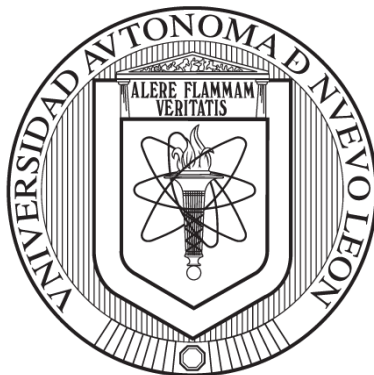


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EXTRACCIÓN SELECTIVA EN FASE SÓLIDA MEDIANTE IMPRESIÓN  
MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS MACRÓLIDOS EN  
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL**

**Por:**

**M.C. ELISA GARZA MONTELONGO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación  
en Química Analítica Ambiental**

**Diciembre 2021**

**EXTRACCIÓN SELECTIVA EN FASE SÓLIDA MEDIANTE IMPRESIÓN  
MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS MACRÓLIDOS EN  
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL**

---

**Dra. Perla Elizondo Martínez**  
Director de tesis

---

**Dr. Bernabé L. Rivas Quiroz**  
Co-director externo

---

**Dr. Eduardo D. Pereira Ulloa**  
Co-Director externo

**EXTRACCIÓN SELECTIVA EN FASE SÓLIDA MEDIANTE IMPRESIÓN  
MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS MACRÓLIDOS EN  
PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL**

**Aprobación de la tesis**

---

**Dra. Perla Elizondo Martínez**

Asesor de tesis

---

**Dra. María Guadalupe Sánchez Anguiano**

---

**Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas**

---

**Dra. Laura Hinojosa Reyes**

---

**Dr. Alfredo Rosales Jasso**

---

**Dr. Vladimir García**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas por forjarme como profesionista y como persona, además de por todo el apoyo brindado a lo largo de tantos años de formación académica. Deseo también agradecer a la Fundación UANL por los beneficios que me otorgaron para la realización de la estancia de investigación en la Universidad de Concepción. También expreso mi gratitud hacia el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, la cual me permitió continuar desarrollando mis estudios de doctorado.

Al equipo de trabajo del departamento de polímeros de la Universidad de Concepción, Chile, por su recibimiento en sus instalaciones y por sus invaluable aportaciones en la realización de este proyecto. Gracias también al equipo de trabajo del laboratorio de química industrial de la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme integrarme a sus filas y trabajar juntos por más de siete años durante los cuáles he tenido un gran crecimiento tanto personal como profesional. A mis asesores de tesis Dra. Perla Elizondo, Dr. Bernabé Rivas, M.C. Nancy Pérez y Dr. Eduardo Pereira les agradezco su confianza y todo el apoyo otorgado. A mis compañeros y amigos que me han acompañado durante esta travesía, muchas gracias.

Finalmente reservo estas palabras para agradecer a mi familia por estar siempre conmigo, a mi hijo, a mis padres, mis hermanos, mis sobrinas y especialmente a mi esposo José Pablo que siempre ha sido mi ancla, pero principalmente agradezco a mi Dios que me ha permitido continuar en este viaje llamado vida.

## **DEDICATORIA**

Posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz quiero que sepas que eres la razón de que me levante cada día, eres el motivo de mis esfuerzos por el presente y el mañana, eres mi principal motor y como en todos mis logros, en este has estado presente, por eso te dedico este trabajo a ti Juan Pablo.

El amor de mi familia me ha enseñado a través de tantos momentos difíciles, y yo, con toda la humildad del mundo he aprendido de ellos, he logrado convivir con mis miedos y a no temer a mí misma. Siento el deseo de llorar y reír al mismo tiempo y por eso doy gracias a Dios, por estar viva.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Residuos de fármacos en productos de origen animal .....	5
2.2 Fármacos macrólidos.....	6
2.2.1 Eritromicina .....	7
2.2.1.1 Parámetros farmacocinéticos de la eritromicina .....	10
2.2.1.2 Farmacodinamia de la eritromicina.....	11
2.2.2 Claritromicina .....	12
2.2.2.1 Farmacocinética de la claritromicina .....	13
2.2.2.2 Farmacodinamia de la claritromicina.....	15
2.2.3 Tilosina .....	156
2.2.3.1 Farmacocinética de la tilosina.....	18
2.2.3.2 Farmacodinamia de la tilosina .....	20
2.3 Efectos en el humano por la exposición a residuos o a bacterias resistentes .....	21
2.4 Evaluación de la calidad alimentaria.....	23
2.5 Extracción en fase sólida.....	24
2.6 Polietilen tereftalato (PET) y su acumulación en el ambiente .....	25
2.7 Polímeros molecularmente impresos.....	26
2.8 Antecedentes .....	30
2.9 Análisis crítico.....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	39
3.1 Hipótesis .....	39
3.2 Objetivo general .....	39
3.3 Objetivos específicos.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.1 Equipos y reactivos .....	41
4.1.1 Equipos .....	41
4.1.2 Reactivos.....	41
4.2 Parte experimental.....	42

4.2.1 Degradación de PET con etilenglicol .....	42
4.2.2 Injerto de PET con ácido acrílico .....	43
4.2.2.1 Medio heterogéneo .....	43
4.2.2.2 Medio homogéneo .....	44
4.3 Impresión molecular de PET-g-AA con fármacos macrólidos .....	45
4.3.1. Impresión molecular por monoplantilla .....	45
4.4 Síntesis del polímero no impreso (NMIP) .....	46
4.5 Caracterización .....	46
4.5.1 Espectrofotometría de infrarrojo .....	46
4.5.2 Microscopía electrónica de barrido .....	46
4.5.3 Calorimetría diferencial de barrido .....	47
4.5.5 Porosimetría de mercurio .....	47
4.6 Ensayos de adsorción .....	47
4.6.1 Ensayos de adsorción utilizando PET, PET-g-AA, MIP y NMIP como adsorbentes .....	47
4.6.2 Cinética de adsorción de macrólidos por el MIP .....	48
4.6.3 Isotermas de adsorción de macrólidos por el MIP .....	48
4.6.4 Determinación de la capacidad máxima de adsorción de macrólidos por los MIPs mediante el método de contactos consecutivos .....	49
4.6.5 Implementación de MIPs en cartuchos de extracción en fase sólida .....	49
4.6.6 Diseño de experimentos para el proceso de extracción en fase sólida .....	50
4.6.7 Implementación de SPE en muestras alimenticias .....	50
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
5.1 Degradación de PET mediante glicólisis .....	52
5.2 Injerto de PET con ácido acrílico .....	53
5.2.1 Medio heterogéneo .....	53
5.2.2 Medio homogéneo .....	55
5.3 Impresión molecular de PET-g-AA con tilosina, eritromicina y claritromicina ....	56
5.4 Caracterización .....	57
5.4.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier con reflectancia total atenuada .....	58
5.4.2 Calorimetría diferencial de barrido .....	61
5.4.3 Microscopia electrónica de barrido .....	644

5.4.3 Porosimetría de mercurio.....	66
5.5 Ensayos de adsorción .....	69
5.5.1 Adsorción de macrólidos por distintos materiales .....	69
5.5.2 Isotermas de adsorción de macrólidos por MIPs .....	71
5.5.2.1 Isoterma de adsorción de tilosina.....	71
5.5.2.2 Isoterma de adsorción de eritromicina .....	75
5.5.2.3 Isoterma de adsorción de claritromicina .....	77
5.5.3 Determinación de las capacidades máximas de adsorción .....	79
5.6 Implementación de MIP <sub>Ty</sub> , MIP <sub>Ery</sub> y MIP <sub>Cl</sub> como adsorbentes en SPE.....	81
5.7 Extracción de macrólidos de muestras alimenticias.....	86
CONCLUSIONES .....	89
REFERENCIAS.....	92



## LISTA DE TABLAS

1. Fragmentos estructurales derivados de azúcares de la eritromicina y sus grupos funcionales .....	8
2. Propiedades fisicoquímicas de la eritromicina.....	9
3. Parámetros farmacocinéticos de la eritromicina .....	10
4. Propiedades fisicoquímicas de la claritromicina.....	13
5. Parámetros farmacocinéticos de la claritromicina .....	14
6. Grupos funcionales presentes en los fragmentos estructurales de la tilosina A.....	16
7. Propiedades fisicoquímicas de la Tilosina .....	17
8. Parámetros farmacocinéticos de la tilosina .....	18
9. Límites máximos de residuos de macrólidos en alimentos .....	23
10. Factores y niveles considerados en la optimización del proceso de SPE de macrólidos en disoluciones acuosas.....	50
11. Resultados de degradación de PET .....	52
12. Resultados de reacción de injerto con distintos iniciadores.....	53
13. Resultados de reacción de injerto en medio homogéneo con distintos iniciadores ...	55
14. Vibraciones infrarrojas $\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) del PET y PET degradado .....	59
15. Transiciones térmicas para el PET, PET-g-AA y $\text{MIP}_{\text{Ty}}$ .....	62
16. Cristalinidad (%) de PET, PET-g-AA y $\text{MIP}_{\text{Ty}}$ .....	63
17. Análisis de porosimetría de mercurio para PET, $\text{MIP}_{\text{Ty}}$ y NMIP. ....	66
18. Capacidades de adsorción (mg/g) de macrólidos para distintos adsorbentes .....	70
19. Coeficientes de reconocimiento para $\text{MIP}_{\text{Ty}}$ , $\text{MIP}_{\text{Ery}}$ y $\text{MIP}_{\text{Cly}}$ sobre sus respectivas plantillas .....	71
20.- Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir .....	73

21. Parámetros del análisis de Scatchard de adsorción de tilosina por MIP <sub>Ty</sub> .....	74
22.- Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir .....	76
23.- Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir .....	78
24. - Capacidad máxima de adsorción de macrólidos para distintos adsorbentes .....	80
25. Parámetros para la extracción en fase sólida de tilosina, eritromicina y claritromicina por MIP <sub>Ty</sub> , MIP <sub>Ery</sub> y MIP <sub>Cly</sub> .....	84
26. Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en medio acuoso para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes.....	85
27. Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de leche para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes .....	86
28. Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de huevo para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes .....	87
29. Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de carne para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes .....	88

## LISTA DE FIGURAS

1. Protocolo de preparación de muestras del método QuEChERS .....	2
2. Proceso de extracción en fase sólida.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3. Proceso de impresión molecular .....	4
4. Estructura de los fármacos macrólidos a) eritromicina, b) claritromicina y c) tilosina .	7
5. Fragmentos estructurales de la tilosina A. ....	16
6. Mecanismo de acción de la tilosina .....	20
7. Estructura química del polietilentereftalato (PET) .....	25
8. Reacción de glicólisis de PET con trietilenglicol .....	43
9. Esquema del equipo utilizado en la reacción de injerto.....	44
10. Posible mecanismo de la reacción de injerto de PET con ácido acrílico por vía radicálica <sup>[57]</sup> .....	54
11. Estructura predominante de a) tilosina, b) eritromicina y c) claritromicina a pH 6.5	57
12. Espectros infrarrojos del PET y PET degradado.....	58
13. Espectros infrarrojos del PET, PET-g-AA (AA), MIP <sub>Ery</sub> , MIP <sub>Ty</sub> y NMIP .....	60
14. Curvas de DSC para PET, PET-g-AA, MIP <sub>Ty</sub> y NMIP .....	61
15. Micrografías del PET a 270 y 4 x .....	64
16. Micrografías del PET-g-AA a 500 y 1000 x.....	655
17. Micrografías del MIP <sub>Ty</sub> a a)1000, b), c)5000 y d)10000 x.....	65
18. Micrografías del MIP <sub>Cly</sub> 1000 y 100 x.....	66
19. Distribución de tamaño de poro para PET, NMIP y MIP <sub>Ty</sub> .....	68
20. Isoterma de adsorción de tilosina por MIP <sub>Ty</sub> a 25°C.....	72
21. Modelos de a) Lagmuir y b) Freundlich de adsorción de tilosina por MIP <sub>Ty</sub> .....	72

22. Análisis de Scatchard de adsorción de tilosina por MIP <sub>Ty</sub> .....	74
23. Isoterma de adsorción de eritromicina por MIP <sub>Ery</sub> a 25°C .....	75
24. Modelos de a) Lagmuir y b) Freundlich de adsorción de eritromicina por MIP <sub>Ery</sub> ...	76
25. Isoterma de adsorción de claritromicina por MIP <sub>Cly</sub> a 25°C.....	77
26. Modelos de a) Lagmuir y b) Freundlich de adsorción de claritromicina por MIP <sub>Cly</sub> .	78
27. Capacidad de adsorción del tilosina por MIP <sub>Ty</sub> , de eritromicina por MIP <sub>Ery</sub> y de claritromicina por MIP <sub>Cly</sub> .....	79
28. Recuperación de macrólidos con distintos solventes de lavado.....	82
29. Recuperación de macrólidos con distintos solventes de elución .....	83

## ABREVIATURAS

AA	Ácido acrílico
AIBN	Azobisisobutironitrilo
BPO	Peróxido de benzoílo
CAC	Comisión del Códex Alimentarius
EGDMA	Etilen glicoldimetacrilato
EPA	Agencia de Protección Ambiental
HPLC-UV	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector Ultravioleta
MIP <sub>Cl<sub>y</sub></sub>	Polímero molecularmente impreso con claritromicina
MIP <sub>Ery</sub>	Polímero molecularmente impreso con eitromicina
MIPS	Polímero molecularmente impreso
MIP <sub>Ty</sub>	Polímero molecularmente impreso con tilosina
NMIP	Polímero molecularmente no impreso
PET	Polietilentereftalato
PET-g-AA	Polietilentereftalato injertado con ácido acrílico
PSA	Persulfato de amonio
SPE	Extracción en fase sólida
T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión

# **CAPÍTULO I**

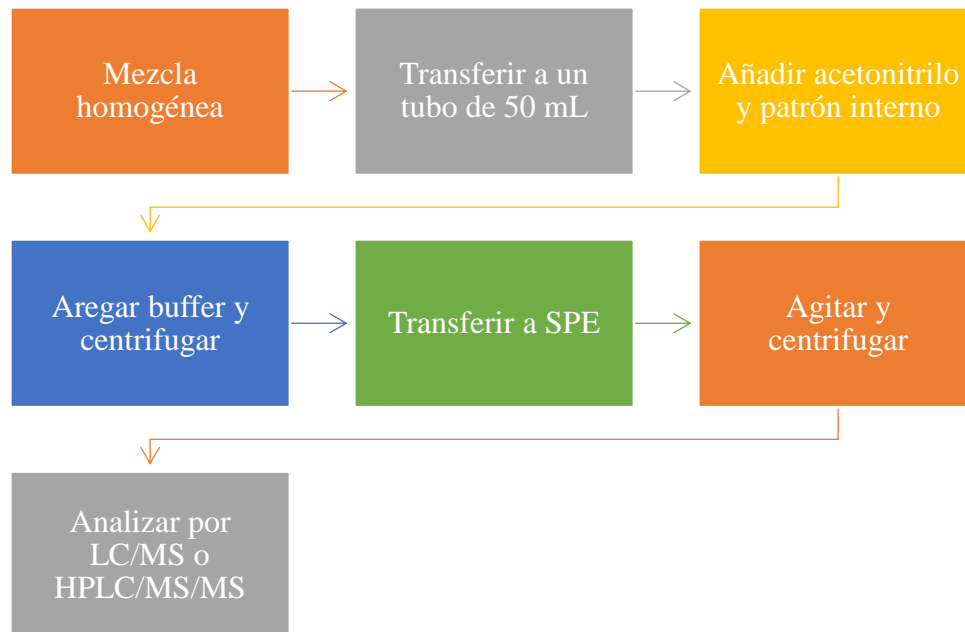
## **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad se utiliza un gran número de compuestos naturales, sintéticos o semi sintéticos, para el tratamiento de enfermedades en animales entre los que se encuentra el grupo de los fármacos macrólidos, los cuales son ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones [1].

Los macrólidos son moléculas que contienen de 14 a 16 carbonos, entre los que destacan la eritromicina, claritromicina, azitromicina y tilosina [2]. El uso indiscriminado y la presencia de residuos de este tipo de moléculas en los tejidos animales o en los desechos generados por los mismos, puede ocasionar serios problemas ambientales así como la aparición de distintas bacterias resistentes a estos fármacos [3], provocando efectos adversos en la salud de los organismos consumidores de los productos derivados de animales que fueron tratados con estos antibióticos [4].

Para protección del consumidor se han regulado las concentraciones máximas permitidas de algunos fármacos macrólidos, entre los que se encuentran la claritromicina, eritromicina y tilosina, los organismos internacionales que han emitido dichas regulaciones son la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) [5-6], por lo que el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de este tipo de compuestos se ha convertido en una necesidad tanto para el productor como para los organismos de control.

Una de las metodologías más ampliamente utilizadas para llevar a cabo la determinación de residuos de diversas moléculas en matrices derivadas de animales es el método QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) [6-8], el cual implica como primer paso una extracción con solventes, en las que se utiliza acetonitrilo y sulfato de magnesio anhidro y posteriormente el proceso de limpieza de la muestra mediante extracción en fase sólida, para la eliminación de interferencias mediante distintos adsorbentes y finalmente la cuantificación del analito mediante distintas técnicas entre las que se encuentran la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [9-12], dicho procedimiento se muestra en el esquema presentado en la Figura 1.



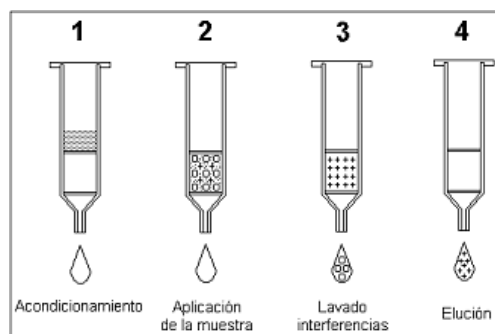
**Figura 1.** Protocolo de preparación de muestras del método QuEChERS

Como se mencionó anteriormente, el primer paso de la cuantificación requiere que la muestra sea sometida a un proceso de pretratamiento, el cual generalmente se lleva a cabo

mediante extracción líquido-líquido utilizando distintos solventes o extracción en fase sólida [13-16].

La principal desventaja de la extracción líquido-líquido es el consumo de grandes cantidades de solventes orgánicos, los cuales son perjudiciales para el ambiente, además de requerir períodos prolongados para lograr separaciones eficientes. La extracción en fase sólida (SPE) se ha desarrollado como una alternativa, dicha metodología consiste en el uso de adsorbentes empacados en cartuchos, los cuales tienen como principal objetivo la separación del analito de interés de distintas matrices, tal como se muestra en la Figura 2.

Actualmente existe una gran cantidad de materiales adsorbentes, sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta es la presencia de distintas moléculas que actúan como interferentes al llevar a cabo el proceso de purificación de la muestra.

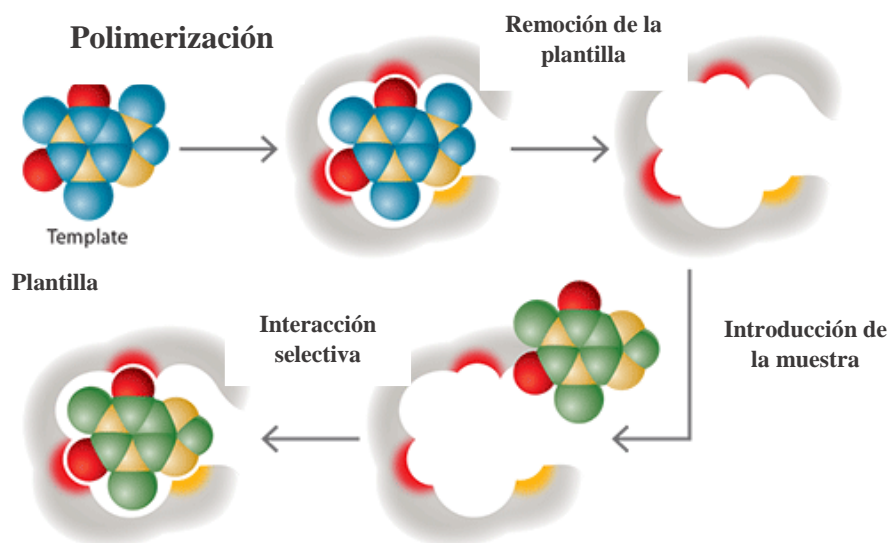


**Figura 2.** Proceso de extracción en fase sólida

Una de las alternativas que puede ser utilizada para disminuir las interferencias durante la SPE, es la implementación de polímeros molecularmente impresos (MIPs) como adsorbentes [17], este tipo de materiales presenta como principal característica la selectividad hacia el analito de interés, ya que dicha molécula se emplea como plantilla al llevar a cabo la síntesis del polímero (Figura 3), lo cual genera en la estructura huecos que



son complementarios en tamaño, forma y funcionalidad a la molécula objetivo, lo que desarrolla el reconocimiento del analito plantilla a nivel molecular [18-19].



**Figura 3.** Proceso de impresión molecular

Debido a sus características, los MIPs pueden ser aplicados en la separación de analitos de matrices complejas, como las muestras de productos alimenticios tales como huevos, lácteos y cárnicos [20-22], por lo que en este proyecto se propone la síntesis de un material molecularmente impreso basado en polietilentereftalato (PET) reciclado y su implementación como adsorbente en un cartucho de SPE de residuos de fármacos macrólidos, para la purificación de muestras provenientes de productos derivados de animales destinados para consumo humano, para posteriormente cuantificar dichas moléculas mediante HPLC.

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Residuos de fármacos en productos de origen animal**

La industria alimenticia tiene el compromiso de distribuir en el mercado productos de óptima calidad. El acelerado comercio internacional de alimentos ha promovido la implementación de estrategias que contribuyan al aseguramiento de la inocuidad de los productos alimenticios [23], la inocuidad de dichos productos puede verse afectada por la presencia de residuos de origen químico. Se conoce como residuo a cualquier sustancia que permanece en el organismo como consecuencia de un tratamiento y puede aparecer en la carne de consumo o en subproductos como la leche o el huevo [23], por lo que los productores deben tomar medidas para la obtención de productos de alta calidad.

El aseguramiento en la salud de los animales ayuda a obtener productos de calidad, es decir, alimentos seguros, por lo que la prevención y el tratamiento de las enfermedades de los animales es una de las principales preocupaciones de los ganaderos [23], ya que cada día los consumidores son más exigentes en cuanto a la inocuidad de los productos que consumen, por lo que la presencia de residuos de fármacos veterinarios en productos de origen animal trae consecuencias a nivel de salud pública, de comercio y de la industria [24-25].

Los reportes por intoxicación aguda debido a la ingestión de alimentos que presentan residuos de fármacos veterinarios son escasos, aunque este tipo de residuos se encuentra en baja concentración, es probable que se presenten reacciones alérgicas en personas sensibles, debido a los riesgos que representan para la salud humana, se han establecido límites máximos de residuos para los fármacos, por debajo de los cuales son tolerables y no deberían ocasionar ningún tipo de reacción adversa en los seres vivos [25].

