



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**<<DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DE RACTOPAMINA POR
ELECTROFORESIS CAPILAR>>**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

YESSICA NASHIELY JIMÉNEZ CRUZ

ASESORA: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: Tesis

Desarrollo de métodos analíticos para el control de calidad de ractopamina por electroforesis capilar.

Que presenta la pasante: Yessica Nashiely Jiménez Cruz

Con número de cuenta: 408080220 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura de Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
VOCAL	Dr. Julio César Botello Pozos	
SECRETARIO	M.C. Bernardo Francisco Torres	
1er. SUPLENTE	M.C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



AGRADECIMIENTOS



Agradezco:

A Dios y a la vida por darme esta oportunidad y por permitirme culminar este trabajo.

A mis padres Gonzalo y Ana por sus enseñanzas, su fortaleza, perseverancia y que durante toda mi vida he tenido su apoyo incondicional...

A mis abuelitos Silverio y Asunción quienes me enseñaron y dieron lecciones de vida.

A mis tíos por su apoyo incondicional.

A mi hermano Alan quien me apoyo en todo momento.

A mi novio David por su apoyo incondicional y confianza, gracias por creer en mí ganita...

A mi asesora Gaby por su gran y valioso apoyo en todo momento, por su asesoría y paciencia...

A mi familia en general quienes me brindaron su compañía y consejos...

A mis amigos de toda la vida por su gran amistad y apoyo...

A mis compañeros de laboratorio: David Sturbe, Miguel, Dulce, Gonzalo, Sandra, Carmen, Elida, Alicia, David, Giovanni, Juan y los demás por su apoyo y asesoramientos.

A los profesores que me formaron y cuyas enseñanzas son parte de mí.

A la generación de química 35 con quienes compartí y viví esta maravillosa etapa de vida.

A los sinodales por su asesoramiento.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me brindó la dicha de estudiar en ella.

A sus profesores, instalaciones y proyectos fue posible la realización de este trabajo.

Gracias...



ÍNDICE



ÍNDICE

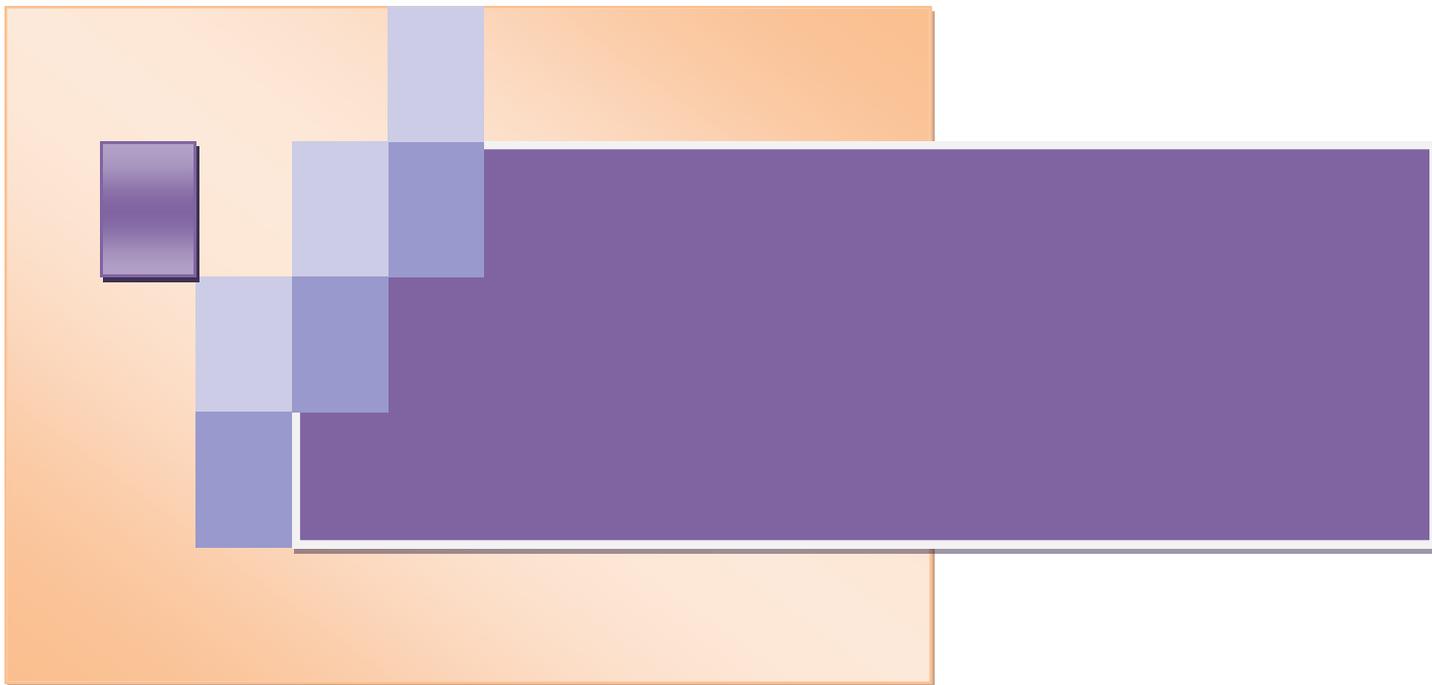
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	x
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos particulares	8
3. MARCO TEÓRICO.	10
3.1 Carne de cerdo	10
3.1.1 Mercado nacional	10
3.1.2 Mercado mundial	19
3.1.3 Importancia de la eficiencia en canal.....	22
3.1.4 Panorama del uso de los agonistas β - adrenérgicos como promotores de crecimiento	22
3.2 Ractopamina	25
3.2.1 Generalidades de la ractopamina.....	26
3.2.2 Controversia del uso de la ractopamina a nivel mundial y nacional.	27
3.2.3 Propiedades físicas, químicas y biológicas	28
3.2.3.1 Propiedades físicas	28
3.2.3.2 Propiedades químicas	28
3.2.3.3 Propiedades biológicas.....	30
3.2.4 Productos comerciales disponibles	31
3.2.5 Métodos analíticos reportados para la determinación de la ractopamina	32
3.3 Validación de un método analítico	33
3.3.1 Parámetros de validación	33
3.3.1.1 Precisión del sistema	33
3.3.1.2 Linealidad del sistema	33
3.3.1.3 Especificidad.....	34
3.3.1.4 Exactitud y repetibilidad del método	34
3.3.1.5 Precisión del método	34
3.3.1.6 Linealidad del método.....	34
3.3.1.7 Límite de detección.....	34
3.3.1.8 Límite de cuantificación	34
3.4 Estereoquímica	34
3.4.1 Quiralidad	35
3.4.1.1 Notación R/S de Cahn- Ingold- Prelog.....	36
3.4.2 Quiralidad y su importancia en fármacos	37



3.4.3	Quiralidad de la ractopamina.....	38
3.4.4	Métodos analíticos reportados para la separación de los isómeros de la ractopamina.....	39
3.5	Electroforesis capilar	40
3.5.1	Proceso electroforético.....	40
3.5.2	Generalidades.....	40
3.5.3	Principios de la separación electroforética	42
3.5.3.1	Movilidad electroforética	42
3.5.3.2	Flujo electrosmótico.....	43
3.6	Generalidades de las ciclodextrinas como selectores quirales	44
3.6.1	Principales características.....	45
3.6.1.1	Ciclodextrina altamente sulfatadas HS β CD.....	46
3.7	Modificadores orgánicos	46
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	48
4.1	Reactivos.....	48
4.2	Muestras	48
4.3	Instrumentación.....	48
4.4	Equipos.....	48
4.5	Metodología para el control de calidad de la ractopamina	51
4.5.1	Preparación de soluciones	51
4.5.1.1	Preparación de solución buffer	51
4.5.1.2	Preparación del estándar interno.....	51
4.5.1.3	Preparación de la ractopamina.....	51
4.5.2	Metodología utilizada por electroforesis capilar.....	51
4.5.2.1	Preacondicionamiento del capilar al inicio del día	51
4.5.2.2	Condiciones de separación de las muestras por electroforesis capilar	52
4.5.2.3	Condiciones del capilar al final del día.....	52
4.5.3	Validación.....	52
4.5.4	Tratamiento estadístico	54
4.6	Metodología para la separación quiral de los isómeros de la ractopamina	56
4.6.1	Preparación de soluciones	56
4.6.1.1	Preparación de soluciones buffer y el selector quiral HS β CD	56
4.6.1.2	Preparación de la ractopamina	56
4.6.2	Metodología.....	56
4.6.2.1	Preacondicionamiento del capilar al inicio del día	56
4.6.2.2	Condiciones de separación para las muestras por electroforesis capilar	56
4.6.2.3	Condiciones del capilar al final del día.....	57

4.6.2.4	Condiciones del artículo de referencia (Inoue & Chang) para la separación isomérica de la ractopamina	57
4.6.3	Tratamiento estadístico	58
4.6.3.1	Análisis estadístico	58
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	61
5.1	Desarrollo del método para el control de calidad de la ractopamina.....	61
5.1.1	Estudio de la influencia del pH	61
5.1.1.1	Separaciones a pH bajo	62
5.1.1.2	Separaciones a pH alto	66
5.1.2	Estudio de la concentración del buffer a pH 10	67
5.1.3	Influencia del tipo de buffer	68
5.1.4	Influencia de la longitud del capilar	70
5.1.5	Estándar interno	71
5.1.5.1	Selección del estándar Interno. (E.I).....	71
5.1.6	Resumen de las condiciones óptimas de separación para el control de calidad de la Ractopamina	73
5.1.7	Validación del método analítico.....	73
5.1.7.1	Precisión del sistema	73
5.1.7.2	Linealidad del sistema	74
5.1.7.3	Selectividad (Especificidad).....	76
5.1.7.4	Precisión del método	77
5.1.7.5	Linealidad del método y Exactitud (Recobro)	78
5.1.7.6	Efecto de la matriz	83
5.1.7.7	Límite de detección y límite de cuantificación.....	84
5.1.7.8	Tabla resumen de la validación	85
5.1.8	Cuantificación de Muestras	87
5.1.8.1	Racmina premix, Pafmine y Paylean	87
5.2	Desarrollo del método analítico para la separación de los isómeros de la ractopamina.....	91
5.2.1	Tipo de Selector Quiral (Ciclodextrina)	91
5.2.2	Influencia del pH.....	94
5.2.3	Concentración del selector quiral	94
5.2.4	Modificador orgánico.	96
5.2.4.1	Tipo de modificador orgánico.....	96
5.2.4.2	Concentración de MeOH como modificador orgánico	98
5.2.5	Estudio de otros parámetros secundarios	100
5.2.5.1	Concentración del buffer.....	100
5.2.5.2	Efecto del Voltaje aplicado.....	101

5.2.6	Resumen de las condiciones óptimas para la separación quiral de los estereoisómeros de la ractopamina	103
5.2.7	Comparación del método de separación de enantiómeros del método desarrollado con el método reportado en la literatura	104
5.2.7.1	Mediciones del estándar de ractopamina	105
5.2.7.2	Mediciones de las muestras Pafmine, Racmina Premix y Paylean.	106
6.	CONCLUSIONES	116
7.	ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS	cxix
	Índice de figuras.....	cxix
	Índice de ilustraciones.....	cxix
	Índice de tablas	cxix
	Índice de gráficos	cxix
8.	BIBLIOGRAFÍA	127
9.	ANEXOS	135
	Anexo 1: Escala de zonas de predominio del fármaco ractopamina	135
	Anexo 2: Estereoisómeros del fármaco ractopamina.	136
	Anexo 3: Análisis estadístico de la separación de los isómeros de la ractopamina.	138
	Anexo 4: Detalle de la preparación de la solución patrón para la realización de la curva de calibración del sistema	140
	Anexo 5: Detalle de la preparación de la solución patrón para la realización de la curva de calibración del Método	141
	Anexo 6: Validación del modelo lineal: curva de calibración del sistema, gráfico de residuales y cálculo de intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)) para control de calidad de la ractopamina	142
	Anexo 7: Validación del modelo lineal curva de calibración del método, gráfico de residuales y cálculo de intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)) así como el intervalo de confianza del intercepto (IC (b_0)) para el control de calidad de la ractopamina	144
	Anexo 8: Validación: Cálculo del límite de detección y cuantificación para el control de calidad de la ractopamina.....	147
	Anexo 9: Validación: Estudio efecto matriz para control de calidad de la ractopamina	148
	Anexo 10: Validación: Modelos alternos al modelo lineal de las curvas de calibración del control de calidad de la ractopamina.....	151
	Ractopamina (Sistema).....	151
	Ractopamina (Método).....	157
	Anexo 11: Detalle del procedimiento y cuantificación de las muestras analizadas por EC con el método analítico para el control de calidad de la ractopamina	161
	Racmina premix	162
	Pafmine	164
	Paylean.....	165



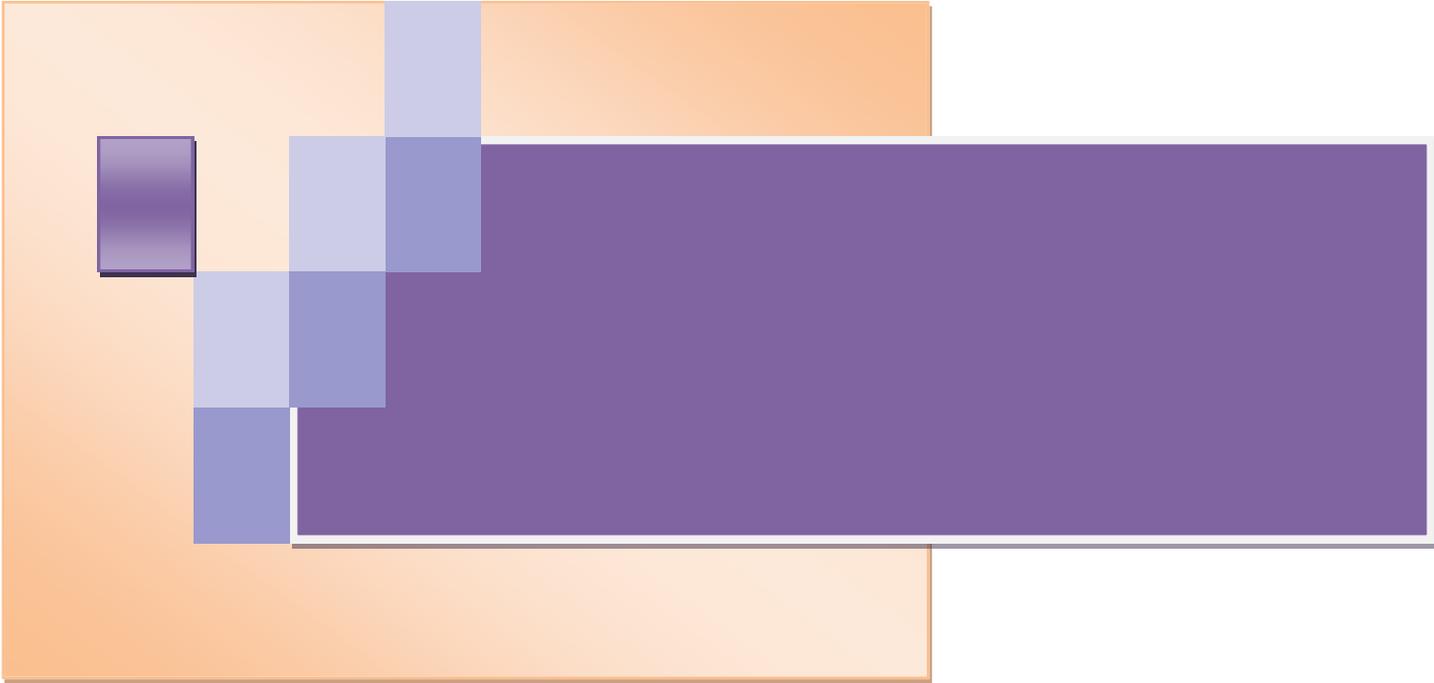
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SÍMBOLO Y/O ABREVIATURA	SIGNIFICADO
%RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa (o coeficiente de variación)
λ	Longitud de onda
μ_{eof}	Movilidad del flujo electroosmótico
°C	Grados Celsius
μA	Microampers
3AF	3-Aminofenol
A	Área
Ac.	Ácido
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
b_0	Ordenada al origen o intercepto
b_1	Pendiente
CAPS	Ácido 3- (ciclohexilamino) -1-propanosulfónico
CAS	Servicio de resúmenes químicos.
CD	Ciclodextrina
CE-DAD	Electroforesis capilar con detector de arreglo de diodos
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de Variación
CWE	Equivalente de peso en canal
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Campo eléctrico
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EI	Estándar interno
EM	Espectrometría de masas
EZP	Escalas de zonas de predominio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FEO	Flujo electroosmótico
F_{Exp}	F calculada experimentalmente
F_{tablas}	F de tablas de la distribución de Fisher
$F_{za\ elect.}$	Fuerza eléctrica

g	Gramos
g.d.l.	Grados de libertad
GC	Cromatografía de gases
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
H₂O	Agua
H_i	Altura
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSαCD	α Ciclodextrina Altamente Sulfatada
HSβCD	β Ciclodextrina Altamente Sulfatada
HSγCD	γ Ciclodextrina Altamente Sulfatada
I	Fuerza iónica
IC(b₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(b₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
Kg	Kilogramo
kV	Kilovolts (10^{-3} V)
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
L_{ef}	Longitud efectiva
L_T	Longitud total del capilar
M	Concentración Molar
MAO	Monoaminoxidasa
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mM	Concentración milimolar (10^{-3} M)
MS	Espectrometría de masas
MTM	Miles de millones de toneladas
n	millones de toneladas métricas
Na₂B₄O₇	Tetraborato de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	-Logaritmo de la constante de acidez.

Q	Carga
s	Segundos
SNIM	Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados
SPE	Extracción en fase sólida
S β CD	β ciclodextrina sulfatada
T	tiempo
TLC	Cromatografía en capa fina
T _m	Tiempo de migración del analito
TMAC	Tasa media anual de crecimiento
UPLC	Cromatografía líquida Ultra de alto rendimiento
USDA	Departamento de agricultura de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Volts
Vol.	Volumen
α -CD	α Ciclodextrina
β -CD	β Ciclodextrina
γ -CD	γ Ciclodextrina
H	Viscosidad
μ_{ep}	Movilidad efectiva o electroforética del analito
μ L	Microlitros
Y	Velocidad de migración
ζ	Potencial zeta



RESUMEN



RESUMEN

El principio activo analizado durante esta investigación de tesis es el clorhidrato de ractopamina, un agonista de los receptores adrenérgicos β , que ha sido aprobado por la FDA como aditivo en alimento para animales de engorda (principalmente cerdos) desde 1999. Se ha demostrado que la ractopamina reduce la grasa y aumenta la masa muscular, mientras que mejora el crecimiento y el rendimiento canal.

Este compuesto está actualmente prohibido en 160 países, ya que se ha declarado no apto para el consumo humano debido a las preocupaciones de sus efectos negativos sobre la salud humana y animal. Las prohibiciones en Rusia y China principales consumidores de la carne porcina han causado tensiones comerciales a Estados Unidos uno de los principales productores por el uso de la ractopamina ya que la industria de la carne produce un mayor número de millones de kg de carne y millones de pesos con menos esfuerzo gracias al uso de aditivos β agonistas.

La ractopamina tiene dos centros quirales y es actualmente comercializado como una mezcla racémica de los cuatro estereoisómeros RR, RS, SR, SS en proporciones aproximadamente iguales, aunque los estudios han demostrado que el isómero RR es responsable de la mayoría de los efectos ya que es el isómero más activo y funcional además de ser es un cardioestimulante potente.

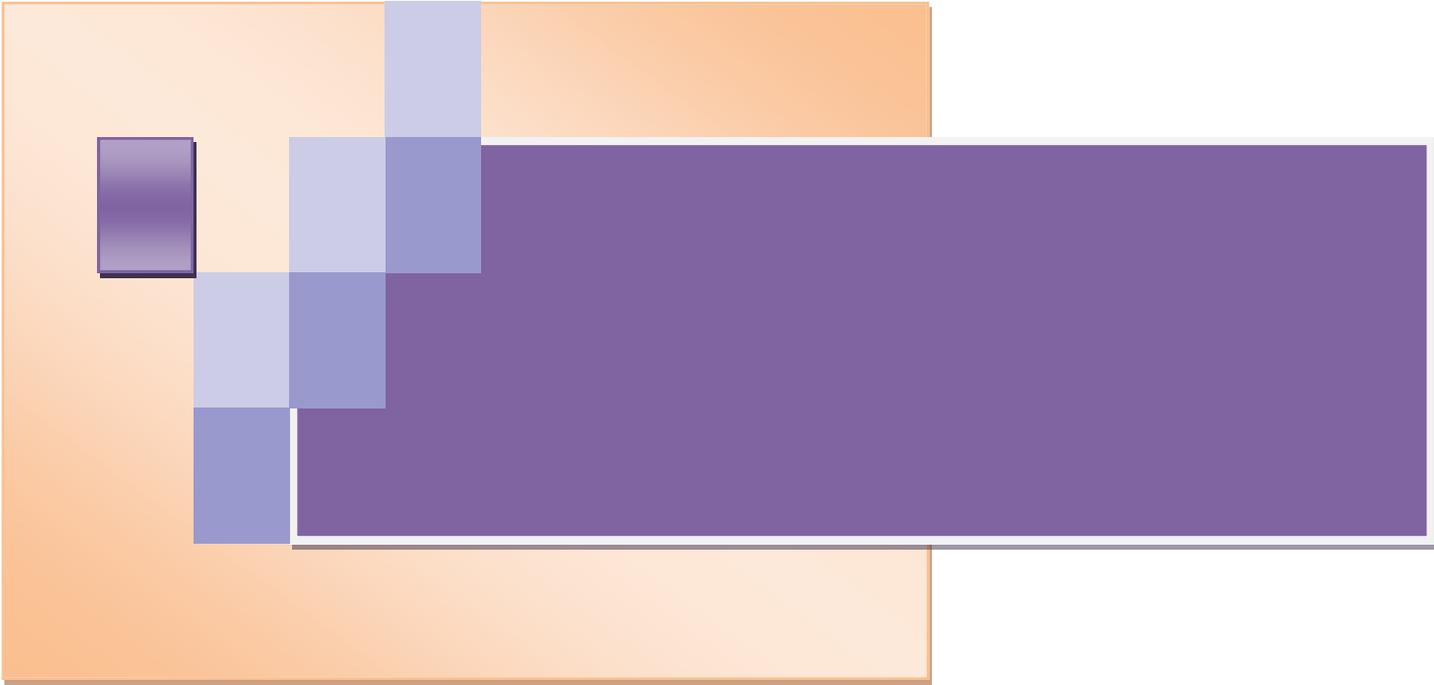
En el presente trabajo se desarrollaron 2 métodos analíticos por Electroforesis Capilar, cuyas finalidades fueron las siguientes:

- A. **Método para el control de calidad de la ractopamina:** el cual permite la determinación de forma confiable del porcentaje de contenido de ractopamina en premezclas de alimento para cerdos. Para tal efecto se evaluaron el efecto del pH, tipo y concentración del buffer, así como factores secundarios como la influencia del largo del capilar y el voltaje. Dentro de los parámetros de validación evaluados están: la selección del E.I, linealidad del sistema y del método, precisión en el sistema y el método, la selectividad o especificidad, exactitud (recobro), límites de cuantificación (LC) y detección (LD).

