

10
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE
AVOPARCINA EN PREMEZCLAS
ALIMENTICIAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :
IRMA FLORES CAMACHO
MAURICIO RAMIREZ FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS: Q.I.J. FERNANDO JAUREGUI ZAVALA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

FALLA DE ORIGEN

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Lista de Tablas.....	3
Lista de Figuras.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
INTRODUCCION	6
OBJETIVOS	8
CAPITULO 1 .GENERALIDADES	Pág.
1.1 Generalidades.....	9
1.2 Estructura de Avoparcina.....	14
1.3 Componentes de Avoparcina.....	15
1.4 Propiedades de la Avoparcina	18
1.5 Epimerización y Estereoquímica de Avoparcina	19
CAPITULO 2 .FUNDAMENTOS	
2.1 Fundamentos de Técnicas Analíticas Involucradas.....	24
2.2 Espectro Electromagnético	24
2.3 Espectroscopia Ultravioleta y Visible	28
2.3.1 Instrumentación.....	30
2.4 Espectroscopia Infrarroja	31
2.4.1 Instrumentación.....	32
2.5 Espectrometría de Masas.....	34
2.5.1 Instrumentación	35
2.6 Cromatografía	37
CAPITULO 3 .DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 Material y Métodos.....	39
3.1.1 Obtención y Purificación del Estándar.....	39
3.1.2 Identificación Espectroscópica.....	40
3.1.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible	40
3.1.4 Espectroscopia de Infrarrojo	40
3.2 Espectrometría de Masas.....	41
3.3 Técnicas de Separación y Cuantificación.....	42
3.3.1 Cromatografía en Placa.....	42
3.3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	42

3.4	Validación del Método Analítico.....	45
3.4.1	Linealidad del Método.....	45
3.4.2	Precisión del Método.....	46
3.4.3	Exactitud del Método.....	46
3.4.4	Reproducibilidad	46
3.4.5	Límite de detección.....	46
3.4.6	Especificidad.....	47

CAPITULO 4 .RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1	Interpretación del Espectro de Absorción de UV.....	48
4.2	Interpretación del Espectro de Infrarrojo.....	49
4.3	Interpretación de los Espectros de Masas.....	52
4.4	Interpretación de Cromatografía en Placa.....	55
4.5	Resultados de Cromatografía de Líquidos.....	57
4.5.1	Proporcionalidad de los Antibióticos.....	61
4.6	Validación del Método Analítico.....	63
4.6.1	Linealidad del Método.....	63
4.6.2	Precisión del Método al 100%.....	67
4.6.3	Exactitud del Método al 80%.....	68
4.6.4	Exactitud del Método al 120%.....	69
4.6.5	Reproducibilidad.....	70
4.6.6	Cantidad Mínima Detectable.....	74
4.6.7	Especificidad	74

CAPITULO 5 .CONCLUSIONES

5.1	Conclusiones.....	78
	Anexo.....	80

CAPITULO 6 .BIBLIOGRAFIA81

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1.- Epimerización de los componentes de Avoparcina.....	20
2.- Cromatografía en capa fina teórico y experimental (RF's).....	54
3.- Proporcionalidad de los Antibióticos.....	61
4.- Linearidad del Método.....	63
5.- Precisión del Método al 100%.....	67
6.- Exactitud del Método al 80%.....	68
7.- Exactitud del Método al 120%.....	69
8.- Reproducibilidad.(analista 1 día 1).....	70
9.- Reproducibilidad.(analista 1 día 2).....	71
10.- Reproducibilidad.(analista 2 día 1).....	72
11.- Reproducibilidad.(analista 2 día 2).....	73
12.- Resultados de la Validación del Método.....	75
13.- Análisis de Variancia para Reproducibilidad.....	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pag
1.- Estructura de Vancomicina.....	10
2.- Degradación Alcalina Fragmento I y Ia.....	10
3.- Estructura de origen común para glucopéptidos	11
4.- Degradación Alcalina Fragmento VIII y IX.....	11
5.- Fragmento X, XI, XII y XIII.....	12
6.- Estructura de α y β Avoparcina.....	14
7.- Estructura de Componentes Menores de Avoparcina.....	17
8.- Estructura de la Estereoquímica de Epi-Avoparcina.....	23
9.- Espectro Electromagnético.....	25
10.- Espectro de Absorción de luz Ultravioleta de Avoparcina.....	48
11.- Espectro de Infrarrojo de Premezcla Alimenticia.....	49
12.- Espectro de Infrarrojo de Avoparcina Purificada.....	50
13.- Perfil de Corriente Iónica Total de Avoparcina Purificada.....	52
14.- Espectro de Masas de β - Avoparcina.....	53
15.- Espectro de Masas de α - Avoparcina.....	54
16.- Cromatoplaque de Avoparcina Purificada y P.mezcla.....	56
17.- Estandarización Interna de Vancomicina y Avoparcina.....	58
18.- Cromatograma de Vancomicina.....	59
19.- Estandarización externa de Avoparcina Purificada.....	60
20.- Estudio de Proporcionalidad de los Antibióis	62
21.- Linearidad del Método.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAR	Cromatografía de Líquidos Alta Resolución
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
λ	Longitud de onda
ν	Frecuencia
$\bar{\nu}$	Número de onda
c	Velocidad de la luz
a	Constante de Absortividad
b	Espesor de la celda (cm)
c	Concentración de la muestra
A	Absorbancia = $abc = \log I / I_0 = \log 1 / T$
m	Masa del ión
Z	Carga del ión
v	Potencial de aceleración
Zv	Energía potencial
Hev	Fuerza centrípeta
mv/r	Fuerza centrífuga
v	Velocidad del ión
r	Radio de trayectoria circular
I	Intensidad de radiación incidente
I	Intensidad de radiación transmitida

INTRODUCCION:

En el país la Investigación Tecnológica enfocada a la Química Analítica ofrece una gama de oportunidades que fluctúan desde actividades como son: operaciones de control de calidad , caracterización de sustancias ,asi como actividades de apoyo a la investigación tanto básica como aplicada. En México uno de los centros más importantes en donde se efectúa este tipo de investigación es el Laboratorio Central de la Dirección General de Aduanas. En este lugar con el propósito de proteger el crédito fiscal al momento de la importación de productos al país , la Legislación Aduanera en vigor, requiere la práctica de Análisis Cuantitativo y Cualitativo para determinar las características esenciales de la mercancía importada , precisando su clasificación en la Tarifa General de Impuestos de Importación . Manifestándose la importancia de contar con estándares que nos permitan poder evaluar la presencia y el contenido de los principales componentes de los productos de importación . Por ésta razón fue necesario realizar el estudio de un producto que presentaba problemas en cuanto a su declaración arancelaria. El producto es una premezcla alimenticia para vacunos y ovinos que está constituida por 5% de un antibiótico llamado Avoparcina y otros componentes entre los que se encuentran fibras de soya , ceras de origen natural y compuestos inorgánicos.

No existiendo un estándar de Avoparcina con el cual realizar la comparación y cuantificación del antibiótico de las premezclas importadas fue necesario recopilar la información bibliográfica

relativa a avoparcina. preparar una muestra de referencia a partir de una formulación comercial. aislar el antibiótico , identificarlo espectroscópicamente y evaluar la pureza del extracto obtenido y posteriormente cuantificar el contenido de Avoparcina de las premezclas alimenticias comerciales.

Para darle mayor validez al trabajo analítico realizado como el fundamentar el concepto teórico sobre métodos de cuantificación por estandarización interna. fué necesario establecer un estudio de proporcionalidad de los antibióticos utilizados a las mismas condiciones cromatográficas, y así poder aclarar en parte las dudas que dejara el utilizar estandares internos que no tienen exactamente la misma estructura química. El poder determinar el contenido del antibiótico en la premezcla alimenticia fue un trabajo que ayudo al Laboratorio Central de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público a resolver el problema Analítico - Arancelario, como a su vez permitié ser material de apoyo para cursos académicos del area de la Química Analítica.....

OBJETIVOS:

- 1.0 Recopilar toda la información existente hasta el momento relativa a Avoparcina.
- 2.0 Separar de las premezclas la Avoparcina contenida en ellas utilizando para ello la cromatografía en capa fina y posteriormente utilizarlo como estándar secundario.
- 3.0 Identificar por métodos espectroscópicos como son espectroscopia de U.V. e I.R. y espectrometría de masas a la Avoparcina.
- 4.0 Evaluar la pureza del extracto obtenido (estándar secundario).
- 5.0 Cuantificar el contenido de Avoparcina en premezclas alimenticias comerciales mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
- 6.0 Realizar la validación del método de cuantificación de Avoparcina en premezclas alimenticias.

CAPITULO 1

1.1 GENERALIDADES

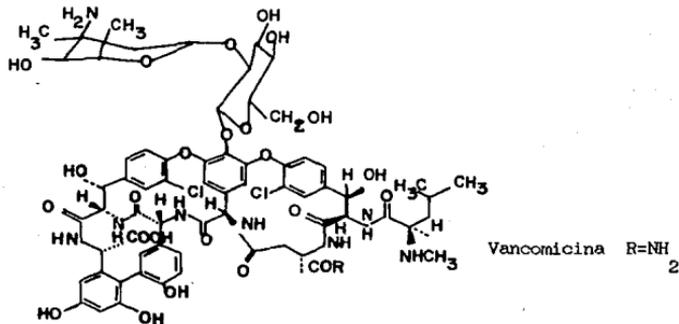
La Avoparcina es un antibiótico glucopéptido producido mediante fermentación por una cepa de *Streptomyces candidus*, bacterias que tienen actividad sobre una serie de organismos Gram (+). La Avoparcina es un miembro de la familia glicopeptídica de antibióticos como Vancomicina, Actinoidina, Ristocetina y Ristomicina (15).

El descubrimiento de la estructura de avoparcina, fue realizado por Mc.Gahren, Martin, Ellestad y Holker, de la División de Investigación de la Compañía Cyanamid en 1979, mediante un sistema de incubación in vitro del líquido del rumen en condiciones anaeróbicas en el que se observaron cambios en la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta; así mismo obtuvieron datos que muestran que la estructura para y son idénticas excepto por la ausencia de la mitad de un azúcar (ristosamina). Estudios posteriores in vitro e in vivo han demostrado que la avoparcina disminuye la relación acetato:propionato en el rumen y mejora la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia en vacunos alimentados en corrales de engorda y en vacunos y ovinos en pastoreo (24).

Otro antibiótico glucopéptido como es la vancomicina, se descubrió en 1969, y no fue sino 20 años después en Cambridge, cuando Williams et al. (15), identificaron su estructura mediante estudios de cristalografía de rayos X junto con estudios de resonancia protónica y de carbono -13 efectuados a una vancomicina obtenida por ellos.

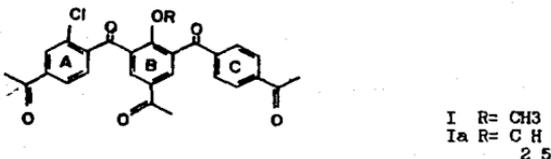
Los fragmentos obtenidos por degradación de la aglicona de Vancomicina como son el eter de trifenilo y las mitades de los bifenilos, apoyaron la estructura propuesta.

