

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“EVALUACIÓN DE NANOMATERIALES Y
SISTEMAS FLUORESCENTES PARA LA
DETECCIÓN DE RESIDUOS DE
TETRACICLINA”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MARÍA GARCÍA SUÁREZ

JULIO, 2015



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Elena Díaz García por su interés, dedicación y ayuda que me han permitido llevar a cabo este proyecto.

A los Doctores Rosana Badía Laíño y Alfonso Fernández González por sus conocimientos y ayuda durante la evolución de este proyecto.

A los servicios científico-técnicos de la Universidad de Oviedo.

A mis compañeros de laboratorio Marian, Tere, Jorge, Christian y Jing por haberme acogido tan bien y por haberme ayudado siempre que los he necesitado.

A “los incomprensidos” por todos los buenos momentos: las risas tontas, los mil y un cafés, los chistes malos y no tan malos, por los ¿Cómo vais ho? ¡Yo regular! ¡Yo mal! ¡Yo fatal! ¡Pues yo peor!, en fin, porque con mejores compañeros y amigos no podría haberme encontrado.

Y por último, a mis padres, a mis hermanos y más especialmente a mis abuelos por apoyarme siempre en cada paso que he ido dando, por guiarme, por tantos y tan buenos consejos, por estar.

INDICE:

Resumen.....	A
Abstract.....	B
Lista de Figuras.....	C
Lista de tablas.....	E
1. – Introducción	
1.1.- Importancia del uso de antibióticos en la ganadería.....	1
1.2.- Objetivos del presente proyecto.....	3
2. - Consideraciones teóricas y experimentales	
2.1.- Antibióticos: presencia en alimentos y grupos más importantes.....	4
2.2.- Técnicas clásicas de detección de antibióticos.	
2.2.1.- Técnicas cromatográficas.....	8
2.2.2.- Biosensores.....	9
2.2.3.- Técnicas microbiológicas.....	9
2.2.4.- Técnicas inmunológicas.....	11
2.3.- Métodos basados en el empleo de nanomateriales.....	14
2.3.1.- Nanopartículas de oro (AuNPs).....	16
2.3.2.- Nanopartículas de carbono.....	18
2.3.3.- Otras nanopartículas.....	19
2.3.4.- Materiales biomiméticos.....	20
3. – Metodología	
3.1.- Reactivos y disoluciones.....	22
3.2.- Instrumentación analítica.....	22

3.3.- Utillaje de laboratorio.....	23
3.4.- Síntesis nanopartículas de sulfuro de zinc.....	23
3.5.- Síntesis de nanopartículas de ZnS dopadas con europio (ZnS-Eu).....	24
3.6.- Estudio de la morfología de las nanopartículas.....	24
3.7.- Estudio de la absorción al infrarrojo de las nanopartículas.....	25
3.8.- Estudio de las características luminiscentes de las nanopartículas.....	25
3.9.- Características luminiscentes de la tetraciclina y de sus complejos con el europio y el terbio.....	25
3.10.- Análisis de la capacidad de retención de Tc de las nanopartículas ZnS-Eu.....	25
3.11.- Influencia del pH en la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb....	26
3.12.- Cinética de formación del complejo Tc-Tb.....	26
3.13.- Tratamiento previo de la leche.....	26
3.14.- Influencia del pre-tratamiento de la muestra sobre la extracción de la Tc.....	27
3.15.- Determinación de Tc en leche por formación del complejo Tc-Tb.....	27

4. - Resultados y discusión

4.1.- Características espectrales FTIR de las nanopartículas de ZnS.....	28
4.2.- Características luminiscentes de las nanopartículas de ZnS.....	28
4.3.- Caracterización morfológica por TEM de las nanopartículas de ZnS.....	29
4.4.- Características espectrales FTIR de las nanopartículas de ZnS-Eu.....	30
4.5.- Propiedades fotoluminiscentes de nanopartículas de ZnS-Eu.....	31
4.6.- Caracterización morfológica de las nanopartículas de ZnS-Eu.....	32

4.7.- Características fluorescentes de la tetraciclina.....	32
4.8- Características fluorescentes del complejo Tetraciclina-Europio.....	34
4.9.- Interacción de las nanopartículas de ZnS-Eu con Tc en disolución acuosa.....	35
4.10.- Características luminiscentes del terbio y de su complejo con tetraciclina.....	38
4.11.- Cinética formación complejo Tc-Tb.....	39
4.12.- Influencia del pH en la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb....	40
4.13.- Ensayos de detección de Tetraciclina mediante disolución de Terbio en leche.....	41
5. – Conclusiones.....	45
6.- Sugerencias para estudios posteriores.....	46
7.- Bibliografía.....	47

RESUMEN

Existen diversas técnicas analíticas para la detección de residuos de antibióticos en alimentos, pero muchas de ellas presentan importantes desventajas que derivan en la necesidad de buscar nuevos métodos más sensibles, selectivos, rápidos y económicos.

Recientemente, en el área de los nanomateriales se está haciendo un gran esfuerzo investigador con el objetivo de desarrollar nuevos métodos de análisis basados en las especiales características físico-químicas que poseen, en particular, las nanopartículas de óxidos metálicos, como pueden ser una gran área superficial, características luminiscentes notables, capacidad de catálisis, etc. Asimismo, las técnicas luminiscentes ofrecen una especial sensibilidad y selectividad en el desarrollo de nuevos métodos de análisis.

En el presente proyecto hemos abordado dos líneas de trabajo. Por una parte, la evaluación de nanopartículas de ZnS y de nanopartículas de ZnS dopadas con Eu (III), como medio para retener tetraciclina en disolución. La posibilidad de interacción de la tetraciclina con la superficie de las nanopartículas (a través de la formación del complejo tetraciclina-Zn) y las características luminiscentes del sistema, han sido la base de la hipótesis de trabajo.

Por otra parte, también hemos evaluado la posibilidad de utilizar el complejo tetraciclina-terbio como sistema luminiscente para la determinación de tetraciclina en muestras de leche, una vez separado el antibiótico de la muestra. Hemos tomado como modelo, la tetraciclina puesto que es uno de los antibióticos más utilizados en el ámbito veterinario y ganadero, siendo la detección en leche la finalidad principal de estos estudios por ser el sector lechero uno de los sectores alimentarios de mayor relevancia a nivel mundial y que más ha ido aumentando en los últimos años.

ABSTRACT

There are different analytical techniques to determine antibiotic residues in food; however, many of them have important drawbacks that prompt to search for new methods highly sensitive, selective, cheap and faster.

Recently, in the nanomaterials area, a great research effort is being done with the aim to develop new analytical methods based on the unique physical and chemical characteristics of the nanomaterials, particularly metal oxide nanoparticles, such as the large surface area, the luminescent properties, catalyst properties, among others. Also, luminescent techniques offer sensitivity and selectivity for developing new analytical methods.

In the present project, two working lines have been addressed. Firstly, we performed the evaluation of ZnS nanoparticles and Eu (III) doped ZnS nanoparticles with the aim to retain tetracycline in solution. The possibility of interaction of tetracycline with the nanoparticle surface (through the formation of tetracycline-Zn complex) and the intrinsic luminescent properties of the system were the base of the hypothesis. On the other hand, we have also evaluated the tetracycline-terbium complex as luminescent system for tetracycline determination in milk samples, once the antibiotic was extracted from the samples.

We have use tetracycline as model antibiotic as it is one of the most used in the veterinary and livestock and milk as model sample as the daily market is one of the most worldwide relevant and developed in the last years.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de determinadas familias de antibióticos en los alimentos.....	2
Figura 2: Crecimiento de la demanda mundial de lácteos entre 1996-2011.....	3
Figura 3: Estructura química de antibióticos β -lactámicos.....	4
Figura 4: Estructura química de un antibiótico aminoglucósido.....	5
Figura 5: Estructura básica de la Eritromicina.....	6
Figura 6: Estructura de la Tetraciclina.....	6
Figura 7: Estructura química de las sulfonamidas.....	7
Figura 8: Antibióticos derivados del ácido di-cloro-acético.....	7
Figura 9: Principales métodos de antibióticos en alimentos.....	8
Figura 10: Test de inhibición de crecimiento de microorganismos.....	10
Figura 11: Antibiograma múltiple.....	11
Figura 12: Ensayo ELISA competitivo indirecto para tetraciclina.....	12
Figura 13: Protocolo para el análisis rápido de tetraciclinas empleando el ParallaxTMTetracyclines Test Kit.....	13
Figura 14: Clasificación de nanomateriales de acuerdo a su forma y dimensiones.....	15
Figura 15: Nanopartículas de oro.....	16
Figura 16: Esquema de reconocimiento de antibiótico en función del color de las AuNPs y la cantidad de antibiótico.....	18
Figura 17: Nanopartículas de carbono.....	19
Figura 18: Esquema general de síntesis de un polímero molecularmente impreso.....	21
Figura 19. Microscopio Electrónico de Transmisión. Jeol 2000 EX – II.....	24
Figura 20. Espectro de absorción FTIR de nanopartículas de ZnS.....	28

Figura 21. Espectro de emisión de las nanopartículas de ZnS.....	29
Figura 22. Morfología de las nanopartículas de ZnS.....	30
Figura 23. Espectro de absorción FTIR de nanopartículas de ZnS dopadas con europio. [Eu], M.....	31
Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia de nanopartículas de ZnS dopadas con europio.....	31
Figura 25. Nanopartículas de ZnS-Eu.....	32
Figura 26. Estructura química de la tetraciclina totalmente protonada.....	33
Figura 27. Espectros de excitación y de emisión de la tetraciclina en medio acuoso a pH 6.....	33
Figura 28. Espectro de emisión y de excitación del complejo Tc-Eu ⁺³	34
Figura 29. Esquema del proceso de excitación de la Tc, de transferencia de energía al europio y desactivación radiacional del mismo.....	35
Figura 30. Intensidad de fluorescencia vs tiempo de reacción de la disolución de Tc en contacto con nanopartículas de ZnS dopadas con Eu ⁺³	36
Figura 31. Formación del complejo Tc-Zn sobre la superficie de nanopartículas de ZnS dopadas con Eu ⁺³	37
Figura 32. Espectro de excitación y de emisión del ión Tb ⁺³ en disolución reguladora de pH6.....	38
Figura 33. Espectros de excitación y de emisión del complejo Tc-Tb en medio acuoso a pH 6.....	39
Figura 34. Fluorescencia del complejo Tc-Tb en función del tiempo de reacción.....	40
Figura 35. Influencia del pH en las características espectrales del complejo Tc-Tb.....	41
Figura 36. Línea de calibrado para Tc.....	42
Figura 37. Línea de calibrado para el complejo Tc-Tb.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos representativos de los diferentes antibióticos β -lactámicos.....	4
Tabla 2: Ensayos microbiológicos comerciales para la detección de antibióticos.....	10
Tabla 3: Comparación de los límites máximos de residuos de tetraciclinas para diferentes ensayos.....	14
Tabla 4: Lista de propiedades de las AuNPs y sus aplicaciones.....	17
Tabla 5: Sistemas de análisis para antibióticos mediante el uso de nanopartículas.....	20
Tabla 6. Constante de formación de complejos Tc-Zinc en medio acuoso.....	37
Tabla 7. Intensidades de fluorescencia de la Tc medidas en el sobrenadante, tras el tratamiento de las muestras de leche.....	42
Tabla 8. Intensidades de fluorescencia el complejo Tc-Tb medidas en el sobrenadante, tras el tratamiento de las muestras de leche.....	44

1.-INTRODUCCION

1.1. Importancia del uso de antibióticos en la ganadería

Los antibióticos son compuestos orgánicos que se caracterizan por ser tóxicos, letales e inhibidores del crecimiento de ciertos microorganismos. En función de la capacidad del antibiótico de afectar a las distintas especies de microorganismos pueden clasificarse en antibióticos de amplio espectro, cuando actúan sobre múltiples especies de bacterias, o de espectro restringido cuando actúan solo sobre unas pocas especies.

En los últimos años, estas sustancias se han convertido en un pilar importante para el tratamiento de enfermedades tanto en la medicina humana como en la veterinaria, sector este último en el que debido principalmente al aumento del número de industrias cárnicas y lecheras y, por tanto, al aumento de las exigencias de producción, se ha producido un incremento en la tendencia de administrarlos de forma habitual, en muchos de los casos por vía directa (inyecciones intravenosas y/o intramusculares), generalmente para los casos de prevención de las enfermedades bacterianas más comunes y también como aditivos en las comidas y en las aguas destinadas al consumo del animal, de forma que actúen como promotores del crecimiento del animal favoreciendo el control de la flora bacteriana, lo que deriva en un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable del peso con la consiguiente mejora en la producción y por tanto, en la competencia en los mercados.

Además de este uso indiscriminado e irracional de antibióticos por parte de determinados sectores, motivado principalmente por razones económicas, también destacan aquellos casos en los que los encargados de administrar los antibióticos desconocen los efectos que puede ocasionar su uso descontrolado como puede ocurrir, por ejemplo, en el caso de los responsables de pequeñas ganaderías.

Otro de las causas más destacadas y que finalmente derivan en la presencia de antibióticos en los alimentos es el uso prolongado en el tiempo de dichos antibióticos respecto al tiempo recomendado por los especialistas o, en el caso de la ganadería lechera, el no respetar los períodos de cuarentena diseñados para la correcta eliminación de los restos de antibióticos a través de la leche con lo que el consumidor se expone al consumo de leche con concentraciones de antibióticos potencialmente peligrosas.

Este uso excesivo de antibióticos en animales destinados al consumo humano, está generando una gran preocupación en las instituciones sanitarias ya que puede derivar en el desarrollo de múltiples problemas y/o alteraciones de la salud como pueden ser:

- Reacciones alérgicas.
- Efectos genotóxicos y/o carcinogénicos.
- Aparición de microorganismos resistentes a dichos antibióticos, con la consiguiente alteración del tratamiento de determinadas enfermedades.
- Reducción de la síntesis de vitaminas.
- Alteración de la flora intestinal.

De todos los antibióticos existentes, la mayoría de los destinados al tratamiento del ganado se incluyen dentro de los grupos conocidos como antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, sulfamidas, fenicoles y fluoroquinolonas cuyas características se describirán más detalladamente en el apartado de consideraciones teóricas y experimentales.

A continuación, aparece representando en un gráfico de sectores el porcentaje de abundancia correspondiente a cada familia de antibióticos anteriormente citada.

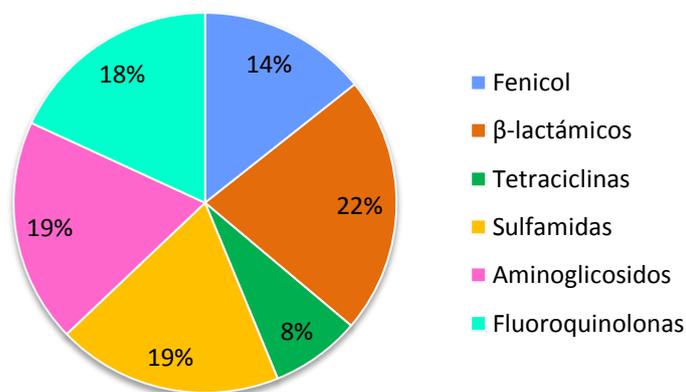


Figura 1.-Distribución de determinadas familias de antibióticos en los alimentos. [1].

Preocupa especialmente el caso de la leche debido a que, como se puede observar en la Figura 2, la leche es uno de los alimentos más demandados y consumidos por la población, por tanto, es importante llevar un control de la calidad de la misma siendo clave el análisis de la presencia de antibióticos u otras sustancias antimicrobianas.

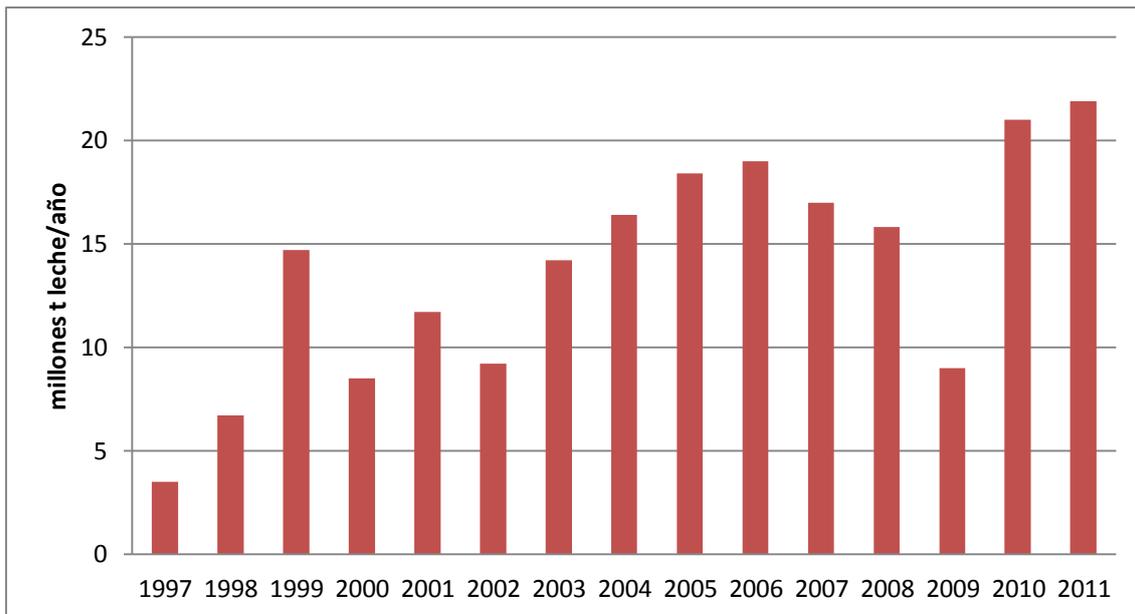


Figura 2. Crecimiento de la demanda mundial de lácteos entre 1996-2011. [2].

