



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN LECHE BOVINA POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN (UPLC)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía

Dr. Antonio Camacho Arteta

Autor

Francisco Daniel Zapata Soria

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Antonio Camacho Arteta
Doctor en Bioquímica y Farmacia
CI: 1707817688

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Francisco Daniel Zapata Soria
CI: 1721937231

AGRADECIMIENTOS

A Antonio Camacho y Emilia Vázquez, porque he visto reflejado en ustedes la excelencia profesional y la calidad personal, gracias por su apoyo en el transcurso de mis estudios y en la culminación de este proyecto.

Un agradecimiento especial a mi novia Natalie, por todo el amor y apoyo que me brinda, por estar siempre a mi lado, por ser mi fortaleza y mi compañera de vida.

DEDICATORIA

A mis padres, Francisco y Marcela, por el apoyo incondicional que me brindan, ellos son en mi vida ejemplo de esfuerzo y dedicación. Mamá, que es la persona que más quiero en este mundo, por el infinito cariño y motivación que me ha brindado todos estos años y Papá, mi amigo y la persona que más admiro en el mundo, un ejemplo de vida tanto personal como profesional.

RESUMEN

Las sulfonamidas (SAs) son un extenso grupo de antibióticos sintéticos, utilizados como medicamentos veterinarios en el ganado vacuno para el tratamiento y prevención de enfermedades. Los residuos de este tipo de antibióticos son segregados a la leche que llega al consumidor causando efectos nocivos en la salud humana, por este motivo se vuelve una prioridad la identificación y cuantificación de estos compuestos en la leche.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar un método para la identificación y cuantificación de sulfametazina y sulfamerazina en leche cruda por medio de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), ya que en el Ecuador no se había desarrollado un método cuantitativo para la identificación de estos dos antibióticos en la leche.

En este proyecto primero se estandarizó el método de lectura cromatográfica mediante el uso de estándares, tanto de sulfametazina como sulfamerazina al 99% de pureza y se procedió a realizar curvas de calibración de cada una de las (SAs), esto mediante el análisis por triplicado de cada estándar. Seguidamente se fortificaron muestras de leche cruda con concentraciones conocidas de los dos antibióticos, la extracción y purificación de las muestras se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE). Estandarizado el método, se corrieron muestras de leche cruda provenientes de la Parroquia Alóag del Cantón Mejía Provincia de Pichincha.

Se obtuvo los tiempos de retención de cada sulfonamida, se consiguió un coeficiente de correlación cercano a 1 con lo que se demostró la linealidad del método, también se realizó un estudio estadístico con el que se determinó los límites de detección y cuantificación de las dos (SAs), obtenidos estos límites se demostró que el método desarrollado puede detectar concentraciones a nivel de partes por billón. Se obtuvo un porcentaje promedio de recuperación de 91.05% para sulfametazina y 115.71% para sulfamerazina, que son valores

aceptables para este indicador. De las 6 muestras de leche analizadas 3 resultaron positivas para sulfametazina, con valores que exceden los LRM permitidos por el Codex Alimentario.

ABSTRACT

Sulfonamides (SAs) are an extensive group of synthetic antibiotics, used as veterinary drugs in cattle for the treatment and prevention of diseases. Residues of these antibiotics are secreted into milk that reaches the consumer, they cause harmful effects on human health, that is why the identification and quantification of these compounds in milk are a priority.

The aim of this work was to develop and implement a method for the identification and quantification of sulfamethazine and sulfamerazine in raw milk by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), because Ecuador had not developed a quantitative method for the identification of these two antibiotics in milk.

The first method in this project was to standardize the chromatographic reading method, by using standards of sulfamethazine and sulfamerazine with 99% purity, and then it proceeded to perform calibration curves of each of the (SAs), by the triplication analysis of each standard. Then, the samples of raw milk were fortified with known concentrations of the two antibiotics, the extraction and purification of the samples was performed by solid phase extraction (SPE). By the method standardization the samples of raw milk were analyzed from the Alóag Parish in the Mejía Canton at the Pichincha Province.

Retention time of each sulfonamide was obtained, a correlation coefficient close at 1 was achieved so that the linearity of the method was demonstrated, also a statistical study was performed to determine the limits of detection and quantification of the two (SAs). After these limits were obtained they showed that the developed method is able to detect concentrations of parts per billion level. An average recovery rate of 91.05% and 115.71% for sulfamethazine and sulfamerazine, these were acceptable values for this indicator. Three of the 6 milk samples were positive for sulfamethazine, with values that exceed the LRM allowed by the Codex Alimentarius.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Formulación del Problema	3
1.3 Justificación	4
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo General.....	4
1.4.2 Objetivos específicos	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 La leche	6
2.1.2 Introducción	6
2.1.3 Historia.....	6
2.1.4 Situación a nivel mundial	8
2.1.5 Situación en el Ecuador	11
2.1.6 Calidad de la leche	12
2.1.6.1 Parámetros de calidad.....	13
2.1.6.2 Calidad a nivel mundial.....	15
2.1.6.3 Normas de calidad para la leche en el Ecuador	16
2.1.7. Medicamentos empleados en la industria pecuaria	17
2.1.8 Riesgos del consumo de leche y derivados con residuos de antibióticos.....	18
2.1.8.1 Origen de la presencia de residuos de antibióticos en la leche ..	19
2.1.8.2 Tiempo de retiro o suspensión	20
2.1.8.3 Efectos de la presencia de residuos antimicrobianos en la leche	20
2.1.8.4 Salud pública	21
2.2 Sulfonamidas.....	22
2.2.1 Estructura química	23
2.2.2 Propiedades de las sulfonamidas	24
2.2.3 Mecanismo de acción	25
2.2.4 Farmacocinética.....	25

2.3 Cromatografía	26
2.3.1 Tipos de cromatografía	27
2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	28
2.3.3 Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC)	28
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	30
3.1 Tipo de investigación.....	30
3.2 Muestras de leche cruda para la investigación	30
3.3 Toma de muestras	30
3.4 Tratamiento de la muestra	30
3.5 Métodos y Técnicas	30
3.5.1 Método cromatográfico	31
3.5.1.1 Gradiente.....	31
3.5.2 Curva de calibración	33
3.5.3 Fortificación de muestras de leche cruda	33
3.5.4 Método de extracción de muestra.....	33
3.5.5 Método de extracción y purificación en fase sólida.....	34
3.5.6 Soluciones y fases móviles	35
3.5.6.1 Solución acuosa de ácido acético 0.2% (fase móvil).....	35
3.5.6.2 Solución Buffer de McIlvaine	36
3.5.6.3 Solución Buffer de McIlvaine/EDTA.....	36
3.5.6.4 Solución estándar de sulfamerazina 100 µg/ml	36
3.5.6.5 Solución estándar de sulfametazina 100 µg/ml	36
3.5.6.6 Estándar de trabajo 1 µg/ml de sulfamerazina y sulfametazina	36
3.5.6.7 Solución ácido tricloroacético al 12%	37
3.6 Parámetros de desempeño analítico del método cromatográfico	37
3.6.1 Estimación de los parámetros de regresión.....	37
3.6.2 Predicción de la muestra incógnita	38
3.6.3 Sensibilidad de la calibración.....	39
3.6.4 Sensibilidad analítica	39

3.6.5 Límite de detección (LOD)	40
3.6.6 Límite de cuantificación (LOQ)	41
3.6.7 Rango Lineal.....	41
4. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
4.1 Método cromatográfico	42
4.2 Curvas de calibración.....	42
4.3 Límites de detección y cuantificación	46
4.4 Validación del método de recuperación de muestras de leche fortificada.....	47
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
5.1 Conclusiones.....	51
5.2 Recomendaciones	52
REFERENCIAS	53
ANEXOS	59

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La leche es uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial. En el año 2011, en Sudamérica, la producción fue de 68.0 millones de toneladas, 14.4 millones para América Central (incluyendo México) y 1.9 millones para la región del Caribe, manteniendo un aumento anual de esta producción (FAO, 2011).

En el Ecuador, según los datos recopilados por el INEC del año 2014, la producción diaria de leche alcanza los 5'596.361 litros. En la Sierra se aporta el 75.9% de la producción nacional, en la Costa el 16% y en el Oriente el 7.6%. La producción de leche en la provincia de Pichincha es la más importante, con 970 516 litros anuales de la producción (INEC, 2014).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la leche y sus derivados son parte del grupo de alimentos con mayor riesgo para la salud humana por ser de amplio consumo. También por su facilidad para transmitir enfermedades, que se dan por la presencia de microorganismos y contaminantes como medicamentos veterinarios (Parra et al., 2003).

Los medicamentos veterinarios son empleados en el ganado vacuno para aumentar su metabolismo y para tratar o prevenir enfermedades. Después de administrado el medicamento a un animal, se genera una serie de cambios metabólicos para su eliminación, por lo cual estos compuestos son expulsados a través de la orina, la leche y las heces. Los residuos de medicamentos veterinarios alteran la calidad de la leche y son un peligro para la salud humana, ya que por efectos acumulativos, son tóxicos y producen afecciones orgánicas, alergias e incluso cáncer (Parra et al., 2003).

Los residuos químicos más comunes en la leche son los compuestos betalactámicos, las tetraciclinas y las sulfonamidas. Las sulfonamidas son compuestos bacteriostáticos que inhiben la formación de ácido fólico en las bacterias. Actualmente, se conocen por lo menos 20 tipos de sulfonamidas (SAs). Estos compuestos químicos en la leche constituyen una creciente preocupación para los consumidores, así como para la industria alimentaria debido a su potencial cancerígeno y su contribución a crear resistencia a los antibióticos (She, 2014, pp. 2246-2254).

Estudios recientes indican que el uso indiscriminado y no controlado de este tipo de antibióticos puede generar en el hombre carcinogenicidad, reacciones alérgicas, teratogenicidad mutagenicidad, entre otras, es por esto que la Unión Europea (UE), y organismos como la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) han establecido los límites máximos de residuos (LMR) de sulfonamidas en la leche. De la misma manera, la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se ocupan de la ejecución de los programas de normativas alimentarias, que basados en el Codex Alimentario, garantizan la protección de la salud de los consumidores (Márquez, 2008, pp. 124-135).

Se han desarrollado varias técnicas para detectar y cuantificar los residuos de antibióticos en alimentos de origen animal, siendo las técnicas cromatográficas las de más amplio alcance. Entre estas técnicas podemos destacar: la cromatografía líquida (LC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC), la Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), y la Cromatografía de gases (GC) (Baliz y Hewitt, 2003, 105-131).

La validación del método desarrollado por Yin-Liang Wu, para la determinación de sulfonamidas en la leche, demuestran que la cromatografía líquida de alta eficacia es idónea para la investigación de las sulfonamidas, mostrando la

cuantificación de 8 sulfonamidas a niveles de partes por billón y presentando mejoras tanto en la fase de extracción de muestras como en la fase de lectura (Wu. et al., 2007).

En los métodos oficiales de análisis de la AOAC International (OMA), se encuentra también el desarrollo y validación de métodos analíticos para detección de sulfonamidas en la leche por cromatografía líquida. OMA es la colección más completa y fiable de los métodos químicos y microbiológicos disponibles en el mundo y se encuentran contenidos en varias de las normas alimentarias del Codex. En estas metodologías de estudio de sulfonamidas, se detalla las condiciones cromatográficas del equipo así como como la preparación, extracción y análisis de las muestras a ser estudiadas (Horwitz y Latimer, 2010). De esta manera se podrá tomar como referencia los estudios ya realizados como guía para la investigación y desarrollo del presente proyecto.

1.2 Formulación del Problema

Las sulfonamidas constituyen uno de los agentes farmacológicos más empleados para tratar enfermedades en animales y favorecer su crecimiento. Estos compuestos son segregados en la leche que va directo al consumidor, causando efectos nocivos en la salud humana por su potencial carácter cancerígeno, la generación de resistencia a los antibióticos y reacciones alérgicas (Manzanares, Gracia y García, 2013, pp. 459–464)

En el Ecuador no se ha desarrollado un método para la identificación cuantitativa de estos compuestos en la leche. Teniendo en cuenta que la leche es uno de los alimentos de mayor consumo en el país, se tiene que garantizar que se encuentre libre de agentes químicos extraños a su composición y con esto cumplir con la Norma NTE INEN 9:2012 quinta revisión en la que se especifican los LMR para sulfonamidas en leche (INEN, 2012).

1.3 Justificación

El uso de antibióticos antimicrobianos en medicina veterinaria, es una de las principales herramientas en el control y erradicación de enfermedades infecciosas en ganado bovino. El uso indiscriminado de estos compuestos que solo se deberían administrar bajo prescripción veterinaria, generan impacto sobre la salud humana al ser excretados en la leche cuando no existe un control debido de su dosificación y posterior tiempo de retiro. Por este motivo en varios países ya se han desarrollado métodos para detectar sulfonamidas en leche, de igual manera organismos como la FAO y la OMS advierten sobre los riesgos que presentan estos compuestos en un alimento de consumo masivo como lo es la leche (San Martín et al., 2002, pp. 222-224).

En el Ecuador ya se encuentran establecidos en la norma INEN los límites máximos de residuos de sulfonamidas en la leche pero en la actualidad el país no cuenta con una técnica para su determinación. AGROCALIDAD, organismo de control a nivel nacional de alimentos, para salvaguardar la inocuidad alimentaria del consumidor, requiere un método analítico cuantitativo e instrumental en UPLC para investigar y cuantificar los niveles de sulfonamidas en leche cruda, método que será desarrollado en el presente proyecto.

El estudio de las sulfonamidas y el desarrollo de una técnica cromatográfica con tecnología de última generación permitirán que se mejore la calidad de la leche en el país y al mismo tiempo permitirá realizar análisis efectivos de estos compuestos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar sulfonamidas en leche bovina mediante el uso de Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución.

1.4.2 Objetivos específicos

Estandarizar el método para la determinación de sulfamerazina y sulfametazina en leche por UPLC.

Realizar un estudio estadístico del mismo, encaminado a la determinación de su porcentaje de recuperación, límites de detección y cuantificación de las 2 sulfonamidas.

Aplicar el método estandarizado para la determinación de las sulfonamidas en muestras de leche cruda, a niveles de concentración del orden de partes por billón.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 La leche

2.1.2 Introducción

En la actualidad la producción de leche ha crecido de manera sostenida, como resultado del mejoramiento genético, sanitario, manejo y alimentación de los establecimientos. Creando para los pequeños productores pecuarios ganancias parcialmente rápidas, estos abastecen prácticamente la totalidad de la leche a los países en vías de desarrollo, en los que se prevé un aumento del 25% para 2025 de la demanda equivalente (FAO, 2006).

La leche es un alimento nutritivo y también un producto de control en materia de seguridad alimentaria en el mundo, y es imprescindible asegurar su calidad, pues el consumo diario de este alimento se da en un alto porcentaje de la población, por lo tanto es fundamental cuidar de la salud del animal, mantener la limpieza de corrales, cadena de frío del producto y su pronta comercialización, tomando en cuenta aquellos factores que pueden alterar su inocuidad y estabilidad (O'Grady y Doherty, 2009, p. 258).

2.1.3 Historia

El comercio de lácteos ha sufrido un alto impacto de las reformas a las políticas agrarias y a las negociaciones comerciales internacionales, porque se trata de un sector que mantiene una política de proteccionismo, principalmente en los países industrializados, que en la actualidad concentran la mayor parte de las importaciones, exportaciones y demanda mundial, basándose en subsidios como la Unión Europea (SEM, 2012).

Las políticas de calidad a largo plazo han aprobado el mejoramiento progresivo de los sistemas de producción, desarrollo y las características finales del producto, así en 1996 se planteó el objetivo de disminuir la latencia

mundial de mastitis bovina en la industria láctea, para cumplir con el objetivo algunos países prohibieron la venta de leche que contenga SCC > 500 000 cel./mL o se acerquen a dicha cifra (Rivas et al., 2001, pp. 399-407).

En los diez últimos años se ha dado más énfasis a nivel mundial a las enfermedades transmitidas por alimentos, por lo tanto la FAO y la OMS se involucran en el desarrollo de programas dirigidos a vigilar estas enfermedades y reducir sus efectos; conjuntamente la Unión Europea emite disposiciones de higiene en la obtención, recolección y procesamiento de leche, como que los animales no presenten tuberculosis ni brucelosis, el producto final y listo para ser comercializado no debe contener trazas de medicamentos veterinarios o detergentes y debe mantenerse sobre el límite máximo de conteo bacteriano permitido (FAO, 2000).

En el año 2003 y 2004, el sector lechero recibió una gran influencia de las políticas gubernamentales a nivel mundial, principalmente: (I) reducción de los precios internacionales de los productos lácteos, (II) ingreso de políticas para mejorar las normas de calidad en las explotaciones lecheras, orientadas a elevar la calidad y la higiene, (III) cambios en las políticas nacionales para enlazarlas con la política agrícola común y (IV) países como Brasil y Venezuela, implementaron medidas para restringir las importaciones de lácteos de otros países (FAO, 2006).

Actualmente en el Ecuador se ha implementado una normativa que regula la calidad y los precios, esta fue establecida por el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN, para controlar la producción de alimentos y su comercialización, de igual manera más instrumentos legales son planteados y aplicados en los diferentes organismos gubernamentales del país para un verdadero control en la producción de alimentos, un ejemplo es el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura, que es un requisito obligatorio para la obtención de permiso de funcionamiento; de esta manera todas las industrias deben acatar con lo planteado en las normativas técnicas INEN (FAO/OMS, 2005).