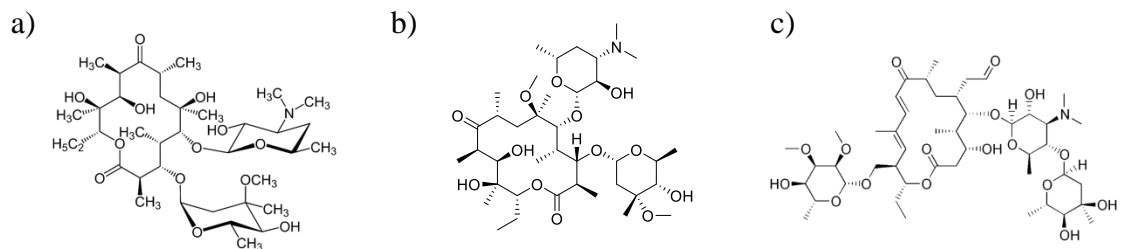
Entre los fármacos veterinarios que se encuentran con mayor frecuencia en matrices animales se encuentran los antibióticos, ya que además de ser utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, también se emplean para el control de la reproducción, alivio del estrés y como promotores de crecimiento, además de que, en la mayoría de los casos los animales no son tratados de manera individual, sino que resulta más eficiente tratar en grupos medicando el agua o el pienso que consumen [25], el uso indiscriminado para estos fines puede ocasionar serios problemas en la salud de los consumidores, además de que favorece el incremento y la prevalencia de bacterias resistentes en el ecosistema, la cual está asociada a la presencia de distintas bacterias resistentes que se encuentran en los intestinos de animales que son continuamente tratados con dosis subterapéuticas de antibióticos.

Para lograr la reducción del consumo de antibióticos en animales, distintos organismos han establecido regulaciones en el uso como promotores de crecimiento y han impulsado políticas para su prohibición. [26]

## **2.2 Fármacos macrólidos**

En el año 1952 fue descubierta la eritromicina, y con ella se creó una nueva familia de antimicrobianos: los macrólidos. Estos fármacos se caracterizan por poseer en su

estructura un anillo de lactona macrocíclico de entre 14 y 16 átomos. Los miembros de esta familia entre los que se encuentran la claritromicina y la tilosina (Figura 4), comparten estructura química, espectro antimicrobiano, farmacocinética y toxicidad, y tienen como prototipo a la eritromicina [27].



**Figura 4.** Estructura de los fármacos macrólidos a) eritromicina, b) claritromicina y c) tilosina

### 2.2.1 Eritromicina

La eritromicina fue observada por primera vez por McGuire en 1952. Su nombre establecido por la farmacopea europea es 6-(4-dimetilamino-3-hidroxi-6-metil-tetrahidropiran-2-il)oxi-14-etil-7,12,13-trihidroxi-4-(5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetil-tetrahidropiran-2-il)oxi-3,5,7,9,11,13-hexametil-1-oxacciclotradecano-2,10-diona) [28]. Está indicada para el tratamiento de infecciones causadas por organismos susceptibles en bovinos, potrillos, cerdos, ovejas, perros y gatos.

La eritromicina posee en su estructura (Figura 4) tres distintos fragmentos estructurales: desoxamina, cladinosa (3-O-metilmicarosa) y eritronolida [28]. La desoxamina y la cladinosa son derivados de azúcares (piranosas) que poseen ciclos de 6 miembros donde uno de ellos es un átomo de oxígeno, cada una de ellas posee distintos grupos funcionales, los cuales se resumen en la Tabla 1.

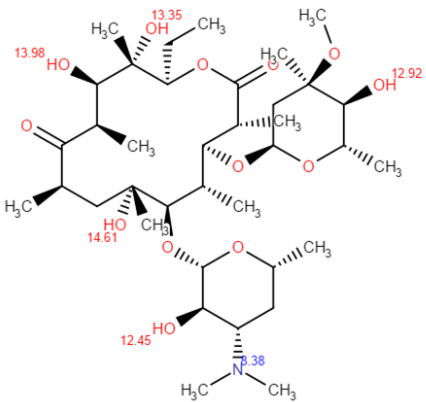
**Tabla 1.** Fragmentos estructurales derivados de azúcares de la eritromicina y sus grupos funcionales

<b>Fragmento</b>	<b>Grupos funcionales</b>
<b>Desoxamina</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dimetilamino</li><li>• Metilo</li><li>• Hidroxilo</li></ul>
<b>Cladinosa</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Metoxilo</li><li>• Dos metilos</li><li>• Hidroxilo</li></ul>

El fragmento más polar es la desoxamina, mientras que la eritronolida representa el aglicón de la eritromicina, es decir, es el compuesto remanente sin azúcares que queda tras reemplazar por un átomo de hidrógeno el grupo glicósilo de un glucósido, que es un compuesto formado por un azúcar (desoxamina y cladinosa) y un compuesto no glúcido (eritronolide). Este fármaco es ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas comunes principalmente en las vías respiratorias. Su estabilidad depende del valor de pH del medio, ya que puede formar sales con los ácidos pero se inactiva en gran medida a valores de pH menores a 4 [27-29].

La Tabla 2 resume algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de la eritromicina [30].

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas de la eritromicina

Propiedad	Valor
<b>Solubilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Poco soluble en agua y completamente soluble en alcoholes de cadena corta, benceno, acetona y cloroformo</li> <li>2.7</li> </ul>
<b>Coefficiente de partición Log P (octanol:agua)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Log P &gt; 0.5, el compuesto tiende a ser lipofílico</li> </ul>
<b>Coefficiente de distribución Log D</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH 6 = 0.38</li> <li>pH 7.4 = 2.08</li> </ul>
<b>Estabilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Soluciones estables a pH entre 7 – 8</li> <li>pH ligeramente ácido se transforma en enol</li> <li>pH &lt; 4 = Degradación del fármaco por la formación de anhídrido de eritromicina                             <ul style="list-style-type: none"> <li>pH &gt; 8 = Degradación polar del fármaco, formación del enol éter de eritromicina</li> </ul> </li> <li>Térmicamente inestable en soluciones acuosas.</li> </ul>
<b>Punto de fusión</b>	135 – 140 °C
<b>Grupos ionizables pKa</b>	
<b>Absorción UV</b>	$\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$

### 2.2.1.1 Parámetros farmacocinéticos de la eritromicina

La eritromicina está compuesta principalmente por eritromicina A, aunque pueden estar presentes diferentes cantidades de eritromicina B y eritromicina C, sin embargo la mayor parte de la actividad biológica reside en la eritromicina factor A.

#### Absorción

La absorción de la eritromicina administrada por vía oral y su estabilidad en el medio ácido del estómago dependen de la forma química, ya sea como base, estearato o estolato, en todos los casos su biodisponibilidad es baja, por lo que se prefiere la vía intramuscular. La diferencia con otros antibióticos es que sus moléculas no ionizadas son altamente liposolubles [29], atravesando las barreras biológicas fácilmente por difusión pasiva, para alcanzar idénticas concentraciones en ambos lados de la membrana. La biodisponibilidad oral del fármaco es menor al 50%.

La Tabla 3 resume algunos otros parámetros farmacocinéticos de la eritromicina [28].

**Tabla 3.** Parámetros farmacocinéticos de la eritromicina

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>T máx</b>	4 h
<b>C máx</b>	4.8 µg/mL
<b>Volumen de distribución</b>	1.95 L/ kg

#### Distribución

Se distribuye a través del cuerpo en la mayoría de los fluidos, células y tejidos incluyendo próstata, pulmón, macrófagos, neutrófilos, glándula mamaria y líquido cefalorraquídeo. La penetración de este fármaco a los tejidos de difícil acceso es debida a su gran

liposolubilidad [29], de tal manera que la presencia en ellos está influenciada por su unión a proteínas plasmáticas que va de 73% a 81%, y por la velocidad con que disminuye su concentración en plasma.

### **Metabolismo**

El metabolismo de la eritromicina ocurre principalmente en el hígado y generalmente se lleva a cabo mediante alguna de las reacciones mencionadas a continuación:

- N-desmetilación
- O-desmetilación

El principal metabolito generado mediante dichas reacciones de metabolismo es la N-desmetil eritromicina [28].

### **Eliminación**

Primariamente es excretada por la bilis sin modificaciones, sólo del 2% al 5% es excretada por orina. La vida media de la Eritromicina es de 60 a 90 minutos en perros y gatos, 70 a 80 minutos en potrillos y yeguas y 200 minutos en vacas.

El tiempo de restricción para la industrialización o consumo de leche es de cinco días para bovinos (10 ordeñas), y para industrialización o consumo de carne: 14 días.

#### **2.2.1.2 Farmacodinamia de la eritromicina**

Es un antibiótico bacteriostático perteneciente al grupo de los macrólidos, de amplio espectro y activo sobre todo frente a bacterias gram positivas, y algunas gram negativas, actinomicetos, micoplasmas, clamidias, rickettsias y algunas micobacterias.



Es muy eficaz contra ciertos microorganismos, principalmente *Staphylococcus aureus* Coagulasa Positivo en la mastitis bovina, en infecciones por *Rhodococcus equi* en el potrillo y en pleuroneumonía fibrinosa por *Pasteurella* en los terneros.

El mecanismo de acción de este fármaco consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a las subunidades ribosómicas 50S, dicha unión inhibe la actividad de la enzima peptidil transferasa e interfiere con la translocación de aminoácidos durante la traducción y el ensamblaje de proteínas.

La eritromicina puede ser bacteriostática o bactericida dependiendo del organismo y la concentración del fármaco.

Las reacciones adversas son en general leves, las más comunes son alteraciones digestivas, como dolor y calambres abdominales, náuseas, vómitos, diarrea, estomatitis, hiperacidez gástrica y anorexia además de reacciones dermatológicas entre las que destacan las erupciones cutáneas y urticaria [31].

### **2.2.2 Claritromicina**

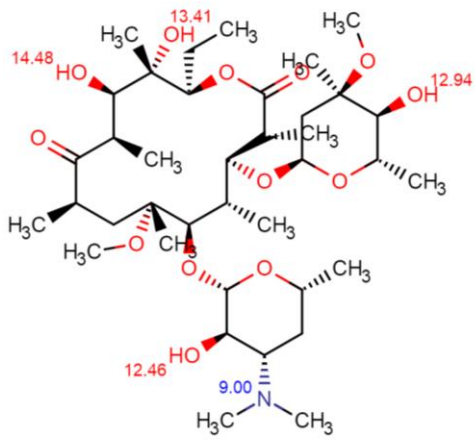
Este fármaco presenta en su estructura un anillo lactónico de 14 miembros. Pertenece a los macrólidos de segunda generación y tiene como principales ventajas frente a la eritromicina que genera menos efectos adversos además de significativas mejoras en los parámetros farmacocinéticos.

Su nombre IUPAC es (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11R,12R,13S,14R)-6-[[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxano-2-il]oxi]-14-etil-12,13-dihidroxi-4-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi]-7-metoxi-3,5,7,9,11,13-hexametil-1-oxaciclotetradecano-2,10-diona.

Este fármaco es derivado de la eritromicina y sus estructuras difieren únicamente por la metilación del grupo hidroxilo ubicado en la posición 6 dentro del ciclo de la lactona, lo cual contribuye a incrementar la efectividad del medicamento.

La Tabla 4 resume algunas de las principales propiedades fisicoquímicas de la claritromicina [32].

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas de la claritromicina

Propiedad	Valor
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>1.69 mg/L en agua a 25°C</li> </ul>
Coefficiente de partición Log P (octanol:agua)	<ul style="list-style-type: none"> <li>3.16</li> <li>Log P &gt; 0.5, el compuesto tiende a ser lipofílico</li> </ul>
Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>Soluciones estables a pH entre 7 – 8</li> <li>A pH ácido se hidroliza</li> </ul>
Grupos ionizables pKa	
Punto de fusión	220 - 222 °C
Absorción UV	$\lambda_{\text{máx}} = 265 \text{ nm}$

### 2.2.2.1 Farmacocinética de la claritromicina

La claritromicina está formada por un solo componente, sin embargo su principal metabolito, el 14-hidroxiclaritromicina es también activo frente a algunas bacterias.

## Absorción

La absorción de este fármaco es rápida y su biodisponibilidad oral es entre 52 - 55% producto de una absorción incompleta del fármaco. Dicha biodisponibilidad puede disminuir si el fármaco se ingiere con alimentos o si se administra en conjunto con un antiácido. Comúnmente este fármaco es administrado por vía oral en las vacas, en dosis bajas de 10 mg/kg de peso del animal cada 12 horas cuando se encuentran en tratamiento de enfermedades infecciosas. La claritromicina comparte el mismo mecanismo de paso a través de membrana que otros macrólidos, lo cual es generalmente mediante difusión pasiva debido a su alta lipofiliidad [33].

La biodisponibilidad oral del fármaco es 55%. La Tabla 5 muestra algunos otros parámetros farmacocinéticos de la claritromicina [33].

**Tabla 5.** Parámetros farmacocinéticos de la claritromicina

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>T máx</b>	2 h
<b>C máx</b>	2.12 µg/mL
<b>Volumen de distribución</b>	1.3 L/ kg

## Distribución

Es muy amplia, el fármaco muestra una elevada penetración intracelular pero también tiende a presentarse en la saliva y los tejidos pulmonares. Como resultado, la concentración en los tejidos es más elevada que la plasmática. Sin embargo, la penetración en el sistema nervioso central es pequeña. Su unión a proteínas va a depender de la cantidad en la que se encuentre la claritromicina, la unión del fármaco a proteínas tiene

un valor de entre 42 y 72 %, por lo que tiende a acumularse en tejido muscular cuando es administrado en alta concentración o durante períodos prolongados.

### **Metabolismo**

Se lleva a cabo principalmente en el hígado mediante reacciones de hidroxilación y N-desmetilación oxidativa, el principal metabolito generado mediante las reacciones de biotransformación es la 14-hidroxiclaritromicina.

### **Eliminación**

El fármaco que no se metaboliza es eliminado sobre todo por la orina en más del 75% de la dosis y su tiempo de vida media es de hasta 72 horas.

#### **2.2.2.2 Farmacodinamia de la claritromicina**

Es indicado principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Este fármaco se emplea para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio [33].

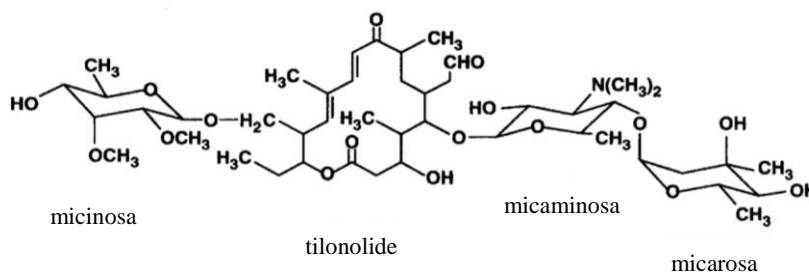
La claritromicina presenta el mismo mecanismo de acción general que los macrólidos. Su efecto es generalmente bactericida, independientemente del organismo y la concentración del fármaco. Su larga vida media, que permite una dosificación diaria y una duración de administración más corta, es una propiedad distinta de otros macrólidos.

La gran mayoría de los efectos adversos son de severidad leve o moderada, y reversibles al suspender el fármaco. Evidencias limitadas obtenidas de estudios clínicos comparativos sugieren que la frecuencia de efectos adversos con claritromicina es menor a la de eritromicina.

#### **2.2.3 Tilosina**

La tilosina es un antibiótico macrólido de uso veterinario bacteriostático a dosis usuales y bactericida a dosis altas. Es principalmente activo contra las bacterias gram positivas.

Su nombre de acuerdo a la farmacopea europea es (4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-15-[[[(6-deoxi-2,3-di-O-metil-β-D-alopiranosil)oxi]metil]-6-[[[3,6-dideoxi-4-O-(2,6-dideoxi-3-C-metil-α-L-ribo-hexapiranosil)-3-(dimetilamino)-β-glucopirnosil]oxi]-16-etil-4-hidroxi-5,9,13-trimetil-7-(2-oxoetil)oxaciclohexadeca-11, 13-dieno-2,10-diona. Este fármaco presenta en su estructura diversos grupos funcionales, que de acuerdo a los valores de pH en el que se encuentren, pueden poseer diversas cargas, posee cuatro distintos fragmentos estructurales: micinosa, micaminosa, micarosa, y tilonolida, los cuales se ilustran en la Figura 5 [34].



**Figura 5.** Fragmentos estructurales de la tilosina A.

La micinosa, micaminosa y micarosa son derivados de azúcares, ya que son ciclos de 6 miembros donde uno de ellos es un átomo de oxígeno, cada una de ellas posee distintos grupos funcionales, los cuales se resumen en la Tabla 6.

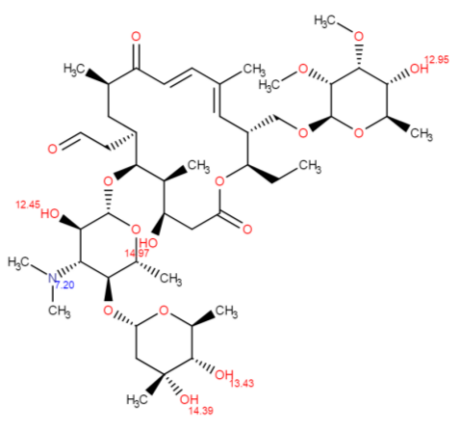
**Tabla 6.** Grupos funcionales presentes en los fragmentos estructurales de la tilosina A

Fragmento	Grupos funcionales
Micinosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 grupos metoxilo</li> <li>• 1 grupo hidroxilo</li> <li>• 1 grupo metilo</li> </ul>
Micaminosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 grupo hidroxilo</li> <li>• 1 grupo dimetilamino</li> <li>• 1 grupo metilo</li> </ul>
Micarosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 grupos hidroxilo</li> <li>• 2 grupos metilo</li> </ul>

El fragmento más polar de los tres es la micinosa, mientras que el fragmento de la tilonolida, representa el aglicón de la tilosina, es decir, es el compuesto remanente sin azúcares que queda tras reemplazar por un átomo de hidrógeno el grupo glicósido de un glucósido, que es un compuesto formado por un azúcar (micinosa, micaminosa y micarosa) y un compuesto no glúcido (tilonolida).

La Tabla 7 resume algunas de las principales propiedades fisicoquímicas del fármaco en estudio [34].

**Tabla 7.** Propiedades fisicoquímicas de la Tilosina

Propiedad	Valor
<b>Solubilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mg/mL (agua, 25°C)</li> <li>• Soluble en alcoholes de cadena corta, ésteres, cetonas, hidrocarburos clorados, benceno, éter, acetona y cloroformo</li> </ul>
<b>Coefficiente de distribución Log D</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 6 = 1.49</li> <li>• pH 7.4 = 3.02</li> </ul>
<b>Estabilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soluciones estables a pH entre 4 – 9</li> <li>• pH &lt; 4 = Formación de tilmicosina por hidrólisis ácida.</li> <li>• pH &gt; 9 = Degradación polar del fármaco, formación de aldol de tilosina.</li> </ul>
<b>Grupos ionizables pKa</b>	
<b>Punto de fusión</b>	128 – 132 °C
<b>Absorción UV</b>	$\lambda_{\text{máx}} = 282 \text{ nm}$

### 2.2.3.1 Farmacocinética de la tilosina

La tilosina consiste principalmente de tilosina A, aunque pueden estar presentes diferentes cantidades de desmicosina (tilosina B), macrocina (tilosina C) y relomicina (tilosina D) dependiendo de la fuente de manufactura, sin embargo la mayor parte de la actividad biológica reside en la tilosina factor A.

#### Absorción

La tilosina es usada en ganado porcino, ganado vacuno y aves de corral para el tratamiento de infecciones. En terneros, la tilosina puede ser administrada vía oral en la leche a una concentración de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$  y por vía intramuscular a una concentración dosis de  $4\text{-}10 \text{ mgkg}^{-1}$ .

La biodisponibilidad oral del fármaco depende de la sal que se utilice del mismo, para el tartrato de tilosina es de 0.35, mientras que para el fosfato el valor de la biodisponibilidad oral disminuye hasta 0.14, por lo que la principal vía de administración es la intramuscular debido a la baja biodisponibilidad oral de la misma.

La Tabla 8 muestra algunos otros parámetros farmacocinéticos de la tilosina [34].

**Tabla 8.** Parámetros farmacocinéticos de la tilosina

Parámetro	Valor
T máx	1.2 h
C máx	1.2 $\mu\text{g/mL}$
AUC (Área bajo la curva)	0.82
Volumen de distribución	0.85 L/ kg

## **Distribución**

Este fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos, y las concentraciones son aproximadamente iguales que en el plasma, o incluso mayores en algunos casos. Se concentran en la bilis y la leche. Hasta el 75% de la dosis se une a las proteínas plasmáticas, Y se unen a  $\alpha$ 1-Glicoproteínas en lugar de a la albúmina.

## **Metabolismo**

El metabolismo de la tilosina ocurre principalmente en el hígado y generalmente se lleva a cabo mediante alguna de las reacciones mencionadas a continuación [34]:

- Reducción
- O-desmetilación en el fragmento de micinosa
- N-desmetilación en el fragmento de micaminosa
- Una combinación de reducción y N-desmetilación

Mediante dichas reacciones se generan metabolitos tales como Tilosina A, Tilosina D, Tilosina C y Dihidrodesmicosina.

## **Eliminación**

La tilosina y sus metabolitos se excretan principalmente en heces y orina en la mayoría de los animales. El fármaco presenta un tiempo de vida media de 1 a 2.4 h en terneros y de 1.6 a 2.8 h en vacas.

Después de administrar la tilosina al ganado vacuno existe un periodo de espera de 14 días y en el caso del cerdo de 21 días para que el fármaco sea eliminado. La tilosina se concentra en la leche y persiste durante largo tiempo, por lo que no debería administrarse a animales en lactancia.

La tilosina no se debe administrar en gallinas de postura porque el huevo puede adquirir concentración alta del antibiótico, además de que las gallinas no se deben inyectar por vía



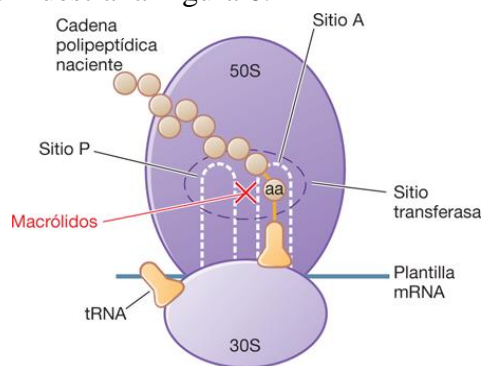
intramuscular tres días antes de su sacrificio, ni 24 h si la sustancia se proporciona vía oral. Las vacas lactantes se deben retirar de la línea de ordeña durante 96 horas para evitar el consumo de leche por el humano, ya que en la leche se excreta aproximadamente 1 mg/mL de tilosina. Los cerdos no se deben sacrificar en un lapso de 21 días tras la administración del fármaco si se utiliza la vía intramuscular y de cuatro días si se utiliza la vía oral.

### 2.2.3.2 Farmacodinamia de la tilosina

El fármaco es bacteriostático, aunque a concentración elevada puede llegar a ser bactericida. El espectro antibacteriano de la tilosina es esencialmente gram-positivo y es también activo contra algunas bacterias gram-negativas, espiroquetas, algunas rickettsia y clamidia.

Principalmente se utiliza en el tratamiento de infecciones respiratorias y digestivas del ganado bovino y porcino y en cantidad sub terapéutica como promotor del crecimiento para ganado bovino [34].

La tilosina actúa al igual que todos los macrólidos mediante la unión a la subunidad ribosomal 50 S, inhibiendo la translocación de los péptidos y por lo tanto la síntesis de proteínas, tal como lo muestra la Figura 6.



**Figura 6.** Mecanismo de acción de la tilosina

Los efectos adversos no son muy comunes para la tilosina, únicamente pueden presentarse hinchazón en el lugar de la aplicación cuando es suministrada vía parenteral y en pocas ocasiones se han reportado casos de hipersensibilidad.