Existen numerosas técnicas para la detección de antibióticos en alimentos, destacan sobre todo el uso de técnicas cromatográficas, técnicas inmunológicas, técnicas microbiológicas y biosensores [3] las cuales serán descritas más ampliamente en el apartado de consideraciones teóricas y experimentales, sin embargo, la gran mayoría presenta múltiples inconvenientes, entre los que destaca el alto coste o tiempos de análisis altos, que hacen necesario la búsqueda de nuevos métodos de detección, siendo ésta la idea impulsora de este estudio.

1.2. Objetivos.

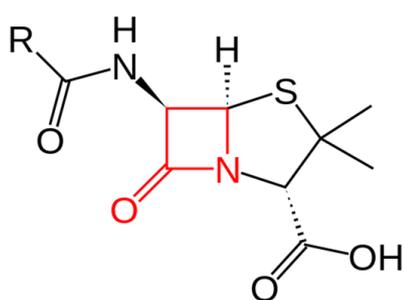
- Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnS y de nanopartículas dopadas con Eu (III).
- Estudiar la interacción de las nanopartículas sintetizadas con tetraciclina y evaluar dicha interacción como sistema para la detección del antibiótico.
- Evaluación de las características luminiscentes del complejo tetraciclina-terbio como base para la detección de tetraciclina.
- Ensayos de los anteriores sistemas en muestras reales de leche.

2.-CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

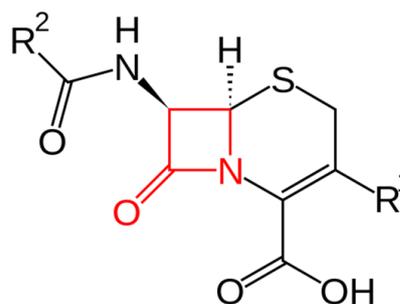
2.1.- Antibióticos: presencia en alimentos y grupos más importantes.

Como se he citado anteriormente, en el ámbito de la ganadería destacan sobre todo el uso de antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, sulfamidas, fenicoles y fluoroquinolonas, a continuación, se describen más ampliamente:

- Los antibióticos β -lactámicos son los más ampliamente utilizados en el ámbito veterinario. Se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico (Figura 3, resaltado en rojo) en su estructura y actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglicano que conforma la pared celular bacteriana, por lo que contribuye a la desintegración de la misma.



Estructura básica de las penicilinas



Estructura básica de las cefalosporinas

Figura 3. Estructura química de antibióticos β -lactámicos [3].

Penicilinas	Cefalosporinas
Amoxicilina	Cefacetilo
Ampicilina	Cefalexina
Benzopenicilina	Cefalona
Cloxacilina	Cefapirina
Dicloxacilina	Cefazolina
Nafcilina	Cefoperazona
Oxacilina	Cefquinoma

Tabla 1. Ejemplos representativos de los diferentes antibióticos β -lactámicos [3].

- Las fluoroquinolonas (FQs) constituyen un grupo importante de antibióticos sintéticos. Se caracterizan porque la mayoría no se metabolizan completamente en el organismo de modo que son excretados en su forma activa y pasan al entorno pudiendo llegar a las reservas de agua. Así, se ha comprobado en varios estudios la presencia de altos niveles de FQs en aguas superficiales, aguas profundas y aguas de bebida, presentando un importante riesgo para la salud humana.

-Los aminoglucósidos constituyen una familia de antibióticos que presentan una estructura caracterizada por tener dos o más grupos amino unidos mediante enlaces glucosídicos a un grupo aminociclitol [4] y son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica de la bacteria mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S, causando daños irreversibles en dicha bacteria. Dentro de este grupo de antibióticos destacan los antibióticos gentamicina, kanamicina y neomicina, estreptomycinina y dihidroestreptomycinina.

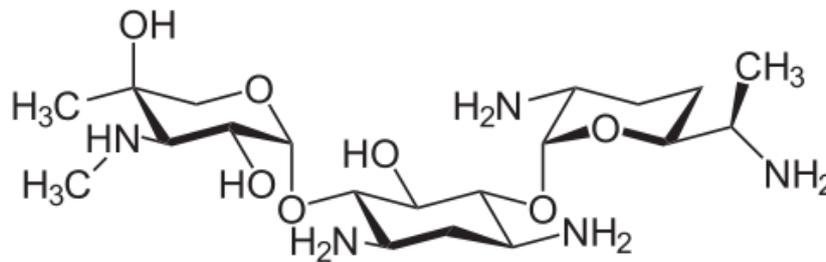


Figura 4.- Estructura química de un antibiótico aminoglucósido (gentamicina) [4].

-Los macrólidos son una familia de antibióticos que presentan una estructura caracterizada por tener un anillo lactónico macrocíclico (Figura 5) unido por enlace glucosídico a desoxiazúcares aminados [4]. Actúan inhibiendo la síntesis proteica de la bacteria mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S causando, como los anteriores, daños no reversibles en dicha bacteria. Dentro de este grupo de antibióticos destacan la tilosina, la espiramicina y la eritromicina.

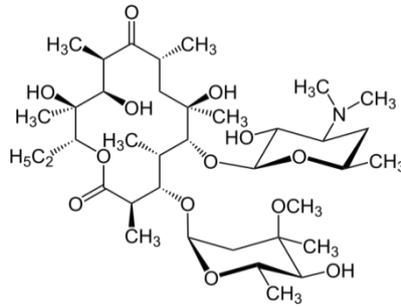


Figura 5. Estructura básica de la eritromicina. El anillo macrólido es la lactona (éster cíclico) en la parte superior izquierda [4].

-Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces sp.*, y que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. Todas poseen estructura tetracíclica lineal (Figura 6), con diferentes grupos funcionales, lo que ha dado lugar a tres generaciones de antibióticos, según el orden de su descubrimiento: [5]

- 1) clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, rolitetraciclina, limeciclina y clomociclina (1948-1963).
- 2) metaciclina, doxiciclina y minociclina (1965-1972).
- 3) glicilciclinas (1993)

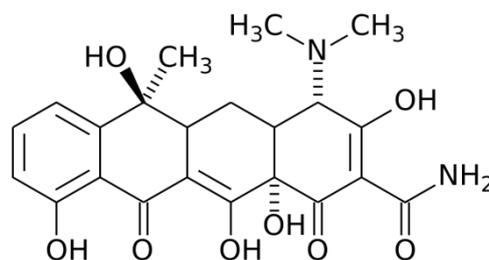


Figura 6. Estructura de la tetraciclina [5].

-Las sulfamidas fueron los primeros agentes antibacterianos empleados en el tratamiento de las infecciones humanas. Constituyen una familia de antibióticos descubierta en la década 1930-1940, son sintéticos de amplio espectro y derivan de la sulfonamida. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos de la bacteria. Se eliminan del organismo por la orina,

principalmente, parte sin metabolizar y parte en forma de conjugados entre 11-24 horas después de su ingestión. Es de los antibióticos que más resistencias ha desarrollado a lo largo de los años al ser de los primeros que se emplearon para el tratamiento de enfermedades. Estructuralmente presenta relación con el ácido para-aminobenzoico (Figura 7), con el que compiten por la unión al enzima dihidropteroatosintasa, la cual interviene en el metabolismo del ácido fólico imprescindible para la síntesis de ácidos nucleicos por la bacteria.

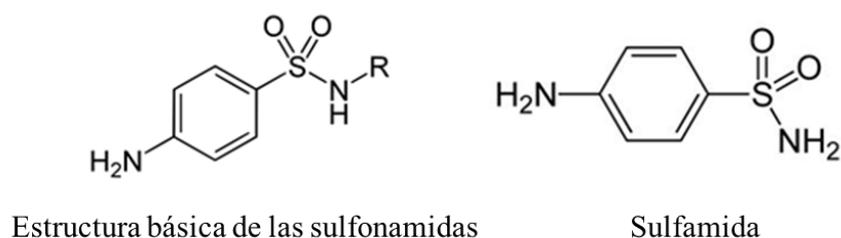


Figura 7. Estructura química de las sulfonamidas [5]

-Fenicoles: La denominación de fenicoles incluye tres fármacos, el cloranfenicol, el tianfenicol y el florfenicol, derivados del ácido dicloroacético (Figura 8).

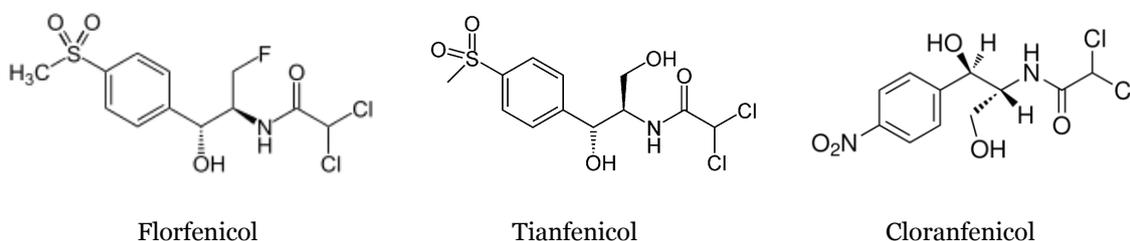


Figura 8. Antibióticos derivados del ácido di-cloro-acético: fenicoles.

2.2.- Técnicas clásicas de detección de antibióticos.

Debido a la creciente preocupación por ese uso excesivo de antibióticos y sus consecuencias, desde hace varios años se vienen controlando los residuos de los mismos presentes en los alimentos, entendiéndose por residuo, “cualquier metabolito, sustancia farmacológica o producto de degradación de la misma que permanece en un alimento obtenido a partir de animales a los que se les ha sido suministrado un antibiótico” [4]. Así, varias organizaciones a nivel mundial han establecido un límite máximo de residuos (MRL), definido como “la máxima concentración de residuo derivado del uso

de antibióticos aceptada en un alimento” [4], y se crea la Directiva 96/23/EC que establece una serie de normas para la elección de los métodos de análisis y para la interpretación de los resultados obtenidos.

Existe una gran variedad de métodos destinados para la detección y/o cuantificación de antibióticos. Los más utilizados se agrupan en las siguientes metodologías: técnicas cromatográficas, técnicas inmunológicas, técnicas microbiológicas y biosensores. [3]

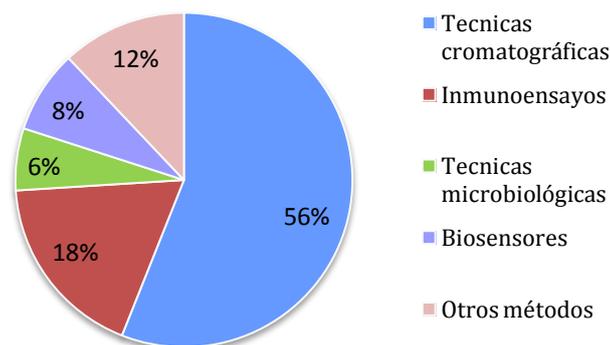


Figura 9. Principales métodos de detección de antibióticos en alimentos [1].

A continuación describiremos brevemente cada una de las técnicas analíticas empleadas.

-2.2.1.- Técnicas cromatográficas.

Este tipo de técnicas han resultado bastante eficientes no sólo en la detección sino también en la cuantificación de múltiples residuos de antibióticos presentes en los alimentos. En general, se precisa una limpieza previa de la muestra mediante una extracción en fase sólida y la separación posterior del residuo objeto de análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high performance liquid chromatography) [6].

La cromatografía HPLC ofrece la posibilidad de analizar simultáneamente distintos residuos en un período de tiempo relativamente corto respecto a otras técnicas cromatográficas. Además, dada la posibilidad de automatizar el método, lo hace ideal como sistema de monitorización o “screening”. Con el fin de mejorar aún más esta técnica, en los últimos años, se han realizado una serie de cambios que consisten, sobre todo, en acoplar el sistema de HPLC a un espectrómetro de masas (HPLC-MS) lo que

contribuye a mejorar la eficiencia de la identificación y cuantificación, con la consiguiente reducción del tiempo de análisis [4]. No obstante, la técnica HPLC-MS requiere de usuarios especializados.

-2.2.2.-*Biosensores.*

Están formados por un componente de reconocimiento molecular biológico (enzimas, ácidos nucleicos, aptámeros, anticuerpos...) y un elemento transductor que transforma el proceso de reconocimiento en una señal analítica cuantificable.

Los biosensores se clasifican atendiendo principalmente a la naturaleza del elemento transductor, siendo los más empleados los electroquímicos y los ópticos.

Entre las ventajas de los biosensores destaca su alta especificidad de reconocimiento y la rapidez de respuesta, por el contrario, también presenta numerosos inconvenientes como la inestabilidad del elemento biológico que puede perder su actividad en apenas unas horas o días dependiendo de su naturaleza o, de otros factores, como el pH o cambios en la temperatura que favorecen su desnaturalización. Como resultado de estas desventajas, hasta la fecha, no se han sido comercializados biosensores para tetraciclina.

-2.2.3.- *Técnicas microbiológicas.*

Agrupar una serie de métodos cuantitativos y semicuantitativos basados en la inhibición del crecimiento de determinados microorganismos (Figura 10). Son métodos de barrido (“screening”), rápidos y económicos ya que no requieren equipamiento sofisticado. Incluso, algunos métodos de difusión en agar han sido implementados como métodos oficiales. La mayor parte de los métodos rápidos comercialmente disponibles se han desarrollado para la industria de la leche con objeto de determinar antibióticos en leche. [7- 10].

El test más usado como sistema de referencia en la mayoría de los laboratorios es el conocido como “BsDA” [3], y es método de referencia en la Unión Europea para residuos de antibióticos en leche cruda y en leche tratada térmicamente. Consiste en colocar unos pequeños discos de papel en un medio de agar común donde previamente se ha hecho crecer cepas de *Bacillus stearothermophilus* var.*Calidolactis* y se ha añadido la muestra a analizar sobre la superficie del medio. Si hay presencia de antibióticos en la muestra, se forman zonas de inhibición alrededor del disco

caracterizadas por la formación de un anillo transparente alrededor del mismo. Se utiliza principalmente en la detección de antibióticos β -lactámicos [3].



Figura 10. Test de inhibición de crecimiento de microorganismos.

En la siguiente tabla, se recogen algunos ensayos microbiológicos comerciales para la detección de antibióticos en leche.

Ensayo de inhibición microbiano	Compañía	Tiempo por ensayo	Antibiótico ensayado	Tipo de detección
Devoltest SP Kit	Gist-brocades/DSM	2 h30 min	Amplio espectro	Cambio de color
Copan test (CH ATK)	Copan Italia SpA	2 h 30 min-3 h	Amplio espectro	Cambio de color
CharmFarm Test	Charm Sciences	2 h 30 min-3 h	Amplio espectro	Cambio de color
Charm AIM-96	Charm Sciences	4 h	Amplio espectro	Cambio de color

Tabla 2: Ensayos microbiológicos comerciales para la detección de antibióticos [10].

Como se puede observar, el ensayo AIM-96 es el más largo, pero permite analizar simultáneamente hasta 96 muestras y que, a diferencia del test BsDA, se emplea medio líquido en lugar de agar común, se incuba la muestra durante 3-4 horas y se observan cambios en el color del medio. Así, una tonalidad amarilla indica que la muestra es negativa, si la muestra toma otro color es positiva, es decir, presenta residuos de antibióticos (Figura 11).

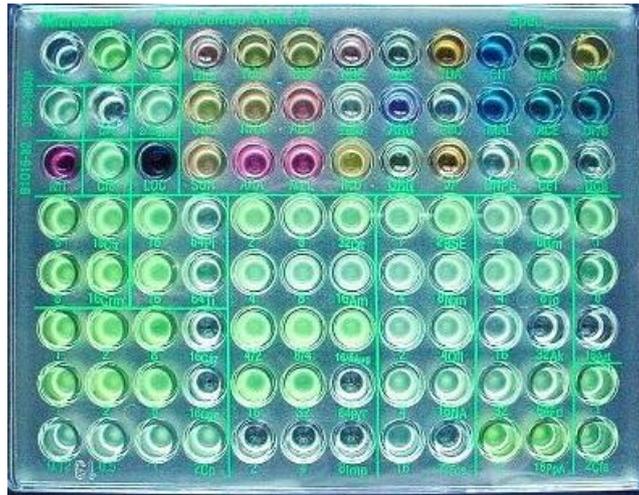


Figura 11. Antibiograma múltiple.

-2.2.4.- Técnicas inmunológicas.