En la actualidad, a nivel mundial un gran número de países dan prioridad nacional a la producción y abastecimiento de leche, por esta razón se establecen políticas de protección para el sector lechero (SEM, 2012).

2.1.4 Situación a nivel mundial

A nivel mundial la oferta, demanda y comercio de alimentos depende de varios factores que intervienen en un contexto macroeconómico que se ve influenciado por el manejo comercial y económico de cada país, así como las políticas de apoyo a la producción. (FAO, 2006).

En los diez últimos años el consumo mundial de productos lácteos se incrementó debido al aumento de la población mundial, la demanda creció cerca de 30% y el 70% corresponde al crecimiento del consumo per cápita; que en la actualidad se encuentra concentrado en los países industrializados, debido a su gran poder de adquisición y consumo por habitante, además del acelerado ritmo de crecimiento poblacional; motivo por el cual, en las perspectivas a largo plazo, no solo son necesarias las proyecciones del desarrollo económico y promedio mundial, sino el impacto relativo que tendrán todos los países (SEM, 2012).

Para el año 2012 se estimó en 754 millones de toneladas de producción mundial de leche según la FAO (2015), representada por 9 de los principales productores (Figura 1), Estados Unidos con 90 865 000 toneladas métricas/año tiene el primer lugar, Turquía con 15 977 837 toneladas métricas/año obtuvo el último lugar (FAO, 2015).

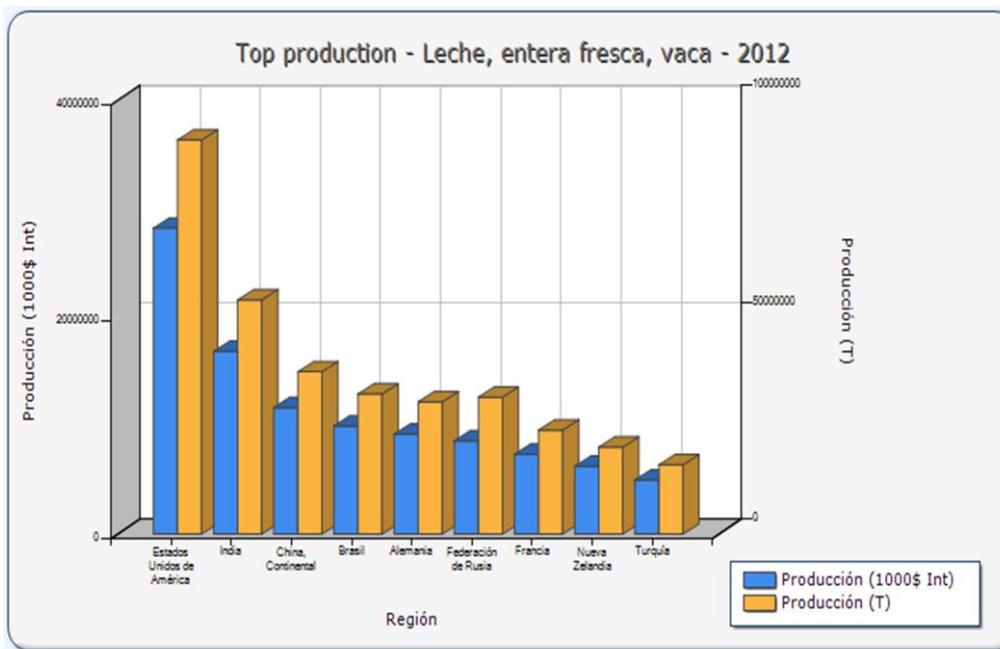


Figura 1: Producción mundial de leche de vaca, referente a los 10 mayores productores en toneladas métricas (MT) y dólares internacionales (Int \$) del año 2012.

Tomado de FAOSTAT, 2012.

Las perspectivas del comercio a nivel mundial de productos lácteos indican que siguió expandiéndose en el 2012, la demanda permaneció firme, y se prevé que las importaciones lleguen a 52.7 millones de toneladas de leche, El continente Asiático permaneció como el mercado principal, seguido de África del Norte, Oriente Medio, América Latina y el Caribe (FAO/SMIA, 2012).

Se prevé que mundialmente se consume alrededor de 500 millones de toneladas, en diversos tipos; el 85% pertenece a leche de vaca y el resto corresponde a otras especies como cabra 2%, búfalo 11%, y otras 2%; el consumo anual de leche ha ido aumentando en los últimos diez años un 1.6% observándose dos conductas paralelas, el de los países en vías de desarrollo y el de los países desarrollados (SEM, 2012).

Para septiembre de 2015 los precios de los productos lácteos presentaron un aumento después de varios meses de descenso. Durante el primer trimestre del año 2015 los mercados internacionales de productos lácteos se vieron influenciados por la reducción de importaciones de China y Rusia, y al mismo tiempo se mantuvieron constantes las exportaciones a nivel mundial. Se pronostica que la producción mundial de leche aumentará un 1.5 % en 2015, lo que quiere decir, una tasa mucho menor que la registrada en 2014, y con una cuota de producción mundial estimada para el año 2016 de 8.9% llegando a 800.7 millones de toneladas como se muestra en la (Figura 2) (FAO, 2015).

PANORAMA DEL MERCADO MUNDIAL DE PRODUCTOS LÁCTEOS				
	2013/14	2014/15 <i>estim.</i>	2015/16 <i>prónost.</i>	Variación de: 2015/16 a 2014/15
	<i>millones de toneladas</i>			<i>%</i>
BALANZA MUNDIAL				
Producción total de leche	767.5	789.0	800.7	1.5
Comercio total	68.7	72.6	71.3	-1.7
INDICADORES DE LA OFERTA Y LA DEMANDA				
Consumo humano per cápita:				
<i>Mundo (kg/año)</i>	107.2	109.0	109.4	0.4
<i>Comercio - cuota de producción (%)</i>	9.0	9.2	8.9	-3.1
ÍNDICE DE LA FAO PARA LOS PRECIOS DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS (2002-2004=100)				
	2013	2014	2015 <i>Ene-Sept</i>	Variación de: Ene-Sept 2015 a Ene-Sept 2014 <i>%</i>
	243	224	163	-31.8

Figura 2: Panorama del mercado mundial de productos lácteos con pronóstico al año 2016
Tomado de FAO, 2015

2.1.5 Situación en el Ecuador

En el Ecuador la leche entera es el segundo producto con mayor demanda a nivel nacional (Figura 3) con 5 675 067 toneladas métricas para el 2012, según la FAOSTAT 2012

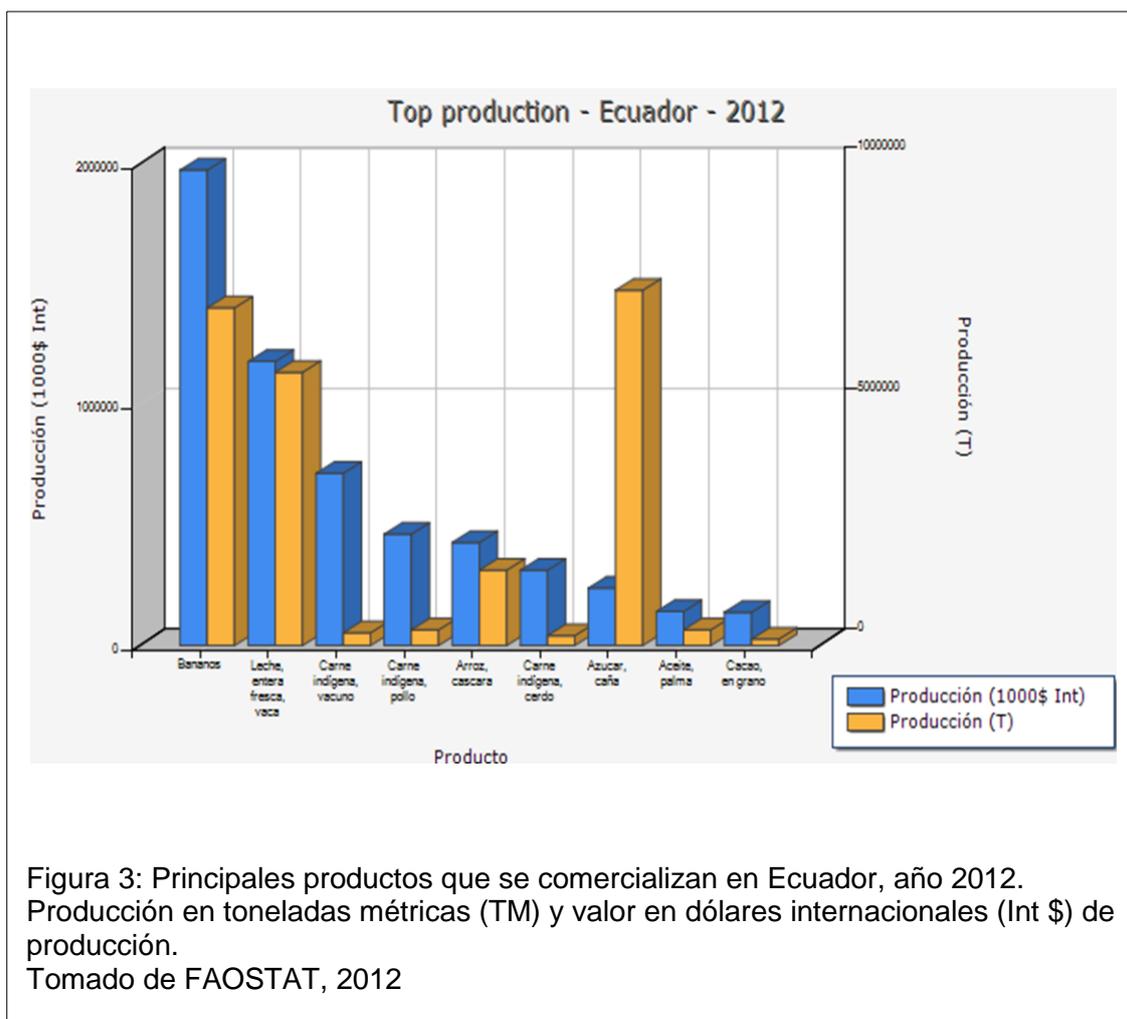


Figura 3: Principales productos que se comercializan en Ecuador, año 2012. Producción en toneladas métricas (TM) y valor en dólares internacionales (Int \$) de producción. Tomado de FAOSTAT, 2012

Según el INEC la producción total nacional de leche es de 5 596 361 litros diarios de la cual la región Sierra contribuye con el mayor porcentaje, 75.9% de producción, un aproximado de 4 836 974 litros por año, seguida de la Costa con el 16.6%, y un aproximado de 1 055 934 litros por año y el Oriente con el 7.6%, y un aproximado de 482 415 litros por año; se destaca en la región Sierra, la provincia de Pichincha con una producción de 970 516 litros por año (INEC, 2014).

La Sierra posee la mayor cantidad de litros de leche por vaca, con un promedio de alrededor de 6.7 L/vaca, esto se debe al amplio número de ganado lechero de la zona, 51.0% del total nacional, y a varias exenciones de pastos naturales que se cultivan para su alimentación; la región Oriental se encuentra en segundo lugar con una producción de 4.7 L/vaca, con el 12.3% del ganado y por último la región Costa con 3.6 L/vaca, con el 36.7% (INEC, 2011).

De igual manera en el país la producción de leche está establecida por el tamaño de UPA, según el III Censo Nacional Agropecuario (INEC/MAG/SICA, 2002) existe una mayor producción en aquellas que constan de extensiones de 20 a menos de 50 hectáreas con 644 654 L, de 50 a menos de 100 ha con 531 871 L y finalmente aquellas de 200 ha y más con 439 098 L.

2.1.6 Calidad de la leche

Al hablar de control de calidad de leche es indispensable el uso de herramientas y análisis aprobados para garantizar el cumplimiento de buenas prácticas, normativas y reglamentaciones concernientes a los productos lácteos (FAO, 2012); controles necesarios para asegurar el cumplimiento de las normas para la composición química, pureza y la concentración de microorganismos presentes (Jánnosi y Baltay, 2004, pp. 173-183).

Un significativo porcentaje de la población mundial consume diariamente productos de origen animal, debido a su alto contenido de nutrientes indispensables para la salud y crecimiento; por otro lado estos son productos muy susceptibles a contaminarse, especialmente por microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter* (FAO/OMS, 2005).

Lamentablemente, la leche, carne y huevos son sustratos perfectos para el crecimiento de microorganismos patógenos causantes de altos índices de mortalidad anual, principalmente en países en vías de desarrollo, debido a que carecen de una amplia base de recursos para la producción ganadera, quienes

necesitan implementar todo lo que producen de manera segura e inocua; además la corta vida útil de los productos provoca pérdidas grandes y puede afectar de mala manera el comercio y la confianza del consumidor (O'Grady y Doherty, 2009, p. 258).

Por lo cual, el estado de la calidad de la leche conlleva a incrementar costos en toda la cadena de producción, comercialización y consumo (Rivas et al., 2002), destacando la necesidad de contar con sistema de control de calidad óptimo y eficiente para la industria lechera, como para los productores, procesadores, consumidor y organismos gubernamentales que regulan de leche los cuales esperan contar con un precio justo dependiendo de la calidad, así como también una garantía para la salud de la población; lo cual es factible por medio de una institución donde se realicen pruebas de calidad nutricional, funcional y de aseguramiento de inocuidad basadas en las normas nacionales e internacionales aceptables (FAO, 2012).

De esta manera se enfatiza que la calidad alta de la leche sin procesar (cruda) es directamente proporcional a la calidad del producto pasteurizado y de los subproductos (Olechnowicz y Jaskowskj, 2012, pp. 681-686). Por lo tanto la producción bajo condiciones higiénicas óptimas es fundamental para lograr el éxito en una producción lechera; siendo las más importantes limitaciones para los pequeños productores, la inadecuada alimentación del ganado, el uso excesivo y no controlado de antibióticos, el disminuido potencial genético de los animales y los altos índices de contaminación por microorganismos, que provocan una menor vida útil antes de llegar a su comercialización; por ello es indispensable partir con animales sanos, contar con asesoramiento y asistencia en las líneas de producción, recogida y comercialización para producir leche de buena calidad (O'Grady y Doherty, 2009, p. 258).

2.1.6.1 Parámetros de calidad

La leche es un alimento altamente nutritivo, está compuesto de agua, lactosa, proteínas, lípidos, materia grasa, vitaminas, componentes minerales y

carbohidratos, su composición es dependiente estrictamente de la especie, nutrición, ciclo de lactancia, periodos de retiro, etc. Se puede determinar su calidad mediante análisis físico químicos, microbiológicos y test rápidos de antibióticos (FAO, 2012). De igual manera esta puede ser asociada directamente con afectaciones en la salud humana, principalmente si se encuentra relacionada con la presencia de microorganismos patógenos zoonóticos y trazas de medicamentos veterinarios (Karimuribo et al., 2005, pp. 213-221).

La grasa y las proteínas no están relacionadas con el punto de congelación, más bien lo son, la sal y la lactosa; la densidad obedece a la cantidad de grasa y proteína presentes en la leche en forma de pequeños glóbulos, cuyo tamaño varía entre especies y razas de ganado vacuno (FAO, 2012).

La proteína tiene un valor nutricional muy elevado debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, se conforma de 2 grupos: Caseína con un porcentaje de alrededor del 80% y las proteínas del suero con 20-25% de la proteína total; las enzimas son un tipo de proteínas elaboradas por organismos vivos, en la leche estas vienen de la ubre de la vaca o de algunas bacterias que difieren en número y tipo, de acuerdo con su naturaleza y especie bacteriana, un gran número de ellas son utilizadas para la producción de pruebas de control, algunas de las más utilizadas son la, catalasa, fosfatasa, lipasa y peroxidasa (FAO, 2012).

La lactosa es un azúcar parte del grupo de los carbohidratos, es fuente de energía inmediata refiriéndose a vitaminas, en la leche se puede separar en dos grupos, solubles en grasa y solubles en agua (FAO, 2012).

En la leche están presentes una serie de minerales con una concentración total menor que 1%, las sales mineras se encuentran presentes en forma de solución en el suero de leche o caseína en los compuestos y sus cantidades son variables, las principales son potasio, sodio, calcio y magnesio, siendo el potasio y las sales de calcio los más abundantes en la leche (FAO, 2012).

La leche contiene glóbulos blancos de la sangre, este contenido es muy reducido en la leche excretada por una ubre sana y la calidad del producto está directamente relacionada por el número y los tipos de bacterias encontradas (FAO, 2012).

2.1.6.2 Calidad a nivel mundial

Alrededor del mundo los países se rigen bajo parámetros de calidad establecidos por varias organizaciones, en estos se utilizan kits de detección rápida para la identificación de residuos de antibióticos en la leche, su objetivo es cumplir con las normativas que les permitan la importación o exportación de leche. Estados Unidos, es uno de los mayores importadores de productos lácteos, por otra parte, Argentina se encuentra como uno de los mayores países exportadores de leche y sus derivados en la región (CIL, 2004). Mientras que en países europeos organismos de control intensifican las leyes para erradicar los residuos de medicamentos veterinarios en la leche, en el (Anexo 1) se muestran las leyes de los LRM permitidos en leche para la unión europea. En España se han realizado estudios a nivel de país sobre la frecuencia de uso de antibióticos según su tipo (Zorraquino, Berruga Y Molina, 2007), parte de este estudio se muestra en la (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentaje de uso de antibióticos veterinarios en ganado vacuno

Penicilinas	Cefalosporinas	Aminoglucósidos	Sulfonamidas
%	%	%	%
57	18	23	2

Adaptado de Zorraquino, Berruga Y Molina, 2007

Como se puede observar en este estudio, la frecuencia de uso de penicilinas en España es del 57% y el de menor porcentaje en frecuencia de uso es el de sulfonamidas con un 2% (Zorraquino, Berruga Y Molina, 2007).

