

## **Extracción simultánea de ocho antibióticos mediante la técnica MEPS para su aplicación en el análisis de agua potable.**

del Ángel Hernández Mario Daniel\*, Carmona Alvarado Idalia F., Lucio Gutiérrez Juan R., Waksman de Torres Noemí, Cavazos Rocha Norma C.

Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina, UANL. Ave. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño S/N. Mitras Centro. CP. 64460. [danielqcb02@gmail.com](mailto:danielqcb02@gmail.com).

### **RESUMEN:**

La industria alimenticia requiere gran cantidad de agua para los procesos de fabricación de alimentos. El agua potable es fundamental para las necesidades básicas de la sociedad actual. Existen microcontaminantes en el agua como los antibióticos cuya presencia puede causar problemas a la salud humana, así como llevar al desarrollo de cepas resistentes. Por ello, es necesario de desarrollo de métodos analíticos sensibles y rápidos, que permitan detectar la presencia de estos agentes. El análisis de antibióticos requiere un complejo conjunto de extracciones y limpiezas para eliminar o minimizar las interferencias, y al mismo tiempo lograr la mayor recuperación de la matriz. La microextracción con sorbente empacado (MEPS por sus siglas en inglés) es una técnica de extracción y limpieza amigable con el medio ambiente por utilizar poca cantidad de muestra, poca cantidad de solventes y además es una técnica rápida. El objetivo de este trabajo fue desarrollar, optimizar y validar un sistema cromatográfico para la comparación del desempeño de los cartuchos de C8/intercambio catiónico fuerte y el cartucho C18 de MEPS en la extracción de antibióticos de agua, y optimizar el proceso de extracción del cartucho con mejores resultados mediante un diseño de experimentos modo diseño factorial completo de 2 niveles para su aplicación en el análisis de agua potable de la zona metropolitana de Monterrey..

### **ABSTRACT:**

The food industry requires a large amount of water for food manufacturing processes. Drinking water is fundamental to the basic needs of today's society . There are micropollutants in the water, such as antibiotics whose presence can cause problems to human health, as well as lead to the development of resistant strains. Therefore, it is necessary to develop sensitive and rapid analytical methods that allow detecting the presence of these agents. Antibiotic analysis requires a complex set of extractions and cleanings to eliminate or minimize the interferences, and at the same time achieve the greatest recovery of the matrix. The microextraction with packed sorbent (MEPS for its acronym in English) is an environmentally friendly extraction and cleaning technique because it uses a small amount of sample, a small amount of solvents and is also a quick technique. The objective of this work was to develop, optimize and validate a chromatographic system for the comparison of the performance of the C8 cartridges / strong cation exchange and the cartridge C18 of MEPS in the extraction of water antibiotics, and to optimize the cartridge extraction process with better results by means of a design of experiments mode complete factorial design of 2 levels for its application in the analysis of drinking water of the metropolitan area of Monterrey..

**Palabras clave:** MEPS, agua potable, antibióticos, microextracción

**Key words:** MEPS, drinking water, antibiotics, microextraction

**Área:** otros

## **INTRODUCCIÓN**

El agua tiene distintas aplicaciones en la industria alimenticia; se utiliza en la producción, en la formulación, en el transporte de vegetales, en la generación de vapor, en los servicios sanitarios, en los sistemas de enfriamiento, en el lavado de equipos y maquinaria. La extracción del agua cada día se vuelve más complicada y costosa, sobre todo en países en vías de desarrollo como México (Badui,2013). El agua potable es utilizada para los fines domésticos, higiene personal, beber y cocinar. Tiene características microbianas, químicas y físicas que cumplen con las pautas de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017). El consumo de agua no potable es el origen de muchos problemas de salud que aquejan un gran sector de la población mundial, como las enfermedades ocasionadas por bacterias y virus (Badui, 2013).Se define como contaminación del agua, cualquier cambio químico, físico o biológico en la calidad del agua que tiene un efecto dañino en cualquier ser vivo que consuma el agua (Lenntech,2017).