### **2.3 Efectos en el humano por la exposición a residuos o a bacterias resistentes**

La mayor preocupación sobre la liberación de los antibióticos en el medio ambiente está relacionada principalmente con el potencial para el desarrollo de resistencia bacteriana [35]. En México se ha reportado un uso inadecuado de antibióticos por parte de médicos veterinarios y productores, así como la dispensación inapropiada en farmacias veterinarias privadas, además del uso de antibióticos en dosis bajas como promotores de crecimiento en animales, lo cual incrementa el riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana, por lo que esta última práctica está siendo objeto de fuertes críticas y presiones legales [35].

Los productos alimenticios que provienen de animales que hayan sido tratados con antibióticos, ya sea en dosis sub terapéuticas como promotores de crecimiento, o para el tratamiento de alguna enfermedad, pueden presentar baja concentración remanente de dichos fármacos, que se incorporan a los organismos consumidores a través de la cadena alimentaria, y que por el consumo prolongado en cantidad sub terapéutica fomenta la aparición de bacterias resistentes en el hombre [36].

El desarrollo de bacterias resistentes ocurre además por el consumo continuo de antibióticos aún en baja concentración que pueden llegar al ser humano a través de los productos de ingesta diaria.

La resistencia bacteriana a los antibióticos macrólidos ocurre por alteración del receptor ribosomal lo cual dificulta la entrada del antibiótico a la célula bacteriana, siendo muy común la resistencia cruzada entre los antibióticos de este grupo. En los seres humanos se

han reportado interacciones farmacológicas relevantes entre algunos antibióticos macrólidos, estos implican la formación de complejos estables con algunas enzimas lo cual puede resultar en una disminución de las tasas de biotransformación de fármacos coadministrados [37].

Además de la aparición de cepas de microorganismos resistentes, otro de los efectos adversos que conlleva la ingesta de productos animales con residuos de fármacos es la aparición de reacciones alérgicas, existen reportes de algunos antibióticos que pueden desencadenar reacciones alérgicas o causar hipersensibilidad en personas sensibles, aún cuando son ingeridos en baja cantidad [38].

El consumo prolongado de fármacos en baja concentración, por medio de residuos de los mismos, modifica la composición de las bacterias presentes en la flora intestinal, y por consecuencia las reacciones de metabolismo que ocurren a este nivel por parte de las bacterias, generando por lo tanto, un impacto negativo en la salud humana [38].

Por todo lo anterior, actualmente existen instituciones internacionales que han establecido límites máximos de residuos de fármacos en distintas matrices de origen animal, dentro de dichas instituciones destaca la comisión del código alimentarius, la cual se encarga de proteger la salud de los consumidores, y promover la aplicación de reglas acordadas por distintas instituciones [38], nuestro país ha adoptado las medidas tomadas por los organismos internacionales para la evaluación de la calidad alimentaria de este tipo de productos.

Para residuos de los macrólidos de interés de este estudio, es decir la eritromicina, claritromicina y la tilosina se han establecido límites máximos de residuos en diversos productos de origen animal, dichos límites se resumen en la Tabla 9 [40].

**Tabla 9.** Límites máximos de residuos de macrólidos en alimentos

Fármaco	Matriz	Límite máximo de residuo (mg/kg)
<b>Eritromicina</b>	Músculo bovino	0.1
	Leche	0.05
	Huevo de gallina	0.05
<b>Claritromicina</b>	Músculo bovino	0.1
<b>Tilosina</b>	Músculo bovino	0.2
	Leche	0.2
	Huevo de gallina	0.05

#### **2.4 Evaluación de la calidad alimentaria**

Dada la problemática que representa la presencia de residuos de contaminantes en productos alimenticios, es necesario el desarrollo de métodos que permitan la evaluación y el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos, para lo que se debe determinar el nivel de sustancias específicas que pueden estar presentes en dichas matrices. Para llevar a cabo esta determinación se deben desarrollar métodos analíticos que sean capaces de detectar este tipo de sustancias en concentraciones del orden de mg/kg o  $\mu\text{g/kg}$  en matrices de alta complejidad.

Para realizar la determinación de residuos es necesario llevar a cabo un proceso de extracción cuantitativa del analito, así como llevar a cabo la purificación del mismo antes de proceder a su detección y cuantificación.

Para la selección adecuada de un método analítico se deben considerar todas las etapas implicadas. Dentro de las cuales se encuentra la purificación, que tiene como principal objetivo la eliminación de interferencias, así como la pre-concentración del analito, entre los métodos más utilizados para este fin, se encuentra la extracción en fase sólida, la cual se describe en el apartado siguiente.

## 2.5 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) por sus siglas en inglés, es una de las técnicas más atractivas para llevar a cabo el proceso de purificación y pre-concentración de muestras provenientes de matrices complejas, tal es el caso de las muestras alimenticias. Básicamente, esta técnica consiste en hacer pasar una muestra líquida por un cartucho que contiene un material adsorbente que extrae al analito de interés, eliminando así los interferentes y pre concentrando la molécula que se desea analizar. Esta técnica presenta como principales ventajas la disminución en el tiempo de análisis así como en la cantidad de solvente utilizado durante el proceso.

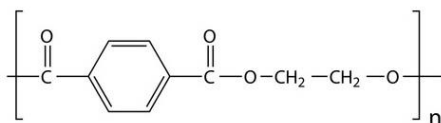
En SPE se utilizan cartuchos generalmente de plástico, que contienen entre 100 y 500 mg de material adsorbente, el cual debe cumplir con las siguientes características [41]:

- Elevada área superficial. Mediante este parámetro se incrementa la interacción entre el adsorbato y el adsorbente.
- Adsorción reversible. Es importante que el analito sea fácilmente extraído del adsorbente una vez que se retenga en el mismo utilizando una mínima cantidad de disolvente.
- Baja lixiviación de impurezas. Las impurezas pueden interferir en el proceso de cuantificación de la molécula de estudio.

Algunos materiales poliméricos entre los que se encuentra en polietilen tereftalato (PET), cumplen con las características antes mencionadas, por lo que pueden ser empleados en la fabricación de cartuchos de extracción en fase sólida con características dependientes de la naturaleza del material polimérico, dentro de este grupo destacan los materiales molecularmente impresos, los cuales son descritos más adelante en la sección 2.7.

## 2.6 Polietilen tereftalato (PET) y su acumulación en el ambiente

Dentro de la familia de los polímeros se encuentra el polietilen tereftalato (PET), cuya estructura se muestra en la Figura 7 que es una resina que se forma mediante la combinación de etilenglicol y ácido tereftálico.



**Figura 7.** Estructura química del polietilentereftalato (PET)

Este material es uno de los más ampliamente utilizados, principalmente en la elaboración de contenedores de bebidas, actualmente su consumo mundial se estima en 200 billones de botellas anualmente a nivel mundial [42].

Algunas de las propiedades de este material, que lo posicionan como el más importante en la fabricación de contenedores, se enlistan a continuación [43]:

- Actúa como una excelente barrera contra el agua.
- Posee una elevada estabilidad mecánica.
- Puede ser termoformado en distintas formas.
- Es químicamente inerte, lo que lo hace adecuado para el empaque de alimentos.
- Es aislante eléctrico por lo que puede ser utilizado en la industria eléctrica y electrónica.

La resistencia del PET a ser degradado debido a su estabilidad química ocasiona gran cantidad de residuos y materiales de eliminación que traen consigo graves problemas ambientales. El aumento de la concientización por la contaminación ambiental en nuestro planeta es la causa principal del reciclado/reutilización de los residuos de dicho polímero [43].

Este material puede ser completamente reciclado, por lo que hoy en día, dicho proceso está enfrentando nuevos retos para encontrar un camino más sostenible y económico para este fin, el reto consiste en la obtención de procesos de optimización para incrementar su conversión a unidades monoméricas, reducir el tiempo de reacción, desarrollo de procesos utilizando alternativas amigables con el ambiente, etc.

Siendo estas prácticas importantes en la contribución a la recuperación de materias primas y la conservación de la energía. El reciclaje terciario (químico) de residuos de PET y su conversión a productos de mayor valor son de gran interés, ya que es el polímero más reciclable [44-45].

Dentro del reciclaje químico, el cual se enfoca en la modificación de la funcionalidad de los polímeros, destaca la metodología de impresión molecular, la cual permite la obtención de materiales altamente selectivos hacia un determinado analito plantilla, dicha metodología se describe en el apartado siguiente.

## **2.7 Polímeros molecularmente impresos**

La tecnología de impresión molecular ofrece la posibilidad de sintetizar materiales que sean capaces de reconocer específicamente a un analito plantilla tanto en forma como en tamaño y funcionalidad química. Esto se logra mediante la incorporación de un analito plantilla en el proceso de síntesis del material, el cual es extraído de la matriz polimérica una vez que la síntesis ha sido concluida, dando lugar a una impresión tridimensional de sí mismo en la estructura polimérica, que permite alcanzar altos niveles de selectividad en la extracción de dicho analito.

Generalmente existen interacciones intramoleculares como puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo que se dan entre la molécula plantilla y los grupos funcionales presentes en

el polímero matriz, dichas interacciones son las responsables de que tenga lugar el fenómeno de reconocimiento molecular [46].

La impresión molecular es una herramienta poderosa en la síntesis de materiales específicos para la adsorción de una molécula determinada, lo que les confiere la capacidad de ser implementados en diversas técnicas, otorgándoles características únicas, siendo estos capaces de reconocer específicamente la molécula plantilla o análogos del mismo y concentrar específicamente trazas de compuestos como pesticidas, fármacos de uso humano y animal o toxinas ambientales de matrices complejas.

Aunado al ya mencionado reconocimiento molecular hacia una plantilla específica, los polímeros molecularmente impresos (MIPs) presentan ventajas adicionales sobre otros materiales, tales como estabilidad mecánica y química, relativa facilidad y bajo coste de preparación, lo que les ha permitido su incursión en el área de adsorbentes, membranas y sensores.

Las características de este tipo de materiales han sido aprovechadas principalmente para incursionar en procesos de purificación de muestras provenientes de matrices complejas, tal es el caso de su implementación como fase estacionaria en cartuchos de extracción en fase sólida (SPE), en la cual se han enfocado una gran cantidad de esfuerzos de investigación en los últimos años. Este tipo de cartuchos molecularmente impresos han demostrado obtener mejores resultados que los cartuchos convencionales como los fabricados a partir de  $C_{18}$ , al obtener extractos más limpios, además de que su alta selectividad y estabilidad permiten realizar análisis más rápidos, permitiendo la eliminación de algunas etapas de purificación, por lo que la tecnología de impresión molecular se ha expandido hacia diferentes áreas de la química durante los años recientes y se perfila para ser muy prometedora. Sin embargo uno de los principales problemas a



los que se enfrenta su implementación en este tipo de procesos reside en la lixiviación del analito plantilla de los MIPs, el cual puede ser solucionado durante el proceso de síntesis mediante la extracción completa de la molécula objetivo de la red polimérica o utilizando un análogo de la misma durante el proceso de síntesis, por lo que el diseño adecuado de este tipo de materiales es de suma importancia para su aplicación final [47,48].

Durante el proceso de síntesis de MIPs, la polimerización ocurre colocando en un solvente porogénico todos los componentes del polímero: el monómero funcional, la molécula plantilla, el agente entrecruzante y el iniciador. Uno de los aspectos fundamentales durante esta metodología es la selección adecuada del monómero funcional, los monómeros deben ser capaces de interactuar con el analito plantilla mediante interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, e interacciones iónicas, formado un complejo de pre polimerización estable, lo cual es el aspecto clave para que se desarrolle el reconocimiento molecular de manera satisfactoria. Durante la polimerización, el monómero se posiciona espacialmente alrededor de la molécula plantilla, y esa posición es fijada mediante el proceso de entrecruzamiento. De esta manera se obtiene un polímero que presenta cavidades tridimensionales que son complementarias a la molécula plantilla. El último paso es la remoción de la plantilla, lo cual se logra lavando el material con un solvente capaz de remover dicha molécula de la red polimérica, generando así sitios de adsorción específicos que permiten que el MIP sea capaz de reconocer y adsorber selectivamente a la plantilla.

La naturaleza de los sitios de adsorción varía dependiendo de las interacciones que existan entre el monómero y la plantilla, las cuales fueron establecidas durante el proceso de formación del complejo de pre polimerización.

De acuerdo al tipo de interacciones que existan entre el polímero y la plantilla, la impresión molecular puede tomar dos enfoques: covalente y no covalente, cada uno de ellos se describe a continuación [49].

- **Enfoque no covalente:** Es la metodología más utilizada, en este tipo de impresión molecular, existen interacciones débiles tales como dipolo-dipolo, Van der Waals o puentes de hidrógeno. Su principal ventaja es la fácil elución del analito plantilla de la matriz polimérica.
- **Enfoque covalente:** Se basa en la formación de enlaces covalentes entre el monómero y la plantilla, sin embargo durante la elución es necesario romper dichos enlaces generalmente disociando la plantilla, por lo que su uso es muy limitado.

Una de las principales características de los MIPs es que son materiales altamente entrecruzados, lo que los vuelve insolubles en los solventes orgánicos comúnmente utilizados, esta característica genera complicaciones para poder caracterizar a los MIPs, sin embargo, existen algunas técnicas que pueden ser utilizadas para caracterizarlos tanto química como morfológicamente, entre las que destacan la resonancia magnética nuclear (RMN) de estado sólido, espectroscopia infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y porosimetría por inclusión de mercurio.

Los MIPs son generalmente caracterizados mediante el estudio del proceso de adsorción que experimentan con su molécula plantilla, por ejemplo, el análisis de Scatchard permite la identificación del número y tipo de sitios activos que se encuentran presentes en la superficie del adsorbente, el proceso adsorptivo puede ser también descrito mediante la isoterma de adsorción que presenta dicho sistema, los modelos más utilizados para llevar a cabo esta descripción son Langmuir y Freundlich, sin embargo comúnmente en

necesario utilizar modelos combinados para lograr un ajuste adecuado de los datos experimentales.

## **2.8 Antecedentes**

La ganadería es una de las actividades económicas más importantes de México, ya que el sector pecuario aporta aproximadamente dos quintas partes de los bienes alimentarios a nivel nacional [50], dentro de este sector se encuentra el uso de fármacos macrólidos para el tratamiento de distintas enfermedades del ganado, los cuales pueden generar residuos que llegan a estar presentes en productos alimenticios provenientes de dichos animales y representan un riesgo para el consumidor, por lo que la actividad científica se ha enfocado en el desarrollo de nuevas metodologías orientadas a la determinación cuantitativa de distintas moléculas entre las que destacan la eritromicina, claritromicina, y tilosina.

Dentro de las metodologías propuestas para el análisis de estos fármacos se encuentra la reportada por Zhou *et al.* [51] en el año 2000, quienes aplicaron electroforesis capilar de zona acoplada con detección de voltametría reductiva, para la determinación de eritromicina, espiramicina y oleandomicina, utilizando como medio buffer de fosfatos. Estudiaron el efecto de variables tales como pH, la concentración de fosfato, el voltaje aplicado y la longitud del capilar. Con los procesos optimizados tanto de separación como de detección, alcanzaron límites de detección de  $7.5 \times 10^{-8}$  M para espiramicina y de  $3.0 \times 10^{-7}$  M tanto para oleandomicina como para eritromicina. En todos los casos se utilizó pH 7.5, concentración de fosfatos 0.2 M, un capilar de 80 cm de largo y 50  $\mu$ m de diámetro y el voltaje aplicado 12.5 kV. Estos investigadores reportaron que los parámetros estudiados afectan directamente al flujo electroosmótico y por lo tanto a la separación de los analitos.

Una de las técnicas analíticas que ha destacado en la separación y análisis de este tipo de compuestos es la cromatografía de líquidos de alta resolución, diversos autores han reportado su implementación en este tipo de aplicaciones tal como Juhel *et al.* (1999) [52], quienes reportan en su trabajo el desarrollo de un método cromatográfico para la separación de tilmicosina, tilosina, espiromicina y neoespiramicina provenientes de muestras de músculo de porcino. Las muestras fueron fortificadas con 200 mL de una disolución con, 0.5 µg/mL de tilmicosina, 1 µg/mL de tilosina, y 2 µg/mL de espiramicina y neoespiramicina, posteriormente fueron tratadas mediante extracción por solventes con acetonitrilo e isooctano, y se purificaron mediante extracción en fase sólida utilizando un cartucho C<sub>18</sub>. Obtuvieron valores de recuperación de entre 42.5 y 63.5% para distintos fármacos, estos resultados los atribuyeron a que el método no es selectivo, sino aplicable para múltiples residuos. Para el análisis cromatográfico en cada uno de los analitos se utilizaron distintos gradientes de fase móvil de acetonitrilo y ácido trifluoroacético como solventes, con detector UV-Vis a 278 nm obteniendo límites de detección de 15 µg/kg para tilosina y tilmicosina, 30 µg/kg para espiramicina y de 25 µg/kg para neoespiramicina.

Recientemente se ha continuado con el uso de esta técnica, en el 2014 Dickson *et al.* [53] llevaron a cabo la determinación de macrólidos presentes en productos marinos tales como salmón, tilapia y camarón; las cuales fueron fortificadas con niveles de 5 a 50 µg/kg de fármacos totales. La extracción de los analitos de las muestras de tejidos se llevó a cabo mediante múltiples extracciones con solventes utilizando acetonitrilo, buffer de fosfatos, metanol y agua. Obtuvieron resultados de recuperación entre 60 y 90% para todas las matrices, estos resultados los atribuyeron a la nula selectividad del proceso de purificación. Optimizaron los parámetros cromatográficos para la cuantificación de los

diversos fármacos, y bajo las condiciones óptimas obtuvieron límites de detección y cuantificación de macrólidos de 0.5 y 3 µg/kg para todas las matrices.

Freitas *et al.* (2014) [54] desarrollaron un método cromatográfico para la detección simultánea de múltiples antibióticos en tejido de hígado utilizando cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) para la determinación de 39 antibióticos. Las muestras fueron fortificadas con 100 µg/kg de cada uno de los fármacos individualmente. En este estudio reportan recuperaciones entre 80 y 110% para todos los antibióticos y desviación estándar relativa menor a 22% en todos los casos. Previo a la detección, los analitos fueron extraídos de las muestras utilizando acetonitrilo, EDTA y *n*-hexano.

Uno de los trabajos más recientes es el reportado por García-Mayor (2017) [55] donde se presenta la síntesis de dos materiales molecularmente impresos utilizando espiramicina como molécula plantilla, ácido acrílico como monómero funcional, etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) como agente entrecruzante y AIBN como iniciador de polimerización, en este trabajo se detalla además la aplicación de este material como adsorbente de espiramicina, obteniendo que el fenómeno de adsorción es descrito adecuadamente por el modelo de bi-Langmuir, además se utilizó el MIP como adsorbente para SPE para el análisis de dichos fármacos de muestras de leche obteniendo porcentajes de recuperación de 91 – 99% en tres diferentes niveles de fortificación (48.3, 482.6 y 965.2 µg/Kg). Después de optimizar el proceso de extracción, el material resultó selectivo hacia el analito plantilla en presencia de cuatro fármacos macrólidos como interferentes manteniendo el nivel recuperación obtenido en los ensayos individuales, por lo que se corroboró la capacidad del material de reconocer al analito con el que fue sintetizado.

Como se observó anteriormente, una de las principales etapas implicadas en la determinación de residuos de macrólidos para lograr una adecuada cuantificación del analito es el pretratamiento de la muestra, para lo cual el método más utilizado es la extracción por solventes seguido de extracción en fase sólida (SPE) para la purificación. Dentro de este campo existen múltiples trabajos que se han enfocado en el desarrollo de nuevos materiales capaces de actuar como adsorbentes para SPE, tal es el caso de McClure y Wong (2007) [56] quienes optimizaron un método de SPE para la extracción de múltiples antibióticos (sulfonamidas, macrólidos y trimetoprima) de agua residual. Utilizaron distintos tipos de cartuchos, obteniendo mejores resultados al utilizar adsorbentes polares (resina carbowax templada (CW/TPR) y fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)), ya que éstos presentan mayor afinidad hacia los analitos de interés, el tiempo de microextracción seleccionado fue 30 min para la adsorción y 5 min para desorción a pH 7. El adsorbente no mostró selectividad hacia un analito particular sino que es aplicable para la determinación simultánea de cuatro antibióticos.

Recientemente se han aplicado los polímeros molecularmente impresos como adsorbentes en SPE, con la finalidad de aprovechar las propiedades de este tipo de materiales. La principal ventaja que ofrece el uso de los MIPs en este campo es el marcado incremento en la selectividad de las extracciones, ya que el adsorbente retiene en mucho mayor medida al analito plantilla que al resto de las moléculas presentes en las muestras, permitiendo así la extracción de extractos más limpios, lo cual facilita en gran medida la posterior cuantificación de los analitos de interés [21].

Zhang *et al.* [48] en el año 2011 sintetizaron un adsorbente basado en nanotubos de carbono y ácido metaacrílico molecularmente impreso, utilizaron azobisisobutironitrilo

(AIBN) como iniciador, etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante y eritromicina como molécula plantilla. El adsorbente molecularmente impreso mostró mayor afinidad hacia la eritromicina en comparación con roxitromicina y espiramicina, esto debido a la formación de complejos entre el polímero y la plantilla. La capacidad máxima de adsorción que presentaron fue alrededor de 70 mg/g. Además, al utilizar este adsorbente para la extracción de analitos provenientes de muestras de músculo de pollo reportaron recuperación de eritromicina de 100% utilizando una mezcla etanol:agua (80:20) como eluente. El material resultó selectivo a eritromicina en presencia de roxitromicina y espiramicina obteniendo coeficiente de selectividad de 2.90 y factor de impresión de 3.08, por lo que el material es aplicable como adsorbente para la separación de macrólidos.

Los MIPs han sido utilizados para la extracción de analitos de matrices complejas como los tejidos animales. Song *et al.* (2016) [57] sintetizaron un adsorbente molecularmente impreso utilizando ácido metaacrílico como monómero, EGDMA como entrecruzante y tilosina como molécula plantilla para la extracción simultánea de diez macrólidos de músculo bovino. Mediante este método lograron eliminar las interferencias presentadas por moléculas presentes en las muestras, tales como hormonas y residuos de otro tipo de fármacos, esto debido al reconocimiento molecular desarrollado durante el proceso de impresión. Obtuvieron resultados de recuperación entre 60 y 80% para los diez fármacos macrólidos analizados en tres distintos niveles de fortificación (1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dicha recuperación fue mayor que las reportadas para adsorbentes comerciales como C<sub>18</sub>, *N*-vinilpirrolidona-divinilbenceno (HLB) y sílica funcionalizada con ácido bencensulfónico (SCX). Determinaron que el uso de una sola molécula en la síntesis del material impreso disminuye la recuperación de las moléculas análogas a la plantilla, ya que los sitios

impresos generados no están estructurados específicamente para el reconocimiento de los fármacos análogos.

En un reporte del año 2015 por Zhou *et al.* [58] se presenta la síntesis e implementación de un polímero magnético molecularmente impreso como adsorbente para MSPE para la separación de eritromicina de muestras de productos animales. Sintetizaron un MIP a partir de óxido de hierro como soporte y ácido metaacrílico como monómero utilizando eritromicina como molécula plantilla. Identificaron dos tipos de sitios de distinta afinidad en la superficie del adsorbente obteniendo una capacidad máxima de adsorción de 94.1 mg/g para los sitios impresos. La recuperación osciló entre 73 y 89% para todas las matrices.