2.1.6.3 Normas de calidad para la leche en el Ecuador

La Norma NTE INEN 9:2012 Quinta Revisión se encarga de normalizar a la leche cruda de vaca en el país, el calificativo de leche cruda es aplicado para leche que no ha pasado por tratamiento térmico, salvo el tratamiento a bajas temperaturas para su conservación (INEN 9:2012, 2012).

Dentro la norma NTE INEN 9:2012, existen varias disposiciones para que la leche sea considerada no apta para el consumo humano entre las importantes tenemos por ejemplo, la disposición 4.1.3: “La leche cruda no podrá ser apta para el consumo humano cuando contenga componentes extraños a su naturaleza como: colorantes conservantes, adulterantes, neutralizantes y residuos de medicamentos veterinarios, en cantidades que sobrepasen los límites permitidos”. También la disposición 4.4: “Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios para leche serán los que determine el Codex Alimentario CAC/MRL2” (INEN 9:2012, 2012).

Los requisitos microbiológicos, físico-químicos y de antibióticos específicos para la leche cruda, de acuerdo a Norma NTE INEN 9:2012 se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Requisitos microbiológicos, físico-químicos y de antibióticos para la leche cruda.

Requisito	Límite mínimo	Límite máximo
Materia grasa	3.0%	-
Sólidos totales	11.2%	-
Sólidos no grasos	8.2%	-
Proteína	2.9%	-
Recuento de microorganismo aeróbicos mesófilos REP	-	1.5×10^6 UFC/cm ³
Recuento de células somáticas/cm ³	-	$7,0 \times 10^5$
RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS (µg/L)	-	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarios CAC/MRL2

Adaptado de Norma NTE INEN 9:2012, 2012

2.1.7. Medicamentos empleados en la industria pecuaria

La medicina veterinaria es usada en la industria pecuaria para mejorar el crecimiento, prevención, control de enfermedades, y control de infecciones en los animales. En este grupo se ubican: los antibióticos empleados en caso de infecciones bacterianas, los vermífugos como tratamientos para los endoparásitos, los detergentes y desinfectantes para la purificación y esterilización, por último los pesticidas para controlar moscas, piojos, u otros parásitos (Vallejo, 1993).

El uso excesivo de medicamentos veterinarios conlleva a una problemática de salud pública, en la medida en que estos pueden ser capaces de generar trazas que son segregadas a los alimentos provenientes o fabricados a partir de animales tratados; siendo así, la implementación de medicamentos de uso veterinario debe estar controlada y se debe respetar las normas de administración de antibióticos así como el tiempo de retiro (Karimuribo et al., 2005, pp. 213-221).

Después de la administración de un medicamento al ganado vacuno, se da un proceso de eliminación a través de la orina, las heces, y también en la leche; por lo tanto es recomendable que mientras los animales sean sometidos a un tratamiento, la leche ordeñada de estos animales sea separada de la leche de los animales sanos, hasta que se evalúe y se conozca que se encuentra apta para el consumo y que no existan trazas de los medicamentos administrados (Máttar, et al., 2005, pp. 213-221).

Los antibióticos están definidos como sustancias sintetizadas por plantas superiores o microorganismos, estos son capaces de inhibir los procesos de metabolismo de las bacterias, por medio de la reducción de la tasa de reproducción bacteriana o destruyéndolas completamente. Los antibióticos pueden ser usados para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas, los medicamentos antibacterianos no ocasionan un efecto tóxico

para el hospedador infectado, sin embargo su efecto es tóxico para las bacterias, son empleados para tratar a los animales que pasen por un proceso infeccioso durante su vida productiva (Domínguez y Moreno, 2001).

Para el tratamiento de enfermedades infecciosas se buscan agentes antimicrobianos con características específicas como una alta selectividad antimicrobiana, propiedades farmacocinéticas que mantengan valores altos en los lugares de acción, también tener bajos niveles de toxicidad para el hospedero, no debe producir resistencia bacteriana, eficacia por vía oral, parenteral o tópica, facilidad de producción y bajo costo (Loscher, 1994, pp. 67-68).

A pesar de que los antibióticos se encuentren conformados por varias clases de compuestos, generalmente se clasifican en diferentes grupos. Las clasificaciones que existen tienen diversas características y han sido elaboradas basándose en varios criterios, por lo tanto es complicado clasificarlos siguiendo un solo parámetro. En la actualidad el sistema más empleado agrupa a los compuestos de acuerdo a su similitud química, según los núcleos base de sus estructuras, siendo estos los encargados de aportar cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas (Honkanen-Buzalski y Reybroeck, 1997, pp. 26-34).

2.1.8 Riesgos del consumo de leche y derivados con residuos de antibióticos

Los residuos de antibióticos en la leche son peligrosos para los procesos de industrialización de la leche y la salud humana. En la actualidad el mercado de lácteos se ha vuelto más exigente en el control de productos que contengan residuos de medicamentos; por lo tanto, contar con leche de calidad y libre de trazas de antibióticos es fundamental para su comercialización. (Parra et al., 2003).

2.1.8.1 Origen de la presencia de residuos de antibióticos en la leche

Los antibióticos pueden ser administrados de varias formas, principalmente por vía parenteral, intramamaria y oral, como aditivos alimentarios o disueltos en agua, para prevenir y curar las infecciones en animales. Cuando los antibióticos son administrados por vía intravenosa, estos tienden a ser rápidamente distribuidos en el organismo, esta es una característica de la mayor parte de estos fármacos, sin embargo por medio de otras vías, el desplazamiento es menos rápido y se rige en leyes físico-químicas y bioquímicas específicas (Rubén, 2010).

Por medio del metabolismo de un fármaco, se originan en el mismo diferentes cambios químicos, habitualmente provocados por enzimas, antes de su eliminación final, de modo que este proceso es considerado como uno de los mecanismos de eliminación fisiológica o de reducción de la actividad antimicrobiana del antibiótico suministrado; sin embargo, algunas ocasiones este metabolismo puede ocasionar el efecto contrario y producir un compuesto intermediario con mayor actividad o toxicidad (Sumano y Ocampo, 1997, pp. 118-137).

La eliminación de la forma activa del fármaco depende principalmente de los procesos de biotransformación y excreción, además de otros factores, destacándose el pH, la solubilidad del medicamento en medios lipídicos y su unión a proteínas del citoplasma. Varios de los factores pueden ser alterados debido a la misma enfermedad y ocasionar cambios sistémicos o locales en la repartición de la sustancia en el organismo (Rang, Dale y Ritter, 2000, pp. 742-748).

Una de las formas más empleadas para definir la velocidad de eliminación de los medicamentos se conoce como “vida media”, esta se expresa como el tiempo que se necesita para que se disminuya en un 50% una concentración plasmática definida (Haagsma, 1993, pp. 41-49).

Las principales vías de excreción de los antibióticos son renal, mamaria, salival, biliar, secreciones gástricas, pulmonar, vía genital y por medio de la piel. Son varios los riesgos relacionados al uso de sustancias antimicrobianas, y estos riesgos también dependen de la permanencia y tiempo de excreción y por ende su duración en la leche, otros factores que influyen en los riesgos son la naturaleza del medicamento, la dosis dispuesta, la influencia del excipiente, el estado sanitario en el que se encuentre la ubre y la vía de administración del antibiótico (Debeckere, 1995, pp. 41-53).

2.1.8.2 Tiempo de retiro o suspensión

Uno de los principales factores que determina la cantidad de residuos que se pueden encontrar en un producto es el tiempo de espera entre la culminación de la administración del antibiótico al animal y la obtención de leche o carne de este. El tiempo o período de retiro es fundamental para que la leche pueda ser destinada al consumo humano, en mayoría de antibióticos de uso veterinario se encuentran los tiempos de retiro de la leche, las propiedades farmacocinéticas así como el tipo y forma de administración (Botsoglou y Fletouris, 1996, pp. 144-148).

El tiempo de espera o de seguridad de un antibiótico se expresa como el tiempo que necesariamente debe pasar después de la última administración del antibiótico y la capacidad de aprovechar los productos que se obtengan del animal tratado. El tiempo de espera será específico para cada animal, según el tipo de producto alimenticio a elaborarse y el medicamento empleado, es preciso respetar el tiempo de espera para evitar la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos (Parra et al., 2003).

2.1.8.3 Efectos de la presencia de residuos antimicrobianos en la leche

Es posible hallar residuos de medicamentos antimicrobianos en sustancias como la leche de los animales que se encuentran en período de lactación, inclusive algunos días después de finalizado el tratamiento. Si la leche que

presenta trazas de antibióticos se mezcla en el círculo lechero, esta puede llegar a contaminar la leche en los tanques de almacenamiento de las granjas, en las cisternas de recolección y los silos de las industrias lácteas, causando una gran contaminación en cadena (Zorraquino, 1996).

Por esta razón, los programas de control de calidad de la leche usada como materia prima para desarrollar productos lácteos, se enfocan en controlar y determinar la existencia de residuos de sustancias antibióticas, que pueden influir de manera directa en la calidad de la leche. Sin embargo se debe agregar la enorme importancia de la detección de residuos de medicamentos para los productores de leche debido a su afectación económica, si trazas de antibióticos son encontrados y la leche es declarada como no apta para el consumo humano (Parra et al., 2003).

2.1.8.4 Salud pública

La presencia de trazas de sustancias antibióticas en la leche puede ocasionar efectos perjudiciales sobre la salud de los seres humanos (Demoly y Romano, 2005, pp. 9-4). Los riesgos que pueden ser encontrados al consumir leche contaminada con residuos de medicamentos veterinarios, van desde la sensibilidad producida por la ingesta de pequeñas dosis repetidas de antibióticos, cuadros de alérgicos extremos y reacciones de intoxicación ante algunos antibióticos de alta toxicidad. Es preciso tomar en cuenta los efectos adversos para el consumidor, sin embargo actualmente el problema más alarmante es el desarrollo de resistencia a antibióticos (Tollefson y Karp, 2004, pp. 514-521).

Los mismos tipos de sustancias antimicrobianas son empleadas en humanos y animales, en la actualidad se ha desarrollado una cantidad muy pequeña de nuevos antibióticos que pueden ser capaces de sustituir a aquellos que no son eficaces a causa de la generación de resistencias, se han creado medidas para que exista un uso responsable y prudente de este tipo de medicamentos, para

controlar la aparición de posibles resistencias a estos, tanto para medicina humana y veterinaria (Codex Alimentario, 2007)

2.2 Sulfonamidas

Los primeros compuestos quimioterapéuticos utilizados en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias fueron las sulfamidas. Son compuestos sintéticos con actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a una diversa cantidad de microorganismos, sean estos gram positivos o gram negativos. Un gran grupo de sulfonamidas empleadas en quimioterapia se derivan de la sulfanilamida (Sumano y Ocampo, 1997, pp 118-137).

Científicos del Instituto Pasteur en 1939 declararon la actividad antibacteriana de la molécula sulfanilamida del grupo de las sulfonamidas como segura para ser comercializada después de la realización de más estudios (Figura 4). Actualmente se han desarrollado varios tipos diferentes de drogas a partir de la sulfanilamida, sin embargo sólo un pequeño número de estos son empleados en terapéutica debido a su poder antimicrobiano (Gratacós, 2007).

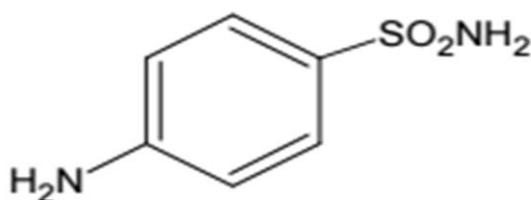


Figura 4: Estructura química de la Sulfanilamida
Tomado de: Gratacós, 2007

2.2.1 Estructura química

Las sulfamidas se derivan químicamente del núcleo aminobenzenosulfonamida (sulfanilamida) que presenta un núcleo de benceno con un grupo amino (NH_2) y otro $\text{SO}_2 \text{NH}_2$. Todas poseen un núcleo igual, a este se va uniendo o cambiando algunos grupos funcionales al grupo amido, por medio de estos cambios se producen compuestos con diferentes propiedades antibacterianas, físico-químicas y farmacológicas (Korolkovas y Burckhalter, 1979). En las siguientes figuras se muestran las estructuras químicas tanto de sulfametazina como de sulfamerazina.

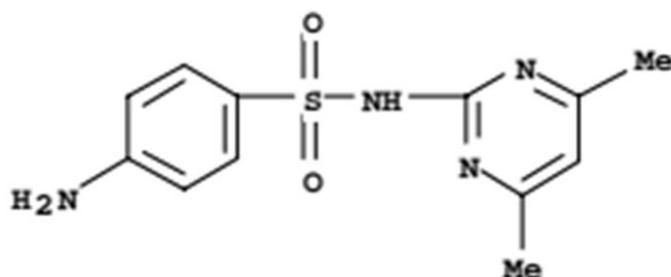


Figura 5: Estructura química de la Sulfametazina

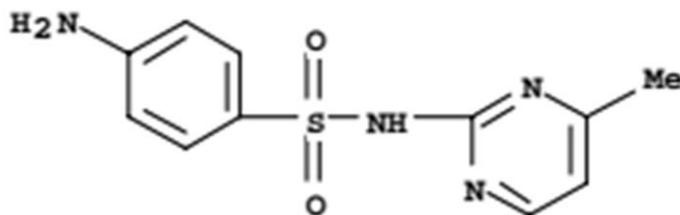


Figura 6: Estructura química de la Sulfamerazina
Tomado de: Soto, 2007.

2.2.2 Propiedades de las sulfonamidas

Gran parte de las sulfonamidas se presentan como liofilizados de color amarillo o blanco, que muestran baja solubilidad en agua y algo más en acetona o alcohol etílico. Las sulfonamidas presentan un carácter básico otorgado por su grupo amino y también características ácidas otorgadas por el grupo sulfonamido (SO_2NH_2), esto hace que se consideren a las sulfonamidas como sustancias anfóteras (Soto, 2007).

Tabla 3: Propiedades de las sulfonamidas

Compuesto	Siglas	Pm	log P	pKa1	pKa2
Sulfametazina	SMZ	278.33	0.803±0.259	2.79±0.24	7.45±0.50
Sulfamerazina	SMR	264.33	0.343±0.257	1.58±0.10	6.98±0.30

Tomado de Soto, 2007.

Las sulfonamidas pueden ser clasificadas en distintos grupos, como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 4: Clasificación de las sulfamidas según su solubilidad y uso.

Compuestos	Tipo de sulfamidas
Compuestos de uso habitual	Sulfatiazol, sulfametazina, sulfapiridina, sulfadimetoxina
Compuestos muy solubles	Sulfisoxazol, sulfasomidina,
Compuestos poco solubles	Talilsulfatiazol, succinilsulfatiazol, salicilazosulfapiridina.
Compuestos potenciados	Trimetoprim-sulfadiacina, trimetoprim-sulfametoxazol, trimetoprim-sulfadoxina
Compuestos de uso tópico	Sulfacetamina, mafenida, Sulfadiacina y sulfatiazol

Adaptado de Sumano y Ocampo, 1997, pp. 118-137

2.2.3 Mecanismo de acción

Las sulfonamidas muestran un complejo mecanismo de acción, este actúa de manera que bloquea diferentes enzimas, entre las cuales se encuentran las involucradas en la síntesis de las bases púricas, las bacterias que incorporan la sulfonamida no pueden generar ácido fólico que es indispensable para la síntesis proteica, causando cambios y alteraciones en los procesos metabólicos, disminución del crecimiento de la multiplicación de microorganismos, es por esto que a las sulfonamidas se les atribuye la llamada actividad bacteriostática (Pérez, 2010).

Las sulfonamidas son utilizadas generalmente para tratar y curar enfermedades de tipo sistémico o local, las infecciones más tratadas son: la mamitis, metritis, poliartitis, coccidiosis, colibacilosis, toxoplasmosis he infecciones respiratorias. Una de las desventajas de mayor importancia de las sulfonamidas en comparación con otros antibióticos es la alta frecuencia de efectos secundarios, siendo los más importantes, los trastornos gastrointestinales, reacciones de hipersensibilidad y hematológicas (Adams, 2003, pp. 835-981).

2.2.4 Farmacocinética

La mayoría de las sulfonamidas presentan las mismas características antimicrobianas, se diferencian principalmente en el modo de absorción, solubilidad, y tiempo de permanencia de sus efectos (Pérez, 2010). De acuerdo con estas características las sulfonamidas se pueden clasificar según la siguiente tabla.

Tabla 5: Clasificación de las sulfonamidas según sus propiedades absorbibles y no absorbibles.

ABSORVIBLES	
<i>ABSORCIÓN Y EXCRECIÓN RÁPIDA</i>	
SULFAMERAZINA	SULFADIAZINA
SULFAMETAZINA	SULFISOXAZOL
SULFAMETOXAZOL	
<i>ABSORCIÓN RÁPIDA Y EXCRECIÓN LENTA</i>	
SULFAMETOXIPIRIDAZINA	SULFADIMETOXINA
SULFAMETER	SULFAQUINOXALINA
NO ABSORVIBLES	
SULFAGUANIDINA	FTALILSULFATEAZOL
SUCCINILSULFATEZOL	

Tomado de Pérez, 2010.

2.3 Cromatografía

La cromatografía agrupa varias técnicas empleadas para cuantificar y separar los componentes de una mezcla. Las diferentes técnicas cromatográficas están compuestas por una fase móvil y una estacionaria (Poucke et al., 2003, 99-109).