- B. **Método para la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina:** Este método tiene la finalidad de corroborar la intercambiabilidad de las premezclas



genéricas, con el producto de patente (el innovador Paylean®), para lo cual se estudiaron factores como: el tipo de ciclodextrina, su concentración, el pH, el uso de modificadores orgánicos como: metanol y acetonitrilo, estudiándose su tipo y concentración, lo anterior utilizando diseño experimental tradicional y diseño multivariante. Por último se estudio como factor secundario el voltaje para finalmente aplicar este método desarrollado para comparar los productos genéricos Pafmine y mediante un análisis de varianzas (ANOVA) concluir si los productos se pueden considerar iguales, es decir son intercambiables.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

La electroforesis capilar (EC) es ampliamente reconocido como una técnica alternativa a las técnicas cromatográficas convencionales y se ha aplicado a una gran variedad de compuestos. Es importante hacer notar que aunque este método se parece al HPLC, los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos, con excepción de la CCEM (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005)

El compuesto analizado en este estudio es el clorhidrato de ractopamina el cual es un fármaco que pertenece a un grupo de compuestos llamados β_2 -agonistas adrenérgicos, estos se utilizan en la medicina humana y veterinaria para el tratamiento de enfermedades pulmonares como broncodilatadores, tocolíticos y tónicos cardíacos (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009). Además de su uso, estos fármacos son a menudo mal utilizados como promotores del crecimiento, para mejorar la composición de la canal por la disminución de la grasa en beneficio de la masa muscular.

El clorhidrato de ractopamina es un fármaco aditivo en veterinaria que aumenta la cantidad de carne magra y disminuye la cantidad de grasa de la canal cuando se alimenta a los cerdos durante las últimas semanas dando 50 kg de ganancia. (Additives, 2004), (Ungemach Fritz, 2004). Recientemente, se ha vuelto aun más popular no sólo en la producción de cerdo, sino también en la producción de pollos y ganado (vacuno, caballar).

La base bioquímica de los efectos de ractopamina está aumentando la retención de nitrógeno, la síntesis de proteínas, la mejora de la lipólisis y la supresión de la lipogénesis (Mills, Kissel, Bidwel, & Smith, 2003), (Chevolleau & Tulliez, 1995), (Mills, Biological basis of ractopamine response, 2002) que a su vez va causando efectos al corazón, los músculos y otros tejidos que generalmente interfieren con las hormonas del estrés.

El uso ilegal de los β_2 -agonistas en 5 a 10 veces las dosis terapéuticas conduce a la acumulación de estos compuestos en los tejidos animales tales como el hígado, riñón y músculo (Ungemach Fritz, 2004). Las altas cantidades de residuos β_2 -agonistas de carne y productos cárnicos llevaron a una serie de casos de intoxicación alimentaria en

humanos en los últimos 20 años, por lo que la Unión Europea prohibió el uso de estas sustancias para fines de ganancia de peso en canal.

En consecuencia, la detección de β_2 -agonistas de material biológico de los animales de granja es una alta prioridad debido a la preocupación de la salud pública; relativamente grandes cantidades de muestras deben ser analizadas con criterios más estrictos utilizados en vista de las graves consecuencias para la salud pública por lo que solo algunos aditivos autorizados por la Food and Drug Administration FDA son utilizados en el ganado.

Aunque todos los incidentes de intoxicación reportados fueron causados por la toxicidad con clenbuterol, la Unión Europea ha impuesto la prohibición sobre el uso de todos los agonistas, por lo que requiere un seguimiento estricto por el uso ilegal de este y otros β agonistas.

La ractopamina fue aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para su uso en el acabado de los cerdos en 1999 mientras que en la Unión Europea el uso de la ractopamina al igual que otros β agonistas están completamente prohibidos desde 1996.

Actualmente está prohibido en 160 países ya que ha sido declarado no apto para el consumo humano debido a las preocupaciones de sus efectos negativos sobre la salud humana y animal. Por lo tanto, la ractopamina está siendo utilizado de manera restringida dentro de un límite bajo de la dosis cuando se utiliza en la producción de ganado, en muchos países. (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009)

El clorhidrato de ractopamina existe en dos formas diastereoméricas resultante a partir de la presencia de dos carbonos quirales y es actualmente comercializado como una mezcla racémica de los cuatro estereoisómeros RR, RS, SR, SS en proporciones aproximadamente iguales. El isómero RR es un cardioestimulante potente en los seres humanos, incrementando la frecuencia cardiaca de leve a moderada dependiendo de la dosis que sea administrada, así como cambios del comportamiento y nerviosismo en las personas, ganado porcino, bovino, y aves.

Con el fin de ofrecer una garantía de calidad para el consumidor y para cumplir las obligaciones legales de prueba, la capacidad de detectar residuos de medicamentos a bajas concentraciones se ha convertido en un tema muy importante.

Como resultado de la exigencia de criterios analíticos sobre los métodos de confirmación, ha habido un creciente número de métodos analíticos reportados para supervisar y detectar la ractopamina. Las técnicas de espectrometría de masas son ampliamente utilizados para identificar niveles de trazas de residuos de contaminantes orgánicos; el uso de la cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC) (Y.Zhang, Chang, Dong, He, & Yang, 2009) y HPLC con detector electroquímico, detector UV, y detector de fluorescencia, extracción en fase sólida (SPE), así como la UPLC (Pleadin, Vulie, & Persi, 2015) acoplada con espectrometría de masas (MS), están disponibles para el análisis de la ractopamina en una variedad de matrices, debido a la alta resolución, sin embargo suelen ser costosas.

El análisis de residuos de la ractopamina se lleva a cabo principalmente en las muestras de orina y de plasma tomadas de animales vivos así como en muestras de tejido después de la matanza (músculo, hígado, riñón y grasa). En la literatura científica, pocos trabajos se refieren a la determinación de ractopamina en alimento para animales uno de ellos por CPE LC-MS (Y.Zhang, Chang, Dong, He, & Yang, 2009) pero ninguno encontrado por electroforesis capilar (EC).

La separación de enantiómeros ha recibido una gran cantidad de atención reciente, específicamente en la industria farmacéutica (Gómez-Gomar, Ortega, Calvet, Andaluz, Mercé, & Frigola, 2003). Puesto que los fármacos quirales se administran comúnmente como mezclas racémicas, si es que los dos enantiómeros exhiben el mismo efecto, pero si este es diferente, necesariamente deben ser estudiados la aportación de los efectos individuales y la ausencia de efectos adversos de alguno de los isómeros, por lo que es de gran interés el desarrollo analítico de métodos para el análisis quiral. (Bressolle, Audran, Pham, & Vallon, 1996).

En el caso de separaciones quirales, la Electroforesis Capilar se ha convertido en una técnica muy potente y es mayormente aplicada para sustancias farmacológicas. (Kavran-Belin & Rudaz, 2005). Por lo que se ha establecido rápidamente en el área de separaciones quirales por su rapidez y sencillez en el desarrollo de los métodos, además

de ser más económicos que los usados en otras técnicas. La separación de enantiómeros por EC normalmente se lleva a cabo mediante la formación de interacciones estereoespecíficas entre los analitos quirales y un selector quiral que se ha añadido al electrolito de fondo (buffer).

La creciente demanda de las organizaciones de la legislación para métodos analíticos enantioselectivos ha promovido la investigación en la aplicación de CD's (ciclodextrinas) en diversos campos de separación por cromatografía tal como: cromatografía de gas-líquido, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar de zona (CZE). Varias tecnologías de CD's se han aplicado no sólo para la separación y determinación cuantitativa de productos farmacéuticos sintéticos y naturales, sino también para el análisis de compuestos enantioméricos presentes en los alimentos y productos alimenticios. (A.Frazier, M.Ames, & E.Nursten, 1999).

Las CD's y sus derivados han sido ampliamente empleados para la resolución quiral directa de un amplio número de enantiómeros, principalmente de interés farmacéutico (Fanali, 2000). Su estructura con una superficie externa hidrofílica y una cavidad hidrófoba, permite la formación de complejos diastereoméricos con un par de enantiómeros, que migran a diferentes velocidades a través del capilar permitiendo la enantioseparación. Se ha informado que la enantioselectividad máxima se alcanza cuando los analitos y las CD's tienen movilidades opuestas. (Asensi-Bernardi, Escuder-Gilabert, Martín-Biosca, & Medina-Hernández, 2013). Existen varios parámetros que influyen en la resolución enantiomérica, por ejemplo, el tipo y la concentración de ciclodextrina, el tipo y la concentración del buffer, el pH, la temperatura, así como la presencia de disolventes orgánicos o aditivos de complejos en el buffer. (Hudson & Coulter Beckman, 2008).

En específico las ciclodextrinas altamente sulfatadas (HSCD) tienen una alta densidad de carga negativa en un amplio rango de pH's, por lo que su movilidad electroforética las hace adecuadas para separaciones a contracorriente. La movilidad opuesta del analito y la ciclodextrina aumenta en gran medida la fuerza de la interacción, ya que las interacciones electrostáticas generadas podrían estabilizar al complejo formado. (Asensi-Bernardi, Escuder-Gilabert, Martín-Biosca, Sagrado, & Medina.Hernández, 2014).



En cuanto a la separación de los enantiómeros de la ractopamina, se reportan métodos como HPLC (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014), incorporados a MS (Lafontaine, Haigiang, Espeurteile, & Shi, 2012) y EC. (Chang, Inoue, & Jen, 2007), llevándose a cabo éstos análisis principalmente en muestras de orina, tejidos, y solo muy pocos en alimento.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método fiable, sensible que puede detectar y confirmar el porcentaje de contenido químico de ractopamina, además de que en un segundo método separar sus enantiómeros en alimento (premezclas) para cerdo utilizando la técnica de EC. Este método se utiliza para detectar ractopamina, en las premezclas de alimento para cerdos como paylean (Paylean, 2013), Racmina premix (Racmina Premix ® 2%, 2013) y Pafmine. (PiSA, 2013).



2. OBJETIVOS



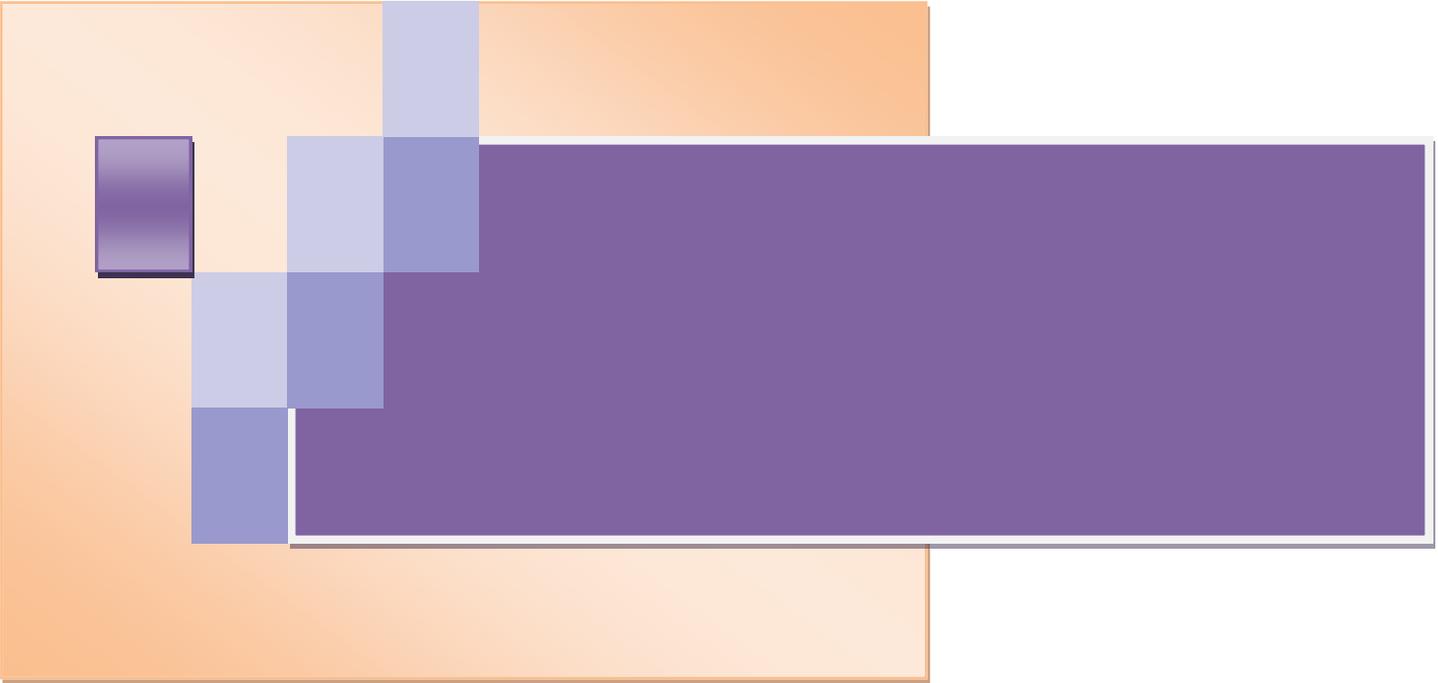
2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

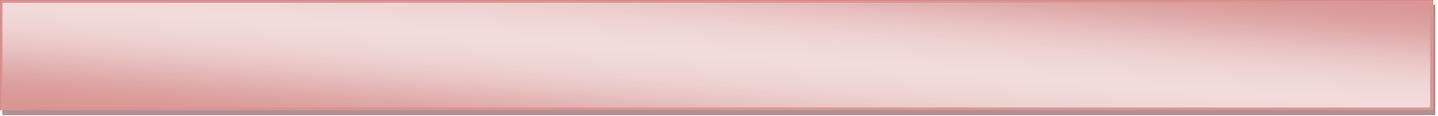
- ❑ Desarrollar dos métodos para el control de calidad de la ractopamina, uno para evaluar el porcentaje de contenido químico y otro para la determinación de la pureza enantiomérica del mismo, ambos análisis en premezclas comerciales de alimento para cerdos, utilizando la técnica de Electroforesis Capilar con la finalidad asegurar el control de calidad de las premezclas para ser utilizado en la alimentación de cerdos.

2.2 Objetivos particulares.

- ❑ Realizar el estudio de los factores a optimizar como son el pH, tipo y concentración de buffer para lograr el desarrollo del método para el control de calidad del porcentaje de contenido de ractopamina en premezclas comerciales por EC.
- ❑ Validar el método desarrollado para evaluar el porcentaje de contenido químico de ractopamina en premezclas comerciales, asegurando así su confiabilidad para ser utilizado de forma rutinaria en el control de calidad.
- ❑ Realizar un diseño experimental de monitoreo para estudiar los factores de pH, tipo y concentración de ciclodextrina, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de separación de los enantiómeros de la ractopamina y así llevar a cabo la separación quiral de sus 4 isómeros por EC.
- ❑ Comparar el método desarrollado con el reportado en la literatura, con la finalidad de utilizar el más adecuado para llevar a cabo la evaluación de la pureza enantiomérica de los 4 isómeros de la ractopamina en premezclas comerciales por EC.
- ❑ Discutir y concluir si las premezclas comerciales se pueden considerar iguales en cuanto a su pureza enantiomérica y por lo tanto se pueden llegar a considerar equivalentes en cuanto a su quiralidad, todo esto mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos por EC.



3. MARCO TEÓRICO



3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Carne de cerdo

El cerdo o porcino se cría en casi todo el mundo, principalmente como fuente de alimento, por su alto valor alimenticio, alto en proteínas y por su sabor. Los cerdos están adaptados y desarrollados para la producción de carne, dado que crecen y maduran con rapidez, tienen un periodo de gestación corto, de unos 114 días, y pueden tener camadas muy numerosas. Son omnívoros y consumen una gran variedad de alimentos. Como fuente de alimento, convierten los cereales, como el maíz, el sorgo y las leguminosas, como la soya, en carne. (Financiera Rural., 2013). La carne porcina es la más consumida en el mundo, seguida por la aviar y luego la bovina. Los porcentajes de participación en el consumo total rondan en 43%, 33% y 23% respectivamente con un pequeño porcentaje (2%) para carne de pavo.

3.1.1 Mercado nacional

Producción

En México, la producción de carne de cerdo no se realiza con animales de razas puras, sino con las cruza de éstas, llamadas hibridaciones; entre las principales razas que sirven para ello están Duroc, Landrace, Hampshire, Chester White, Yorkshire, y Pietrain. (Financiera Rural., 2013) Los cerdos son alojados en diferentes tipos de instalaciones de acuerdo con el sistema de producción en que se les explota:

- 1) **Instalaciones tecnificadas:** Los porcinos son criados en granjas generalmente grandes que pueden llegar a tener hasta 100,000 cerdos de diferentes edades, están ubicados en instalaciones donde casi todo es automático, además de que utilizan lo último en tecnología para su producción. Generalmente los animales producidos en este sistema van a los mercados de las grandes ciudades como Guadalajara y el Distrito Federal, entre otras.
- 2) **Instalaciones tradicionales o semitecnificadas:** Los cerdos son criados en explotaciones de diferente tamaño, donde se tienen desde 100 animales en adelante y su objetivo es la venta del ganado para abasto. A diferencia de las instalaciones tecnificadas, estas instalaciones son tradicionales y no usan lo último

que hay en tecnología para esta especie. Este tipo de producción se realiza principalmente en los estados del centro del país como Guanajuato, Michoacán, Jalisco y el Estado de México.

- 3) **Traspatio, sistema rural o de autoabastecimiento:** Los porcinos que se producen en traspatio, también denominado sistema rural o de autoabastecimiento generalmente son mantenidos en corrales rústicos construidos sin tecnología alguna con materiales de la región. Este tipo de producción se da principalmente en las zonas rurales de nuestro país y son explotaciones de pocos animales, en la mayoría de los casos no pasan de 10 y solo es para consumo propio.

En el 2007 se contabilizaron más de 979 mil unidades de producción de ganado porcino, distribuidas en todas las entidades del país mostrado en el Gráfico 3.1.-1.

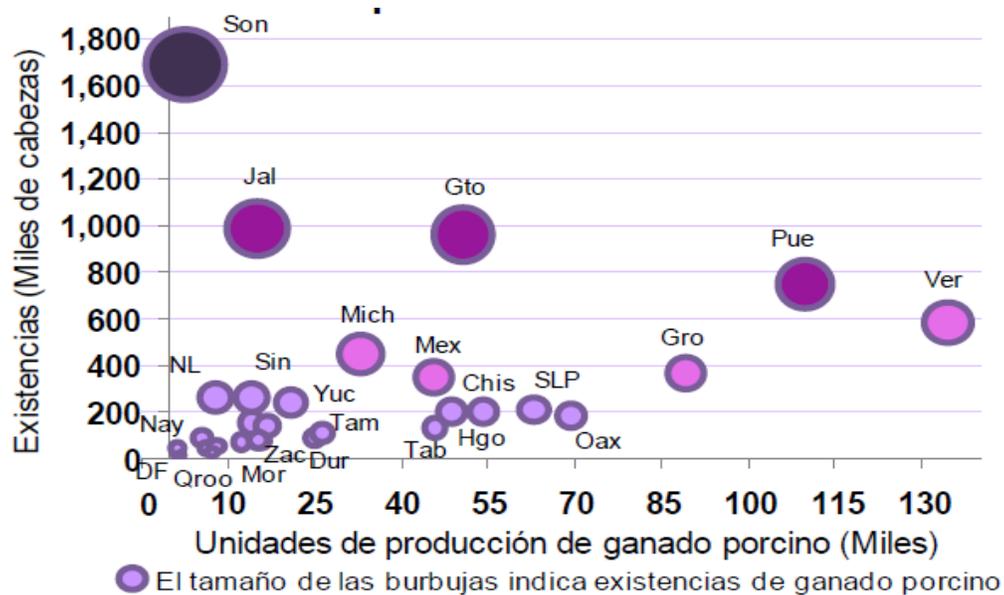


Gráfico 3.1-1 Unidades con ganado porcino y existencia por entidad

De estas unidades de producción de porcinos, un 59.3 % se dedica a la engorda y mantiene el 55.8% de las existencias de ganado. Un 15.8 % cuenta con lechones (cerdos menores a 8 semanas), con un 23.1 % de la participación de existencias. El 15.8 % de unidades mantiene vientres (para la producción de porcino), con un 11.9 % de las existencias (SAGARPA, 11 Sistema de producción porcina, 2014). Asimismo, el 10.3 % de unidades cuenta con sementales, que participan con el 3.5% de las existencias. Es

también importante señalar que el 22.9% de las unidades se encuentran en las viviendas de los productores y participan con el 4.5% de las existencias totales (Financiera Rural., 2013).