Aunque las técnicas microbiológicas presentan unas buenas características analíticas para el control rápido, adolecen de lentitud y en algunos casos de sensibilidad suficiente. Por ello, se ha venido investigando en el desarrollo de métodos de control rápidos, sensibles y selectivos. Entre ellos, los métodos inmunológicos ofrecen un potencial extraordinario. Están basados en la capacidad de reconocimiento de un anticuerpo (Ac) por un antígeno (Ag) determinado, gracias a la elevada afinidad entre ambos. Dentro de este grupo se distinguen varios formatos del método. Entre ellos, el ensayo ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay), llamado también ensayo inmunoabsorbido ligado a enzima, ha llegado a ser una de las técnicas más ampliamente utilizadas. Por ello, será el que describiremos en esta revisión.

El formato ELISA es un inmunoensayo enzimático en el que la determinación de un Ag (o de un Ac) se lleva a cabo mediante el empleo de uno de ellos inmovilizado en placas de microtitulación con múltiples pocillos y el otro en disolución. El producto de reacción entre ambos puede ser detectado y cuantificado mediante un marcador enzimático con un sustrato apropiado. Este tipo de ensayo se encuentra comercializado ya para el análisis de tetraciclina en muestras de alimentos y se basa en un ensayo indirecto competitivo. La tetraciclina se encuentra inmovilizada en los pocillos y durante el análisis la muestra se añade a los mismos, junto con un anticuerpo primario específico para el antibiótico. Si éste está presente en la muestra, competirá por el anticuerpo, impidiendo que éste se una al antibiótico inmovilizado. Tras un lavado, se

añade un segundo anticuerpo, marcado con peroxidasa, que interacciona con el primer anticuerpo. Tras la adición del sustrato enzimático, se genera un color cuya intensidad es inversamente proporcional a la concentración de tetraciclina en la muestra. En la Figura 12 se muestra un esquema simplificado del formato descrito y la reacción enzimática coloreada, base de la detección espectrofotométrica.

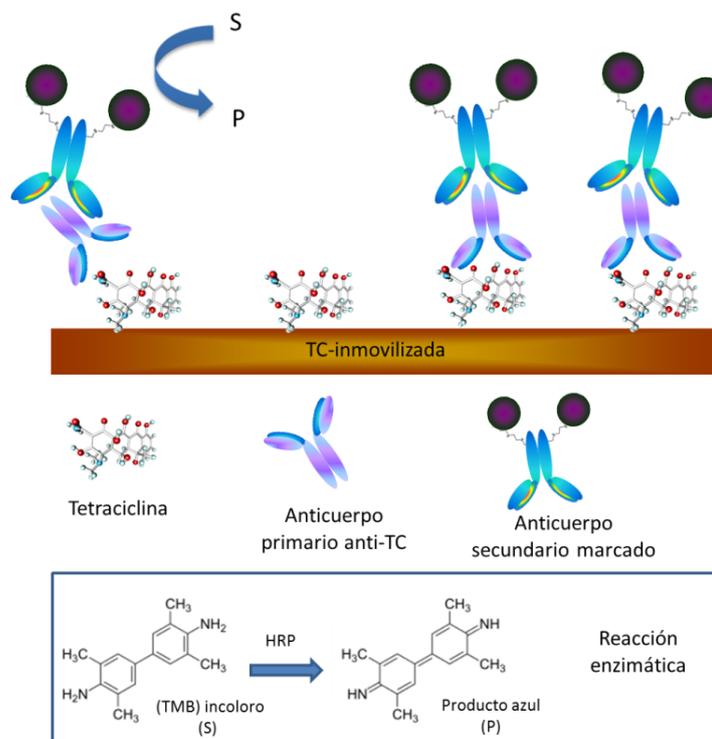


Figura 12. Ensayo ELISA competitivo indirecto para tetraciclina.

Es el método más usado debido a su sencillez, su alta sensibilidad y a su rapidez por la posibilidad de automatización.

Hoy día existen métodos basados en inmunoensayos, comercialmente disponibles para el análisis de tetraciclinas en leche. Por ejemplo, el ensayo ParallaxTMTetracyclines Test Kit es un inmunoensayo fluorescente basado en anticuerpos inmovilizados en capilares de vidrio. El cartucho de ensayo contiene cuatro capilares de vidrio, un reservorio de reactivos con cuatro pocillos de reactivos secos y un procesador que lee una señal de fluorescencia. El ensayo dura menos de 5 minutos. El sistema está patentado por lo que no se dispone información sobre la naturaleza de los anticuerpos ni de la sonda fluorescente. En la Figura 13 se muestra el sencillo protocolo que supone el análisis.

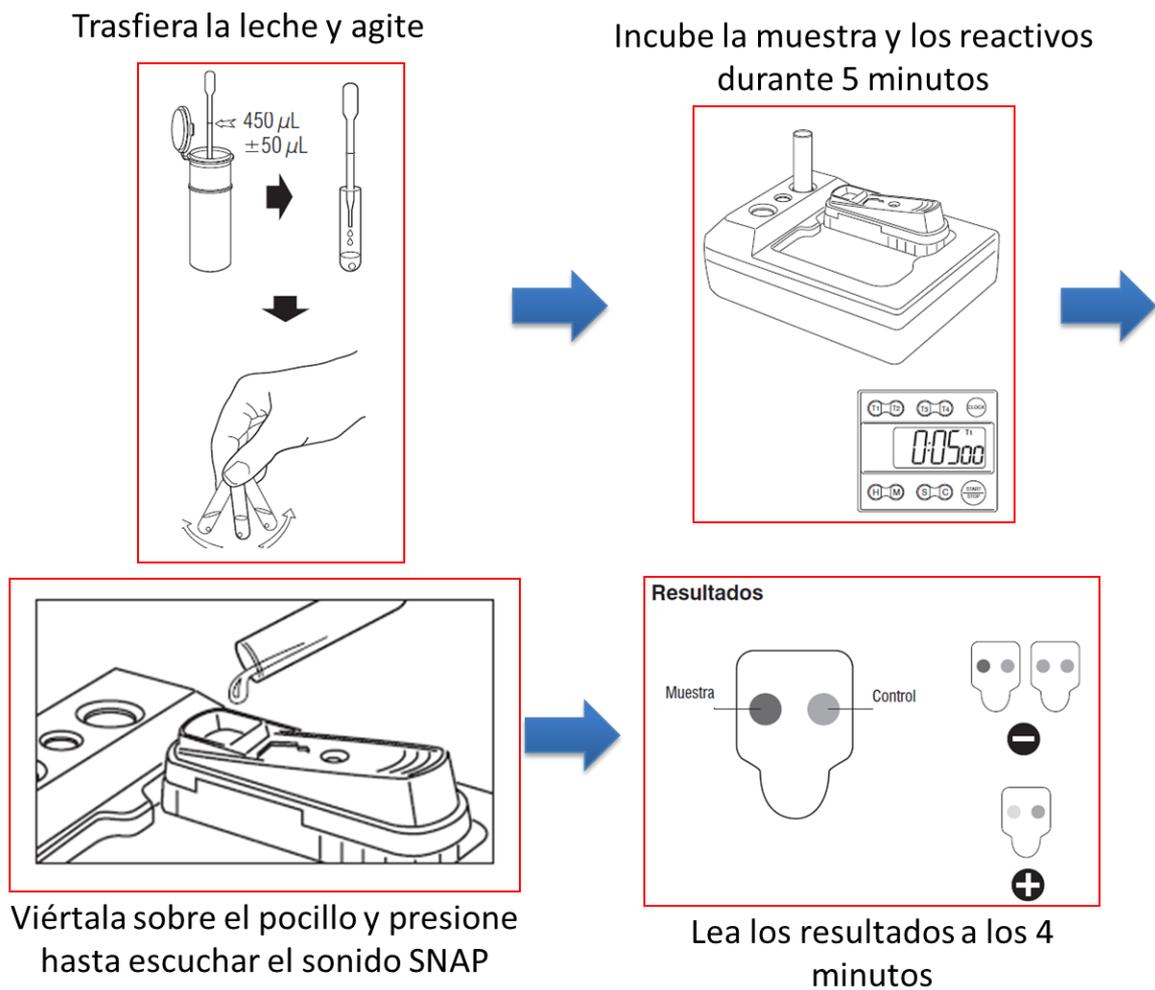


Figura 13. Protocolo para el análisis rápido de tetraciclinas empleando el ParallaxTMTetracyclines Test Kit [11].

A continuación, en la Tabla 3, se muestran la sensibilidad de un ensayo comercial de tipo inhibición microbiana con el inmunoensayo fluorescente ParallaxTM [12].

Antibiótico	MRL., U.E. (µg/kg)	MRL., Codex (µg/kg)	FDA, USA (µg/kg)	Ensayo inhibición microbiana Delvo SP, (µg/kg)	Parallux™ test (µg/kg)
Clorotetraciclina	100	100	100	300	150
Doxiciclina	0				(100)
Oxitetraciclina	100	100	100	300	100
Tetraciclina	100	100	100	300	100

Tabla 3. Comparación de los límites máximos de residuos de tetraciclinas para diferentes ensayos [12].

Como se puede observar, la sensibilidad de los métodos está muy próxima a los valores MRL de los distintos organismos oficiales para las tetraciclinas.

El Parallux™ test es el más rápido, pero requiere instrumentación, lo que limita su aplicabilidad para el análisis *in situ*.

2.3.- Métodos basados en el empleo de nanomateriales.

Las técnicas anteriormente citadas son las más empleadas; sin embargo, en los últimos años ha aumentado notablemente la búsqueda de nuevos materiales que ofrezcan una mayor selectividad para el reconocimiento del analito, así como, una mejora en la sensibilidad del método de análisis dada la necesidad de detectar bajos niveles de residuos en muestras complejas, como son las de los alimentos. Entre esos materiales, hoy día se trabaja intensamente en el desarrollo de nanomateriales para su empleo en el campo de los alimentos, no sólo desde un punto de vista analítico, sino también en el de la nutrición, la agricultura y el procesado de los mismos [13-15].

Con el nombre genérico de nanomateriales se definen, según la Comisión Europea en el año 2011 [16], “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendidos entre 1nm y 100 nm”.

Se pueden clasificar en distintos grupos en función de su estructura y del número de dimensiones espaciales que superen el intervalo de valores de la nanoescala:

- Nanomateriales 0D: presentan todas sus dimensiones en el rango nanométrico. Se denominan comúnmente nanopartículas.
- Nanomateriales 1D: presentan una de las dimensiones espaciales fuera del rango de la nanoescala y adoptan, generalmente, forma alargada por lo que reciben el nombre de nanotubos o nanohilos.
- Nanomateriales 2D: presentan dos de las dimensiones espaciales fuera del rango de la nanoescala y adoptan, generalmente forma de película delgada, por ello, también reciben el nombre de películas.
- Nanomateriales 3D: materiales constituidos por agrupaciones de algún tipo de nanomaterial por lo que también se denominan materiales nanoestructurados.

En la Figura 14 se muestra un ejemplo de cada uno de estos nanomateriales, en la que se observa también su forma.

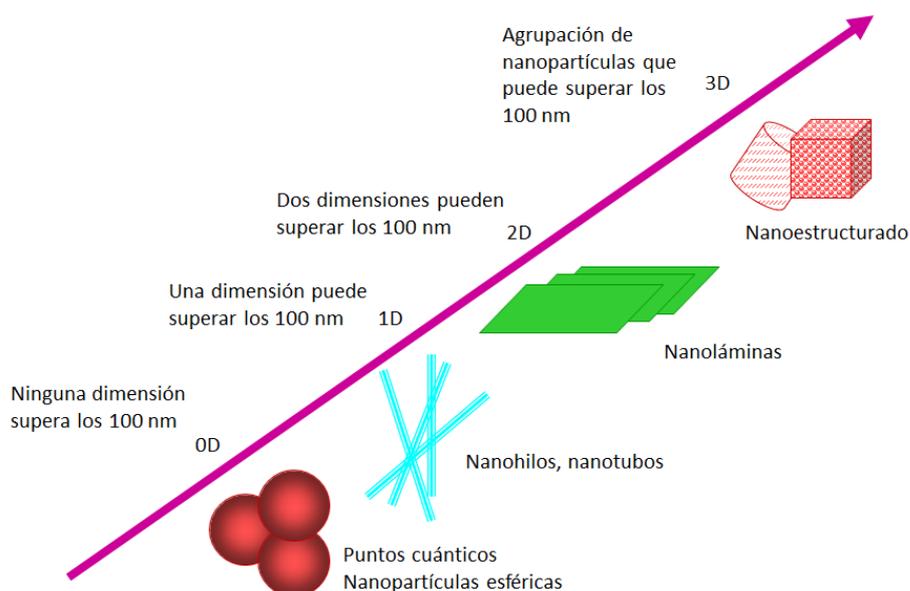


Figura 14. Clasificación de nanomateriales de acuerdo a su forma y dimensiones.

En el campo del análisis de residuos de antibióticos en alimentos, se han utilizado diferentes tipos de nanopartículas. Describiremos brevemente algunas de ellas.

-2.3.1.- Nanopartículas de oro (AuNPs).

Son las nanopartículas que tradicionalmente se han empleado con más frecuencia. Poseen propiedades físico-químicas excelentes para su empleo en el desarrollo de nuevas metodologías se caracterizan por ser de síntesis sencilla y económica, elevada relación superficie/volumen, propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas únicas, diferentes a las del metal macroscópico. Asimismo, la posibilidad de modificarlas superficialmente de forma muy sencilla es una ventaja frente a otro tipo de nanopartículas [17]. El color de una suspensión de nanopartículas de oro, depende de forma crítica del tamaño de las mismas (Figura 15).

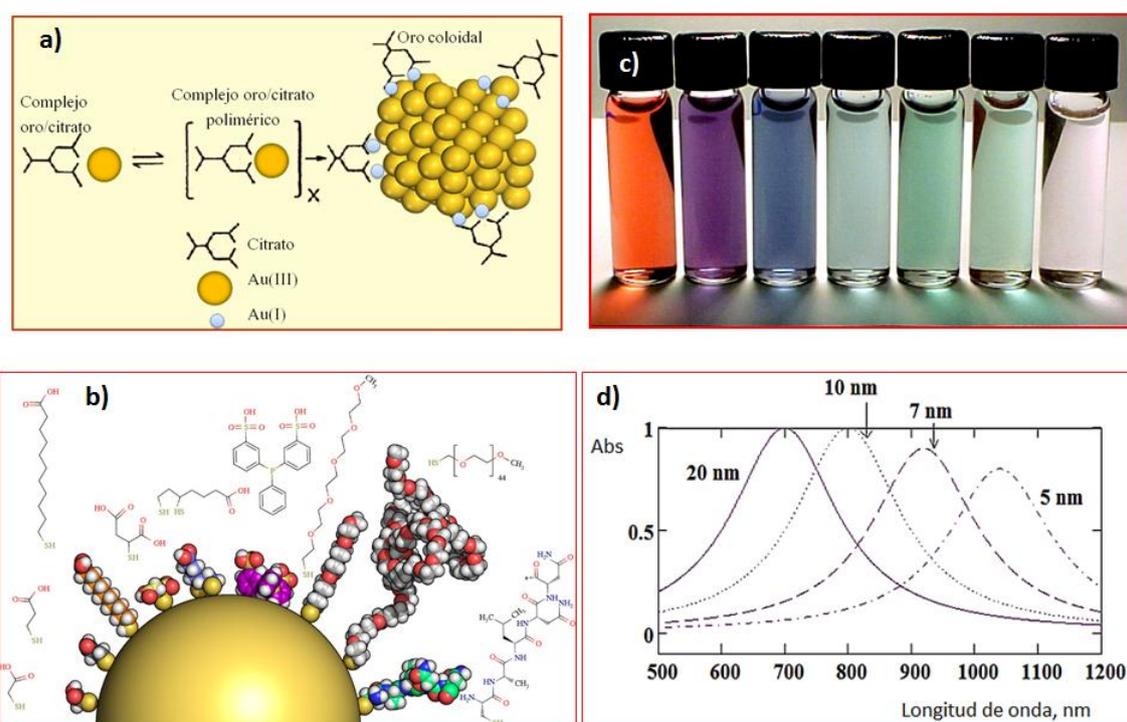


Figura 15. Nanopartículas de oro. a) Síntesis empleando una sal de oro y ácido cítrico como reductor, b) Funcionalización superficial con diferentes ligandos hidrofílicos, c) Color de suspensiones coloidales de AuNPs de diferente diámetro, d) Espectros de absorción Vis-UV de AuNPs de diferente diámetro.

Para el empleo de las AuNPs en el desarrollo de nuevos métodos de análisis es necesario modificar su superficie con ligandos adecuados (Figura 15 b). La selección adecuada de dichos ligandos es crucial para obtener la sensibilidad y selectividad deseada. En la Tabla 4 se recogen las propiedades ópticas que presentan las AuNPs y su aplicación potencial [18].

