



UNAH
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE HONDURAS

No.25 / Año 2020

REVISTA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dirección de Investigación Científica, Humanística y Tecnológica
Universidad Nacional Autónoma de Honduras



DICIHT
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA

ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación de quinolonas en músculo de pollo mediante Cromatografía Líquida con detector de arreglo de diodos (LC-DAD) utilizando QuEChERS como técnica de tratamiento

Determination of quinolones in chicken muscle by Liquid Chromatography with diode array detector (LC-DAD) using QuEChERS as a treatment technique

Henry Ponce Rodríguez^{a, b}, Nahun Lanza Sorto^a, Alba Blanco Raudales^a

a Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Tegucigalpa, Honduras

b Facultad de Química. Universitat de València. c/Dr. Moliner 50, 46100- Burjassot, València, España

DOI 10.5377/rct.v13i25.10408

Recibido: 25 marzo 2020

Aceptado: 09 de julio 2020

Publicado en línea: 23 noviembre 2020

RESUMEN

Un método rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro, mediante extracción QuEChERS seguido de cromatografía líquida de alto desempeño con detección DAD (HPLC-DAD), fue desarrollado para la determinación de quinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, sarafloxacina y flumequina) en músculo de pollo. La separación cromatográfica se logró utilizando agua acidificada (ácido acético 0.1 M, pH = 2.8) y metanol (85:15) como fase móvil con columna C8 (150 mm x 4.6 mm i.d., partícula 5 µm). Todos los analitos eluyeron antes de 18 minutos, a un flujo de 1 mL min⁻¹, a dos longitudes de onda para la detección, 250 y 280 nm, respectivamente. El tratamiento de muestra consistió en una extracción y limpieza utilizando la metodología QuEChERS, para lo cual se optimizaron diferentes variables, mostrando elevada eficiencia sin presencia de interferencias en la separación cromatográfica. El método presentó una adecuada linealidad ($r^2 > 0.90$)

y recuperaciones entre 70 y 110 %. Los límites de detección (S/N=3) fueron menores que los límites de residuo máximo (LMR) establecidos para quinolonas y los coeficientes de variación para repetibilidad y reproducibilidad intermedia (n=3), a tres niveles de concentración, se encontraron entre 3.8 y 10.9 %. Un total de 36 muestras, obtenidas en Tegucigalpa y Comayagüela en Honduras, fueron analizadas por el método propuesto, encontrándose rastros de flumequina en dos de ellas.

Palabras clave: QuEChERS, pollo, quinolonas, LCDAD, validación

ABSTRACT

A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method, using QuEChERS extraction followed by high-performance liquid chromatography with DAD detection (HPLC-DAD), has been developed for the determination of quinolones (norfloxacin,

Autor corresponsal

✉ **Henry Ponce Rodríguez**
henry.ponce@unah.edu.hn

ciprofloxacin, danofloxacin, difloxacin, sarafloxacin and flumequin) in chicken muscle. Chromatographic separation was achieved using acidified water (acetic acid 0.1 M, pH = 2.8) and methanol (85:15) as mobile phase with C8 column (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm particle size). All analytes eluted before 18 minutes, at a flow of 1 mL min⁻¹, at two wavelengths for detection, 250 and 280nm, respectively. The sample treatment consisted of extraction and clean-up using the QuEChERS methodology, for which different variables were optimized, showing high efficiency without the presence of interferences in the chromatographic separation. The method presented adequate linearity ($r^2 > 0.90$) and recoveries between 70 and 110 %. The limits of detection (S/N=3) were lower than the maximum residue limits (MRL) established for quinolones, and the intra- and inter-day variation coefficients (n=3) at three concentration levels, were between 3.8 and 10.9 %. A total of 36 samples, obtained in Tegucigalpa and Comayagüela in Honduras, were analyzed by the proposed method, and traces of flumequin were found in two of them.

Keywords: QuEChERS, chicken, quinolones, LC DAD, validation

1 INTRODUCCIÓN

Los compuestos quinolónicos representan un grupo importante de antibióticos sintéticos utilizados en el tratamiento de un amplio rango de infecciones, siendo aplicados en veterinaria como agentes profilácticos o para el tratamiento de infecciones en animales de crianza, como ser pollos, cerdos, pavos y ganado (Talero-Pérez et al. 2014). Pese al beneficio que representa su uso, es importante señalar que el consumo por los seres humanos de animales de crianza con presencia de trazas de estos compuestos representa un riesgo, pudiendo generar resistencia de los microorganismos a estos fármacos, como algunos

estudios lo han demostrado (Ferreira et al. 2018; Mağa et al. 2018; Benameur et al. 2018). En ese sentido, diversas normativas internacionales, como el Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO s.f.) y el EU/37/2010 de la Unión Europea (2010), han establecido los límites máximos de residuos (LMR) permitidos para medicamentos veterinarios en matrices alimenticias provenientes de animales que han sido tratados con estos agentes microbianos.

Las quinolonas son derivados del ácido nalidíxico, que a nivel estructural se componen de un anillo de piridona, con ácido carboxílico libre en posición 3 y un nitrógeno en posición 1, unido a un anillo aromático. Normalmente se les clasifica en función de su evolución a lo largo del tiempo y su aparición en el mercado, desde los de primera generación (ácido nalidíxico, cinaxacina), segunda (flumequina, ciprofloxacin), tercera (danofloxacin, sarafloxacin) hasta cuarta generación (clinafloxacin) (Hassouan 2006). La Fig. 1 muestra la estructura molecular y valores de pKa para algunas quinolonas representativas (Jiménez-Lozano et al. 2002). Es importante señalar que la presencia de grupos carboxílico y piperazinil en su estructura les confieren propiedades Zwitteriónicas, por lo que poseen dos valores de pKa, a excepción de la flumequina, que únicamente presenta el grupo funcional ácido.

La determinación de estos compuestos en diversas matrices de pollo (músculo, riñón, huevos e incluso plumas) ha sido llevada a cabo empleando principalmente HPLC debido a la polaridad que presentan, mientras que su separación con cromatografía gaseosa precisa una etapa de descarboxilación (Takatsuki 1992) por lo que su uso ha sido limitado. Las concentraciones de quinolonas presentes en este tipo de matrices requieren aplicar métodos capaces de alcanzar bajos límites de