Actualmente, se puede englobar a los productos farmacéuticos dentro de los contaminantes emergentes debido a que pueden causar efectos negativos en los seres humanos y organismos acuáticos, entre los contaminantes emergentes podemos citar a los antibióticos (Becerril, 2009). Los antibióticos son sustancias químicas ampliamente usadas en la medicina humana y en aplicaciones veterinarias. (Feng, Yao *et al.*, 2016). El uso desmedido de antibióticos conduce invariablemente a la propagación de resistencia en microorganismos y el problema está alcanzando niveles alarmantes, ya que, cada vez estos microorganismos se vuelven más resistentes a fármacos considerados como última línea de defensa (Kupferschmidt, 2016). Los antibióticos y sus metabolitos persisten en el medio ambiente mediante un ciclo de transformación parcial, bioacumulación y deposición gradual en el suelo, el agua superficial y el agua subterránea (Carvahlo, 2016). Los antibióticos y en general los compuestos farmacéuticos, en contraste a los compuestos contaminantes industriales, poseen características que dificultan su análisis simultáneo. Los antibióticos son moléculas más grandes, complejas, con múltiples sitios de ionización y con multifuncionalidades dentro de la misma molécula (Moreno-Bondi *et al.*, 2009). La persistencia de los antibióticos puede aumentar debido a la difusión facilitada mediante biopelículas presentes en las tuberías, piedras de los ríos y en los lagos, lo que permite la sorción coloidal sea una entrada importante a ambientes acuáticos en un lapso de tiempo prolongado, por lo tanto, aumentando su persistencia en el agua y reduciendo al mismo su biodisponibilidad en el medio ambiente (Kümmerer, 2010). El análisis de antibióticos en matrices como el agua se lleva a cabo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) acoplada a detector Ultravioleta (UV), Fluorescencia o Espectrómetro de Masas. Sin embargo, se requiere un complejo conjunto de extracciones y limpiezas para eliminar o minimizar las interferencias, y al mismo tiempo lograr la mayor recuperación de la compleja matriz (Obimakin *et al.*, 2016). El uso de técnicas verdes permite a los científicos proteger y beneficiar a la economía, la población y el planeta mediante la búsqueda de formas creativas e innovadoras para reducir el desperdicio, conservar la energía y descubrir reemplazos de sustancias peligrosas (American Chemical Society, 2014). Una de las técnicas verdes es la microextracción con sorbente empacado (MEPS, por sus siglas en inglés). Entre las ventajas más destacadas de la MEPS sobre la extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) se podrían mencionar: las fibras de la MEPS son reutilizables, pueden llegar a utilizarse hasta 100 veces, poca cantidad de solvente dependiendo de la complejidad de la matriz y puede aplicarse a matrices biológicas, alimentos, aditivos, fármacos, toxicológicas, forense y medioambientales (Pereira *et al.*, 2014). La selección de un sorbente apropiado es de gran importancia para lograr un rendimiento aceptable de limpieza y extracción; los sorbentes están hechos principalmente de sílice y más recientemente de divinilbenceno polimérico (DVB), y pueden ser modificados o especializados para obtener diferentes propiedades de retención. En el primer caso, se añaden grupos alquilo de diferentes tamaños (C2, C8 y C18) a la sílice hidrófila, introduciendo propiedades hidrófobas en el sorbente final que son proporcionales al tamaño del grupo alquilo. Estos sorbentes de sílice modificados están particularmente indicados para extracciones en fase inversa. La sílice puede ser también fácilmente modificada con diferentes grupos funcionales, usualmente aminas cuaternarias o ácidos sulfónicos que son más adecuados para la extracción de moléculas cargadas a través de separaciones de intercambio iónico (Pereira *et al.*, 2014).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Equipo

- a) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP 1100, equipado con sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, sistema de control de temperatura, detector de UV y fluorescencia.
- b) Jeringa Analítica Automática eVolXRSGEAnalyticalScience