FIG.1. ESTRUCTURA DE VANCOMICINA.



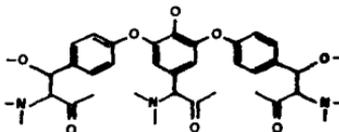
Por lo que respecta a la avoparcina, Mc Gahren, et al (15), reportaron su estructura (pág. 10) después de realizar degradaciones alcalinas de la misma y de su aglicona, obteniendo los fragmentos I y Ia (Fig. 2), mismos que corresponden al éter de diclorotrifenilo aislado por Williams a partir de la vancomicina .

FIG. 2 Fragmentos I y Ia.



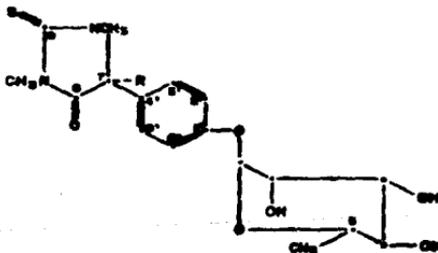
Después de estos fragmentos prosiguieron la degradación alcalina obteniendo diferentes fragmentos, derivados bifenílicos y trifenílicos éteres con diferentes sustituyentes que permitieron asignar un origen común para todos los grupos. (15)

FIGURA 3 : ESTRUCTURA COMUN PARA LOS ANTIBIOTICOS GLUCOPEPTIDOS .



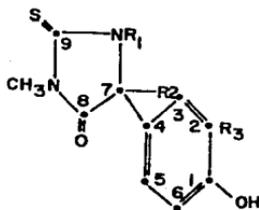
Utilizaron el método de Edman (15), en la avoparcina y obtuvieron los fragmentos VIII, IX, X, XI, XII y XIII siguientes:

FIGURA 4 : FRAGMENTOS VIII, IX.



VIII R = H
IX R = OH

FIG. 5 Fragmentos X,XI,XII y XIII



X	R1=CH3, R2=H, R3=H
XI	R1=CH3, R2=OH, R3=H
XII	R1= H, R2= H, R3= Cl
XIII	R = H, R = H, R = H
	1 2 3

Los fragmentos XII y XIII se obtuvieron en una proporción de 4:1 , lo cual significó que el isómero mayoritario beta contiene hidroxifenilglicina clorada a diferencia del isómero alfa que tiene hidroxifenilglicina .

En los pasos que llevaron a cabo para determinar los grupos fenólicos libres de avoparcina descubrieron que el grupo fenólico de la clorofenilglicina se encuentra libre; además supusieron que el componente menor de la mezcla de aglicona mencionada, contiene p-hidroxifenilglicina en lugar del correspondiente cloroaminoácido del componente mayoritario.

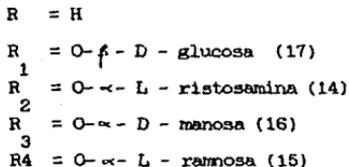
Por otra parte , también se obtuvieron resultados relativos a los carbohidratos que forman parte de la estructura de avoparcina , los cuales son: glucosa, manosa y ramosa; precisando además que la glucosa es el único azúcar no terminal que está unido glicosidicamente a otro azúcar a través del grupo hidroxilo del carbono 2.

Al precisar la secuencia de péptidos en la cadena principal , así como los enlaces entre los azúcares constitutivos , se asignó la estructura total de α y β avoparcina, misma que resultó muy similar a la reportada para vancomicina, lo cual sugiere un mismo origen biogénico (15).

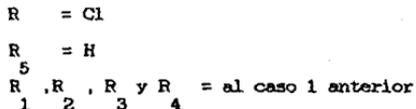
1.3 COMPONENTES MENORES DE AVOPARCINA

Siendo el producto comercial "Avoparcina" un complejo de antibióticos compuesto mayoritariamente por Beta y alfa avoparcina, se han determinado las estructuras para otros componentes minoritarios como las determinadas por Mc. Gahren et al. (15).

1.- Deristosaminil - α - avoparcina:



2.- Deristosaminil - β - avoparcina:



3.- D-Galactosil- β - Avoparcina:

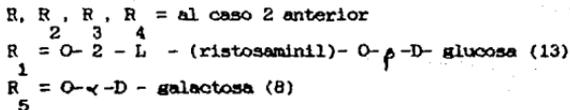
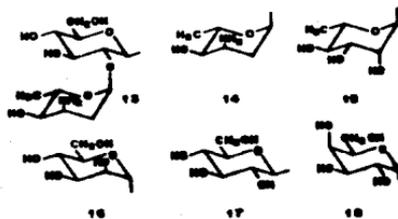
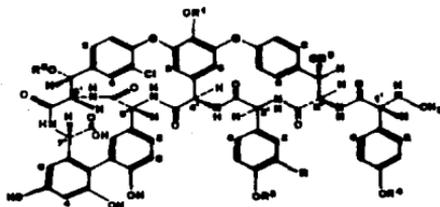


FIGURA 7 : . ESTRUCTURA DE COMPONENTES MENORES DE AVOPARCINA.



1.4 PROPIEDADES DE LA AVOPARCINA

La Avoparcina es un antibiótico glucopéptido que tiene actividad antibacterial sobre bacterias Gram (+) y cuya fórmula condensada es:

Avoparcina α	C	H	N	Cl
	89	101	9	
Avoparcina β	C	H	N	Cl
	89	100	9	2

Peso molecular aproximado Avoparcina α = 1330

Peso molecular aproximado Avoparcina β = 1364

Pertenece al grupo : glucopéptido.

Producido por : S. candidus NRRL 3218.

Sinónimos de Avoparcina: CL 81 588

LL AV-290

C-254

CL 221,006

Y Avotan que es el nombre comercial más conocido en Europa.

Propiedades físicas:

Polvo blanco amorfo, higroscópico, punto de fusión no bien definido.

Soluble en agua, dimetilformamida, dimetilsiloxano y moderadamente soluble en metanol.

Uso: Antibacterial y promotor de crecimiento.

El compuesto se comercializa como antibiótico estimulante del crecimiento en rumiantes en una premezcla al 5%. DL50 rata, ratón, pollo = mayor de 10 000 mg/Kg oral (24).

ESTRUCTURA: (ver pag 14).

1.5 EPIMERIZACION Y ESTEREOQUIMICA DE AVOPARCINA

G. A. Ellestad, W. Swenson y W.J. Mc Gahren de la División de Investigación de los laboratorios Cyanamid publicaron en 1983 (19) sus estudios sobre epimerización y estereoquímica de Avoparcina, sus observaciones indican que a pH menores de 4, existe un incremento en la cantidad de compuestos deristosaminil presentes, así como también se obtienen vancomicina modificada (CDF-I) y manosil aglicona de avoparcina. En lo que respecta a pH básico, la avoparcina comienza a perder amoniaco, supusieron que esto ocurre debido a una ristosamina bencílica. Por consiguiente el rango de pH de máxima estabilidad se encuentra entre 4-8, pero disminuye la actividad antibacteriana con el tiempo (19).

Quando la β avoparcina es calentada a 75 °C a pH 7.0 por 18 horas, el resultado es un equilibrio constituido de 30% de β - avoparcina y 70% de un diastereómero Epi- β -avoparcina (14); en otras palabras para cada componente de avoparcina está su correspondiente Epi-avoparcina.

A continuación se presentan datos obtenidos por Mc. Gahren et al (19), sobre la epimerización llevada a cabo en la Avoparcina, mediante hidrólisis y determinación por CLAR.

TABLA I

Resultados de la epimerización de los componentes de Avoparcina.

Componente	UV (area %)	TR
α - Avoparcina	2.3:1	1.61
β - Avoparcina	2.9:1	1.41
Galactosil- α - Avopar.	2.0:1	1.51
Manosil aglicona de Avoparcina	2.1:1	1.31
Manosil aglicona de Avoparcina	2.3:1	1.51
α -CDP-I avoparcina	1.3:1	1.41
α -CDP-I avoparcina	1.5:1	1.41
ϵ -Avoparcina	0.9:1	0.91
Deristosaminil - - avoparcina	0.9:1	0.91

En el caso de los primeros siete componentes, cada uno tiene dependencia del azúcar "manosa", presentando tiempos de retención similares. La ausencia de manosa en E-avoparcina cambió marcadamente ambos resultados (19).

Aparentemente es necesaria la presencia del azúcar manosa para la extra estabilidad del diasteroómero bajo condiciones de equilibrio.

Mc. Gahren et al ,determinaron que la deristosaminil E-avoparcina es impureza de la β -avoparcina. Para poder establecer la rotación específica de la avoparcina, trabajaron con aminoácidos N-terminales de la avoparcina y de acuerdo con la reacción de Edman (19) usando condiciones estándar , obtuvieron que la tiohidantoína

resultante fue ópticamente inactiva. Apoyándose en el método de Lomakina et al. en algunos casos recobraron cristales de N metil-p-hidroxifenilglicina de β -avoparcina que tiene rotación específica negativa en agua . Consecuentemente la configuración del aminoácido terminal en Avoparcina es R como también en Vancomicina y Ristocetina que poseen una estructura similar. La avoparcina fue epimerizada y el mismo procedimiento fue aplicado al aislamiento del aminoácido terminal del complejo epimerizado.

De este compuesto se aislaron también la p- hidroxifenilglicina de -avoparcina y m-cloro-p- hidroxifenilglicina de β -avoparcina. Bajo estas condiciones el aislamiento de la N-metil-p-hidroxifenilglicina exhibió una rotación específica positiva en agua .

De esta forma Gahren et al. confirmaron su postulado sobre la epimerización : " Estos tipos de compuestos cuando están completamente protonados no son epimerizados".

Convert et al., basados en los datos obtenidos por sus estudios en RMN protónica y en las interacciones de los péptidos de antibióticos de esta familia , postularon la teoría de un enlace hidrofóbico en agrupamiento al péptido del grupo carboxilato.

En su punto de vista la reacción inicial es entre el grupo N-metilo del sustituyente grupo amino del antibiótico protonado y el anión carboxilato formándose una bolsa con paredes hidrofóbicas. El resto del antibiótico proporciona consecuentemente interacciones de enlace con otras porciones del péptido, dándose así un aumento de la

especificidad del antibiótico. (19) Nombraron a las etapas:

- a) Interacción carga-carga.
- b) Cambio conformacional.
- c) Formación de la bolsa hidrofóbica.
- d) Complementaridad de sitios enlazantes. (enzima-sustrato).

Finalmente Mc Gahren et al. concluyeron que la E-avoparcina tiene muy poca actividad como antibiótico sobre organismos Gram (+), consecuentemente el péptido Ac-D-Ala no debe ser enlazado por un epímero de avoparcina (19).

Aunque esto continúa en estudio en la Universidad de Yale, la Epiavoparcina es un diastereómero que se presenta 1 a 2 veces menos activo que ξ - Avoparcina contra organismos Gram positivos .