La fase móvil es aquella con movimiento en una dirección definida, esta a su vez se mueve junto con el analito a través de una columna en donde sus componentes son separados y analizados, (Figura 10). Para la cromatografía líquida en fase normal se usa un disolvente no-polar y en fase reversa un disolvente polar. La fase estacionaria se encuentra fija durante el paso de la fase móvil, la cromatografía trabaja de manera que las moléculas presentes en la mezcla son distribuidas entre ambas fases (Naushad y Rizwan, 2014).

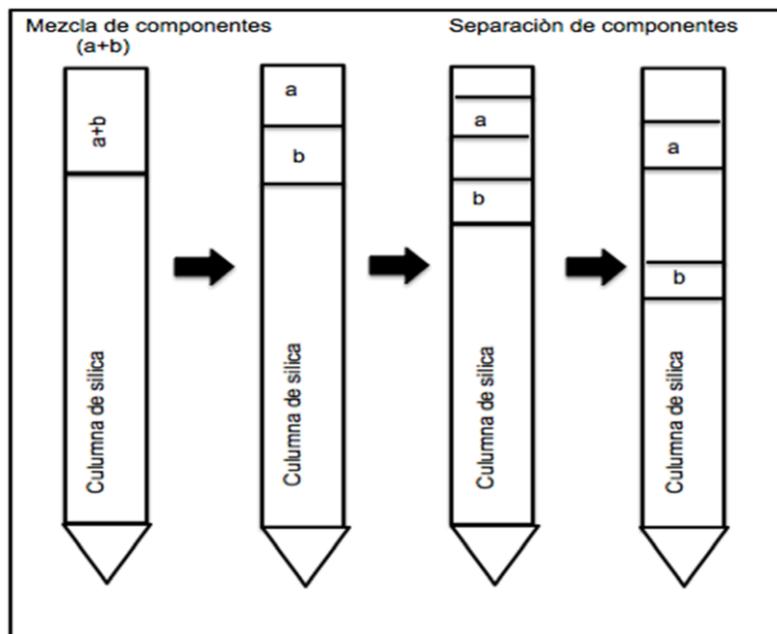


Figura 7: Migración de dos componentes en una mezcla.
Tomado de Naushad et al., 2014)

Como se puede observar en la (Figura 7), primero los analitos a y b, que forman parte de una mezcla se encuentran al inicio de la columna, cuando la fase móvil pasa a través de esta, los analitos a y b comienzan su proceso de separación, se puede observar como el analito "b" presenta una mayor afinidad por la fase móvil que el analito "a" algunos componentes de la mezcla pueden pasar más rápido que otros a través de la columna, esto debido a las diferentes polaridades de los elementos en el proceso de separación (Naushad y Rizwan, 2014).

2.3.1 Tipos de cromatografía

Dependiendo de características como la naturaleza de la fase móvil, estacionaria y el tipo de interacción entre los componentes de la mezcla, se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía, clasificados en la siguiente tabla.

Tabla 6: Tipos de cromatografía

Clasificación cromatográfica de acuerdo a la fase móvil				
Cromatografía líquida		Cromatografía de gases		
LLC La fase móvil es un líquido	LSC Existen las dos fases, líquida-sólida	GSC La fase móvil es un gas	GLC Existen las dos fases, gas-líquido	
Clasificación cromatográfica de acuerdo al relleno de la fase estacionaria				
TLC Cromatografía en capa fina	PC Cromatografía en papel		CC Cromatografía en columna	
Clasificación cromatográfica de acuerdo a la fuerza de separación				
Cromatografía de adsorción	Cromatografía de partición	Cromatografía de intercambio iónico	Cromatografía de filtración en gel	Cromatografía de afinidad

Adaptado de Naushad et al., 2014).

2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es una de las técnicas de mayor aplicación en laboratorios a nivel mundial, se basa en el principio de separación de componentes de una sustancia, basada en las interacciones químicas de los analitos, la columna cromatográfica y el tipo de detector utilizado. Para la detección e identificación de antibióticos en carne, riñón y leche los detectores más usados son el detector ultravioleta (UV) y el detector de arreglo de diodos (DAD) (Corcia y Nazzari. 2002, 53-89).

2.3.3 Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC)

Esta técnica con equipo mejorado y mucho más eficiente, tuvo su aparición en 2004, El sistema Acquity UPLC H-Class fue el primer sistema diseñado para aprovechar de mejor manera las ventajas de las nuevas columnas con diámetros mucho más pequeños, mejores en rendimiento y rellenas en la fase estacionaria con partículas inferiores a 2 μm . El sistema UPLC se basa en el mismo principio que el sistema HPLC, pero el nuevo equipo presenta mejoras en la eficiencia de las columnas, mejoras en la resolución, aumento de

sensibilidad y separaciones de los componentes de una mezcla mucho más rápidos, todo esto se traduce en tiempos de corrido de muestras mucho más cortos. En los sistemas HPLC tradicionales las bombas pueden llegar a una presión máxima de 4000 psi y en sistemas UPLC puede llegar a 15000 psi (1000 bar) (Naushad y Rizwan, 2014).



Figura 8: Equipo UPLC H-Class.

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Leche (AGROCALIDAD)

3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo bibliográfico experimental, se desarrolló un método analítico, cuantitativo e instrumental en cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), por medio de este se realizó el análisis de muestras de leche, para cuantificar la presencia de sulfametazina y sulfamerazina, y se determinó su concentración.

3.2 Muestras de leche cruda para la investigación

Para el cumplimiento del tercer objetivo de este proyecto se tomaron muestras de leche que provienen de las haciendas ubicadas en la Parroquia Alóag del Cantón Mejía Provincia de Pichincha. Para este estudio la población definida fue de 28 haciendas y se tomaron muestras de leche cruda de 6 haciendas.

3.3 Toma de muestras

Se tomó 200ml de leche cruda de los recolectores de cada hacienda, se almacenó las muestras en frascos estériles y fueron etiquetados con el número de hacienda, hora de muestreo, volumen (ml) y número de muestra.

3.4 Tratamiento de la muestra

Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en coolers con gel refrigerante. En el laboratorio se conservó las muestras en refrigeración a 4°C, para su respectivo análisis.

3.5 Métodos y Técnicas

El método usado para este estudio se basó en el procedimiento descrito por la AOAC (Official Method 993.32, 2005), "Multiple Sulfonamide Residues in Raw

Bovine Milk” “Liquid Chromatographic Method”. Este método fue modificado para poder ser acoplado a las condiciones del Laboratorio de Control de Calidad de Leche, perteneciente a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro - Agrocalidad.

3.5.1 Método cromatográfico

Se utilizó el método cromatográfico para UPLC-MS propuesto por She et al., (2010, pp. 2246-2253). Se acopló para el UPLC-UV con la aplicación de un gradiente isocrático. Para este estudio se utilizó una columna de fase reversa *Acquity BEH C18 UPLC™* (50mm x 2,1 μ m, 1.7 μ m. Waters). También se trabajó con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) ACQUITY UPLC, que permitió el funcionamiento simultáneo en 2D y 3D en el software Empower™.

En el equipo se trabajó con una temperatura de columna de 30°C (\pm 5) y una temperatura para la muestra de 10°C (\pm 5). El flujo de la fase móvil fue de 0.25 ml/min. El volumen de inyección fue de 1 μ L. La longitud de onda recomendada por la AOAC (Official Method 993.32, 2005), y establecida después de varias pruebas fue de 265nm.

En la primera fase de estandarización de la técnica, para realizar las curvas de calibración se empleó el estándar de Sulfametazina y Sulfamerazina con una pureza mayor o igual que 99%.

3.5.1.1 Gradiente

El gradiente que se empleó se formó entre los solventes: Ácido acético al 0.2% y Acetonitrilo grado HPLC. Este gradiente se detalla en la (Tabla 7).

Tabla 7: Gradiente utilizado para la separación de las dos sulfonamidas.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Acetonitrilo (%)	0.2% Ac. Acético en solución (%)
0	0.25	10	90
3	0.25	10	90
4	0.25	15	85
5	0.25	25	75
6	0.25	25	75

Para la detección de las dos sulfonamidas con el gradiente formulado, se preparó una solución mix de sulfamerazina y sulfametazina, a una concentración de 1 µg/mL, y se observó la correcta separación de los dos analitos (Anexo 3).

Con la correcta separación en la corrida de las dos sulfonamidas, se determinó su tiempo de retención y se disminuyó el tiempo de corrida cromatográfica; establecidos estos parámetros se realizó una separación por gradiente de elución en modo isocrático. Como se muestra en la (Tabla 8).

Tabla 8: Gradiente de elución en modo isocrático

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Acetonitrilo (%)	0.2% Ac. Acético en solución (%)
0	0.25	15	85
3	0.25	15	85

3.5.2 Curva de calibración

Obtenido y optimizado el método cromatográfico para el equipo UPLC H-Class con detector UV, se preparó una solución madre de cada estándar de 100 µg/mL, esta se diluyó a 1 µg/mL. A partir de esta alícuota fueron preparadas soluciones cromatográficas de trabajo, con las que se realizó las curvas de calibración para cada sulfonamida.

Se tomó siete niveles de concentración y se realizó tres réplicas de cada nivel. Debido a que la sulfamerazina produce una señal mucho más baja, la concentración de la misma fue tomada desde un nivel superior al de la sulfametazina. Así el intervalo de concentración para la sulfametazina fue de 0.035, 0.065, 0.095, 0.125, 0.155, 0.185, 0.215 µg/mL (ppm), mientras que para la sulfamerazina fue de 0.065, 0.095, 0.125, 0.155, 0.185, 0.215, 0.245 µg/mL (ppm). Estas soluciones estándar fueron aforadas con metanol grado HPLC en balones ámbar de 10ml.

3.5.3 Fortificación de muestras de leche cruda

Con el propósito de verificar el método establecido para la detección y cuantificación de sulfonamidas, se realizó una fortificación a muestras de leche cruda con concentraciones de 0.065, 0.100 y 0.200 µg/ml de sulfametazina y sulfamerazina.

3.5.4 Método de extracción de muestra

En un tubo de centrifuga de 40 ml, se transfirió 2.0 ± 0.1 ml de la leche (muestra desconocida o muestra fortificada), a este se le agregó 10 ml de la solución Buffer de McIlvaine/EDTA, y 3 ml de Hexano. Esta mezcla se centrifugó por 30 min a 10°C y 3000 RPM. Se utilizó una centrifuga refrigerada que ayudó a la correcta precipitación y separación de las fases (acuosa, grasa, y orgánica).

Para desengrasar totalmente la leche, se tomó el sobrenadante y se lo transfirió a un nuevo tubo de centrifuga, a este se le añadió nuevamente 10 ml de la solución Buffer de McIlvaine/EDTA. Esta mezcla se agitó durante dos minutos en un mini agitador y fue centrifugada por 30 min a 10°C y 3000 RPM.

Se agregó una solución de ácido tricloroacético al 12%, esta fue añadida en un volumen igual al 10% de la cantidad de sobrenadante recolectado, posterior a este proceso, las muestras fueron puestas en refrigeración por 10 minutos. Para eliminar las impurezas de la muestra, esta se filtró con papel cuantitativo y a través de un equipo de filtración al vacío, con una membrana de poro de 0.22 o 0.45 μm . Finalmente las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior proceso de extracción y purificación en fase sólida.

3.5.5 Método de extracción y purificación en fase sólida

Para este proceso se utilizó el método SPE (Oasis HLB Waters), con modificaciones en su metodología. Primero se colocó el cartucho en un sistema de filtración al vacío y se lo acondicionó con 1ml de metanol, seguidamente se realizó un lavado con 1ml de agua ultra pura, a continuación se transfirió 4 ml de muestra, y se procedió a realizar un segundo lavado con 2ml de agua, finalmente se efluyó el extracto con 2ml de acetonitrilo grado HPLC y se aseguró que el flujo de elución no supere los 3ml/min. El eluato obtenido fue evaporado hasta la sequedad en un evaporador a base de nitrógeno y se lo reconstituyó con 1ml de la fase móvil (Solución acuosa de ácido acético 0.2%).

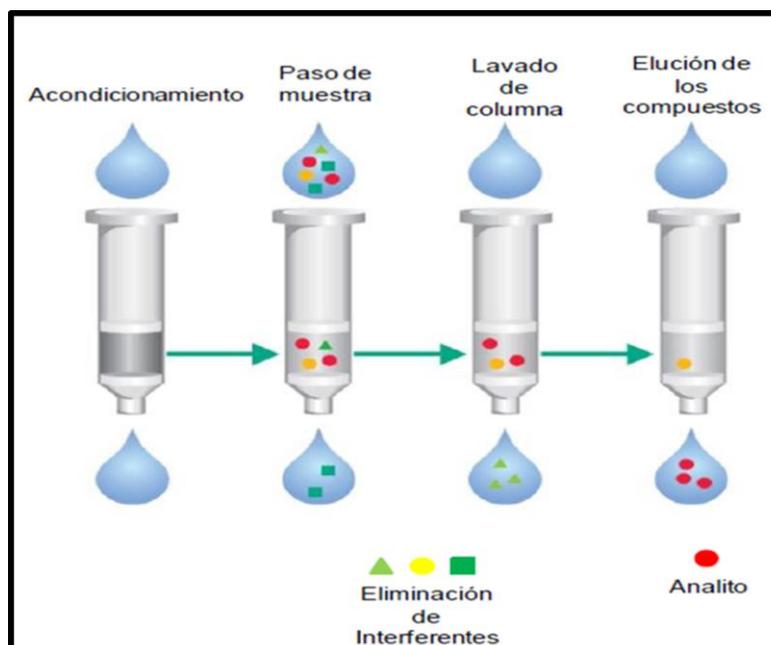


Figura 9: Etapas que conforman el proceso de extracción en fase sólida
Tomado de Ibarra, 2013

Finalizado este proceso se filtró la solución obtenida a través de un filtro de PVDF de 25 mm y 0,2 μm , se recuperó el filtrado en un vial ámbar para su posterior análisis cromatográfico.

3.5.6 Soluciones y fases móviles

3.5.6.1 Solución acuosa de ácido acético 0.2% (fase móvil)

Se disolvió 20 ± 0.1 g de ácido acético en 1000 ml de agua desionizada grado HPLC. Se filtró la solución y se pasó por ultrasonido por 10 minutos para completar eliminación de gases disueltos.

3.5.6.2 Solución Buffer de Mcllvaine

Se disolvió 10 ± 0.1 g de Na_2HPO_4 en 500 ml de agua ultra pura, también se pesó 12 ± 0.1 g de ácido cítrico y se disolvió en 500 ml de agua ultra pura. Se mezcló las dos soluciones, se verificó y ajustó el pH a un valor de 4 ± 0.5

3.5.6.3 Solución Buffer de Mcllvaine/EDTA

Se añadió 3.7 ± 0.1 g de etil diamina tetra acetato disódico (EDTA) a 1000 ml de solución Buffer de Mcllvaine, finamente y mediante agitación magnética se disolvió la mezcla preparada.

3.5.6.4 Solución estándar de sulfamerazina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Se pesó 10 ± 0.1 mg de estándar de sulfamerazina en un balón aforado (ámbar o recubierto con papel aluminio) de 100 ml. Se registró el valor exacto (con 0.1 mg de precisión) y se aforó con metanol grado HPLC.

3.5.6.5 Solución estándar de sulfametazina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Se pesó 10 ± 0.1 mg de estándar de sulfametazina en un balón aforado (ámbar o recubierto con papel aluminio) de 100 ml. Se registró el valor exacto (con 0.1 mg de precisión) y se aforó con metanol grado HPLC.

Nota: Estas soluciones son estables hasta 6 meses y deben ser conservadas en refrigeración a 10°C .

3.5.6.6 Estándar de trabajo 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sulfamerazina y sulfametazina

Se tomó 0.25 ml (250 μl) de la solución estándar 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se aforó con metanol grado HPLC, en un balón ámbar de 25 ml para cada una de las sulfonamidas, y se las conservo en refrigeración a 10°C .

3.5.6.7 Solución ácido tricloroacético al 12%

Se pesó 12g de ácido tricloroacético y se aforó en un balón de 100 ml con agua tipo I.

3.6 Parámetros de desempeño analítico del método cromatográfico

Para el estudio y tratamiento de los resultados se utilizó el libro: Curso de Quimiometría para Calibraciones univariada y multivariada de primer orden, de Olivieri, (2002).

3.6.1 Estimación de los parámetros de regresión

El objetivo del análisis de los parámetros de regresión es ajustar a ecuaciones las variables obtenidas, la ecuación general se expresa como:

$$y = A x + B \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde A representa la pendiente, y B es la ordenada al origen, estos valores se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para estas ecuaciones tenemos que (m) es el total de puntos en una recta de calibración y a la concentración de cada uno de estos puntos se los representa

con x_i , a las concentraciones de calibrado promediadas se la representa con \bar{x} , el resultado en cada punto está representado por y_i , y finalmente el promedio de las respuestas de los puntos de calibrado están representados con \bar{Y} . Para los parámetros A y B , las desviaciones estándar de cada uno de estos pueden calcularse mediante:

$$s_A = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$s_B = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde el desvío estándar de los residuos se representa con $s_{y/x}$, y se obtiene mediante la ecuación:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m - 2}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Cada uno de los patrones de calibración tiene una respuesta experimental y esta se representa como y_i , y en cada punto existe una respuesta estimada que se representa como \hat{y}_i , lo que significa que, $\hat{y}_i = A x_i + B$. Para la ecuación 6 se establecen $m - 2$ grados de libertad, debido a que en la regresión tenemos dos parámetros (A y B) y también (m) datos disponibles.

