserg T., Johnsons G., Rainnie D. y Spears D. 1997.

Drugs in salmonid aquaculture. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20: 333-349.

Cabello F. 2004.

Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. *Rev. Med. Chile*. 132: 1001-1006.

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.

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.

Cooper A.D., Stubbings G.W.F., Kelly M., Tarbin J.A., Farrington W.H.H. y Shearer G. 1998.

Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J. Chromatogr. A*. 812: 321-326.

Coyne R., Bergh Ø. y Samuelson O. B. 2004.

One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle *J. Chromatogr B*. 810: 325-328.

Cravedi J.P., Choubert G. y Delous, G. 1987.

Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*. 60: 133-141.

Croubels S., Baeyens W., Dewaelec C. y Van Peteghem C. 1994.

Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics. *J. Chromatogr . A*. 673: 267-274.

da Silva G., Pereira E., dos Santos H., Wellington C. y Brandes A. 2005.

Identificação e quantificação do cristal violeta em aguardentes de mandioca (tiquira). *Quím. Nova*, 28: 583-586.

de Paula F., Carvalho S., Duarte H., Paniago E., Mangrich S. y Pereira-Maia E. 1999. A physicochemical study of the tetracycline coordination to oxovanadium (IV). *J. Inorg Biochem*. 76: 221-230.

Díaz-Cruz M.S., López de Alda M.J. y Barceló D. 2003.

Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem*. 22: 340-351.

Dowling G., Mulder P., Duffy C., Regan L. y Smyth M. 2007.

Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 586: 411-419.

Dubois M., Fluchard D., Sior E. y Delahaut Ph. 2001.

Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 753: 189-202.

El-Brashy A. M., Metwally M. E-S y El-Sepai F. A. 2004.

Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes. *Farmaco* 59: 809-817.

- El-Shahawi M. S. y Aldhaheiri S. M. 1996.
Spectrophotometric determination of bismuth (III and V) in water after ion- pair liquid-liquid extraction using tetramethylammonium cation as counter ion. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354: 200-203.
- Fedeniuk R.W., Ramamurthi S. y Mc Curdy A. 1996.
Application of reversed-phase liquid chromatography and prepacked C18 cartridges for the analysis of oxytetracycline and related compounds. *J. Chromatogr. B.* 677: 291-297.
- Fernández-González R., García-Falcón M.S. y Simal-Gándara J. 2002.
Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta* 455: 143-148.
- Fletouris D.J. y Papapanagiotou E.P. 2008.
A new liquid chromatographic method for routine determination of oxytetracycline marker residue in the edible tissues of farm animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 1189-1198.
- Fufkushima E. y Roeder S. 1981.
Experimental Pulse NMR, Anuts and Bolts Approach. Editorial Addison Wesley.
- Halling-Sørensen B., Lykkeberg A., Ingerslev F., Blackwell P. y Tjørnelund J. 2003.
Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere.* 50: 1331-1342.
- Hernández-Arteseros J.A., Barbosa J., Compañó R. y Prat M.D. 2002.
Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A.* 945: 1-24.
- Hirscha R., Ternesa T., Haberera K. y Kratzb K. L. 1999.
Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225: 109-118.
- Hooper D.C. 1999.
Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs.* 58 (suppl 2): 6-10.

Horie M., Saito K., Ishii R., Yoshida T., Haramaki Y. y Nakazawa H. 1998. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 812: 295-302.

Hormazabal V., Steffenak I. e Yndestad M., 1996.

Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 724: 364-366.

Instituto de Salud Carlos III. España. Centro Nacional de Alimentación. Dirección General de Salud Alimentaria y Protección de los Consumidores. Métodos de Análisis de Residuos en alimento. Método 3.9.

Jacobsen A.M., Halling-Sørensen B., Ingerslev F. y Honoré Hansen S. 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1038: 157-170.

Karpinska J. 2004.

Derivative spectrophotometry—recent applications and directions of developments *Talanta* 64: 801-822.

Leclercq R. y Courvalin P. 2002.

Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2727-2734.

Liu R., Yang J. y Wu X. 2002.

Study of the interaction between nucleic acid and oxytetracycline–Eu³⁺ and its analytical application. *Journal of Lumin.* 96: 201-209.