Otra alternativa que también ha sido utilizada para la extracción de fármacos de origen animal de distintas matrices ha sido la implementación de polímeros impresos utilizando multiplantillas, tal como lo reportan Jing *et al.* [59] en el 2010 reportaron el uso de un polímero multiimpreso para la determinación de tetraciclinas utilizando cuatro moléculas plantilla (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina) para el desarrollo de un material multi impreso capaz de reconocer selectivamente a estas cuatro moléculas presentes en langostas, miel y leche. Obtuvieron factores de impresión mayores a 7 para oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina, así como porcentajes de recuperación mayores a 80 para todos los fármacos. Estos investigadores reportaron que el uso de polímeros multi impresos mejora la selectividad y reconocimiento hacia el grupo de las tetraciclinas en comparación con aquellos polímeros que han sido impresos utilizando únicamente una molécula plantilla.

De la misma manera Feng *et al.* [60] quienes en el año 2016 utilizaron oxitetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina como moléculas plantilla, para la SPE selectiva de



tetraciclinas, de 42 muestras de leche comercialmente disponibles. Encontraron que el uso de este material como adsorbente arroja resultados comparables a los obtenidos mediante adsorbentes comerciales, por lo que la implementación del polímero impreso como parte del proceso de purificación de muestras permitió el desarrollo de un método sensible, selectivo y preciso para la determinación de tetraciclinas de productos de origen animal, obteniendo resultados de recuperación mayores al 85% para cada una de las tetraciclinas de interés. Cabe destacar que no se encontraron concentraciones de tetraciclinas mayores a las establecidas en las regulaciones internacionales para ninguna de las 42 muestras de leche.

He *et al.* [61], en el año 2015 reportan la síntesis de microesferas molecularmente impresas a partir de ácido acrílico utilizando como plantillas seis pesticidas organofosforados, en estos polímeros destaca el acoplamiento de MIPs a materiales con acceso restringido, dicha metodología les permitió obtener límites de detección de 0.0005 µg/mL. Las microesferas fueron evaluadas como adsorbente en SPE para la extracción de los seis pesticidas de miel, el uso de este tipo de materiales les permitió eliminar completamente el proceso de pre tratamiento de la muestra, la cual solamente se hizo pasar por el cartucho de SPE cargado con el polímero obteniendo recuperación mayor al 96% para todos los analitos.

Además de la presencia de macrólidos en los productos cárnicos, estos han sido reportados en derivados de origen animal, por lo que el desarrollo de métodos para su cuantificación debe considerar como matrices a este tipo de productos, tal y como lo hicieron Song *et al.* [62] en el año 2014, quienes sintetizaron un MIP y lo acoplaron a un detector electroquímico para la identificación y cuantificación de eritromicina en miel. El material fue selectivo al analito plantilla y el sensor desarrollado presentó como principal ventaja

la eliminación del pretratamiento de la muestra para la extracción y posterior cuantificación de los analitos. Obtuvieron límites de detección de  $1.9 \times 10^{-8}$  M de eritromicina. Además, este sensor fue capaz de detectar selectivamente eritromicina en productos lácteos.

## **2.9 Análisis crítico**

Tal como se aprecia en la sección anterior, la identificación de macrólidos en productos destinados a consumo humano ha sido un tema de interés, ya que se busca garantizar la calidad de los alimentos, tanto para la seguridad del consumidor como la del productor.

En la búsqueda de asegurar la calidad alimentaria, los métodos que han sido desarrollados para la determinación de este tipo de moléculas, destaca principalmente la cromatografía de líquidos de alta resolución, con distintos detectores tales como UV-Vis o espectrometría de masas [52-56], sin embargo, dada la complejidad de las matrices de origen animal, el proceso de pretratamiento de la muestra para la extracción de las moléculas de interés es uno de los puntos críticos para esta metodología, la extracción con solventes se encuentra entre las más comúnmente utilizadas para este fin. Sin embargo, presenta como principal desventaja el uso excesivo de solventes en cuanto a volumen (100-1000 mL), así como mezclas de estos, durante períodos de tiempo prolongados, lo cual representa una problemática ambiental.

Dentro del proceso de purificación, la SPE se presenta como una alternativa para disminuir la cantidad de solvente necesario para llevar a cabo la extracción [52-62]. Uno de los parámetros a tener en cuenta en esta técnica, es la escasa selectividad mostrada por los adsorbentes comerciales comúnmente utilizados, lo cual ocasiona disminución en la recuperación que se alcanza para un analito en específico, obteniéndose valores entre

40-80% lo que dificulta la posterior cuantificación de los analitos, y limita su uso a matrices donde se busque la determinación simultánea de fármacos [56].

La selectividad ha sido incrementada al utilizar polímeros molecularmente impresos y aprovechar las características de este tipo de materiales, lo cual los convierte en adsorbentes eficaces para la separación de un determinado analito en una matriz compleja; sin embargo, la determinación de un solo analito en matrices de origen animal es de menor interés comparada con la cuantificación simultánea de un grupo de moléculas con características similares, lo que podría reducir el tiempo de análisis y por lo tanto, los costos del mismo. Los polímeros impresos utilizando múltiples moléculas como plantilla o utilizando una plantilla modelo, son capaces de alcanzar esta meta [59-61], ya que favorecen el reconocimiento de un determinado grupo de analitos.

Hasta el momento, la mayor parte de los trabajos se han enfocado en la extracción y cuantificación de macrólidos de productos cárnicos, sin embargo existen pocas referencias de la implementación de MIPs en otro tipo de productos alimenticios tales como huevo o leche, los cuales son ampliamente consumidos por los seres humanos, por lo que la presencia de residuos de macrólidos en este tipo de matrices también podría representar un riesgo para la salud de los consumidores.

Debido a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se sintetizó un material molecularmente impreso a partir de polietilentereftalato (PET) utilizando tilosina, eritromicina y claritromicina como moléculas plantilla, por otro lado se llevó a cabo la optimización del proceso de extracción selectiva de fármacos macrólidos de productos de origen animal utilizando el MIP como adsorbente.

## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

El PET como soporte modificado con ácido acrílico como matriz de impresión, molecularmente impreso con tilosina, eritromicina y claritromicina como plantillas, extrae selectivamente dichos fármacos de productos de origen animal, con recuperación mayor a 80 % al utilizarlo como adsorbente para SPE.

#### **3.2 Objetivo general**

Sintetizar PET-g-AA molecularmente impreso con tilosina, eritromicina y claritromicina como plantillas, a partir de PET reciclado como soporte modificado con ácido acrílico como matriz de impresión e implementarlo como adsorbente para la extracción en fase sólida de los fármacos plantilla de productos de origen animal.

#### **3.3 Objetivos específicos**

- Caracterizar el PET grado botella que se utilizará para la síntesis mediante FTIR, DSC y TGA.
- Degradar PET grado botella mediante glicólisis.

- Injertar PET grado botella de desecho con ácido metaacrílico (AMA) en medio heterogéneo y medio homogéneo.
- Imprimir molecularmente PET-g-AA con tilosina, eritromicina y claritromicina, cada una por separado, como moléculas plantilla (monoplantilla).
- Determinar las capacidades de adsorción de cada uno de los fármacos impresos con cada uno de los fármacos de estudio (monoplantilla).
- Caracterizar el polímero impreso mediante FTIR, DSC, TGA, SEM y RMN.
- Determinar la capacidad máxima de adsorción de eritromicina, claritromicina y tilosina por el PET-g-AA mediante isotermas de adsorción.
- Evaluar la selectividad del adsorbente hacia los macrólidos en presencia de distintos antibióticos de uso pecuario.
- Implementar el MIP como adsorbente en un cartucho de extracción en fase sólida.
- Optimizar mediante un diseño de experimentos central compuesto los parámetros del proceso de extracción en fase sólida (tiempo de adsorción, volumen de muestra, pH y composición de eluente).
- Determinar los porcentajes máximos de recuperación para productos derivados de origen animal (leche, huevo, carne) mediante HPLC-UV.

## **CAPÍTULO 4**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Equipos y reactivos**

##### **4.1.1 Equipos**

- Espectrofotómetro FTIR marca Perkin Elmer modelo Spectrum one
- Espectrofotómetro UV-VIS marca GBC modelo CINTRA
- Calorímetro diferencial de barrido marca Netzsch DSC 204F1 modelo Phoenix
- Analizador térmico marca Netzsch TG 209F1 modelo Iris
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector UV-VIS
- Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6701F
- Porosímetro de inclusión de mercurio marca Quantachrome modelo PoreMaster
- Agitador hidrodinámico

##### **4.1.2 Reactivos**

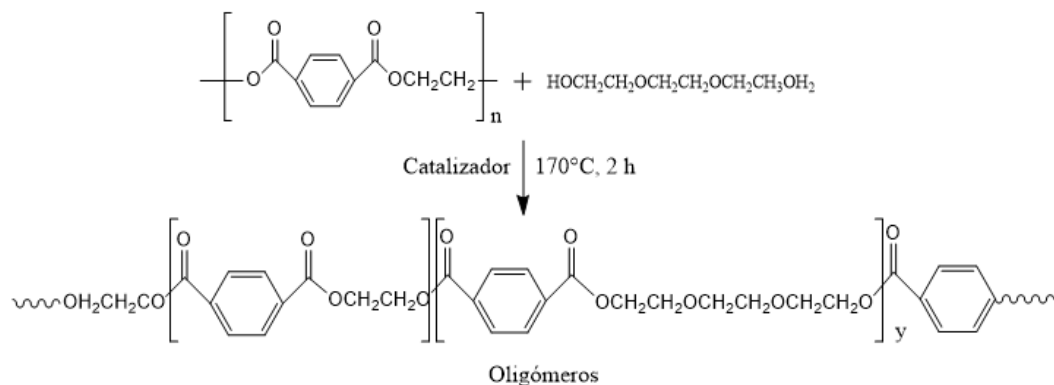
- PET reciclado (<60  $\mu\text{m}$ )
- Ácido acrílico (99% de pureza, marca Sigma Aldrich)
- Persulfato de amonio (99% de pureza, marca Merck)
- *N,N'*-metilenbisacrilamida (99% de pureza, marca Sigma Aldrich)

- Peróxido de benzoílo (% de pureza, marca Sigma Aldrich)
- Acetona (grado reactivo, marca Merck)
- Etanol (Merck)
- Hidróxido de sodio (99% de pureza, marca Merck)
- Tilosina (Estándar de referencia de farmacopea europea, 99.99% de pureza marca Sigma Aldrich)
- Eritromicina (Estándar de referencia de farmacopea europea, 99.99% de pureza marca Sigma Aldrich)
- Claritromicina (Estándar de referencia de farmacopea europea, 99.99% de pureza marca Sigma Aldrich)
- Etilenglicol (99% de pureza, marca Sigma Aldrich)
- Músculo bovino
- Leche
- Huevo de gallina

## **4.2 Parte experimental**

### **4.2.1 Degradación de PET con etilenglicol**

El proceso de degradación de PET se llevó a cabo mediante glicólisis utilizando trietilenglicol como agente nucleófilo bajo la reacción mostrada en la Figura 8.



**Figura 8.** Reacción de glicólisis de PET con trietilenglicol

Se colocaron 4 g de PET (0.02 moles) en un matraz bola de fondo plano y se añadieron 0.4 g de estearato de zinc ( $6.3 \times 10^{-3}$  moles) como catalizador, la reacción se mantuvo en reflujo a  $170^{\circ}\text{C}$ , se evaluaron distintos tiempos de degradación entre 30 y 180 min. Posterior al proceso de degradación, el material fue lavado con agua destilada y se evaluó su solubilidad en tetrahidrofurano (THF).

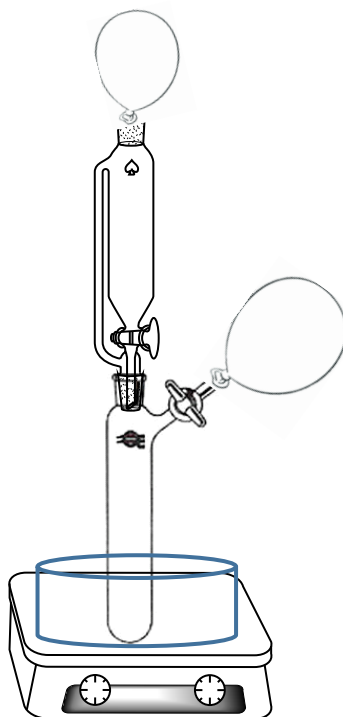
## 4.2.2 Injerto de PET con ácido acrílico

### 4.2.2.1 Medio heterogéneo

Inicialmente se lavó el PET con 30 mL de metanol manteniéndolo en agitación durante 8 h, posteriormente se secó en estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. En un tubo Schlenk se colocaron 0.6 g del PET previamente lavado y 0.5 g de iniciador (peróxido de benzofilo disuelto en 5 mL de acetona o persulfato de amonio) en 20 mL de agua, se saturó el tubo de polimerización con  $\text{N}_2$  para eliminar el oxígeno en el medio de reacción. En un embudo de adición de presión compensada se colocaron 0.6 g de ácido acrílico disueltos en 2 mL de agua.



Se ensambló el equipo mostrado en la Figura 9 y se mantuvo la mezcla en el tubo Schlenk bajo agitación magnética a 80°C en un baño de temperatura durante 10 min, posteriormente se añadió el ácido acrílico a velocidad constante y se mantuvo en agitación durante el tiempo establecido de acuerdo a las condiciones de reacción elegidas.



**Figura 9.** Esquema del equipo utilizado en la reacción de injerto

El homopolímero formado durante la reacción se separó del producto de reacción mediante extracción con 50 mL de THF a 40 °C. El polímero injertado se secó en liofilizador durante 24 h.

#### **4.2.2.2 Medio homogéneo**

Para llevar a cabo la reacción en medio homogéneo se utilizó la fracción de PET degradado que fue soluble en THF, de la cual se disolvieron 0.6 g en 20 mL de THF, dicha

solución fue colocada en un tubo Schlenk, al cual se le adicionaron 0.5 g de iniciador (peróxido de benzoílo o persulfato de amonio), posteriormente se saturó el tubo con N<sub>2</sub> para eliminar el oxígeno del medio de reacción. En un embudo de adición de presión compensada se colocaron 0.6 g de ácido acrílico disueltos en 2 mL de THF.

El procedimiento experimental de la reacción de injerto se llevó a cabo a partir de este punto de manera similar a lo establecido para la reacción en medio heterogéneo.

### **4.3 Impresión molecular de PET-g-AA con fármacos macrólidos**

#### **4.3.1. Impresión molecular por monoplantilla**

El proceso de impresión molecular tanto por monoplantilla como por multiplantilla se llevó a cabo en tres etapas: la formación de la plantilla, el entrecruzamiento y la elución del fármaco.

Para la formación de la plantilla en un tubo Schlenk se colocó 1 g del producto injertado con 30 mL de una disolución acuosa de 20 mg/L del fármaco seleccionado (eritromicina, claritromicina o tilosina) y se mantuvo en agitación durante 6 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción de entrecruzamiento se llevó a cabo mediante la adición en el tubo que contenía la plantilla de 0.05 de agente entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida y 0.1 g de persulfato de amonio como iniciador radicalico, se saturó con N<sub>2</sub> para eliminar el oxígeno del tubo de reacción y se colocó en un baño de temperatura controlada a 60 °C bajo agitación durante 2 h.

El fármaco se eluyó mediante variación de pH, colocando el polímero impreso en una disolución de hidróxido de sodio 1M, donde se mantuvo en agitación durante 8 h, posteriormente se lavó el material con metanol hasta obtener la decoloración completa del polímero, finalmente se secó en liofilizador durante 48 h.

#### **4.4 Síntesis del polímero no impreso (NMIP)**

En un tubo Schlenk se colocó 1 g del producto injertado con 30 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación durante 6 h a temperatura ambiente.

Posteriormente al tubo que contenía el producto injertado se añadieron 0.05 g de agente entrecruzante *N,N'*-metilenbisacrilamida y 0.1 g de persulfato de amonio, se saturó con N<sub>2</sub> para eliminar el oxígeno del tubo de reacción y se colocó en un baño de temperatura controlada a 60 °C bajo agitación durante 2 h.

El polímero sintetizado se colocó en 20 mL de hidróxido de sodio 1M, donde se mantuvo en agitación durante 8 h, posteriormente se lavó el material con metanol, y finalmente se secó en liofilizador durante 48 h.

#### **4.5 Caracterización**

El material fue caracterizado antes y después de llevar a cabo cada etapa de síntesis mediante las siguientes técnicas:

##### **4.5.1 Espectrofotometría de infrarrojo**

Se realizó un barrido de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> antes y después de cada modificación del polímero. Mediante esta técnica se observó la presencia o ausencia de bandas características de cada grupo funcional presente en el polímero en cada una de las etapas de síntesis.

##### **4.5.2 Microscopía electrónica de barrido**

La morfología del PET, PET-g-AA, MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cl<sub>y</sub></sub> se determinó por medio de esta técnica, con la finalidad de observar los cambios en la misma ocasionados durante cada uno de los pasos llevados a cabo para obtener el polímero impreso.

### **4.5.3 Calorimetría diferencial de barrido**

Se caracterizaron los polímeros (PET, PET-g-AA y MIP<sub>Ty</sub>) mediante DSC para determinar los cambios en la estructura de dichos polímeros. El análisis se llevó a cabo mediante el método de estimulación térmica por etapas, utilizando crisoles de aluminio con velocidad de calentamiento y enfriamiento a 10°C/min en el rango de 15 - 300°C.

### **4.5.4 Porosimetría de mercurio**

Se caracterizaron los polímeros (PET, PET-g-AA, MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub>, MIP<sub>Cly</sub>) mediante porosimetría de mercurio para determinar su área superficial, tamaño y volumen de poro. El análisis se llevó a cabo utilizando 1 g de muestras en un rango de presión de 0.1 – 2000 kg/cm<sup>2</sup>.

## **4.6 Ensayos de adsorción**

Se determinaron las capacidades de adsorción del PET, PET-g-AA, y MIP monoplantilla (MIP<sub>Ery</sub>, MIP<sub>Cly</sub>, MIP<sub>Ty</sub>) mediante ensayos tipo batch bajo las condiciones presentadas en cada uno de los apartados siguientes, cada uno de los materiales fue tamizado hasta alcanzar tamaño de partícula menor a 60 µm.

### **4.6.1 Ensayos de adsorción utilizando PET, PET-g-AA, MIP y NMIP como adsorbentes.**

Se pesó en tubos de ensayo 25 mg de adsorbente y a cada uno de los tubos se añadieron 20 mL de una disolución acuosa de 200 mg/L de fármaco por separado, se mantuvieron en agitación constante utilizando un shaker a 200 rpm durante 10 h a 25 °C, posteriormente

la solución se separó del adsorbente mediante centrifugación y se determinó la cantidad de fármaco remanente en la disolución mediante espectrofotometría UV-VIS a la longitud de onda característica de cada analito.

#### **4.6.2 Cinética de adsorción de macrólidos por el MIP**

Se determinaron los parámetros cinéticos de la adsorción mediante ensayos tipo batch. Para ello, en 12 tubos de ensayo se colocaron 25 mg de adsorbente (MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub>, MIP<sub>Clv</sub>) y 20 mL de disolución acuosa del analito plantilla correspondiente de 100 mg/L, se mantuvieron en agitación constante en un shaker a 200 rpm y 25°C. Se retiró un tubo de ensayo cada 30 minutos con tiempo máximo de 9 horas. Las muestras se diluyeron 10 veces y se cuantificó el analito remanente en la disolución mediante espectrofotometría UV-Vis.

#### **4.6.3 Isotermas de adsorción de macrólidos por el MIP**

Se llevó a cabo la determinación de las isotermas de adsorción de cada uno de los fármacos por separado, utilizando los MIPs correspondientes como adsorbentes, con tiempo de contacto de 2 h y bajo agitación a 200 rpm, colocando 25 mg de adsorbente en tubos con concentraciones iniciales de 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg/L de fármaco. Transcurrido el tiempo de contacto se cuantificó el fármaco residual presente en la solución mediante espectrofotometría UV-VIS y se calculó la capacidad de adsorción mediante la ecuación 1:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{w} \quad (1)$$

Donde:

$q_e$  = Capacidad de adsorción en el equilibrio

$C_0$ = Concentración inicial de fármaco

$C_e$ = Concentración de fármaco en el equilibrio

$V$ = Volumen de la solución (L)

$w$ = Masa de adsorbente

#### **4.6.4 Determinación de la capacidad máxima de adsorción de macrólidos por los MIPs mediante el método de contactos consecutivos.**

En tubos de ensayo se pesaron 25 mg de MIP y a cada uno de los tubos de ensayo se añadieron 10 mL de disolución 500 mg/L de fármaco, se mantuvo bajo agitación a 200 rpm durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la disolución se separó del adsorbente mediante centrifugación y se determinó la cantidad de macrólido remanente en la disolución. El adsorbente se secó en estufa a 60 °C durante 24 h y posteriormente se añadieron nuevamente 10 mL de disolución 500 mg/L de analito y se repitió el procedimiento anterior hasta alcanzar la saturación del polímero.

#### **4.6.5 Implementación de MIPs en cartuchos de extracción en fase sólida**

Se pesaron 400 mg de cada uno de los materiales de interés ( $MIP_{Ty}$ ,  $MIP_{Ery}$ ,  $MIP_{Clly}$ ), y fueron empacados en cartuchos de SPE de 3 mL con dos fritas de polietileno, los materiales fueron prensados con 2 kPa de presión. Los cartuchos preparados fueron acondicionados con 10 mL de metanol anhidro para remover cualquier posible contaminante. Luego se hizo pasar 5 mL de analito (tilosina, eritromicina o claritromicina) con cuatro distintas concentraciones (1, 2, 20 y 200 mg/L) a flujo constante de 1 mL/min. El cartucho se lavó con 10 mL de agua destilada y finalmente el analito retenido se eluyó con 10 mL de MeOH:HOAc (9:1). Las fracciones obtenidas fueron evaporadas a sequedad

y redisueltas en 10 mL de agua destilada. La cuantificación del fármaco eluído se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-VIS.

#### 4.6.6 Diseño de experimentos para el proceso de extracción en fase sólida

Para la optimización del proceso de SPE se consideraron tres distintos factores en dos niveles cada uno, los cuales se resumen en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Factores y niveles considerados en la optimización del proceso de SPE de macrólidos en disoluciones acuosas.

Factores	Niveles		
<b>Solvente de lavado</b>	Agua	Acetonitrilo	Agua:Acetonitrilo (1:1 v/v)
<b>Composición de eluente</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :Acetonitrilo (1:1 v/v)	Metanol	Metanol:Ácido acético (99:1 v/v)
<b>Volumen de eluente (mL)</b>	5	10	15

#### 4.6.7 Implementación de SPE en muestras alimenticias

El proceso optimizado para llevar a cabo la extracción en fase sólida de los tres distintos fármacos macrólidos en muestras de leche, huevo y músculo bovino obtenidas de supermercados locales, en el caso de la leche se utilizó leche entera pasteurizada contenida en envases de 1 L de una sola marca específica, el huevo adquirido fue un producto orgánico proveniente de gallinas mantenidas bajo el régimen de libre pastoreo y el músculo bovino es un producto orgánico proveniente de animales alimentados con grano orgánico, libre de pesticidas. Las muestras fueron sometidas a un proceso de tratamiento previo antes de llevar a cabo la metodología por SPE, dicho procedimiento se describe de manera detallada a continuación.