#### Materiales

- a) Columna SynergiC18, 2 x 150 mm, 4 m, Phenomenex.
- b) Cartuchos de microextracción en adsorbente empacado, C8 + SCX, SGEAnalyticalScience (diámetro de partícula 45  $\mu$ m, superficie de 500 m<sup>2</sup>/g, 80% C8 y 20% SCX)
- c) Cartuchos de microextracción en adsorbente empacado, C18, SGEAnalyticalScience
- d) Jeringa para microextracción en adsorbente empacado de 100  $\mu$ L

e) Jeringa Analítica Automática eVolXR. SGEAnalyticalScience

Metodología

Se desarrolló, optimizó y validó un sistema cromatográfico para la cuantificación de ocho antibióticos. Se realizó la comparación de los cartuchos M1 y C18MEPS para la extracción simultánea de ocho antibióticos y se seleccionó el cartucho con mejores resultados (recuperación y precisión).

Se preparó una disolución stock individual de 200 µg/mL de cada uno de los siguientes antibióticos: Trimetoprim (TMP), Sulfadimetoxina (SDX), Oxitetraciclina (OXI), Tetraciclina (TETRA), Ciprofloxacina (CIPRO), Enrofloxacin (ENRO), Sulfametoxazol (SMX) y 600 µg/mL para Tilosina (TIL) en metanol. A partir de ellos se preparó una mezcla intermedia a una concentración de 10 µg/mL para TMP, TETRA, OXI, CIPRO, ENRO, SMX y SDX y de 30 µg/mL para TIL. A partir de la mezcla intermedia, y por diluciones adecuadas, se prepararon estándares en un rango de concentración de 0.25 a 5 µg/mL para todos los antibióticos excepto TIL que se preparó en un rango de 0.75-15 µg/mL. El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución HP 1100, equipado con sistema de bombeo cuaternario, automuestreador, sistema de control de temperatura, detector de UV y fluorescencia. En la tabla 1 se muestran las condiciones del sistema.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis en CLAR

Columna	Synergi 4µ RP Phenomenex 150 x 3.00 mm
Fase móvil	A: Ácido Fórmico (AF) 0.1% B: Metanol
Elución	Gradiente
Temperatura de análisis	40°C
Volumen de inyección	10 µL
Detector	UV
Longitud de onda	280 nm

Una vez validado el método se procedió a realizar experimentos de extracción, por triplicado, para comparar los cartuchos M1 (fase compuesta por C8 e intercambio catiónico fuerte) y C18 MEPS, partiendo de una mezcla de 0.25 µg/mL para todos los antibióticos excepto la TIL de 0.75 µg/mL. Las condiciones de extracción fueron las siguientes: acondicionamiento del cartucho (metanol y agua ácida pH=3), saturación de cartucho (ocho ciclos), lavado (agua Milli-Q), elución (2 x 50 µL ácido fórmico 0.1%/ metanol 1:1) y limpieza del cartucho (metanol).

Una vez seleccionado el cartucho se procedió a realizar el diseño de experimentos en el programa MODDE 12 con la finalidad de establecer las condiciones óptimas. Se tomaron en cuenta las siguientes variables en el nivel bajo y en el nivel alto: pH (3 y 7), mixes (10 y 20) y eluciones (2 y 5)

El programa sugirió el siguiente set de experimentos en el modo diseño factorial completo de 2 niveles.

Tabla 2 Condiciones de extracción con el programa MODDE 12.

EXPERIMENTO NO	NOMBRE DE EXPERIMENTO	ORDEN DE CORRIDA	MIXES	pH	ELUCIONES
1	N1	1	10	3	2x50µL
2	N2	7	20	3	2x50µL
3	N3	10	10	7	2x50µL
4	N4	4	20	7	2x50µL
5	N5	6	10	3	5x20µL
6	N6	11	20	3	5x20µL
7	N7	8	10	7	5x20µL

8	N8	3	20	7	5x20μL
9	N9	2	15	5	3X30μL
10	N10	9	15	5	3X30μL
11	N11	5	15	5	3X30μL

Cada extracción se llevó a cabo con una Jeringa Analítica Automática eVol XR SGE Analytical Science, de 100 μL, y el cartucho de microextracción empacado con fase C18. El protocolo general de extracción fue: 1) activación del cartucho (usando metanol y agua pH 3, 5 y 7 dependiendo de la extracción), 2) extracción (bajo las condiciones establecidas de acuerdo al diseño de experimentos), 3) secado 4) elución 5) lavado del cartucho con metanol para su uso en la siguiente extracción. Los experimentos se realizaron en un orden aleatorio de acuerdo al software. En la tabla 2 se muestra el orden en que fueron realizados.