CAPITULO 2

2.1 FUNDAMENTOS DE TECNICAS ANALITICAS INVOLUCRADAS

2.2 .- ESPECTRO ELECTROMAGNETICO

Las moléculas se asocian con varios tipos de movimiento. Cada uno de estos tipos de movimiento se cuantiza (1). La molécula puede existir sólo en estados específicos que corresponden a estados de energía discreta y cada estado se caracteriza por uno o más números cuánticos. La diferencia de energía entre dos estados de esta índole, E , se relaciona con la frecuencia de la luz, ν , por la constante de Planck, h :

$$E = h\nu$$

La espectroscopía es una técnica que nos permite medir la cantidad de radiación que absorbe una sustancia a diferentes longitudes de onda. La diferencia de energía entre los distintos estados cuánticos depende del tipo de movimiento implicado. En consecuencia la longitud de onda de la luz requerida para producir una transición difiere para cada uno de los tipos de movimiento, es decir, para cada uno, corresponde cierta absorción de luz en una región diferente del espectro electromagnético. Cada uno de estos tipos de radiación, tiene una cantidad de energía diferente. La clasificación de la radiación de acuerdo a su energía, nos da el espectro electromagnético. La clásica descripción de radiación electromagnética nos dice que ésta es continua y tiene una onda

sinusoidal móvil; la onda móvil de la radiación electromagnética puede ser descrita en términos de Longitud de Onda y Frecuencia.

La longitud de onda (λ) de la radiación es :

λ = Longitud de Onda = La distancia entre dos sucesivos máximos o mínimos de la onda móvil.

ν = Frecuencia = El número de ciclos que pasan por un punto dado en el segundo.

La longitud de onda y la frecuencia están relacionados de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$\lambda = \frac{C}{\nu} \cdot \lambda \nu = C$$

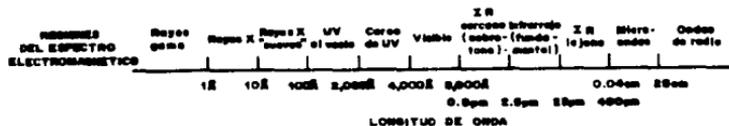
C = velocidad de la luz (3.0×10^{10} cm/seg)

ν = Frecuencia en Hz (hertz, ciclos/seg)

λ = longitud de onda, en cm

$\hat{\nu}$ = Número de onda cm⁻¹ = $10 / \text{longitud de onda (14)}$

El espectro electromagnético está dividido de acuerdo a la energía de la radiación en varias regiones (4):



Rayos Gamma (γ)

La región de los rayos comprende las radiaciones producidas por fenómenos nucleares y la información que nos proporciona es básicamente sobre la estructura de núcleos atómicos y las transiciones producidas en esta región son radiaciones de frecuencias muy elevadas (10^{10} a 10^6 cm).

Rayos X

Los rayos X son las radiaciones de longitud de onda más corta que se atribuyen a cambios reversibles en la energía de los sistemas atómicos. En esta región los saltos de electrones internos de los orbitales (K, L) del átomo producen ondas en esta frecuencia, y su estudio nos permite entender las estructuras internas del mismo o sea de los electrones que no participan en los enlaces químicos. Abarcan la región de (10^8 a 10^6 cm).

Ultravioleta

La región del Ultravioleta comprende radiaciones producidas por saltos de electrones de valencia y permite estudiar el comportamiento de electrones que participan en los enlaces químicos y por lo tanto de las estructuras moleculares (10^6 a 3.8×10^5 cm).

Visible

La región visible corresponde a los mismos fenómenos físicos que en la región Ultravioleta, la diferencia estriba en que el ojo humano está

capacitado para percibir las ondas en esta parte del espectro (3.8×10^{-5} a 7.8×10^{-5} cm).

Infrarrojo

La siguiente región corresponde a la del infrarrojo, donde las radiaciones tienen mucho menor energía que en la región ultravioleta y son producidas por variaciones en los niveles rotacionales y vibracionales de las moléculas. Esta es quizás la región más importante del espectro para el estudio de estructuras moleculares (7.8×10^{-5} a 3×10^{-2} cm).

Microondas

La región de microondas está relacionada con rotaciones moleculares, son vibraciones de átomos en redes cristalinas. Abarca de (3×10^{-2} a 10^2 cm).

Radio

Esta última región corresponde a las radio ondas que son las de menor energía y con las cuales se han desarrollado métodos muy importantes como son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Resonancia Paramagnético Electrónica (RPE). Ondas de esta energía pueden ser absorbidas por núcleos y electrones en determinadas condiciones, y esta absorción depende de las estructuras electrónicas. (10^2 cm)

En las siguientes secciones, se ampliarán los conceptos así como los efectos moleculares involucrados, en cada técnica analítica como resultado de la interacción energía-materia. (Ref.9).

2.3.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La luz de longitud de onda entre unos 400-750 nm es visible y más allá del extremo violeta del espectro (menor que 400 nm) se encuentra la región ultravioleta. Cuando las moléculas interactúan con energía radiante en la región ultravioleta y visible, la absorción provocada consiste en cambios en estados electrónicos producidos por las transiciones de los electrones en los niveles de energía. Los estados de energía de la molécula reflejan los niveles de energía de sus componentes de vibración , rotación y electrónico. Si la molécula pasa desde uno de sus niveles de energía permitidos hasta otro más bajo, se ha de liberar cierta energía . Esta energía se puede perder como radiación , y entonces se dice que se ha producido emisión de radiación . Si se permite que una molécula encuentre una radiación electromagnética de una frecuencia apropiada, de manera que la energía de la molécula se eleve desde un nivel a otro superior, se dice entonces que ha ocurrido una absorción de radiación. En una transición a un nivel electrónico más alto una molécula puede ir desde cualquiera de varios subniveles correspondientes a diversos estados vibracionales y rotacionales hacia cualquiera de otros subniveles : el resultado son bandas de absorción ultravioleta anchas. Tal espectro puede describirse convenientemente en función de la posición del máximo de la banda (λ_{max}) y de la intensidad de tal absorción (E_{max} Coeficiente de Extinción). Las transiciones electrónicas que se llevan a cabo pueden ser debidas a electrones σ , π o n (electrón no enlazante). Un electrón σ está sujetado firmemente, por lo que se

necesita una buena cantidad de energía para excitarlo: energía correspondiente a luz ultravioleta de onda corta, fuera del rango del espectrómetro usual, luz del ultravioleta lejano. Las excitaciones que aparecen en el espectro ultravioleta (cercano) corresponden principalmente a los electrones n y σ . La espectroscopia ultravioleta se usa para establecer relaciones de grupos funcionales, principalmente la conjugación. Los espectrofotómetros ultravioleta visible de uso común miden la absorción de luz en la región visible y ultravioleta "cercano" es decir, en el rango de 200 - 400 nm en el UV y de 400 a 750 nm en el Visible. Cuando cierta cantidad de luz, se hace llegar a una sustancia, una parte de la luz absorbe de acuerdo a su estructura molecular. Toda sustancia tiene su propio nivel de energía el cual es específico para las moléculas constituyentes. Cuando la luz tiene una energía igual a la diferencia entre la energía del estado basal (E_0) y la del estado excitado (E_1 , E_2 , etc), la sustancia absorbe; los electrones que se encuentran en estado basal son transferidos al estado excitado, entonces esa energía corresponde a una longitud de onda. Los electrones excitados pierden energía por el proceso de radiación calorífica y regresan a su estado basal. Un espectro de absorción se obtiene a partir de diferentes luces monocromáticas al chocar con una sustancia continuamente midiéndose el grado de absorción. Las longitudes de onda se grafican sobre la abscisa y los grados de absorción (transmitancia o absorbancia sobre la ordenada) (14).

2.3.2.- INSTRUMENTACION

En un espectrofotómetro UV-VIS, generalmente se emplea una lámpara de deuterio para la región UV y una de tungsteno o Yoduro de Tungsteno para el visible, un monocromador que se clasifica de acuerdo al tipo de dispersador utilizado, de ahí tenemos monocromadores de prisma y de rejilla, la celda pudiendo ser de vidrio o sílica fundida y un detector que convierte la señal óptica en señal eléctrica. Dentro de los tipos de fotodetectores existen muchos tales como fotoceldas de silicón, fototubos y fotomultiplicadores.

2.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La región del infrarrojo es una determinada zona de la radiación electromagnética situada "más allá de la parte roja de la región visible". Como toda radiación electromagnética, la radiación infrarroja es un movimiento ondulatorio, formado por un campo eléctrico oscilante perpendicular a la dirección de propagación, y un campo magnético oscilante con la misma frecuencia y perpendicular al campo eléctrico. Por lo tanto, la radiación infrarroja como cualquier radiación electromagnética, puede caracterizarse por la frecuencia de oscilación (ν) y por la longitud de onda (λ). La frecuencia de la radiación infrarroja alcanza números grandes, y para caracterizar la radiación infrarroja se utiliza normalmente el número de onda. Aunque no existen límites precisos entre las diferentes regiones de la radiación electromagnética la región del infrarrojo suele considerarse como la zona comprendida entre las longitudes de onda de 0.75 - 1000 nm que corresponde a los números de onda de $13\ 333 - 10^1$ cm⁻¹.

A su vez, la región del infrarrojo está subdividida en:

Infrarrojo cercano: suele considerarse entre 0.78-3.0 nm. ($13\ 333 - 4000$ cm⁻¹).

Infrarrojo fundamental: Comprendido entre 3.0-30nm ($4000 - 400$ cm⁻¹).

Infrarrojo lejano: Entre 30 - 300 nm ($400 - 30$ cm⁻¹).

Interacción de la energía con las moléculas.

La energía infrarroja provoca movimientos de torsión, flexión, rotación y vibración de los átomos de una molécula, ya que algunas

porciones de la radiación incidente se absorben a determinadas longitudes de onda. La multiplicidad de las vibraciones que ocurren en forma simultánea, producen un espectro de absorción altamente complejo que depende de las características de los grupos funcionales constitutivos de la molécula, y de la configuración total de los átomos. Para que una molécula absorba radiación en la región infrarroja debe vibrar en tal forma que haya un desplazamiento de su centro eléctrico o sea debe haber un cambio en su " momento dipolo", provocado por una fuente de radiación que pasa por un sistema dispersivo hacia un detector (9).

2.4.1 .- INSTRUMENTACION

Un espectrofotómetro de luz infrarroja está constituido principalmente de los siguientes componentes: la fuente de radiación que debe emitir una continua y alta energía a través de la región infrarroja, clasificándose desde un punto de vista físico, dependiendo del espectro que produzcan, dividiéndose en: continuo y discontinuo, el sistema dispersivo donde la luz policromática emitida es convertida en haces monocromáticos y el detector que convierten la radiación incidente en una señal eléctrica proporcional. Dicha radiación es una señal alterna que es amplificada y medida. Los detectores más empleados son: Bolómetro ,Detector Neumático de Galay y Termopar.

El detector más ampliamente usado es el termopar que consiste en un trozo de metal noble ennegrecido que actúa como un verdadero absorbente de la radiación , la hoja se solda a los contactos eléctricos y a alambres muy finos de dos metales de potencia

termoeléctrica muy diferentes por lo cual se mide una diferencia de voltaje. La unidad está encerrada en una caja de vacío para reducir al mínimo las pérdidas por calor por medio de una ventana transparente al infrarrojo. (KBr por ejemplo). Ref. (10).