Las muestras de leche se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 min., y fueron homogeneizadas mediante agitación magnética, se tomó un volumen de 5 mL de muestra y se fortificó con la cantidad de fármaco deseada. Para permitir que alcanzara el equilibrio, las muestras fortificadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. Para la precipitación de proteínas se añadió a la muestra 4 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Acetonitrilo (3:2 v/v). Posteriormente, la solución se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y la solución sobrenadante obtenida se filtró. Posteriormente se tomaron 5 mL de las soluciones sin proteínas y fueron pasadas por el cartucho bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, las fracciones eluídas fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Vis.

Las muestras de huevo se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min, se homogenizaron del mismo modo que las muestras de leche, posteriormente se tomó una porción de 10 g, se fortificaron con las concentraciones deseadas de fármacos. Se mantuvo bajo agitación constante durante 15 min para alcanzar el equilibrio, posteriormente se tomó una porción de 1 g, se le añadió 1 mL de acetonitrilo y se agitó durante 10 min. La muestra se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante. El precipitado generado se lavó con 0.5 mL de acetonitrilo y se le añadió al sobrenadante, la muestra se evaporó hasta un volumen de 250 mL a 50°C . Posteriormente se ajustó el pH del extracto a pH 5 con una solución de ácido acético 10 mmol/L. Se tomaron 5 mL de las soluciones obtenidas y se hicieron pasar por el cartucho bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, las fracciones eluídas se analizaron mediante espectrofotometría UV-Vis.



## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Degradación de PET mediante glicólisis

Se llevó a cabo la degradación de PET con trietilenglicol como agente nucleófilo a 170°C, obteniendo los resultados que se reportan en la Tabla 11, donde se muestra el porcentaje de la masa total que fue soluble en tetrahidrofurano (THF).

**Tabla 11.** Resultados de degradación de PET

<b>Tiempo de reacción (min)</b>	<b>Fracción soluble en THF (%)</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>30</b>	<b>0</b>
<b>60</b>	<b>47</b>
<b>90</b>	<b>86</b>
<b>120</b>	<b>100</b>

Los resultados muestran que existe un aumento en la fracción soluble conforme se incrementa el tiempo de degradación, esto es debido a la disminución del tamaño de las cadenas de PET durante el transcurso de la reacción, lo que ocasiona que las cadenas más cortas puedan disolverse en el THF y por lo tanto, puedan ser utilizadas para llevar a cabo la reacción de injerto en medio homogéneo.

En 120 min de reacción, el material fue completamente soluble en THF, lo cual da indicio de que las cadenas poliméricas son muy cortas, este resultado representa una problemática para llevar a cabo la metodología de impresión molecular, ya que las cadenas poliméricas deben poseer un tamaño mayor al de las moléculas plantilla para que se pueda llevar a cabo la formación de los huecos impresos de manera satisfactoria, por lo antes mencionado se seleccionó el material obtenido a 90 min de reacción para llevar a cabo la reacción de injerto.

## 5.2 Injerto de PET con ácido acrílico

### 5.2.1 Medio heterogéneo

Se evaluaron dos distintos iniciadores radicálicos (peróxido de benzoílo (BPO) y persulfato de amonio (PSA)) para llevar a cabo la reacción de injerto de PET con ácido acrílico en medio homogéneo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

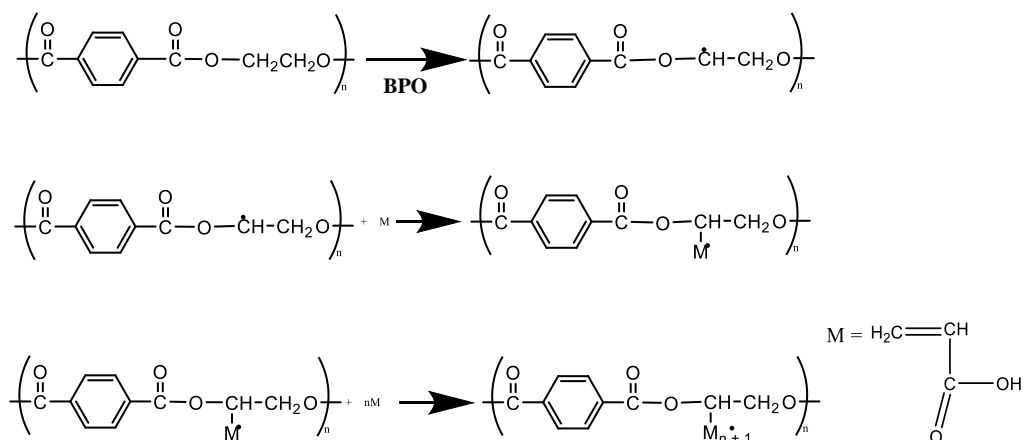
**Tabla 12.** Resultados de reacción de injerto con distintos iniciadores

Iniciador	Peróxido de benzoílo	Persulfato de amonio
% de injerto	17.6	2.03
Velocidad de adición de monómero	0.2 mL/min	0.2 mL/min
Medio de reacción	Acetona : agua	Agua
Temperatura de reacción	90°C	70°C

Los resultados evidencian que el porcentaje de injerto muestra una marcada diferencia entre los dos iniciadores utilizados. Esto puede deberse a que los iniciadores presentan distintas velocidades de disociación,  $2.0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  para el peróxido de benzoílo a 90°C y  $6.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  para el persulfato de amonio a 70°C [63]. Al ser mayor la constante de

descomposición para el persulfato de amonio, dicho iniciador generará mayor cantidad de radicales que estarán presentes en el medio, lo cual favorecerá la formación de cadenas homopoliméricas de ácido acrílico, lo que lo vuelve un iniciador no apto para el fin deseado.

De acuerdo a la literatura, [64-65] el PET puede formar en su superficie radicales primarios al entrar en contacto con un agente iniciador radicalico, dichos radicales reaccionan con el doble enlace del metileno presente en las moléculas de acrílico de acuerdo al mecanismo mostrado en la Figura 10, llevándose a cabo de esta manera la reacción de injerto.



**Figura 10.** Posible mecanismo de la reacción de injerto de PET con ácido acrílico por vía radicalica<sup>[57]</sup>

Al existir en el medio una mayor cantidad de radicales, se ve favorecida la reacción de homopolimerización, ya que algunos de ellos interaccionarán con las cadenas poliméricas de la manera descrita anteriormente, pero también existirá una mayor cantidad de radicales libres en el medio de reacción, lo que ocasiona que el monómero de ácido acrílico homopolimerice disminuyéndose así el injerto obtenido.

El mayor porcentaje de injerto obtenido fue de 17.6, se obtuvo en 2 h de reacción adicionando el monómero a 0.2 mL/min, con peróxido de benzoílo como iniciador, el polímero sintetizado bajo estas condiciones se seleccionó para continuar con el proceso de impresión molecular con los fármacos plantilla.

### 5.2.2 Medio homogéneo

Al igual que para el medio heterogéneo, para el medio homogéneo se evaluaron dos distintos iniciadores radicálicos (peróxido de benzoílo y persulfato de amonio) para llevar a cabo la reacción de injerto de PET degradado con ácido acrílico en medio homogéneo, es decir con el polímero disuelto en THF. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Resultados de reacción de injerto en medio homogéneo con distintos iniciadores

<b>Iniciador</b>	<b>Peróxido de benzoílo</b>	<b>Persulfato de amonio</b>
<b>% de injerto</b>	65.3	13.1
<b>Velocidad de adición de monómero</b>	0.2 mL/min	0.2 mL/min
<b>Medio de reacción</b>	THF	THF
<b>Temperatura de reacción</b>	90°C	70°C

La cantidad de injerto obtenido en ambos casos es mayores que el alcanzado mediante la reacción en medio heterogéneo, esto es debido a que al estar disueltos en el mismo medio, tanto el iniciador como las cadenas poliméricas, la formación de los radicales sobre la estructura del PET es más eficiente, ya que éstos no tienen que migrar del medio donde se encuentran disueltos, hacia el medio sólido en el que se encuentran en el polímero al llevar a cabo la reacción en dos fases distintas.

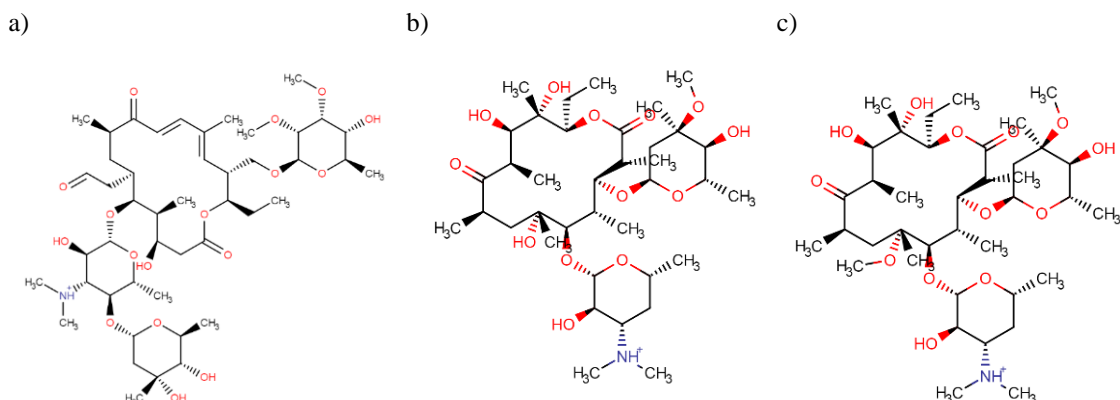
Por otro lado, los resultados muestran una tendencia similar que los alcanzados mediante medio heterogéneo, es decir, el fenómeno de la eficiencia del iniciador se mantiene aún al tener todos los reactivos en medio líquido.

El mayor injerto obtenido fue 65.3%, se obtuvo en 2 h de reacción adicionando el monómero a 0.2 mL/min, con peróxido de benzoílo como iniciador, sin embargo, al tener una mayor fracción de poliácido acrílico y dada la tendencia de los materiales acrílicos a hincharse en presencia de agua, [66] el material con 65.3 % de injerto presenta la capacidad de adsorber una gran cantidad de agua en su estructura e hincharse cuando forma parte de una red entrecruzada. Este es el caso de los polímeros de impresión molecular, por lo que no sería un material adecuado para llevar a cabo el procedimiento de impresión, ya que al hincharse el polímero, los huecos formados en la estructura tenderían a deformarse y por lo tanto se perdería el reconocimiento molecular hacia las moléculas plantilla desarrollado mediante la impresión molecular.

### **5.3 Impresión molecular de PET-g-AA con tilosina, eritromicina y claritromicina**

Para llevar a cabo la impresión molecular se seleccionó el material con 17.6% de injerto, es decir el obtenido mediante la reacción de injerto en medio heterogéneo.

Durante la formación del complejo de pre polimerización y de acuerdo a la estructura de los fármacos (pH 6.5) se infiere que existen interacciones electrostáticas entre los grupos de los fármacos cargados positivamente (Figura 11) y los grupos carboxílicos del polímero, los cuales se encuentran cargados positivamente al valor de pH de trabajo. En la Figura 11 se muestran las estructuras de cada uno de los tres macrólidos utilizados como plantilla en el pH de trabajo.



**Figura 11.** Estructura predominante de a) tilosina, b) eritromicina y c) claritromicina a pH 6.5

Además de las interacciones electrostáticas existentes entre el analito plantilla y el polímero, la presencia de grupos  $\text{OH}^-$  en la estructura de los fármacos sugiere que existen también interacciones de tipo puentes de hidrógeno, tal como lo reporta Piletsky en el año 2004 [67].

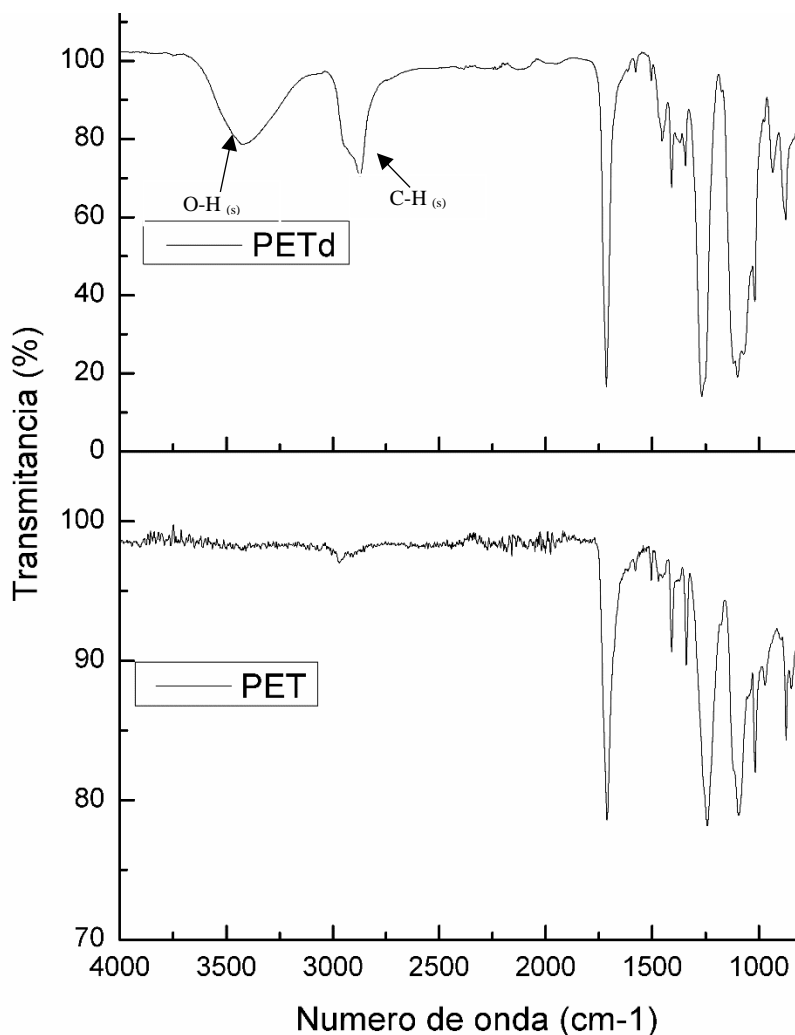
Se utilizó *N,N'*-metilenbisacrilamida como entrecruzante al 5% y bajo estas condiciones se logró eluir el 96% de la plantilla de la estructura polimérica mediante variación de pH, lo cual generó una disminución en las interacciones polímero-fármaco debido a la modificación de la estructura de la plantilla. De este modo se obtuvieron los polímeros molecularmente impresos que fueron posteriormente utilizados en los ensayos de adsorción.

#### 5.4 Caracterización

Cada uno de los materiales poliméricos utilizados en el proceso tanto de injerto como de impresión molecular fueron caracterizados mediante distintas técnicas que permitieron corroborar la obtención del producto deseado, a continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de dichas técnicas.

### 5.4.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier con reflectancia total atenuada

Mediante esta técnica se caracterizaron el PET de partida, el producto obtenido de la reacción de degradación (PET<sub>d</sub>) y el polímero molecularmente impreso, los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13.



**Figura 12.** Espectros infrarrojos del PET y PET degradado

Los espectros del PET y del PET degradado (Figura 12) resultaron muy similares, sin embargo, se observa en el PET degradado a diferencia del PET, una señal en 3500 cm<sup>-1</sup> atribuida al estiramiento O-H, lo que indica que se llevó a cabo la reacción de degradación

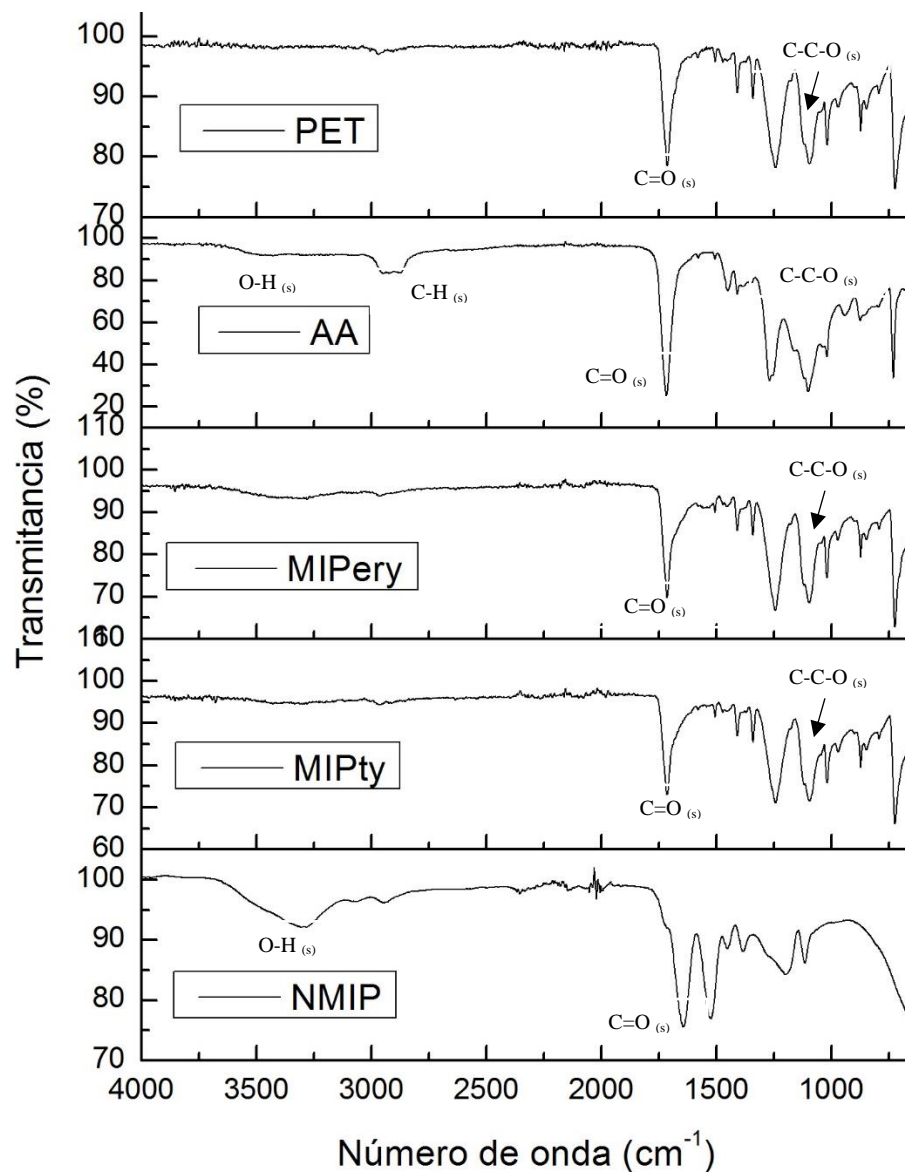
y por lo tanto la inserción en las cadenas poliméricas de grupos hidroxílicos provenientes del trietilenglicol. También se observa incremento en la intensidad de algunas señales para el polímero degradado, tal es el caso de la banda a  $2921\text{ cm}^{-1}$  atribuible al estiramiento de los enlaces C-H, que se incrementa debido a la presencia de grupos metileno aportados por el trietilenglicol. En la Tabla 14 se resumen las señales más representativas en ambos espectros.

**Tabla 14.** Vibraciones infrarrojas  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) del PET y PET degradado

Señal	Posición $\text{cm}^{-1}$
Ar C-H (w)	723
Ar C-H (s)	871
C-C-O (s)	1243
C-H (b)	1409
C=O (s)	1714
C-H (s)	2921
O-H(s)	3500

Los espectros IR obtenidos para el material después de llevar a cabo la modificación mediante la reacción de injerto e impresión molecular se muestran en la Figura 13, la aparición de la señal alrededor de  $3400\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del PET-g-AA (AA) se atribuye al estiramiento O-H típico del ácido acrílico, lo cual es indicativo de la presencia de dichas cadenas en la estructura del PET, adicionalmente se observa la presencia de las bandas correspondientes al estiramiento C-H alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , que provienen de las cadenas acrílicas que se anclaron a la estructura polimérica dando lugar a dicha banda.





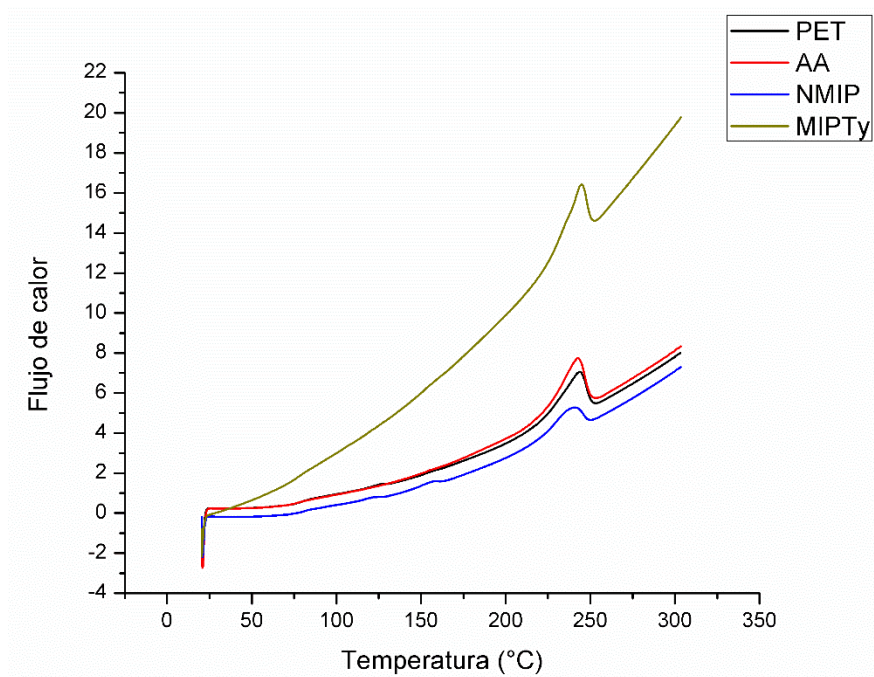
**Figura 13.** Espectros infrarrojos del PET, PET-g-AA (AA), MIP<sub>Ery</sub>, MIP<sub>Ty</sub> y NMIP

La señal correspondiente al estiramiento C-C-O entre 1000 y 1200 cm<sup>-1</sup> en el espectro del material injertado en comparación al PET, sufre un ensanchamiento, que puede ser ocasionado por la inserción de las cadenas de ácido acrílico, ya que la modificación se lleva a cabo en el carbono  $\alpha$  al oxígeno del grupo éster.

Los espectros de los materiales molecularmente impresos no presentan diferencias notables con el obtenido para el PET de partida, por lo que es necesaria la implementación de técnicas de caracterización alternativas que permitan obtener información adicional a la proporcionada por la espectroscopia de infrarrojo.

#### 5.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Esta técnica permitió identificar modificaciones estructurales que se llevaron a cabo en el PET reciclado en cada una de las etapas de síntesis, los termogramas obtenidos se presentan en la Figura 14.



**Figura 14.** Curvas de DSC para PET, PET-g-AA, MIP<sub>Ty</sub> y NMIP

En las curvas se observan cambios tanto en la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) como en la temperatura de fusión ( $T_m$ ), los cuales se generan debido a cambios estructurales en las cadenas poliméricas.

En la Tabla 15 se muestran los valores de  $T_g$  y  $T_m$  para cada uno de los polímeros, la modificación en dichos parámetros implica que existen diferencias en la energía involucrada en cada una de las transiciones térmicas, esto es derivado de las diferencias estructurales en las cadenas poliméricas, ya que al incrementarse la rigidez de las mismas será necesario aplicar mayor energía para llevar a cabo las transiciones de fase.