3.6.2 Predicción de la muestra incógnita

Para poder hacer predicciones de muestras desconocidas se necesitan los valores de A y B , aplicados a las siguientes ecuaciones:

$$y_{\text{inc}} = A x_{\text{inc}} + B \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$x_{inc} = (y_{inc} - B) / A \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde y_{inc} representa el promedio de resultados que se extraen del análisis por triplicado de una muestra incógnita. Por medio de las ecuaciones 7 y 8 se obtienen valores de la concentración de un analito en una muestra determinada. En una concentración predicha se puede calcular su desviación estándar $s(x_{inc})$, aplicando la ecuación:

$$s(x_{inc}) = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(y_{inc} - \bar{y})^2}{A^2 Q_{xx}}} = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde $s_{y/x}$ se obtiene de la ecuación 6, A y B representan pendiente y ordenada al origen de la recta, respectivamente. Para la muestra incógnita, su número de réplicas está representado con la letra n . Para el cálculo de la concentración predicha con el intervalo de confianza, se puede multiplicar el valor del error estándar por su valor correspondiente en la tabla *t-student*, para un nivel de confianza que generalmente es de 95% y con $m-2$ grados de libertad.

3.6.3 Sensibilidad de la calibración

Se establece como la pendiente al origen de la recta: SEN = A

3.6.4 Sensibilidad analítica

Está definida como la relación entre el ruido cromatográfico y la sensibilidad, está representada por γ y se obtiene mediante la ecuación:

$$\gamma = \text{SEN} / s_y \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde s_y es el ruido cromatográfico y se calcula con la siguiente ecuación:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m - p}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde p es el número de puntos tomados para realizar la recta de calibración, y cada punto tiene diferente concentración, r es el número de réplicas de cada nivel, y_{ij} es la respuesta de cada réplica en cada uno de los puntos de la recta, finalmente \bar{y}_i son las respuestas promediadas de las réplicas en cada uno de los puntos de concentración.

3.6.5 Límite de detección (LOD)

Es la menor concentración que se puede detectar de un analito en una muestra, para su cálculo se emplea primero la ecuación:

$$s(x_{inc}) = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

Con esta ecuación se estima (s_0), que es la concentración predicha para una muestra blanco con su correspondiente desviación estándar. Cuando se leen muestras por triplicado ($n = 3$), y sin presencia del analito ($x_{inc} = 0$), queda simplificada la ecuación a:

$$s_0 = \frac{s_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ecuación 13})$$

3.6.6 Límite de cuantificación (LOQ)

Se define como el mínimo valor que puede ser cuantificado de manera confiable y es 10 veces la desviación estándar del valor de la concentración de la muestra blanco, se calcula de la siguiente manera:

$$LQO = 10 s_0 \quad (\text{Ecuación 14})$$

3.6.7 Rango Lineal

El rango lineal esta dado desde el límite de cuantificación hasta la pérdida en la linealidad y esta a su vez está determinada por la relación entre el ruido instrumental y la varianza en la regresión. Para verificar si los datos obtenidos están de acuerdo con la ley lineal se aplica la prueba F de Fisher, con la siguiente ecuación:

$$F_{\text{exp}} = \frac{(s_{y/x})^2}{(s_y)^2} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Determinado el valor de F experimental este es comparado con el valor de la tabla F, para un nivel de confianza del 99% y $m - p$ grados de libertad. Para aceptar la linealidad de los resultados obtenidos, F_{exp} tiene que ser menor que F en la tabla.

4. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Método cromatográfico

La optimización del método cromatográfico se realizó al correr estándares de las dos sulfonamidas, se ajustó el pH de la fase móvil de ácido acético a 3.10 ± 0.5 . El volumen de inyección se estableció en $1 \mu\text{L}$ y tras varios ensayos se configuró la lectura de las dos sulfonamidas a 265 nm, (AOAC. Official Method 993.32, 2005), con estos ajustes en la metodología se pudo obtener una mejor resolución en los picos cromatográficos y también se determinó los tiempos de retención para cada sulfonamida. Los tiempos establecidos fueron; para sulfametazina 1,15 min, y para sulfamerazina 0,95 min. La determinación de los tiempos de retención permitió la posterior identificación de estos dos analitos en muestras de leche.

4.2 Curvas de calibración

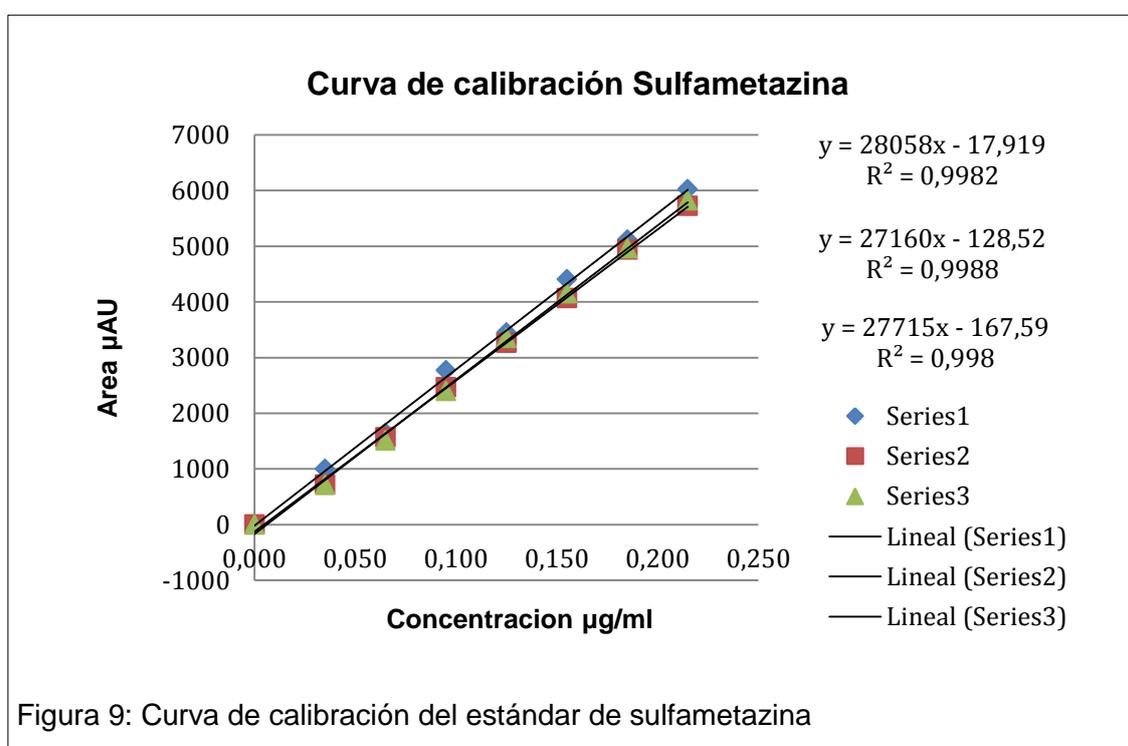
Para realizar las curvas de calibración se tomó concentraciones en intervalos de $0.035 - 0.215 \mu\text{g/mL}$ (ppm) para sulfametazina y de $0.065 - 0.245 \mu\text{g/mL}$ (ppm) para sulfamerazina, esta variación en la concentración se realizó porque la sulfamerazina produce una señal mucho menor que la sulfametazina. Cada nivel de los 8 tomados para realizar la curva fue analizado por triplicado, y siguiendo el protocolo optimizado (capítulo 3.6.1 y 3.6.2), con lo que se obtuvo una correcta separación, detección y cuantificación de los analitos.

Los resultados correspondientes a los cromatogramas de los estándares de sulfametazina y sulfamerazina se incluyen en la (Tabla 9 y 10), también se muestran las áreas y la concentración de los 8 estándares.

Tabla 9: Resultados de los cromatogramas del estándar de sulfametazina

Estándar Sulfametazina Concentración (ppm)	ÁREAS		
	A1	A2	A3
0.000	0	0	0
0.035	1001	717	711
0.065	1644	1568	1512
0.095	2772	2466	2401
0.125	3445	3263	3352
0.155	4407	4064	4153
0.185	5115	4938	4959
0.215	6023	5721	5822

Obtenidas las áreas por triplicado de cada concentración, se realizó la curva de calibración para el estándar de sulfametazina, que se puede observar en la (Figura 9), también se muestra la concentración que fue inyectada en relación al área detectada por el equipo.



El análisis de los datos de calibrado para Sulfametazina mediante regresión lineal implica el cálculo de la pendiente (A) y ordenada al origen (B) de la recta ajustada a la ecuación $y = A x + B$ (Olivieri, 2002). Los valores estimados de A y B son los siguientes:

A =	27644.27	Pendiente	
B =		-104.68	Intercepto

Quedando planteada la siguiente ecuación:

$$y = 27644.27x - 104.68$$

Dónde:

y = área (μ AU)

x = concentración (μ g/ml)

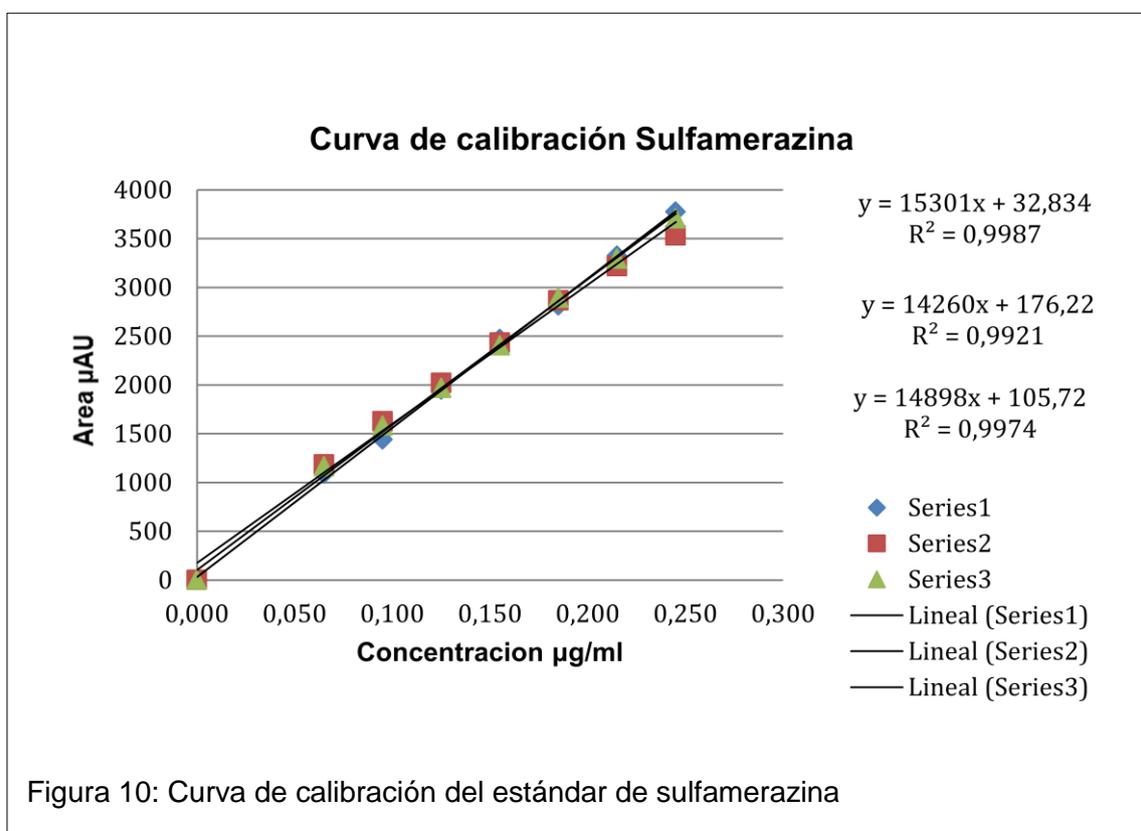
Como se puede observar en la (Figura 9), la pendiente es positiva, creciente y además es directamente proporcional a las variables: concentración (X) y áreas: A1, A2, A3 (Y).

Tabla 10: Resultados de los cromatogramas del estándar de sulfamerazina

Estándar Sulfamerazina	ÁREAS		
	A1	A2	A3
Concentración (ppm)			
0.000	0	0	0
0.065	1090	1185	1164
0.095	1440	1627	1583
0.125	1953	2021	1968
0.155	2469	2434	2404
0.185	2814	2865	2893
0.215	3322	3217	3293
0.245	3776	3533	3705

Obtenidas las áreas por triplicado de cada concentración, se realizó la curva de calibración para el estándar de sulfamerazina, que se puede observar en la

(Figura 10), también se muestra la concentración que fue inyectada en relación al área detectada por el equipo.



El análisis de los datos de calibrado para Sulfamerazine mediante regresión lineal implica el cálculo de la pendiente (A) y ordenada al origen (B) de la recta ajustada a la ecuación $y = A x + B$ (Olivieri, 2002). Los valores estimados de A y B son los siguientes:

A =	14819.59	Pendiente
B =	104.93	Intercepto

Quedando planteada la siguiente ecuación:

$$y = 14819.59x + 104.93$$

Dónde:

y = área (μ AU)

x = concentración (μ g/ml)

Como se puede observar la figura 4.2 la pendiente es positiva, y creciente además es directamente proporcional a las variables: concentración (X) y áreas: A1, A2, A3 (Y).

Los resultados de la curva de calibración para las dos sulfonamidas mostraron un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.9983$ para sulfametazina y $r^2 = 0.9961$ para sulfamerazina, siendo ambos resultados cercanos a 1, el coeficiente mínimo aceptable para establecer la linealidad es de 0.95, lo que nos comprueba la calidad del modelo para replicar los resultados (She et al., 2010, pp. 2246-2254).

4.3 Límites de detección y cuantificación

Se determinó los límites de cuantificación y detección para las dos sulfonamidas obteniendo los siguientes resultados; para sulfametazina el límite de detección y cuantificación es de 0.0111 y 0.0157 (μ g/ml) respectivamente, para sulfamerazina el límite de detección y cuantificación es de 0.0166 y 0.0236 (μ g/ml) respectivamente. Estas unidades obtenidas fueron transformadas de μ g/ml (ppm) a μ g/L (ppb), de esta manera se comparó los valores obtenidos con los establecidos por la Norma NTE INEN 9:2012 quinta revisión, para residuos de medicamentos veterinarios.

Se aplicó la siguiente transformación:

$$1 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppb} \text{ aplicando: } 0.01 \text{ ppm} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \times \frac{1000 \text{ ppb}}{1 \text{ ppm}} = 10 \text{ ppb} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right)$$

El límite máximo de residuos para sulfonamidas en leche cruda, establecidos por el Codex Alimentario es de 25 μ g/L (ppb), con los resultados obtenidos en los límites de detección y cuantificación para cada sulfonamida se pudo comprobar que el método establecido puede cuantificar las dos sulfonamidas

desde un límite inferior al establecido por el Codex Alimentario al cual se remite la Norma NTE INEN 9:2012 quinta revisión.

4.4 Validación del método de recuperación de muestras de leche fortificada

Los resultados de las muestras que fueron fortificadas se muestran en la (Tabla 11), y (Tabla 12), aquí que se presenta el área promedio, concentración predicha, porcentaje de recuperación, desviación estándar y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

Tabla 11: Resultados obtenidos y calculados del análisis de leche fortificada con sulfametazina

Muestra	Respuesta promedio (y_{inc})	Concentración predicha (x_{inc})	% Recuperabilidad	Desvío estándar $s(x_{inc})$	Desvío estándar relativo, DSR (%)
0.065	1294.00	0.05	77.84	0.0017	3.4
0.100	2573.67	0.10	96.89	0.0016	1.7
0.200	5336.67	0.20	98.42	0.0018	0.9

Tabla 12: Resultados obtenidos y calculados del análisis de leche fortificada con sulfamerazina

Muestra	Respuesta promedio (y_{inc})	Concentración predicha (x_{inc})	% Recuperabilidad	Desvío estándar $s(x_{inc})$	Desvío estándar relativo, DSR (%)
0.065	1070.00	0.07	100.19	0.0025	3.9
0.100	2112.33	0.14	135.46	0.0024	1.8
0.200	3409.67	0.22	111.50	0.0026	0.2

Los resultados obtenidos demuestran que el método desarrollado para la cuantificación de las dos sulfonamidas en leche cruda puede detectar las

concentraciones de (0.065, 0.100 y 0.200 $\mu\text{g/ml}$), con las que fueron fortificadas las muestras. Estos resultados también fueron evaluados empleando los coeficientes de t – Student a dos colas para $(m - 2)$ grados de libertad y un 99% de confianza (Olivieri, 2002).

Con la prueba de t de Student se comparó los resultados donde el valor obtenido de t experimental es menor que el valor de t en tabla, por lo tanto se aceptó la hipótesis nula y no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación. Con respecto al coeficiente de variación y a la desviación estándar los resultados son adecuados y corroboran la t de Student. En el (Anexo 8) se encuentra la tabla de A.O.A.C de criterio de aceptación de parámetros que es aprobado con un valor de recuperación que se encuentra entre 60 y 115%.

Según la UNODC, en cuanto a la validación de métodos analíticos, no es preciso que se obtenga una recuperación del 100% del analito, más bien está enfocada en que no exista una variación significativa de los valores recuperados al realizar el mismo análisis (UNODC, 2010).