Los extractos obtenidos (20,30 y 50 μL) se recibieron en un vial con un inserto para análisis cromatográfico. Se añadió el solvente de extracción hasta completar 100 μL. La mezcla se agitó en vortex, y se llevó al equipo para su análisis por CLAR/ UV, bajo las condiciones establecidas en tabla 1.

Después del análisis por CLAR/UV se obtuvieron los datos tomando en cuenta el área del pico de cada antibiótico, y la suma de áreas de todos los antibióticos y se procesaron en programa MODDE 12.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

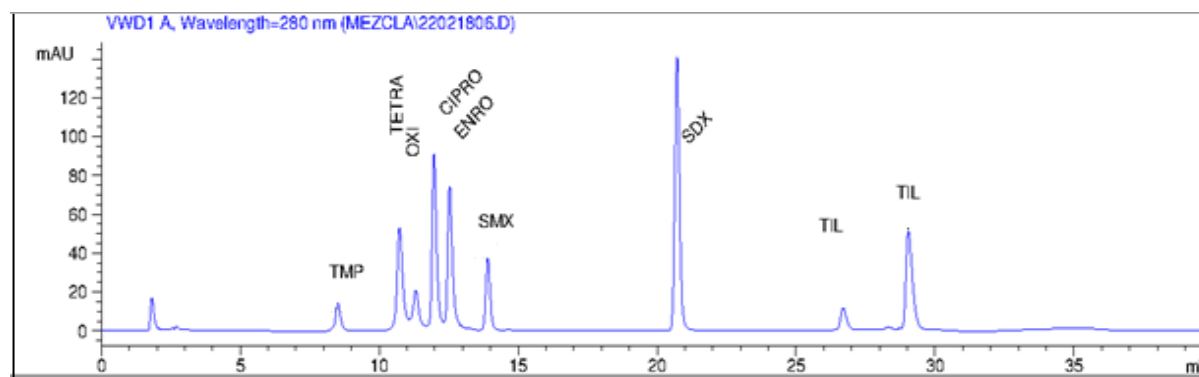


Figura 1. Cromatograma con el orden de elución de la mezcla de antibióticos. Orden de elución ( $t'_R$ ): TMP (8.5 min), TETRA (10.73 min), OXI (11.31 min), CIPRO (11.97 min), ENRO (12.53 min), SMX (13.91 min), SDX (20.74 min) y TIL (26.36, 26.04 min).

Se validó el sistema cromatográfico obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3. Parámetros de validación del sistema cromatográfico

Antibiótico	Linealidad (μg/mL)	Ecuación de la recta	$R^2$	LD (μg/mL)	LC (μg/mL)
TMP	0,25 -5	Y=41,41X-2,872	0,995	0,02	0,05
TETRA	0,25 -5	Y=136,55X-16,262	0,995	0,10	0,25
OXI	0,25 -5	Y=44,06X-5,638	0,993	0,10	0,25
CIPRO	0,25 -5	Y=202,27X-5,389	0,991	0,10	0,25

ENRO	0,25 -5	Y=178,88X-7,950	0,991	0,10	0,25
SMX	0,25 -5	Y=87,036X-4,153	0,997	0,06	0,18
SDX	0,25 -5	Y=337,70X-6,940	0,999	0,03	0,09
TIL	0,75-15	Y=65,032X+4,626	0,999	0,17	0,52
					n=3

LD=límite de detección LC=límite de cuantificación

Los coeficientes de variación de la precisión intradía, para niveles bajo, medio y alto estuvieron entre 0.75 para CIPRO y 14.21 % para ENRO. En el caso de la precisión intermedia, para niveles bajo, medio y alto, los coeficientes de variación obtenidos estuvieron entre un 4.42 para TETRA y 13.1 % para ENRO.