Propiedades de las AuNPs	Aplicaciones potenciales
Plasmón superficial de resonancia (SPR)	Sensores colorimétricos, Raman sensibilizado
Fluorescencia	Sensores fluorescentes
Dispersión Raman sensibilizada	SERS
Dispersión de luz	Ensayos por dispersión dinámica de luz
Funcionalización superficial	Reconocimiento molecular por diversos mecanismos

Tabla 4 Lista de propiedades de las AuNPs y sus aplicaciones.

Como ejemplo representativo del empleo de AuNPs en el desarrollo de un método colorimétrico para determinación de antibióticos en leche es el desarrollado por Zhang y col. [19]. Este método se basa en la síntesis de AuNPs en presencia de PCV (pirocatecol violeta), compuesto que se caracteriza por presentar una serie de grupos funcionales (-OH, -NH₂, -NH) por los que determinados antibióticos tienen afinidad y, por tanto, se unirán a él modificando el color de la solución formada debido a que esa unión modifica el tamaño de las AuNPs durante la síntesis. Como se puede ver en la Figura 16, en ausencia de antibióticos las AuNPs se sintetizan correctamente y la disolución presenta un color rojizo característico. Sin embargo, en presencia de bajas concentraciones de antibiótico en el medio se puede observar que las AuNPs se sintetizan correctamente pero la interacción del antibiótico con los grupos funcionales hace que éstas se agreguen y el color de la disolución cambia a azul. Si la cantidad de antibiótico aumenta, el crecimiento de las AuNPs se modifica, inhibiendo la acción del PCV y la disolución se torna marrón.

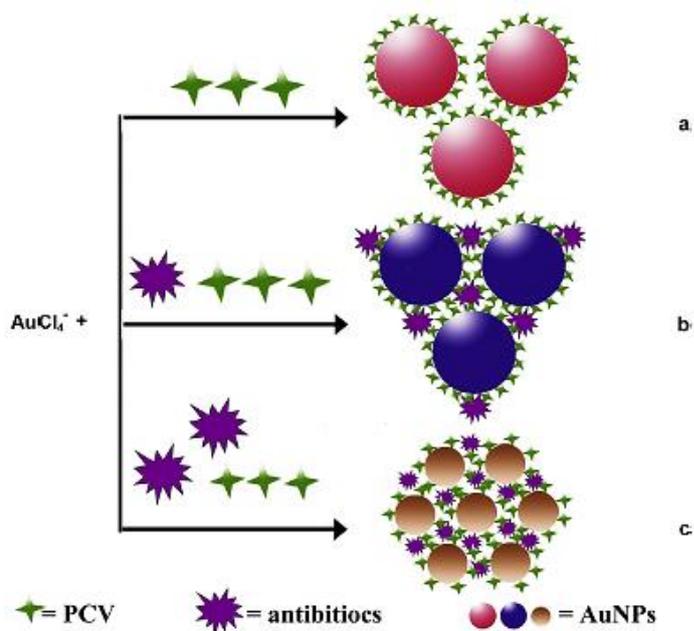


Figura 16. Esquema del mecanismo de reconocimiento de antibiótico en función del color de las AuNPs y la cantidad de antibiótico [19].

Recientemente, Shen y col [20] han descrito un ensayo colorimétrico para tetraciclina basado en el crecimiento *in situ* de AuNPs. El método se basa en la capacidad de las tetraciclinas de reducir directamente las sales de oro formando, bajo condiciones adecuadas, nanopartículas de oro. Las nanopartículas resultantes absorben a 526 nm y su absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de antibiótico en el medio. La sensibilidad del método es elevada, exhibiendo un límite de detección de 20 ng/mL. El ensayo presenta una selectividad importante frente a otros antibióticos como sulfonamidas o amino-glicósidos

-2.3.2.- Nanopartículas de carbono.

Las nanopartículas de carbono pueden ser una alternativa tecnológica importante en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la detección y determinación cuantitativa de antibióticos. Su base fundamental es carbono, pueden ser modificadas superficialmente con grupos funcionales como $-COOH$, $-OH$, $-C=O$, $-NH_2$, $-SH$ lo que les proporciona una excelente solubilidad en agua. Al mismo tiempo, dichos grupos pueden actuar como puntos de enlace para determinados analitos.

Existen varios tipos de nanopartículas de carbono (Figura 17), siendo los nanotubos de carbono los más explotados analíticamente hasta la fecha. [21].

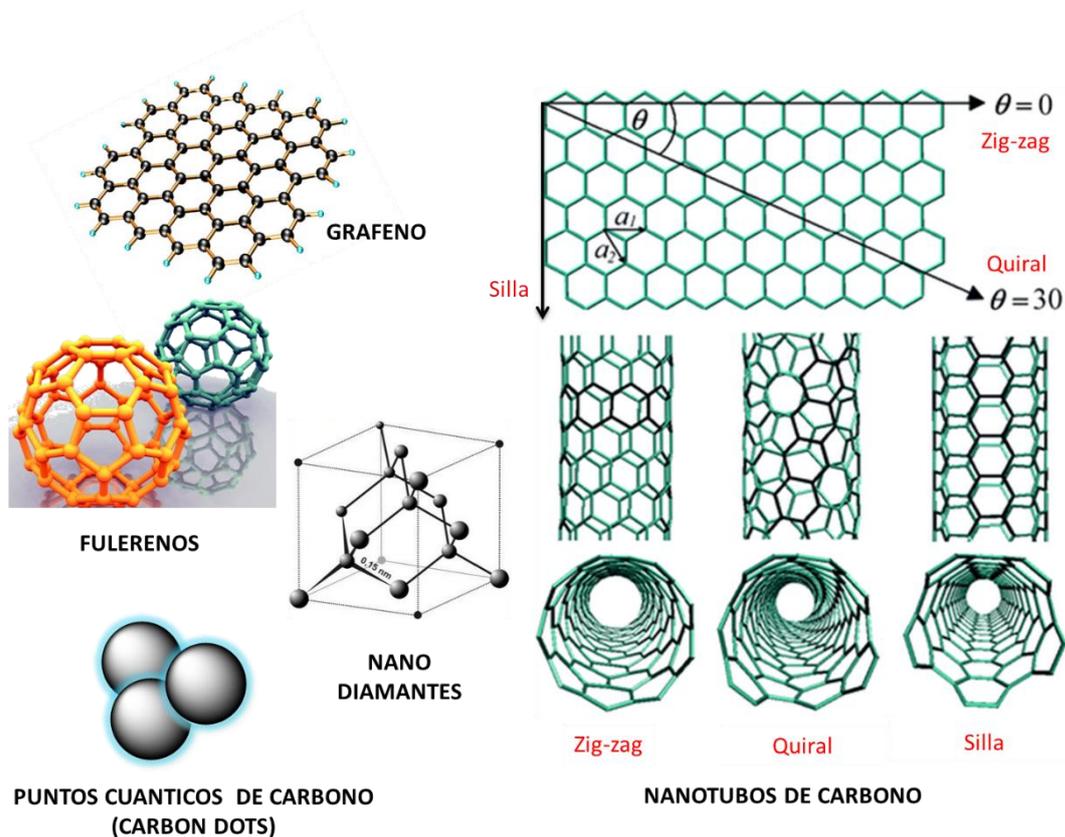


Figura 17. Nanopartículas de carbono.

Así, se han desarrollado métodos voltamétricos y amperométricos para la determinación de tetraciclina empleando nanotubos de carbono de pared múltiple [22-24]. Con electrodos modificados con nanotubos se mejora notablemente el proceso de oxidación de la tetraciclina en comparación con electrodos sin modificar, consiguiéndose límites de detección del orden de $0.50 - 3.10 \text{ ng mL}^{-1}$. Zhou and col. [25] han empleado nanotubos de carbono para favorecer la inmovilización de aptámeros en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado para desarrollar un aptasensor de tetraciclina. El dispositivo se empleó en la determinación de tetraciclina en leche con excelentes resultados.

-2.3.3.- Otras nanopartículas.

Además de las ya expuestas, se han venido desarrollando otros sistemas de análisis y detección de tetraciclina en muestras de alimentos empleando otras nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos, de semiconductores o paramagnéticas. En la siguiente tabla se recopilan algunos ejemplos de estos sistemas de análisis para antibióticos.

NANO-PARTICULAS	Antibiótico	Técnica	Límite de detección	Muestra real	Ref.
Magnéticas Fe ₃ O ₄	Tetraciclina, Penicilina, Sulfadimetoxina	Inmuno- fluorescencia	<50 ng mL ⁻¹	Leche	[26]
Plata	Tetraciclina	Fluorescencia	4 nM	Leche	[27]
Sílice	Tetraciclinas	Electroquímio- luminiscencia	< 0.1 μmol L ⁻¹	Fármacos	[28]
Puntos cuánticos de semi- conductores	Tetraciclina, Penicilina, Estreptocimina	Inmunoensayo fluorescente	5 pg mL ⁻¹	Leche	[29]

Tabla 5: Sistemas de análisis para antibióticos mediante el uso de nanopartículas.

-2.3.4.- Materiales biomiméticos.

Con objeto de obviar el empleo de materiales biológicos, que en determinadas condiciones experimentales pueden experimentar degradación y/o desnaturalización, se han desarrollado en los últimos 15 años materiales que simulan la capacidad de reconocimiento molecular que poseen moléculas como los anticuerpos. Entre estos materiales biomiméticos se encuentran los polímeros de impresión molecular. Estos polímeros se pueden preparar a partir de monómeros orgánicos o inorgánicos. En la Figura 18 se muestra el esquema de síntesis de un polímero impreso para una molécula determinada. Como se puede observar, el polímero se sintetiza en presencia de la molécula de interés y finalmente, mediante un proceso de extracción con un disolvente adecuado o un cambio de pH, dicha molécula se extrae. Este proceso de limpieza deja “huellas dactilares” con puntos de enlace que poseen la estereoquímica de la molécula y grupos funcionales orientados de modo que sólo esa molécula será capaz de alojarse en dichas huellas.

Los polímeros impresos tienen un elevado potencial para la recuperación/extracción de moléculas y cómo material de reconocimiento para el diseño de sensores, tanto ópticos como electroquímicos.

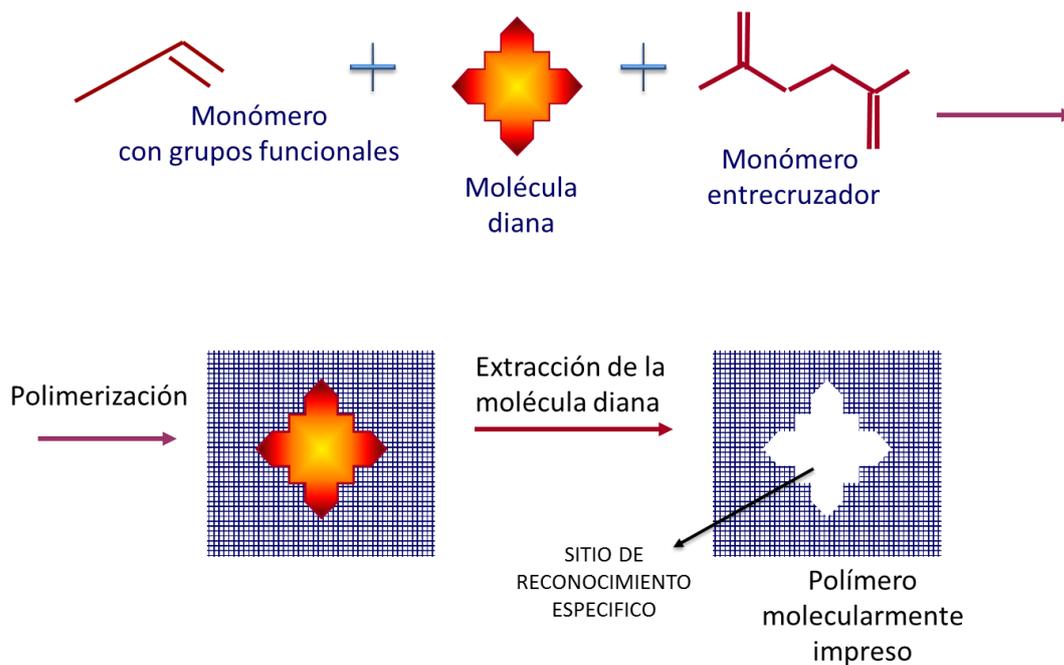


Figura 18. Esquema general de síntesis de un polímero molecularmente impreso.

Cohelo Moreira y col. [30] han desarrollado un polímero molecularmente impreso para tetraciclina empleando monómeros vinílicos y lo han utilizado para el desarrollo de sensores potenciométricos para la determinación del antibiótico tanto en sistemas estáticos como en flujo. El sistema presenta un límite de detección menor de 1.3×10^{-5} M y su aplicabilidad se demostró con la determinación de tetraciclina en muestras de suero.

Hoy día es posible adquirir comercialmente cartuchos de extracción en fase sólida, que contienen polímeros molecularmente impresos, para la extracción selectiva de tetraciclina en alimentos. [31]

3.-METODOLOGIA

3.1.- Reactivos y disoluciones.

- Sulfuro de sodio (Na_2S).
- Acetato de Zinc cristalizado (ZnAc_2).
- Etanol absoluto.
- Tetraciclina (Tc).
- Tricloruro de Europio (EuCl_3) 99.9%.
- Tricloruro de Terbio (TbCl_3) 99.9%.
- Hidróxido de sodio en escamas 99% (NaOH).
- Ácido clorhídrico 38%.
- MOPS 99.5% (3-(N-morpholino) propanesulfonicacid).
- BES 99% (bicine ethane sulfonic).
- Acetato de sodio 99% (NaAc).
- Ferrocianuro potásico cristalizado.
- Agua destilada.
- Leche desnatada de marca blanca obtenida en el supermercado Alimerka.
- Ferrocianuro de Potasio cristalizado.

Todos los reactivos han sido adquiridos en Sigma Aldrich.

3.2.- Instrumentación analítica.

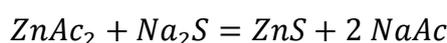
- Balanza analítica Mettler AE 163.
- Fluorímetro Varian Cary Eclipse.
- Espectrofotómetro FTIR, Varian 670 IR equipado con un módulo de ATR “Golden Gate”.
- Microscopio de Transmisión Electrónica Jeol-2000 EX II.
- Espectrofluorímetro Edimburgh Instruments modelo FLSP920 equipado con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- pH-metro (micropH-2002, CRISON).
- HRTEM: Jeol JEM 2100F.

3.3.- *Utilaje de laboratorio.*

- Matracas Erlenmeyer de 100 mL.
- Matracas aforados de 5 mL y 10 mL.
- Pipeta aforada 10 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Tubos de plástico de 12 mL.
- Tubos eppendorf.
- Micropipetas LABMATE+: de 100-1000 μ l.
- Mortero.
- Papel de filtro analítico (tamaño de poro de 7 μ m-11 μ m).
- Placa calefactora: Heidolph MR-HeiTec.
- Estufa: Function line. Heraeus.
- Vortex Labnet VX-100.
- Embudo de vidrio.

3.4.- *Síntesis nanopartículas de sulfuro de zinc.*

En un matraz erlenmeyer de 100 mL de capacidad se preparó una disolución formada por 15 mL de acetato de zinc 1M, 15 mL de sulfuro de sodio (Na_2S) 1M y llevando a un volumen final de 100 mL con agua destilada. [32,33]. La reacción de formación se puede describir mediante el siguiente equilibrio:



En el que $\text{Ac} =$ ion acetato. A continuación, se dejó dicha disolución agitando a temperatura ambiente durante una hora dejándose reposar después unas 12 horas más hasta formación de un precipitado. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó dicha disolución en tubos de 10 mL durante 5 min a 5400 rpm eliminando el sobrenadante cada vez y lavando el precipitado varias veces con agua destilada y etanol.

Finalmente, se dejaron secar las muestras en una estufa a 40°C durante varios días hasta eliminación total de disolventes, tras lo cual se homogenizan en un mortero de ágata.

3.5.- Síntesis de nanopartículas de ZnS dopadas con europio (ZnS-Eu).

En varios matraces erlenmyer de 100 mL de capacidad se preparó una serie de disoluciones formadas por la mezcla de 15 mL de ZnAc_2 1M, 15 mL de Na_2S 1M y 0, 0.25 mL, 0.5 mL, 1 mL y 2 mL, respectivamente, de Eu_3Cl 1M. Estas disoluciones resultantes se trataron posteriormente siguiendo los mismos pasos descritos para la síntesis de las nanopartículas de ZnS.

3.6.- Estudio de la morfología de las nanopartículas.

Las nanopartículas anteriormente sintetizadas se caracterizaron morfológicamente empleado la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se suspendió una pequeña cantidad de nanopartículas en metanol en un tubo eppendorf y del cual se tomaron posteriormente, unos pocos μL y se colocaron sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono amorfo. Tras dejar evaporar el disolvente se introduce la rejilla en el microscopio para llevar a cabo la medida. En la Figura 19 se muestra una imagen del microscopio utilizado (Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo).



Figura 19. Microscopio Electrónico de Transmisión. Jeol 2000 EX – II.

3.7.- Estudio de la absorción al infrarrojo de las nanopartículas.