Tabla 13: Resultados de los análisis cromatográficos aplicados a muestras de leche cruda

Hacienda 1						Hacienda 2						Hacienda 3					
SMZ			SMR			SMZ			SMR			SMZ			SMR		
-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Hacienda 4						Hacienda 5						Hacienda 6					
SMZ			SMR			SMZ			SMR			SMZ			SMR		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

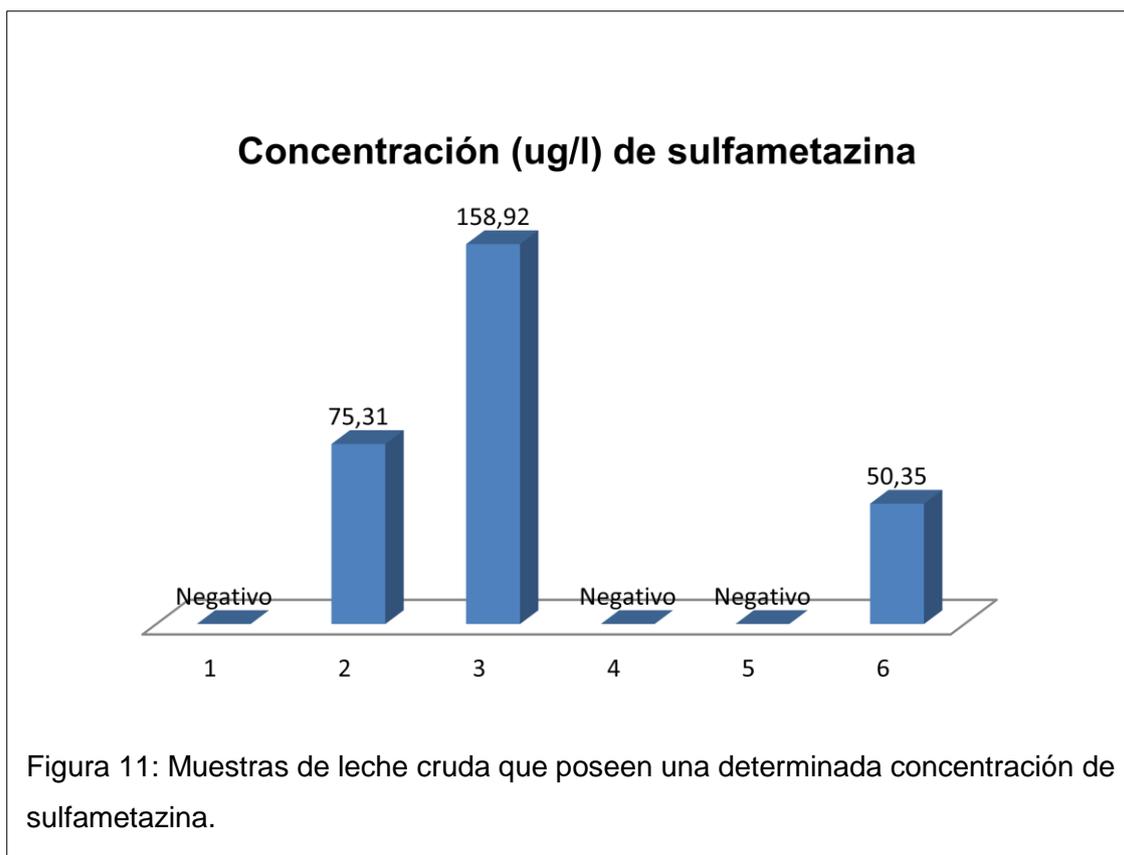
En la (Tabla 13), se muestra los resultados tanto positivos como negativos obtenidos del análisis por triplicado de las dos sulfonamidas en muestras de leche cruda de cada hacienda ubicada en la Parroquia Alóag del Cantón Mejía

Provincia de Pichincha. Los resultados negativos muestran que no se detectó ningún pico de interés en los tiempos de retención que corresponden a sulfametazina o sulfamerazina, dicho de otra manera estas muestras no presentan ningún tipo de contaminante o antibiótico veterinario estudiado. Las muestras positivas son las que presentan presencia de los antibióticos estudiados. Aquí se pudo determinar que en la leche analizada solo existe presencia de sulfametazina y no de sulfamerazina.

Tabla 14: Resultados de las concentraciones del análisis de leche cruda con respuesta positiva para sulfametazina

HACIENDA	MUESTRAS	REPETICION (AREAS)			PROMEDIO	CONCENTRACION MUESTRA	MEDI. CON. MUESTRA ug/l
		R1	R2	R3			
HACIENDA 1	M1	0	0	0			
	M2	0	0	0			
	M3	0	0	0			
HACIENDA 2	M4	1984	1975	1980	1979.67	75.40	75.31
	M5	1980	1989	1994	1987.67	75.69	
	M6	1970	1954	1968	1964.00	74.83	
HACIENDA 3	M7	4230	4252	4243	4241.67	157.22	158.92
	M8	4348	4354	4342	4348.00	161.07	
	M9	4270	4281	4276	4275.67	158.45	
HACIENDA 4	M10	0	0	0			
	M11	0	0	0			
	M12	0	0	0			
HACIENDA 5	M13	0	0	0			
	M14	0	0	0			
	M15	0	0	0			
HACIENDA 6	M16	1236	1252	1248	1245.33	48.84	50.35
	M17	1321	1336	1342	1333.00	52.01	
	M18	1272	1298	1280	1283.33	50.21	

En la (Tabla 14), se presentan los resultados de los análisis por triplicado de cada hacienda con respuestas negativas y positivas para sulfametazina, aquí se muestra como las haciendas 2, 3 y 6 presentan contaminación por sulfametazina, se muestra también la concentración por muestra y el promedio de concentración por hacienda en partes por billón (ppb).



En la (Figura 11), se muestra las distintas concentraciones de sulfametazina presentes en las muestras de leche cruda analizada con el método desarrollado. Se observa que 3 de las 6 muestras analizadas presentan una concentración superior a $25 \mu\text{g/L}$, que es el límite máximo permitido por el Codex Alimentario para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos.

Estos resultados demuestran que el método cromatográfico desarrollado para UPLC – UV puede ser aplicado para la detección de sulfamerazina y sulfametazina en muestras de leche cruda.

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se desarrolló y estandarizó el método para la cuantificación de sulfametazina y sulfamerazina en leche cruda por UPLC.

Se pudo obtener una correcta separación de las dos sulfonamidas en una sola corrida y se establecieron los tiempos de retención de 1.15 min para sulfametazina y de 0.95 min para sulfamerazina.

Las curvas de calibración fueron realizadas para las dos sulfonamidas y se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a 1, lo que demostró la linealidad de los resultados en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Se realizó un estudio estadístico con el que se determinó el porcentaje de recuperación, y los límites de detección y cuantificación, tanto de sulfametazina como de sulfamerazina.

El límite de detección y cuantificación obtenido para sulfametazina es de 11 y 15 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, el límite de detección y cuantificación obtenido para sulfamerazina es de 17 y 24 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, con estos resultados se pudo constatar que el método desarrollado para el equipo UPLC, puede detectar concentraciones a niveles de partes por billón.

Se probó el método desarrollado, fortificando las muestras de leche cruda con concentraciones específicas de las dos sulfonamidas obteniendo un porcentaje promedio de recuperación de 91.05% para sulfametazina y 115.71% para sulfamerazina, estos resultados se encuentran dentro de los parámetros de aceptación de A.O.A.C.

Las 6 muestras de leche analizadas no presentaron resultados positivos para sulfamerazina, pero 3 muestras presentaron contaminación por sulfametazina

(tabla 3.4 y 3.5). Se pudo constatar que estas muestras sobrepasaron los LMR permitidos por el Codex Alimentario.

El método desarrollado será aplicado en el Laboratorio de Control de Calidad de Leche de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro y puede ser aprovechado en el Ecuador para el análisis cuantitativo de estos dos antibióticos, también podrá servir de referencia para su aplicación en otros laboratorios a nivel nacional.

5.2 Recomendaciones

Se sugiere revisar el pH de las fases móviles previo a la corrida de las muestras o de los estándares, puesto la variación en el pH influye directamente en los tiempos de retención del analito.

Se recomienda que todas las soluciones preparadas en el laboratorio sean filtradas antes de interactuar con el equipo, a través de una filtración al vacío con membranas de 0.22 o 0.45 μm con el fin de eliminar las impurezas que pueden obstruir los canales o la columna del equipo de cromatografía.

Se debe también filtrar siempre todos los estándares y las muestras antes de ser inyectadas al equipo mediante filtros PVDF de 0.22 o 0.45 μm

Es recomendable que para implementación de técnicas similares que requieran detectar niveles de concentración mucho más bajos o a nivel de trazas, utilizar un equipo UPLC H-Class acoplado a un espectro de masas, con el que se puede aumentar significativamente la separación, cuantificación e identificación de analitos.

REFERENCIAS

- Adams, H. (2003). Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. *Farmacología y terapéutica microbiana*. (1), 835-981.
- Baliz, G., Hewitt, A. (2003). Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. (492), 105-131.
- Botsoglou, N., Fleitoris, J. (1996). Analysis of Residual Antibacterials in Food of Animal Origin. *In Handbook of Food Analysis*. (2), 144-148.
- CIL. (2004). *La Lechería en la República Argentina*. Recuperado el 24 de noviembre de 2015, de: http://www.cil.org.ar/docs/la_lecheria_argentina.pdf.
- Codex Alimentario. (2007). *Examen de la labor realizada por la FAO, OMS y OIE sobre la resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado el 4 de diciembre de 2015, de: ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/TFAMR/tfamr1/amr01_03s.pdf
- Corcia, A., Nazzari M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J Chromatogr A*. (1-2), 53-89.
- Debackere, M. (1995). Comparison of disk assay, Intest and Delvotest P sensitivity for antibiotic residues in milk. *International Dairy Federation*. 41-53.
- Demoly, P., Romano A. (2005). Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep*. (1), 9-14.
- Dominguez, L., Moreno, M. (2001). *Utilización de antimicrobianos en producción animal y otras alternativas*. Conferencia Real Academia de Ciencias Veterinarias. Madrid. Recuperado el 28 de noviembre de 2015, de: <http://racve.es/publicaciones/utilizacion-de-antimicrobianos-en-produccion-animal-y-otras-alternativas/>
- FAO. (2000). *Report on the FAO E-mail Conference on Small-scale Milk Collection and Processing in Developing Countries*. Recuperado el 4 de

- octubre de 2015, de:
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/econf-proc-english.pdf
- FAO. (2006). *La larga sombra de ganado problemas ambientales y opciones*. Recuperado el 1 de octubre de 2015, de: <http://www.fao.org/3/a-a0701s.pdf>
- FAO. (2006). *Examen de las políticas sobre productos alimenticios básicos 2003-2004*. Recuperado el 5 de octubre de 2015, de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/A0368s/A0368s00.pdf>
- FAO. (2015). *Perspectivas Alimentarias*. Recuperado el 5 de noviembre de 2015, de: <http://www.fao.org/3/a-i5003s.pdf>
- FAO/OMS. (2005). *Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe*. Recuperado el 24 de noviembre de 2015, de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/af181s.pdf>.
- FAO/SMIA. (2012). *Perspectivas Alimentarias*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015, de: <http://www.fao.org/docrep/015/al989s/al989s00.pdf>
- FAOSTAT. (2012). *Production de produits alimentaires et agricoles*. Recuperado el 20 de noviembre de 2015, de: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- Haangsmann, N. (1993). Stability of veterinary drug residues during storage, preparation and processing. *In Proceedings of EuroResidue*. . 41-49.
- Honkanen-Buzalski, T., Reybroeck, W. (1997). Antimicrobials In Residues and contaminants in milk and milk products. *International Dairy Federation*. 26-34.
- Horwitz, W., Latimer, G. (2010). Multiple Sulfonamide Residues in Raw Bovine Milk by Liquid Chromatographic Method. *Official Methods of analysis of AOAC International*. (18).
- INEC. (2011). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015, de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/PRESENTACION-Espac.pdf>

- INEC. (2014). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Recuperado el 24 de noviembre de 2015, de: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014/Resultados_2014/3.%20Informe_ejecutivo_ESPAC_2014.pdf
- INEC/MAG/SICA. (2002). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. Recuperado el 23 de noviembre de 2015, de: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/>
- INEN. (2012). NTE INEN 9:2012. *Requisitos para la Leche Cruda*. Quito, Ecuador.
- János, S., y Baltay, Z. (2004). Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. Recuperado el 25 de noviembre de 2015, de: http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/AVet.52.2004.2.6?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed
- Karimuribo, E., Kusiluka, L., Mdegea, R., Kapaga, A., Sindato, C., Kambarage, D. (2005). Studies on mastitis, milk quality and health risks associated with consumption of milk from pastoral herds in Dodoma and Morogoro regions, Tanzania. *Journal of Veterinary Science*. 6(3), 213-221.
- Loscher, W. (1994). Animal experiments in the development and evaluation of veterinary drugs. *Tierarztliche-Umschau*. 49, 67-68.
- Lundstrom, T., Sobel J. (1995). Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Rifampim. *Infect Dis Clin*. 9(3), 747-764.
- Manzanares, N., Gracia, L., García, A. (2013). Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. (143), 459–464
- Marquez, L. (2008). Residuos de alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica de Ciencia y tecnología Agropecuaria*. 9(1), 124-135.

- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de salud pública*. 11 (4), 579-590.
- Naushad, M., Rizwan, M. (Eds). (2014). *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Evaluation and Applications in Food Analysis*. USA. Taylor & Francis Group.
- O'Grady, L., y Doherty, M. (2009). Focus on Bovine Mastitis: knowledge into practice. *Irish Veterinary Journal*. 64 (4), 258. Recuperado el 20 de noviembre de 2015, de: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/supplements/volume-62-supplement-4>
- Olechnowicz, J., y Jaskowskj, J. (2012). Somatic cells count in Cow's Bulk Tank Milk. *Journal of Veterinary Science*. 74(6), 681-686.
- Oliveri, A. (2002). *Curso de quimiometría: Calibración univariada y multivariada de primer orden*. Argentina: Suipacha.
- Parra, M., Peláez, L., Londoño, J., Pérez, N., Rengifo, G. (2003). *Los residuos de medicamentos en la leche*. Recuperado el 2 de diciembre de 2015, de: http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf
- Pérez, R. (2010). *Farmacología Veterinaria*. Universidad de Concepción. Chile. Recuperado el 28 de noviembre de 2015, de: http://www.sibudec.cl/ebook/UDEC_Farmacologia_Veterinaria.pdf
- Poucke, V., Keyser, K., Baltusnikiene, A., Evoy, J., Peteghem, C. (2003). Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Analytica Chimica Acta*. (483), 99–109. Recuperado el 4 de diciembre de 2015, de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267003000187>
- Rang, H., Dale, M., Ritter, J. (2000). Quimioterapia de enfermedades infecciosas y malignas. *In Farmacología*. (4), 742-748
- Reig, M., Toldrá, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*. (78), 60–67. Recuperado el

- 5 de diciembre de 2015, de:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174007002719>
- Rivas, A., Quimby, F., Blue, J., Coksaygan, O. (2001). Longitudinal Evaluation of Bovine Mammary Gland Health Status by Somatic Cell Counting, Flow Cytometry and Cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(5), 399-407. Recuperado el 5 de diciembre de 2015, de: <http://vdi.sagepub.com/content/13/5/399.long>
- San Martín, B., Kruze, J., Morales, A., Auguero, H., León, B., Espinoza, S., Iraguren, D., Puga, J., Borrie, C. (2002). *Medicina Veterinaria*. (2), 222-224.
- She, Y., Liu, J., Wang, J., Liu, Y., Wang, R., Cao, W. (2014). Determination of Sulfonamides in Bovine Milk by Ultra Performance Liquid Chromatography Combined with Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. Recuperado el 15 de diciembre de 2015, de: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032711003698796#.V2hXlfAsM8U>
- SEM. (2012). *Análisis del sector lácteo en México*. Recuperado el 3 de octubre de 2015, de: http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf.
- Smilack, J. (1999). Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Mayo Clin Proc*. (74), 730-734.
- Soto, J. (2007). *Nuevas aportaciones al análisis de residuos y plaguicidas antibióticos en aguas y alimentos*. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada.
- Sumano, H., Ocampo, L. (1997). Quimioterapia de las enfermedades microbianas. *Farmacología Veterinaria*. (2), 118-137.
- Tollefson, L., Karp, B. (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses*. (34), 514-521.
- USDA. (2012). *Food Composition*. Recuperado el 28 de noviembre de 2015, de: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/201?fg=Dairy+and+Egg+Produ>

ctsyman=yfacet=yformat=ycount=ymax=25yoffset=200ysort=yqllookup=

- .
- Vallejo, M. (1993). Residualidad de los plaguicidas en alimentos tóxicos. Toxicología y seguridad de los alimentos. Primera edición. 139-151.
- Wu, Y., Cun L., Liu, Y., Shen, J. (2007). Validation Method for the Determination of Sulfonamide Residues in Bovine Milk by HPLC. Springer.
- Zorraquino, M. (1996). *Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios*. Curso de medicina de la producción en vacuno lechero.
- Zorraquino, M., Berruga, M. Molina, M. (2007). Investigación de campo de los antibióticos utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada. Ministerio de agricultura, pesca y Alimentación. España, Madrid.