2.5 .- ESPECTROMETRIA DE MASAS

Es una técnica analítica que se utiliza para identificación y determinación de estructuras de compuestos orgánicos, en base a las siguientes funciones:

- 1.- Producir un haz de iones a partir de la sustancia neutra.
- 2.- Separar estos iones de acuerdo con su relación masa/carga.
(m/z).
- 3.- Registrar la abundancia relativa de cada ión separado.

Producción de iones.- La forma más común de producirlos consiste en el bombardeo de moléculas neutras en estado de vapor a muy baja presión, con un haz de electrones de alta energía. Acorde con el principio Frank-condon (13), la ionización por impacto ocurre desde el "o"-ésimo nivel vibracional molecular, como resultado de la interacción de los componentes eléctricos y magnéticos del electrón ionizante con los correspondientes Electrones moleculares accesibles; De esta manera es posible producir iones moleculares con diferente contenido de Energía Interna y, por ende, con diferencia en su Reactividad.



Separación de Iones:

La baja presión es un requisito indispensable para reducir al mínimo el número de colisiones entre iones y moléculas no ionizados. Esta clase de colisiones conducen a reacciones que producen nuevos iones con una razón m/z mayor que el compuesto inicial. El radio de la trayectoria que sigue un ión de masa m en un campo magnético es

proporcional a su carga z y al potencial de aceleración (V). La energía potencial del ion acelerado (zV) es igual a su energía cinética.

$$eV = 1/2 mv^2.$$

En un campo magnético de fuerza H , el ion experimenta una fuerza centripeta HeV , que se equilibra por medio de la fuerza centrífuga $\frac{mv^2}{r}$ en donde v es la velocidad del ion y r es el radio de la trayectoria circular que recorre el mismo.

$$HeV = \frac{mv^2}{r} \quad r = mv/eH$$

A medida que un conjunto de iones de diferentes masas penetra en la región del campo magnético (H) cada ion sigue una trayectoria circular

descrita por : $m/e = H^2 r^2 / 2v$

Los iones que tienen un valor mayor de m/z siguen una trayectoria con un radio mayor, en tanto que los que tienen un valor menor de m/z seguirán la trayectoria de menor radio (6).

Detección de iones.-El haz iónico procedente del analizador magnético choca con una superficie electrónica sensibilizada que inmediatamente emite electrones secundarios. Estos electrones se aceleran a otro electrodo, con la consecuente emisión de electrones secundarios. Este proceso se repite durante varias etapas hasta que los electrones se recogen en el electrodo final y se mide la corriente resultante, se logra obtener así la amplificación de 10^7 ; por tanto se trata de una forma muy sensible de detección. (Rápida).

Los iones registrados en un espectro de masas son los siguientes:

- a) Ion molecular.- Corresponde al ion de masa mayor en un espectro y se encuentra constituido por los mismos átomos de la molécula neutra, ya que proviene de esta después de haber sido ionizada en la cámara del equipo.
- b) Iones fragmento.- Resultan de procesos de descomposición del ion molecular que ocurren dentro de la cámara de ionización del espectrómetro y que poseen un tiempo de vida media $\approx 10^{-6}$ s.
- c) Iones isotópicos.- Son generalmente iones minoritarios que acompañan a los iones anteriores y corresponden en masa y abundancia a la distribución natural de isotopos pesados.
- d) Iones multiple-cargados.- Son iones fragmento o moleculares que resultan de multiples ionizaciones en la cámara de ionización y cuando provienen de iones de masa impar, aparecen en valores m/z fraccionarios.
- e) Iones de reagrupamiento.- Son iones que resultan de rearrreglos unimoleculares que corresponden a reacciones de descomposición características, cuya aparición, evidencia la presencia de funcionalidades específicas en una muestra.
- f) Iones metaestables.- Son aquellos iones que resultan de las descomposiciones unimoleculares que ocurren fuera de la cámara de ionización y se alcanzan a detectar como señales anchas, difusas, de baja abundancia y dispuestas a valores de m/z no integrales. Su existencia evidencia procesos de reagrupamiento y/o fracturas específicas (6).

2.6 .- CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica que permite separar , aislar, identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos , la muestra es distribuida entre dos fases , una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria.

El principio común a todas las técnicas cromatográficas es un fluido (fase móvil) circula a través de una fase estacionaria (sólida o líquida); cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, en una secuencia de equilibrios de desorción o adsorción constantemente desplazados, por lo que cada uno se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema. Las sustancias han de ser solubles en la fase móvil , y , según sea el tipo de interacción con la fase estacionaria, se puede clasificar el proceso de la siguiente manera:

1.- For la naturaleza de las dos fases:

Cromatografía líquido-sólido	CLS.
Cromatografía líquido-Líquido	CLL.
Cromatografía gas-sólido	CGS.
Cromatografía gas-líquido	CGL.

2.- Por la naturaleza del fenómeno:

Cromatografía de Adsorción.

Cromatografía de Reparto.

Cromatografía de Intercambio Iónico.

Cromatografía de Permeación sobre Gel.

3.- Por la tecnología utilizada:

Cromatografía en columna.

Cromatografía en papel.

Cromatografía en capa fina.

4.- Por el modo de Separación:

Cromatografía por elución.

Cromatografía por desplazamiento.

Cromatografía por Análisis Frontal.

La eficacia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente utilizado, la fase estacionaria empleada, la velocidad y el flujo del disolvente.

CAPITULO 3 . DESARROLLO EXPERIMENTAL.

3.1 Material y Métodos.- La investigación se llevó a cabo utilizando premezclas comerciales de Avoparcina de la Compañía Cyanamid de México , como se describe a continuación:

3.1.1 Obtención y Purificación del Estándar.

Se pesaron 10g de la premezcla alimenticia de Avoparcina en balanza analítica. Se adicionaron 150 ml de agua destilada, homogeneizando la solución en un baño de ultrasonido durante 15 minutos y se filtró con papel Whatman No 2 . El extracto sin purificar se evaporó en una estufa, a 8 libras de vacío y con una temperatura inferior a 50 C, durante 24 horas. Se prosiguió a la purificación e identificación utilizando para ello, cromatografía en capa fina preliminar y preparativa.

Identificación : Se utilizó el sistema establecido por Mc. Gahren et al. (18), de los valores de R_fs obtenidos, se seleccionaron las manchas que se acercaron a los valores reportados por ellos, y proseguimos a la purificación utilizando cromatoplaques preparativas de sílica gel fluorescente (Merck 254 de aprox. 2 mm de espesor), aplicamos en banda con pipetas de 20 µl a lo largo de la placa cromatográfica, los componentes se eluyeron con un sistema de aminoácidos modificado (Butanol : Acetona : Dietilamina : Agua) (50:20:6:1). El exceso de disolvente de las placas se evaporó a 50 C, visualizamos las bandas de corrimiento con luz ultravioleta, de aquí se seleccionaron las bandas que se utilizarán raspandolas y recolectando en recipientes adecuados (18).

La Avoparcina e isómeros se extrajerón del producto recuperado con solución hidroalcohólica, posteriormente eliminamos el exceso de sílice por centrifugación y microfiltración (0.22 μm), la solución filtrada se evaporó en estufa a vacío a baja temperatura hasta obtener el extracto purificado, el cual se sometió a diversas pruebas de identificación.

3.1.2 IDENTIFICACION ESPECTROSCOPICA

Las determinaciones espectroscópicas se realizaron a la premezcla alimenticia y al extracto purificado, solo para fines comparativos.

3.1.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS.

Se pesaron aproximadamente 0.15g de la Avoparcina purificada disolviéndola en 10 ml de agua destilada. La solución resultante se colocó en una celda de cuarzo de 1 cm de espesor, se realizó el barrido desde una longitud de onda de 200nm hasta 300nm en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 554.

El espectro de absorción se muestra en la figura 10.

3.1.4 ESPECTROSCOPIA IR.

A una parte de la premezcla alimenticia y Avoparcina purificada se les adicionaron, en un mortero de ágata, 10 partes de KBr; la mezcla se pulverizó y homogeneizó para posteriormente obtener una pastilla integrada al portamuestras, la pastilla que se obtuvo se

colocó en la rejilla del paso de luz infrarroja y se ajustó el valor de transmitancia a 60%, utilizando un compensador de aire (celda de referencia). La preparación de las muestras de los diferentes extractos se realizó de la misma forma. Los espectros se trazaron en un espectrofotómetro de I.R. Perkin-Elmer, modelo 1320, con las siguientes condiciones:

Expansión de la carta= 0.5 cm

Tiempo de análisis: 3 minutos

Ganancia del 10% Transmitancia

Paso de luz medio (70-120)

En las figuras 11 y 12 se muestran los espectros obtenidos para las muestras analizadas.

3.2 ESPECTROMETRIA DE MASAS.

El espectro de Masas de Avoparcina purificada fue obtenido en un espectrómetro de Masas cuadrupolar, marca Hewlett-Packard, modelo 5988, utilizando el sistema de introducción directa, 70 cv en la cámara de ionización y 270 ° C de temperatura.

El calentamiento de la muestra se realizó utilizando programación valística con una frecuencia de adquisición de 3 segundos, de 25 ° C a 270 ° C.

El Perfil Iónico Total y los espectros de masas obtenidos se presentan en las figuras 13, 14 y 15.

3.3 TECNICAS DE SEPARACION Y CUANTIFICACION.

3.3.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Como ya se mencionó anteriormente (pág. 37) , la separación del ingrediente activo (Avoparcina), de la Premezcla se llevó a cabo mediante Cromatografía en Capa Fina, utilizando placas de sílica gel tipo GF 254 y aplicando con una pipeta de 20 μ l el extracto acuoso obtenido sobre una línea base . Para la identificación de voparcina e Isómeros se eluyo con el sistema establecido por Mc. Gahren et al. (18) marcando el frente del solvente y revelando las distancias de las manchas con respecto a la línea base mediante luz ultravioleta, los resultados obtenidos se muestran en la figura No. 16.

3.3.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Para la cuantificación del contenido de Avoparcina en las premezclas alimenticias, fue necesario conocer la pureza del estándar obtenido, determinándose por estandarización interna, tomando como estándar interno la Vancomicin (Grado farmacéutico, libre de excipientes, 100 % según marbete).

Así mismo, para verificar el uso de este antibiótico como estándar interno, se realizó un estudio complementario sobre proporcionalidad de Avoparcina contra Vancomicina consistiendo en inyectar a las mismas condiciones cromatográficas 4 diferentes concentraciones de ambos antibióticos, obteniendo así su area bajo la curva a cada concentración y graficandolas, se determinó la pendiente para cada curva de los antibióticos, los valores obtenidos se reportan en la figura No. 20.

Conocida la pureza del estándar se realizó el método de cuantificación de Avoparcina en premezclas alimenticias por estandarización externa.

- Cuantificación por Estandarización Interna.

Se disolvieron conjuntamente 60 mg. de Vancomicina (estandar interno) con 50 mg. de Avoparcina purificada (estándar secundario), en 25 ml. de fase móvil. Se agitaron en baño de ultrasonido durante 15 minutos a 50 ° C microfiltrándose con filtros de 0.22 μ m. e inyectándose en un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard 1090 con detector de longitud de onda fija a las condiciones cromatográficas conocidas (Ref.20). El perfil cromatográfico obtenido se presenta en la figura 17.