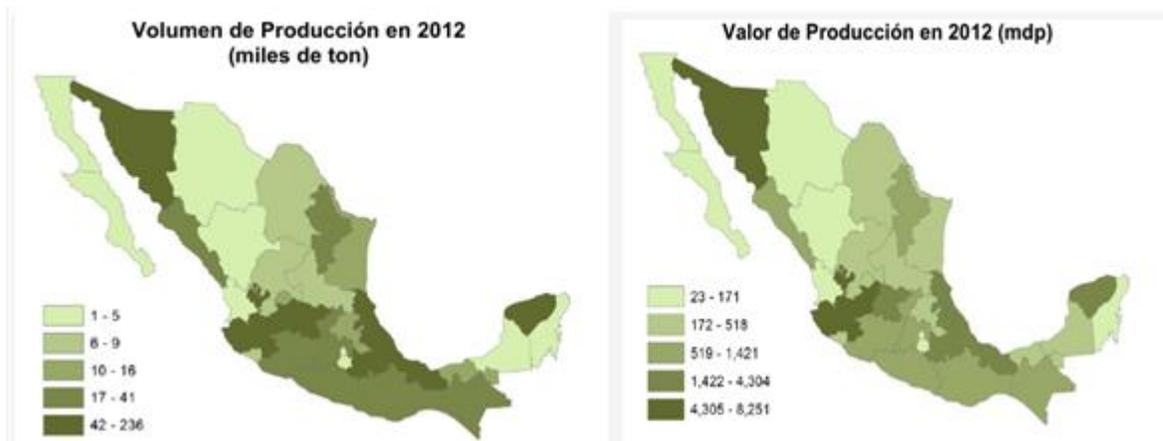


Figura 3.1-A Entidades de la República Mexicana productora en el 2012

Las entidades con mayores ventas mostradas en la Figura 3.1-A de vientres fueron: Chiapas, Sonora, Guanajuato, Jalisco, Veracruz y Michoacán, las cuales concentraron el 76.2% de los vientres vendidos.

Las entidades con la producción de carne fueron: El 58.2 % de estas unidades se concentró en siete estados: 13.7 % en Veracruz, 11.2 % en Puebla, 9.1 % en Guerrero, 7.1 % en Oaxaca, 6.4 % en San Luis Potosí, 5.5 % en Chiapas y 5.2 % en Guanajuato.

La producción de carne de porcino en canal se concentra prácticamente en dos estados de la República: Jalisco y Sonora, que tienen una participación en la producción nacional de 18.9 % y 18.2 %, respectivamente (Financiera Rural., 2013). El primer estado abastece al mercado nacional, mientras que el segundo orienta su producción principalmente hacia la exportación. Entre otras entidades sobresalientes encontramos a Guanajuato (9.4 %), Puebla (9.3 %) y Yucatán (8.4 %). El 35.8 % restante de la producción la conforman los demás estados del país como se observa en el Gráfico 3.1-2.

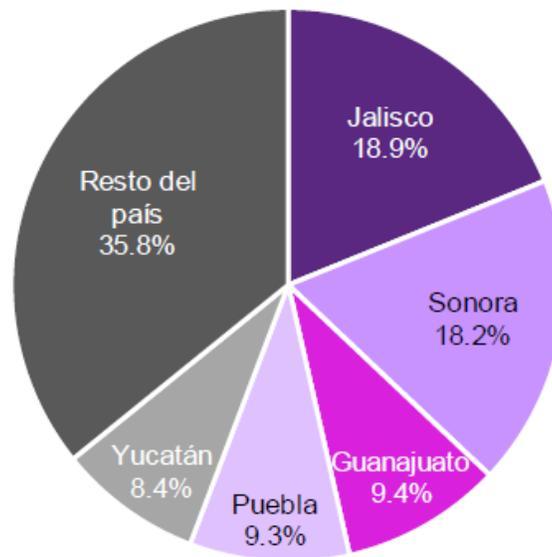


Gráfico 3.1-2 Producción de carne en canal de porcino en México (SAGARPA, Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2009, 2013)

La cantidad producida de cerdo en pie ha disminuido desde los años ochenta (Gráfico 3.1-3), al igual que las existencias, lo que se debe a la competencia con otro tipo de proteínas, principalmente la carne de pollo, que tiene un menor precio. Mientras que la producción de cerdo en pie disminuyó en cerca de 21 % entre 1983 y 2010, (Producción y consumo de carne de cerdo a nivel mundial, 2014) la producción de pollo en pie creció en casi 450 % y la producción de bovino en canal aumentó en cerca de 71 %.

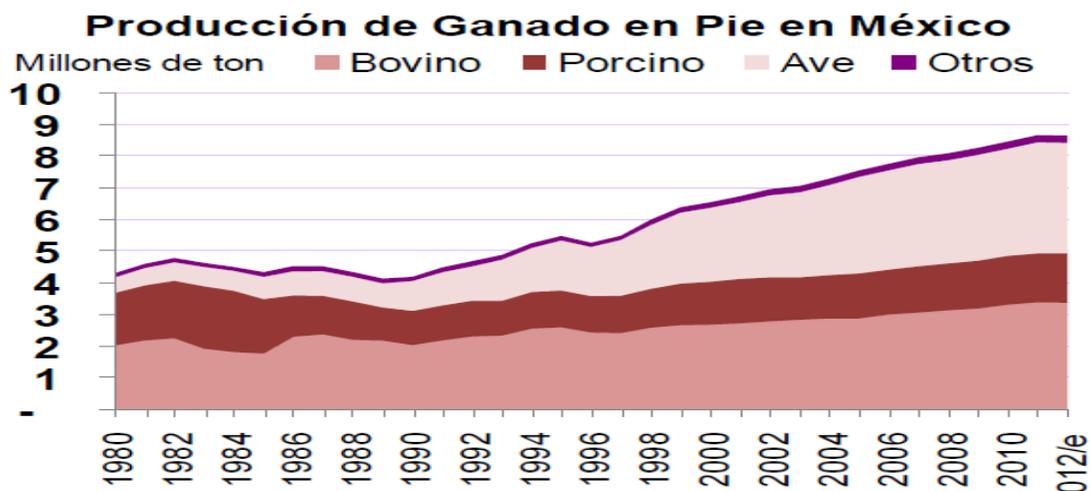


Gráfico 3.1-3 Producción de ganado en pie en México (Financiera Rural, 2015)

Se incrementó el sacrificio y volumen de producción en los años 2000-2010 (Sofoscorp, 2014) lo cual también aumento el valor de producción como se observa en el Gráfico 3.1-4.

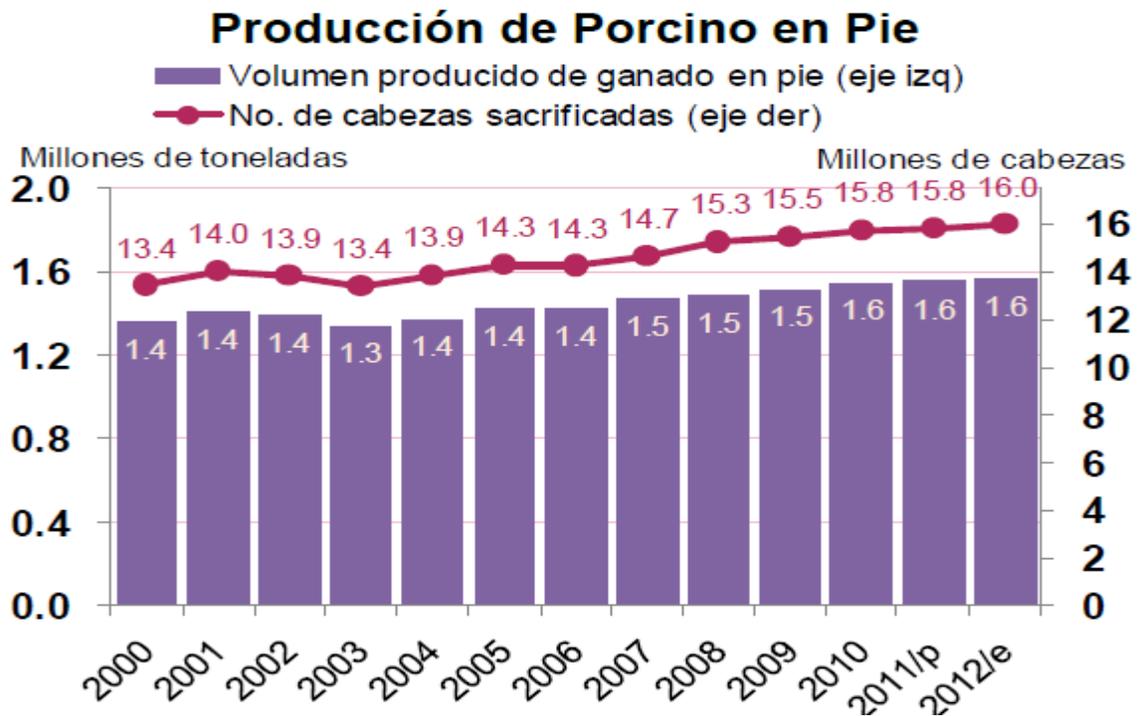


Gráfico 3.1-4 Producción de porcino en pie

La carne en canal de cerdo en nuestro país representa un 76 % del peso del cerdo en pie. Entre 2000 y 2010, la producción de carne en canal mostró una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 1.3 %, ubicándose en 2010 en 1.2 millones de toneladas, con un valor de 35,840 millones de pesos. Cifras preliminares indican que en 2011 (Financiera Rural., 2013), la producción de carne se incrementó en cerca de 0.7 %, observada en el Gráfico 3.1-5 y Gráfico 3.1.6.

Producción de Carne en Canal de Porcino

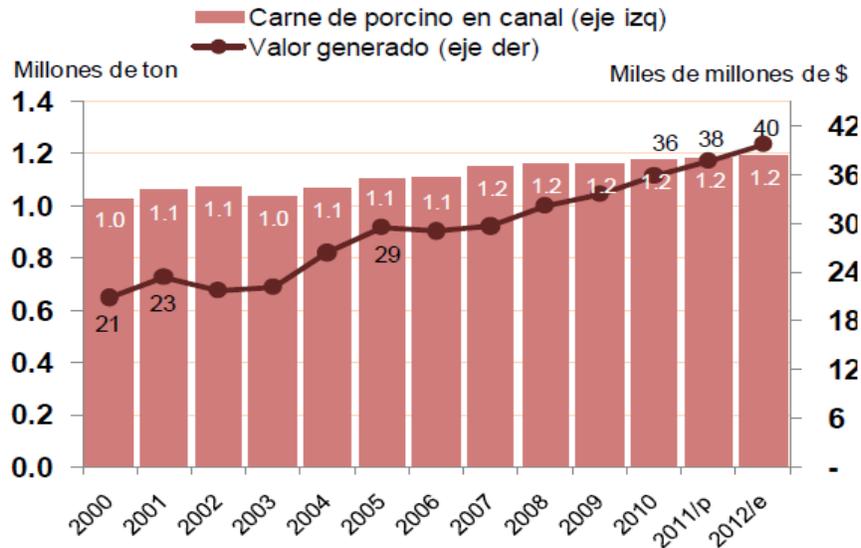


Gráfico 3.1-5 Producción de carne en canal de porcino del año 2000 al 2012

Distribución Porcentual Mensual de la Producción de Carne de Porcino en Canal

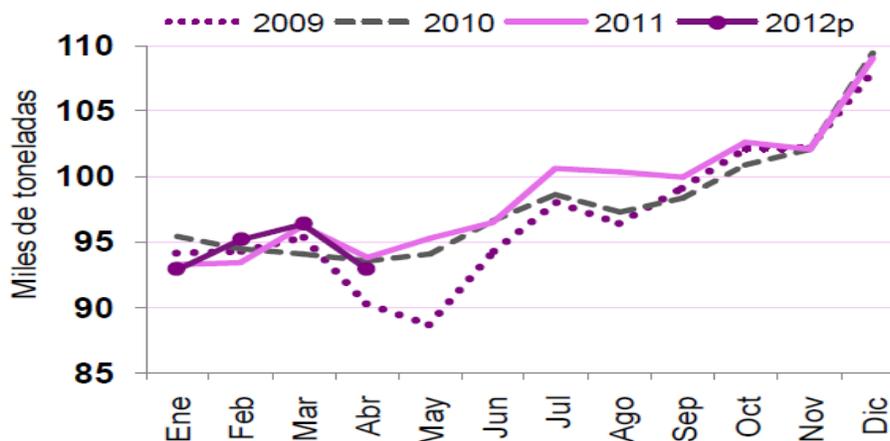


Gráfico 3.1-6 Distribución porcentual mensual de la producción de carne de porcino en canal años 2009-2012

De esta manera, ocupa el cuarto lugar entre los productos cárnicos más dinámicos, superado por el crecimiento en el volumen y valor de producción de la carne de pollo o ave (3.9%, 9.2%), de bovino (2.2%, 6.5%) y ovino (5.1%, 9.1%) (Financiera Rural., 2013). Mostrados en el Gráfico 3.1-7.

TMAC del Volumen y Valor de Producción de la Carne en Canal en México

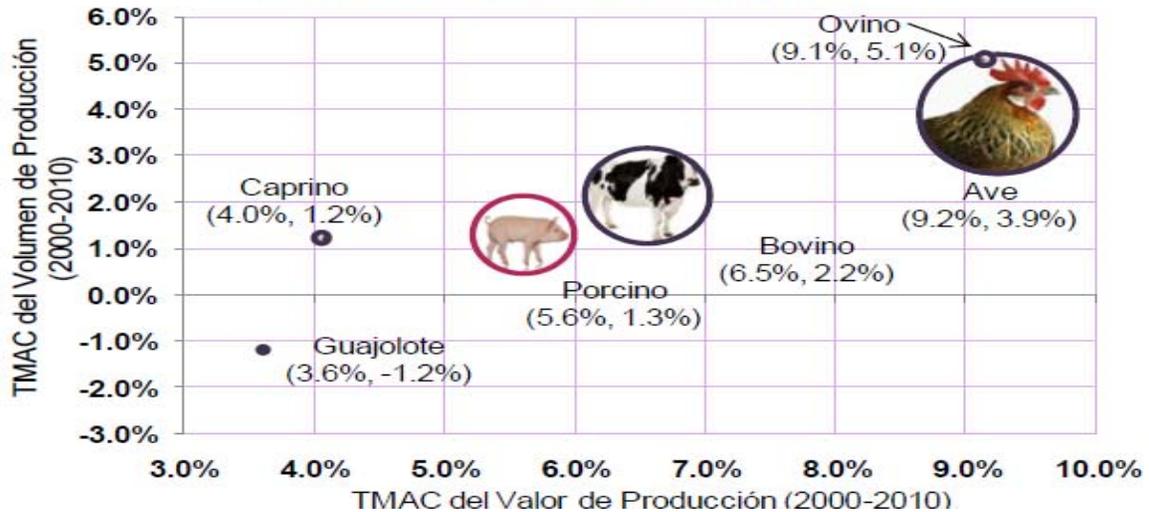


Gráfico 3.1-7 TMAC del volumen y valor de producción de la carne en canal en México 2000-2010. ● Tamaño de la burbuja indica volumen de producción del año 2010

Consumo

La estimación total de consumo de cerdo 2014 es 1,96 MTM de CWE Gráfico 3.1-8. La carne de porcino y sus subproductos representa el 28.7 % del gasto que se realizan en general. Dentro de esta categoría, los productos más demandados son el jamón, con una participación de 22.6 %, seguido del bistec, pulpa, trozo y molida con el 17.1 %.

Consumo Nacional Aparente de Carne de Porcino en México

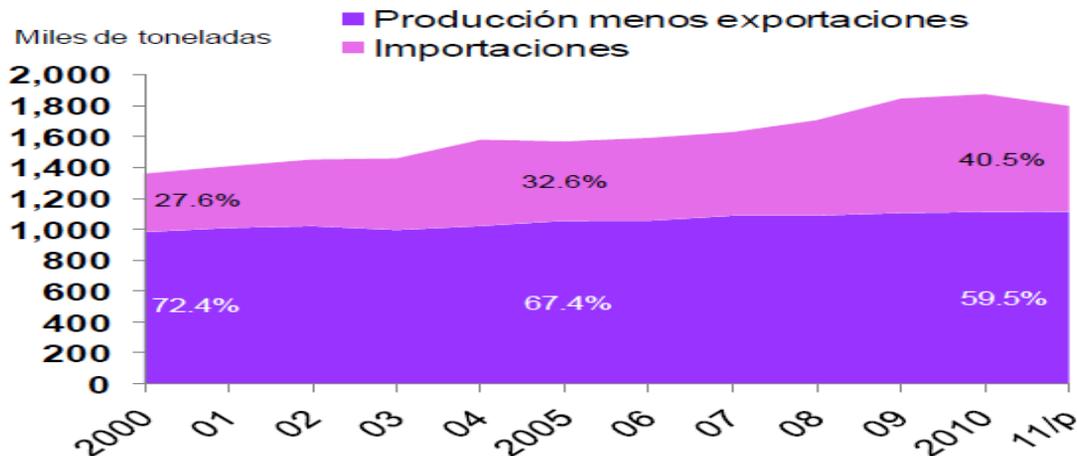


Gráfico 3.1-8 Consumo nacional aparente de carne porcino en México, exportaciones e importaciones

Comercio

En el año 2014 es 790,000 TM de CWE, (SNIIM, 2014) un poco por debajo de los datos oficiales del USDA y se baso en un ligero aumento de la producción, la demanda estable del sector de procesamientos para paletillas y jamones así como para otros cortes o carne deshuesada mecánicamente que tiene un precio competitivo en México (Financiera Rural., 2013).

La mayoría de las importaciones siguen siendo paletas y jamones así como carne deshuesada mecánicamente para la preparación de salchichas, jamones y otros fiambres. La estimación de 2012 para las importaciones se mantuvo invariable según los datos oficiales (México: mejores pronósticos de producción de cerdo no obstante la ped, 2014).

El porcentaje de participación de las importaciones en el consumo nacional aparente se ha incrementado de manera importante en los últimos años. México es un importador neto de carne de porcino, y el déficit que presenta la balanza comercial en dicho producto muestra una tendencia creciente. Las importaciones de carne de porcino aumentaron entre los años 2000 y 2011 como se muestra en el Gráfico 3.1-9.

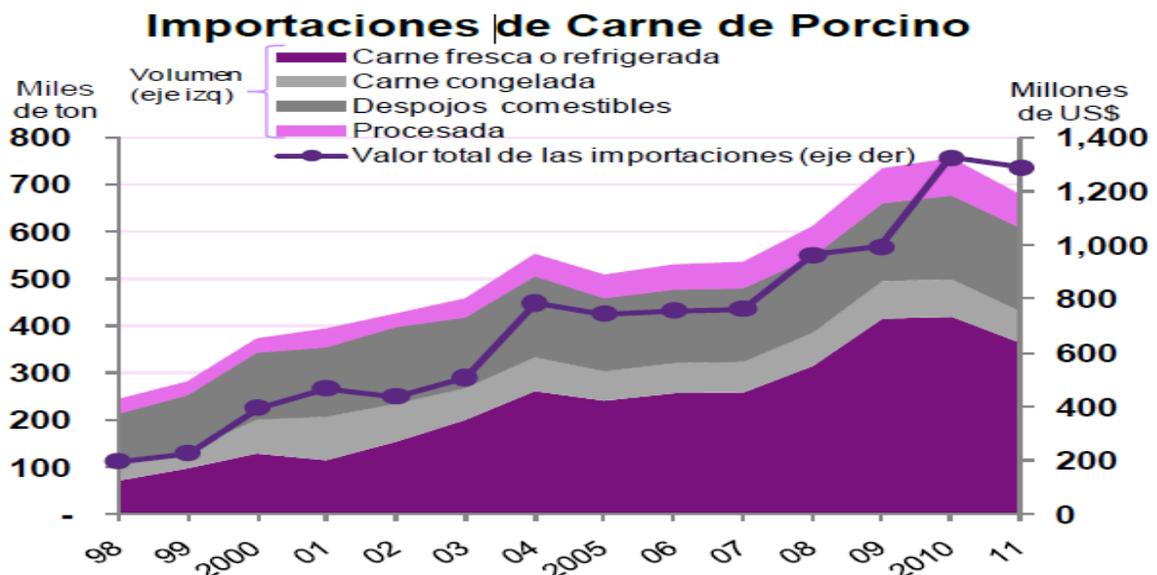


Gráfico 3.1-9 Importaciones de carne porcino: carne fresca, congelada, despojo y procesada.

En el 2011, los principales proveedores de carne de porcino de México fueron Estados Unidos y Canadá, con aportaciones de 87.7 % y 11.2 %, respectivamente. El 1 % restante provino de Chile, España, Dinamarca, Italia y Francia.

Japón sigue siendo el primer mercado de exportación por volumen y valor para México y no se espera que haya cambios en esta situación. Las exportaciones de carne de cerdo a Japón y los Estados son principalmente lomos mientras que las exportaciones a Corea del Sur es carne con hueso. (México: mejores pronósticos de producción de cerdo no obstante la ped, 2014).

Cerca de 80 % de la carne exportada en 2011 según el Gráfico 3.1-10 correspondió a carne congelada, la carne fresca o refrigerada aportó 16.9 %, la procesada 2.2 % y los despojos 1.4 %. La participación en el valor de exportación fue de 81.1 %, 16.6 %, 1.9 % y 0.4 %, respectivamente.

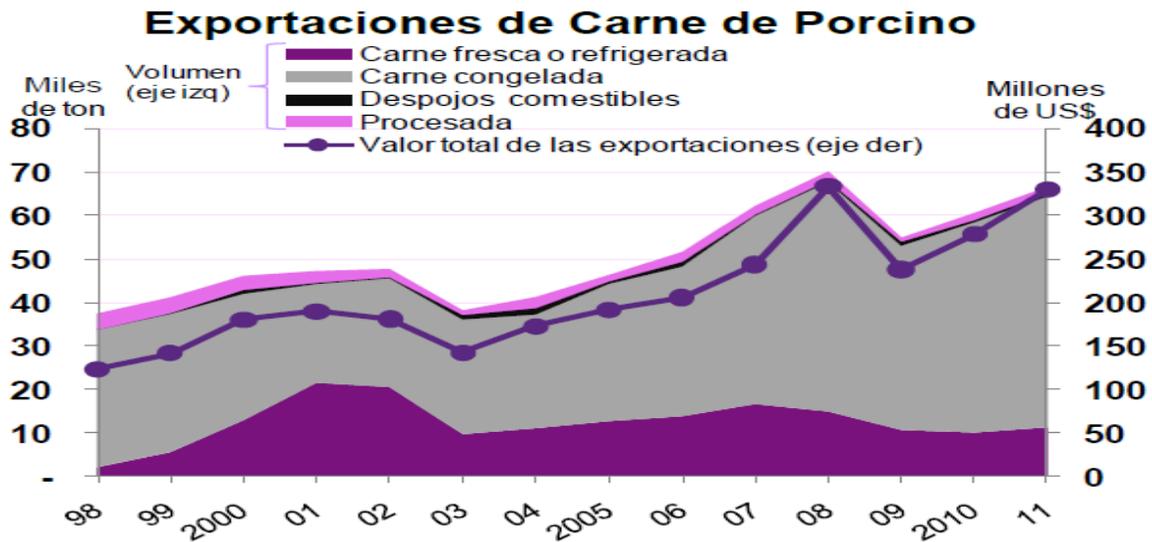


Gráfico 3.1-10 Exportaciones de carne porcina: carne fresca, congelada, despojos y procesada.