**Tabla 15.** Transiciones térmicas para el PET, PET-g-AA y MIP<sub>Ty</sub>

	<b>T<sub>g</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>
PET	75	244.2
PET-g-AA	75	241.7
MIP	83.3	252.1

El incremento en la temperatura de transición vítrea y la temperatura de fusión para el polímero impreso, da indicio del entrecruzamiento de las cadenas acrílicas, estas presentan mayor rigidez debido a la formación de una red polimérica, esto a su vez conlleva a la disminución del volumen libre de las cadenas poliméricas y por lo tanto, al presentar menor libertad de movimiento es necesaria una mayor cantidad de energía para alcanzar dichas transiciones, dicho fenómeno, también ocasiona que su capacidad calorífica se vea incrementada en comparación con el PET y el PET-g-AA.

A partir de los termogramas obtenidos para cada uno de los materiales se determinó la cristalinidad en los polímeros, el resultado se expresa en porcentaje de acuerdo a la ecuación 2.

Donde:

$$\% \chi_c = \frac{[(\Delta H_m - \Delta H_{cc}) / \Delta H_m^0]}{\phi_{PET}} \times 100 \quad (2)$$

$\Delta H_m$  = Entalpía de fusión

$\Delta H_{cc}$  = Entalpía de cristalización fría

$\Delta H_m^0$  = Entalpía de fusión estándar para PET 100% cristalino (140.1 J/g)

$\Phi$  PET = Fracción en peso del PET en la muestra (PET=100%, PET-g-AA = 82%,  
MIP<sub>Ty</sub>=78%)

La Tabla 16 presenta los resultados obtenidos para cada uno de los materiales, donde se aprecia el incremento en la cristalinidad en cada una de las etapas de modificación, presentando el menor valor para el PET (13.20%), al injertar el material con poliácido acrílico la cristalinidad se incrementa ligeramente hasta alcanzar 13.71%, sin embargo, ambos valores son muy cercanos, esto puede deberse a que la fracción de ácido acrílico en la estructura polimérica es menor al 20%. La cristalinidad del material molecularmente impreso fue de 32.61%, los resultados van de acuerdo con lo observado en el incremento de la temperatura de fusión, ya que la cristalinidad se incrementó con el entrecruzamiento de la molécula.

**Tabla 16.** Cristalinidad (%) de PET, PET-g-AA y MIP<sub>Ty</sub>

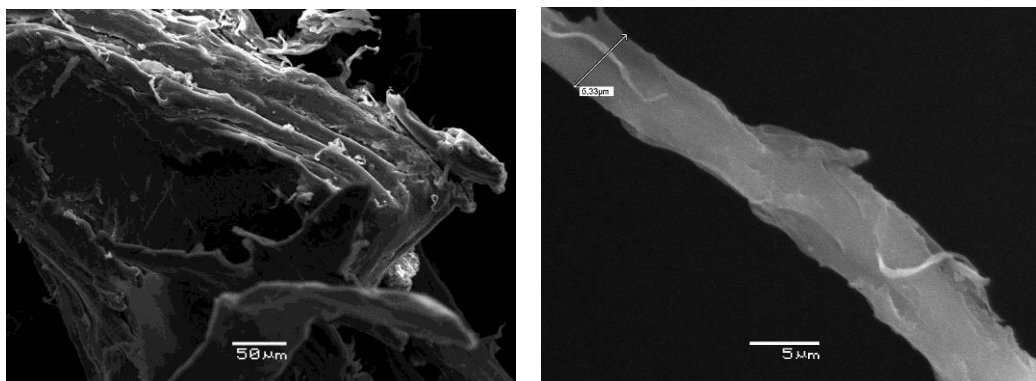
	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>cc</sub> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_m</math> (J/g)</b>	<b><math>\Delta H_{cc}</math> (J/g)</b>	<b><math>\Phi</math> PET</b>	<b>% <math>\chi_c</math></b>
<b>PET</b>	244.2	172.4	51.09	32.59	1.000	13.20
<b>PET-g-AA</b>	241.7	238.6	54.93	39.17	0.8200	13.71
<b>MIP<sub>Ty</sub></b>	252.1	237.9	55.94	15.34	0.7800	37.20

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante esta técnica y su análisis, se demuestra la obtención de los productos de interés en cada una de las etapas de reacción.

### 5.4.3 Microscopia electrónica de barrido

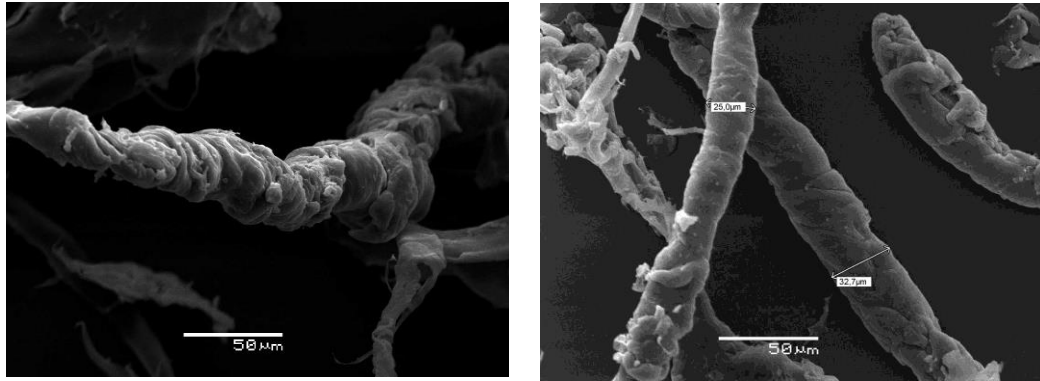
El material de partida y los materiales molecularmente impresos se caracterizaron mediante esta técnica, las micrografías obtenidas se detallan a continuación.

La Figura 15 muestra las micrografías obtenidas para el PET, en la cual se aprecia que el polímero presenta superficie laminar, homogénea con escasas irregularidades sobre su superficie, se destaca la ausencia de poros en las zonas analizadas y adicionalmente se encontraron fibras con espesor de alrededor de 5  $\mu\text{m}$ .



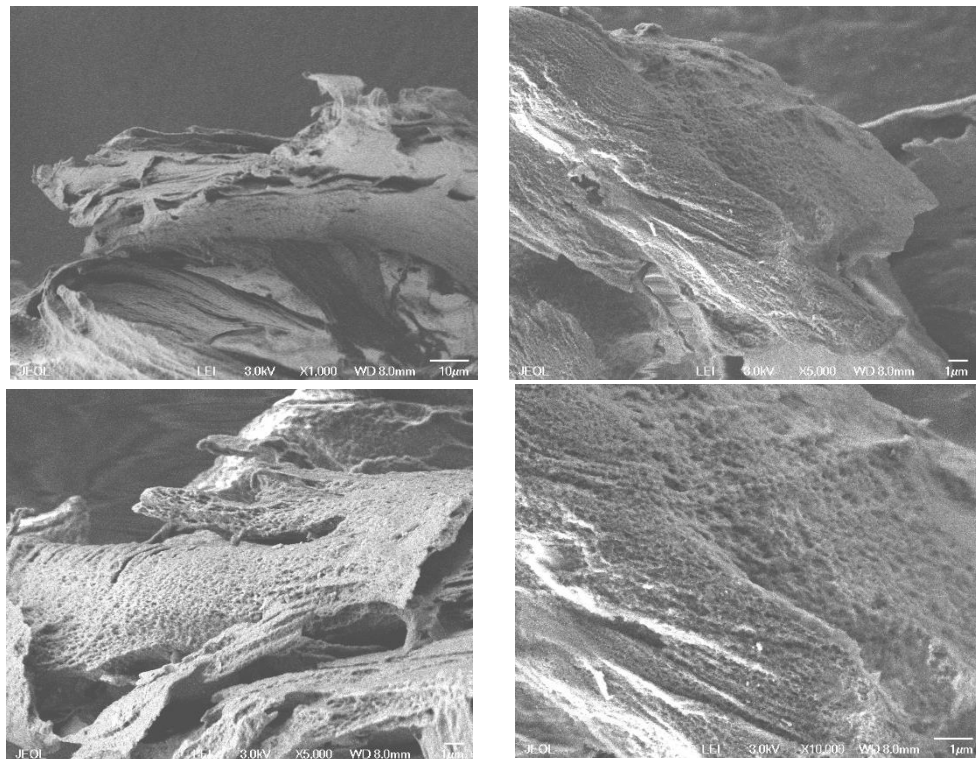
**Figura 15.** Micrografías del PET a 270 y 4 x

Las micrografías presentes en la Figura 16 corresponden al polímero injertado, en donde se pueden apreciar aglomerados de forma irregular distribuidos sobre toda la superficie, además de presentarse incremento en el diámetro de las fibras, con espesores mayores a 20  $\mu\text{m}$ , lo cual representa un incremento de 4 veces con respecto a las fibras de PET. Dichas diferencias en la morfología de ambos materiales da indicio de las modificaciones que tuvieron lugar en la estructura del polímero.



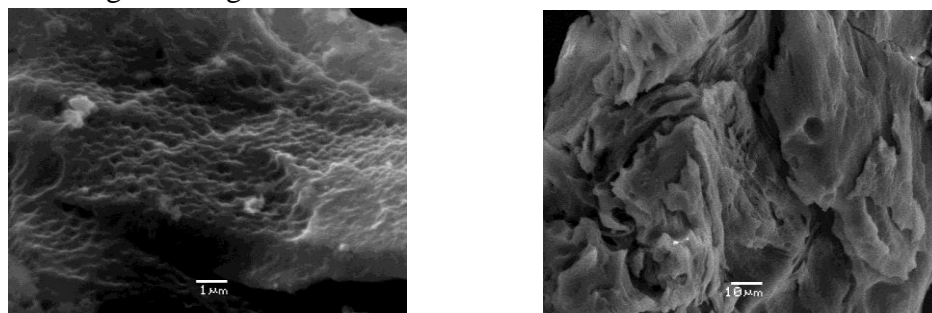
**Figura 16.** Micrografías del PET-g-AA a 500 y 1000 x

El material molecularmente impreso con tilosina, cuyas micrografías se presentan en la Figura 17, presenta morfología uniforme, observándose zonas que conservan la morfología laminar del PET, se aprecia también la presencia de poros distribuidos uniformemente sobre la superficie del material, los cuales son indicio de la modificación superficial que se llevó a cabo, ya que este tipo de morfología se observa únicamente para los materiales molecularmente impresos.



**Figura 17.** Micrografías del MIP<sub>Ty</sub> a a)1000, b), c)5000 y d)10000 x

Las micrografías del material impreso con claritromicina (Figura 18) muestran una morfología similar a la que se observó para su análogo de tilosina, la presencia de poros fue apreciable en algunas zonas de la superficie, además de presentar zonas que mantienen la morfología homogénea del PET.



**Figura 18.** Micrografías del MIP<sub>Cly</sub> 1000 y 100 x

La presencia de poros en la superficie del adsorbente favorece en gran medida al proceso de adsorción, ya que el área superficial se ve incrementada. Para corroborar esta información, los materiales fueron sometidos a análisis mediante porosimetría de mercurio para la determinación del área superficial, así como del tamaño y volumen de poro, cuyos resultados se muestran a continuación.

#### 5.4.4 Porosimetría de mercurio

Mediante esta técnica se determinó la distribución de tamaño de poro, el tamaño de poro promedio y el área superficial total del PET, MIP<sub>Ty</sub>, y NMIP. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 17.

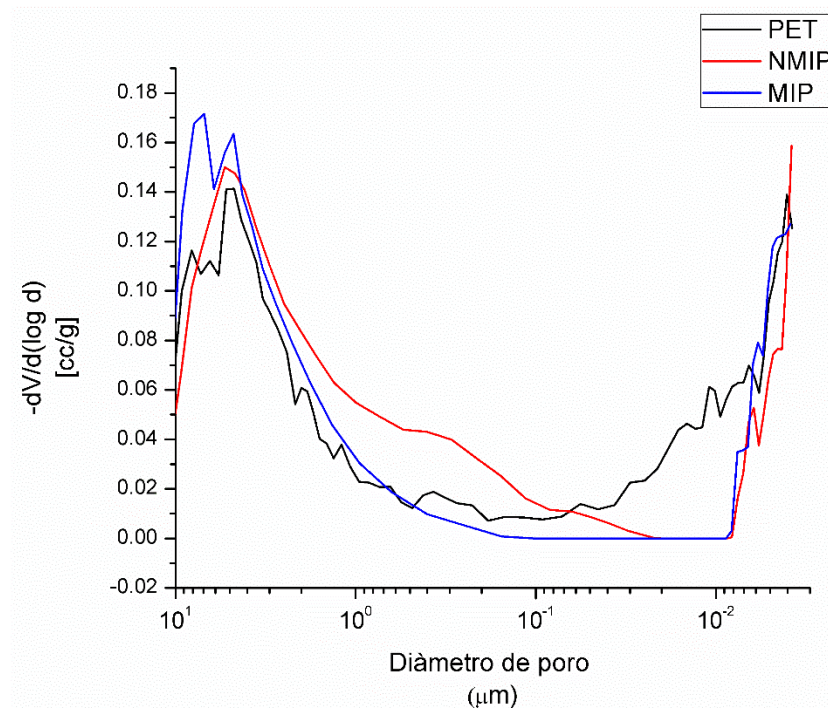
**Tabla 17.** Análisis de porosimetría de mercurio para PET, MIP<sub>Ty</sub> y NMIP.

Material	Diámetro de poro	Área superficial	% de porosidad
PET	10.65 – 0.003580 μm	33.89 m <sup>2</sup> /g	15.06
MIP	10.66 – 0.003562 μm	25.95 m <sup>2</sup> /g	16.05
NMIP	10.66 – 0.003568 μm	21.20 m <sup>2</sup> /g	17.47

Los valores obtenidos en la porosidad indican que el material molecularmente impreso presenta mayor cantidad de espacios vacíos en su superficie, es decir hay incremento del volumen de los poros presentes en el material, en comparación con el PET y el material no impreso, por lo que esta técnica sirve como apoyo para afirmar que se llevó a cabo el proceso de formación o modificación de los huecos en la superficie del material. Al observar los resultados obtenidos para el área superficial del material, es posible notar que este parámetro disminuye al llevar a cabo el proceso de impresión molecular, esto se debe a que, aunque el material presenta mayor volumen de espacios vacíos, estos corresponden a poros de mayor tamaño que los que se encontraban en la superficie del PET, esto es consistente con lo mostrado en los resultados del rango de diámetro de poros encontrado en el material, ya que prácticamente se mantiene constante para los tres materiales. Esta información indica que no todos los poros en la superficie del PET se vieron modificados, sino que aún se mantienen presentes tanto los de menor como los de mayor tamaño.

En la Figura 19 se presentan las gráficas de distribución de tamaño de poro para PET, NMIP y MIP<sub>Ty</sub>. Para el caso del PET se observa una distribución uniforme entre los poros de mayor tamaño (10 $\mu$ m) y los de menor tamaño (3E-03 $\mu$ m) y en menor medida en los poros de tamaño intermedio, se aprecian notables diferencias con los polímeros molecularmente impreso y no impreso.





**Figura 19.** Distribución de tamaño de poro para PET, NMIP y MIP<sub>Ty</sub>

En el caso del NMIP se observa mayor proporción de poros entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, a diferencia del PET, en este material no existen poros en el rango de 0.02 – 0.05  $\mu\text{m}$ , por lo que se sugiere que los menores a 0.02  $\mu\text{m}$  se modificaron e incrementaron su diámetro y por consecuencia, el área superficial del material se ve disminuida.

El material molecularmente impreso mostró comportamiento similar al NMIP, pero en este caso, en su superficie predominan los poros de mayor tamaño, es decir los que poseen diámetro de 0.2 a 10  $\mu\text{m}$ , por otra parte, se observa la ausencia de poros menores a este rango y escasa presencia de los de diámetro menor a  $2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{m}$ , lo que ocasionó al igual que en el caso del MIP, la disminución del área superficial de este material.

Mediante esta técnica se corroboró la obtención de un mayor volumen de poros en la superficie del material, lo cual es indicativo de que se llevó a cabo el proceso de impresión molecular.

## **5.5 Ensayos de adsorción**

Para evaluar el comportamiento del proceso de adsorción se realizaron distintas pruebas, la primera etapa consistió en comparar la capacidad de adsorción que presentan los distintos materiales involucrados en la síntesis de los MIPs, posteriormente se llevó a cabo la determinación de las isothermas de adsorción para cada uno de los fármacos macrólidos por el MIP correspondiente, así como la determinación de su capacidad máxima de adsorción. Los resultados obtenidos se describen detalladamente en las posteriores secciones.

### **5.5.1 Adsorción de macrólidos por distintos materiales**

Se llevaron a cabo ensayos de adsorción de tilosina utilizando como adsorbentes el PET, PET-g-AA (17.6%), PET-g-AA (65.3%), NMIP, MIP<sub>TY</sub>, MIP<sub>Ery</sub>, MIP<sub>Cly</sub>.

Se determinaron las capacidades de adsorción de cada uno de los polímeros en estudio utilizando 10 mL de disolución 200 mg/L del fármaco correspondiente y 25 miligramos de adsorbente, manteniendo así una relación adsorbente: adsorbato (10:1). El pH de las disoluciones fue de 6.5 en todos los casos. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 188.

**Tabla 18.** Capacidades de adsorción (mg/g) de macróidos para distintos adsorbentes

		Adsorbente					
		PET	PET-g-AA	NMIP	MIP <sub>Ty</sub>	MIP <sub>Ery</sub>	MIP <sub>Cly</sub>
Adsorbato	Ty	23.5	67.3	74.7	78.5	21.2	18.2
	Ery	24.8	68.9	75.0	84.9	78.9	69.4
	Cly	10.1	74.9	77.8	73.7	76.7	113

Al comparar los resultados obtenidos para el PET y el PET-g-AA en los tres fármacos, se observa el incremento de la capacidad de adsorción al insertar grupos carboxílicos en la estructura del PET, ya que estos son los responsables de llevar a cabo la interacción entre los sitios de los fármacos cargados positivamente y los sitios carboxílicos del material cargados negativamente, así como también la formación de puentes de hidrógeno entre adsorbato y adsorbente.

Los mayores valores de capacidad de adsorción para los tres fármacos se obtuvieron para los materiales impresos con tilosina, esto es debido a que este analito plantilla es el de mayor tamaño y al poseer los fármacos funcionalidades similares (los tres poseen grupos amino cargados positivamente en el pH de trabajo y grupos hidroxílicos) el material es capaz de retener a los analitos en las cavidades formadas, sin embargo, se espera que en ensayos de selectividad, es decir, en disoluciones donde se encuentren presentes los tres fármacos simultáneamente, el material sea capaz de reconocer selectivamente a su analito plantilla.

Con base a los resultados obtenidos se calcularon los coeficientes de reconocimiento ( $\alpha_r$ ), dichos valores se resumen en la Tabla 19. Los valores para los tres MIPs resultaron ser mayores a 1, lo cual indica que el proceso de impresión molecular favorece la afinidad del

material hacia el fármaco desarrollando reconocimiento molecular hacia el mismo, producto de la formación de sitios específicos complementarios a cada uno de los analitos plantilla. Los valores de coeficiente de reconocimiento cercanos a la unidad, son indicativos de que existe una proporción similar entre los sitios tanto impresos como no impresos, este fenómeno se determina mediante la realización del análisis de Scatchard.

**Tabla 19.** Coeficientes de reconocimiento para MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cl</sub> sobre sus respectivas plantillas

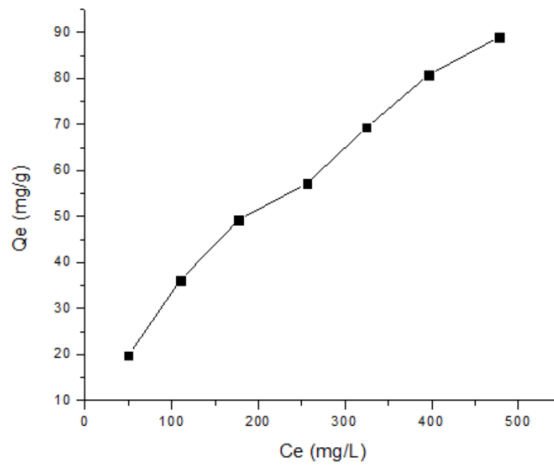
<b>Adsorbente</b>	<b><math>\alpha</math></b>
<b>MIP<sub>Ty</sub></b>	1.05
<b>MIP<sub>Ery</sub></b>	1.05
<b>MIP<sub>Cl</sub></b>	1.46

Mediante los ensayos de adsorción se corroboró que la reacción de impresión molecular de tilosina, eritromicina y claritromicina en monoplantilla se llevó a cabo de manera satisfactoria, incrementando la afinidad entre el polímero y la molécula plantilla.

## **5.5.2 Isotermas de adsorción de macrólidos por MIPs**

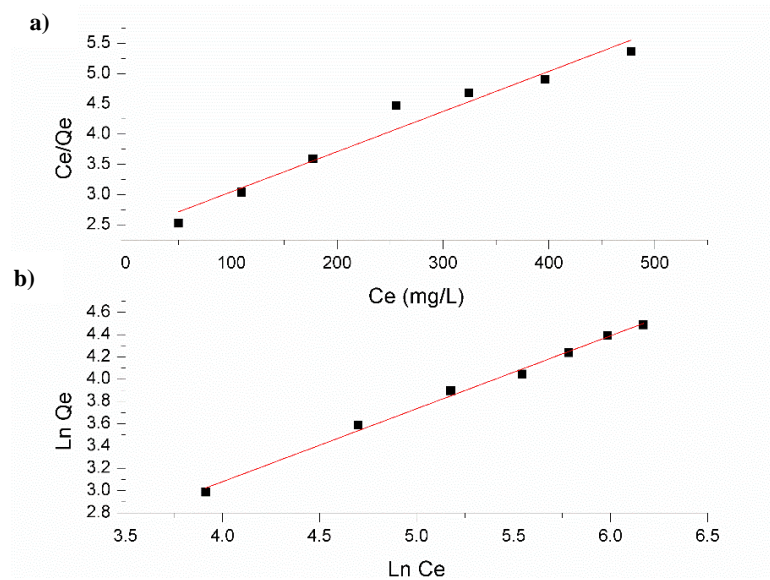
### **5.5.2.1 Isotherma de adsorción de tilosina**

Se determinó la isoterma de adsorción de tilosina por el MIP<sub>Ty</sub> a 25°C en un rango de concentraciones de 10 – 1000 mg/L, los resultados se muestran en la Figura 20, donde se aprecia la tendencia a la formación de una isoterma tipo “s” característica de procesos de adsorción por multicapas, conforme aumenta la concentración, la capacidad de adsorción se ve favorecida.



**Figura 20.** Isoterma de adsorción de tilosina por MIP<sub>Ty</sub> a 25°C

Para determinar la naturaleza del fenómeno de adsorción, los datos experimentales se ajustaron a los modelos de Langmuir y de Freundlich utilizando sus expresiones linealizadas, los gráficos obtenidos se presentan en la Figura 21.