- Cuantificación por Estandarización Externa.

Se pesaron 60 mg del estándar secundario en un matraz erlenmeyer con tapón esmerilado de 50 ml, agregándole 25 ml de agua grado HPLC con pipeta volumétrica, agitando la solución en baño de ultrasonido y manteniendo la temperatura a 50 ° C. Se filtró en papel Whatman No 2 microfiltrándose a 0.22 μ m, se recibió la solución en frascos de 10 ml con tapón de rosca. De esta solución se inyectaron 5 μ l. a un cromatógrafo de líquidos H.P. 1090, con integrador H.P. 3392A, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna= C18, 5 micras, spherical.

Fase Móvil= Metanol: Agua: Formiato de Amonio 10% (20:80:1).

Flujo de fase móvil= 0.7 ml/min.

Longitud de onda de máxima absorción= 230nm

Temperatura de la columna= 50 ° C

Volúmen de inyección= 5 μ l.

Presión máxima= 73 psi

Velocidad de la carta= 0.4 cm/min.

Presentando el perfil cromatográfico en la fig.19.

La cuantificación de la Avoparcina en las premezclas alimenticias se realizó con el método de análisis por estandarización externa , siguiendo el mismo tratamiento que el estándar secundario (pág. 43).

Preparación de la muestra:

A 1.6 g de la premezcla se le adicionaron 25 ml de agua HPLC colocándose en baño de ultrasonido durante 15 minutos. Se filtró posteriormente la muestra con papel Whatman No 4 y microfiltrándose con filtros de 0.22 μ m e inyectándose bajo las mismas condiciones cromatográficas anteriormente mencionadas.

3.4 VALIDACION DEL METODO DE CUANTIFICACION DE AVOPARCINA EN LAS PREMEZCLAS ALIMENTICIAS POR ESTANDARIZACION EXTERNA.

Para realizar la validación del método analítico se cubrieron los parámetros mínimos en control de calidad como son:

- 1.- Linealidad del método.
- 2.- Exactitud del método.
- 3.- Precisión del método.
- 4.- Reproducibilidad.
- 5.- Límite de detección.
- 6.- Especificidad.

3.4.1 LINEARIDAD DEL METODO.

Para obtener la linealidad del método se realizaron análisis duplicados de diferentes soluciones de la sustancia de interés, conteniendo 50, 80, 100, 120 y 150 % de los 80 mg. esperados y representando gráficamente en la curva cantidad adicionada vs. cantidad recuperada, la cual se muestra en la figura 19, calculando posteriormente su media (\bar{X}), desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER), pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r), error estándar de la regresión (s_y/x) y la sensibilidad (Y'), pruebas de hipótesis para intercepción, pendiente y coeficiente de correlación.

3.4.2 PRECISION DEL METODO.

Se inyectaron 6 soluciones de 80 mg. de Avoparcina purificada en un cromatógrafo de líquidos, obteniendo sus tiempos de retención y sus áreas correspondientes, calculando después X, DE, DER.

3.4.3 EXACTITUD DEL METODO.

Se analizaron, también por cromatografía de líquidos, 6 muestras preparadas al 80, 100 y 120%, de la cantidad esperada a determinar en la premezcla alimenticia, calculándose su promedio de determinación DE, DER e intervalo de confianza al 95%.

3.4.4. REPRODUCIBILIDAD.

Se llevó a cabo mediante 6 inyecciones de la muestra hechas 2 diferentes días y por 2 analistas. La preparación de la muestra y del estándar se llevaron a cabo de la misma forma antes mencionada, calculando posteriormente X, DE y DER.

3.4.5. LIMITE DE DETECCION.

Se prepararon soluciones conteniendo cantidades exactas de 120 mg. de la Avoparcina purificada, disolviéndolas en 25 ml de agua grado HPLC. De esta solución se realizaron diluciones de 1, 2, 3, 5 y 7 ml llevándose a un volumen total de 10 ml cada una. y determinándose la cantidad mínima detectable.

3.4.6. ESPECIFICIDAD.

Se sometieron muestras de Avoparcina, con temperatura de 70 °C, durante 7 y 14 días. Otras se dejaron con H₂O durante 7 y 14 días, al término de ese tiempo se prepararon soluciones al 100% del ingrediente activo es decir la Avoparcina y se inyectó cada una al cromatógrafo de líquidos para tratar de verificar si había producto de degradación o de alguna sustancia extraña, que interfirieran con el método.

Los valores obtenidos de la validación del método analítico para Avoparcina se reportan en la tabla 11.

CAPITULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1.- ESPECTROSCOPIA AL ULTRAVIOLETA.

Como se puede observar en el espectro de absorción de luz ultravioleta Fig. 10. se observan 3 picos de absorción, marcándose claramente un pico de máxima absorción a una longitud de onda de 239 nm (valor que se aproxima al reportado en la literatura Ref. 23). Necesario para la cuantificación por CLAR con detector de UV.

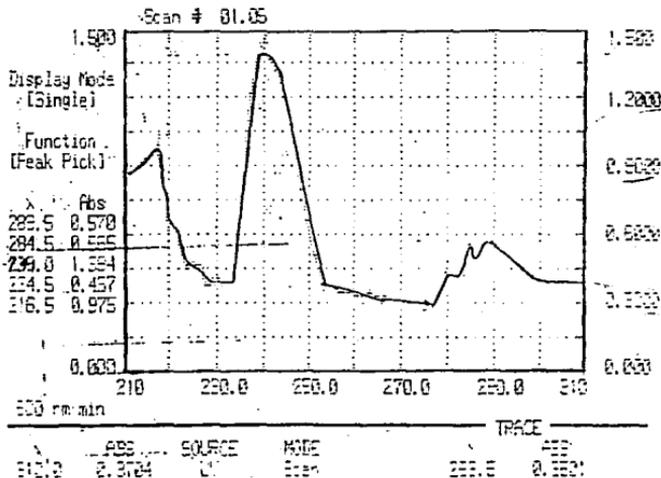


Figura 10. ESPECTRO DE LUZ ULTRAVIOLETA PARA AVOPARCINA PURA.

4.2 INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE INFRARROJO.

Espectroscópicamente en la muestra original de la premezcla alimenticia, no se observan adecuadamente los grupos funcionales que conforman la estructura de la Avoparcina debido a las interferencias que ocasionan el resto de los componentes de ésta. Fig. 11.

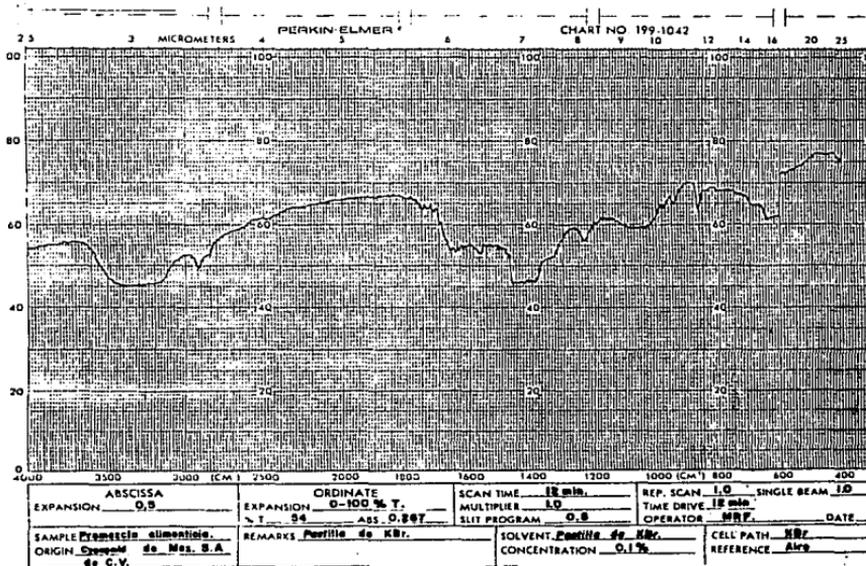


FIGURA 11. ESPECTRO DE INFRARROJO DE LA PREMEZCLA ALIMENTICIA.

Para la muestra de Avoparcina purificada (Fig. 12), destacan en el espectro dos tipos diferentes de vibraciones de estiramiento longitudinal C-H entre 2760 y 2960 cm^{-1} que son debidos a la presencia de los diferentes grupos CH_3 , CH_2 y CH que posee la molécula.

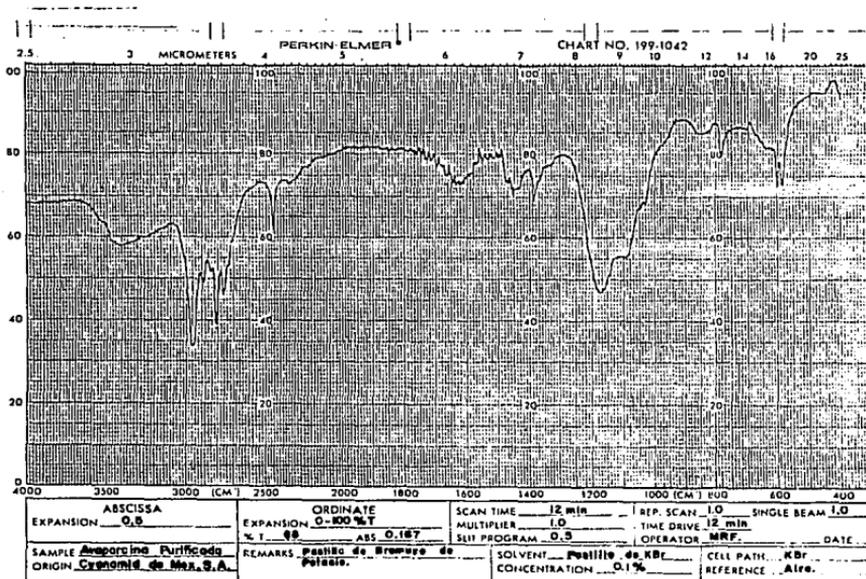


FIGURA 12. EXTRACTO PURIFICADO DE AVOPARCINA.

La banda que aparece en la región comprendida de 2450 - 2490 cm^{-1} (Ref. 9), corresponde al estiramiento longitudinal simétrico de un grupo CH, difícil de asignar en la estructura.

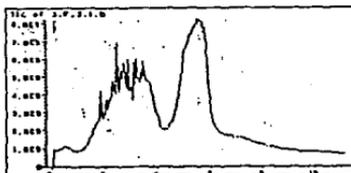
La vibración de alargamiento longitudinal O-H aparece como una banda ancha centrada en 3420 - 3400 cm^{-1} , correspondiente a los múltiples grupos O-H glucosídicos y fenólicos que conforman a la molécula (Ref. 9). Es notorio observar además las vibraciones de alargamiento longitudinal C-O en 1770 cm^{-1} característico de los grupos glucosídicos que posee la Avoparcina (Ref. 9), que son debidas a carbonilo de amida en 1620 cm^{-1} , las bandas del alargamiento C=C aromático asimétricos y simétricos en 1600 y 1500 cm^{-1} , así como las vibraciones de deformación de CH₂ y CH₃ de 1450 y 1360 cm^{-1} se observa baja intensidad en su coeficiente de extinción.