Bajo las condiciones descritas se observó en el cartucho C18 la extracción de todos los antibióticos, con porcentajes de recuperación de 14.1 hasta 104.2 % y coeficientes de variación se encontraron en un rango de 0.7 a 7.5%, mientras en el cartucho M1 se recuperaron solo 7 antibióticos con un porcentaje de recuperación de 3.8 a 27% y un coeficiente de variación entre 1.5 a 36.2%. Por lo cual se decidió seguir trabajando con el C18.

Además de los experimentos por triplicado, se realizaron varios experimentos adicionales en donde la constante era la baja reproducibilidad en las extracciones, y la recuperación de solo 7 antibióticos con el cartucho M1. La diferencia entre las recuperaciones entre los dos cartuchos era, en relación M1:C18, desde 1:2 para algunos antibióticos, hasta 1:4 aproximadamente para otros, por lo que, aún optimizando las condiciones de extracción para M1 difícilmente se podrían obtener resultados similares a las extracciones con el cartucho C18.

La combinación de las variables bajo el diseño factorial completo de 2 niveles arrojó como resultado 11 experimentos de extracción. En todos los experimentos se lograron extraer todos los antibióticos. Se calculó la concentración y el porcentaje de recuperación para cada antibiótico en cada experimento. Los porcentajes obtenidos fueron entre 11% y 114%. Posteriormente, los resultados obtenidos (suma de área y porcentaje de recuperación promedio) fueron introducidos en el programa “Modde”, el cual estadísticamente mostró la relevancia de cada factor trabajado. Se presenta el análisis hecho por el MODDE 12 con el modelado con mínimos cuadrados parciales (PartialLeastSquaresPathModeling, PLS-PM por sus siglas en inglés).