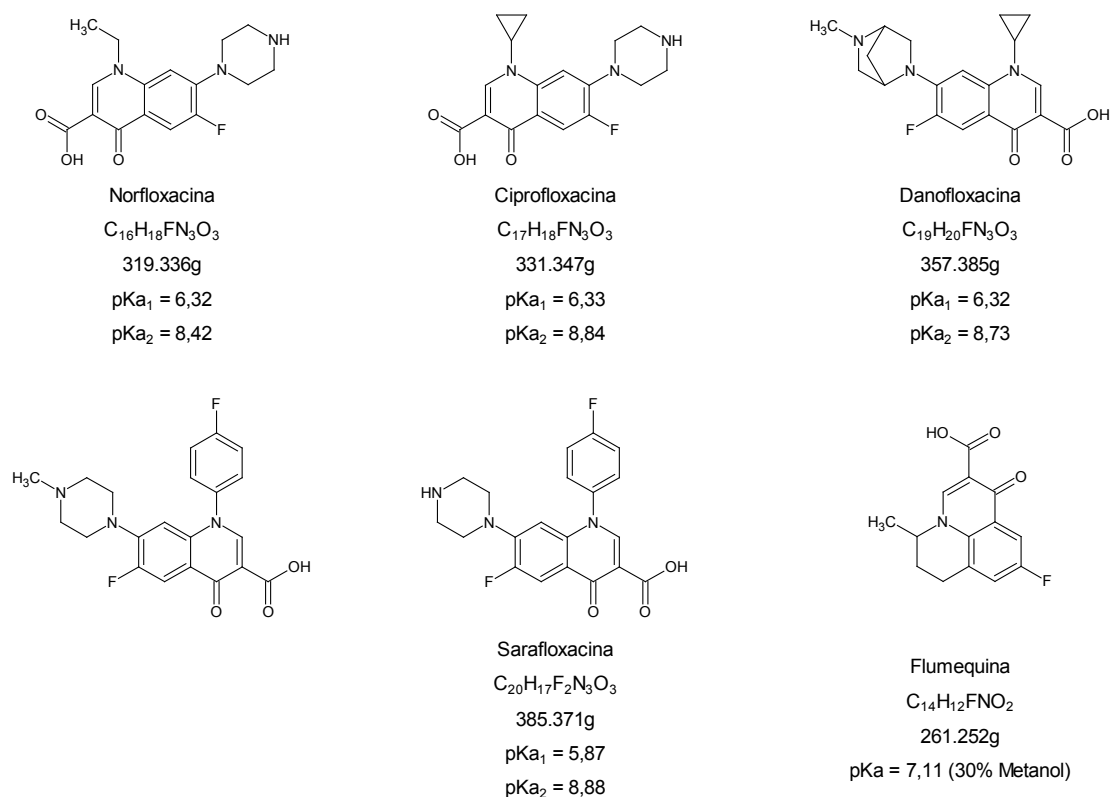


Fig. 1 Estructura, peso molecular y valores de pKa de quinolonas estudiadas (adaptado de Mella et al. (2000))

detección, por lo que la utilización de detectores de masas y masas en tándem permite alcanzar los límites deseados. Sin embargo, algunas desventajas de este tipo de instrumentación son el elevado coste y mantenimiento, además de la alta especialización para su operación. Por otra parte, algunos trabajos han utilizado detectores de Fluorescencia, debido a que estas sustancias presentan propiedades fluorescentes, con lo cual es posible incrementar la sensibilidad en el análisis. Asimismo, las quinolonas presentan capacidad para absorber radiación en la región ultravioleta-visible, por lo que otras publicaciones han reportado métodos con DAD.

El análisis de matrices alimenticias involucra la presencia de elevadas y complejas impurezas, que pueden ir desde aquellas de origen inorgánico, como sales y minerales, hasta grandes proteínas, lípidos

y grasas, las cuales generan un marcado efecto matriz, afectando la identificación y cuantificación de los analitos (Andreu et al. 2007). Por ello, se requieren técnicas de tratamiento de muestra capaces de eliminar la mayor cantidad de impurezas y con elevada capacidad de preconcentración de los analitos. Algunas técnicas de extracción utilizadas para este tipo de compuestos en matrices alimentarias han incluido extracción líquido-líquido, extracción con solventes y posterior aplicación de la extracción en fase sólida (SPE) y, en menor medida, la extracción con líquidos presurizados (Hernández-Arteseros et al. 2002).

Una de las técnicas de tratamiento de muestra más reciente es la denominada QuEChERS (por sus siglas en inglés: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), introducida por Anastassiades et al. (2003).

QuEChERS surge como un método de tratamiento de muestras de frutas y vegetales en la determinación de multiresiduos de pesticidas. El método original se basa en una extracción a micro escala con acetonitrilo como solvente extractor, donde los analitos son extraídos utilizando sales de sulfato de magnesio y cloruro de sodio. Existe una etapa opcional de limpieza del extracto y una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), para lo cual es posible agregar sorbentes como amina primaria secundaria (PSA), C18, carbón grafitizado o incluso el silicagel, que también ha mostrado buenos resultados (Rodríguez et al. 2016).

En el presente estudio, se desarrolla y valida un método capaz de determinar compuestos quinolónicos en muestras de músculo de pollo, optimizando diferentes variables del procedimiento original de QuEChERS y la posterior separación cromatográfica mediante HPLC-DAD para alcanzar límites de detección por debajo de los LRM establecidos para estas sustancias. Se aplicó el método desarrollado para el análisis de muestras comerciales de músculo de pollo, alimento de elevado consumo en la población hondureña, recolectadas en las ciudades de Tegucigalpa y Comayagüela en Honduras, para establecer si las trazas de antibióticos quinolónicos no exceden las concentraciones máximas permitidas por la normativa vigente.

2 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.1 Reactivos

Se utilizaron acetonitrilo y metanol calidad HPLC, y acetona grado pesticida, todos de la marca J.T. Baker (Center Valley, PA) y citrato de amonio y ácido acético glacial marca Merck (Darmstadt, Germany). Para la evaporación de los extractos, se utilizó nitrógeno gaseoso ultra puro (INFRA). En los experimentos se utilizó agua ultra pura tipo I obtenida con equipo

purificador de la marca Thermo Scientific, modelo Barnstead micropurest (Waltham, MA, USA). Se utilizaron diferentes kits de sales para extracción QuEChERS conteniendo sulfato de magnesio y acetato de sodio (método tampón acetato), sulfato de magnesio y cloruro de sodio (método sin tampón) y sulfato de magnesio, cloruro de sodio y citrato de sodio di hidratado (método tampón citrato), de la marca Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Sorbentes para d-SPE, conteniendo sulfato de magnesio y C18, fueron adquiridos de la marca Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Filtros de solución de nylon (0.45 μm , 15 mm, Thomas Scientific., Swedesboro, NJ, USA) fueron utilizados para filtrar los extractos de muestras. La fase móvil fue filtrada antes de utilizar CON filtros de membrana de nylon (0.45 μm , 13 mm, Pall Corp., MI, USA).

2.2 Estándares y soluciones

Estándares de norfloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, sarafloxacina y flumequina fueron adquiridos de Sigma Aldrich® (St. Louis, USA) con un 99.9 % de pureza. Soluciones patrón individuales de cada compuesto fueron preparadas con una concentración de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo la masa exacta de cada compuesto en metanol y luego fueron almacenadas a -20 °C alejadas de la luz. Dos soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones patrón mezclando y diluyendo a concentraciones finales de 100 y 10 μg de cada quinolona con agua-metanol (80:20 v/v). Todas las soluciones fueron almacenadas hasta su utilización a 4 °C.