ANEXOS

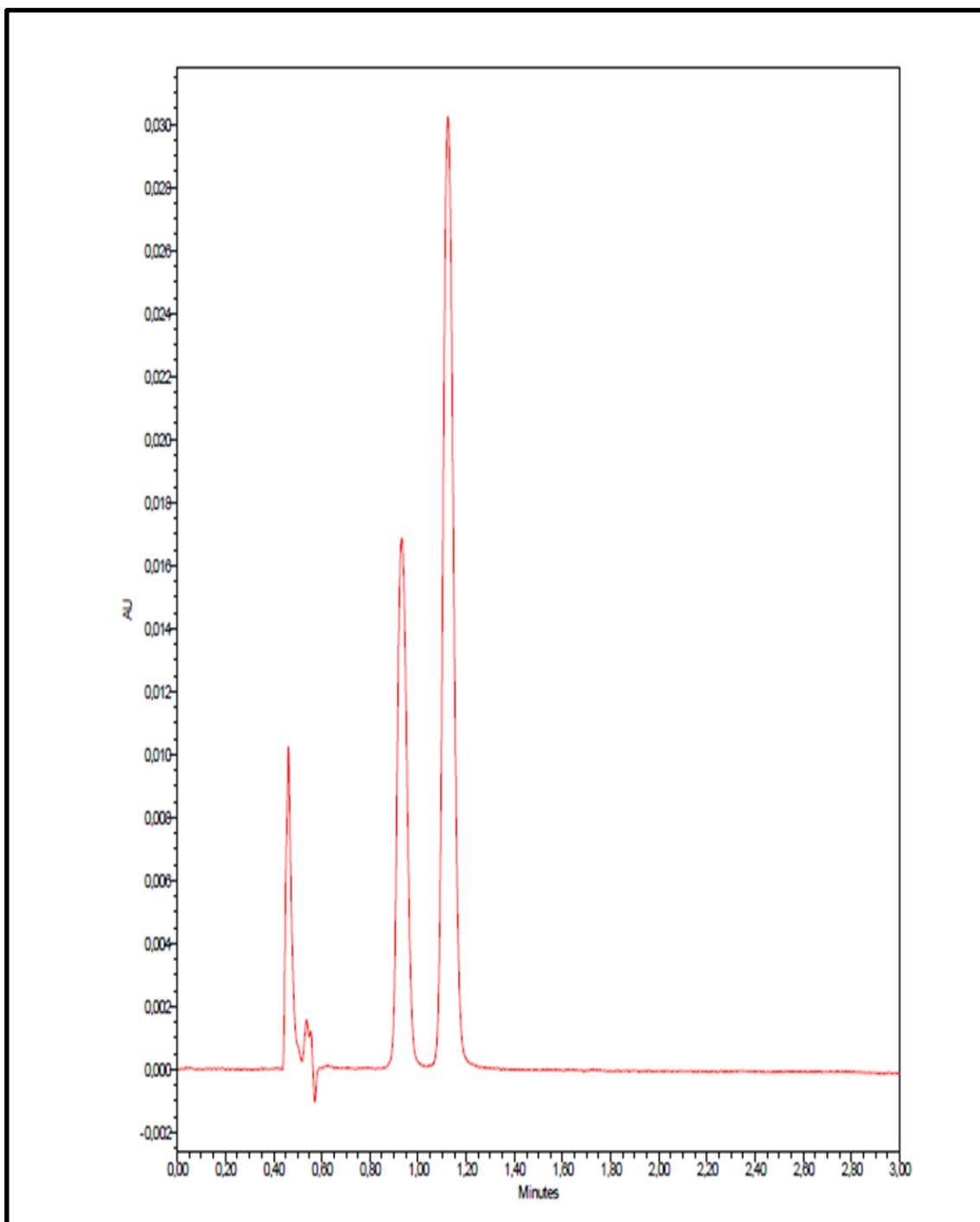
Anexo 1. REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009. Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.

L 15/64		ES		Diario Oficial de la Unión Europea		20.1.2010	
Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana	Otras disposiciones (con arreglo al artículo 14.7 del Reglamento (CE) nº 470/2009)	Clasificación terapéutica	
Sulfonamidas (todas las sustancias que pertenecen al grupo de las sulfonamidas)	Medicamento base	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón	Los residuos combinados totales de todas las sustancias del grupo de las sulfonamidas no deben sobrepasar los 100 µg/kg. Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces. No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.	Antiinfecciosos/ Quimioterapéuticos	
		Bovinos, ovinos y caprinos	100 µg/kg	Leche			

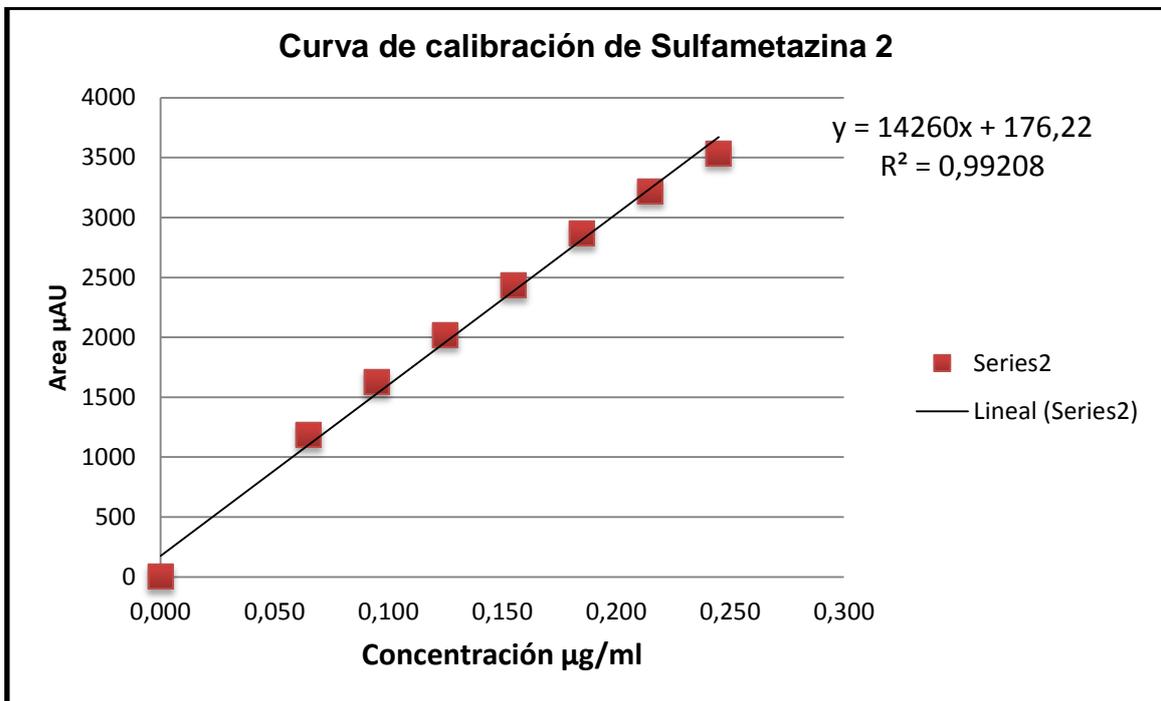
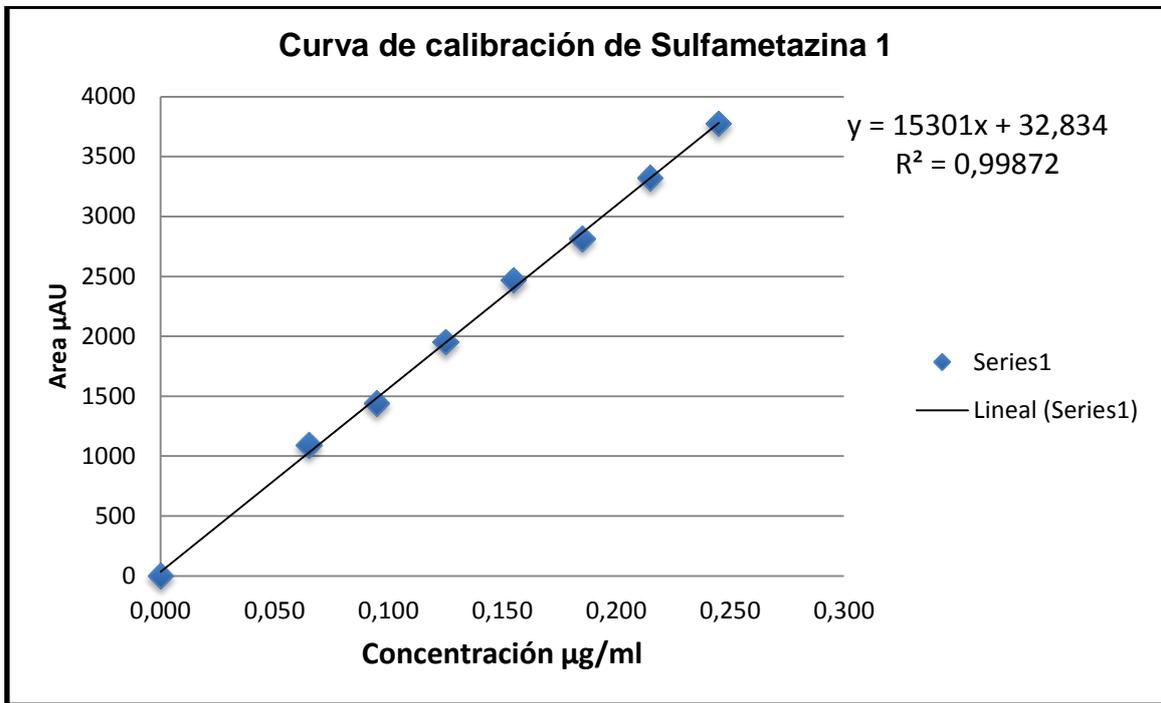
Anexo 2. Norma Codex Alimentarius.

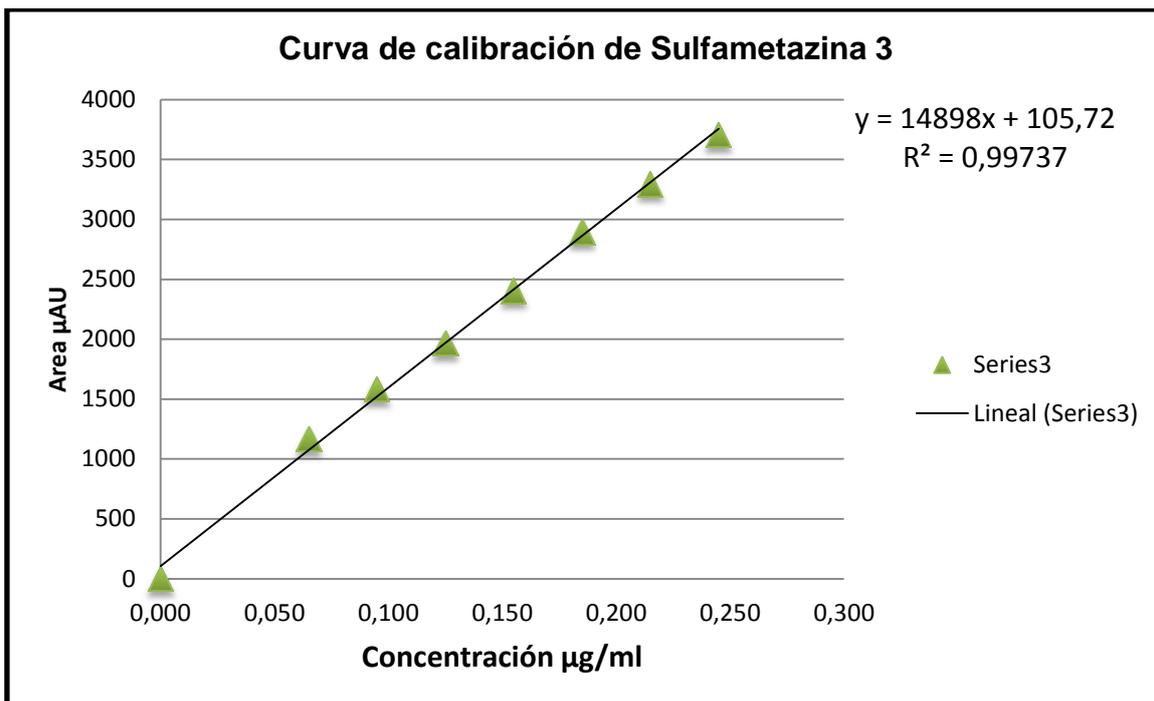
SULFADIMIDINA (agente antimicrobiano)				
Evaluación del JECFA: 34 (1989); 38 (1991); 42 (1994)				
Ingesta diaria admisible: 0-50 µg/kg de peso corporal (42.ª JECFA, 1994).				
Definición del residuo: Sulfadimidina.				
Especie	Tejido	LMR (µg/kg)	CAC	Notas
Vacuno / Vaca	Leche (µg/l)	25	21.º (1995)	
No especificado	Músculo	100	21.º (1995)	
No especificado	Hígado	100	21.º (1995)	
No especificado	Riñón	100	21.º (1995)	
No especificado	Grasa	100	21.º (1995)	

Anexo 3. Cromatograma de sulfametazina y sulfamerazina a una concentración de 100 µg/L.