La tendencia del precio implícito de las exportaciones de carne congelada y carne fresca o refrigerada ha sido creciente, ese mismo año, Japón (75.3 %), Corea del Sur (16.7 %) y Estados Unidos (8.0 %), fueron los tres principales destinos de la carne congelada exportada. Hong Kong y Vietnam adquirieron, en conjunto, menos del 0.1 % del volumen exportado. Por otro lado, el 0.1 % de la carne congelada importada fue carne en canal,

4.1 % correspondió a piernas, paletas, y sus trozos sin deshuesar, y el restante 95.8 % a otro tipo de carne. El 90.8 % de las importaciones de carne congelada provino de Estados Unidos, Canadá contribuyó con 7.0 % y Chile con 2.2 %.

3.1.2 Mercado mundial

Producción

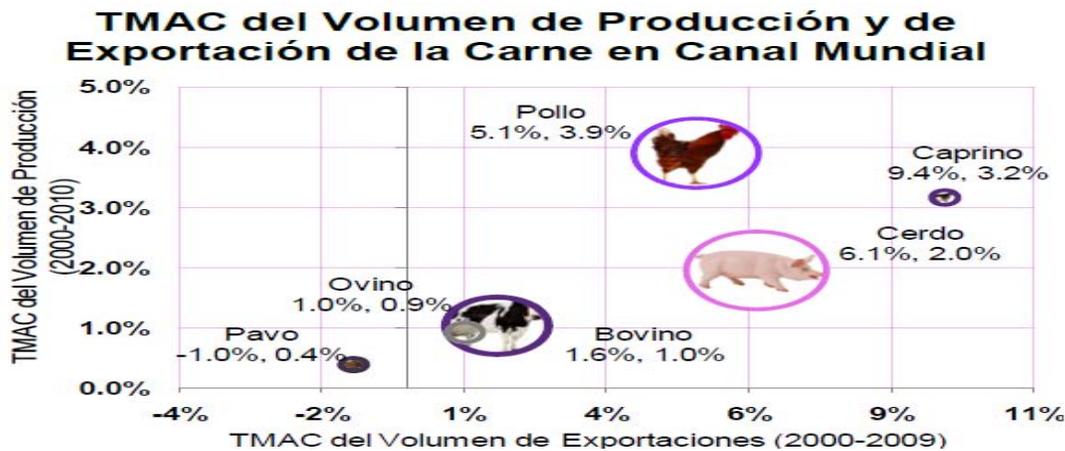


Gráfico 3.1-11 TMAC del volumen de producción y de exportación de la carne en canal mundial ●
Tamaño de la burbuja indica el volumen de producción 2010

Entre 2000 y 2010, como se observa en el Gráfico 3.1-11 la producción mundial de carne de porcino se incrementó de 90 a 109 millones de toneladas, lo que representó un crecimiento promedio anual de 2.0 %. China es el principal productor de carne de porcino en el mundo, al generar 47.3 % del total, sin embargo, la mayor parte de su producción es para consumo interno. Otros países sobresalientes son Estados Unidos (Marti, Johnson, & Mathews, 2014) (9.3 %), Alemania (5.0 %), España (3.1 %) y Brasil (2.8 %). México se ubica en el décimo sexto lugar, con una aportación de 1.1 % Gráfico 3.1-12.

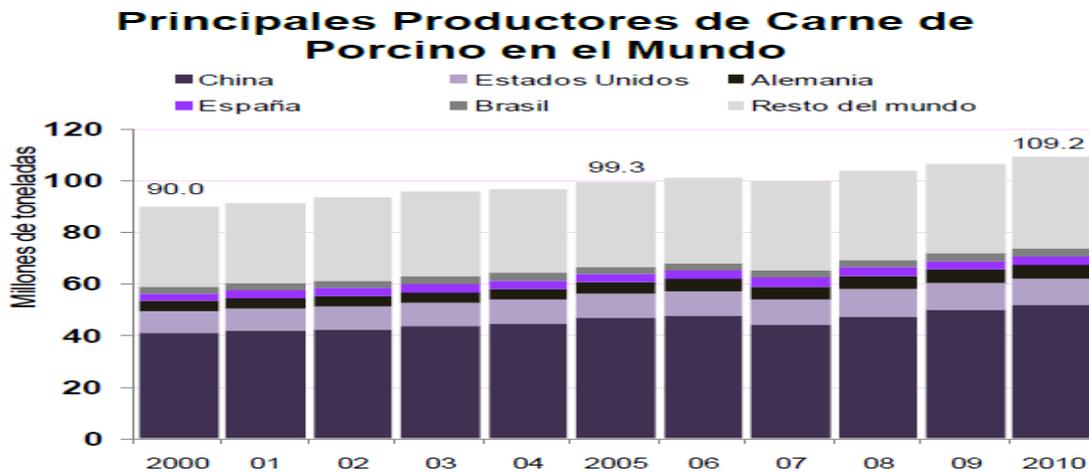


Gráfico 3.1-12 Principales productores de carne de porcino en el mundo

China, la Unión Europea y Estados Unidos son responsables de más del 86 % de la producción mundial, equivalente a 1.086 millones de cabezas de cerdo Figura 3.1-B. Dentro de la Unión Europea se destacan Alemania y España como principales productores. Otros países que se destacan son Brasil, Rusia y Canadá (Sitio Porcino, 2014).

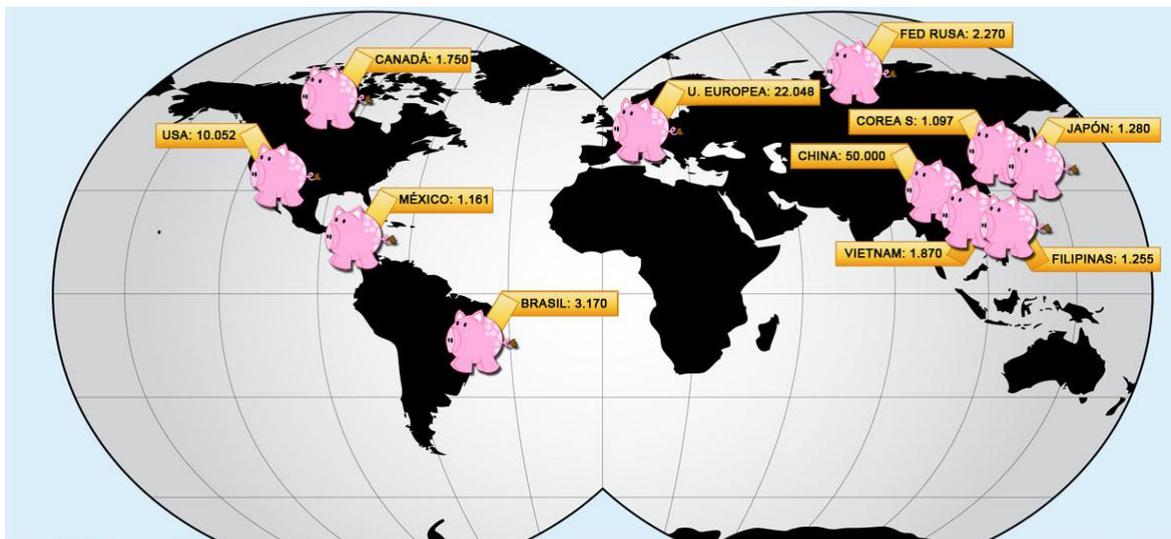


Figura 3.1-B Productores de carne de cerdo mundial

La producción mundial de carne de cerdo ha tenido un incremento constante, (Gráfico 3.1-13) y las estimaciones son que seguirá creciendo. También el comercio de la carne se ha intensificado a pesar de las enfermedades y barreras sanitarias.



Gráfico 3.1-13 Producción mundial de carne de cerdo

Consumo

Los principales países consumidores de carne de cerdo son los países asiáticos y Europeos como se observa en el Gráfico 3.1-14.

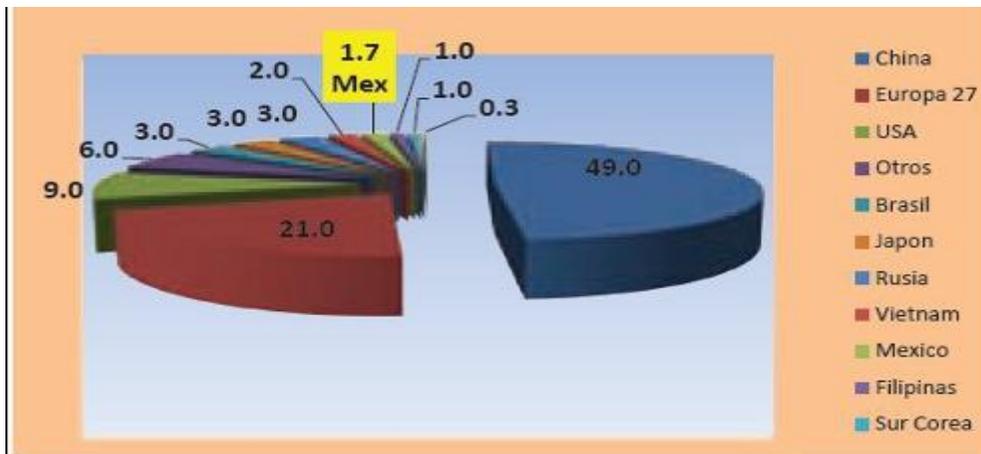


Gráfico 3.1-14 Porcentaje del consumo mundial de la carne de cerdo

Hong Kong encabeza la lista de los principales países consumidores de carne porcina con más de 74 kilogramos anuales per cápita para el año 2013 Gráfico 3.1-15, prácticamente duplicando al segundo de la lista. Estados Unidos, Rusia, China y Taiwán rondan los 40 kilogramos anuales. Se destacan también Suiza y Corea del Sur con 32 kilogramos per cápita anuales cada uno.

Resalta que de los 7 principales países consumidores de cerdo en el mundo, 4 pertenecen al continente asiático.

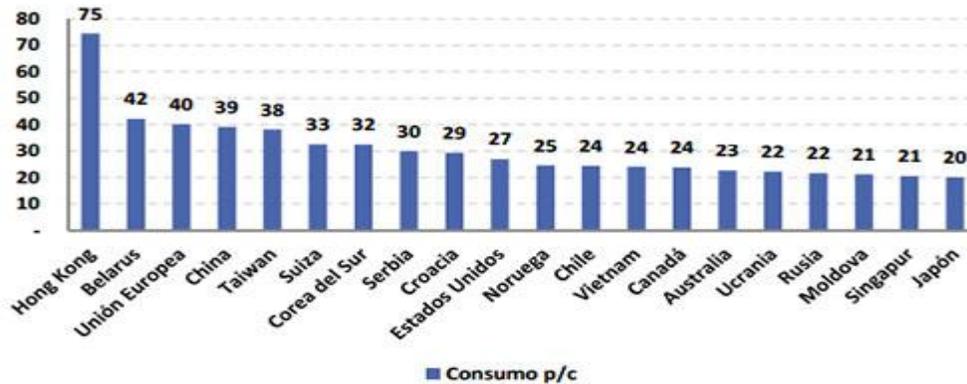


Gráfico 3.1-15 Principales países consumidores de cerdo en el mundo

3.1.3 Importancia de la eficiencia en canal

La carne en canal de cerdo es el cuerpo del animal sacrificado, después del sangrado y eviscerado, entero o partido por la mitad, sin lengua, cerdas, pezuñas, genitales, manteca, riñones ni diafragma. Aproximadamente, la carne en canal de cerdo en nuestro país representa un 76% del peso del cerdo en pie y como se mostro anteriormente posee un valor mayor que el de carne en pie, al igual en el comercio internacional posee un mayor valor en canal siendo la más vendida.

3.1.4 Panorama del uso de los agonistas β - adrenérgicos como promotores de crecimiento

Son una clase de medicamentos que se utilizan sobre todo para el tratamiento de las arritmias cardíacas, asma, etc. Estos compuestos se utilizan principalmente en la medicina humana y veterinaria como agentes tocolífticos y broncodilatadores. También son ampliamente utilizados como promotores de crecimiento en la producción ganadera. (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009). Dando la acumulación de proteínas y la disminución de la lipogénesis. (Chevolleau & Tulliez, 1995).

De acuerdo con un artículo publicado en el Journal of Animal Science en 1998, (Rosenberg, , 2013) hay datos sobre la "intoxicación humana tras el consumo de hígado o carne de bovinos tratados con beta- agonistas". Los autores escriben:

"El uso de beta-agonistas de gran actividad como promotores del crecimiento no es apropiada debido al peligro potencial para la salud humana (Kuiper, Noordan, Dooren-Flipsen, Schilt, & Roos, 1998) y animal, como se ha concluido recientemente en la Conferencia científica sobre promoción del crecimiento en la producción de carne (Noviembre 1995, Bruselas)". No se sabe hasta qué punto el residuo que se encuentra en la carne para el consumo humano podría afectar a las personas, pero numerosos problemas de seguridad han apoyado las restricciones sobre su uso. (We care, 2014), (Wang, Zhang, Wang, Shi, & Ye, 2010).

Cabe señalar según Aberg que los efectos beneficiosos de los agonistas de los receptores beta adrenérgicos sobre el crecimiento de tejido muscular y la disminución de los tejidos de grasa son de duración relativamente corta en la mayoría de los animales, que es probablemente debido a la baja regulación de los receptores beta adrenérgicos. En resumen, esto significa que las células del cuerpo por mecanismos desconocidos tienen la capacidad para protegerse de la sobre-estimulación adrenérgica disminuyendo el número de receptores disponibles para la estimulación por un fármaco agonista beta-receptor. Según Gunnar su método ayuda para promover el crecimiento muscular, la disminución de los depósitos de grasa o mejorar la eficiencia de la alimentación de los animales, promover el crecimiento muscular (efecto anabólico), promover pérdida de peso en animales y en seres humanos, mejorar la relación de músculo y grasa de animales etc. (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014).

Sin embargo para consumo humano no está bien visto por causar tantos efectos secundarios en el humano y animales.

Acción de los β -Agonistas

1) Estructura

Los Fármacos beta-adrenérgicos agonistas contienen característicamente como parte de su estructura química una etanolamina o 2-amino-etanol, un anillo de benceno y una cadena en la amina como se observa en la Figura 3.1-C.

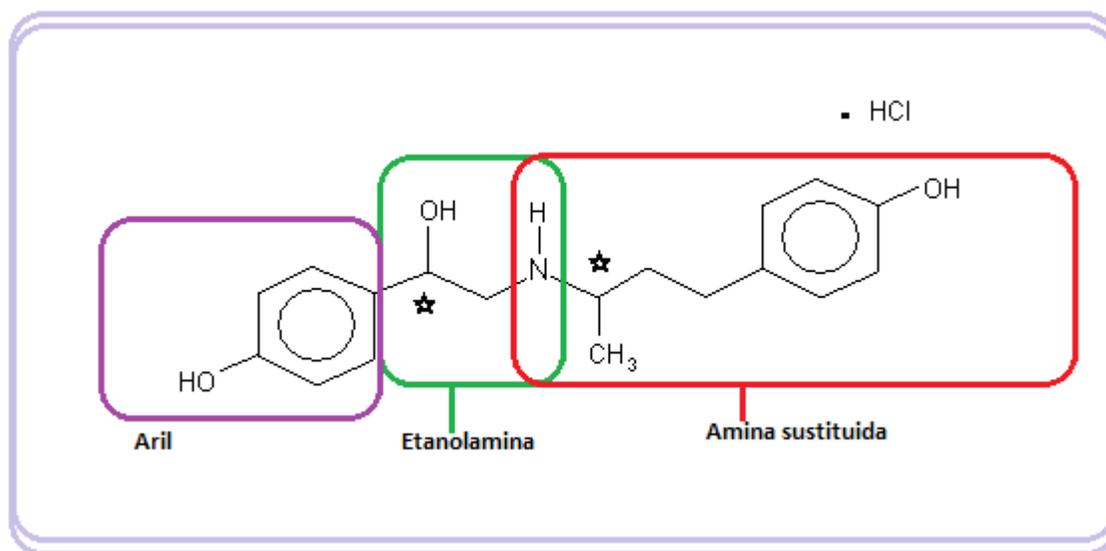


Figura 3.1-C Ejemplo de los componentes de los beta adrenérgicos utilizando programa Chemoffice 2004

Dado que las estructuras químicas de estos medicamentos generalmente comprenden al menos un átomo de carbono asimétrico, estos fármacos comúnmente existen en forma de isómeros ópticamente activo, con el átomo de carbono que tiene un centro quiral de configuración (R) o (S). Cuando hay un átomo de carbono asimétrico único presente, existen los agonistas de los receptores beta como individual (R) o (S) enantiómeros o en forma racémica (RS), es decir, como una mezcla de aproximadamente 50:50 de (R) y (S) enantiómeros. Los compuestos con dos centros quirales, tales como ractopamina tienen cuatro isómeros, que son los isómeros RR, SS, RS y SR. (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014). Como se observa en la figura anterior (Figura 3.1-C).

Los enantiómeros R (-) presentan un mayor poder de activación de los β_2 -adrenoreceptores que su enantiómero S (+). (G. Pérez, 2004).

Todos los agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 (caso de la ractopamina) tienen un centro asimétrico debido a la presencia de un grupo β -OH. La presencia de un centro de resultados asimétricos en la molécula existente como un par de isómeros ópticos (o imágenes de espejo), referido como el R- y S-enantiómeros (o [-] y [+]), en una mezcla racémica).

Es una característica de la mayoría de los sistemas biológicos que son específicas esto es cierto de las interacciones β_2 -agonista/receptor. Es claro que la actividad se encuentra predominantemente en el enantiómero R, probablemente como resultado de una interacción óptima entre la orientación hacia abajo del grupo β -OH por lo que el enantiómero R será 100 veces más potente que el enantiómero S y este será mayor a los RR y SS (Johnson, 2006).

3.2 Ractopamina

El clorhidrato de ractopamina es un fármaco que pertenece a un grupo de compuestos llamados β_2 -agonistas adrenérgicos, (Index, 2015) estos se utilizan en la medicina humana y veterinaria para el tratamiento de enfermedades pulmonares como broncodilatadores, tocolíticos y tónicos cardíacos (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009) Además de su uso, estos fármacos son a menudo mal utilizados como promotores del crecimiento, para mejorar la composición de la canal por la disminución de la grasa en beneficio de la masa muscular.

El clorhidrato de ractopamina es un fármaco aditivo en veterinaria que aumenta la cantidad de carne magra y disminuye la cantidad de grasa de la canal cuando se alimenta a los cerdos durante las últimas semanas dando 50 kg de ganancia. (Additives, 2004), (Ungemach Fritz, 2004). Recientemente, se ha vuelto aun más popular no sólo en la producción de cerdo, sino también en la producción de pollos y ganado.

La FDA aprobó la ractopamina para su uso en la alimentación de cerdos en 1999, pero desde entonces el efecto potencial de los residuos de medicamentos en los seres humanos y el medio ambiente ha sido cuestionado. Varios gobiernos, entre ellos la Unión Europea, China y Rusia han prohibido la importación de cerdos alimentados con ractopamina, diciendo que no saben lo suficiente sobre la seguridad del medicamento para aprobarlo en animales destinados al consumo.

Recientemente está prohibido en 160 países ya que ha sido declarado no apto para el consumo humano debido a las preocupaciones de sus efectos negativos sobre la salud humana y animal. Debido a sus posibles riesgos para la salud humana, la ractopamina está siendo utilizado de manera restringida dentro de un límite bajo de la dosis cuando se

utiliza en la producción de ganado, en muchos países. (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009).

3.2.1 Generalidades de la ractopamina

La ractopamina Figura 3.2 A es un fármaco agonista de los receptores β adrenérgicos que se utiliza para la mejora de la ganancia de peso, la delgadez de la canal y eficiencia alimenticia en cerdos. (Dr. Ritter, 2014), (Additives, 2004), (Ungemach Fritz, 2004). De acuerdo a las cantidades por ejemplo se recomienda para su uso de cerdos en engorda una dosis de 5-20 mg / kg de alimento para mejorar la eficiencia de la alimentación y aumentar el peso, o a 10-20 mg / kg de pienso para mejorar la delgadez de canal. La dosis recomendada para el ganado acabado es de 10-30 mg / kg de alimento para mejorar la eficiencia alimenticia y para aumentar la ganancia de peso y la delgadez de canal. (Ungemach Fritz, 2004).

El fármaco, que también se utiliza en medicamentos para el asma, fue reclutada inicialmente para su uso en el ganado cuando los investigadores descubrieron que los ratones aumentaron su masa muscular.

Curiosamente, el aumento de peso es también una queja común entre los pacientes con asma que usan Advair (una droga beta-agonista).

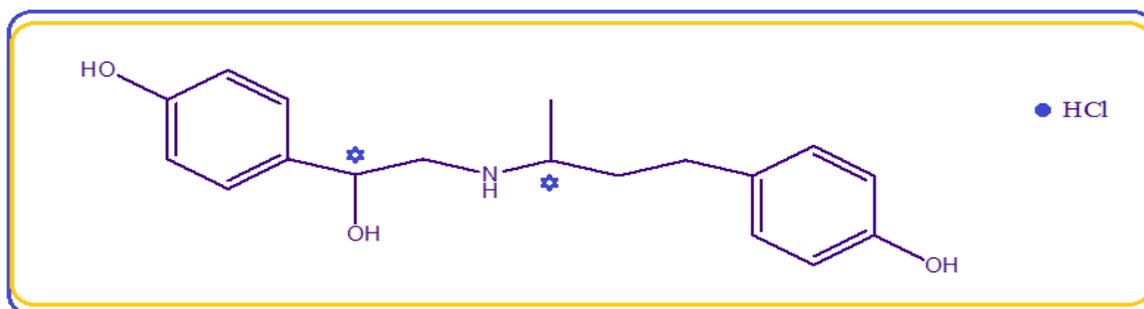


Figura 3.2-A Estructura de la ractopamina utilizando programa Chemoffice 2004

El clorhidrato de ractopamina existe en dos formas diastereoméricas resultante a partir de la presencia de dos carbonos quirales, mostrado en la Figura 3.2-A en paréntesis y es actualmente comercializado como una mezcla racémica de los cuatro estereoisómeros RR, RS, SR, SS en proporciones aproximadamente iguales. Con una pureza mínima del 92%. El isómero RR es un cardioestimulante potente en los seres humanos,



incrementando la frecuencia cardiaca de leve a moderada dependiendo de la dosis que sea administrada, así como cambios del comportamiento y nerviosismo en los seres humanos, ganado porcino, bovino, y aves.