2.3 Instrumentación y condiciones analíticas

Para el desarrollo del método, se utilizaron un baño ultrasónico, marca Branson™, modelo CPX2800 (Ferguson, Missouri, USA), agitador mecánico de la marca KoolLab, modelo KS-VM-1000

(Miami, Florida, USA), centrifuga para tubos de capacidad de 50 mL marca LW Scientific, modelo C5 (Lawrenceville, Georgia, USA). El pesaje de estándares, reactivos y muestras se realizó en balanza analítica marca OHAUS® modelo Explorer Pro (Parsippany, New Jersey, USA). Una bomba al vacío de la marca Millipore, modelo WP6111560 (Burlington, Massachusetts, USA) se empleó durante los experimentos.

La separación cromatográfica se efectuó en un cromatógrafo líquido marca Shimadzu, modelo Prominence (Kyoto, Japan), consistiendo en bomba modelo LC20-AT, sistema de control CMB-20Alite, inyector automático SIL-20A, horno de columna CTO-A20 y detector SPD-M20A. Se utilizó el software EZ Start versión 7.4 (Shimadzu, Kioto, Japón) para recolectar y procesar los datos obtenidos. En el desarrollo de las condiciones cromatográficas, se utilizó una columna cromatográfica Hypersil Gold (ThermoScientific™) C8 de 150 mm por 4.6 mm y con partículas de 5 μm y desactivación terminal (end-capped). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido acético 0.1 M (pH = 2.8) (Solvente A) y Metanol (Solvente B). El porcentaje inicial de B fue de 15 %, manteniéndose así hasta los 8 minutos. Pasado este tiempo, se incrementó linealmente hasta alcanzar el 100 % en el minuto 15. Esta proporción se mantuvo por tres minutos, para retornar a condiciones iniciales en otros tres minutos y colocando un tiempo de estabilización final de dos minutos. El volumen de flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL min^{-1} , y el volumen de inyección se fijó en 20 μL de las soluciones del estándar y muestras. El detector de arreglo de diodos se controló a dos longitudes de onda: 250 nm para flumequina y 280 nm para el resto de compuestos.

2.4 Adquisición de muestras

Para la optimización de las variables del método QuEChERS, una muestra de músculo de pollo

con certeza de no contener residuos de antibióticos (blanco de muestra) se obtuvo procedente de una granja de crianza artesanal en el oriente del país. Dicho animal fue alimentado únicamente con pienso natural y sin administrar ningún antibiótico. Muestras de tres marcas comerciales de músculo de pollo fueron adquiridas en varios supermercados del Distrito Central (Tegucigalpa y Comayagüela) durante seis meses (noviembre 2017 a abril de 2018) de manera aleatoria, para un total de 36 muestras. Las muestras adquiridas fueron colocadas en refrigeración (4 °C) hasta ser llevadas al laboratorio para su posterior análisis dos días después de su recolección. La Fig. 2 presenta el mapa de los puntos de muestreo seleccionados.

2.5 Procedimiento QuEChERS

Todas las muestras de músculo de pollo fueron trituradas y homogenizadas utilizando un procesador de alimentos de cocina convencional, para posteriormente aplicar la técnica de tratamiento. La muestra blanco fue fortificada con concentraciones conocidas de los compuestos para la etapa de desarrollo y validación de los principales parámetros del procedimiento.

Se pesaron 10 g de la muestra en tubos de plástico para centrifuga de capacidad de 50 mL seguido de la adición de 10 mL de agua fría y 10 mL de una solución de acetonitrilo con ácido acético al 5 %. La mezcla se colocó en agitación en vortex durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron las sales de sulfato de magnesio y acetato de sodio y se colocaron nuevamente en el vortex, por otros cinco minutos. La mezcla se colocó en centrifugación durante 10 minutos a 6000 g. La capa superior (sobrenadante) fue obtenida y colocada en un tubo plástico de 15 mL conteniendo la mezcla de sorbentes para la d-SPE, que consistía en sulfato de magnesio y C18, y se colocó en vortex por 30 segundos. El extracto se sometió nuevamente a centrifugación a las condiciones

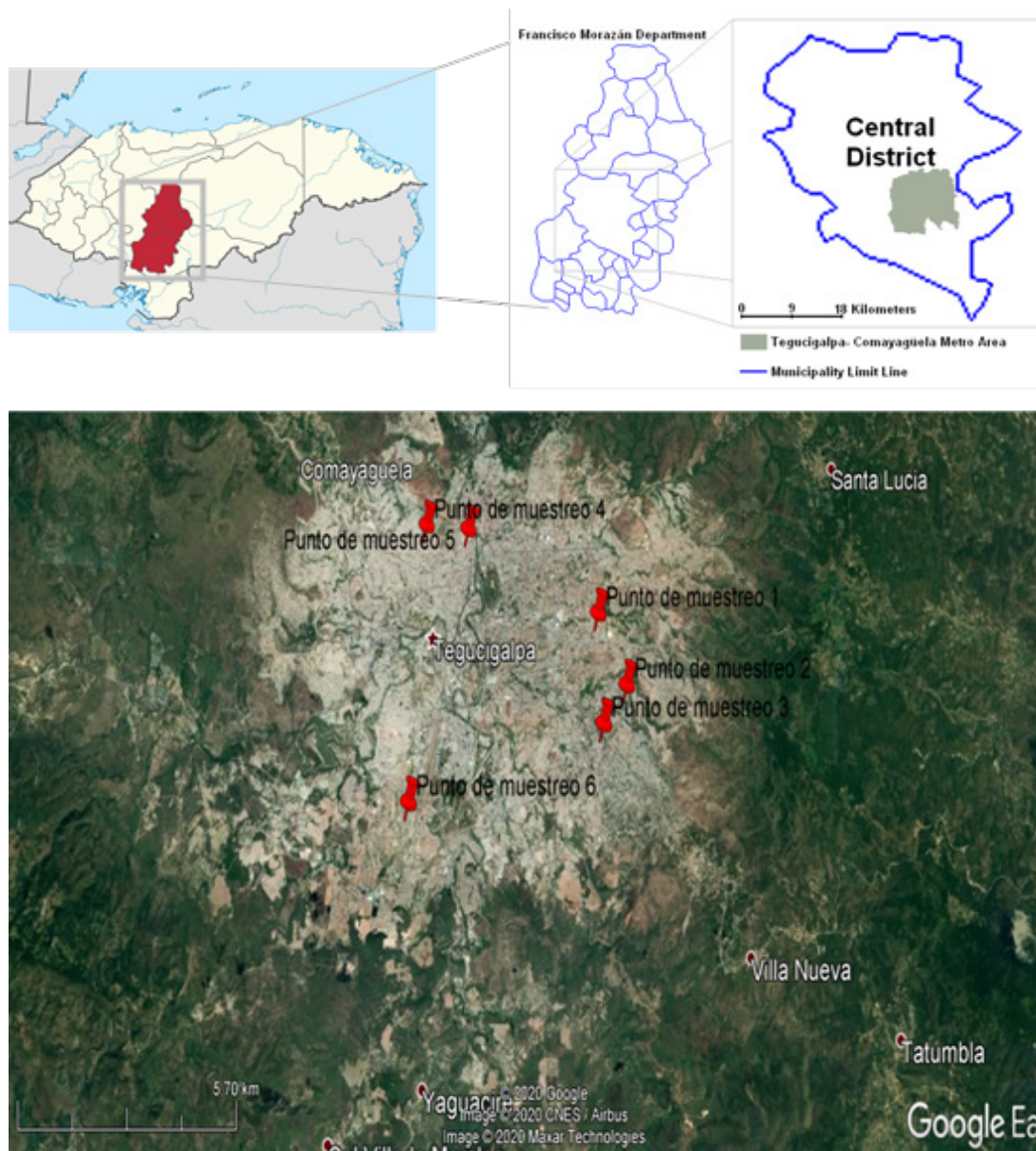


Fig. 2 Mapa de puntos de adquisición de muestras comerciales de músculo de pollo (Fuente: Google Earth)