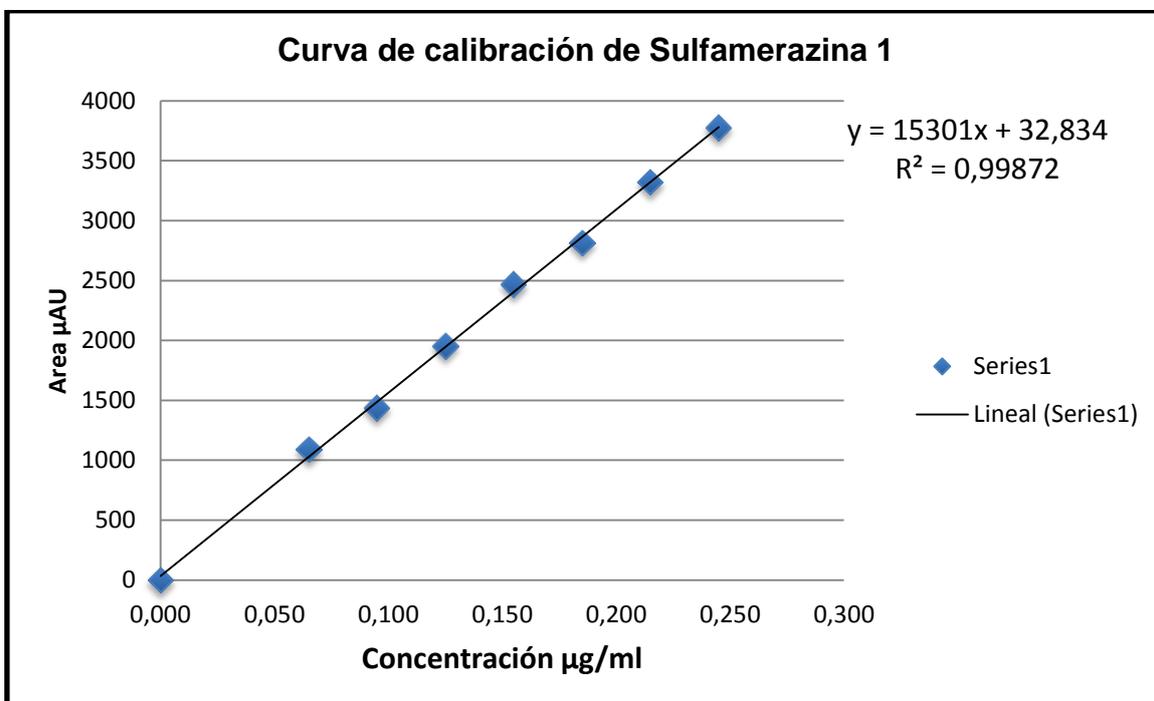


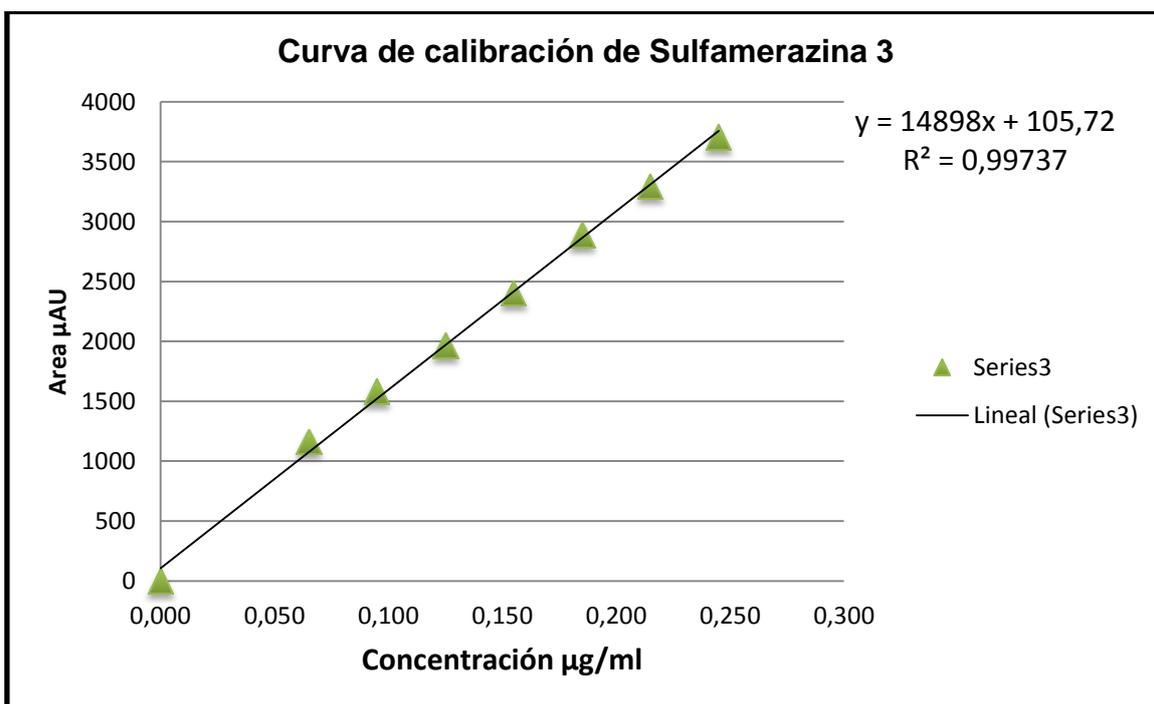
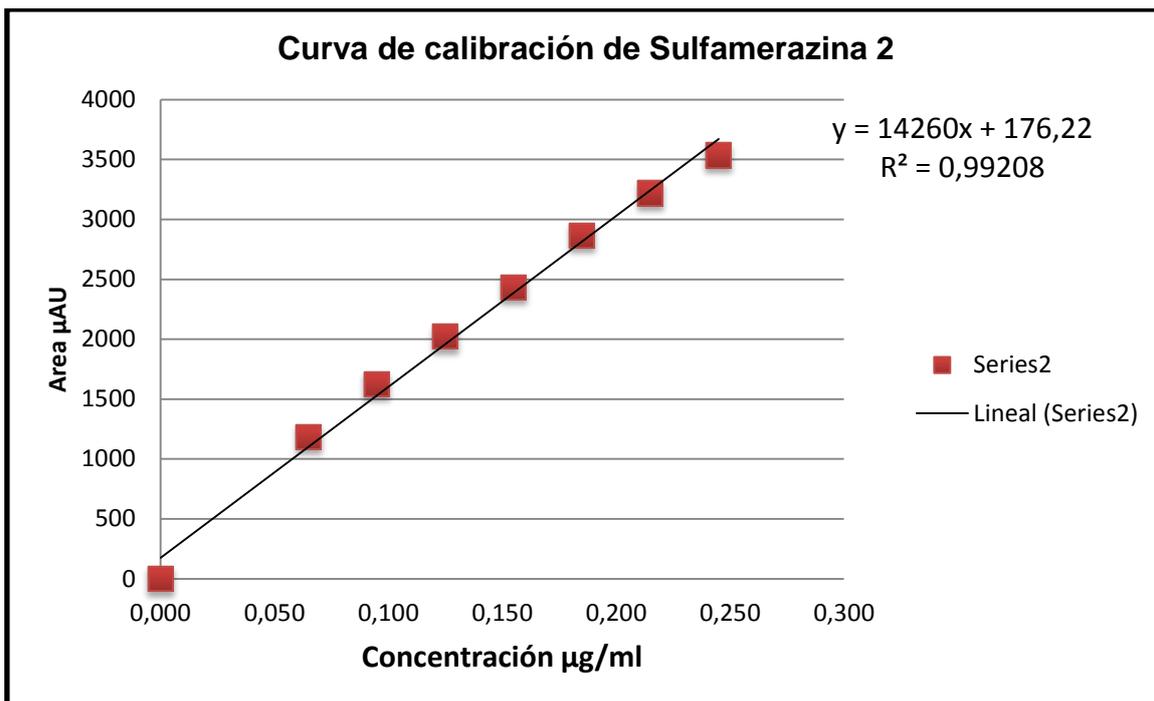
Anexo 4: Curvas de calibración y coeficientes de correlación de cada una de las tres repeticiones del estándar de Sulfametazina





Anexo 5: Curvas de calibración y coeficientes de correlación de cada una de las tres repeticiones del estándar de Sulfamerazina





Anexo 6: Cálculos y desarrollo estadístico del método cromatográfico para sulfametazina

Concentración (ppm)	A1, A2 & A3	$(x_i - x_{prom})$	$(x_i - x_{prom})^2$	$(y_i - y_{prom})$	$(x_i - x_{prom})(y_i - y_{prom})$	
0,000	0	-0,11	0,01	-2918,92	319,26	
0,035	1001	-0,07	0,01	-1917,92	142,65	
0,065	1644	-0,04	0,00	-1274,92	56,57	
0,095	2772	-0,01	0,00	-146,92	2,11	
0,125	3445	0,02	0,00	526,08	8,22	
0,155	4407	0,05	0,00	1488,08	67,89	
0,185	5115	0,08	0,01	2196,08	166,08	
0,215	6023	0,11	0,01	3104,08	327,87	
0,000	0	-0,11	0,01	-2918,92	319,26	
0,035	717	-0,07	0,01	-2201,92	163,77	
0,065	1568	-0,04	0,00	-1350,92	59,95	
0,095	2466	-0,01	0,00	-452,92	6,51	
0,125	3263	0,02	0,00	344,08	5,38	
0,155	4064	0,05	0,00	1145,08	52,24	
0,185	4938	0,08	0,01	2019,08	152,69	
0,215	5721	0,11	0,01	2802,08	295,97	
0,000	0	-0,11	0,01	-2918,92	319,26	
0,035	711	-0,07	0,01	-2207,92	164,21	
0,065	1512	-0,04	0,00	-1406,92	62,43	
0,095	2401	-0,01	0,00	-517,92	7,45	
0,125	3352	0,02	0,00	433,08	6,77	
0,155	4153	0,05	0,00	1234,08	56,31	
0,185	4959	0,08	0,01	2040,08	154,28	
0,215	5822	0,11	0,01	2903,08	306,64	
Q_{xx} =			0,12	Q_{xy} =		3223,75

Promedio:

$x_{prom} =$	0,11
$y_{prom} =$	2918,92

Estimación de los parámetros de la regresión

$$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x}$$

A =	27644,27	Pendiente
B =	-104,68	Intercepto

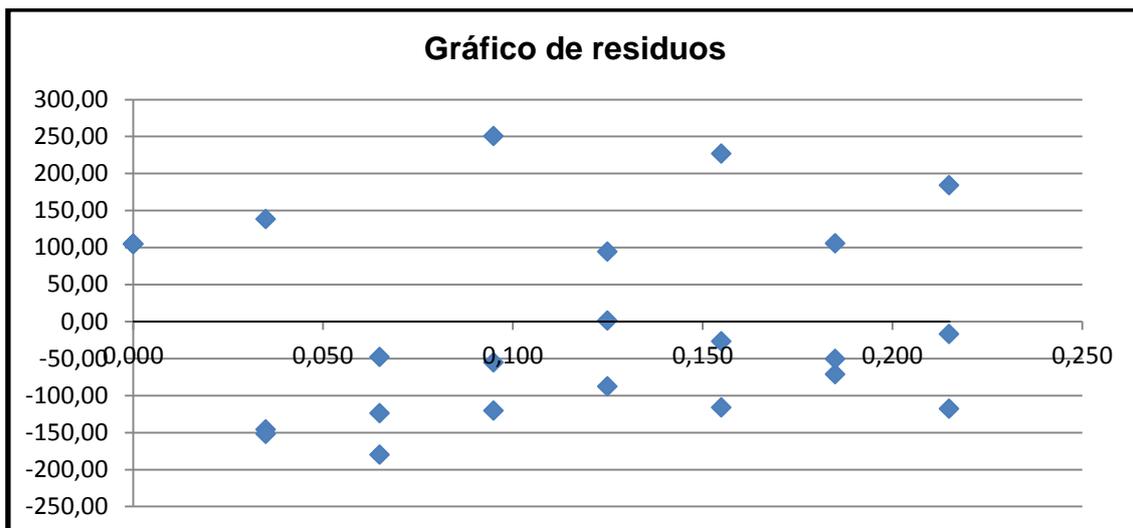
Entonces:

$$y = A x + B$$

y_{inc} =	27644,27	x _{inc}	+	-104,68
--------------------------	----------	------------------	---	---------

Para el gráfico de residuos:

Concentracion (ppm)	A1, A2 & A3	Residuos y_i - (Ax_i + B)
0,000	0	104,68
0,035	1001	138,13
0,065	1644	-48,20
0,095	2772	250,47
0,125	3445	94,14
0,155	4407	226,81
0,185	5115	105,49
0,215	6023	184,16
0,000	0	104,68
0,035	717	-145,87
0,065	1568	-124,20
0,095	2466	-55,53
0,125	3263	-87,86
0,155	4064	-116,19
0,185	4938	-71,51
0,215	5721	-117,84
0,000	0	104,68
0,035	711	-151,87
0,065	1512	-180,20
0,095	2401	-120,53
0,125	3352	1,14
0,155	4153	-27,19
0,185	4959	-50,51
0,215	5822	-16,84



Evaluando F para el rango de los 8 estándares analizados

Concentración (ppm)	A1, A2 & A3	Respuesta estimada	$y_i - \text{Resp. Est.}$	$(y_i - \text{Resp. Est.})^2$	$(y_i - y_{\text{prom } i})^2$
0,000	0	-104,68	104,68	10956,92	0,00
0,035	1001	862,87	138,13	19078,76	36608,44
0,065	1644	1692,20	-48,20	2323,45	4807,11
0,095	2772	2521,53	250,47	62735,07	50925,44
0,125	3445	3350,86	94,14	8862,65	8402,78
0,155	4407	4180,19	226,81	51444,38	39601,00
0,185	5115	5009,51	105,49	11127,18	12321,00
0,215	6023	5838,84	184,16	33913,94	28112,11
0,000	0	-104,68	104,68	10956,92	0,00
0,035	717	862,87	-145,87	21279,26	8587,11
0,065	1568	1692,20	-124,20	15426,19	44,44
0,095	2466	2521,53	-55,53	3083,61	6453,44
0,125	3263	3350,86	-87,86	7719,09	8160,11
0,155	4064	4180,19	-116,19	13499,29	20736,00
0,185	4938	5009,51	-71,51	5114,33	4356,00
0,215	5721	5838,84	-117,84	13886,88	18045,44
0,000	0	-104,68	104,68	10956,92	0,00
0,035	711	862,87	-151,87	23065,75	9735,11
0,065	1512	1692,20	-180,20	32472,84	3927,11
0,095	2401	2521,53	-120,53	14527,55	21121,78
0,125	3352	3350,86	1,14	1,30	1,78
0,155	4153	4180,19	-27,19	739,10	3025,00
0,185	4959	5009,51	-50,51	2551,72	2025,00
0,215	5822	5838,84	-16,84	283,67	1111,11
				376006,79	288107,33

$y_{prom} =$	2918,92
$m =$	24
$p =$	8

m: Número total de patrones de calibrado

p: número de réplicas de la muestra incógnita

Anexo 7: Cálculos y desarrollo estadístico del método cromatográfico para sulfamerazina.

Concentracion (ppm)	A1, A2 & A3	$(x_i - x_{prom})$	$(x_i - x_{prom})^2$	$(y_i - y_{prom})$	$(x_i - x_{prom})(y_i - y_{prom})$
0,000	0	-0,14	0,02	-2114,83	286,82
0,065	1090	-0,07	0,00	-1024,83	72,38
0,095	1440	-0,04	0,00	-674,83	27,42
0,125	1953	-0,01	0,00	-161,83	1,72
0,155	2469	0,02	0,00	354,17	6,86
0,185	2814	0,05	0,00	699,17	34,52
0,215	3322	0,08	0,01	1207,17	95,82
0,245	3776	0,11	0,01	1661,17	181,69
0,000	0	-0,14	0,02	-2114,83	286,82
0,065	1185	-0,07	0,00	-929,83	65,67
0,095	1627	-0,04	0,00	-487,83	19,82
0,125	2021	-0,01	0,00	-93,83	1,00
0,155	2434	0,02	0,00	319,17	6,18
0,185	2865	0,05	0,00	750,17	37,04
0,215	3217	0,08	0,01	1102,17	87,48
0,245	3533	0,11	0,01	1418,17	155,11
0,000	0	-0,14	0,02	-2114,83	286,82
0,065	1164	-0,07	0,00	-950,83	67,15
0,095	1583	-0,04	0,00	-531,83	21,61
0,125	1968	-0,01	0,00	-146,83	1,56
0,155	2404	0,02	0,00	289,17	5,60
0,185	2893	0,05	0,00	778,17	38,42
0,215	3293	0,08	0,01	1178,17	93,52
0,245	3705	0,11	0,01	1590,17	173,92
		$Q_{xx} =$	0,14	$Q_{xy} =$	2054,97

Promedio:

$x_{prom} =$	0,14
$y_{prom} =$	2114,83

Estimación de los parámetros de la regresión

$$A = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x}$$

$$B = \bar{y} - A\bar{x}$$

A =	14819,59	Pendiente
B =	104,93	Intercepto

Entonces:

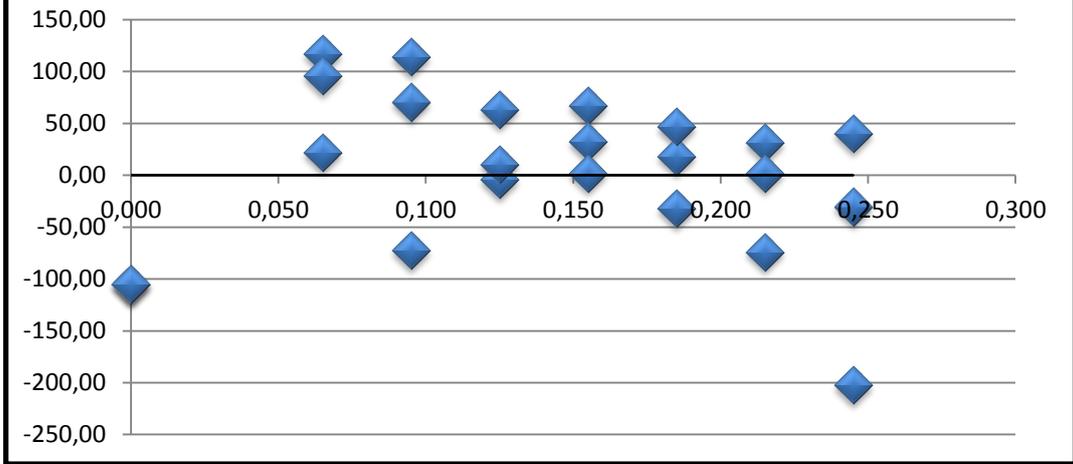
$$y = A x + B$$

$y_{inc} =$	14819,59	x_{inc}	+	104,93
-------------	----------	-----------	---	--------

Para el gráfico de residuos

Concentracion (ppm)	A1, A2 & A3	Residuos $y_i - (Ax_i + B)$
0,000	0	-104,93
0,065	1090	21,80
0,095	1440	-72,79
0,125	1953	-4,38
0,155	2469	67,04
0,185	2814	-32,55
0,215	3322	30,86
0,245	3776	40,27
0,000	0	-104,93
0,065	1185	116,80
0,095	1627	114,21
0,125	2021	63,62
0,155	2434	32,04
0,185	2865	18,45
0,215	3217	-74,14
0,245	3533	-202,73
0,000	0	-104,93
0,065	1164	95,80
0,095	1583	70,21
0,125	1968	10,62
0,155	2404	2,04
0,185	2893	46,45
0,215	3293	1,86
0,245	3705	-30,73

Gráfico de residuos



Evaluando F para el rango de los 8 estándares analizados

Concentración (ppm)	A1, A2 & A3	Respuesta estimada	$y_i - \text{Resp. Est.}$	$(y_i - \text{Resp. Est.})^2$	$(y_{ij} - y_{\text{prom } i})^2$
0,000	0	104,93	-104,93	11009,60	0,00
0,065	1090	1068,20	21,80	475,24	3173,44
0,095	1440	1512,79	-72,79	5298,03	12100,00
0,125	1953	1957,38	-4,38	19,14	765,44
0,155	2469	2401,96	67,04	4493,98	1111,11
0,185	2814	2846,55	-32,55	1059,54	1877,78
0,215	3322	3291,14	30,86	952,45	1995,11
0,245	3776	3735,73	40,27	1622,01	10955,11
0,000	0	104,93	-104,93	11009,60	0,00
0,065	1185	1068,20	116,80	13642,26	1495,11
0,095	1627	1512,79	114,21	13044,48	5929,00
0,125	2021	1957,38	63,62	4048,11	1626,78
0,155	2434	2401,96	32,04	1026,38	2,78
0,185	2865	2846,55	18,45	340,38	58,78
0,215	3217	3291,14	-74,14	5496,47	3640,11
0,245	3533	3735,73	-202,73	41097,76	19136,11
0,000	0	104,93	-104,93	11009,60	0,00
0,065	1164	1068,20	95,80	9177,66	312,11
0,095	1583	1512,79	70,21	4929,79	1089,00
0,125	1968	1957,38	10,62	112,89	160,44
0,155	2404	2401,96	2,04	4,15	1002,78
0,185	2893	2846,55	46,45	2157,55	1272,11
0,215	3293	3291,14	1,86	3,47	245,44
0,245	3705	3735,73	-30,73	944,08	1133,44
				142974,63	69082,00

$y_{\text{prom}} =$	2114,83
$m =$	24
$p =$	8

m: Número total de patrones de calibrado

p: número de réplicas de la muestra incógnita

Anexo 8. Criterio de aceptación del parámetro de exactitud, relacionando el porcentaje de recuperación en función de la concentración del analito

Analito %	Radio analito	Unidad	Porcentaje de recuperación
100	1	100%	98-102
≥ 10	10-1	10%	98-102
≥ 1	10-2	1%	97-103
≥ 0.1	10-3	0.1%	95-105
0.01	10-4	100ppm	90-107
0.001	10-5	10ppm	80-110
0.0001	10-6	1ppm	80-110
0.00001	10-7	100ppb	80-110
0.000001	10-8	10ppb	60-115
0.0000001	10-9	1ppb	40-120