3.2.2 Controversia del uso de la ractopamina a nivel mundial y nacional.

Uso Mundial

Actualmente la Ractopamina está prohibida en 160 países ya que ha sido declarado no apto para el consumo humano debido a las preocupaciones de sus efectos negativos sobre la salud humana y animal. Debido a sus posibles riesgos para la salud humana, la ractopamina está siendo utilizado de manera restringida dentro de un límite bajo de la dosis cuando se utiliza en la producción de ganado, en muchos países. (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009).

En un esfuerzo por conseguir que este aditivo peligroso quede fuera de los productos cárnicos estadounidenses, el Centro para la Seguridad Alimentaria (CSA) y el Fondo de Defensa Legal de los Animales (ALDF) demandaron a la Food and Drug Administration (FDA) por los registros de retención relativos a la seguridad de la ractopamina, según lo informado por Rosenberg (Rosenberg, , 2014).

En febrero de 2013, Rusia prohibió la importación de carne con ractopamina de Estados Unidos (Barry, 2014) y ahora sólo permite que la carne de cerdo y carne de res en el país con la confirmación de que está libre de cualquier rastro de drogas.

Según lo informado por Pravda (Garina, 2014) Rusia es el cuarto mayor importador de carne de Estados Unidos, generando alrededor de \$ 500 millones de dólares en carne de res y de cerdo al año.

En 2007, China se apoderó de los envíos de carne de Estados Unidos y denunció que las costillas congeladas, orejas de cerdo y salchichas carcasa contenían ractopamina. Este año, cuando los EE.UU. se negaron a cumplir con la certificación de producto libre de ractopamina, Rusia cerró su mercado a la carne estadounidense, cerdo y pavo.



Uso Nacional

En México también se utiliza dicho fármaco como modulador metabólico en cerdos y bovinos en la etapa de finalización. En cerdos se utiliza a una dosis de 5 a 10 ppm para aumentar la ganancia de peso y mejorar la conversión alimenticia, así mismo incrementar la dosis de 10 a 20 ppm aumenta la magrez de la canal y el porcentaje de rendimiento de la misma. (PiSA, 2013), (Porcicultura, 2013).

A pesar de que las autoridades sanitarias digan que la carne está fuera de estos aditivos así de igual manera en el 2013 cuando comenzó el rechazo de carne a Rusia, México tuvo problemas y Rusia también limitó la entrada de la carne a su país, aunque SAGARPA hace mención del rechazo de la ractopamina en carne porcina, bovina y aves. (FAO, 2013).

3.2.3 Propiedades físicas, químicas y biológicas

3.2.3.1 Propiedades físicas

La ractopamina es un sólido de color blanco, tiene un peso molecular de 337.84 g/mol, con una pureza mayor al 99 %, es soluble en metanol, DMSO y agua. Tiene un punto de fusión de 124-129° C (Ractopamine hydrochloride (CAS 90274-24-1), 2013).

3.2.3.2 Propiedades químicas

La ractopamina Figuras 3.2-B y 3.2-C tiene la fórmula molecular $C_{18}H_{23}NO_3$ HCl y se prepara típicamente como una sal de hidrocloreto la cual se obtiene por síntesis no estereoselectiva. Tiene los nombres según la IUPAC (hidrocloreto) de: **1)** 4-(-2-(4-p-ilbutan-2-ilamino)-1-hidroxietil)fenol; **2)** 4-(1-hidroxi-2-{{4-(4-hidroxifenil)butan-2 il}amino}etil)fenol; **3)** 4-(2{{3-(4-hidroxifenil)-(1-metil-propil}amino)-1-hidroxietil}fenol (Ractopamine hydrochloride (CAS 90274-24-1), 2013). El término ractopamina HCl se refiere a la sal de hidrocloreto de RR / SS / RS / SR. Por lo tanto es la sal de clorhidrato de una mezcla de los cuatro isómeros en proporciones aproximadamente iguales.

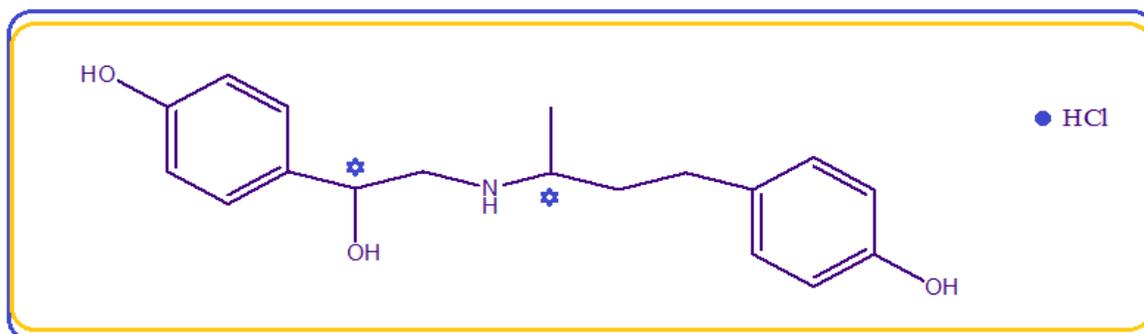


Figura 3.2-B Estructura de la ractopamina utilizando programa chemoffice 2004: 1) 4-(2-(4-p-ilbutanil-2-ilamino)-1-hidroxi-etil) fenol 2) 4-(1-hidroxi-2-[4-(4-hidroxi-fenil) butan-2-il] amino} etil) fenol 3) 4-(2{[3-(4-hidroxi-fenil)-(1-metil-propil] amino}-1-hidroxi-etil) fenol.



Figura 3.2-C Estructura de la ractopamina utilizando programa chemoffice 2004.

De los cuatro isómeros de la ractopamina, se sabe que RR-ractopamina es la más potente, tanto cuando se probó in vitro (Mills, Kissel, Bidwel, & Smith, 2003). Por lo tanto, cuando se prueba la afinidad de unión para los receptores β_2 adrenérgicos el isómero RR-ractopamina es alrededor de 2,5 veces más activo que la mezcla de todos los cuatro isómeros (Mills, Kissel, Bidwel, & Smith, 2003).

La sal de HCl del isómero RR de la ractopamina se llama Clorhidrato de Butopamina, y ha sido probado como un estimulador cardíaco para los seres humanos (J. Thompson & al, 1980).

Ahora se ha encontrado que la RR-ractopamina no es un compuesto quiralmemente estable, ya que puede epimerizar en un corto lapso de tiempo de un sólo día. La epimerización se ve facilitado por un aumento de la temperatura y/o humedad. En contraste, la mezcla RR/SR de ractopamina es isoméricamente estable según dice Aberg (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014).



Otro estudio dice que se ha encontrado rotación óptica en el sitio de metanol pero no el "OH". Por lo tanto, los isómeros de ractopamina con configuración S en el sitio "Metilo" causan estrés, mientras que la misma molécula con la configuración R correspondiente no causó estrés. Así pues, ni RR-ractopamina ni SR-ractopamina causaron estrés (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014) por tanto la inestabilidad óptica de enantiómeros ractopamina es importante ya que afecta particularmente a RR-ractopamina. Así, desde RR-ractopamina es inestable en el "OH-sitio", se está formando SR-ractopamina por epimerización disminuyendo así gradualmente en potencia.

3.2.3.3 Propiedades biológicas

La Ractopamina es una molécula orgánica que se une a los receptores β -adrenérgicos a nivel de la membrana celular, dando lugar al complejo agonista-receptor, que a su vez activa a la proteína Gs1. La subunidad α de la proteína Gs activa a la adenilato ciclasa, enzima que produce el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), una de las principales moléculas de señalización intracelular. (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014), (Wallukat & Herz, 2002)

Esta molécula produce su efecto al unirse a la subunidad reguladora de la proteína quinasa A, para liberar la subunidad catalítica que fosforila a un gran número de proteínas intracelulares. Las proteínas intracelulares tienen papeles funcionales vitales para una gama de funciones que van desde permitir la entrada del Ca^{++} a la célula, hasta mediar la síntesis de proteínas, clave para el funcionamiento celular (L. Brunton, S.Lazo, & L.Parker, 2007).

Actúa directamente sobre la utilización de los nutrientes de la acumulación de grasa hacia la síntesis de proteína, de manera que hay un incremento en la carne magra contenida en las canales de los animales que fueron alimentados con dietas a las que se les adicionó el producto.

Estudios con ^{14}C -ractopamina en varias especies animales indicaron una rápida absorción después de la administración oral. La vida media de eliminación fue aproximadamente 7 h para hombres y mujeres. Se analizaron y se dieron cuenta que el hígado y los riñones de animales contenían tres principales metabolitos de la ractopamina (Metabolitos A, B, y C

por conjugación del grupo hidroxilo en el anillo A o el anillo B y son cromatográficamente distintas como se observa en la Figura 3.2-D tanto en personas como en los cerdos (Dr. Ritter, 2014).

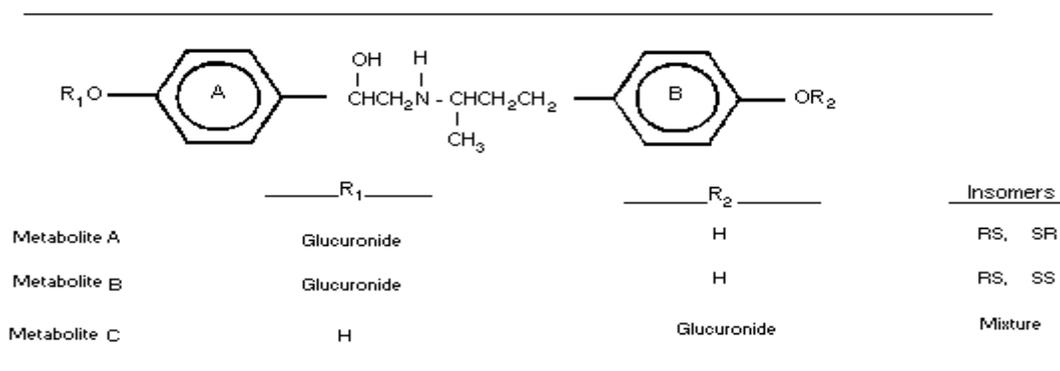


Figura 3.2-D Metabolitos de la ractopamina en puercos, ratas y perros

La ractopamina es también conocido por afectar el sistema cardiovascular humano, y se cree que es responsable de la hiperactividad. También puede causar anomalías cromosómicas y cambios de comportamiento.

Se absorbe bien en una serie de animales y es excretado rápidamente con la orina como principal vía de excreción biliar, sin embargo depende la especie (Additives, 2004).

3.2.4 Productos comerciales disponibles

La ractopamina está disponible comercialmente bajo los nombres comerciales PAYLEAN®, Elanco (Paylean, 2013) Paylean 20 g contiene clorhidrato de ractopamina en 20 g/kg para cerdos, OPTAFLEX®, Elanco 100 g contiene clorhidrato de ractopamina en 100 g/kg; para ganado, Engain 20 g contiene clorhidrato de ractopamina en 20 g/kg (Zoetis Canadá Inc.) y Actogain 100 contiene clorhidrato de ractopamina en 100 g/kg (Zoetis Canadá Inc.), Nutriplex PMC-PL, Nutriplex MB-PL (Toluca, México) (Nutriplex PMC-PL, 2013) y TopMax para los pavos. Se usan como promotores del crecimiento para el ganado, para su uso en comida o alimentación (pellets) para el acabado de machos castrados y hembras confinadas, ganado de ceba y en el acabado de pavos pesados solamente, también está indicada para aumentar la tasa de ganancia de peso, mejorar la

eficiencia alimenticia, aumentar el porcentaje de rendimiento de canal e incrementar la carne magra en cerdos en finalización recibiendo una dieta nutricionalmente balanceada.

3.2.5 Métodos analíticos reportados para la determinación de la ractopamina

Recientemente, residuos de medicamentos veterinarios se han convertido en un asunto de interés público debido a posibles efectos adversos en la salud humana debido al arrastre de drogas de los animales a la dieta humana.

La ractopamina, un fármaco aditivo veterinario, fue aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para el uso en la producción porcina. Recientemente, se ha vuelto más y más popular no sólo en el cerdo, sino también en la producción de pollos y ganado, a raíz del clenbuterol que habían sido los agonistas más utilizados en la producción ganadera. Debido a sus posibles riesgos para la salud humana, la ractopamina está siendo utilizado de manera restringida dentro de un límite bajo de la dosis cuando se utiliza en la producción de ganado, en muchos países. (Zhang, Wang, Fang, & Wang, 2009).

Por lo tanto, ha presentado un creciente número de métodos analíticos reportados para supervisar y detectar la ractopamina en la orina animal, los piensos, y tejidos tales como:

Los métodos que utilizan HPLC con detector electroquímico, detector UV) y detector de fluorescencia. (Yongfei, Xionge, Huhua, & Congying, 2015) (Shishani, Chai, Jamokha, & Aznar, 2003). Incorporados a MS, a extracción en fase sólida (SPE). (Y.Zhang, Chang, Dong, He, & Yang, 2009). (Es un método complicado y costoso). Estos métodos son sensibles, pero generalmente requieren tratamientos previos complicados y también se consume mucho tiempo para la detección de niveles de partes por billón (ppb) de ractopamina.

Otros reportes encontrados son utilizando UPLC/MS/MS (Pleadin, Vulie, & Persi, 2015) siendo un método costoso y LC/MS (Sakai, Hotomi, Kai, Murayama, M., & Maitani, 2007), (Wu, Liu, & Peng, 2014) (utilizando una fase móvil de 0.05 % de ácido trifluoroacético: acetonitrilo (85:15 y 80:20) teniendo tiempos de 9.90 y 4.69 min respectivamente) los cuales suelen ser un poco costosos.

Por último, existen reportes usando la técnica de EC con detector UV y arreglo de diodos (Chevolleau & Tulliez, 1995) utilizando 2 estrategias (a) con un capilar de sílice fundida y (b) con un capilar unido a una fase estacionaria C₁₈, Buffer de Tris 50 mM, pH 8,3, 30 kV, T: 25°C a 200 nm, presentándose tiempos de migración de 3.58 y 5.74 min respectivamente). Otra publicación usa la técnica de EC con un detector electroquímico (ED) (Wang, Zhang, Wang, Shi, & Ye, 2010), utilizando un capilar 75 cm, i.d 25 µm, un buffer 100 mM de boratos, pH: 9.0, 14 kV, siendo aplicado el método a muestras de hígado y orina. La concentración de ractopamina utilizada en la publicación fue de 5 µg/mL, obteniendo un tiempo de migración de 10 min. Cabe hacer mención que en ninguna publicación a la fecha, se ha analizado la ractopamina en alimento para animales.

3.3 Validación de un método analítico

La validación analítica, consiste en el establecimiento de una evidencia documentada que demuestre con alto grado de probabilidad, que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

3.3.1 Parámetros de validación

Las características de desempeño del método analítico se expresa en función de los siguientes parámetros analíticos según la Guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos México, A.C (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

3.3.1.1 Precisión del sistema

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

3.3.1.2 Linealidad del sistema

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

3.3.1.3 Especificidad

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes.

3.3.1.4 Exactitud y repetibilidad del método

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

3.3.1.5 Precisión del método

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea cuando esta se encuentra en la matriz a medir.

3.3.1.6 Linealidad del método

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito cuando este se encuentra en la matriz de la muestra.

3.3.1.7 Límite de detección

Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

3.3.1.8 Límite de cuantificación

Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.

3.4 Estereoquímica

La estereoquímica es la química de 3 dimensiones sus fundamentos fueron establecidos por Jacobus Van't Hoff y Joseph Achille Le Bel en 1874 y Pasteur logrando la primera resolución quiral de una mezcla racémica en isómeros ópticos. (J. Ward & Ward, 2012) Ellos propusieron de manera independiente que los 4 enlaces el carbono estaban dirigidos hacia los vértices de un tetraedro una consecuencia de un arreglo tetraédrico de los enlaces del carbono Figura 3.4-A es que dos compuestos pueden ser diferentes

debido a que el arreglo de sus átomos en el espacio es diferente. (Francis & Carey, Estereoquímica, 2006).

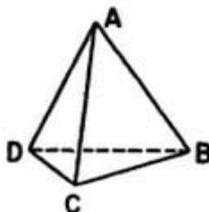


Figura 3.4-A Representación de un tetraedro

Los isómeros que tienen la misma constitución pero difieren en el arreglo espacial de sus átomos son llamados estereoisómeros. (Rudolph Macy, 2005)

3.4.1 Quiralidad

La palabra "quiral" se deriva de la palabra griega 'cheir', lo que significa mano. Las moléculas quirales son moléculas que están relacionados entre sí de la misma manera que una mano izquierda se relaciona con una mano derecha. Estas moléculas Figura 3.4-B son espejo imágenes de uno al otro y no son superponibles (J. Ward & Ward, 2012).

En 1984 William Thompson estableció que un objeto es quiral si no es superponible con su imagen especular aplicando el término de Thompson a la química se dice que una molécula es quiral y sus dos formas de imagen especular no son superponibles en tres dimensiones. La palabra quiral es apropiada para hablar de la lateralidad de las moléculas lo opuesto de quiral es aquiral una molécula que es superponible en su imagen especular es aquiral en química orgánica la quiralidad ocurre con más frecuencia en moléculas que contienen un carbono unido a cuatro grupos diferentes.

Los estereoisómeros son los átomos que están conectados en el mismo orden pero difieren en el arreglo de sus átomos en el espacio los estereoisómeros que se relacionan con un objeto y su imagen especular no superponible Figura 3.4-B se clasifican como enantiómeros la palabra enantiómero describe una relación particular entre dos objetos (Francis & Carey, Química orgánica, 2006).

En 1996 la IUPAC recomendó que un átomo de carbono tetraédrico que lleva cuatro átomos o grupos diferentes fuera llamado centro de quiralidad.

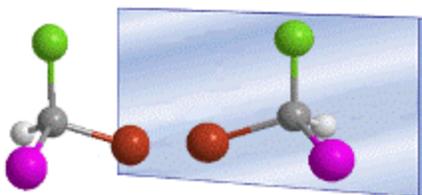


Figura 3.4-B Átomo tetraédrico con su imagen especular

Cuando una molécula contiene 2 centros quirales, que es el caso de la ractopamina, el número de estereoisómeros se calcula utilizando la fórmula de 2^n , donde “n” son el número de carbonos quirales, es decir, para el caso de la ractopamina serán 2^2 que son 4, dos de éstos serán enantiómeros entre sí (imágenes especulares) y los otros dos serán diastereómeros.

3.4.1.1 Notación R/S de Cahn-Ingold-Prelog

El sistema de Cahn Ingold Prelog es el método estándar de notación de la estereoquímica desarrollada para abordar el problema de la configuración absoluta en un centro de quiralidad (Francis & Carey, Química orgánica, 2006). A continuación se muestran las reglas de secuencias para especificar la configuración absoluta en el centro de quiralidad.

Para dar notación R o S a un centro quiral es necesario asignar prioridades a los sustituyentes mediante las siguientes reglas:

- ♣ **Regla 1** Se identifican los sustituyentes en el centro de quiral y se clasifica en orden de prioridad decreciente de acuerdo las prioridad de los átomos unidos al carbono quiral y éstas se dan por números atómicos, en el caso de isótopos tiene prioridad el de mayor masa atómica (las prioridades se dan por orden de número atómico de los átomos unidos directamente al carbono asimétrico).
- ♣ **Regla 2** Se orienta la molécula de modo que el átomo o grupo de menor prioridad apunta alejándose de usted cuando dos o más sustituyentes unidos al centro quiral tenga la misma prioridad se continúa comparando las cadenas átomo hasta encontrar un punto de diferencia.
- ♣ **Regla 3** Los dobles enlaces o triples se desdoblamos y se toman como si fueran enlaces sencillos.

- ❖ **Regla 4** Para asignar notación “R” o “S” seguimos el orden de prioridades a b c de los sustituyentes. Si esta sucesión se realiza en el sentido de las manecillas del reloj se dice que el centro es “R” (rectus, del latín derecha). Si se sigue el sentido contrario a las manecillas del reloj, se dice que es “S” (sinister del latín izquierdo).

En la Figura 3.4-C se aprecia la notación R/S de una molécula con 2 centros quirales.

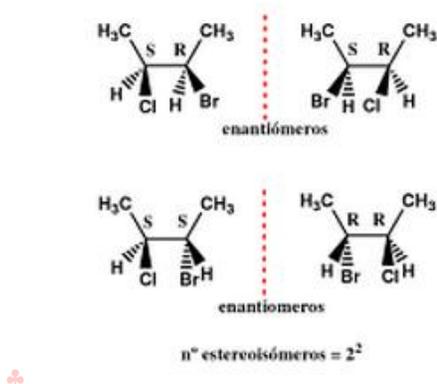


Figura 3.4-C Enantiómeros, notación R/S de una molécula con 2 centros quirales

3.4.2 Quiralidad y su importancia en fármacos

En las últimas dos décadas, en particular en la industria farmacéutica, existe un gran interés en la quiralidad de los medicamentos. Este interés es atribuido principalmente al conocimiento de las diferencias farmacológicas y toxicológicas que existen entre los enantiómeros de una misma sustancia (A. Goodman-Gilman, 1985.).

De los 200 medicamentos más prescritos, 114 contienen al menos un centro quiral y de éstos 75 a 90 % son marcados racematos, es decir, el principio activo contiene una proporción de su isómero. Generalmente, uno de los enantiómeros tiene la mayor actividad biológica y la otra menor actividad o incluso puede ser inactivo, pero algunas veces el otro enantiómero puede llegar a ser tóxico (D.E. Drayer, 1988). Debe entonces probarse si los isómeros poseen la misma actividad biológica para poder comercializarlo como mezcla racémica y si no es así, se debe sintetizar como enantiómero puro.

Debido a los posibles efectos secundarios que puede producir la presencia indeseable de uno de los componentes de la mezcla racémica, la tendencia actual de la industria

farmacéutica es la de preparar principios activos con uno solo de los enantiómeros. Todo esto con la finalidad de mejorar la especificidad y la seguridad de dichos productos. Por lo mismo, la quiralidad de los compuestos se ha convertido en una parte integral de la investigación y desarrollo de los medicamentos (FDA, FDA Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, 1992). Lo mismo sucede con agroquímicos (pesticidas, herbicidas), fragancias, contaminantes atmosféricos, nutrientes alimenticios etc.