- Luetzhoft H., Vaes W., Freidig A., Halling-Sorensen B. y Hermens J. 2000.
Influence of pH and Other Modifying Factors on the Distribution Behavior of 4-Quinolones to Solid Phases and Humic Acids Studied by "Negligible-Depletion" SPME-HPLC. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4989-4994.
- Lykkeberg A.K., Halling-Sørensen B., Cornett C., Tjørnelund J. y Honoré Hansen S. 2004.
Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34: 325-332.
- Macorni R., Lodmell J. y Hill W. 1990.
Identification of rRNA/ Chloramphenicol interaction site within then peptidyltransferase center of the 50S subunit of the Echerichia coli ribosome. *J. Biol. Chem.* 265: 7894-7899.
- Miranda C. y Zemelman R. 2002a.
Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms *Sci. Total Environ.* 293: 207- 218.
- Miranda C. y Zemelman R. 2002b.
Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture.* 212: 31-47.
- Mishra D. D., Islam I. y Sharma J. P. 1985.
Ion-pair extraction of tetracyclines. *Mikrochim. Acta III:* 97-106.
- Mulders E.J. y Van de Lagemaat D. 1989.
Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7: 1829-1835.

- Nagata T. y Oka H. 1996.
Detection of Residual Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Yellowtail Fish Muscles by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1280-1284.
- Oka H., Ito Y., Ikai Y., Kagami T. y Harada K. 1998.
Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A.* 812: 309- 319.
- 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- dialkylamino-substituted triarylmethane dyes in liquid solutions. *Spectrochim. Acta Part A.* 58: 2971-2982.
- Pandey S.N. 1989.
Derivative Infrared Spectra of Ramie. *Text. Res J.* 59: 226-231.
- Parham H., Pourreza N. y Shafiekhani H. 2008.
Solvent extraction-spectrophotometric determination of trace amounts of fluoxetine in pharmaceutical formulations. *J. Anal. Chem.* 63: 626-628.
- 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.
- Peña A., Lino C. y Silveira M.I. 2003.
Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescent detection. *J.AOAC Int.* 86: 925-929

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.

Pouliquen H., Gouelo D., Larhantec M., Pilet N. y Pinault L. 1997.

Rapid and simple determination of oxolinic acid and oxytetracycline in the shell of the blue mussel (*Mytilus edulis*) by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr B.* 702: 157-162.

Pouliquen H., Delépée R., Larhantec-Verdier M., Morvan M.L. y Le Bris H. 2007.

Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture.* 262: 23-28.

Pourreza N. y Mousavi H. Z. 2005.

Extraction Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Perchlorate Based on Ion- Pair Formation with Thionine. *J. Anal. Chem.* 60: 816-818.

Qiang Z. y Adams C. 2004.

Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water res.* 38: 2874-2890.

Ramos M., Aranda A., García E., Reuvers T. y Hooghuis H. 2003.

Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 789: 373-381.

Reich H. J., Borst J. P., Dykstra R. D. y Green D. P. 1993.

A nuclear magnetic resonance spectroscopic. Technique for the characterization of lithium ion pair structures in THF and THF/HMPA solution. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 8728-8741.

Rezaei B. 2006.

Spectrophotometric determination of manganese (VII) using benzyltriphenyl phosphoniumchloride as a new reagent and application of artificial neural network to extending the dynamic range of determination. *J. Anal. Chem.* 61: 1074-1078.

Roudaut B. e Yorke J.C., 2002.

High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *J. Chromatogr. B.* 780: 481-485.

Rudolph W. e Irmer G. 1994.

Raman and infrared spectroscopic investigation of contact in pair formation in aqueous cadmium sulfate solutions. *J. Solution Chem.* 23: 663-684.

Rupp H., y Anderson C. 2005

Determination of Oxytetracycline in Salmon by Liquid Chromatography with Metal-Chelate Fluorescence Detection. *J. AOAC Int.* 88: 505-510.

Salmon Chile, noticias. 2008.

<http://www.salmonchile.cl/frontend/seccion.asp?contid=915&secid=4&secoldid=4&subsecid=61&pag=1>.

Sanderson H., Ingerslev F., Brain R. A., Halling-Sørensen B., Bestari J.K., Wilson C. J., Johnson D. J. y Solomon K. R. 2005.

Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC-UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. *Chemosphere.* 60: 619-629.

Savitzky A. y Golay M. 1964.

Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36: 1627-1639.

Scasnár V., Benes L., Bezek S. y Trnovec T. 1984.

Ion-pair extraction of pentacaine from biological materials. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 82: 287-297.

Schach von Wittenau M. y Blackwood R.K. 1966.

Proton Magnetic Resonance Spectra of Tetracyclines. *J. Org. Chem.* 31: 613-615

Schlusener M. P., Spitteller M. y Beste K. 2003.

Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1003: 21-28.