Para el análisis de la absorción al infrarrojo de las nanopartículas anteriormente sintetizadas se utilizó un Espectrofotómetro FTIR, Varian 670 IR equipado con un módulo de ATR “Golden Gate”, el análisis de las muestras se realizó sin necesidad de tratamiento previo de las mismas colocando dichas muestras directamente sobre el módulo de ATR del equipo.

3.8.- Estudio de las características luminiscentes de las nanopartículas.

Se registraron los espectros de excitación y de emisión de las nanopartículas anteriormente sintetizadas utilizando un espectrofluorímetro Edimburgh Instruments modelo FLSP920 equipado con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

3.9.- Características luminiscentes de la tetraciclina y de sus complejos con el europio y el terbio.

Las características luminiscentes de la tetraciclina se realizaron sobre una disolución de $5 \times 10^{-2} \text{M}$, en medio acuoso ($\text{pH} = 6$), empleando una longitud de onda de excitación de 446 nm y una de emisión de 554 nm.

En el caso del complejo Tc-Eu, se preparó una disolución acuosa $2 \times 10^{-3} \text{M}$ de Tc y otra disolución acuosa $6 \times 10^{-3} \text{M}$ de EuCl_3 . Para la preparación del complejo, se tomó 1 mL de la disolución de Tc y 1 mL de la de Eu^{+3} y se añadieron a un matraz aforado de 5 mL enrasando al volumen final con agua destilada. De este modo, la estequiometría del complejo se encuentra en una relación $\text{Tc:Eu} = 1:3$. Finalmente, se registraron los espectros de excitación y fluorescencia en cubeta de 1 cm de paso óptico. Para el complejo Tc-Tb se siguió un procedimiento análogo al descrito anteriormente para el complejo Tc-Eu utilizando en su lugar, disoluciones de Tc y de TbCl_3 , asegurando una estequiometría del complejo $\text{Tc:Tb} = 1:3$.

3.10.- Análisis de la capacidad de retención de Tc de las nanopartículas ZnS-Eu.

Con objeto de estudiar la capacidad de las nanopartículas sintetizadas de retener Tc en disolución en función del tiempo de interacción, se preparó una disolución acuosa de Tetraciclina $5 \times 10^{-2} \text{M}$.

A continuación, se prepararon 4 tubos de ensayo cada uno de los cuales contenía 50 mg de las nanopartículas de ZnS-Eu sobre las que se añadió 1 mL de la disolución inicial de Tc y 2 mL de disolución reguladora de pH6. Se agitaron los tubos durante 1 min y posteriormente se dejaron reposar: el primero 0 min, el segundo 5 min, el tercero 15 min, el cuarto 30 min [34]. Transcurrido el tiempo de reacción, se centrifugó la disolución y se registró el espectro de emisión de fluorescencia del sobrenadante excitando a una longitud de onda de 446 nm.

3.11.- Influencia del pH en la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb.

Con objeto de estudiar la influencia del pH sobre la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb, se prepararon varias disoluciones reguladoras en el intervalo de pH 4-7,5. Las reguladoras de pH 4 y pH 5, se obtuvieron ajustando el pH de una disolución 0,1M de acetato sódico. La reguladora de pH 6 se preparó a partir de una disolución acuosa 0,1M de MOPS y la de pH 7 a partir de una disolución acuosa 0,1M de BES.

Se prepararon 50 mL de cada disolución y por medio de un pH-metro se ajustaron al valor de pH deseado. En aquellos casos en que fue necesario añadir una base para subir el pH se utilizó NaOH 0.1M y cuando fue necesario añadir un ácido para bajar el pH hasta los valores deseados se utilizó HCl 0.1M.

A continuación, en un matraces aforados de 10 mL se adicionaron 1 mL de Tc 2×10^{-3} M y 1 mL de Tb 6×10^{-3} M enrasando a volumen con cada uno de las reguladoras anteriormente mencionadas. Se registró el espectro de emisión fluorescencia, excitando a una longitud de onda de 405 nm.

3.12.- Cinética de formación del complejo Tc-Tb.

El estudio de la cinética de formación del complejo Tc-Tb se llevó a cabo midiendo la intensidad de fluorescencia del complejo Tc-Tb (estequiometría Tc-Tb = 1:3) a pH = 6 (reguladora MOPS 0,1 M). Para ello, se preparó el complejo en 6 matraces aforados de 5 mL y se dejaron reposar 2 min, 6 min, 12 min, 18 min, 24 min y 30 min, respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia a 405 nm.

3.13.- Tratamiento previo de la leche.

Dado que la leche es una matriz compleja, con objeto de eliminar la mayor parte de posibles interferentes, como grasas, proteínas o azúcares es necesario realizar un pre-

tratamiento de la leche para eliminar, en lo posible, la mayor parte de dichos interferentes sin perder el antibiótico.

Para eliminar el contenido proteico, se tomó una muestra de 2 mL de leche desnatada a la que se añadieron 200 μ L de reactivo de Carrez I (disolución acuosa de ferrocianuro de potasio 0,1M) y posteriormente 200 μ L de reactivo de Carrez II (disolución acuosa de $ZnAc_2$ 0.6M) [35]. Se agitó la mezcla durante 1 minuto en un Vortex, se dejó reposar durante 10 min, tras lo cual se filtró a través de un papel de filtro analítico (diámetro de poro 7 μ m-11 μ m) lavándose con 5 mL de agua destilada, recogiendo el filtrado total en un matraz y llevando a un volumen final de 10 mL con reguladora de pH 6 (reguladora MOPS 0.1M).

3.14.- Influencia del pre-tratamiento de la muestra sobre la extracción de la Tc.

Con objeto de comprobar la influencia del proceso de precipitación de proteínas en la recuperación de la Tc en muestras de leche, se llevó a cabo el proceso de precipitación anteriormente descrito sobre una muestra de 2 mL de leche desnatada a la que se le había añadido previamente 1 mL de una disolución de Tc 5×10^{-2} M. Se dejó interaccionar la Tc con la muestra de leche durante 24 h antes de proceder al tratamiento con los reactivos de Carrez. La operación se realizó por quintuplicado. La concentración de Tc en el sobrenadante se determinó frente a una recta de calibrado previamente preparada para Tc a pH 6.

3.15.- Determinación de Tc en leche por formación del complejo Tc-Tb.

Con este método se busca analizar la eficacia del uso de disoluciones de Tb en la detección de trazas de Tc en muestras de leche. Se prepararon muestras de leche enriquecidas con Tc. Para ello, se adicionó 1 mL de una disolución acuosa de Tc 5×10^{-2} M a 2 mL de leche y se dejó reposar durante 24 horas. La operación se realizó por quintuplicado. Una vez pasado este tiempo, se siguieron los siguientes pasos:

Adición de 1ml de disolución acuosa de Cloruro de Terbio 15×10^{-2} M a las muestras de leche que llevaban el antibiótico dejando reposar 20 min y posteriormente precipitando las proteínas llevando a un volumen final de 10 mL con reguladora de pH 6. La concentración del complejo Tc-Tb en disolución se determinó empleando una recta de calibrado previamente preparada para el complejo Tc-Tb a pH6.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Características espectrales FTIR de las nanopartículas de ZnS.

Las medidas del espectro FTIR de las nanopartículas de ZnS se llevaron a cabo en el intervalo de 600-3900 cm^{-1} . Como se puede observar en la Figura 20, aparece una banda intensa a 3197 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de tensión O-H de las moléculas de agua. La banda a 1542 cm^{-1} es característica de grupos hidroxilo [36], mientras que la banda a 930 cm^{-1} se asigna a interacciones resonantes entre modos vibracionales de iones sulfuro en el cristal [36] y la banda débil a 601 cm^{-1} se asigna a la banda del ZnS que corresponde a los sulfuros [36]. Por tanto, el espectro FTIR confirma la presencia de ZnS, junto con impurezas (moléculas de agua o grupos hidroxilo).

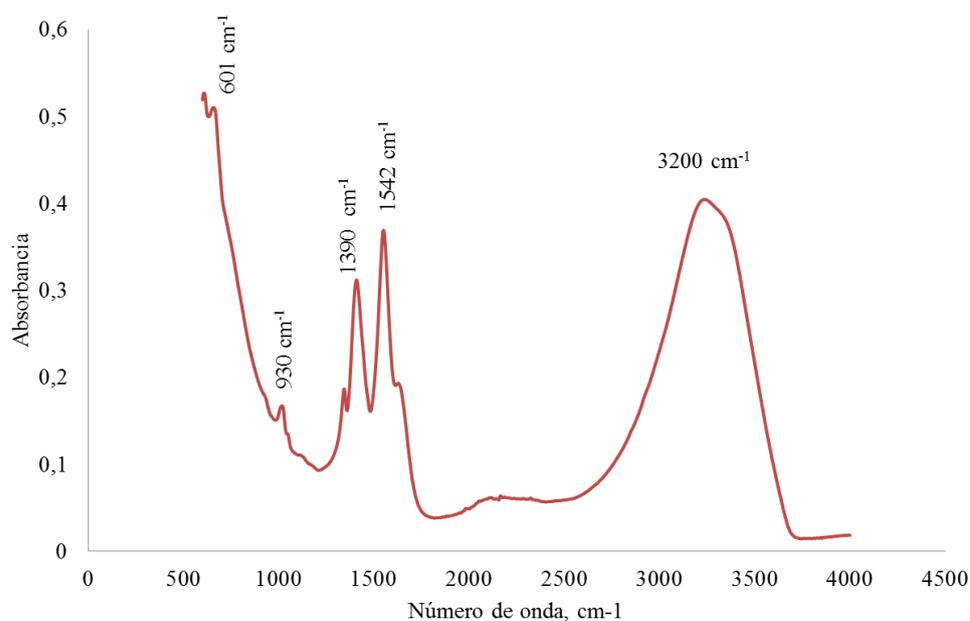


Figura 20. Espectro de absorción FTIR de nanopartículas de ZnS.

4.2.- Características luminiscentes de las nanopartículas de ZnS.

En la Figura 21 se puede ver el espectro de emisión de las nanopartículas de ZnS cuando fueron excitadas a una $\lambda_{\text{exc}} = 324 \text{ nm}$. Como se puede apreciar en el gráfico presenta un máximo de excitación en torno a los 425 nm.

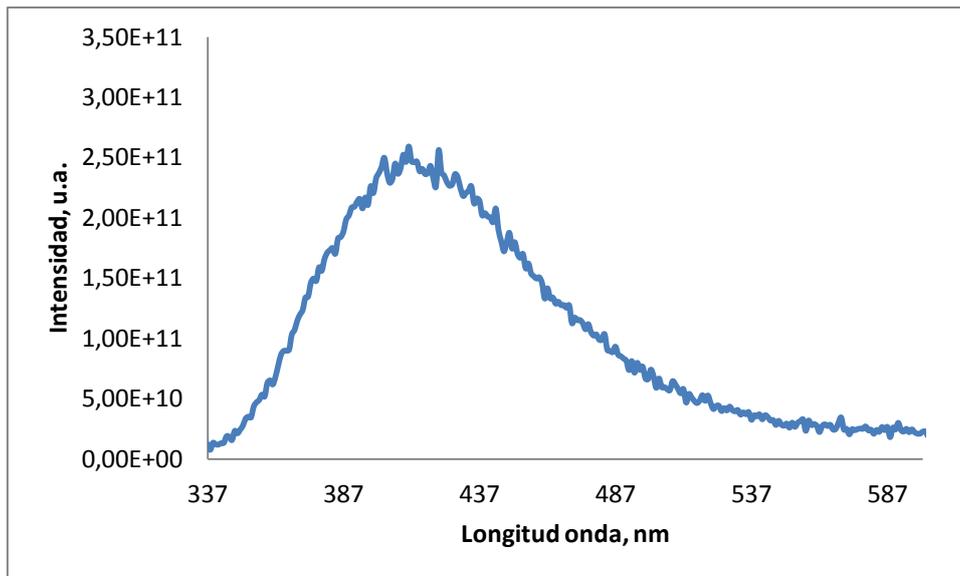


Figura 21. Espectro de emisión de las nanopartículas de ZnS. ($\lambda_{exc} = 324$ nm).

4.3.- Caracterización morfológica por TEM de las nanopartículas de ZnS.

Se puede obtener información directa acerca del tamaño y la morfología de las muestras nanocristalinas preparadas por análisis TEM.

Como se muestra en la Figura 22a, la imagen TEM indica que las nanopartículas de ZnS son monodispersas, aproximadamente esféricas y con un tamaño ≤ 5 nm. El análisis por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) (Figura 22b), muestra que las nanopartículas sintetizadas son puras.

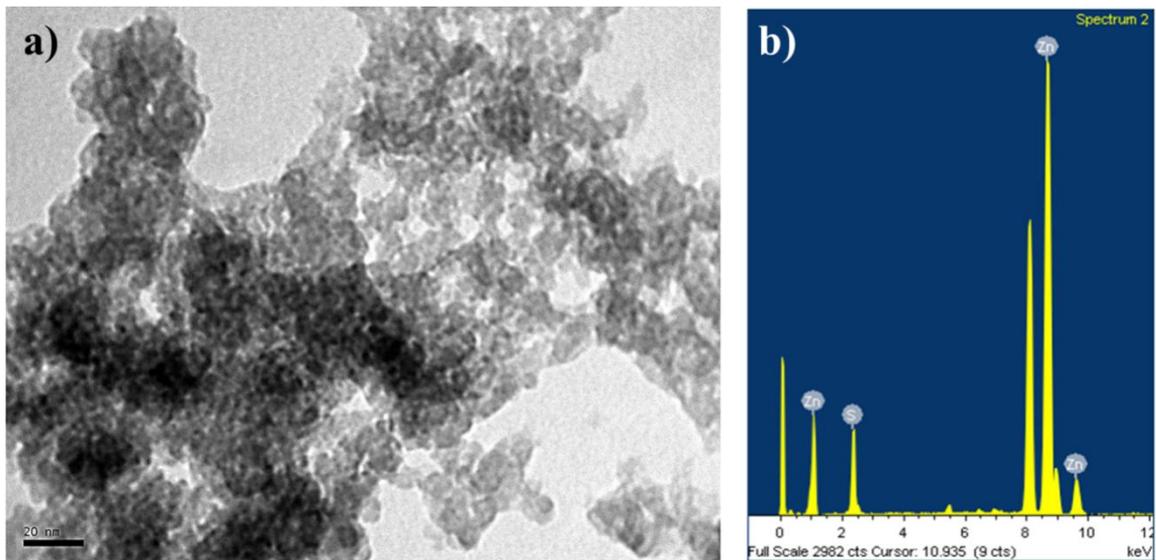


Figura 22. Morfología de las nanopartículas de ZnS. a) Imagen TEM. b) Espectro EDS.

4.4.- Características espectrales FTIR de las nanopartículas de ZnS-Eu.

Se prepararon, según se describió en el procedimiento operatorio, nanopartículas de ZnS dopadas con diferentes cantidades de europio. Como se muestra en la Figura 23, el espectro FTIR de las nanopartículas de ZnS dopadas muestran el mismo hábito. Se observan además dos nuevas bandas de muy débil intensidad a 2310 y 2340 cm^{-1} , que pueden adscribirse a cambios microestructurales en las nanopartículas debidos a la presencia del Eu^{+3} siendo la intensidad de dichas bandas mayor a medida que aumenta la concentración de europio [36].

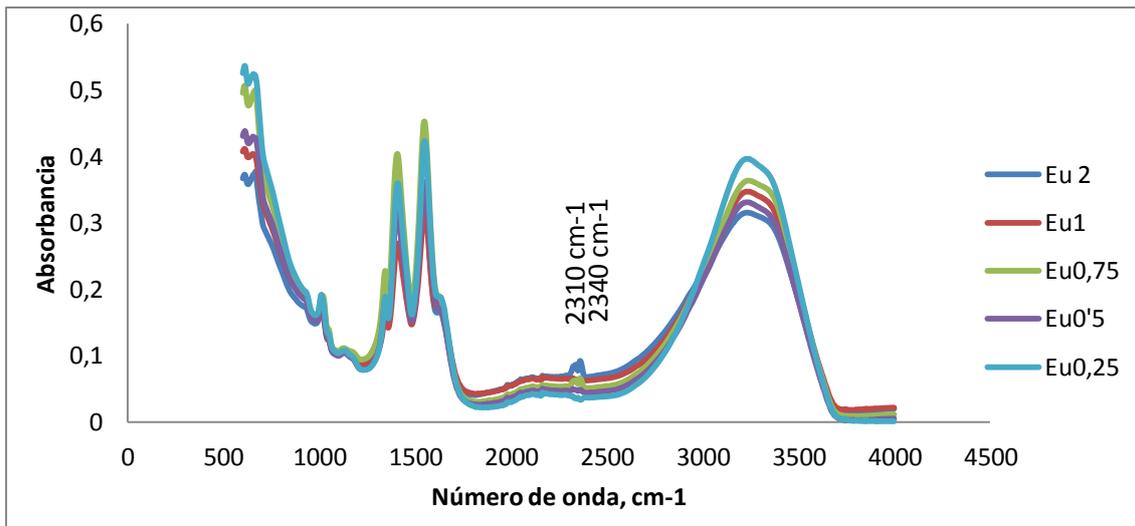


Figura 23. Espectro de absorción FTIR de nanopartículas de ZnS dopadas con europio. [Eu], M.