anteriores y, pasado este tiempo, el sobrenadante fue sometido a evaporación con nitrógeno gaseoso a una temperatura de 40 °C hasta sequedad. Finalmente, el extracto se reconstituyó con 2 mL de fase móvil a condiciones iniciales y se colocó en vortex por 15 segundos, pasando esta solución en filtro de solución 0.45 μm y procediendo a inyectar en el instrumento. El esquema del procedimiento desarrollado se muestra en la Fig. 3.

2.6 Parámetros de desempeño del método

Las características de desempeño del método optimizado fueron evaluadas conforme a las directrices de la guía de validación de la Comisión Internacional de Armonización (ICH) (U.S. Food and Drug Administration s.f.) y del Directorio General Europeo de Salud y protección del consumidor (SANCO) (EU Reference Laboratories for Residues

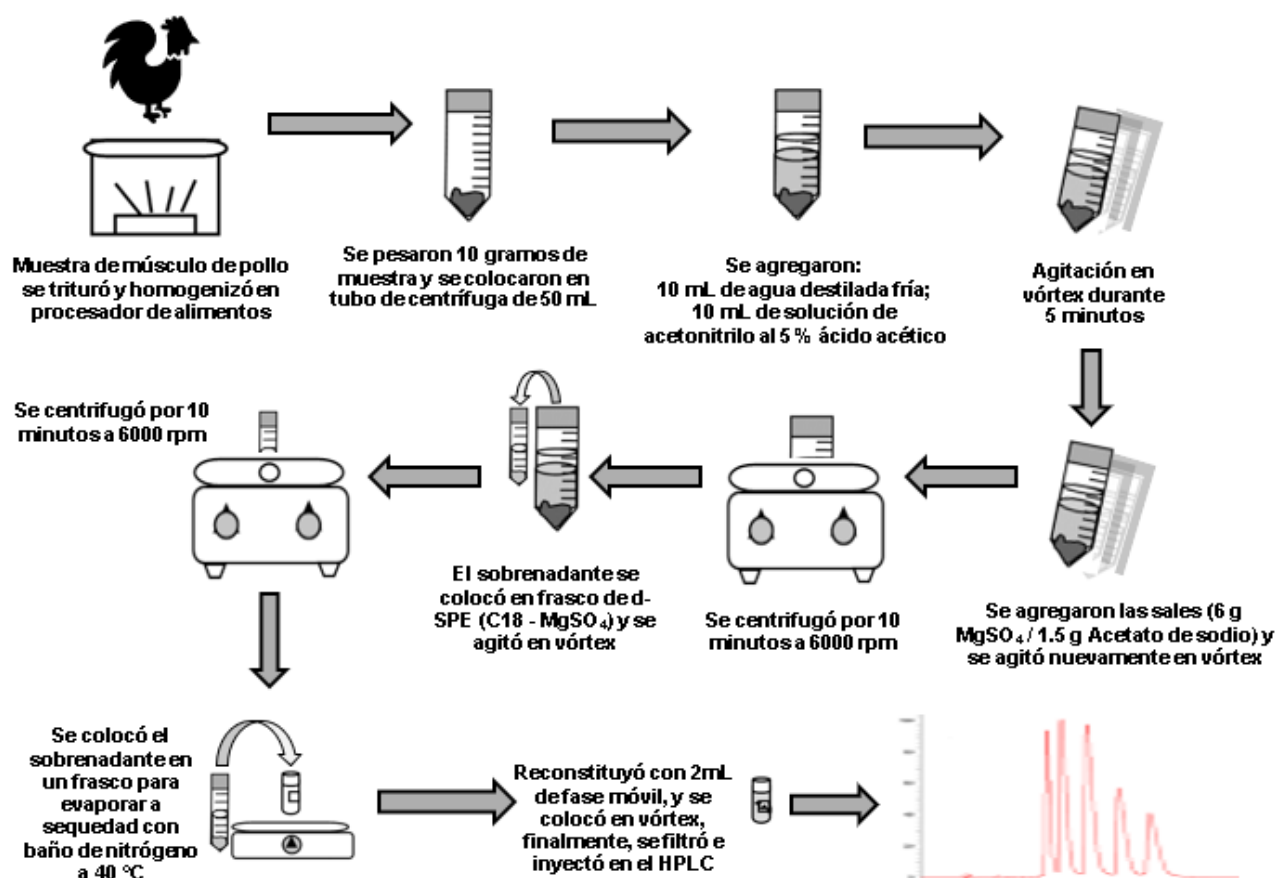


Fig. 3 Procedimiento QuEChERS optimizado (Elaboración propia)

of Pesticides 2020). Se estudiaron parámetros analíticos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia, veracidad, a través de estudios de recuperación, así como la selectividad.

Linealidad: Una recta de calibración a seis (6) niveles de concentración, preparada con muestras de músculo blanco fortificadas en un rango de 1000 a 50 $\mu g Kg^{-1}$ fue preparada, pesando seis muestras de 10 g, agregando volúmenes de 1.0, 0.8, 0.5, 0.25, 0.1 y 0.05 mL de una solución de trabajo 10 mg L^{-1} . Luego se adicionó, a cada uno de estas, una cantidad constante de la solución de Norfloxacina (estándar interno). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en vórtex durante 30 segundos y en reposo por 5 minutos.

Finalmente, fueron sometidas al procedimiento optimizado de la Fig. 3. Las soluciones resultantes fueron inyectadas por duplicado en el instrumento (replicas instrumentales).

Límites de detección y cuantificación: Dos muestras de músculo de pollo fueron fortificadas a bajas concentraciones, 50 y 25 $\mu g Kg^{-1}$, y sometidas al procedimiento antes detallado. El límite de detección se obtuvo mediante el cálculo de la relación señal/ruido siendo igual a 3, y para el límite de cuantificación, aquel nivel de concentración más bajo para el cual se demuestre que se cumplen los criterios de exactitud y precisión.