Sólamente destacan las vibraciones de deformación C-H aromático fuera del plano de los anillos aromáticos en 780 cm^{-1} , 600 y 580 cm^{-1} . No es posible utilizar éstas últimas bandas para evidenciar el tipo de sustitución en los anillos aromáticos (14), debido a que en la molécula existen 7 anillos aromáticos con diferentes sustituciones.

Consecuentemente el espectro de infrarrojo es consistente con el esperado para una estructura del tipo de Avoparcina.

4.3.-INTERPRETACION DE LOS ESPECTROS DE MASAS.

El perfil obtenido para la corriente iónica total (CIT), en función de la temperatura del tubo muestreador indica que la muestra está constituida por dos grupos generales de compuestos con diferentes puntos de fusión se pueden observar en la figura 13.



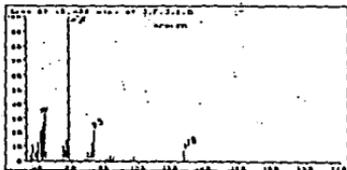
Scan 87 13.488 min of J.F.J.1.0

AVOPARCINA						
m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z
34.00	4	53.00	1	68.00	2	85.00
35.00	11	54.00	2	69.00	5	86.00
36.00	2	55.00	10	70.00	3	87.00
37.00	5	56.00	8	71.00	5	88.00
39.00	8	57.00	15	72.00	12	89.00
39.00	14	58.00	169	73.00	21	90.00
41.00	21	59.00	5	74.00	2	100.00
42.00	22	60.00	2	75.00	1	111.00
43.00	27	61.00	1	76.00	1	113.00
44.00	33	63.00	1	81.00	2	127.00
45.00	7	64.00	1	82.00	2	129.00
46.00	1	65.00	1	83.00	4	140.00
51.00	1	67.00	2	83.00	2	156.00
52.00	1					

FIGURA 13. PERFIL DE CORRIENTE IONICA TOTAL DE AVOPARCINA.

Los espectros de masas obtenidos para los centroides de ambos picos resultan muy similares (Fig. 14 Y 15). Ambos espectros presentan un pico base a $m/z = 58$ característico de las porciones amidicas de la molécula (CH CONH)⁺, las únicas diferencias significativas se observan en el ión a $m/z = 128$ para el scan 87 que posee cloro en su estructura.

Este fragmento corresponde a la posición 3Cl-4-hidroxifenil que caracteriza al isómero beta de la Avoparcina.



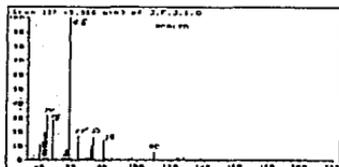
Scan 87 (2.488 min) of J.F.J.1.D
AVOPARCINA

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
34.00	4	53.00	1	58.00	2	85.00	3
35.00	11	54.00	2	59.00	6	95.00	2
36.00	2	55.00	10	70.00	3	96.00	1
37.00	6	56.00	8	71.00	5	97.00	3
39.00	8	57.00	15	72.00	12	98.00	1
39.00	14	58.00	100	73.00	21	99.00	1
41.00	21	59.00	5	74.00	2	100.00	1
42.00	22	60.00	2	76.00	1	111.00	2
43.00	27	61.00	1	76.95	1	113.00	1
44.00	33	63.00	1	81.00	7	127.00	7
45.00	7	64.00	1	82.00	2	129.00	1
46.00	1	65.00	1	83.00	4	148.00	1
51.00	1	67.00	2	83.95	2	155.00	1
52.00	1						

FIGURA 14. ESPECTROMETRIA DE MASAS PARA LA β -AVOPARCINA.

La ausencia de este ión en el espectro correspondiente al scan 137 permite suponer que el primer componente en volatilizarse corresponde al isómero beta de avoparcina, mientras que el componente de mayor temperatura de vaporización es el isómero alfa-avoparcina.

Fig. 15.



Scan 137 (5.568 min) of J.F.J.1.D

AVOPARCINA

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
33.00	1	45.00	2	65.00	1	86.95	2
34.00	1	47.00	28	66.00	1	81.95	1
35.00	3	50.00	1	67.00	1	82.95	1
36.00	1	64.00	1	69.00	2	84.95	1
37.00	1	55.00	4	70.00	1	97.05	1
58.00	4	58.00	7	71.00	2	105.95	5
39.00	11	67.15	7	72.00	10	123.95	1
41.00	13	69.00	100	73.00	16	124.95	1
42.00	28	69.00	4	74.15	1	127.95	2
43.00	15	69.00	1	79.00	14	136.05	1
44.00	32	63.90	17				

FIGURA 15. ESPECTROMETRIA DE MASAS PARA α -AVOPARCINA.

No es sorprendente que en ninguno de los espectros de masas registrados se detecte ión molecular ya que la estabilidad de este tipo de iones en estructuras muy complejas se presupone como muy baja. El perfil de corriente iónica total (CIT), claramente demuestra que la avoparcina purificada no se descompone térmicamente a las condiciones de vacío del espectrómetro.

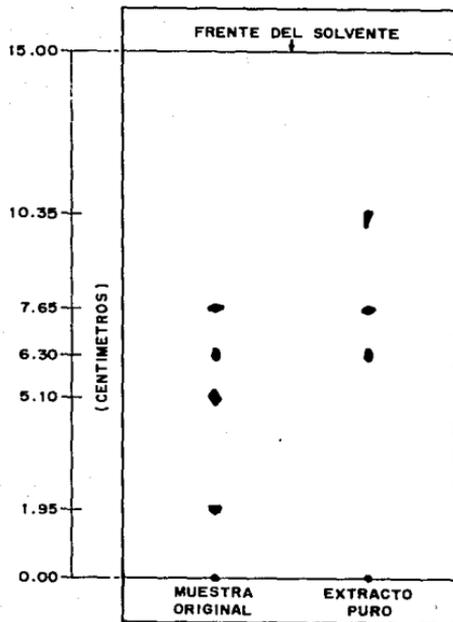
4.4.- INTERPRETACION DE CROMATOGRAFIA EN PLACA.

El análisis por cromatografía en capa fina utilizando el sistema de aminoácidos modificado, descrito anteriormente (Cap.3), aportó los siguientes valores de Rf's, tanto para el extracto directo de muestras comerciales, así como para la Avoparcina purificada. (Fig. 16)

TABLA 2

Valores de Rf's reportados	Muestra original	Purificada
α - Avoparcina 0.47	0.51	0.51
β - Avoparcina 0.47	0.42	0.42
γ - Avoparcina 0.36	0.34	0.69
Epi - Avoparcina 0.16	0.13	
α - CDP-1-Avopar. 0.72		

De los valores obtenidos se observa que tanto para la muestra original como para el extracto existen valores de Rf's muy parecidos a algunos isómeros de la Avoparcina reportados en la literatura (Ref. 19). De lo cual podemos inferir que se puede tener la presencia de los isómeros α, β y Avoparcina modificada que además, con apoyo a la espectroscopía de IR y a la espectrometría de masas se pudo elucidar la estructura y presencia de estos isómeros.



MUESTRA ORIGINAL

RF.

0.51

0.42

0.34

0.13

EXTRACTO PURO

RF.

0.69

0.51

0.42

FIGURA 16: CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA DE AVOPARCINA PURIFICADA.

4.5.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

El análisis realizado para comprobar la veracidad del uso de la Vancomicina grado farmacéutico como estándar interno, resultado favorable, permitió aclarar las dudas, para poder ser utilizado como estándar interno, observando que la respuesta analítica para ambos antibióticos es la misma, la similitud de pendientes nos indicó que la relación del área bajo la curva con respecto a la concentración llevan la misma tendencia, es decir existe proporcionalidad de un a otro antibiótico. Los resultados obtenidos se muestran en la figura No. 20.

La cuantificación del estandar secundario de Avoparcina por estandarización interna, presentó una resolución adecuada de la Vancomicina (estandar interno) con respecto a la Avoparcina. Presentando tiempos de retención de 2.07 y 4.52 min. respectivamente. Determinándose la pureza por relación de áreas de una curva contra el estandar interno. Consecuentemente se determinó la pureza correspondiendo a un 76.4 % reportando su perfil cromatográfico en la Fig. 17.

Cálculo de la pureza de Avoparcina.

$$Fr = \frac{(\text{pureza del std})(\text{peso std})(\text{abc std})(\text{vol. mtra})}{(\text{vol dil std})(\text{abc mtra})(\text{vol dil})} = 76.4\%$$

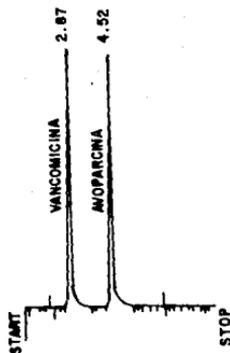


FIGURA 17. CROMATOGRAMA DE AVOPARCINA PURIFICADA POR ESTANDARIZACION INTERNA.

Para identificar a que corresponde cada uno de los tiempos de retención se inyectó la Vancomicina bajo las mismas condiciones cromatográficas mencionadas mostrando un tiempo de retención de 2.07 min., de esta forma el tiempo de retención de 4.52 min. correspondió para este método de análisis a la Avoparcina Fig. 18.

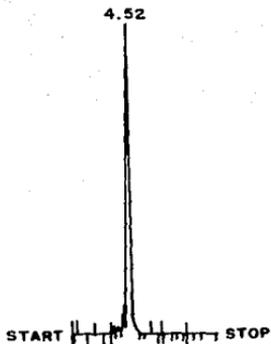


FIGURA 18. CROMATOGRAMA DE VANCOMICINA.

La cuantificación de la Avoparcina en la premezcla alimenticia se intentó realizar con el mismo método de análisis por estandarización interna , pero resultó ser no específico para la Avoparcina , ya que el extracto directo de la premezcla presentó muchas interferencias ocasionadas por el resto de los componentes de esta, que sin ser Avoparcina se eluían al mismo tiempo de retención de esta.

Por consiguiente fue necesario realizar el método de cuantificación por estandarización externa (Pág. 40). Fig. 18.

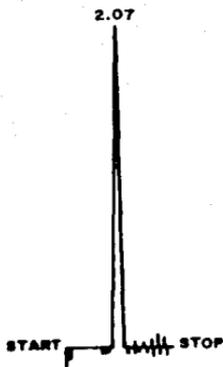


FIGURA 19. CUANTIFICACION POR ESTANDARIZACION EXTERNA.

Se pudo observar que se detecta un sólo componente eluido a un $T = 2.07$ min. indicando que en las diferencias de polaridad y de peso molecular entre los isómeros de avoparcina no son suficientes para resolverlos en este sistema, pero si nos ayuda a la cuantificación del contenido de Avoparcina como mezcla racémica.

Para determinar el contenido de Avoparcina en la premezcla alimenticia se utilizó la Avoparcina purificada (76.4%) como estandar externo.

PROPORCIONALIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS FUERON ALCANZADOS BAJO LAS MISMAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS, DE LAS DIFERENTES SOLUCIONES SE DETERMINARON LOS SIGUIENTES RESULTADOS :

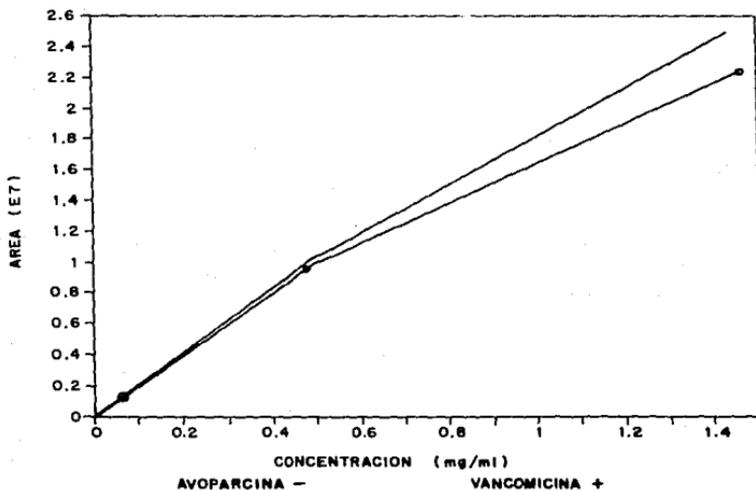
LINEARIDAD DEL METODO CROMATOGRAFICO.

TABLA 3

AVOPARCINA		REGRESSION OUTPUT	
CONCENTRACION mg/ml.	AREA (E7)	CONSTANT	0.055959
0.005	0.019	STD ERR OF Y EST	0.095567
0.048	0.105	R SQUARED	0.995396
0.480	0.999	No. OF OBSERVATIONS	4
1.440	2.497	DEGREES OF FREEDOM	2
		X COEFFICIENT(S)	1.721318
		STD ERR OF COEF.	0.082769
VANCOMICINA		REGRESSION OUTPUT	
CONCENTRACION mg/ml.	AREA (E7)	CONSTANT	0.058205
0.005	0.001	STD ERR OF Y EST	0.145987
0.048	0.075	R SQUARED	0.986441
0.480	0.969	No. OF OBSERVATIONS	4
1.440	2.197	DEGREES OF FREEDOM	2
		X COEFFICIENT(S)	1.525179
		STD ERR OF COEF.	0.126437

ESTUDIO DE PROPORCIONALIDAD DE LOS ANTIBIOTICOS

LINEARIDAD DE LA RESPUESTA
(DE LOS ANTIBIOTICOS)



$t_b = 0.8904$ N.S.

$t_p = -0.3493$ NO ES SIGNIFICATIVO

$t_b = 0.606$ N.S.

$m = 1.721319$

$b = 5.5959E^{-07}$

$r = 0.99769$

$m = 1.52518$

$b = 5.62E^{-07}$

$r = 0.99319$

4.6 VALIDACION DEL METODO DE CUANTIFICACION DE AVOPARCINA EN LAS
PREMEZCLAS ALIMENTICIAS POR ESTANDARIZACION EXTERNA.

METODO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Se usaron las condiciones mencionadas en la parte 3.4.1 de la
experimentación.

4.6.1 LINEARIDAD DEL METODO.

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

TABLA 4
LINEARIDAD DEL METODO

CANTIDAD AGREGADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
39.60	39.51	99.77
64.00	63.38	99.03
80.20	80.40	100.25
96.10	96.29	100.20
120.00	120.22	100.18

Media 99.89

Varianza 0.21

Coefficiente de correlación 0.99995

R^2
R 0.9999

m = 1.006792

b = -0.56323

r = 0.0282

$$X = 99.74$$

$$DE = 0.636$$

$$DER = 0.636$$

Prueba de hipótesis para :

Intercepto (b):

$$Y = \alpha + \beta X$$

estimador de a

Criterio de aceptación para b:

$$H_0 = b = 0$$

$$H_A = b \neq 0$$

Se acepta H_0 si el valor del t-student calculado es menor que t tablas con un nivel de confiabilidad del 95% y grados de libertad $n - 2$.

$$t = \frac{a - \alpha}{S_a} \quad S_a = \frac{S_{xy} \sqrt{\sum x^2}}{\sqrt{n \sum x^2}}$$

$$S_a = 421.818$$

$$S_{xy} = 943.215$$

$$\sum x^2 = 35\,731.35$$

$$t \text{ calculada} = 0.00133$$

$$t \text{ tablas} = 3.18$$

Conclusión : Se acepta H_0 ya que t calculada es menor que t tablas.

Prueba de hipótesis para:

pendiente (m):

$$H_0 = 1$$

$$H_A \neq 1$$

Criterio : Se acepta H_0 si t calculada es menor que t tablas con un nivel de confiabilidad del 95% y grados de libertad $n-2$.

$$Y = \alpha + \beta X$$

estimador de b

$$t = \frac{b - \beta}{S_b} \quad S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum x^2}}$$

$$b = 1.0067$$

$$S_{yx} = 35.5817$$

$$S_b = 0.1882$$

$$\sum x^2 = 35\,731.35$$

$$t \text{ calculada} = 0.035$$

$$t \text{ tablas} = 3.18$$

Conclusión: Se acepta H_0 ya que t calculada es menor que t tablas.

Prueba de hipótesis para:

coeficiente de regresión (r):

$$H_0 = r = 1$$

$$H_A = r \neq 1$$

Criterio : Se acepta H_0 si t calculada es menor que t tablas con un nivel de confiabilidad del 95% y grados de libertad $n - 2$.

$Sx^2 = 936.8519$
 $Sxy = -1055.288$
 $b = -1.12$
 $Sy^2 = 949.70$
 $q = -901.948$
 $\beta_0 = -1.006$
 $t_0 = -0.402$

$t_{\text{tablas}} = 0.035$

CONCLUSION: SE ACEPTA H_0 YA QUE $t_{\text{calculada}}$ ES MENOR QUE t_{tablas} .

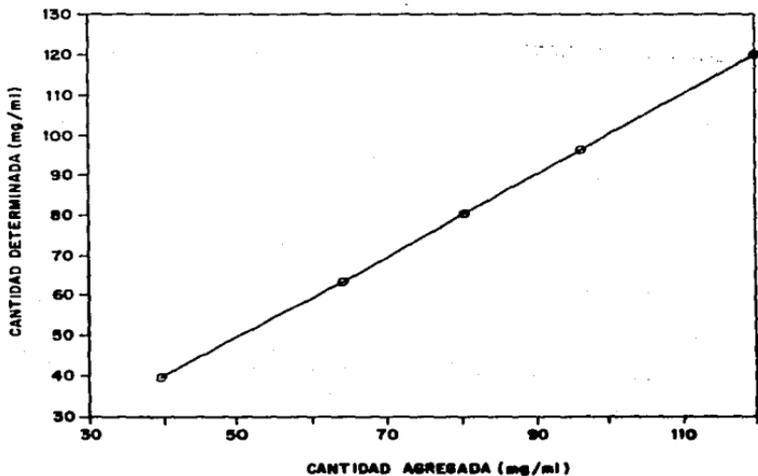
INTERVALO DE COFIANZA AL 95%.

$\bar{X} \pm t \text{ DE}/n$

95%

$98.943 < M < 100.53$

LINEARIDAD DEL METODO (PARA AVOPARCINA)



4.6.2 PRECISION DEL METODO AL 100%.

TABLA 5

PRECISION DEL METODO AL 100%

CANTIDAD AGREGADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
80.00	80.02	100.03
79.90	79.90	100.00
80.10	80.23	100.16
79.80	79.68	99.85
80.40	80.69	100.36
80.00	80.21	100.26

Media 100.1

Desviación Estándar 0.186

Desviación Estándar Relativa 0.186

Varianza 0.03

Intervalo de confianza al 95%..* 99.91 < M < 100.30

* Valor necesario para exactitud del método al 100%.

4.6.3 EXACTITUD DEL METODO AL 80%.

TABLA 6

EXACTITUD DEL METODO AL 80%

CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
64.00	64.00	100.00
64.10	64.13	100.05
64.00	63.73	99.58
64.20	64.32	100.19
64.30	64.44	100.22
64.90	63.79	98.29

Media 99.72

Desviación Estándar 0.64

Desviación Estándar Relativa 0.54

Varianza 0.05

Intervalo de Confianza al 95%. $99.10 < \mu < 100.33$

4.6.4 EXACTITUD DEL METODO AL 120%.

TABLA 7
EXACTITUD DEL METODO AL 120%

CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
96.10	96.10	100.00
95.00	94.69	99.67
94.15	94.50	100.37
96.00	95.94	99.94
95.80	95.80	100.00
95.90	95.99	100.09

Media 100.00

Desviación Estándar 0.22

Desviación Estándar Relativa 0.22

Varianza 0.05

Intervalo de Confianza al 95%. $99.99 < M < 100.25$

4.6.5 REPRODUCIBILIDAD.

TABLA 8

REPRODUCIBILIDAD

ANALISTA 1		DIA 1
CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
80.00	80.02	100.03
79.90	79.90	100.00
80.10	80.23	100.16
80.40	80.69	100.36
79.80	79.68	99.85

Media 100.08

Desviación Estándar 0.04

Desviación Estándar Relativa 0.04

Varianza 0.03

CRITERIO : El método sea reproducible si la DER \leq 2 %

RESULTADO En el caso del Analista 1, día 1 su DER = 0.04%
por lo que cumple con el criterio.

REPRODUCIBILIDAD

TABLA 9

Analista 1		Dia 2
CANTIDAD AGREGADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
79.23	80.00	100.97
79.95	79.35	99.25
80.02	80.21	100.24
80.31	80.29	99.98
79.80	79.00	99.00

Media 99.89

Desviación Estándar 0.26

Desviación Estándar Relativa 0.28

Varianza 0.50

CRITERIO : El método será reproducible si su $DER \leq 2\%$

RESULTADO En el caso del Analista 1, día 2 se cumple con el criterio

REPRODUCIBILIDAD

TABLA 10

Analista 2		Dia 1
CANTIDAD AGREGADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
80.00	80.00	100.0
80.00	80.01	100.01
80.00	79.66	99.58
80.10	79.98	99.85
80.00	80.22	100.28
80.00	80.17	100.21

Media 99.94

Desviación Estándar 0.06

Desviación Estándar Relativa 0.08

CRITERIO : El método seña reproducible si su DER \leq 2 %

RESULTADO Se cumple con el criterio DER = 0.08

REPRODUCIBILIDAD

TABLA 11

Analista 2	Dia 2	
CANTIDAD AGREGADA mg	CANTIDAD DETERMINADA mg	% DETERMINADO
80.00	80.02	100.03
79.90	79.90	100.00
80.10	80.23	100.16
80.40	80.69	100.36
79.80	79.68	99.85
80.00	80.21	100.26

Media 100.1

Desviación Estándar 0.03

Desviación Estándar Relativa 0.04

Varianza 0.03

CRITERIO : El método seña reproducible si su $DER \leq 2\%$

RESULTADO Se cumple con el criterio $DER = 0.04 \%$

4.6.6 CANTIDAD MINIMA DETECTABLE.

$CMD = Z \text{ ord.}$

$\text{ord} = Se \frac{1}{n} + n(x)/S_{xx}$ en donde $Se = 353.51$

$\text{ord} = 0.2099$ con un riesgo = 0.005%

$Z = 5.84$

1.23ng = cantidad mínima detectable

4.6.7 ESPECIFICIDAD.

Para determinar la especificidad del método analítico, se analizaron muestras de Avoparcina, sometidas a las siguientes condiciones de degradación: a 70 °C y en H₂O₂ durante 7 y 14 días.