4.5.- Propiedades fotoluminiscentes de nanopartículas de ZnS-Eu.

En la Figura 24 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de ZnS dopadas con diferentes concentraciones de ión Eu^{3+} .

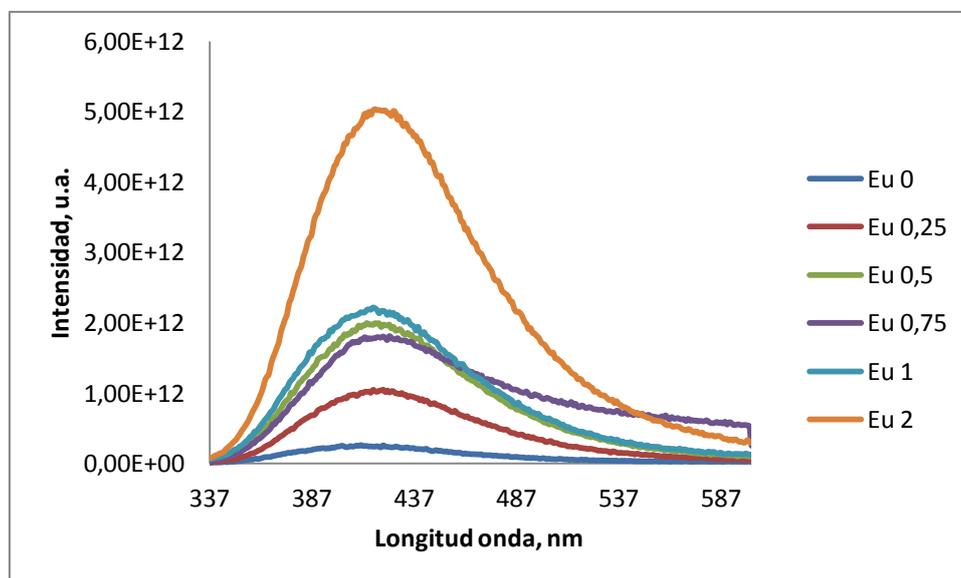


Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia de nanopartículas de ZnS dopadas con europio ($\lambda_{\text{exc}} = 324 \text{ nm}$).

Como se observa, aparece un máximo de intensidad a 430 nm, dicha intensidad depende directamente de la concentración de europio en las nanopartículas. Estos espectros coinciden en buena medida con los reportados en la referencia bibliográfica [36].

4.6.- Caracterización morfológica de las nanopartículas de ZnS-Eu.

El estudio morfológico se realizó con las nanopartículas dopadas con la mayor concentración de europio empleada en este estudio, ya que eran las nanopartículas que presentaban la mayor absorción en el infrarrojo y las que mayor emisión de fluorescencia presentaban.

En la Figura 25a, se puede observar que la morfología de las nanopartículas dopadas no cambia, respecto a las nanopartículas sin dopar: monodispersas, aproximadamente esféricas y con tamaños ≤ 5 nm.

El análisis por EDS (Figura 25b) muestra que las nanopartículas de ZnS-Eu únicamente contienen Zn, S y Eu, indicando que se obtuvo el nanomaterial puro.

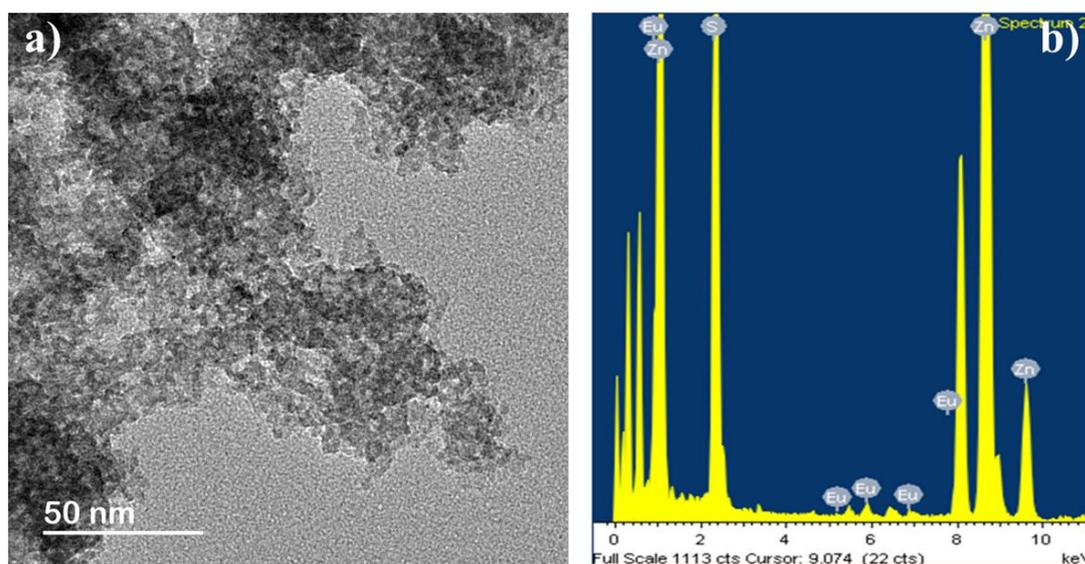


Figura 25. Nanopartículas de ZnS-Eu: a) imagen HRTEM, b) espectro EDS.

4.7.- Características fluorescentes de la tetraciclina.

La estructura química y el número de átomos protonados en la Tc, se muestran en la Figura 26. Los cambios en el estado de protonación de la Tc se manifiestan en cambios en el espectro de emisión de la misma.

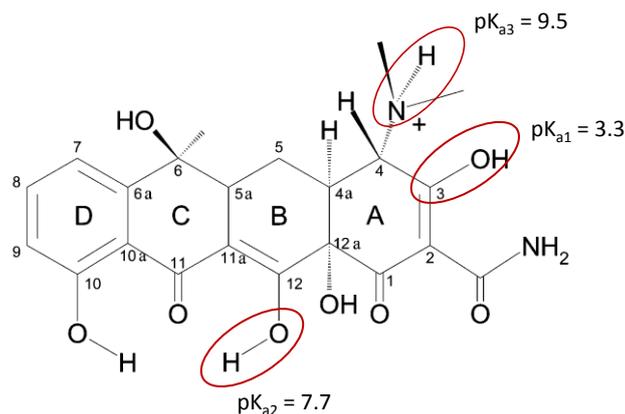


Figura 26. Estructura química de la tetraciclina totalmente protonada.

Existen varias alternativas tautoméricas y formas rotaméricas en disolución.

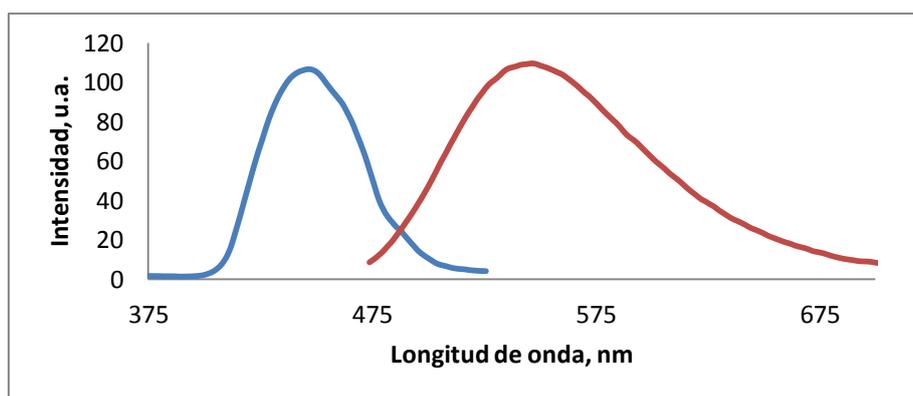
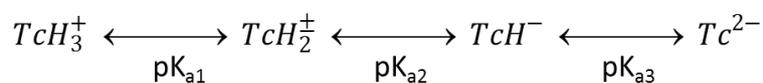


Figura 27. Espectros de excitación (azul) y de emisión (rojo) de la tetraciclina en medio acuoso a pH 6.

En la Figura 27 se muestran los espectros de excitación y emisión de la Tc a pH 6. Como se puede ver la Tc presenta un máximo de emisión (línea roja) en torno a los 554 nm y un máximo de excitación (línea azul) en torno a los 446 nm. A pH 6, y teniendo en cuenta los equilibrios de disociación de la Tc [37] el espectro corresponde a la forma zwitteriónica TcH^{+-2} .



4.8- Características fluorescentes del complejo Tetraciclina-Europio.

Puesto que una de las hipótesis propuestas en este proyecto es el empleo de nanopartículas de ZnS dopadas con Eu^{+3} para la detección de Tc, dada la afinidad de la misma por el Eu^{+3} , es necesario conocer las características fluorescentes de dicho complejo. En la Figura 28, se muestran los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del complejo Tc-Eu (en relación estequiométrica Tc:Eu = 1:3) a pH 6.

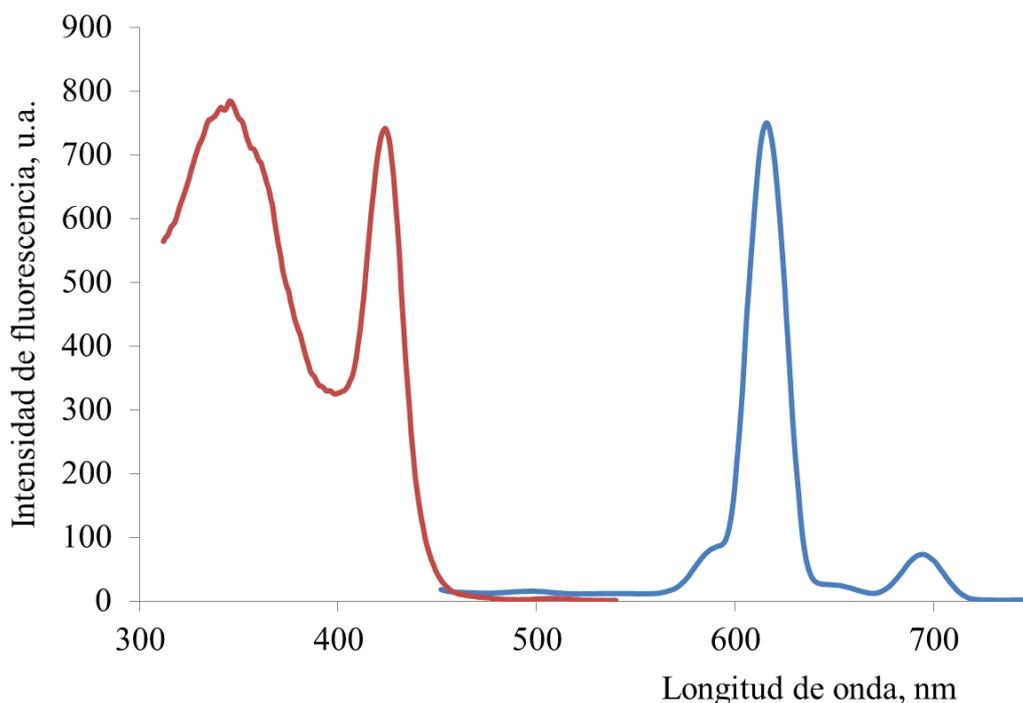


Figura 28. Espectro de emisión (línea azul) y de excitación (línea roja) del complejo Tc-Eu⁺³.

Como se puede observar, aparecen dos bandas en excitación, una a 345 nm que correspondería al complejo Tc-Eu y otra banda más acusada a 420 nm que correspondería a la Tc libre. En el espectro de emisión de fluorescencia se observa un pico intenso a 615-620 nm que corresponde a la emisión de complejo Tc-Eu, un hombro a 580 nm y una pequeña banda a aproximadamente 690 nm, que se debe a la dispersión de la radiación de excitación ($345 \text{ nm} \times 2 = 690$).

El proceso de emisión de los complejos con lantánidos tiene algunas peculiaridades no observables en complejos convencionales (Figura 29):

a) el ligando (la tetraciclina), y no el propio ión lantánido (europio), se excita desde el estado fundamental S_0 hasta el primer estado singlete S_1 a partir del cual tiene lugar un proceso de conversión interna.

b) desde el nivel S_1 tiene lugar entonces un cruce intersistemas al triplete T_1 del propio ligando (tetraciclina) y desde éste al nivel 4f del europio, el cual se desactiva emitiendo fluorescencia con emisiones múltiples. Por ejemplo, en el complejo Eu-Tc, las transiciones más intensas en el europio son la ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (alrededor de 620 nm) y la ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (alrededor de 580 nm) [38].

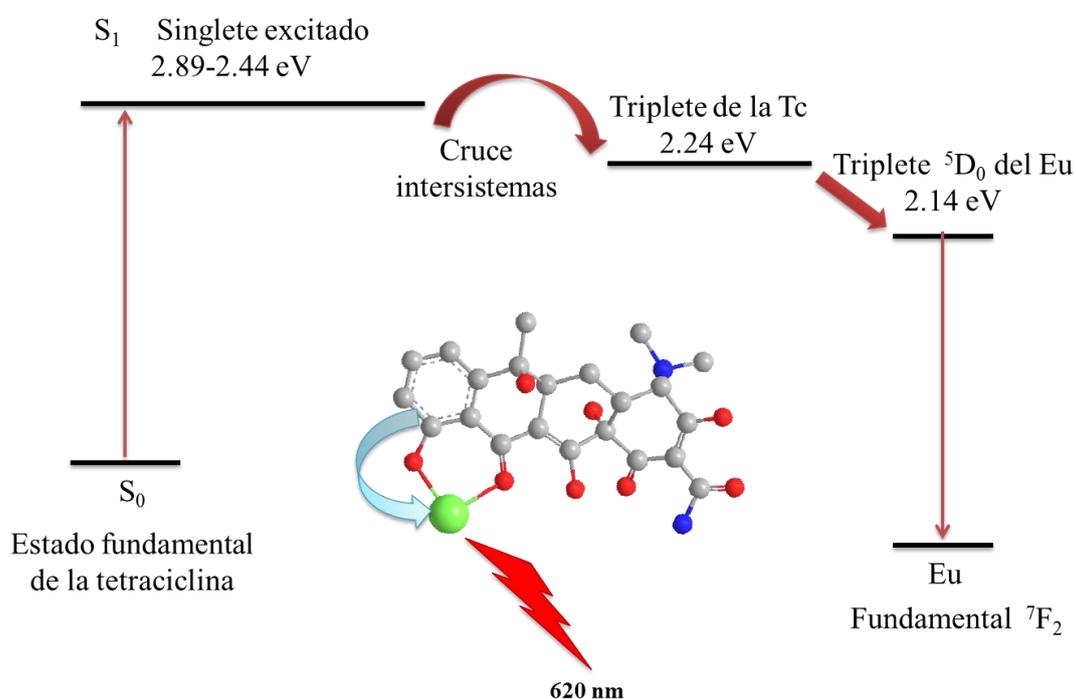


Figura 29.- Esquema del proceso de excitación de la Tc, de transferencia de energía al europio y desactivación radiacional del mismo. Se muestran los valores energéticos de los diferentes niveles excitados.

4.9.- Interacción de las nanopartículas de ZnS-Eu con Tc en disolución acuosa.

Como se describió en la parte experimental, se puso en contacto una cantidad dada de las nanopartículas dopadas con Eu^{+3} con una disolución de Tc $5 \times 10^{-2} \text{M}$ y, tras un tiempo de reacción, se separaron las nanopartículas por centrifugación y se midió la fluorescencia de la Tc libre en el sobrenadante a 560 nm. Los resultados se representaron gráficamente en función del tiempo de reacción (Figura 30). Como se puede observar, a medida que el tiempo de reacción aumenta, la intensidad de

fluorescencia del sobrenadante aumenta. Este hecho sugiere claramente que la Tc no es retenida por las nanopartículas. Este aumento de fluorescencia en el sobrenadante en función del tiempo sugiere, además, que existe un mecanismo por el cual la Tc se mantiene en disolución, con un aumento gradual de la intensidad de fluorescencia, superior al observado para la Tc libre en disolución y que no ha estado en contacto con las nanopartículas de ZnS dopadas.