Precisión: La repetibilidad y reproducibilidad intermedia fueron evaluadas. En el caso de la primera,

las muestras fueron fortificadas a una concentración elevada ($500 \mu\text{g Kg}^{-1}$), intermedia ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) y baja ($50 \mu\text{g Kg}^{-1}$), con un total de tres replicas para cada nivel de concentración. Las muestras se analizaron en las menores condiciones de variación (mismo día, instrumento y analista). La precisión intermedia fue evaluada de igual forma, pero en días diferentes. Se obtuvieron los porcentajes de analito recuperado, mediante interpolación de las señales de área de las muestras, en la curva de calibración preparada para la linealidad. En ambos casos, el criterio de aceptación utilizado fue una desviación estándar relativa (DER) de los valores de recuperación menor a 15 %.

Exactitud: Se evaluó mediante la recuperación a tres niveles de concentración, 50, 100 y $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ con valores entre 70 y 110 % como criterio de aceptación. Las muestras fortificadas con los analitos fueron sometidas al procedimiento analítico desarrollado, y se calculó la concentración obtenida de forma similar a la precisión. Los porcentajes de recuperación fueron obtenidos de acuerdo con la Ec. 1:

$$\% \text{ Rec} = \left(\frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración teórica fortificada}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Selectividad: El espectro de absorción de los picos obtenidos de muestras fortificadas y muestras de músculo comerciales fueron comparados con los correspondientes espectros de absorción de los patrones analizados con el método desarrollado.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Optimización de la separación cromatográfica

De acuerdo con trabajos previos en la literatura (Moghadam et al. 2018; Jammoul y El Darra 2019), el mecanismo de fase reversa ha sido utilizado, empleando columnas de baja polaridad, como ser C18 y C8, las cuales pueden presentar elevados factores

de coleo debido a la presencia de grupos silanoles libres residuales. Una opción para evitar este efecto puede ser utilizar columnas con mecanismos de reducción de coleo denominadas “endcapped” o con desactivación terminal. Como se ha mencionado antes, las quinolonas estudiadas, a excepción de la flumequina, poseen propiedades Zwitteriónicas por la presencia de grupos carboxílico y piperazinil, con valores de pKa entre 5.5 y 6.6 (pKa 1) y entre 7.2 y 8.9 (pKa 2). Por esta razón, la separación con fases acuosas acidificadas con valores por debajo de pH 4 resultará en mejores separaciones al evitar la ionización de los compuestos. Con relación a los solventes orgánicos, la utilización de metanol, de menor costo que acetonitrilo, presenta la ventaja de no interferir con la señal de absorbancia máxima de los analitos. Es preciso señalar la diferencia de polaridades de los compuestos, especialmente de la flumequina, que es prácticamente insoluble en agua, por lo que es necesario realizar la separación mediante gradiente de la composición de la fase móvil.

Empleando una columna C8 con desactivación terminal, se realizaron pruebas con dos soluciones acuosa: una solución tampón de citrato de amonio pH 4.5 y una solución de ácido acético 0.1M pH 2.8. Se obtuvieron mejores resultados con la de valor de pH más bajo que con la solución tamponada; esto se puede dar debido a que los valores más bajos de pH se alejan de los valores de pKa de los compuestos (Fig. 1), evitando la ionización de las moléculas y el subsecuente apareamiento de picos quebrados y/o coelución. Las condiciones del gradiente señaladas en la sección 2.3 mostraron una adecuada separación de los analitos, sobre todo de los primeros tres, donde se observaba una mayor coelución. La elución de la flumequina solo fue posible cuando se incrementó el porcentaje de metanol hasta un 100 % pasados los 18 minutos. Adecuadas presiones fueron observadas trabajando a un flujo de 1 mL min^{-1} , mientras que

la longitud de onda de máxima absorción de los compuestos se establece en 280 nm. En el caso de la flumequina, una mayor intensidad se obtiene a 250 nm, lo que posibilita disminuir los límites de detección instrumental.

Finalmente, se obtuvo la linealidad instrumental para todos los compuestos, para lo cual se prepararon soluciones con concentraciones entre 10.0 y 0.05 mg L⁻¹, y procesando en el equipo con las condiciones optimizadas. Mejores resultados de linealidad fueron observados al utilizar estandarización con estándar interno, utilizando norfloxacin que fue el primer compuesto en eluir. La Tabla 1 muestra el resumen de los resultados alcanzados para cada compuesto.

3.2 Optimización del procedimiento QuEChERS

En esta parte, se estableció un procedimiento base para ir optimizando cada una de las etapas, empleando diferentes variables. En cada caso, muestras de músculo fueron fortificadas y se calcularon los valores de recuperación, utilizando el método tradicional de experimentación: variar-un-factor-cada-vez (VUFCV) (Ferré y Rius 2002). Tres kits de sales fueron estudiados: (a) la mezcla de sulfato de magnesio y cloruro de sodio, que no regula el pH; (b) sales de sulfato de magnesio

y acetato de sodio, con una regulación de valor de pH de 4.8; y (c) la mezcla que contiene sales de citrato, con pH entre 5 y 5.5. Se emplearon 8 mL de agua y 2 mL de acetonitrilo, sin utilizar la d-SPE. En el caso de la prueba con acetato, a los 2 mL de acetonitrilo, se agregaron 0.2 mL de ácido acético glacial.

Debido a los valores de pKa de los compuestos de interés, al trabajar a valores de pH más bajos, existirá una menor ionización de estos, lo que incrementa su solubilidad en el solvente extractor. Esto explica que mejores recuperaciones fueron obtenidas con las sales de acetato, como se muestra en la Fig. 4. Los compuestos de mayor polaridad son los que menor recuperación presentan para todas las sales empleadas, y la flumequina es la de mejor recuperación.

Con la intención de alcanzar límites de detección requeridos en los métodos para residuos en matrices alimenticias, es necesario procesar una mayor cantidad de muestra. Sin embargo, cuanto mayor cantidad de muestra, mayor será la presencia de impurezas en los extractos, lo que afectará directamente a la sensibilidad del análisis. En ese sentido, pruebas fueron realizadas con 5 y 10 g de músculo triturado y empleando 8 mL de agua, 2 mL de acetonitrilo, y 0.2 mL de ácido acético glacial como solventes de extracción. Bajos

Tabla 1 Linealidad instrumental para las quinolonas estudiadas

Compuesto	Ecuación lineal ± d.s b + a x (n=10)	r	r ²	Rango lineal	Límite de detección
ciprofloxacina	(0.0162 ± 0.017) + (0.1527 ± 0.003) x	0.99836	0.9967	10 - 0.1	0.05
danofloxacina	(0.0259 ± 0.020) + (0.1748 ± 0.003) x	0.99874	0.9975	10 - 0.1	0.05
difloxacina	(0.0025 ± 0.008) + (0.1248 ± 0.002) x	0.99916	0.9983	8 - 0.1	0.05
sarafloxacina	(0.0074 ± 0.007) + (0.0911 ± 0.001) x	0.99925	0.9985	10 - 0.1	0.1
flumequina	(0.0018 ± 0.005) + (0.1118 ± 0.002) x	0.99933	0.9987	8 - 0.05	> 0.05