Las muestras de avoparcina que fueron sometidas a estas condiciones presentaron degradación, obteniéndose varios picos cromatográficos cuando estas fueron inyectadas, por lo que no se puede cuantificar en estas condiciones la avoparcina, demostrándose que no hay especificidad en el método.

**TABLA DE RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO
UTILIZADO PARA CUANTIFICAR AVOPARCINA.**

TABLA 12

	CRITERIO	RESULTADO
LINEALIDAD	$DE \leq 0.7\%$	0.12 %
	$r \geq 0.99\%$	0.99 %
	$m = 1.0$	1.006
	$b = 0.0$	-0.563
PRECISION	$DER \leq 2.0\%$	0.04 %
EXACTITUD DEL METODO		
Promedio de Recobro.	98 - 102 %	99.72 %
	$DER \leq 2.0\%$	0.06 %
REPRODUCIBILIDAD.	$DER \leq 2.0\%$	0.10 %
LIMITE DE DETECCION.		123 ng
ESPECIFICIDAD.	SI	NO

ANALISIS DE VARIANCA PARA REPRODUCIBILIDAD

MODELO $X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j$ en donde $i = 1, 2.$

$j = 1, 2.$

$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2$ tratamientos iguales

$H_a = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$ los tratamientos no son iguales.

$SC_{total} = SC_{bloque} + SC_{tratamiento} + SC_{residual}$

$SC_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n X_{ijk}^2 - C$

$SC_{bloque} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b T_{ij}^2 / K - C$

$SC_{tratamientos} = \sum_{i=1}^a T_i^2 / n - C$

$SC_{residual} = SC_{total} - SC_{bloque} - SC_{tratamiento}$

$C = (\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n X_{ijk})^2 / KN = T_{..}^2 / KN$

Grados de libertad = $Kn - 1 = (n-1) + (K-1) + (n-1)(K-1)$
total bloque tratami. residual

$C = (399.99)^2 / (2)(2) = 39998.0$

$SC_{total} = 4.03207$

$SC_{bloque} = 0.00062$

$SC_{residual} = 4.03083$

grados de libertad = $(2)(2) - 1 = 3$, bloque = $2-1 = 1$, tratam. = 1 y

el residual = 1

TABLA ANDEVA

Fuente	SC	g.l.	CM	RV
Tratamientos	trat	(K-1)	$CM_{trat} = SC_{trat}/k-1$	$\frac{CM_{trat}}{CM_{res}}$
Bloques	bloq.	(n-1)	$CM_{bloq.} = \frac{SC_{bloq.}}{(n-1)}$	
Residual	resid.	(n-1)(k-1)	$CM_{resid.} = \frac{SC_{resid.}}{(k-1)(n-1)}$	
TOTAL	SCTotal	Kn-1		

$$R.V. = \frac{CM_{trat}}{CM_{res}} = \frac{SC_{trat}/(k-1)}{SC_{resid.}/((k-1)(n-1))}$$

Fuente	SC	g.l.	CM	RV.
tratamiento	0.00062	1	0.00062	0.0001584
Bloque	0.00062	1	0.00062	
Residual	4.03083	1	4.03083	
Total	4.03207	3		

Decisión: F con $\frac{k-1}{(n-1)} = \frac{1}{(1)} = \frac{1}{1} = 161.4$
 $\frac{(1)}{(k-1)}$

Si F calculada es mayor F critica se rechaza Ho,

como F calculada es menor a F critica se acepta Ho, no hay diferencias significativas entre medias de tratamientos.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Antiguamente el análisis de los antibióticos de la familia glucopeptídica se limitaba solamente a su actividad microbiana, rotación específica polarimétrica y espectroscopia ultravioleta, pero estos métodos solo son funcionales si se cuenta con el antibiótico aislado.

Dentro de la familia de antibióticos glucopeptídicos se encuentra uno denominado Avoparcina, que hasta la fecha solo cuenta con bibliografía muy limitada que permita estudiarla adecuadamente. Así mismo, no se cuenta con un estándar que nos ayude para su identificación analítica y cuantificación, el no contar con parámetros que nos permitieran estudiar adecuadamente a la Avoparcina y mucho menos si viene incluida en una presentación comercial, fundamentó el trabajo realizado.

La premezcla alimenticia para vacunos y ovinos, es una mezcla compuesta entre otros componentes de un antibiótico identificado como Avoparcina, el cual es una mezcla racémica constituida en su gran mayoría por isómeros α y β . La identificación del antibiótico por espectroscopia infrarroja realizada al extracto aislado y purificado, nos permitió poner en evidencia la presencia de grupos aminados, hidroxilos, hidrocarburos aromáticos y lineales que conforman a la estructura de la Avoparcina. sin embargo, por si sola esta técnica de análisis no permitió deducir la estructura de la Avoparcina, por ello, se complementó el estudio con el apoyo de la espectrometría de masas, y con ello se obtuvo la estructura química y se aseguró la presencia de los isómeros que constituyen a la Avoparcina.

Cabe mencionar, que la cromatografía en placa fina fue de gran ayuda para poder hacer la separación de los componentes de la premezcla alimenticia e identificar los componentes sin que existiera ninguna interferencia. La evaluación de la pureza del extracto obtenido realizada mediante estandarización interna es válida, como lo demuestra el estudio de proporcionalidad de la Vancomicina y Avoparcina, la similitud de pendientes nos da origen a decir que para ambos antibióticos la respuesta analítica a las mismas condiciones cromatográficas, es la misma. Se obtuvo una pureza para el extracto de Avoparcina del 76.4 %, utilizando para ello estandarización interna.

Debido a las interferencias que ocasionaba el trabajar con estándar interno se realizó la cuantificación de Avoparcina en las premezclas comerciales mediante estandarización externa. La evaluación realizada para las diversas muestras reportó un contenido de Avoparcina de 4.9 a 5.1 % en las formulaciones comerciales.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico para la validación del método de cuantificación permite asegurar que este método es lineal, preciso, exacto y reproducible.

Considerando lo mencionado, podemos decir que los objetivos planteados fueron alcanzados satisfactoriamente y se dispone de un método analítico no biológico, para determinar el contenido de Avoparcina en las premezclas alimenticias, en una forma rápida y confiable.

ESTA TESIS
SALIR DE LA
FPU DEBE
BIBLIOTECA

DEFINICIONES

Método de Medición: Incluye no sólo los instrumentos de medición y los procedimientos específicos para su uso, sino también la manipulación del usuario.

Precisión de un método de medición: se refiere a su variabilidad , cuando se emplea en efectuar variaciones repetitivas bajo condiciones cuidadosamente controladas .

Exactitud de un método de medición: se refiere a la ausencia de desviaciones , a la concordancia de sus resultados respecto a los valores verdaderos de las características de calidad medida. En un método exacto , el valor medio obtenido de un conjunto de mediciones diferirá del valor verdadero , pero no más de lo que se esperaría para una variación debida al azar.

Reproducibilidad de un método de medición: se refiere a la consistencia del modelo de variación , cuando las mediciones repetidas muestran modelos de variación irregulares, el método de medición no es reproducible. Cualquier afirmación relacionada con la precisión de un método de medición implica que sea reproducible.

BIBLIOGRAFIA

1. Streitwieser A. y Heathcock C.H. Química Orgánica, Ed. Interamericana, S.A. de C.V. (1979).
2. Kreyszing E. Introducción a la Estadística Matemática , Edit. Limusa,(1973).
3. Remington R. D. y Schork M. A. Estadística Biométrica y Sanitaria , Ed. Prentice Hall Internacional,(1974).
4. H. Willard Hobart y Lynne L. Merrit. Instrumental Methods of Analysis , Ed. D. Van Nostrand Company.
5. Cuéllar Robert. Introducción a la Química Orgánica ,Ed. Harla, (1973)
6. Gottlieb Richard y Braz Raimundo. Introducción a la Espectrometría de Masa de Sustancias Orgánicas , Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico , Secretaría General de la O.E.A.,(1976).
7. S. Bredd Robert y E. G. D. Murray. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Company, (1975) .

8. The Merck Index, Merck & Co. Inc., (1963).
9. Silverstein & Bassler. Spectrometric Identification of Organic Compounds , John Wiley & Sons, Inc. (1967).
10. R. T. Conley. Espectroscopia Infrarroja. Ed. Alhambra (1979).
11. C. J. Creswell y cols. Análisis espectral de compuestos orgánicos ,Ed. Diana, (1972).
12. P. Joseph - Nathan y E. Diaz. Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear, Ed. Limusa-Wiley, (1970).
13. F. W. Mc. Lafferty. Interpretation of Mass Spectra , Ed. University Science Books, (1980).
14. K. Nakanishi, Infrared Absorption Spectroscopy, Ed. Holden Day Inc., 1-72 (1977).

15. Mc Gahren, W. J.; H. Martin .; G. O. Morton; et al: Structure of Avoparcin Components. J. Am. Chem. Soc. 102, 1671-1684, (1980).
16. Ellestad, G. A.; R. A. Leese.;G.O. Morton ; et al: Avoparcin and eplavoparcin. J. Am. Chem. Soc. 103, 6522-6524, (1981).
17. Mc Gahren W. J. ; R. A. Leese.; G. O. Morton ; et al: Components and Degradation Compounds of The Avoparcin Complex. J. Antibiotics. 36 , 1671-1682, (1983).
18. G. A. Ellestad; W. Swenson, W. J. Mc Gahren.: Epimerization and Stereochemistry of Avoparcin. J. Antibiotics. 36, 1683-1690, (1983).
19. F. Sztaricskai.; J. Borda.; M. M. Puskás; R. Bognar: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Antibiotics of Vancomycin type. J. Antibiotics, 36, 1691-1698, (1983).
20. Gerald. D. Roberts; A. Carr Steven;Rottschaefer Susan; W. Jeffs Peter.: Structural Characterization of Glycopeptide Antibiotics Related to Vancomycin by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. J. Antibiotics, 38, 713-720 , (1985).

21. Dudley H. Williams; R. Kalman John: Structural and Mode of Action Studies on the Antibiotic Vancomycin. Evidence from 270-MHz. Proton Magnetic Resonance. J. Am. Chem. Soc. (): 2768-2774 ,(1976).
22. J. Marshall Frederick, Structure Studies and Vancomycin. J. Am Chem. Soc. 8, 18-22 , (1964).
23. Cyanamid de México, información directa.
24. Grant E., Leavenworth R., Statistical Quality Control. Cia Editorial Continental, México, (1987).
25. J. Stevenson William , Estadística para Administración y Economía , Editorial Harla S. A. de C. V., México, (1981).