La FDA (USA Food and Drug Administration), así como los organismos reguladores en Europa, China y Japón han aprobado normas en las que se menciona que solo uno de los enantiómeros de los principios activos quirales debe ser incluido en el medicamento para ser comercializado (FDA, FDA Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, 1992) (W.E., 1993). También se menciona que para que un medicamento nuevo sea aprobado deben ser estudiados los efectos farmacológicos y rutas metabólicas para cada uno de los enantiómeros.

3.4.3 Quiralidad de la ractopamina

La estructura en la Figura 3.4-D representa al clorhidrato de ractopamina el cual posee 2 centros quirales mostrados con asteriscos (*).

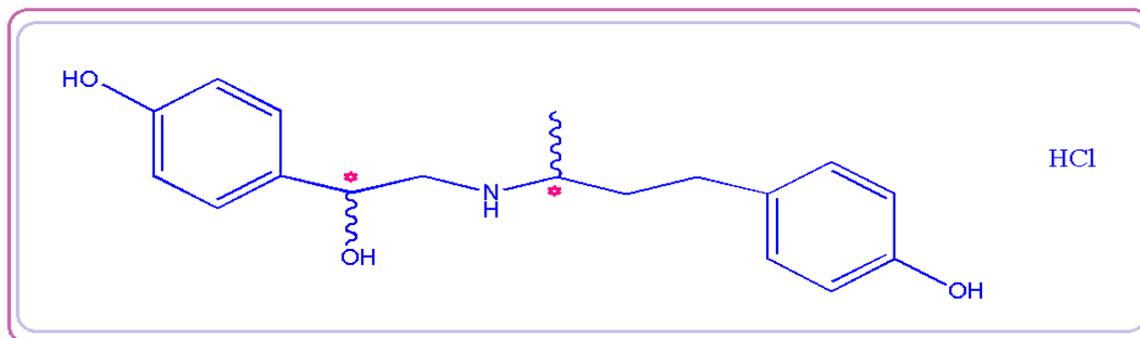


Figura 3.4-D Estructura del clorhidrato de la ractopamina mostrando sus centros quirales con programa chemoffice 2004.

En el Anexo 2 se puede ver los estereoisómeros de la ractopamina que son 4 RR, SS, SR, RS.

3.4.4 Métodos analíticos reportados para la separación de los isómeros de la ractopamina

Los métodos de análisis utilizados hasta ahora para el análisis de compuestos quirales incluyen cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) y recientemente la electroforesis capilar (EC).

EC es una técnica de separación moderna que ofrece un análisis rápido con alta eficiencia y alta resolución debido a la utilización de alta campo eléctrico y una variedad de modos de selectivo. El uso de la EC para la separación de compuestos quirales puede datarse en la obra de Gassmann et al en 1985 con la separación de los enantiómeros de un aminoácido dansilo. Las ciclodextrinas y sus derivados han sido ampliamente empleadas para la resolución quiral directa de un amplio número de enantiómeros, principalmente de interés farmacéutico. En el proceso de inclusión-complejación los analitos ya sea totalmente o con su parte hidrófoba en la cavidad CD entra a través de una de las dos aberturas, primaria y secundaria con 6-hydroxyl y 2-, 3 grupos hidroxilo, respectivamente.

Existen varios trabajos de investigación acerca de la separación de los estereoisómeros de la ractopamina como en el año 2007 por (Inoue & Chang Jen, 2007) utilizaron la EC donde trabajaron con ciclodextrinas altamente sulfatadas con un buffer de fosfatos a pH=3, donde la ciclodextrina HS α CD fue la mejor para la separación de dichos enantiómeros con tiempos de migración de entre 31 a 39 minutos. Se retomará este método como comparación con lo realizado en este trabajo.

Otro es el de (Gunnar Aberg, Reuter, Meier, Stolz, & Gogritchiani, 2014) en el 2010, el cual utilizó HPLC como disolvente una mezcla de hexano:propanol, con un tiempo de elución de 16 a 37 minutos.

Otro más en el año 2012 y el más reciente por (Lafontaine, Haigiang, Espeurteile, & Shi, 2012) donde utilizaron el HPLC-MS, aunque determinaron la ractopamina total y no sus isómeros en la carne de puerco con tiempo menores a 6 minutos para cuantificar la ractopamina residual que posee la carne.

3.5 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es ampliamente reconocido como una técnica alternativa a las técnicas cromatográficas convencionales y se ha aplicado a una gran variedad de compuestos. En particular, la EC ofrece resultados relevantes en el campo de las separaciones quirales (Rudaz, Le Saux, Prat, Gareil, & Veuthey, 2004), (Blaschke & Chankvetadze, 2000), (Nishi & Kawahara, 2002). Ya que tiene las ventajas de tener una alta resolución, una separación rápida, y la utilización de una pequeña cantidad de muestras (Li, Tan, Zhao, Chen, & Zhang, 2012), (Simuli Wabuye & Xu, 2012).

3.5.1 Proceso electroforético

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración como podemos ver en la Figura 3.5-A (Fundamentos de la Electroforesis Capilar, 2015).

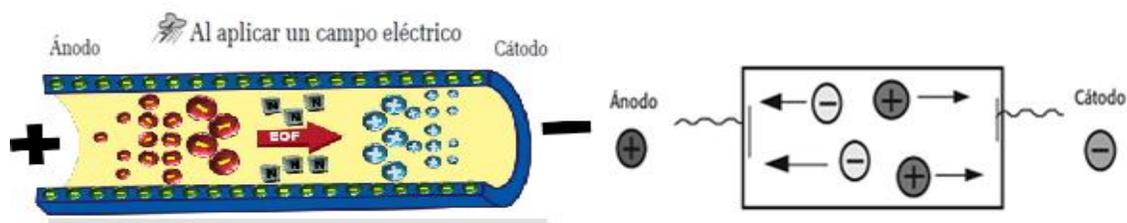
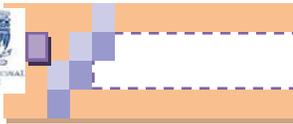


Figura 3.5-A Proceso electroforético

3.5.2 Generalidades

Es importante hacer notar que aunque este método se parece al HPLC, los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos, con excepción de la CCEM (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography), debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria.

En la EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).



El mecanismo de separación en la EC es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debida a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación carga/masa y la conformación de los analitos. La EC consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras) que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico. Para un mismo valor de carga, los iones de menor tamaño migrarán a mayor velocidad que los iones de mayor tamaño, los iones con mayor carga migrarán más rápido que los iones de menor carga; por otro lado, las moléculas neutras presentes en la muestra no se verán afectada por el campo eléctrico (Gómez Ruíz & et-al, 2010).

Un sistema de EC consiste básicamente en las siguientes partes básicas, que se muestran en la Figura 3.5-B.

- Dos electrodos de platino (ánodo y cátodo)
- Fuente de poder de alto voltaje auto reversible (0-30 kV)
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos respectivamente
- Capilar de sílice fundida con o sin recubrimiento de poliamida en la pared (Donde se lleva a cabo la separación)
- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido recirculante)
- Un sistema que introduce la muestra
- Un detector

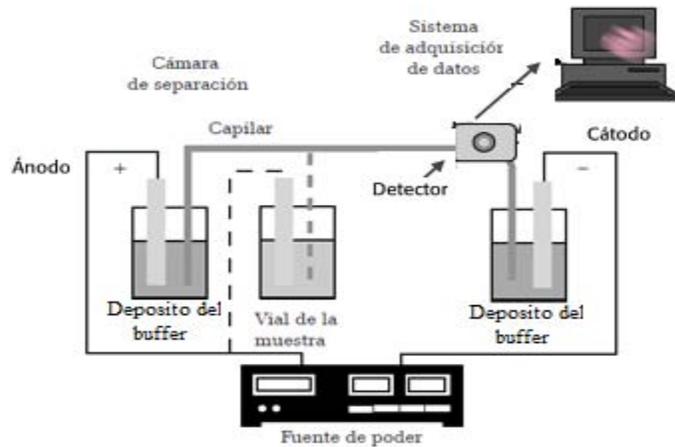


Figura 3.5-B Componentes del equipo de CE

El capilar de separación Figura 3.5-B se llena con electrolito soporte (usualmente buffer) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La introducción de la muestra se realiza sustituyendo un depósito con buffer por el contenedor con la muestra (generalmente un vial), durante este proceso un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje por algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación.

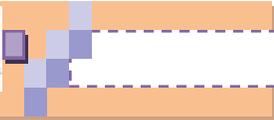
Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005),(Gómez Ruíz & et-al, 2010).

3.5.3 Principios de la separación electroforética

3.5.3.1 Movilidad electroforética

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito, es dada por la ecuación 1:

$$v = \mu E \dots\dots\dots (1)$$



Donde: v es la velocidad del analito, μ es la movilidad electroforética y E es el campo eléctrico, que es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm).

La movilidad electroforética de un analito depende en gran parte de las características propias de éste (carga, tamaño), así como del medio (concentración, temperatura y viscosidad), (Ramírez Aguilar, 2012). Estas variables serán estudiadas en el Apartado 5.2.

De la ecuación 2 es evidente que especies o analitos cargados, menor radio iónico y baja concentración tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad (Gómez Ruíz & et-al, 2010).

$$\mu = \frac{q}{6\pi r \eta} \dots\dots\dots (2)$$

Donde: μ es la movilidad electroforética del analito, q es la carga del analito, η es la viscosidad de la solución y r el radio molecular (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005), (Romero, 2009), (Chankvetadze & Blaschke, Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends, 2001).

3.5.3.2 Flujo electrosmótico

El flujo electrosmótico (FEO) puede describirse como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico (Gómez Ruíz & et-al, 2010). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interface se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 5-6) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica Figura 3.5-C (Gómez Ruíz & et-al, 2010)

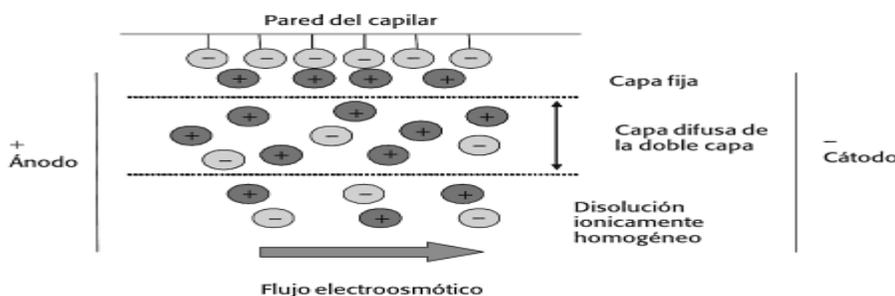


Figura 3.5-C Representación del flujo electroosmótico

Para conseguir la separación de los estereoisómeros de la ractopamina aparte de los factores mencionados anteriormente se añaden agentes complejantes como las ciclodextrinas.

3.6 Generalidades de las ciclodextrinas como selectores quirales

Las ciclodextrinas y sus derivados han sido ampliamente empleados para la resolución quiral directa de un amplio número de enantiómeros, principalmente de interés farmacéutico (Fanali, 2000). Su estructura con una superficie externa hidrofílica y una cavidad hidrófoba, permite la formación de complejos diastereoméricos con un par de enantiómeros, que migran a diferentes velocidades a través del capilar permitiendo la enantioseparación (Cserhádi, 2008). Se ha informado que las enantioselectividades máximas se alcanzan cuando los analitos y CD's tienen movilidades opuestas. (Asensi-Bernardi, Escuder-Gilabert, Martín-Biosca, & Medina-Hernández, 2013). Existen varios parámetros que influyen en la resolución enantiomérica, por ejemplo, el tipo y la concentración de ciclodextrina, buffer, pH, temperatura y la composición, así como la presencia de disolventes orgánicos o aditivos de complejos en el buffer (Hudson & Coulter Beckman, 2008).

Debido a su capacidad de formar complejos de inclusión con un número considerable de analitos (interacción anfitrión-huésped) las ciclodextrinas (CD's) pueden modificar las propiedades fisicoquímicas y las características de los analitos, esto hace que los tiempos de migración (o retención) de cada complejo isómero-CD difieren.

Los grupos hidroxilo presentes en el borde de las CD's pueden ser fácilmente modificados por reacciones químicas con el fin de obtener derivados de CD con un diferente grado de sustitución; la composición de la CD depende de varios parámetros, tales como

condiciones de reacción, el tipo de reactivos etc. Un amplio número de derivados de CD se utilizan actualmente en la EC para el análisis quiral y entre ellos podemos mencionar metilados sin carga, hidroxietilados CD's acetilados y las otras cargadas tales como metilamino, carboximetilados, fosfatadas, sulfatadas y altamente sulfatadas.

Las diferentes CD's pueden exhibir propiedades muy diferentes, que se pueden utilizar fácilmente para mejorar la selectividad de los enantiómeros (Fanali, 2000).

3.6.1 Principales características

Las ciclodextrinas son polisacáridos de peso molecular bajo y que pertenecen a la clase denominada oligosacáridos de donde proviene oligo: unos pocos (Neilson Boyd & Thornton Morrison, 1998). Las ciclodextrinas se obtienen durante la degradación enzimática del almidón y consisten en una serie de oligosacáridos cíclicos ver Figura 3.6-A formados por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades de α -D-[1,4] glucosa, que dan lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico (Szejtli J. , 1998), (Dodziuk, M. Demchuk, Bielejewska, Kozminski, & DolGonos, 2004) .

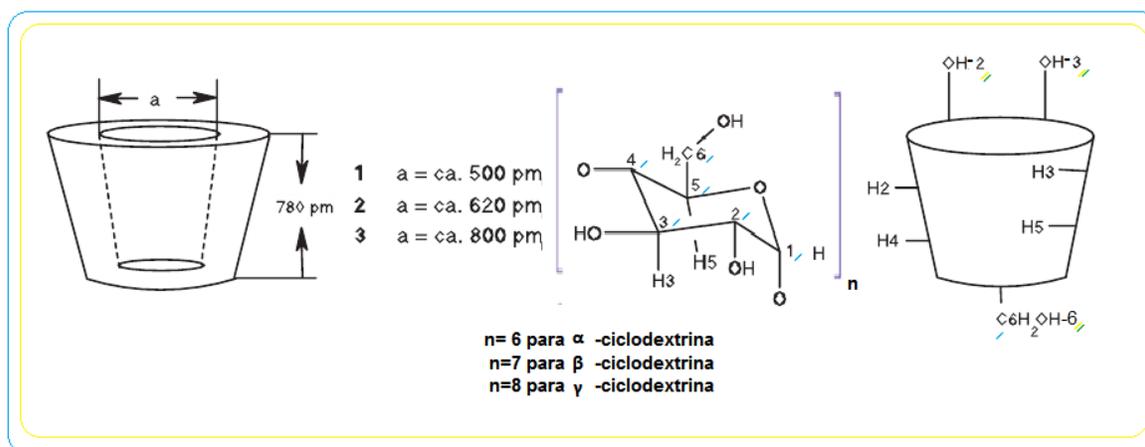


Figura 3.6-A Ciclodextrinas según las unidades de α -D-[1,4] glucosa, así como estructura molecular

La característica más interesante de las ciclodextrinas es su capacidad de formar complejos de inclusión estables con una amplia variedad de compuestos de distinto peso molecular, tanto de naturaleza no polar (hidrocarburos), como de naturaleza polar (ácidos carboxílicos y aminas) y con grandes posibilidades de dar lugar a fenómenos de reconocimiento de macromoléculas en sistemas biológicos. (Martínez & Gómez, 2007).



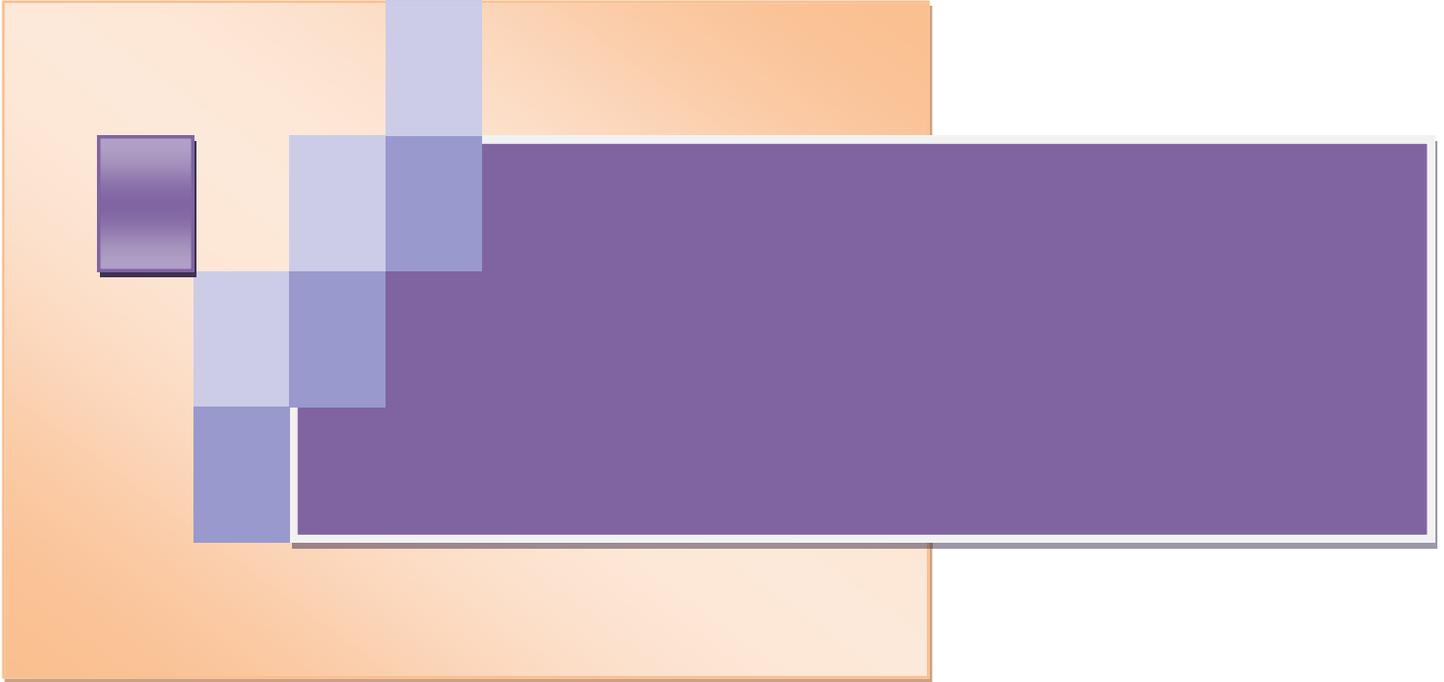
Las ciclodextrinas altamente sulfatadas (HS-CD) de diferentes grados de sustitución se introdujeron por Villiers (Szejtli J. , 2004). En el presente trabajo se emplearon las ciclodextrinas altamente sulfatadas en especial la β .

3.6.1.1 Ciclodextrina altamente sulfatada HS β CD

La ciclodextrina beta altamente sulfatada HS β CD tienen un contenido promedio de 12 grupos sulfato por molécula y su alta densidad de carga negativa hace que sobresalga como selector quiral, específicamente de compuestos neutros y cargados positivamente. (Hudson & Beckman Coulter, 2015). Sin embargo, a pesar de su gran aplicación en separaciones quirales, todavía es difícil predecir su nivel de enantioresolución (R_s) para un compuesto en concreto (Fu-tai, Shen, & A. Evangelista, 2001), (Asensi-Bernardi, Escuder-Gilabert, Martín-Biosca, & Medina-Hernández, 2013), (Asensi-Berdani & Martín-Biosca, 2013).

3.7 Modificadores orgánicos

Otra alternativa para mejorar la separación quiral es añadir un disolvente orgánico, estos se adicionan al electrolito soporte en concentraciones que van desde los 5 % al 40 % v/v con la finalidad de alterar su polaridad y viscosidad por lo que este proceso afecta tanto a la movilidad electroosmótica como la movilidad electroforética del analito.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1 Reactivos.

Los reactivos utilizados en este trabajo son:

Para la separación 1) no quiral (llamada control de calidad) y 2) quiral se emplea el estándar Ractopamina de Sigma Aldrich.

Especificando para 1) el control de calidad de la ractopamina se utilizaron hidróxido de sodio (NaOH) y carbonato de sodio de J.T. Baker, otros solventes como ácido clorhídrico y metanol de la marca fermont, la tricina y el 3-aminofenol de Sigma-Aldrich.

Para la medición en electroforesis capilar en el caso de 2) la separación de isómeros fueron: Hidróxido de sodio (NaOH), Tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), estos de J.T. Baker los siguientes disolventes: Acido clorhídrico (HCl), metanol y acetonitrilo grado HPLC de la marca Fermont; ciclodextrinas como: α -ciclodextrina altamente sulfatada HS α CD, β -ciclodextrina altamente sulfatada "HS β CD" y la γ -ciclodextrina altamente sulfatada "HS γ CD" son de Beckman Coulter.

4.2 Muestras

Las muestras comerciales utilizadas fueron: Racmina premix con 10% ractopamina (PiSA, Guadalajara, México), Paylean (Elanco-Eli Lilly) y Pafmine (Paffa, San Miguel Atlautla, Estado de México) estas dos últimas con el 2% ractopamina.

4.3 Instrumentación

- ▣ Matraces volumétricos: 5, 10, 20, 50 y 100 mL.
- ▣ Pipetas volumétricas: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 30 mL
- ▣ Micropipetas: 10 a 100 μL y 200 a 1000 μL
- ▣ Frascos viales y Propipetas

4.4 Equipos.

- ▣ Baño de ultrasonido Transsonic T570 Elma® (Alemania).
- ▣ Evaporador Turbo Vap® LV, Caliper.

- ❑ Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).
- ❑ Centrifuga Allegra™ 21 Centrifuge Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).
- ❑ Balanza analítica BOECU (Alemania).
- ❑ pH-Metro sensION™+PH31 Hach (Loveland, Colorado, USA).
- ❑ Potenciómetro, Hanna Instruments (Padua, Italia); agitador magnético.
- ❑ Balanza analítica, Boeco, (Alemania).
- ❑ Desionizador Milli Q (Millipore, MA., USA).
- ❑ Parrilla eléctrica con agitador magnético, Cimarec 2, Thermolyne (USA).