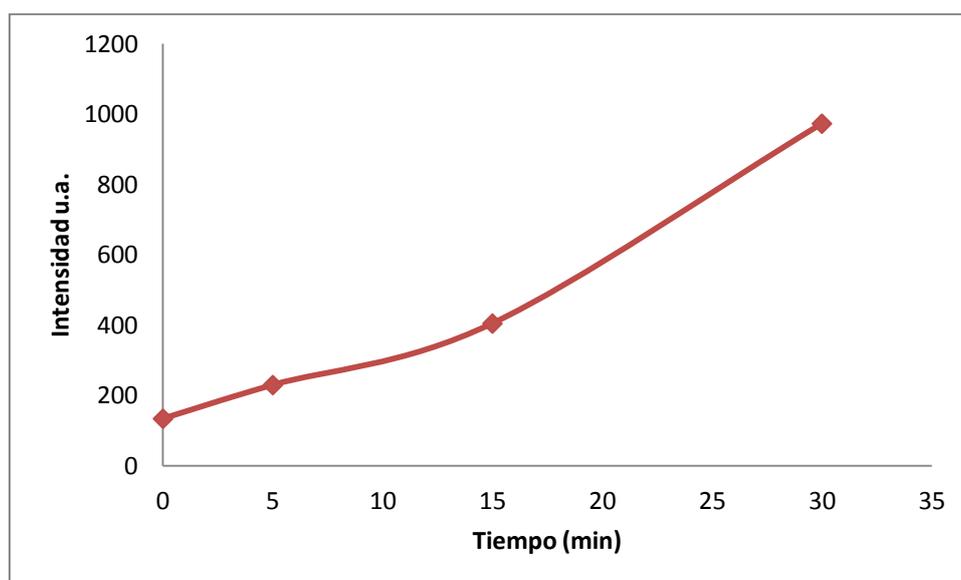


Figura 30. Intensidad de fluorescencia vs tiempo de reacción de la disolución de Tc en contacto con nanopartículas de ZnS dopadas con Eu^{+3} .

Dos son los mecanismos que proponemos para el comportamiento observado:

- En primer lugar, es posible que tenga lugar una lixiviación del Eu^{3+} de las nanopartículas de ZnS dopadas, favoreciéndose así la formación del complejo Tc-Eu. Obsérvese que el máximo de emisión de fluorescencia del complejo (580 nm, correspondiente a la transición $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$) está muy próximo al máximo de emisión de fluorescencia de la Tc libre (560 nm), lo que puede dar lugar a ese aumento de fluorescencia observado.
- Otro posible mecanismo, es la interacción de la Tc con el Zn presente en la superficie de las nanopartículas de ZnS, formando un complejo, manteniéndolas en suspensión y dando lugar a un aumento considerable de la fluorescencia de la Tc debido a la limitación de la movilidad de la misma. Es un hecho bien

conocido que la inmovilización de moléculas fluorescente sobre una superficie minimiza las vías de desactivación no radiacional, dando lugar a un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia [39]. En la Figura 31, se muestra un esquema del posible mecanismo.

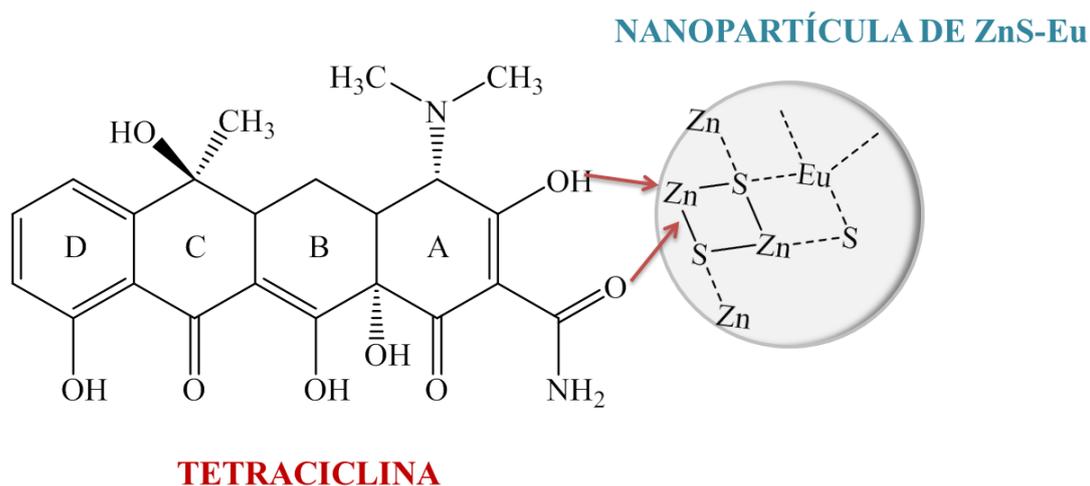


Figura 31. Formación del complejo Tc-Zn sobre la superficie de nanopartículas de ZnS dopadas con Eu+3.

La posibilidad de formación del este tipo de complejos está respaldada por las elevadas constantes de formación del complejo [40] resumidas en la Tabla 6. Como comparación, se incluye también la constante de formación del complejo Tc-Eu [41].

Tipo de complejo	Log β
Zn Tc H ₂	18,245
Zn Tc H	13,522
Zn ₂ Tc H ₂	27,238
Zn ₂ Tc H ₃	32,210
Eu ₃ Tc	10,05
Tb ₃ Tc	10,36
CaTc	5,86

Tabla 6. Constante de formación de complejos Tc-Zinc en medio acuoso [40,41].

Como se puede observar, la Tc tiene mayor afinidad por el zinc que por el europio, por lo que es plausible el mecanismo propuesto. Además, hay que tener en cuenta el pequeño tamaño de las nanopartículas (diámetro ≤ 5 nm), lo que explicaría también la baja eficacia del proceso de centrifugación.

4.10.- Características luminiscentes del terbio y de su complejo con tetraciclina.

A la luz de los resultados anteriores, nuestra hipótesis de trabajo que se basaba en la posibilidad de utilizar las nanopartículas de ZnS-Eu como fase para la extracción de la Tc de muestras complejas, fue descartada. Procedimos entonces a la búsqueda de un sistema luminiscente que nos permitiese, una vez separada la Tc de la muestra mediante un procedimiento químico, determinarla por fluorescencia. Con este fin, seleccionamos un metal lantánido, el terbio, y estudiamos su interacción con la Tc.

En primer lugar se preparó una disolución acuosa del metal $15 \times 10^{-2} \text{M}$ a pH 6, se registraron los espectros de excitación y emisión del metal (Figura 32), y se pudieron observar dos máximos de excitación a 345 y 365 nm. En el espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm) se observan varios máximos: 483, 537, 579 y 610 nm, correspondiendo a las transiciones de orbitales f-f internos, $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6$, $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$, $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_4$ y $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_3$, respectivamente, siendo el máximo de 537 nm el que presenta mayor intensidad y el más sensible a variaciones en el entorno del metal [42].

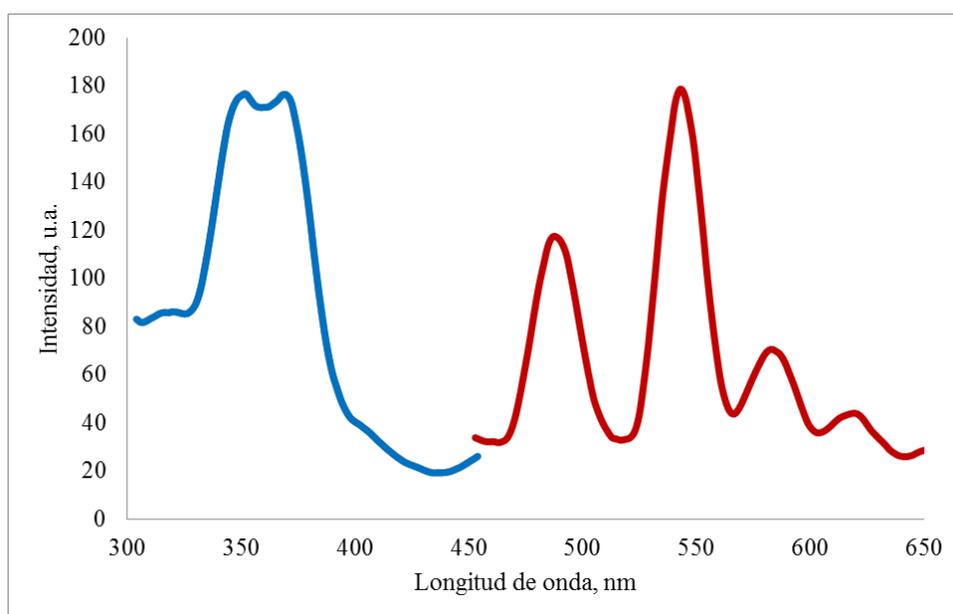


Figura 32. Espectro de excitación (azul) y de emisión (rojo) del ión Tb+3 en disolución reguladora de pH6.

A continuación se estudiaron las características luminiscentes del complejo Tc-Tb, en las condiciones especificadas en la sección experimental. En la Figura 34, se puede observar que el complejo presenta un máximo de excitación a 405 nm y dos bandas de emisión, una banda ancha con una intensidad máxima a 554 nm y una banda más estrecha, cuyo máximo de intensidad está a 612 nm. La banda a 554 nm se corresponde con la banda a 537 nm observada en el ión, ensanchanda como consecuencia de la formación del complejo. El pico a 612 nm se corresponde con la transición $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ del terbio.

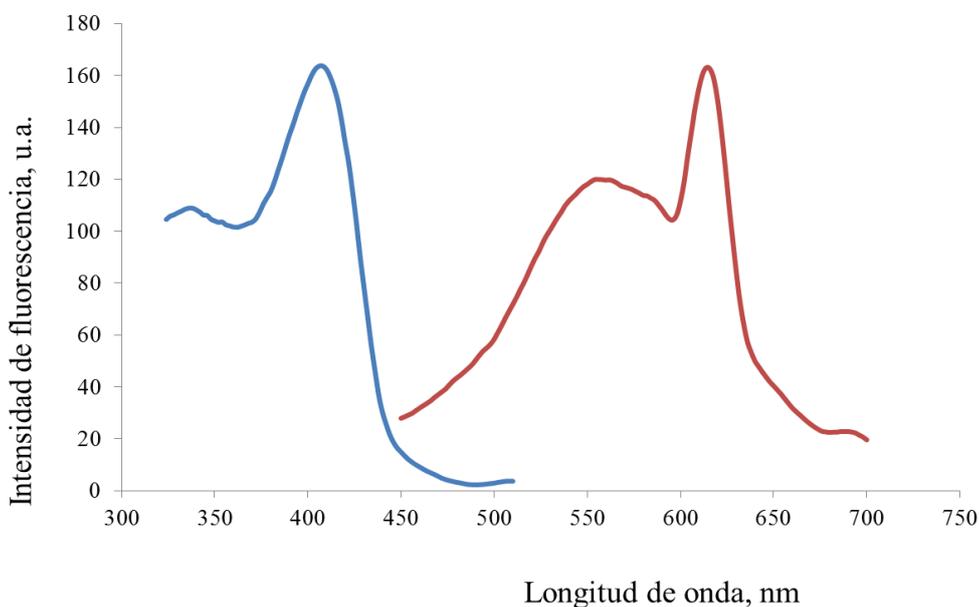


Figura 33. Espectros de excitación (azul) y de emisión (rojo) del complejo Tc-Tb en medio acuoso a pH 6.

4.11.- Cinética formación complejo Tc-Tb.

Dado que la reacción entre la Tc y el ión puede ser lenta, se procedió a estudiar la cinética de formación del mismo, con objeto de asegurar que las medidas posteriores se lleven a cabo en condiciones de equilibrio. Para ello se siguió el procedimiento descrito en la parte experimental y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34. Las medidas de fluorescencia del complejo se tomaron en función del tiempo, con una $\lambda_{exc} = 405$ nm y una $\lambda_{em} = 554$ nm.

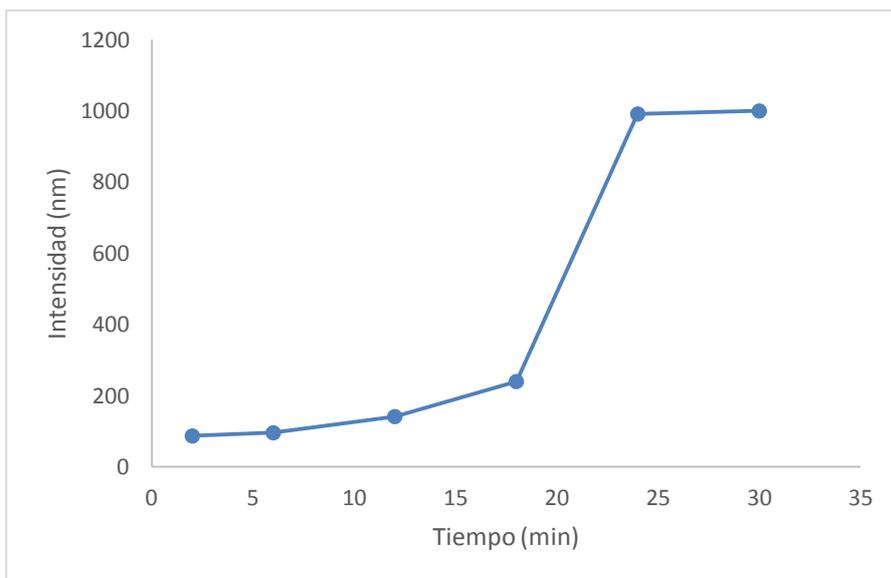


Figura 34. Fluorescencia del complejo Tc-Tb en función del tiempo de reacción.

Como se puede ver la intensidad aumenta lentamente durante los primeros 15 minutos sufriendo un aumento mucho más marcado a partir de los 20 minutos hasta alcanzar un máximo estable a partir de los 25 min. En estudios posteriores, se seleccionó un tiempo de reacción de 30 min para asegurar que se alcanzó el equilibrio de formación del complejo.

4.12.- Influencia del pH en la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb.

Se estudió la influencia del pH en la emisión de fluorescencia del complejo Tc-Tb. Para ello, se preparó una serie de muestras conteniendo la misma cantidad de complejo, pero variando el pH de cada una de ellas, en el intervalo pH 4-7,5. Tras 30 min de reacción, las medidas de fluorescencia del complejo se tomaron empleando una $\lambda_{exc} = 405\text{nm}$ y una $\lambda_{em} = 554\text{ nm}$. Los resultados se muestran en la Figura 35.

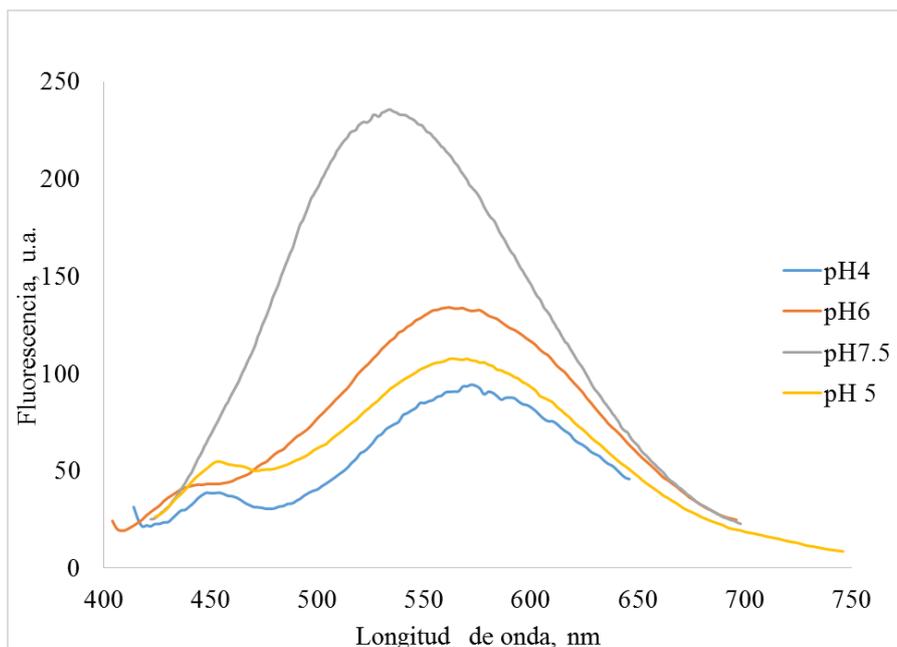


Figura 35. Influencia del pH en las características espectrales del complejo Tc-Tb.

Como se puede observar, a medida que el pH se eleva, la intensidad de fluorescencia del complejo también aumenta y se observa un desplazamiento del máximo de emisión hacia el azul, notándose un importante desplazamiento hipsocrómico de 40 nm a pH 7.5. Este hecho está relacionado con la ionización de la tetraciclina, como se detalló anteriormente en esta Memoria. A pH 7.5, se pierde un nuevo protón y es ahora la especie TcH la que forma complejo con el ion Tb^{+3} . En lo sucesivo, se seleccionó un pH = 6 con objeto de evitar desplazamientos espectrales y asegurar la formación de un único complejo.

4.13.- Ensayos de detección de Tetraciclina mediante disolución de Terbio en leche.

Con objeto de determinar la Tc en muestras de leche empleando el terbio como metal para su complejación, se llevaron a cabo dos vías de trabajo. En ambos casos se utilizó una concentración de Tc superior a la esperada en muestras reales, con objeto de evaluar la bondad de los procedimientos. Así, en la primera vía de trabajo, se adicionó Tc ($5 \times 10^{-2}M$) a las muestras de leche y tras un período de reposo (24h) con objeto de que se alcanzasen los equilibrios de interacción posibles de la Tc con la matriz, se procedió a separar la Tc mediante el tratamiento de las muestras con los reactivos de Carrez, tal y como se detalló en la parte experimental. Los análisis se llevaron a cabo por quintuplicado empleando leche desnatada y la fluorescencia de la Tc en el sobrenadante,

tras separar las proteínas precipitadas, se determinó empleando una línea de calibrado para Tc (Figura 36).