**Figura 21.** Modelos de a) Langmuir y b) Freundlich de adsorción de tilosina por MIP<sub>Ty</sub>

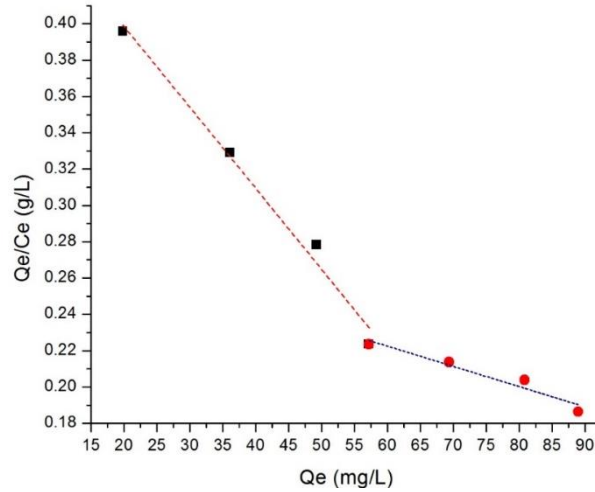
Los parámetros para cada uno de los modelos implementados se describen en la Tabla 20, de acuerdo a los coeficientes de correlación obtenidos, los datos experimentales se

describen de manera más adecuada por el modelo de Freundlich, lo cual concuerda con lo observado en la clasificación dentro de las isothermas tipo “s”, ya que el modelo de Freundlich corresponde a fenómenos de adsorción mediante la formación de multicapas, el valor calculado para el parámetro “n” que corresponde al índice de heterogeneidad, muestra un sistema más heterogéneo, por lo que tiene un valor menor a la unidad, indica que entre el adsorbato y el adsorbente existen interacciones de tipo puentes de hidrógeno o electrostáticas, lo cual confirma lo que se había inferido previamente mediante la observación de la estructura tanto del polímero como del analito plantilla [68-69].

**Tabla 20.-** Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir

<b>Modelo</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Freundlich	$K_F$	1.587
	n	0.529
	$r^2$	0.994
Langmuir	$K_L$	2.784
	$Q_{m\acute{a}x}$	150.60
	$r^2$	0.952

Este modelo de adsorción involucra materiales con sitios de adsorción heterogéneos, lo cual es característico de los materiales molecularmente impresos, donde se presentan sitios tanto impresos como no impresos, dicha heterogeneidad se corroboró mediante el análisis de Scatchard que se muestra en la Figura 22, donde se observan las dos pendientes correspondientes a los sitios de alta y baja afinidad, los cuales corresponden a los sitios impresos y no impresos respectivamente.



**Figura 22.** Análisis de Scatchard de adsorción de tilosina por MIP<sub>Ty</sub>

La Tabla 21 presenta los parámetros derivados de cada una de las dos secciones de la curva de Scatchard.

**Tabla 21.** Parámetros del análisis de Scatchard de adsorción de tilosina por MIP<sub>Ty</sub>

<b>Kd<sub>1</sub> x 10<sup>-4</sup> (mol/L)</b>	<b>Q<sub>máx 1</sub> (mmoles/g)</b>	<b>Kd<sub>2</sub> x 10<sup>-4</sup> (mol/L)</b>	<b>Q<sub>máx 2</sub> (mmoles /g)</b>
4.65	0.227	25.6	0.588

Los sitios de alta afinidad correspondientes a la recta de Scatchard con mayor pendiente, se definen por tener una constante de disociación ocho veces mayor a los que muestran baja afinidad, sin embargo, el número de sitios impresos es menor al de sitios no impresos, esto se denota en los valores de Q<sub>máx</sub> obtenidos para cada una de las zonas.

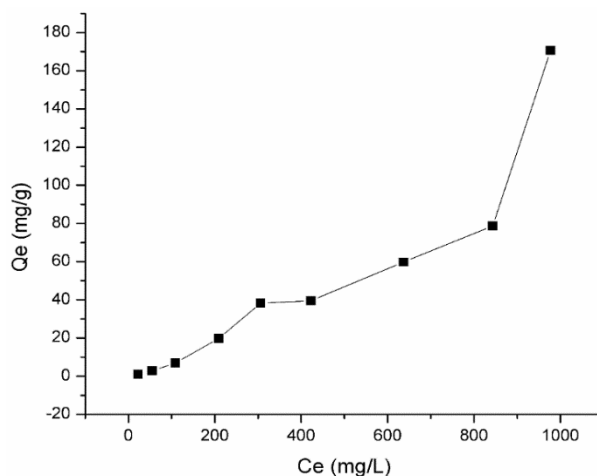
Los resultados son característicos de los MIPs, ya que a bajas concentraciones, la relación entre los sitios de enlace y el analito es muy grande, el analito interacciona principalmente con los sitios de alta afinidad en la región de sub-saturación del polímero, es decir, la primera parte del gráfico. A altas concentraciones, los sitios de alta afinidad se ven

saturados con el analito, por lo que predomina la interacción con los sitios de baja afinidad alcanzando así la región de saturación de la isoterma [70-71].

### 5.5.2.2 Isotherma de adsorción de eritromicina

La isoterma de adsorción para eritromicina fue determinada bajo las mismas condiciones descritas en el caso de la tilosina, es decir en un rango de 10 – 1000 mg/L a 25°C durante 24 h de contacto utilizando MIP<sub>Ery</sub> como adsorbente.

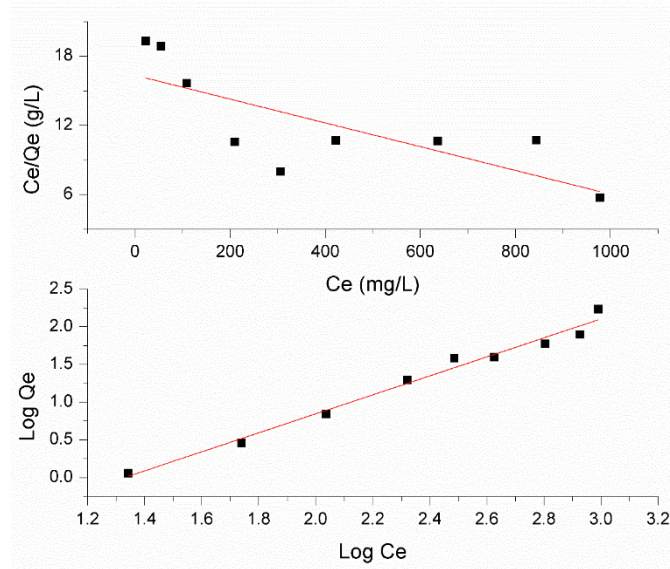
Los resultados que se muestran en la Figura 23, denotan la presencia de una isoterma tipo “s” lo cual es similar con lo encontrado en la adsorción de tilosina, generalmente los procesos de adsorción observados en los MIPs muestran este tipo de comportamiento debido a la heterogeneidad de los sitios activos que presentan en su estructura, es decir los sitios impresos y no impresos [71].



**Figura 23.** Isotherma de adsorción de eritromicina por MIP<sub>Ery</sub> a 25°C

Los datos experimentales se ajustaron a los modelos de Freundlich y Langmuir con la finalidad de describir con mayor detalle el proceso de adsorción, los resultados se presentan en la Figura 24.





**Figura 24.** Modelos de a) Lagmuir y b) Freundlich de adsorción de eritromicina por MIP<sub>Ery</sub>

Los datos presentan mayor correlación por el modelo de Freundlich, característico de adsorbentes con sitios heterogéneos, en los cuales se ve favorecido el proceso de adsorción cooperativa en multicapas, el comportamiento del adsorbente es similar al que presentó el polímero impreso con tilosina dada la naturaleza similar de ambos analitos, sin embargo se observa que el modelo de Langmuir no es capaz de describir de manera adecuada los valores obtenidos experimentalmente, en la Tabla 22 se resumen los parámetros correspondientes a ambos modelos.

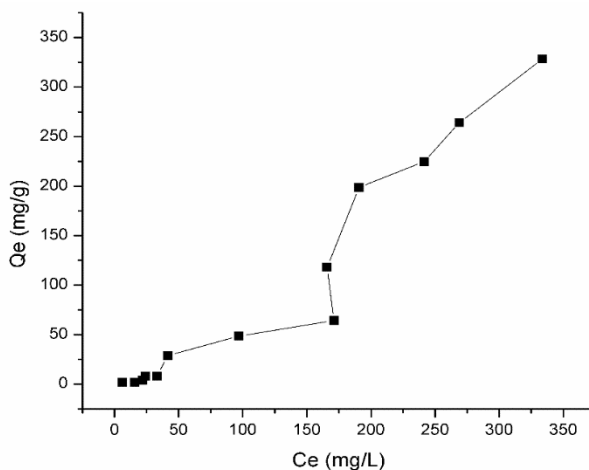
**Tabla 22.-** Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir

Modelo	Parámetro	Valor
Freundlich	$K_F$	0.021
	n	0.813
	$r^2$	0.981
Langmuir	$K_L$	$6.31 \times 10^{-4}$
	$Q_{m\acute{a}x}$	97.0
	$r^2$	0.531

El valor de “n” obtenido para el modelo de Freundlich, es menor a la unidad, lo cual indica la presencia de interacciones entre el adsorbato y el adsorbente, que pueden corresponder a puentes de hidrógeno, ya que en la estructura de la eritromicina se encuentran presentes grupos hidroxilo que pueden formar este tipo de enlaces con el polímero [68-69].

### 5.5.2.3 Isoterma de adsorción de claritromicina

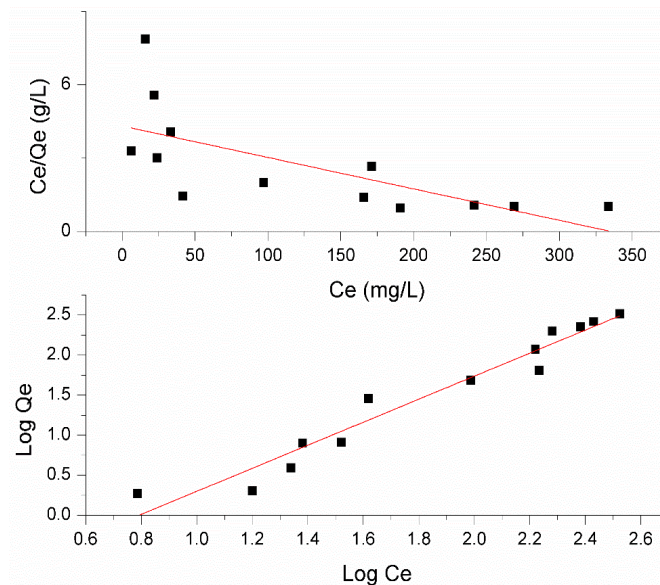
La isoterma de adsorción para la claritromicina utilizando MIP<sub>Cl<sub>y</sub></sub> como adsorbente se obtuvo bajo las mismas condiciones definidas anteriormente para tilosina y eritromicina. Los resultados obtenidos que se presentan en la Figura 25, muestran el comportamiento característico de los fenómenos de adsorción por MIPs, es decir isothermas tipo “s” atribuidbles a la formación de multicapas de adsorbato en la superficie del adsorbente, el material muestra un comportamiento similar al obtenido para MIP<sub>Ty</sub> y MIR<sub>Ery</sub> con sus respectivas plantillas.



**Figura 25.** Isoterma de adsorción de claritromicina por MIP<sub>Cl<sub>y</sub></sub> a 25°C

Los datos experimentales se ajustaron a los modelos de Freundlich y de Langmuir (Figura 26), obteniendo mejor ajuste con el de Freundlich, que es consistente con las isothermas

tipo “s” ya que ambos corresponden a fenómenos de adsorción por multicapas, los parámetros para dicho modelo se muestran en la Tabla 23, donde se observa que el valor de “n” es menor a la unidad, lo cual corresponde a interacciones de tipo electrostáticas o puentes de hidrógeno entre el adsorbato y el adsorbente.



**Figura 26.** Modelos de a) Langmuir y b) Freundlich de adsorción de claritromicina por MIP<sub>C17</sub>

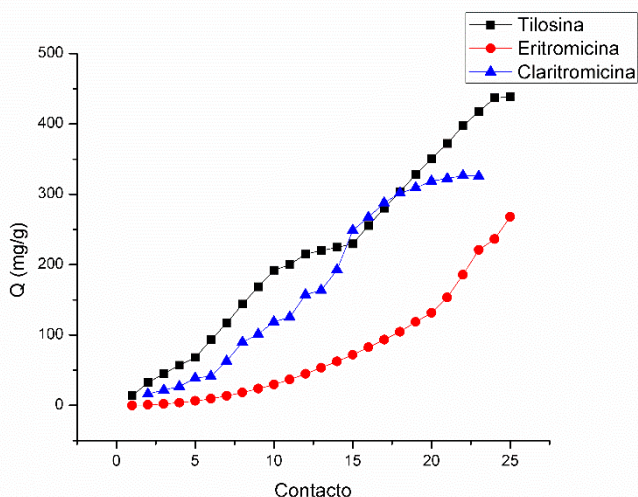
**Tabla 23.-** Parámetros de adsorción de los modelos de Freundlich y Langmuir

Modelo	Parámetro	Valor
Freundlich	$K_F$	0.073
	n	0.695
	$r^2$	0.947
Langmuir	$K_L$	$3.00 \times 10^{-3}$
	$Q_{\text{máx}}$	77.16
	$r^2$	0.422

### 5.5.3 Determinación de las capacidades máximas de adsorción

Dado que en los tres casos los datos experimentales fueron descritos de manera adecuada por el modelo de Freundlich, fue necesario utilizar la metodología de contactos consecutivos para llevar a cabo la determinación de la capacidad máxima de adsorción para los tres sistemas evaluados.

En la Figura 27, se observa que en el caso de la tilosina se realizaron 26 contactos, obteniendo una  $Q_{\text{máx}}$  de 437 mg/g, lo cual lo posiciona como un material efectivo para llevar a cabo la adsorción del macrólido de disoluciones acuosas en comparación con lo reportado por diversos autores [69-71], en el caso de la eritromicina, en el contacto 25 se obtuvo una  $Q_{\text{máx}}$  de 268 mg/g posicionándolo también como un adsorbente atractivo para llevar a cabo este proceso de retención del analito plantilla, MIP<sub>Cly</sub> obtuvo un valor de  $Q_{\text{máx}}$  después de 25 contactos de 326 mg/g, valores que resultaron mayores a lo reportado por diversos autores [48, 58, 68-72].



**Figura 27.** Capacidad de adsorción del tilosina por MIP<sub>Ty</sub>, de eritromicina por MIP<sub>Ery</sub> y de claritromicina por MIP<sub>Cly</sub>.

La tendencia observada para los tres materiales materiales es distinta, el material impreso con tilosina tiende a adsorber más rápidamente a su analito plantilla, ya que en el contacto 18 la capacidad es comparable con la máxima obtenida para la eritromicina y en el contacto 20, su capacidad es similar a la máxima obtenida para claritromicina. Estos datos confirman lo que se observó mediante el ajuste a los modelos de Freundlich y Langmuir donde se detectan notables diferencias entre la adsorción de los tres macrólidos.

Los valores obtenidos para los tres sistemas se compararon con los reportados por distintos autores [48, 58, 72-76] para diversos adsorbentes, dicha comparación se muestra en la Tabla 24. En los resultados de capacidad de adsorción se observa que tanto  $MIP_{Ty}$  como  $MIP_{Ery}$  y  $MIP_{Cly}$  se posicionan con valores mayores a los obtenidos en distintos estudios utilizando las mismas plantillas, lo que los vuelve adsorbentes bastante atractivos para este tipo de sistemas, además de poseer la ventaja de provenir de materiales de desecho que se pueden reinsertar en la cadena de consumo dándoles un valor agregado.

**Tabla 24.** - Capacidad máxima de adsorción de macrólidos para distintos adsorbentes

<b>Autor</b>	<b>Adsorbente</b>	<b>Analito</b>	<b><math>Q_{m\acute{a}x}</math> (mg/g)</b>
Zhang <sup>[48]</sup>	$MIP_{Ery}$ Monómero = Ácido acrílico	Ery	70
Zhou <sup>[58]</sup>	$MIP_{Ery}$ Monómero = Ácido acrílico	Ery	94.1
Zhu <sup>[72]</sup>	$MIP_{Ery}$ Monómero = Ácido acrílico	Ery	47.4
Luo <sup>[73]</sup>	Quitósán/celulosa	Ty	59.3
Guo <sup>[74]</sup>	PVC	Ty	3.33
Guo <sup>[75]</sup>	Black carbon	Ty	119
Song <sup>[76]</sup>	$MIP_{Tul}$ Monómero = Ácido acrílico Plantilla = Tulatromicina	Cly	34.2
Zhou <sup>[58]</sup>	$MIP_{Ery}$ Monómero = Ácido acrílico	Cly	55.2

## **5.6 Implementación de MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cl<sub>y</sub></sub> como adsorbentes en SPE**

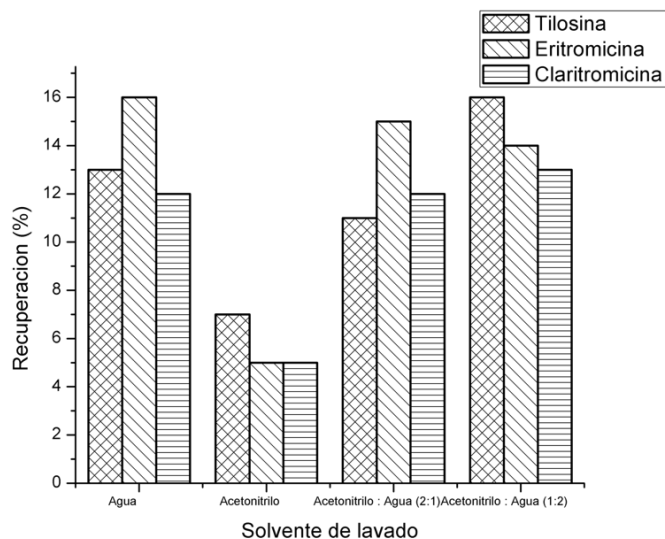
Después de evaluar la capacidad de adsorción de los MIPs sintetizados, se estudió la aplicación de los mismos como adsorbentes para extracción en fase sólida. Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología convencional de SPE, es decir se realizaron las etapas de acondicionamiento, carga, lavado y elución de los analitos.

Se llevaron a cabo una serie de experimentos con la finalidad de obtener los mejores porcentajes de recuperación, los parámetros que se evaluaron fueron la composición y el volumen de las soluciones de lavado y elución.

Para la fabricación de los cartuchos se empaquetaron 400 mg de cada uno de los MIPs para ser utilizados en un método off-line.

Para obtener una extracción adecuada, primeramente se llevó a cabo la etapa de acondicionamiento de los cartuchos, para la cual se hicieron pasar 10 mL de metanol anhidro. Posteriormente se hicieron pasar 5 mL de analito (tilosina, eritromicina o claritromicina) con cuatro distintas concentraciones (1, 2, 20 y 200 mg/L) a flujo constante de 1 mL/min.

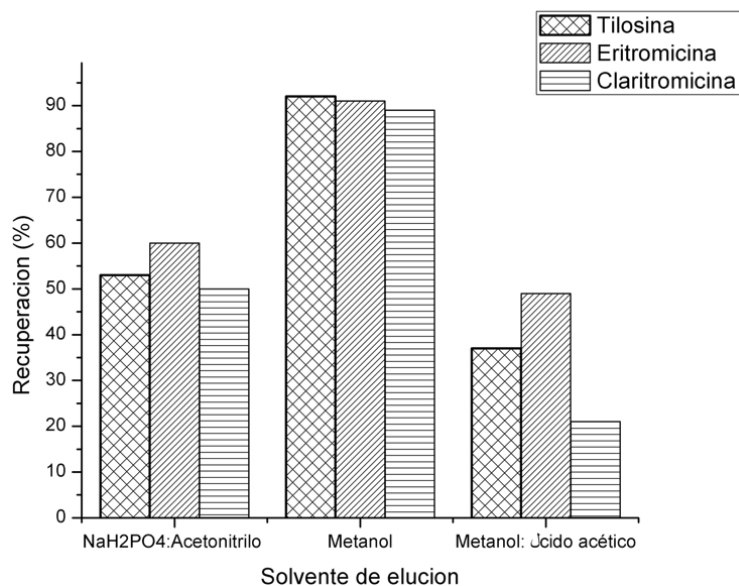
Como tercera etapa se evaluó el solvente utilizado para el lavado, es decir para minimizar las interacciones no específicas presentes en el cartucho, para esto se probaron tres distintos solventes: agua, acetonitrilo y una solución agua:acetonitrilo (1:1 v/v) utilizando 10 mL como volumen de solvente de lavado. En este punto se determinó la cantidad de analito que fue eluída en el proceso de lavado, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28.



**Figura 28.** Recuperación de macrólidos con distintos solventes de lavado

Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar acetonitrilo como solvente de lavado, al hacer pasar a través del cartucho la solución de cada uno de los fármacos, ya que bajo esta condición únicamente se eluyó entre el 5 y 7% del analito, es importante mencionar que durante esta etapa lo que se busca es que la elución sea la mínima posible, es decir lograr eliminar los interferentes de matriz pero retener al analito deseado. Teniendo en cuenta lo anterior, el acetonitrilo fue seleccionado como solvente de lavado, ya que permite maximizar las interacciones específicas y al mismo tiempo destruir las no específicas ayudando a eliminar posibles interferencias de matriz.

La etapa determinante de la eficiencia del proceso de SPE es la elución, para lo cual para la evaluación se utilizaron 10 mL de cada uno de tres distintos solventes, los cuales fueron seleccionados mediante un análisis de la literatura existente: una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : acetonitrilo (1:1 v/v), metanol, y una disolución de metanol:ácido acético (99:1 v/v), los resultados de la recuperación obtenida para cada uno de ellos se muestran en la Figura 29.



**Figura 28.** Recuperación de macrólidos con distintos solventes de elución

El mejor solvente fue el metanol, con el cual se alcanzaron valores de recuperación de alrededor del 93% para los tres macrólidos, esto coincide con lo utilizado durante el método de síntesis empleado, ya que este mismo solvente fue el utilizado para eluir la molécula plantilla de la matriz polimérica durante la metodología de impresión molecular, por lo que los resultados confirman la eficiencia del metanol durante el proceso tanto de síntesis como de extracción en fase sólida, la polaridad de este solvente fue suficiente para eliminar tanto las interacciones electrostáticas como los puentes de hidrógeno que se establecieron entre el analito y el polímero.

Una vez seleccionado el solvente de elución, se evaluaron volúmenes de dicho solvente entre 5 y 15 mL, siendo el mejor resultando con 10 mL, en donde se obtuvo alrededor del 99% de recuperación para los tres analitos, por encima de este volumen el proceso de elución no se ve favorecido, por lo que se decidió utilizar 10 mL para el proceso de SPE. Durante la aplicación de este tipo de materiales en cartuchos de SPE, la finalidad deseada es disminuir el proceso que conlleva la limpieza de las muestras, es decir, la eliminación



de interferentes, por lo que aunque el volumen de eluente utilizado es mayor al volumen original de la muestra, los MIPs ofrecen la ventaja de eliminar los interferentes que pueden complicar la cuantificación de los analitos.

En la Tabla 25 se resumen las mejores condiciones para llevar a cabo la extracción de los analitos por SPE. En esas condiciones se evaluó la extracción de los tres analitos de disoluciones acuosas.