4.5 Metodología para el control de calidad de la ractopamina



4.5 Metodología para el control de calidad de la ractopamina

4.5.1 Preparación de soluciones

4.5.1.1 Preparación de solución buffer

La solución buffer de carbonatos con pH de 10.2 se preparó a partir de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) a una concentración de 70 mM, ajustando el pH con NaOH 3 M.

4.5.1.2 Preparación del estándar interno

Para la solución del estándar interno se utiliza el estándar de 3-aminofenol la cual se preparó a una concentración 5000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) de esta se tomó una dilución para llevarla a una concentración de 25 ppm ($\mu\text{g/mL}$).

4.5.1.3 Preparación de la ractopamina

Para la solución de ractopamina se utiliza el estándar de Sigma Aldrich y se preparó con una mezcla de Metanol/ H_2O 20:80 hasta una concentración de 0.1 mg/mL, se agregó la cantidad necesaria del estándar interno llevando a un aforo en 50 mL.

4.5.2 Metodología utilizada por electroforesis capilar

4.5.2.1 Preacondicionamiento del capilar al inicio del día

Una vez que se montó el capilar en el cartucho éste se acondicionó al inicio de cada día, teniendo como objetivo, la activación de los grupos silanol, así como equilibrar las paredes del capilar con el buffer de separación y así asegurar la reproducibilidad de nuestros experimentos. Para tal efecto se utilizó el buffer de carbonatos 70 mM, pH 10.2 por 15 min, a 30 psi y 25 °C, como lo especifica la Tabla 4.5-I.

Tabla 4.5-I Procedimiento del lavado del capilar al inicio de cada sesión

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H ₂ O desionizada	10 min	30 psi	25 °C
NaOH (0.1 M)	10 min	30 psi	25 °C
H ₂ O desionizada	3 min	30 psi	25 °C
Buffer carbonatos	20 min	30 psi	25 °C

4.5.2.2 Condiciones de separación de las muestras por electroforesis capilar

En general todos los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter y las condiciones iniciales fueron: Buffer de carbonatos a 70 mM a un pH 10.20, con un voltaje de 9.8 kV, con un capilar de sílice fundida (50 µm diámetro interno), de 31.5 cm de longitud total, 20 cm de longitud efectiva, y la detección UV a una longitud de onda de 214 nm y una temperatura de 25°C. En cada corrida se obtienen corrientes entre 90 a 100 µA con un tiempo de análisis de aproximadamente 12 minutos. El procedimiento se describe paso a paso en la siguiente Tabla 4.5-II.

Tabla 4.5-II Procedimiento del control de calidad de la ractopamina por electroforesis capilar

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	30 psi	6 min	Buffer
2	Inyección	Presión	0.5 psi	5 s	Muestra
3	Espera	-	-	0.2 s	Buffer
4	Separación	Voltaje	9.8 KV	12 min	Buffer

4.5.2.3 Condiciones del capilar al final del día.

Una vez finalizadas las mediciones se prosigue a lavar con agua durante 20 minutos para eliminar impurezas que se le hayan quedado en el interior del capilar.

4.5.3 Validación

Los parámetros de validación mostrados en el apartado 3.3.y Anexo 13, se evaluaron con forme a la Guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de

químicos farmacéuticos biólogos México, A.C (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

Los parámetros de integración utilizados para obtener el área bajo la curva del pico de la ractopamina por CE son los mostrados en la Tabla 4.5-III.

Tabla 4.5-III Parámetros de integración para el control de ractopamina por EC.

	Event	Start	Stop Time	Value
✓	Valley to Valley	0.000	6.000	0.01
✓	Minimum Area	0.000	6.000	100
✓	Width	0.000	6.000	0.1
✓	Threshold	0.000	6.000	1100
✓	Left Slope Sensitivity	0.000	6.000	0.01
✓	Right Slope Sensitivity	0.000	6.000	0.01
✓	Integration Off	0.000	4.000	0

Linealidad del sistema:

Para el control de calidad de la ractopamina se utilizó como estándar interno el 3-aminofenol. La elaboración de la curva de calibración se realizó a partir de soluciones patrón tanto de ractopamina como de estándar interno (EI). Cada punto de la curva se preparo por triplicado.

De esta forma los volúmenes añadidos y las concentraciones finales de cada solución son las mostradas en la Tabla 4.5-IV.

Tabla 4.5-IV Descripción de la preparación de soluciones para la linealidad del sistema para el control de calidad de la ractopamina utilizando como E.I al 3-aminofenol

Solución	V _{Aforo} (mL)	V _{adicionados} (mL) de c/estándar		Conc. c/solución ppm (µg/mL)
		V _(E.I.)	V _{ractopamina}	
1	20	0.5	0.5	12.5
2	20	0.5	2	50
3	20	0.5	4	100
4	20	0.5	6	150
5	20	0.5	8	200
6	20	0.5	10	250

Linealidad del método:

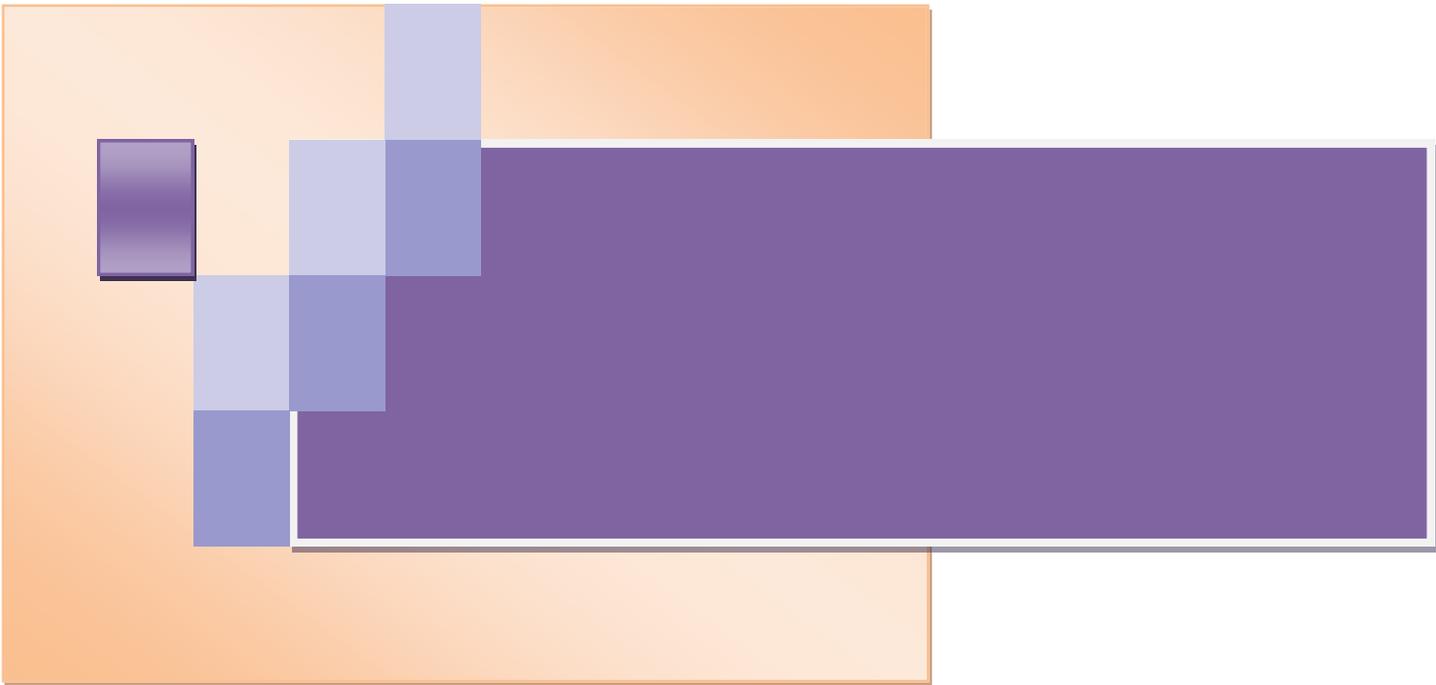
Para la evaluación de la linealidad del método las soluciones se prepararon como se describe en la Tabla 4.5-V.

Tabla 4.5-V Descripción de la preparación de las soluciones para la linealidad del método para el control de calidad de la ractopamina utilizando como E.I al 3-aminofenol

Solución	V _{Aforo} (mL)	V _{adicionados} (mL) de c/estándar		Conc. c/solución ppm (µg/mL)
		V (E.I.)	V _{ractopamina}	
1	20	1	0.05	12.5
2	20	1	0.2	50
3	20	1	0.4	100
4	20	1	0.6	150
5	20	1	0.8	200
6	20	1	1.0	250

4.5.4 Tratamiento estadístico

Para la validación del método desarrollado para el control de calidad de la ractopamina se utilizó el software Statgraphics Centurión XVI. Mediante éste software se realiza el ajuste al modelo para las curvas de calibración, observar sus residuales, ver si los datos son o no homocedásticos, realizar el análisis de varianzas con falta de ajuste (ANOVA), proponer los modelos alternos al modelo lineal, y calcular algunos parámetros de la validación. Ver Anexo 6, 7 y 10 además de la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).



4.6 Metodología para la separación quiral de los isómeros de la ractopamina

4.6 Metodología para la separación quiral de los isómeros de la ractopamina

4.6.1 Preparación de soluciones

4.6.1.1 Preparación de soluciones buffer y el selector quiral HS β CD

Las soluciones buffer con pH deseados de 6 y 8 se preparan a partir de Tetraborato de sodio 50 mM, ajustando el pH con HCl. Los buffer de separación se preparan mediante la adición de cantidades ya calculadas del reactivo sólido de HS α CD, HS β CD o HS γ CD para lograr las concentraciones de 10 mM y 20 mM de ciclodextrina. En algunos experimentos se adicionó como modificador orgánico MeOH o Acetonitrilo de 10-30%, siendo aforadas con la solución buffer de separación.

4.6.1.2 Preparación de la ractopamina

Para la solución de ractopamina se utiliza la cantidad deseada del estándar de Sigma Aldrich, disolviéndose con una mezcla de Metanol/H₂O 20:80 hasta una concentración de 0.1mg/mL llevando a un aforo en 50 mL.

4.6.2 Metodología

4.6.2.1 Preacondicionamiento del capilar al inicio del día

Al inicio de cada día se realiza una serie de lavados al capilar, siguiendo el procedimiento de la Tabla 4.6-I, teniendo como objetivo, la limpieza, activación de los grupos silanol, así como equilibrar las paredes del capilar con el buffer para la reproducibilidad de los experimentos. Para tal efecto se utilizó el buffer de boratos 50 mM por 15 min a 30 psi y 25 °C.

Tabla 4.6-I Procedimiento de lavado de capilar al inicio de cada sesión

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H ₂ O desionizada	10 min	30 psi	25 °C
NaOH(0.1 M)	10min	30 psi	25°C
H ₂ O desionizada	3 min	30 psi	25°C
Buffer boratos	20min	30 psi	25°C

4.6.2.2 Condiciones de separación para las muestras por electroforesis capilar

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter, donde las condiciones iniciales fueron: Buffer de boratos en un rango de 25 mM-50mM, con pH's de entre 2 a 11, voltaje de 20 kV, con un capilar de sílice

fundida (50 μm diámetro interno), de 58 cm de longitud total, 48 cm de longitud efectiva, temperatura de 25°C y a una longitud de onda de detección de 214 nm.

La Tabla 4.6-II especifica los pasos y soluciones que el equipo introduce al capilar. En el momento de la separación, se obtienen corrientes entre 70-80 μA , con una duración de 30 minutos en la separación.

Tabla 4.6-II Procedimiento de separación de los enantiómeros por electroforesis capilar

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	20 psi	15 min.	Buffer
2	Inyección	Presión	0.5 psi	5 s	Muestra
3	Espera	-	-	0.2 s	Buffer
3	Separación	Voltaje	20 KV	30 min.	Buffer

4.6.2.3 Condiciones del capilar al final del día

Una vez finalizadas las mediciones se prosigue a lavar el capilar con agua desionizada durante 20 min para eliminar impurezas que se le hayan quedado en el interior del capilar y proceder a apagar el equipo.

4.6.2.4 Condiciones del artículo de referencia (Inoue & Chang) para la separación isomérica de la ractopamina

Estas condiciones se tomaron del artículo publicado por:(Inoue & Chang Jen, 2007).

Capilar: Sílice fundida (PolymicroTechnologies, Phoenix, AZ, USA) de 50 μm de diámetro interno, 57 cm de longitud total (46.5 cm de longitud efectiva) y temperatura controlada a 20 °C.

Condiciones de Separación: Buffer de fosfatos pH 6.0 con 10.391 mg/mL (1.0391%) de S- α -CD (Sigma-Aldrich), inyección de 0.5 psi, 5 s, a una temperatura de 20 °C. El campo eléctrico utilizado en la referencia fue de $E = 20,000 \text{ volts}/60 \text{ cm} = 333.333 \text{ volts}/\text{cm}$, por lo que se realizó un ajuste a nuestras condiciones, ya que nuestro capilar fue de 57 cm, por lo que se utilizaron 19 kV (19,000 volts) durante la separación. Entre corridas, se realizaron lavados de 5 min con el buffer de corrida.

NOTA: La S- α -CD utilizada durante estas mediciones fue de Sigma-Aldrich sin un grado de sustitución especificado, mientras que la S- α -CD se indica que la fuente es de Cerestar (Hammond, IN) especifica un grado de sustitución de 12, aunque cabe hacer mención, que dicha compañía no se dedica al giro de síntesis, ni tiene a su disposición tal reactivo para su venta. Finalmente es importante decir que no existe una compañía que venda la

S- α -CD con ese grado de sustitución, sino que en general las diversas compañías especifican que su producto es una mezcla de diferentes sustituciones y diferentes grados de hidratación. Debido a esto, no es posible el cálculo exacto del peso molecular de la S- α -CD y por lo tanto no se puede reportar su concentración en molaridad, ni pretender prepararla a cierta concentración comparable con la del artículo. Para fines experimentales consideramos que su concentración aproximada es alrededor de entre 4 a 5 mM.

Preacondicionamiento del capilar: Al inicio del día, se realizó un lavado con agua desionizada (3 min, 20 psi), después con NaOH 0.1 M (10 min, 20 psi), de nuevo con agua (5 min, 20 psi) y finalmente 10 min con el buffer de corrida.

Disoluciones: Se prepararon las siguientes disoluciones como se indica en la Tabla 4.6.III, a partir del estándar y las premezclas recibidas de la compañía Paffa:

Tabla 4.6-III Concentración de ractopamina para cada solución a medir

DISOLUCIONES A MEDIR*	[Ractopamina] (mg/mL)
Estándar de Ractopamina	0.300
Pafmine 2%	0.120
Paylean 2%	0.101
Racmina Premix 10%	0.110

*La cantidad pesada se disolvió en una mezcla de MeOH: H₂O (20:80) y fueron sometidas a sonicación durante 15 min y posterior centrifugación a 10,000 rpm, inyectando el sobrenadante.

4.6.3 Tratamiento estadístico

4.6.3.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a un tratamiento de análisis estadístico factorial 2² utilizando el programa de Design Expert 6.0 donde los factores o parámetros evaluados y sus valores se describen en la Tabla 4.6-IV. La respuesta medida fue la resolución que existe entre los picos de cada isómero como se muestra. Ver Anexo 3.

Tabla 4.6-IV Análisis estadístico factorial 2²

Factores*	Niveles	
	-1	+1
pH	6	8
[HS β CD] mM	10	20



5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS





5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA RACTOPAMINA



5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1 Desarrollo del método para el control de calidad de la ractopamina.

5.1.1 Estudio de la influencia del pH

Para la elección del pH adecuado, se midieron soluciones de ractopamina en un intervalo de pH de 1-13 (Figura 5.1-A). Cabe hacer mención que se usó un buffer de boratos para tal fin, que aunque no amortigüe en ciertos valores de pH, solo en este momento se utilizó para tener presente un electrolito soporte. La ractopamina es una molécula anfótera (zwitterion) que puede poseer cargas positivas (a $\text{pH} < 8.82$) y/o cargas negativas (a $\text{pH} > 9.2$), por lo que puede migrar bajo un campo eléctrico con sus propias cargas, ya que posee movilidades tanto positivas, neutras o negativas (ver Anexo 1).

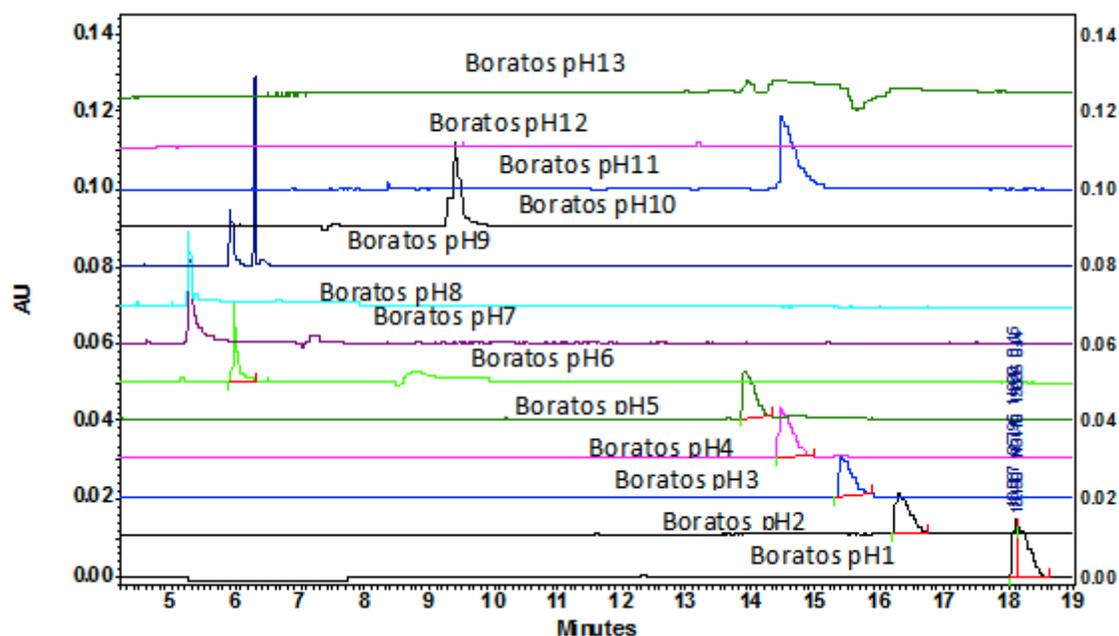


Figura 5.1-A Electroferograma del estudio de la influencia del pH en el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 μm de d.i, buffer de boratos 50 mM.

Podemos apreciar en la Figura 5.1-A que el pico de la ractopamina disminuye en su tiempo de migración con el aumento del pH, hasta el valor de 8. Esto se debe a que a esos pH's posee movilidad positiva (ver Figura 3.2-A, Anexo 1) y como el flujo electroosmótico (FEO) aumenta con el pH, esto hace que se sumen las movilidades que

van en la misma dirección (hacia el cátodo) y eluye más rápido. También se aprecia que a pH 9, cuando la ractopamina es neutra, se observen 2 señales en el electroferograma, la primera (a menores tiempos) correspondiente al disolvente y la segunda a la ractopamina. A pH >9 el analito posee movilidad negativa (debido a la ionización de los grupos $-OH$ de la molécula) por lo que su movilidad es opuesta a la del FEO, con el consecuente aumento en su tiempo de migración (nótese que a pH's 12 y 13 ya salen fuera de la escala de tiempo los picos de la ractopamina, por lo que no se esperó suficiente tiempo para ser apreciados). El pico del analito se presenta asimétrico a todos los pH estudiados, aunque en un menor grado a pH 9.0. Se concluye que la separación puede llevarse a cabo tanto A) a pH bajo, como B) a pH alto, por lo que se realizarán pruebas posteriores para definir su valor, tratando en lo mayor posible obtener picos simétricos, con la finalidad de que la integración que realiza el software sea repetible, lo cual ocurre con picos gaussianos.

5.1.1.1 Separaciones a pH bajo

Para evaluar la posible utilización de un electrolito soporte a pH bajo, se utiliza el buffer de acetatos (ya que posee un $pK_a=4.76$) por lo que amortigua a bajos pH's. Se midió la ractopamina a pH's de 3.5 a 5 dando los electroferogramas mostrados en la Figura 5.1-B.

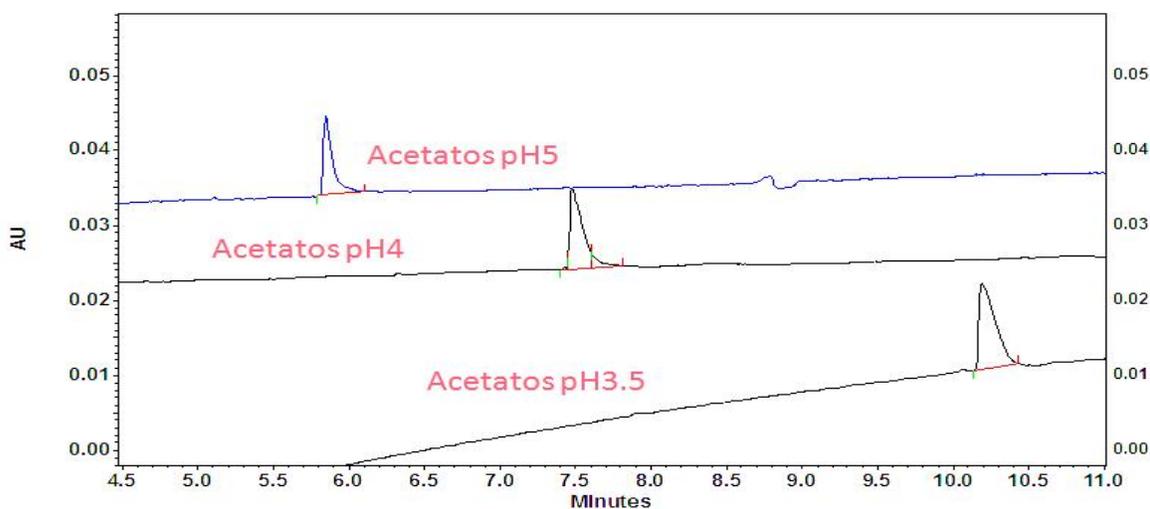


Figura 5.1-B Electroferograma del estudio de la influencia del pH en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL] en un intervalo 3.5-5. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-A excepto que la composición del buffer fue de acetatos.