Concentraciones en mg L⁻¹. d.s.: desviación estándar. r: coeficiente de correlación; r²: coeficiente de determinación

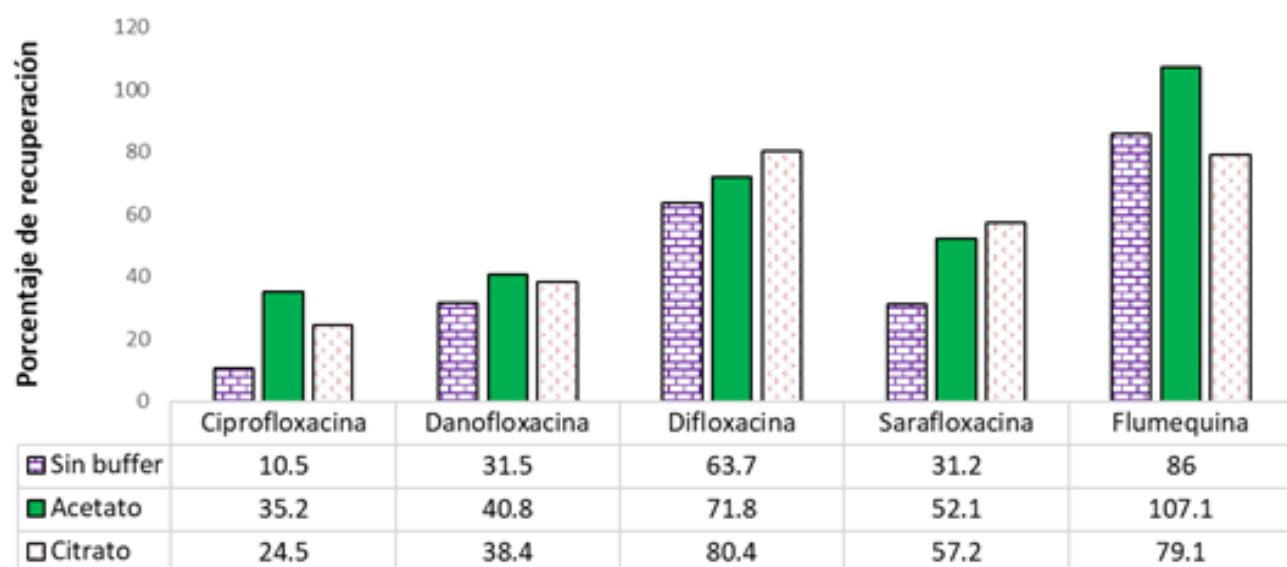


Fig. 4 Recuperaciones encontradas en la optimización de las sales del procedimiento QuEChERS

valores de recuperación fueron obtenidos para ambos casos, lo que pudo deberse a una insuficiente cantidad de solvente extractor. Por ello, en los siguientes experimentos se decidió utilizar 10 mL de agua y 5 mL de acetonitrilo con 0.5 mL de ácido acético. Mejores resultados fueron obtenidos en la formación de las fases de extracción líquido-líquido cuando se utilizó agua fría, con valores de recuperación similares con 5 y 10 g de muestra. Sin embargo, se observó mayor cantidad de impurezas en el extracto con la prueba de 10 g, por lo que la siguiente etapa es la optimización de la d-SPE.

Fortificando 10 g de músculo de pollo y aplicando el método con las condiciones optimizadas hasta el momento, 10 mL de agua, 0.5 mL de ácido acético, 5 mL de acetonitrilo y las sales de acetato, el extracto obtenido después de centrifugar fue colocado en tubo de plástico de 15 mL que contiene una mezcla de sulfato de magnesio y C18. Los resultados mostraron un importante incremento en la recuperación para los analitos de mayor polaridad, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina y sarafloxacina; para el caso de la flumequina, disminuyó hasta un 71 %,

como muestra la Fig. 5. Si bien la incorporación de la etapa d-SPE mejora para casi todos los compuestos, para incrementar la extracción de flumequina es adecuado utilizar una mayor cantidad de acetonitrilo, pasando de 5 a 9.5 mL y acidificando con 0.5 mL del ácido acético glacial. Al repetir la prueba con esta modificación, los porcentajes de los compuestos de mayor polaridad se mantuvieron y el porcentaje de flumequina se vio incrementado hasta un 92 %.

Algunas condiciones menores, como tiempo de centrifugación y uso de temperatura en la evaporación del extracto, también fueron evaluadas, de forma que se logre disminuir el tiempo de preparación de las muestras. Se establecieron 10 minutos para las dos etapas de centrifugación, y aplicar una temperatura de 40 °C al evaporar el extracto después de la d-SPE redujo el tiempo sin disminuir los porcentajes de recuperación. Finalmente, se ejecutó una prueba empleando acetona como solvente en lugar de acetonitrilo, pero más impurezas fueron observadas en el cromatograma resultante, descartando dicha modificación y estableciendo el procedimiento de la Fig. 3.

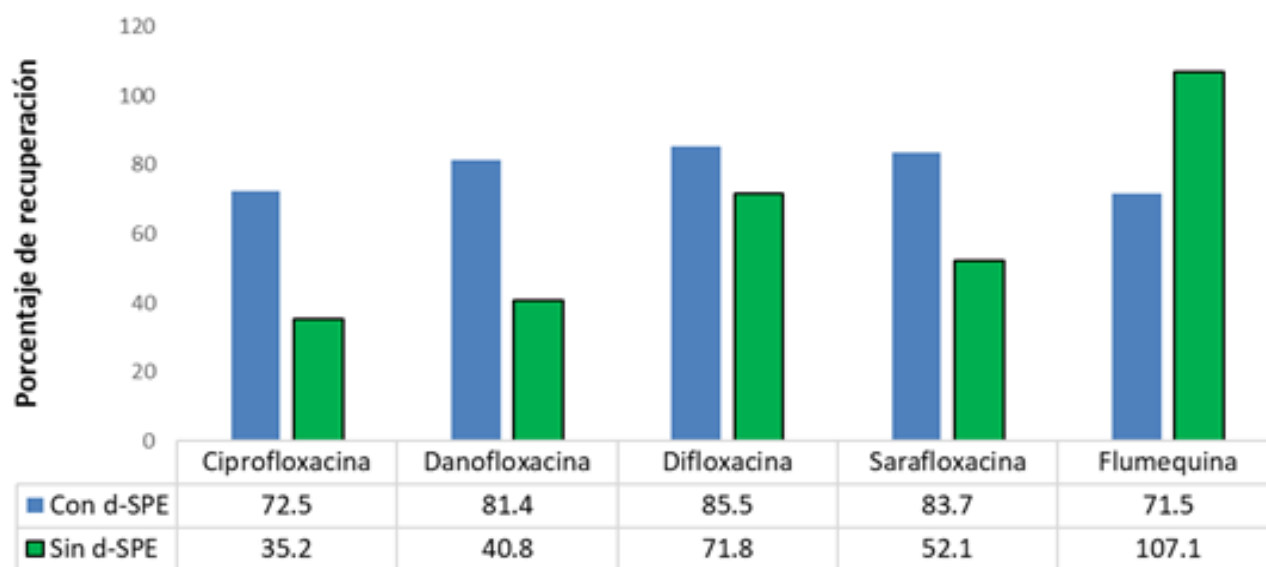


Fig. 5 Recuperaciones en la optimización de la etapa d-SPE

3.3 Parámetros analíticos

Siguiendo los experimentos establecidos en la sección 2.6, el desempeño del método fue evaluado. La Tabla 2 muestra el resumen de los resultados obtenidos en la linealidad y límites de detección y cuantificación. Se observan adecuados valores de coeficiente de determinación (> 0.990), en un rango de 1000 a 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para todos los compuestos quinolónicos, a excepción de la flumequina con una concentración menor de 25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Los límites de detección del método estuvieron por