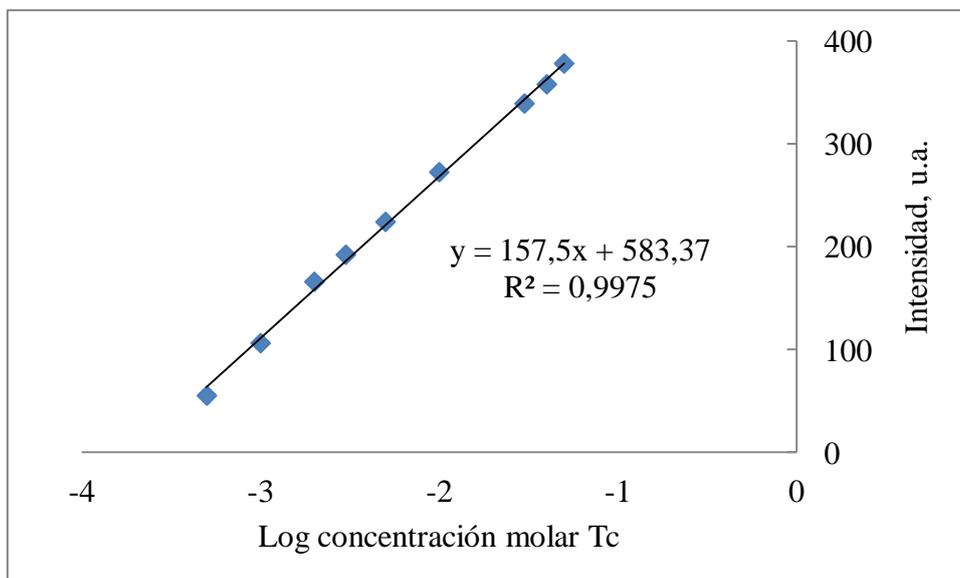


Figura 36. Línea de calibrado para Tc.

El promedio, para un nivel de confianza del 95%, se recoge en la Tabla 2.

Muestras	Intensidad, U.A.
Leche 1	155,89
Leche 2	156,12
Leche 3	155,75
Leche 4	156,46
Leche 5	155,98
Promedio	156,04 ± 0,4

Tabla 7. Intensidades de fluorescencia de la Tc medidas en el sobrenadante, tras el tratamiento de las muestras de leche.

La concentración media de la Tc en el sobrenadante, resultó ser $1,95 \times 10^{-3} \text{M}$, lo que supone una recuperación del 78%. Este resultado indica que el proceso de limpieza, empleando los reactivos Carrez, no es completo y que parte de la Tc queda ocluida en el precipitado o bien haya formado complejos con el Ca (II) presente en la leche. La constante de formación del complejo Tc-Ca ($\log \beta = 5,86$) [43] sugiere una alta afinidad

de la Tc por el ión. No obstante, el método es reproducible como lo demuestra la desviación estándar de las cinco muestras tratadas.

Visto este resultado, la segunda vía de trabajo fue adicionar Tc a las muestras de leche, así como la cantidad suficiente de Tb para asegurar la formación del complejo Tc-Tb en concentración $5 \times 10^{-2}M$. Tras la adición del metal, se mantuvieron las muestras en reposo durante 24 horas con objeto de que el sistema alcanzase el equilibrio y se procedió después a la precipitación de las proteínas con los reactivos Carrez como anteriormente. Tras centrifugar, se determinó la intensidad de fluorescencia del complejo Tc-Tb en el sobrenadante, empleando para ello una línea de calibrado preparada para el complejo Tc-Tb (Figura 37). El análisis se realizó por cuadruplicado.

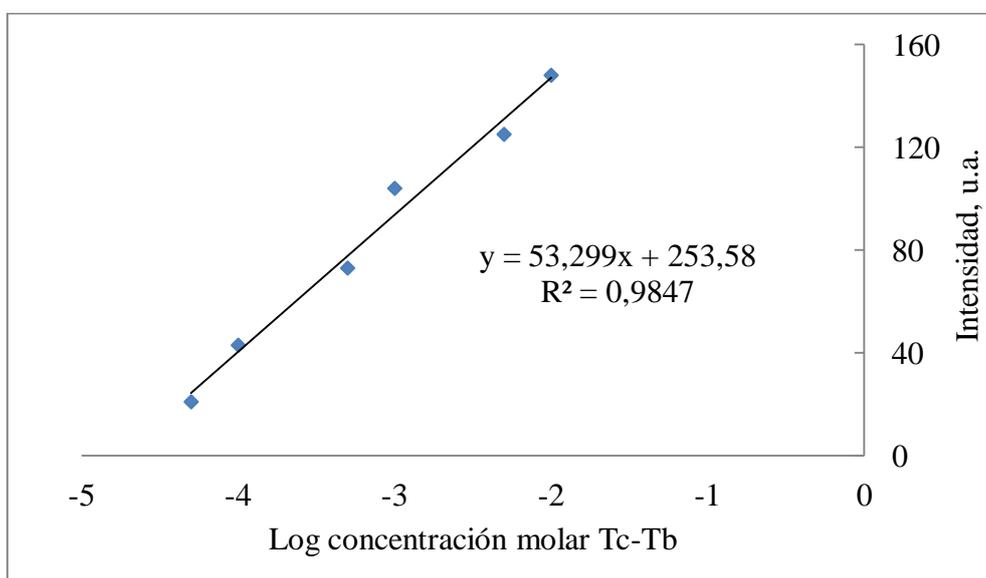


Figura 37. Línea de calibrado para el complejo Tc-Tb.

El promedio, para un nivel de confianza del 95%, se recoge en la Tabla 8.

Muestras	Intensidad
Leche 1	97,9
Leche 2	98,7
Leche 3	98,5
Leche 4	98,1
Promedio	98,3 ± 0,5

Tabla 8. Intensidades de fluorescencia el complejo Tc-Tb medidas en el sobrenadante, tras el tratamiento de las muestras de leche.

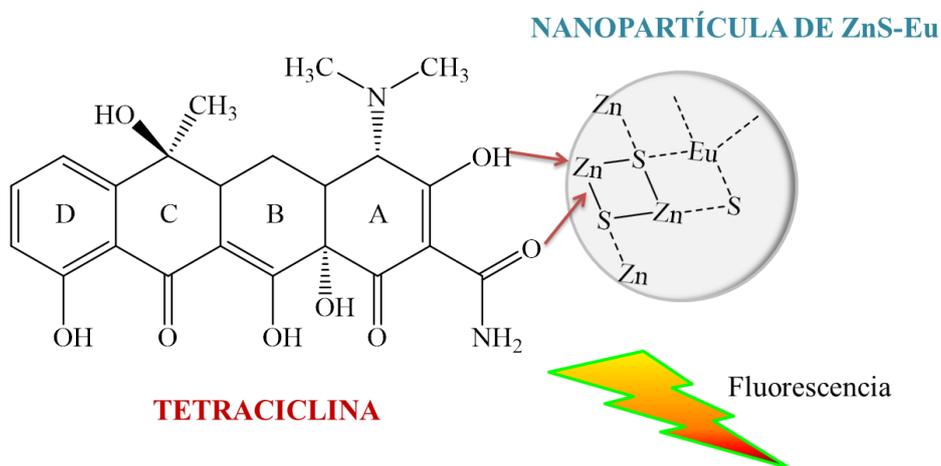
La concentración media del complejo Tc-Tb en el sobrenadante, resultó ser $1,26 \times 10^{-3}$ M, lo que supone una recuperación del 50%. Como anteriormente, el resultado indica que el proceso de limpieza, empleando los reactivos Carrez, no es completo y que parte del complejo queda ocluido en el precipitado (en este caso, en mayor proporción que la Tc libre, como vimos antes) o bien que la Tc sea desplazada del complejo por iones Ca (II) presentes en la leche. Este último punto es menos probable, dada la diferencia en las constantes de estabilidad de los correspondientes complejos [43]. El método, no obstante, es reproducible como lo demuestra la desviación estándar de las cuatro muestras tratadas.

5.-CONCLUSIONES

1. Se han sintetizado con éxito, nanopartículas de ZnS y nanopartículas de ZnS dopadas con Eu (III).
2. Se han evaluado dichas nanopartículas como sistemas para la recuperación de Tc en medio acuoso. En ambos casos, las nanopartículas enlazan a la Tc a través de la formación de complejos con Zn.
3. La recuperación de las nanopartículas en suspensión requiere del empleo de procedimientos de separación más eficaces que la centrifugación diferencial, como es la ultracentrifugación.
4. El tratamiento previo de las muestras de leche para la precipitación de proteínas resultó ser altamente reproducible, como se demostró en la recuperación de la Tc adicionada.
5. El empleo de Tb como metal luminiscente y complejante de la Tc, permitió alcanzar una recuperación de la Tc del 50% en muestras de leche, tras un proceso de precipitación química de las proteínas.

6.- SUGERENCIAS PARA TRABAJOS POSTERIORES

De los resultados obtenidos en este trabajo, las nanopartículas de ZnS-Eu ofrecen potencial analítico para la determinación de Tc.



Un incremento de más del 400% en la intensidad de fluorescencia de la Tc, augura un sistema altamente sensible.

El sistema se podría utilizar como nanosensores para la determinación de Tc en disolución o bien en el diseño de un sensor en fase sólida (tiras reactivas).

7.-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cháfer- Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R.; *Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples*; Trends in Analytical Chemistry 28 (9) (2010).
- [2] www.magrama.gob.es, Julio 2015.
- [3] Kantiani, L., Farré, M., Barceló, D.; *Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics in milk and feed samples*; Trends in Analytical Chemistry 6 (2009).
- [4] McGlinchey, T.A., Rafter, P.A., Regan, F., McMahon, G.P.; *A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices*; Analytical Chemical Acta 624 (2008) 1-15.
- [5] Pérez Trallero, E., Iglesias L.; *Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol*; Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21 (2003) 520-529.
- [6] Toldrá, F., Reig, M.; *Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods*; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 482-489.
- [7] Navrátilova, P.; *Screening method used for the detection of veterinary drug residues in raw and cow milk*; Czech Journal of Food Science 26 (2008) 393-401.
- [8] Zvirdauskierne, R., Salomskiene, J.; *An evaluation of different microbial and rapid test for determining inhibitors in milk*; Food Control 18 (2007) 541-547.
- [9] Kneebone, J., Tsang, PCW., Townson, DH.; *Short communication: Rapid antibiotic screening test detect antibiotic residues in powdered milk products*; Journal of Dairy Science 93 (2010) 3961-3964.
- [10] Perme, T., Bizjak, M., Gacnik, KS., Kirbis, A.; *Validation of TwinsernsorBT screening test for the detection of β -lactams and tetracyclines in milk and comparison to Delvotest SP-NT*; Slovenian Veterinary Research 47 (2010) 97-106.
- [11] www.indexx.com, Julio 2015.
- [12] Food safety information centre. (www.fsic.ie), Julio 2015.
- [13] Liu, Q., Zhou, Q., Jiang G.; *Nanomaterials for analysis and monitoring of emerging chemical pollutants*; Trends in Analytical Chemistry 58 (2014) 10-22.

- [14] Suphiya, M.S., Ranjita, M.S., Sanjeeb, K., Sahoo, PD.; *Nanoparticles: a boom to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 8 (2012) 147-166.
- [15] Martiroxian, A., Schneider, YJ.; *Engineered nanomaterials in food: implications for food safety and consumer health*; Int. J. Environ. Res. Public Health 11 (2014) 5720-5750.
- [16] Comisión Europea, *Recomendación 2011/696/UE relativa a la definición de nanomaterial* 2011.
- [17] Saha, K., Agasti, SS., Kim, C., Li, X., Rotello, VM.; *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*; Chem. Rev. 112 (2012) 2739-2779.
- [18] Zhang, Y., Chu, W., Foroushani, AD., Wang, H., Li, D., Liu, J., Barrow, CJ., Wang, X., Yang, W.; *New Gold Nanostructures for Sensor Applications: A Review*; Materials 7 (2014) 5169-5201.
- [19] Zhang, X., Zhang, Y., Zhao, H., He, Y., Li, X., Yuan, L.; *Highly sensitive and selective colorimetric sensing of antibiotics in milk*; Analytical Chimical Acta 778 (2013) 63-69.
- [20] Shen, L., Chen, J., Li, N., He, P., Li, Z.; *Rapid colorimetric sensing of tetracycline antibiotics with in situ growth of gold nanoparticles*; Anal. Chim. Acta 839 (2014) 83-90.
- [21] He, H., Pham-Huy, LA., Dramou, P., Xiao, D., Zuo, P., Pham-Huy, C.; *Carbon nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine*; Bio. Med. Research International, 2013 Artículo ID 578290, 12 páginas.
- [22] Kim, B., Lim, D., Jin, H.J., Lee, H.Y., Namgung, S., Ko, Y., Park, S.B., Hong, S.; *Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors*; Sensors and Actuators B 166 – 167 (2012) 193-199.
- [23] Guo, G., Zhao, F., Xiao, F., Zeng, B.; *Voltammetric Determination of Tetracycline by Using Multi Wall Carbon Nanotube-Ionic Liquid Film Coated Glassy Carbon Electrode*; Int. J. Electrochem. Sci. 4 (2009) 1365-1372.

- [24] Vega, D., Agüí, L., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, JM.; *Voltammetry and amperometric detection of Tetracyclines al multi-wall carbón nanotubes modified electrodes*; Anal. & Bioanal. Chem. 389 (2007) 951-956.
- [25] Zhou, L., Li, DJ., Gai, L., Wang, JP., Li, YB.; *Electrochemical aptasensor for the determination of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification*; Sensors & Actuators B 162 (2012) 201-202.
- [26] Gabrovskaa, KI., Ivanovaa, SI., Yavor, L., Godjevargovaa, I.; *Immunofluorescent Analysis with Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Determination of Antibiotic Residues in Milk*; Anal. Lett. 46 (2013) 1537-1552.
- [27] Tan H., Chen Y.; *Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk*; Sensors & Actuators B 173 (2012) 262-267.
- [28] Chen, X., Zhao, L., Tian, X., Lian, S., Huang, Z., Chen, X.; *A novel electrochemiluminescence tetracyclines sensor based on a Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles film modified electrode*; Talanta 129 (2014) 26-31.
- [29] Song, E., Yu, M., Wang, Y., Hu, W., Cheng, D., Swihart, MT., Song, Y.; *Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk*; Biosens. Bioelectron. 15 (2015) 320-325.
- [30] Coelho, FT., Lara, JR., Azevedo, VL., Ayman, H., Goreti, M.; *New biomimetics sensors for the determination of tetracycline in biological samples: Batch and flow mode operations*; Anal. Methods 2 (2010) 2039-2045.
- [31] www.polyintell.com, Julio 2015.
- [32] Gurmeet Singh Lotey, Jindal Zinki, Verma NK.; *Structural and photoluminescence properties of Eu-doped ZnS nanoparticles*; Material Science in semiconductor processing 16 (2013) 2044-2050.
- [33] Mou Pal, Mathews NR., Morales ER., Gracia y Jimenez JM., Mathew X.; *Synthesis of Europium⁺³ doped ZnS nanoparticles by a wet chemical route and its characterization*; Optical materials 35 (2013) 2664-2669.

- [34] Viswanath R., BhojyaNaik HS., Gubbihally Somalanaik YK., Parlesed Neelanjeneallu PK., Harish KN., Prabhakara MC.; *Studies on characterization, optical absorption and photoluminescence of Europium doped ZnS nanoparticles*; J. of Nanotechnology (2014), ID 924797.
- [35] Guardia L., Badía R., Díaz-García ME.; *Molecular imprinted sol-gels for nafcillin determination in milk-based products*; J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 566-570.
- [36] Ashwini K., Pandurangappa C., Nagabhushana B.; *Synthesis and optical properties of undoped and Eu-doped ZnS nanoparticles*; Phys. Scr. 85. 065706 (2012).
- [37] Scheneider S., Schmitt MO., Brehm G., Reiher M., Matousek P., Towrie M.; *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg⁺² and Ca⁺²*; Photochem. Photobiol. Sci. 2 (2003) 1107-1117.
- [38] Lakowicz JR.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Second Edition, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 1999.
- [39] Brion M., Lambs L., Berthon G.; *Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. Part 5. Formation of zinc complexes with tetracycline and some of its derivatives and assessment of their biological significance*; Agents and Actions 17 (1985) 229-242.
- [40] Saiki M., Lima FG.; *Determination of the stability constants for the complexes of rare earth elements and tetracycline*; J. Radio. Anal. Chem. 36 (1977) 435-450.
- [41] Pandya S., Yu J., Parker D.; *Engineering emissive europium and terbium complexes for molecular imaging and sensing*; Dalton Trans. (2006) 2757-2766.
- [42] *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*; Eds. M. Nelson, W. Hillen, R.A. Greenwald; Springer Basel AG, Switzerland, 2001]
- [43] Parolo MG., Avena MJ., Savini MC., Baschini MT., Nicotra V.; *Adsorption and circular dichroism of tetracycline on sodium and calcium-montmorillonites*; Colloids and Surfaces A: Physico chem. Eng. Aspects 417 (2013) 57-64.