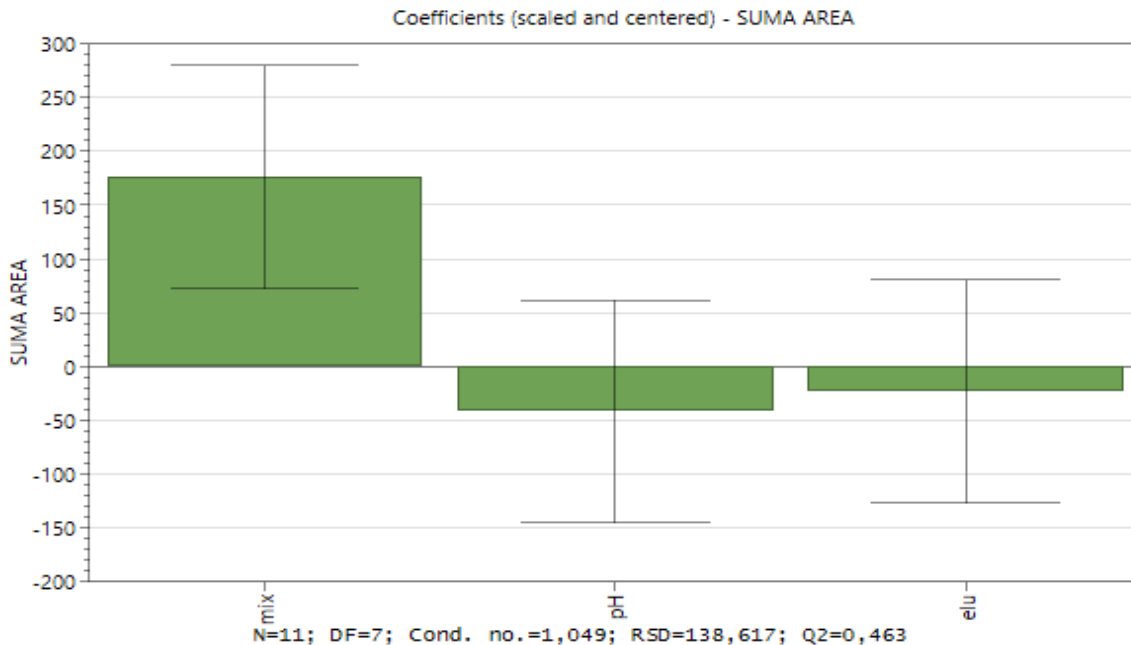


Figura 2. Relevancia de factores de extracción

La figura 2 muestra que la variable de mixes en nivel alto aumentará la eficiencia de la extracción de los ocho antibióticos. Posteriormente se corrió el programa en modo Optimizer y dictó las condiciones para la mayor eficiencia de extracción de antibióticos: tomando en cuenta el aumentar la suma de las áreas obtenidas. Las condiciones son: pH=3, eluciones (2) y número de mixes (20).

### **CONCLUSIONES:**

Se desarrolló, optimizó y validó un método para la cuantificación de TMP, TETRA, OXI, CIPRO, ENRO, SMX, SDX y TIL por CLAR/UV. El cartucho C18 presentó la mayor eficiencia para la extracción simultánea de antibióticos de agua, ya que se extraen todos los antibióticos y con mayor precisión que con el cartucho M1. El M1 no logró extraer todos los antibióticos. Con el diseño de experimentos se observó que solo hay un factor relevante bajo las condiciones de trabajo establecidas, que fue el número de mixes. Se logró recuperar los ocho antibióticos con porcentajes entre el 11 % al 114%.

## BIBLIOGRAFÍA:

American Chemical Society. Green Chemistry Definition. American Chemical Society. Last update: 29/01/2014; (2014) Available from: <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/definition.html>

Badui, S. (2014) *Química de los alimentos*. 5ta edición. Pearson. Ciudad de México; 3-14 p

Becerril, B. (2009) "Contaminantes emergentes en el agua". *Revista Digital Universitaria* [en línea] Vol. 10, No. 8 [Consultada: 11 de agosto de 2009]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art54/int54.htm>>

Carvalho, I.; Santos, L. (2016) "Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario." *Environ Int*. Elsevier Ltd; 94:736–57.

Espinal, P. y Cesar, J. (2015) "Aguas residuales y su impacto en la salud" Retrieved from:[https://issuu.com/esmage/docs/aguas\\_residuales\\_y\\_su\\_impacto\\_en\\_la\\_salud](https://issuu.com/esmage/docs/aguas_residuales_y_su_impacto_en_la_salud).

Feng, Y. et al. (2016) "A simple and economic method for simultaneous determination of 11 antibiotics in manure by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography." *J Soils Sediments*; 16[9]: 2242–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-016-1414-5>

Kupferschmidt, K. (2016) "Long-awaited report outlines how to fight antimicrobial resistance—and how to pay for it" *Revista Digital Science* [en línea]. [Consultada: 11 de febrero de 2017] Disponible en internet: <http://www.sciencemag.org/remoto.dgb.uanl.mx/news/2016/05/long-awaited-report-outlines-how-fight-antimicrobial-resistance-and-how-pay-it>

Lenntech (2017) recuperado de <https://www.lenntech.es/faq-contaminacion-agua.htm>

Moreno, M. et. al. (2009) "An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples" Springer-Verlag.

Obimakinde, S. et. al. (2016) "Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update." *Environ SciPollut Res* [Internet]. *Environmental Science and Pollution Research*;24[4] 1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7757-z>

Pereira J, et. al. (2014) "Microextraction by packed sorbent: An emerging, selective and high-throughput extraction technique in bioanalysis." *Biomed Chromatogr.*;28[6]:839–47.

Pereira J, et. al. (2014) "Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends *Microextraction Techniques*." *Anal Bioanal Chem.*;406[8]:2101–22.

WHO. (2017) Agua, saneamiento y salud (ASS). Retrieved from [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/mdg1/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/mdg1/es/)