debajo del valor LMR establecidos por la normativa de la Unión Europea y el Codex Alimentarius para todos los analitos, a excepción de la sarafloxacina, la cual, según el Codex Alimentarius, posee un LMR de 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, con un límite de detección del método desarrollado igual a 25 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Es decir, el método es capaz de cumplir con las normativas utilizadas. La desviación estándar relativa (DER) de los porcentajes de recuperación obtenidos para la evaluación de la precisión del método fueron menores a 15 % para todos los compuestos (Tabla 3), siendo estos valores

Tabla 2 Resultados de la evaluación de linealidad, límite de detección y límite de cuantificación

Compuesto	Rango de Calibración ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Coficiente de determinación (R^2)	Límite de detección ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
ciprofloxacina	1000 - 50	0.991	25	50
danofloxacina	1000 -50	0.992	25	50
difloxacina	1000 -50	0.990	25	50
sarafloxacina	1000 -50	0.995	25	50
flumequina	1000 - 25	0.998	< 25	25

Tabla 3 Estudio de la precisión del método

Compuesto	Repetibilidad			Reproducibilidad intermedia		
	50	100	500	50	100	500
ciprofloxacina	10.4	10.9	5.7	8.8	9.9	7.9
danofloxacina	7.5	10.9	6.2	6.1	8.6	5.4
difloxacina	8.7	6.0	5.2	6.3	5.6	4.7
sarafloxacina	6.8	6.8	7.9	6.0	4.8	5.9
flumequina	4.8	5.9	7.3	3.8	5.8	6.0

Valores de desviación estándar relativa (DER) con $n = 3$. Concentraciones evaluadas en unidades de $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Tabla 4 Recuperación del método

Compuesto	Rangos de recuperación (%) \pm desviación estándar		
	$50 \mu\text{g Kg}^{-1}$	$100 \mu\text{g Kg}^{-1}$	$500 \mu\text{g Kg}^{-1}$
ciprofloxacina	$(58.3 - 72.7) \pm 5.8$	$(62.9 - 83.2) \pm 7.4$	$(65.2 - 82.5) \pm 5.9$
danofloxacina	$(77.7 - 90.2) \pm 5.2$	$(68.3 - 85.7) \pm 6.9$	$(80.9 - 94.4) \pm 4.7$
difloxacina	$(80.8 - 95.9) \pm 5.7$	$(85.5 - 99.2) \pm 5.1$	$(85.7 - 95.6) \pm 4.3$
sarafloxacina	$(81.9 - 96.4) \pm 5.3$	$(83.1 - 95.2) \pm 4.3$	$(84.9 - 99.0) \pm 5.4$
flumequina	$(87.7 - 97.3) \pm 3.5$	$(88.2 - 105.8) \pm 5.6$	$(92.9 - 108.0) \pm 5.9$

Rangos de recuperación ($n = 6$)

más altos a bajas concentraciones, como es de esperar.

Finalmente, en el caso de la exactitud, los porcentajes de recuperación alcanzados cumplieron los criterios establecidos por la guía de validación utilizada, con valores de recuperación entre 70 y 110 % para todos los compuestos, a excepción de la ciprofloxacina con un porcentaje promedio de 66 % a concentración baja, como se muestra en la Tabla 4. Esto puede explicarse debido a la elevada polaridad de la molécula.

3.4 Análisis de muestras

La aplicabilidad del método desarrollado se evaluó analizando las 36 muestras obtenidas. Únicamente se encontró flumequina en las muestras correspondientes a los meses de noviembre y febrero en una de las marcas comerciales. Los espectros de absorción de los picos cromatográficos encontrados en estas muestras fueron comparados con el espectro de absorción de la flumequina patrón, pudiendo observarse una coincidencia en las longitudes máximas de absorción

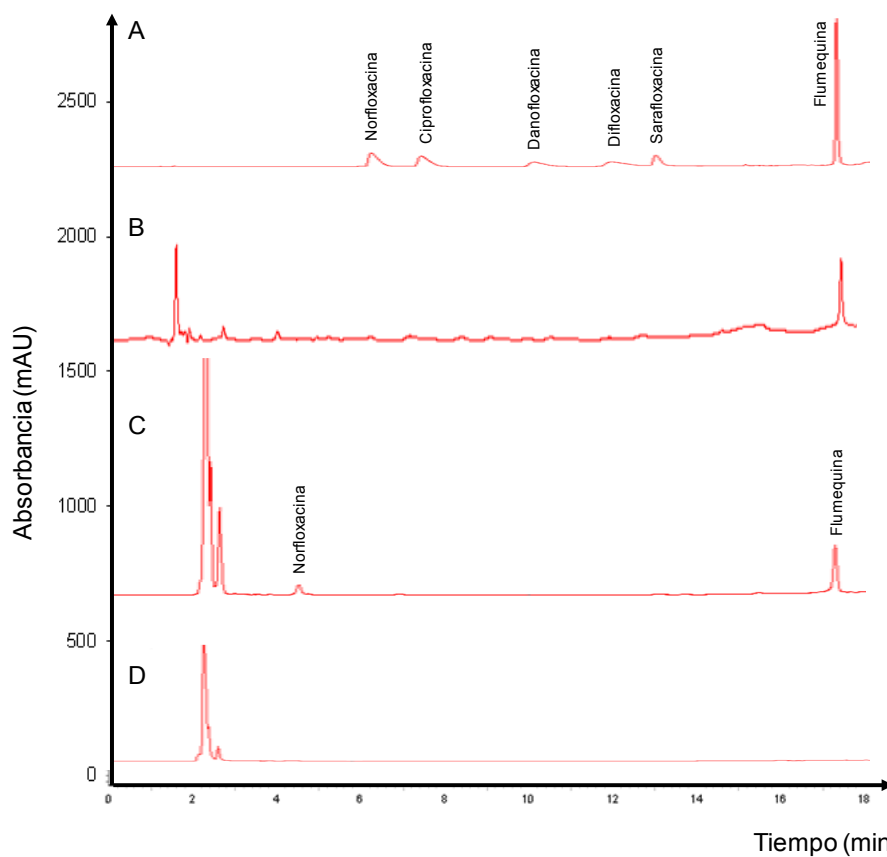


Fig. 6 A: Solución patrón $500 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (250 nm), B: Muestra fortificada a $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (250 nm), C: Muestra comercial (250 nm), D: Blanco de muestra.