Schwarz S., Kehrenberg C., Doublet B. y Cloeckaert A. 2004.

Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 519-542.

Sernapesca, 1999. Anuario estadístico de pesca.

[http://www2.sernapesca.cl/paginas/publicaciones/anuarios/pop_indice.php?c=001004001002007&titulo=Anuario 1999](http://www2.sernapesca.cl/paginas/publicaciones/anuarios/pop_indice.php?c=001004001002007&titulo=Anuario%201999)

Sernapesca, Servicio Nacional de Pesca. 2005. Programa de control de fármacos. Manual de procedimientos sección 1. Programa de control de residuos. Anexo III

Sernapesca, noticias, Servicio Nacional de Pesca. 2007. "Modificaciones al documento FAR-MP1" Última: Abril 2007, Se agrega cristal violeta y leuco cristal violeta al control de sustancias no autorizadas. En <http://www.sernapesca.cl>

Shoukry A. F., Rizk M. S., Issa Y. M. y Atia E. M. 1997.

Extraction-spectrophotometric determination of amprolium hydrochloride using bromocresol green, bromophenol blue and bromothymol blue. *Mikrochim. Acta* 127: 269-272.

Sokol J. y Matisova E. 1998. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 669: 75-80

Skoog D., Holler J. y Nieman T. 2001.

Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill 5° edición.

Silverstein R. y Webster F. 1998.

Spectrometric identification of organic compounds. J. Wiley 6° edición

Smith R. V., Harris R. G., Sanchez E., Maness D. D. y Martin A. 1977.

Analysis of erythromycin I. A study of erythromycin-acid dye complexes. *Microchem. J.* 22: 168-175.

Sørensen L. K. y Elbaek T. H. 2004.

Simultaneous determination of Trimethoprim, Sulfadiazine, Florfenicol and Oxolinic acid in surface water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chromatographia.* 60: 287-291.

Stolker A. A. M y Brinkman U.A.Th. 2005.

Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J. Chromatogr. A.* 1067: 15-53.

Taga M., Kan M. y Nasu T. 1989.

Determination of phosphate by flotation-fluorophotometry using ion- pair of molybdophosphate with Rhodamine 6G. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 334: 45-48.

Terespolsky S. y Kanfer I. 1995.

Stability of erythromycin and some of its esters in methanol and acetonitrile. *Int. J. Pharm.* 115: 123-128.

Thompson M., Ellison S. y Wood R. 2002

Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report) *Pure Appl. Chem.* 74: 835–855. © 2002 IUPAC

Toral M.I., Richter P., Cavieres M. y González W. 1999a.

Simultaneous determination of O- and P- nitrophenol by first derivative spectrophotometry. *Environ. Monit. Assess.* 54: 191-203.

- Toral M.I., Richter P., Tapia A. y Hernandez J. 1999b.
Simultaneous determination of iron and ruthenium as ternary complexes by extractive second derivative spectrophotometry. *Talanta*. 50: 183-191
- Toral M.I., Castillo M., Orellana S. y Richter P. 2006.
Screening y cuantificación de ácido oxolínico y/o flumequina en medicamento y alimento de peces. VII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Iquique, octubre 2006.
- Toral M.I., Gutiérrez P., Ardiles S. y Orellana S. 2007.
Extracción y determinación de oxitetraciclina y ácido oxolínico en alimento para peces. XXVII Jornadas Chilenas de Química. Chillán, noviembre 2007.
- Touraki M., Rigas P., Pergandas P. y Kastritsis C. 1995.
Determination of oxytetracycline in the live fish feed *Artemia* using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*. 663: 167-171.
- Touraki M., Ladoukakis M. y Prokopiou C. 2001.
High-performance liquid chromatographic determination of oxolínico acid and flumequine in the live fish feed *Artemia*. *J. Chromatogr. B*. 751: 247-256.
- Turiel E., Bordin G. y Rodríguez A. 2003.
Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*. 1008: 145-155.
- USP, 2003: United States Pharmacopeia (USP). 2003.
Veterinary monographs tetracyclines.
<http://www.usp.org/pdf/veterinary/tetracyclines.pdf>.
- Vue Ch., Schmidt L. J., Stehly G. R. y Gingerich W. H. 2002.
Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. *J. Chromatogr. B*, 780: 111-117.

Wang H. Y., Xiao Y. y Han J. 2005.

Simultaneous determination of carvedilol and ampicillin sodium by first-derivative fluorometry in the presence of human serum albumin. *Anal. Sci.* 21: 537-540.

Wen Y., Wang Y. y Feng Y.Q. 2006.

Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography 70: 153-159.

Yang S. y Carlson K. 2004.

Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *J. Chromatogr. A.* 1038: 141-155.

Zhu J., Snow D.D., Cassada D.A., Monson S.J. y Spalding R.F. 2001.

Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 928: 177-186.

ANEXO I: PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES

1. "Determinación simultánea de escopolamina y oxazepam por espectrofotometría derivada".
VII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 19- 22 octubre 2004.
2. "Determinación simultánea de imipramina y su metabolito desipramina por espectrofotometría de razón de espectros (RED)"
XXVI Jornadas Chilenas de Química. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 10-13 Enero 2006.
3. "Screening y cuantificación de ácido oxolínico y/o flumequina en medicamento y alimento de peces"
VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. 16-19 Octubre 2006.
4. "Determinación simultánea de losartan potásico e hidroclorotiazida por espectrofotometría derivada digital de primer orden"
VIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. 16-19 Octubre 2006.
5. "Determinación simultánea de acetaminofen y tramadol mediante espectrofotometría derivada digital de segundo orden" Comunicación oral.
XXVII Jornadas Chilenas de Química, Chillán, Chile. 20-23 Noviembre 2007.
6. "Extracción y determinación de oxitetraciclina y ácido oxolínico en alimento para peces"
XXVII Jornadas Chilenas de Química, Chillán, Chile. 20-23 Noviembre 2007.
7. "Desarrollo de un método para la determinación simultánea de albendazol y praziquantel por espectrofotometría derivada digital de segundo orden".
XXVII Jornadas Chilenas de Química, Chillán, Chile. 20-23 Noviembre 2007.
8. "Determinación espectrofotométrica de oxitetraciclina mediante formación de par iónico. Aplicación en músculo de salmón". Comunicación oral.
IX Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 14-17 Octubre 2008

ANEXO II: PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

1. "Estudio de las condiciones experimentales para la determinación simultánea de imipramina y su metabolito desipramina, por espectrofotometría de razón de espectros derivados (RED)".
III Congreso Argentino de Química Analítica, Universidad de San Luis, San Luis, Argentina, Noviembre 2005.
2. "Determinación espectrofotométrica de oxitetraciclina mediante formación de par iónico"
II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, Buenos Aires, Argentina, 27-30 Agosto 2007.
3. "Determinación simultánea de ácido oxolínico y flumequina en alimentos de peces, sin la interferencia de oxitetraciclina por espectrofotometría derivada"
II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, Buenos Aires Argentina, 27-30 Agosto 2007.
4. "Oxytetracycline determination by derivative spectrophotometry based in the formation of ionic pair with crystal violet and its spectroscopy verification".
FACSS (Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies), Reno, Nevada. EEUU, 28 de Septiembre a 2 de Octubre 2008.
5. "Extraction of oxytetracycline and oxolinic acid from food for fish and its determination by derivative spectrophotometry" Comunicación oral.
FACSS (Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies), Reno, Nevada. EEUU, 28 de Septiembre a 2 de Octubre 2008.

ANEXO III: PUBLICACIONES

1. Sandra Orellana D., Marcelo Muñoz F. and M. Inés Toral P.
"Simultaneous determination of N-butyl-scopolamine and oxazepam in pharmaceutical formulations by first-order digital derivate"
Journal of AOAC International 88, 1173-1178 (2005)
2. M. Inés Toral, Jorge Rivas, Marta Saldías, César Soto, Sandra Orellana
"Simultaneous determination of tramadol and paracetamol by second derivative spectrophotometry"
Journal of the Chilean Chemical Society 53, 1393-1397 (2008)
3. M. Inés Toral, Marta Saldías, César Soto, Sandra Orellana
"Estrategias en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación simultánea de compuestos orgánicos por espectrofotometría derivada"
Química Nova, On line 10/12/2008
4. Sandra Orellana D., César Soto and M. Inés Toral P.
"UV-vis, IR and ¹H NMR spectroscopic studies and characterization of ionic-pair Crystal Violet -Oxytetracycline"
Artículo sometido a la revista Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.
5. Sandra Orellana D., M. Inés Toral P.
"Determination of oxyteracycline in salmon muscle, based in formation of ionic- pair with crystal violet by extraction-derivative spectrophotometry"
Artículo en preparación.
6. Sandra Orellana D. M. Inés Toral P., Susan Ardiles, Patricia Gutierrez.
"Extaction and determination of oxytetracycline and flumequine in foods prescribed for fish"
Artículo en preparación.