**Tabla 25.** Parámetros para la extracción en fase sólida de tilosina, eritromicina y claritromicina por MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cly</sub>

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Flujo</b>	1 mL /min
<b>Volumen de muestra</b>	5 mL
<b>Solvente de lavado</b>	Acetonitrilo
<b>Volumen de solución de lavado</b>	5 mL
<b>Composición de eluente</b>	Metanol
<b>Volumen de eluente</b>	10 mL

Se evaluó la recuperación de los tres analitos en cuatro distintos niveles de fortificación (1, 2, 20, 200 µg/mL) bajo las condiciones anteriormente descritas, los análisis se realizaron por triplicado, los resultados se presentan en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en medio acuoso para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes

		1 µg/mL			2 µg/mL			20 µg/mL			200 µg/mL		
		Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly
<b>Adsorbente</b>	PET	16.2	15.8	10.2	12.8	13.4	12.9	13.2	10.8	9.2	7.6	6.5	5.4
	C <sub>18</sub>	92.4	91.8	92.7	79.4	81.3	78.8	72.1	70.6	71.9	67.2	65.4	66.3
	NMIP	76.3	75.4	77.8	56.8	68.5	66.3	55.3	53.2	58.9	56.4	58.7	56.2
	MIP <sub>Ty</sub>	101	--	--	98.4	--	--	92.5	--	--	50.0	--	--
	MIP <sub>Ery</sub>	--	99.3	--	--	97.6	--	--	91.8	--	--	68.2	--
	MIP <sub>Cly</sub>	--	--	98.7	--	--	96.3	--	--	90.8	--	--	47.6

Los valores de recuperación para los materiales impresos fueron aumentando conforme disminuye la concentración del analito de interés para los tres fármacos, alcanzando valores de hasta 101% en el caso del cartucho MIP<sub>Ty</sub> para la adsorción de tilosina. Este comportamiento es muy conveniente para la aplicación que se desea utilizar los materiales sintetizados, ya que generalmente en las muestras alimenticias se van a encontrar valores dentro del rango de 0.5 – 5 mg/L [77].

En el caso de la tilosina el máximo valor obtenido fue de 101% en la concentración de 1 µg/mL, para MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cly</sub>, los valores máximos encontrados resultaron de 99.3 y 98.7% respectivamente.

Las recuperaciones obtenidas para los MIPs fueron comparadas con las presentadas por el PET grado botella, PET-g-AA (17%), NMIP y C<sub>18</sub>, resultando menores para el PET en todos los niveles de concentración, esto debido a la ausencia de grupos funcionales capaces de interactuar de manera específica con los analitos de interés.

La comparación de los materiales impresos con los cartuchos comercialmente disponibles de C<sub>18</sub>, arrojó que en concentraciones de hasta 20 µg/mL, se ve favorecida la recuperación para los cartuchos MIPs sintetizados, sin embargo en el valor de fortificación más elevado se lograron mejores resultados con el cartucho de C<sub>18</sub>.

### 5.7 Extracción de macrólidos de muestras alimenticias

Se obtuvieron resultados de SPE para los cartuchos molecularmente impresos (MIP<sub>Ty</sub>, MIP<sub>Ery</sub> y MIP<sub>Cly</sub>) para dos distintas matrices: huevo y leche en cuatro distintos niveles de fortificación (1, 2, 20 y 200 µg/mL). Los resultados obtenidos para los productos lácteos de los tres fármacos se resumen en la tabla 27.

**Tabla 27.** Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de leche para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes

	1 µg/mL			2 µg/mL			20 µg/mL			200 µg/mL		
	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly
MIP <sub>Ty</sub>	86.4	--	--	74.8	--	--	42.5	--	--	36.2	--	--
MIP <sub>Ery</sub>	--	88.3	--	--	73.1	--	--	53.1	--	--	38.7	--
MIP <sub>Cly</sub>	--	--	79.1	--	--	81.3	--	--	58.6	--	--	38.4

Los resultados muestran una tendencia similar a la observada para las disoluciones acuosas, obteniendo mayor recuperación en el nivel de fortificación más bajo (1 µg/mL). Las recuperaciones en dicho nivel fluctúan entre 79 y 86% en todos los casos. Dado que las concentraciones que se han reportado tanto en leche como en huevo en muestras de este tipo son valores menores a 100 µg/mL [77], el comportamiento del material es favorable y se sugiere que puede utilizarse como un adsorbente eficiente capaz de permitir

el desarrollo de un proceso de purificación y pre-concentración de los analitos deseados mediante la extracción en fase sólida.

En el caso de las muestras de huevo, los resultados se presentan en la tabla 28, donde se muestra que los porcentajes de recuperación siguen la misma tendencia que los observados para leche, es decir son mayores a menor nivel de fortificación, sin embargo los mayores valores alcanzados fueron de alrededor del 80%, esto debido a que durante el proceso de pre tratamiento de la muestra se obtuvo una solución de consistencia gelatinosa, lo cual puede ocasionar que al hacer pasar dicha muestra por los cartuchos se genere una obstrucción de los mismos impidiendo el paso de los analitos, sin embargo, los resultados obtenidos son favorables para que los cartuchos puedan ser utilizados en muestras con baja concentración de macrólidos.

**Tabla 28.** Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de huevo para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200  $\mu\text{g/mL}$  por distintos adsorbentes

		1 $\mu\text{g/mL}$			2 $\mu\text{g/mL}$			20 $\mu\text{g/mL}$			200 $\mu\text{g/mL}$		
		Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly
MIP <sub>Ty</sub>		77.6	--	--	80.1	--	--	39.8	--	--	28.6	--	--
MIP <sub>Ery</sub>		--	61.3	--	--	76.5	--	--	41.2	--	--	30.4	--
MIP <sub>Cly</sub>		--	--	71.4	--	--	78.3	--	--	43.0	--	--	29.7

Para las muestras de carne (tabla 29), se observa un fenómeno similar a lo presentado en las muestras tanto de leche como de huevo. La mayor recuperación fue obtenida a nivel de fortificación bajo (1 – 2  $\mu\text{g/mL}$ ), alcanzando valores alrededor del 50% de recuperación, esto debido a que no se logró extraer completamente al analito de la matriz

mediante el proceso de pretratamiento, por lo que es recomendable buscar alternativas que permitan mejorar la eficiencia de dicha metodología.

**Tabla 29.** Recuperación promedio (%) de fármacos macrólidos en muestras de carne para niveles de fortificación de 1, 2, 20 y 200 µg/mL por distintos adsorbentes

	1 µg/mL			2 µg/mL			20 µg/mL			200 µg/mL		
	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly	Ty	Ery	Cly
MIP <sub>Ty</sub>	46.8	--	--	50.4	--	--	17.6	--	--	11.2	--	--
MIP <sub>Ery</sub>	--	52.5	--	--	45.7	--	--	16.3	--	--	13.4	--
MIP <sub>Cly</sub>	--	--	49.3	--	--	36.3	--	--	18.3	--	--	11.5

## CONCLUSIONES

El análisis mediante espectroscopia de infrarrojo muestra el incremento en la intensidad de la señal de estiramiento C-H, por la presencia de los metilenos del trietilenglicol, y la presencia de la señal de O-H(s) en el espectro de infrarrojo del PET<sub>d</sub> con respecto al PET, lo cual indica que se llevó a cabo el proceso de degradación.

La reacción de injerto de PET con ácido acrílico en medio homogéneo resultó factible, gracias a la degradación parcial del PET grado botella mediante glicólisis que permitió solubilizar el material en tetrahidrofurano

El medio en que se desarrolla la reacción de injerto influye directamente sobre la propagación de los radicales libres e indirectamente sobre los porcentajes de injerto obtenidos, esto se determinó mediante la realización de las reacciones de injerto tanto en medio homogéneo como heterogéneo.

La cantidad de injerto obtenido con persulfato de amonio como iniciador resultó menor al obtenido con el peróxido de benzoílo, esto debido a que el exceso de radicales formados en el medio favorece la reacción de homopolimerización.

El análisis mediante espectroscopia de infrarrojo muestra el incremento en la intensidad de la señal de estiramiento C-H y la presencia de la señal de O-H(s) en el espectro de infrarrojo del PET<sub>d</sub> con respecto al PET, lo cual indica que se llevó a cabo el proceso de degradación.

Mediante FTIR se corroboraron los cambios en los grupos funcionales que indican que se llevaron a cabo las modificaciones en cada una de las etapas de síntesis.

El análisis por SEM presenta modificaciones en la morfología del polímero, apreciándose cambios significativos en la misma que indican que la modificación de los polímeros se llevó a cabo de manera satisfactoria.

Los análisis térmicos denotan cambios en la rigidez de las cadenas poliméricas en cada una de las etapas de síntesis, lo cual se aprecia en el desplazamiento de las transiciones térmicas y es atribuible a las modificaciones estructurales del polímero, lo que permite corroborar que se llevaron a cabo las reacciones tanto de injerto como de impresión molecular.

Los ensayos de adsorción indican que existe reconocimiento molecular de los tres materiales sintetizados hacia sus analitos plantillas, esto debido a que el coeficiente de reconocimiento en cada caso resultó mayor a 1.

El fenómeno de adsorción de macrólidos en los MIPs, se lleva a cabo mediante la formación de multicapas, esto de acuerdo a que se ajustó al modelo de Freundlich y la clasificación de las isothermas dentro del tipo “s” para los tres materiales.

Los valores de recuperación obtenidos con los materiales impresos para los tres fármacos utilizados en cartuchos SPE, están entre 99 y 101 % en el menor nivel de fortificación ( $1\mu\text{g/mL}$ ). Los valores de recuperación superan a los obtenidos con cartuchos comercialmente disponibles ( $\text{C}_{18}$ ), por lo que la implementación de los MIPs sintetizados resultó exitosa .

En la recuperación obtenida en muestras de leche para los materiales impresos hacia su respectivo analito plantilla, los valores máximos entre 80 y 90%, en el menor nivel de fortificación ( $1\mu\text{g/mL}$ ), indican la factibilidad de la implementación de los MIPS sintetizados en este tipo de aplicaciones para muestras de productos lácteos.

La extracción de macrólidos de matrices de huevo muestra un considerable efecto de matriz, por lo que es necesario desarrollar una metodología de pretratamiento que permita eliminar dicha interferencia y por consiguiente elevar la recuperación.

Los nuevos materiales molecularmente impresos presentan una capacidad de adsorción comparable con adsorbentes comerciales y algunos otros reportados por distintos autores, por lo que pueden considerarse como un adsorbente prometedor para la adsorción de fármacos de diversas matrices.



## REFERENCIAS

1. Kirst, H. (2013). Macrolide antibiotics. En F. Monelli, O. Genilloud (Eds.), *Antimicrobials* (pp. 211 - 226) Estados Unidos: Springer.
2. Gordon, R. (1998). Macrolide antibiotics. *Indian Journal of Pediatrics*, 65, pp. 1-9.
3. Peritri, P., Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A. (1993). Adverse effects of macrolide drugs. *Drugs safety*, 9, pp. 346-364.
4. Peters, B., Terry, M. (2013). Potential adverse effects of macrolides. septiembre 28, 2016, de Remedy Health Media Sitio web: [http://www.healthcommunities.com/copd/macrolides-adverse-effects\\_jhmwp.shtml](http://www.healthcommunities.com/copd/macrolides-adverse-effects_jhmwp.shtml)
5. Galvidis, I., Lapa, G., Burkin, M. (2015). Group determination of 14-membered macrolide antibiotics and azithromycin using antibodies against common epitopes. *Analytical Biochemistry*, 468, pp. 75 - 82.
6. Stubbings, G., Bigwood T. (2009). The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637(1-2), 68 – 78.
7. Frenich, G, del Aguilera-Luiz, M., Vidal, J. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661, 150 – 160.
8. Kang, J., Fan, C.-L., Chang, Q.-Y., Bu, M.-N., Zhao, Z.-Y., Wang, W., Pang, G.-F. (2014). Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. *Analytical Methods*, 6(16), 6285 – 6292.
9. Barbosa, M., Moreira, N., Ribeiro, A., Pereira, M., Silva, A. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research*, 94, 257-279.
10. Kennedy, D., McCracken, R., Cannavan, A. (1998). Use of liquid chromatography – mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*, 812, 77 – 98.
11. Tao, Y, Yu, G, Chen, D, Pan, Y, Liu, Z, Wei, H. (2012). Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent

- extraction by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 897, 64 – 71.
12. Horie, M, Saito, K, Ishii, R, Yoshida, T, Haramaki, Y. (1998). Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 812, 295 – 302.
  13. Tang, H., Ho, C, Lai, S. (2006). High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2565 – 2572.
  14. Jessick, Ashley M., "Detection, fate, and bioavailability of erythromycin in environmental matrices" (2010). Graduate Teses and Dissertations. Paper 11580.
  15. Capriotti, A., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2521–2532.
  16. Xie, W., Han, C., Hou, J., Wang, F., Qian, Y., Xi, J. (2012). Simultaneous determination of multiveterinary drug residues in pork meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 35(24), 3447–3454.
  17. Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M. (2009). Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 7977–8015.
  18. Alexander, C., Andersson, H., Andersson, L., Ansell, R., Kirsch, N., Nicholls, I., Whitcombe, M. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), 106–180.
  19. Nicholls, I., Adbo, K., Andersson, H., Andersson, P., Ankarloo, J., Hedin-Dahlström, J., Wikman, S. (2001). Can we rationally design molecularly imprinted polymers? *Analytica Chimica Acta*, 435(1), 9–18.
  20. Wang, P., Fu, X., Li, J., Luo, J., Zhao, X., Sun, M., Ye, C. (2011). Preparation of hydrophilic molecularly imprinted polymers for tetracycline antibiotics recognition. *Chinese Chemical Letters*, 22(5), 611–614.
  21. Beltran, B., Marcé, R., Cormack, P. (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1363–1375.

22. Jing, T., Gao, X.-D., Wang, P., Wang, Y., Lin, Y.-F., Hu, X.-Z., Mei, S. (2009). Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(8), 2009–2018.
23. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2017). ¿Qué es la inocuidad? Sitio web: <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/que-es-la-inocuidad-17624?idiom=es>. Consultada el 2 de Octubre de 2018.
24. Beyene, T. (2015). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7 (1), 1-7.
25. Okocha, R., Olatoye, I., Bolarinwa, O. (2018). Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Reviews*, 39 (21).
26. Hagren, V., Peippo, P. Lovgren, T. (2005). Detecting and controlling veterinary drug residues in poultry. En G. C. Mead (Ed.), *Food Safety Control in the Poultry Industry* (pp. 44 - 82) Reino Unido: S Woodhead Publishing.
27. Gentili, A. Mainero Rocca, L., Caretti, F., Bellante, S. (2016) Antibiotics and drugs: Residue determination, *Encyclopedia of Food and Health*.
28. Omura, S.. (2003). *Macrolide antibiotics*. E.U.: Academic Press.
29. Fernández, A., Ellis, R.. (2006). Erythromycin. Mayo 30, 2017, de Food and Agriculture Organization of the United Nations Sitio web: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/2-2006-erythromycin.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/2-2006-erythromycin.pdf)
30. O’Shea, R., Moser, H. (2008) Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 2871 – 2878.
31. Nakagawa, Y., Itai, S., Yoshida, T., Nagai, T. (1992) Physicochemical properties and stability in the acidic solution of new macrolide antibiotic clarithromycin in comparison with erythromycin. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 40(3), 725 – 728.
32. Yilmaz, C., Özcengiz, G. (2017). Antibiotics: pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 133, 43 – 62.
33. Reverie, J., Papich, M. (2009). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. E.U.: Wiley-Blackwell.

34. Lucas, M., Errecalde, J., Mestorino, N. (2009). Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33, 132 – 140.
35. Lewicki, J., Reeves, P., Swan, G. (2009). Tylosin. Mayo 30, 2017, de Food and Agriculture Organization of the United Nations Sitio web: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/vetdrug/docs/6-2009-tylosin.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/6-2009-tylosin.pdf)
36. Gancho, B., García, M. Simal, J., (2000) El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 3 39-47.
37. Tait-Kamradt, A., Davies, T., Applebaum, P., Depardieu, F., Courvalin, P., Petitpas, J., Wondrack, L., Walker, A., Jacobs, M., Sutcliffe, J. (2000). Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3395 – 3401.
38. Lozano, M., Arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 121 – 135.
39. Pérez-Cobas, A., Gosalbes, M., Friedrichs, A., Knetch, H., Artacho, A., Eissmann, K., Otto, W., Rojo, D., Bargrela, R., von Berger, M., Neulinger, S., Däumer, C., Heinsen, F., Latorre, A., Barbas, C., Seifert, J., dos Santos, V., Ott, S., Ferrer, M., Moya, A. (2013). Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut microbiota*, 62, 1591 – 1601.
40. Canada Government. (2017). List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods. Mayo 30, 2017, de Government of Canada Sitio web: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>
41. Vais Pug, J. (2004). Extracción en fase sólida (SPE) para el tratamiento de muestras de alimentos para análisis por cromatografía. Doctorado. Universidad Central de Venezuela.
42. International bottled water association (2014). Bottled water: sustaining vitality, U.S. and international developments and statistics. Recuperado el 10 de noviembre de 2015 de: [www.bottledwater.org](http://www.bottledwater.org)
43. Omnexus by SpecialChem (2016). Polyethylene Terephthalate (PET): A Comprehensive Review. Recuperado el 10 de noviembre de 2018 de: <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic/properties-of-pet-plastic>

44. Ikladious, N., Asaad, J., Emira, H., Mansour, S. (2017). Alkyl resins base don hyperbranched polyesters and PET waste for coating application. *Progress in Organic Coatings*, 102, 217- 224.
45. Jamdar, V., Kathalewar, M., Dubey, K., Sabnis, A. (2017). Recycling of PET wastes using electron beam radiations and preparation of polyurethane usind recycled material. *Progress in Organic Coatings*, 107, 54 – 63.
46. Vasapollo, G. Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi M., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908 – 5945.
47. Spéigel, P., Schweitz, L., Nilsson, S. (2002). Molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 37 – 38.
48. Zhang, Z., Yang, X., Zhang, H., Zhang, M., Luo, L., Hu, Y., & Yao, S. (2011). Novel molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nanotubes with binary functional monomer for the solid-phase extraction of erythromycin from chicken muscle. *Journal of chromatography B*, 879(19), 1617–1624.
49. Speltini, A., Scalabrini, A., Maraschi, F., Sturini, M., Profumo, A. (2017). Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. *Analytica Chimica Acta*, 974, 1 – 26.
50. Sistema de información agroalimentaria de consulta. (2013). Una mirada al panorama agroalimentario de México y el mundo. septiembre 28, 2016, de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Sitio web: <http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/019-e.html>
51. Zhou, J., Chen, Y., Cassidy, R. (2000). Separation and determination of the macrolide antibiotics (erythromycin, spiramycin and oleandomycin) by capillary electrophoresis coupled with fast reductive voltammetric detection. *Electrophoresis*, 21(7), 1349–1353.
52. Juhel, M., Anger, B., Laurentie, M. (1999). Multiresidue Chromatographic Method for the Determination of Macrolide Residues in Muscle by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Journal of AOAC International*, 82(5), 1046–053.
53. Dickson, L. (2014). Performance characterization of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for 12 macrolide and lincosamide antibiotics in salmon, shrimp and tilapia. *Journal of Chromatography B*, 967, 203–210.

54. Freitas, A., Barbosa, J., & Ramos, F. (2014). Multidetecion of antibiotics in liver tissue by ultra-high-pressure-liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B*, 976-977, 49–54.
55. García-Mayor, M., Paniagua, G., Garcinuño, R., Hernández, P., Durand, J. (2017) *Food Chemistry*, 221, 721 – 728.
56. McClure, E., & Wong, C. (2007). Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1169(1-2), 53–62.
57. Song, X., Zhou, T., Liu, Q., Zhang, M., Chenying, M., Li, J., & He, L. (2016). Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 208, 169–176.
58. Zhou, Y., Zhou, T., Jin, H., Jing, T., Song, B., Zhou, Y., Lee, Y.-I. (2015). Rapid and selective extraction of multiple macrolide antibiotics in foodstuff samples based on magnetic molecularly imprinted polymers. *Talanta*, 137, 1–10.
59. Jing, T., Wang, Y., Dai, Q., Xia, H., Niu, J., Hao, Q., Mei, S., Zhou, Y. (2010). Preparation of mixed-templates molecularly imprinted polymers and investigation of the recognition ability for tetracycline antibiotics. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2218–2224.
60. Feng, M., Wang, G., Yang, K., Liu, H., Wang, J. (2016). Molecularly imprinted polymer-high performance liquid chromatography for the determination of tetracycline drugs in animal derived foods. *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.201604.050.
61. He, J., Song, L., Chen, S., Li, Y., Wei, H., Zhao, D., Gu, K., Zhang, S. (2015) Novel restricted acces materials combined to molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of organophosphorus pesticides from honey. *Food chemistry*, 187, 331 – 337.
62. Song, B., Zhou, Y., Jin, H., Jing, T., Zhou, T., Hao, Q., Zhou, Y., Mei, S., Lee, Y. (2014). Selective and sensitive determination of erythromycin in honey and dairy products by molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor. *Microchemical Journal*, 116, 183–190.
63. Polymer Handbook, Badrup, J., Immergut, C., Grulke, E. 4th Ed. John Wiley, New York, 1992, 142-69.
64. Ping, X., Wang M., Ge, X. (2011). Surface modification of poly(ethyleneterephtalate) (PET) film by gamma-ray induced grafting of poly(acrylic acid) and its application in antibacterial hybrid film. *Radiation Physics and Chemistry*, 180, 567-72.

65. Campbell, D., Araki, K., Turner, D. (1966). ESR study of free radicals formed by  $\gamma$  irradiation of poly(ethyleneterphtalate). *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry*, 4, 2597-2606.
66. Elliot, J., Macdonald, M., Nie, J., Bowman, C. (2004). Structure and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution of the crosslinked polymer structure. *Polymer*, 45, 1503-1510.
67. Piletsky, S., Piletska, E., Karim, K., Foster, G., Legge, C., Turner, A. (2004). Custom synthesis of molecular imprinted polymers for biotechnological application preparation of a polymer selective for tylosin, *Analytica Chimica Acta*, 504, 123 – 130.
68. Lahsini, R., Louhaichi, M., Adhoum, N., Monser, L. (2013). Preparation and application of a molecularly imprinted polymer for determination of glibenclamide residues, *Acta Pharmaceutica*, 63, 265-275.
69. Dada, A., Olalekan, A., Olatunya, A., Dada, O. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of  $Zn^{2+}$  unto phosphoric acid modified rice husk, *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 3, 38 – 45.
70. Rushton, G., Karns, C., Shimizu, K. (2005). A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs), *Analytica Chimica Acta*, 528, 107-113.
71. Chen, J., Bai, L., Liu, K., Liu, R., Zhang, Y. (2014). Atrazine molecular imprinted polymers: Comparative analysis by far-infrared and ultraviolet induced polymerization, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 575-587.
72. Zhu, Y., Jiang, D., Sun, D., Yan, Y., Li, C. (2016). Fabrication of magnetic imprinted sorbents prepared by Pickering emulsion polymerization for adsorption of erythromycin from aqueous solution, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 3570 – 3579.
73. Luo, X., Liu, L., Wang, L., Liu, X., Cai, Y. (2019). Facile synthesis and low concentration tylosin adsorption performance of chitosan/cellulose nanocomposite microspheres, *Carbohydrate Polymers*, 206, 633 – 640.
74. Guo, X., Pang, J., Chen, S., Jia, H. (2018). Sorption properties of tylosin on four different microplastics, *Chemosphere*, 209, 240 – 245.
75. Guo, X., Miao, Y., Yang, C., Zhang, Q., Gao, L., Hu, Y. (2016). Sorption of tylosin on black carbon from different sources, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 3393, 3400.

76. Song, X., Zhou, T., Li, J., Su, Y., Xie, J., He, L. (2018). Determination of macrolide antibiotics residues in pork using molecularly imprinted dispersive solid-phase extraction coupled with LC–MS/MS, *Journal of Separation Science*, 41, 1138 – 1148.
77. Taoa, Y. Yua, G., Chena, D., Pana, Y., Liua, Z., Wei, H., Penga, D., Huang, L., Wang, Y., Yuana, Z. (2012). Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 897, 64-71.