Tabla 5 Concentraciones de quinolonas encontradas en las muestras y LMR establecidos por las normativas internacionales

Compuesto	Muestra noviembre 2017	Muestra febrero 2018	LMR (Codex Alimentarius)	LMR (Unión Europea)
ciprofloxacina	No se detectó	No se detectó	No establecido	100 ^a
danofloxacina	No se detectó	No se detectó	200	200
difloxacina	No se detectó	No se detectó	No establecido	300
sarafloxacina	No se detectó	No se detectó	10	No establecido ^b
flumequina	13.1	12.8	500	400

Concentraciones en $\mu\text{g Kg}^{-1}$

^a Suma de ciprofloxacina + enrofloxacin

^b Establecido para piel ($10 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e hígado ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$)

(246 nm), así como las formas espectrales. Los cromatogramas obtenidos durante el análisis de estándares, muestra control, muestra fortificada y muestra comercial son presentadas en la Fig. 6.

Las concentraciones de flumequina de las muestras, cuantificadas mediante la curva de calibración en el rango de trabajo, fueron inferiores a los LMR establecidos por el Codex Alimentarius y la normativa de la Unión Europea, como se muestra en la Tabla 5.

4 CONCLUSIONES

La aplicación del método QuEChERS para la extracción y concentración de antibióticos quinolónicos en muestras de músculo de pollo demostró buenos resultados en términos de exactitud (con adecuados valores de recuperación), correcta precisión (bajos valores de desviación estándar relativa), adecuada linealidad (valores de coeficiente de correlación por encima de 0.90), y con límites de detección por debajo de los LMR establecidos por normativas vigentes para estos compuestos. En cuanto a la separación cromatográfica, los seis compuestos analizados eluyeron en menos de 18 minutos con una buena eficiencia, resolución y selectividad, empleando una columna C8 con desactivación terminal. Las 36 muestras de músculo de pollo fueron analizadas con el método propuesto, encontrándose trazas de flumequina en dos de ellas, en ambos casos con concentraciones por debajo de las concentraciones permitidas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación Científica y Posgrado, DICyP (ahora Dirección de Investigación Científica, Humanística y Tecnológica, DICIHT) de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras por el financiamiento otorgado mediante Beca

Sustantiva de Investigación 01-2016-II convocatoria. También expresan gratitud a la Facultad de Química y Farmacia por el soporte para el desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. doi: 10.1093/jaoac/86.2.412
- Andreu, V., Blasco, C., & Picó, Y. (2007). Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 534-556. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.010
- Benameur, Q., Tali-Maamar, H., Assaous, F., Guettou, B., Boutaiba Benklaouz, M., Rahal, K., & Ben-Mahdi, M. H. (2018). Characterization of quinolone-resistant Enterobacteriaceae strains isolated from poultry in Western Algeria: First report of *qnrS* in an *Enterobacter cloacae*. *Veterinary World*, 11(4), 469-473. doi: [10.14202/vetworld.2018.469-473](https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.469-473)
- EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (2020). Working document on pesticides to be considered for inclusion in the national control programmes to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides residues in and on food of plant and animal origin. Accesado 11 de mayo de 2020. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_12745.pdf
- FAO/WHO (s.f.). Codex Alimentarius: Normas Internacionales de los Alimentos. Accesado 11 de mayo del 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drugs/es/>
- Ferré, J. & Rius, F. (2002) Introducción al diseño estadístico de experimentos. *Técnicas de Laboratorio -Barcelona-*, 648-653. Accesado 11 de mayo de 2020. Disponible en: http://www.quimica.urv.es/quimio/index.php?option=com_

- content&view=article&id=20&Itemid=22&lang=en
- Ferreira, J. C., Penha Filho, R. A. C., Kuaye, A. P. Y., Andrade, L. N., Junior, A. B., & da Costa Darini, A. L. (2018). Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae isolated from healthy poultry in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 60, 66-70. doi: [10.1016/j.meegid.2018.02.003](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.003)
- Hassouan, M. (2006). *Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada, España.
- Hernández-Arteseros, J. A., Barbosa, J., Compano, R., & Prat, M. D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *Journal of Chromatography A*, 945(1-2), 1-24 doi: [10.1016/S0021-9673\(01\)01505-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01505-9)
- Jammoul, A., & El Darra, N. (2019). Evaluation of antibiotics residues in chicken meat samples in Lebanon. *Antibiotics*, 8(2), 69. doi: [10.3390/antibiotics8020069](https://doi.org/10.3390/antibiotics8020069)
- Jiménez-Lozano, E., Marqués, I., Barrón, D., Beltrán, J. L., & Barbosa, J. (2002). Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 464(1), 37-45. doi: [10.1016/S0003-2670\(02\)00435-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00435-X)
- Mąka, Ł., Maćkiw, E., Stasiak, M., Wołkowicz, T., Kowalska, J., Postupolski, J., & Popowska, M. (2018). Ciprofloxacin and nalidixic acid resistance of Salmonella spp. isolated from retail food in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 1-4. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.012](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.012)
- Mella, S., Acuña, G., & Muñoz, M. (2000). Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Revista Chilena de Infectología* 17(1): 53-66. doi: [10.4067/S0716-10182000000100008](https://doi.org/10.4067/S0716-10182000000100008)
- Moghadam, N. R., Arefhosseini, S. R., Javadi, A., Lotfipour, F., Ansarin, M., Tamizi, E., & Nemati, M. (2018). Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Five Different Kinds of Chicken Tissues by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with HPLC. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 17(4), 1182-1190.
- Rodríguez, A., Martínez, Y., & Ponce, H. (2016). Desarrollo y validación de un método para cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante HPLC-DAD utilizando una variación del método QuEChERS. *Portal de la Ciencia*, 11, 70-89. doi: [10.5377/pc.v11i0.4267](https://doi.org/10.5377/pc.v11i0.4267)
- Takatsuki, K. (1992). Gas chromatographic/mass spectrometric determination of oxolinic, nalidixic, and piromidic acid in fish. *Journal of AOAC International*, 75(6), 982-987. doi: [10.1093/jaoac/75.6.982](https://doi.org/10.1093/jaoac/75.6.982)
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., & Rozo-Núñez, W. (2014). Contemporary analytical techniques to identify residues of sulfonamides, quinolones and chloramphenicol. *Universitas Scientiarum*, 19(1), 11-28. doi: [10.11144/Javeriana.SC19-1.taci](https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci)
- U.S Food and Drug Administration (s.f.). Guidances (Drugs). Accesado el 11 de mayo de 2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances>
- Unión Europea (2010). Commission Regulation EU/37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 15, 1-72