Los resultados obtenidos concuerdan con la tendencia de la Figura 5.1-B, ya que el tiempo de migración de la ractopamina disminuye al aumentar el pH, pero para todos los casos se presentan picos considerablemente asimétricos. Como es bien sabido la simetría de un pico se relaciona con la concordancia (valor parecido) de las movilidades (conductividades) del analito con el electrolito soporte; este fenómeno se conoce como electrodispersión (Mikkers, Evaraerts, & Verheggen, 1979). Por tal motivo y con el fin de lograr una mejora en la forma de los picos se realizaron medidas utilizando otra composición de buffer, en esta ocasión un buffer de fosfatos 50 Mm a pH de 1, 2 y 3.

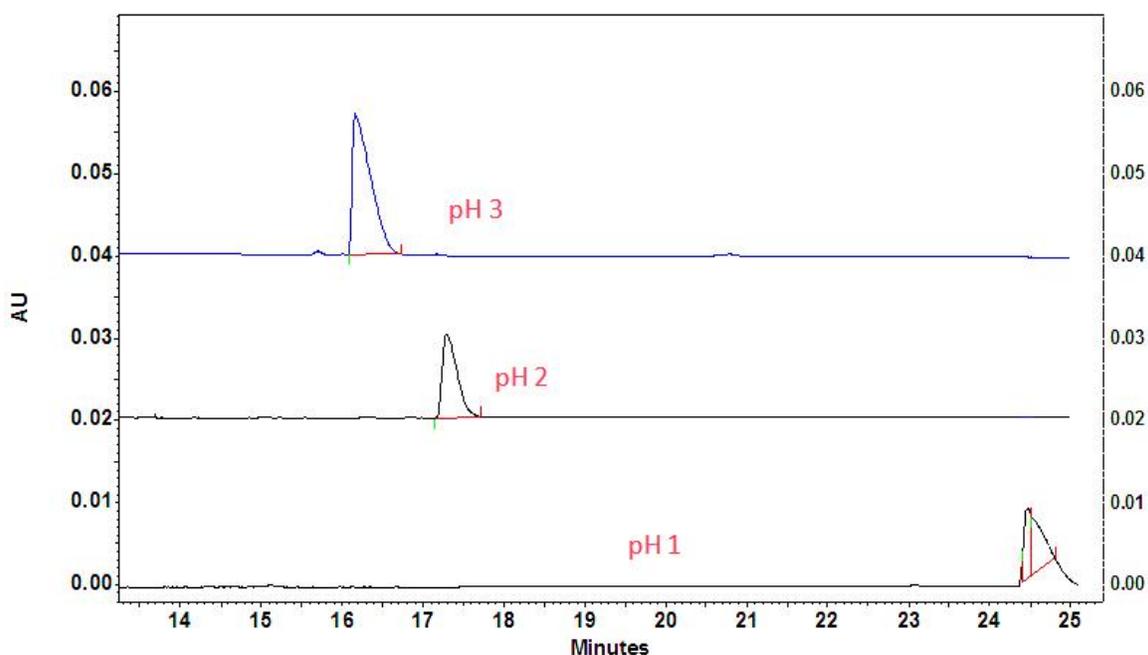


Figura 5.1-C Electroferograma del estudio de la influencia del pH en la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-B excepto que la composición del buffer fue de fosfatos

El buffer de fosfatos presenta un pKa alrededor de pH 2.0, por lo que se midieron muestras de ractopamina utilizando buffers a pH's 1, 2 y 3. Como se observa en la Figura 5.1-C se observa la misma tendencia que con los buffers de boratos y acetatos, disminuyendo los tiempos de migración con el aumento del pH, pero aun así no se logró una mejor simetría en los picos.

Algunas veces este fenómeno de electrodispersión se puede minimizar al disminuir el FEO del medio, ya que la movilidad del FEO contribuye a las diferencias en conductividades entre los analitos y el electrolito soporte (Mikkers, Evaraerts, & Verheggen, 1979). Con base en esto, se realizaron experimentos adicionando trietanolamina al buffer, con la finalidad de que esta pequeña molécula básica ($pK_a=6.24$) con carga positiva a pH's bajos se adsorba en las paredes del capilar (interaccionando con los grupos silanol) y de esta forma disminuya el FEO a valores casi nulos alrededor de pH 3.0. Por tal motivo al buffer de fosfatos se le agregó trietanolamina (Figura 5.1-D) observándose que el pico de la ractopamina aumento un poco más en su tiempo de migración hasta los 16.5 minutos, debido a la disminución del FEO. Comparando el buffer de boratos con el buffer de fosfatos (Figura 5.1-D) con trietanolamina, existe un aumento muy poco considerable en la simetría del pico, con un aumento en el tiempo de migración.

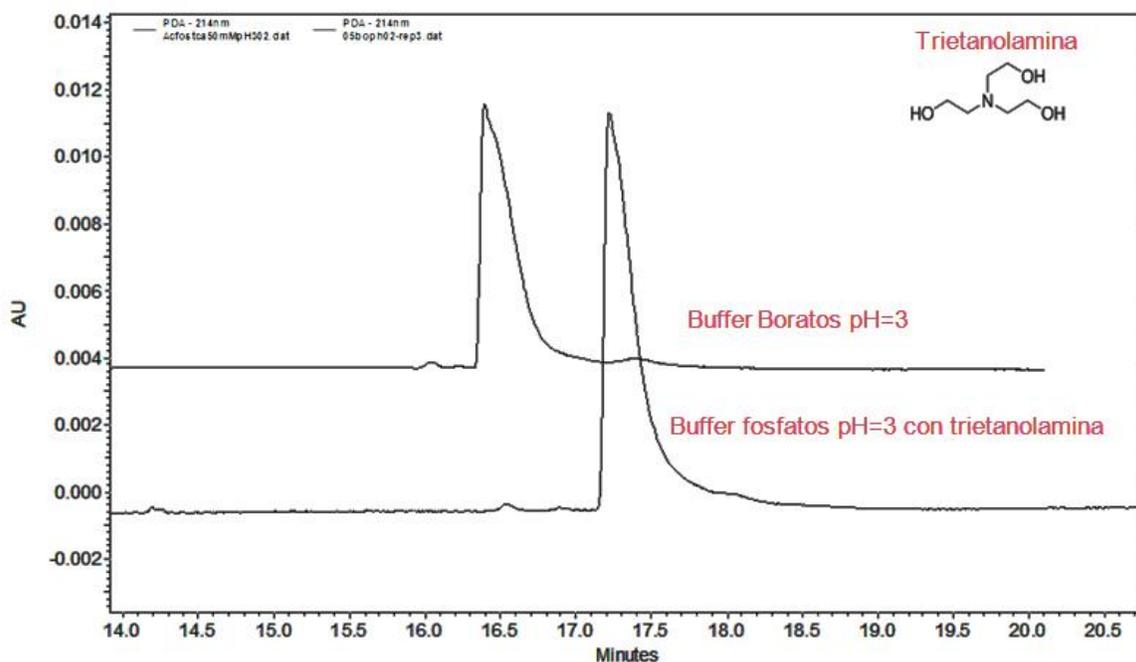


Figura 5.1-D Electroferograma del estudio de la adición de trietanolamina al buffer en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Las mismas que la figura 5.1-C excepto que a los buffers 50 mM se les adiciono a no trietanolamina

Sin embargo al no ver una mejora considerable en la simetría del pico de la ractopamina con la adición de trietanolamina Figura 5.1-D se opta por utilizar el buffer sin esta, ya que es más sencilla la matriz. Se continuó por lo tanto con el buffer de boratos cambiando su concentración de éste 25 mM, 50 mM y 70 mM para lograr una mejora en la forma (simetría) del pico (Figura 5.1-E).

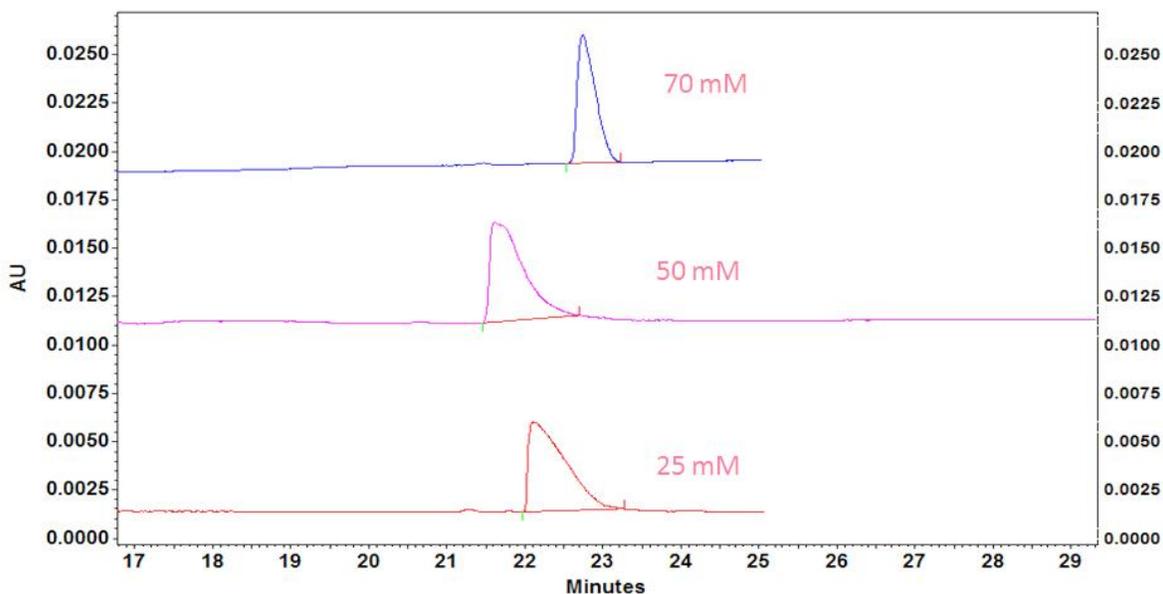


Figura 5.1-E Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración de buffer en la forma del pico la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-A con buffer de boratos pH 3.0 excepto que la concentración del buffer varía.

Podemos ver en la Figura 5.1-E que al aumentar la concentración del buffer, existe una disminución en la dispersión (ancho del pico) de la ractopamina. Esto era de esperarse, ya que este fenómeno conocido como “stacking” (apilamiento) Figura 5.1-F, ocurre al existir diferencias marcadas entre la composición (conductividad) del medio de la muestra (mezcla MeOH: agua) y el buffer con una mayor fuerza iónica. Esto provoca que las moléculas cargadas positivamente de ractopamina se concentren en la frontera entre el disolvente en el que están (MeOH: agua) y el buffer que las circunda debido a que el campo eléctrico generado (en la separación) es mayor en la zona de MeOH: agua (baja conductividad) que en la zona circundante del buffer.

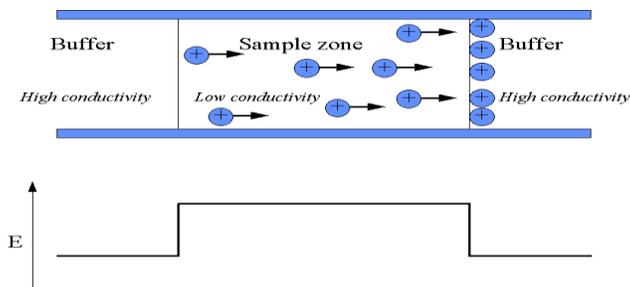


Figura 5.1-F Fenómeno de Stacking en Electroforesis Capilar

5.1.1.2 Separaciones a pH alto

Al no obtener una mejora considerable en la simetría del pico, se optó por realizar las separaciones a pH altos donde la ractopamina también posee carga (anión), iniciando con una concentración de buffer de boratos de 70 mM.

Retomando los resultados obtenidos en la Figura 5.1-A, la señal más simétrica y eficiente de la ractopamina observada fue a pH 10. Por esta razón se compararon nuevos Electroferogramas obtenidos utilizando un buffer de boratos 70 mM, pH 3 y 10 (Figura 5.1-G).

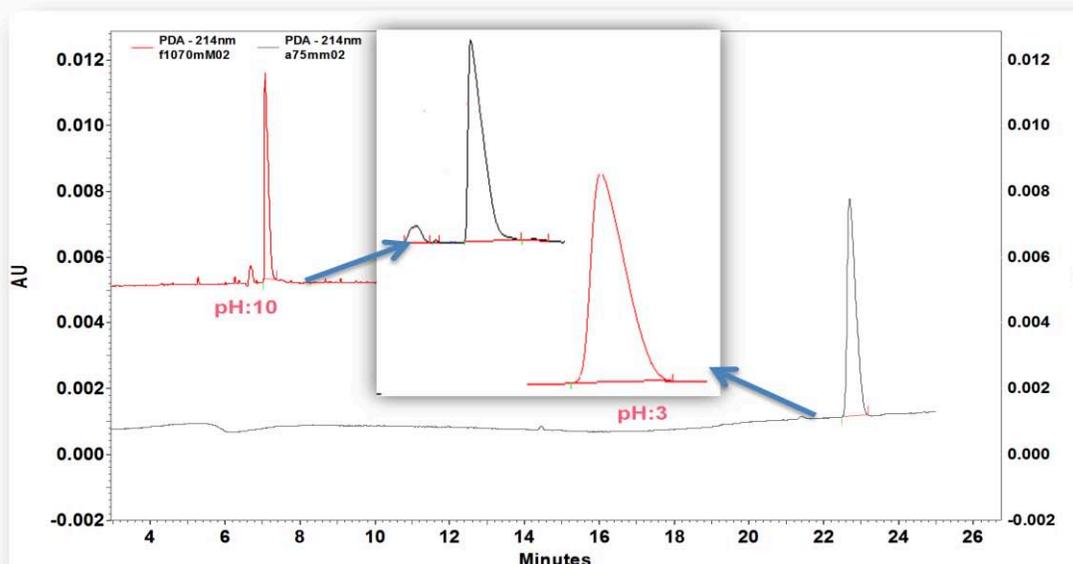


Figura 5.1-G Electroferograma del estudio de la influencia del pH en el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 70mM

Se observa que a pH 10 el tiempo de migración disminuye con una mejora considerable en la eficiencia y simetría del pico del analito, comparado con la señal obtenida a pH 3.

5.1.2 Estudio de la concentración del buffer a pH 10

Con la finalidad de mejorar la forma y simetría del pico del analito se realizaron experimentos donde se varió la concentración del buffer (Figura 5.1 H).

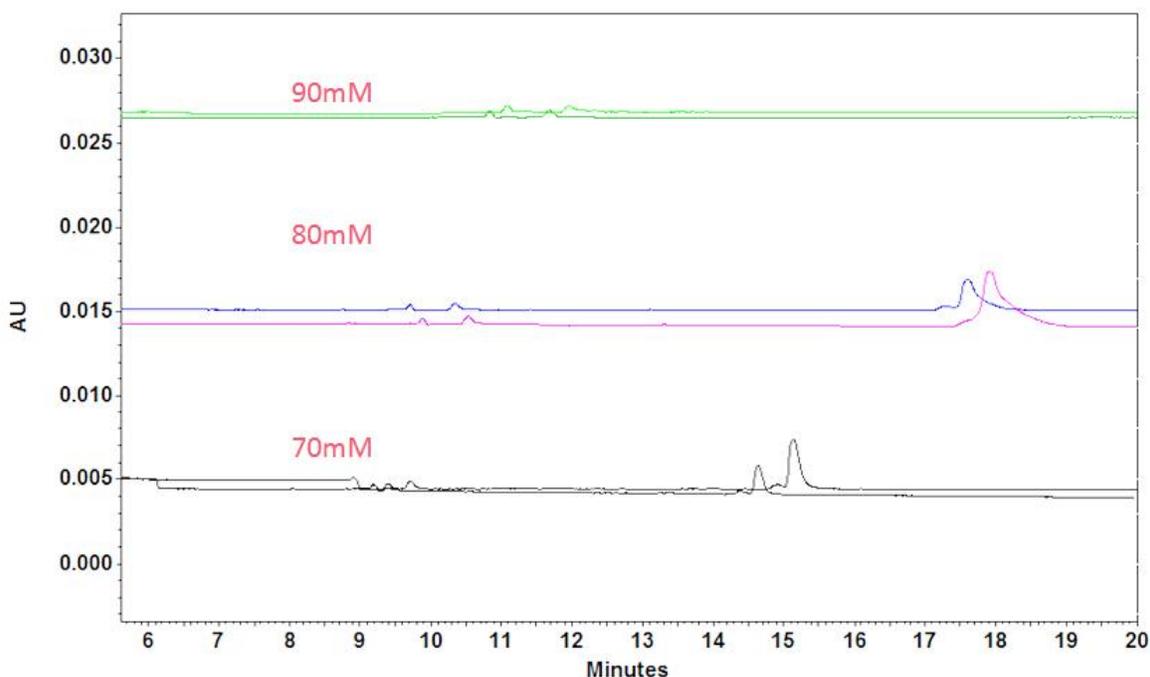


Figura 5.1-H Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración del buffer de boratos en el pico de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-C excepto que la concentración del buffer de boratos se varió.

Como se puede observar en la Figura 5.1-H a concentraciones mayores de 70mM de buffer de boratos, el pico de la ractopamina se ensancha, ya que tiende a presentar mayores tiempos de migración con el aumento de la concentración del electrolito. Esto se hace evidente a la concentración de 90 mM donde la señal sale de la escala, pues ya no se espera suficiente tiempo para verla. Este aumento en los tiempos de migración se debe a la mayor viscosidad del electrolito y a una generación de calor de Joule* que

*CALOR DE JOULE: Se le conoce efecto Joule al fenómeno irreversible por el cual si en un conductor circula corriente eléctrica, parte de la energía cinética de los electrones se transforma en calor debido a los choques que sufren con los átomos del material conductor por el que circulan, elevando la temperatura del mismo. (Santamaría G. & Castejón O., 2009).

provoca la disipación de la señal con el consecuente ensanchamiento del pico. Se concluye que el aumento en la concentración del buffer no mejora la forma del pico, por lo que se continuaron los experimentos utilizando 70 mM.

5.1.3 Influencia del tipo de buffer

Con la finalidad de observar si existe una mejora en la forma del pico de la ractopamina, se utilizaron además del buffer de boratos, el buffer de carbonatos y el CAPS a pH alrededor de 10 (Figura 5.1-I).

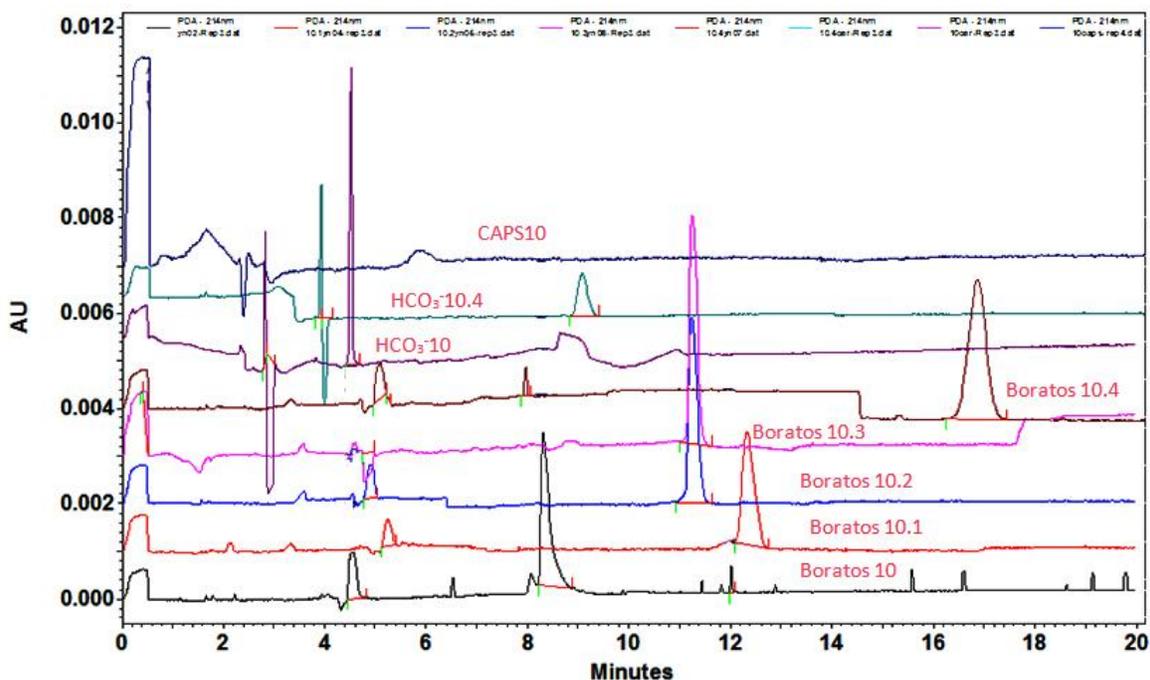


Figura 5.1-I Electroferogramas del estudio de la influencia del tipo de buffer 70 mM y pH 10-10.5 en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-G excepto que se varió el tipo de buffer y el pH de 10 a 10.5,

En la Figura 5.1-I se puede apreciar que el tiempo de migración del buffer de boratos aumenta con el incremento en el pH y mejora la simetría del pico, aunque a pH 10.4 donde se presenta simetría en el pico, ya no hay un buen amortiguamiento del electrolito. Usando el buffers CAPS el pico de la ractopamina es poco eficiente (pico pequeño y ancho), mientras que con carbonatos, aunque la señal a pH 10 es pequeña, mejora considerablemente su altura y simetría a pH 10.4. Se concluye entonces que se tienen 2

posibles condiciones para la medición de ractopamina a alto pH: **1)** usando buffer de carbonatos 70 mM a pH10.4 y **2)** usando buffer de boratos 70 mM a pH 10.4, pero con el peligro de la baja repetibilidad por no estar el medio amortiguado. Se prefirió utilizar el buffer de carbonatos, ya que presenta muchos menores tiempos de migración (8.9 comparado con 17 min de boratos), buen amortiguamiento al pH seleccionado y aunque la altura de la señal es un poco menor, las determinaciones del analito serán realizadas en soluciones concentradas, por lo que no es el fin de esta investigación lograr la determinación de la ractopamina en trazas.

Para verificar la buena selección del pH de separación se midieron una serie de soluciones en un intervalo de pH's de 10 a 10.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.1 J.

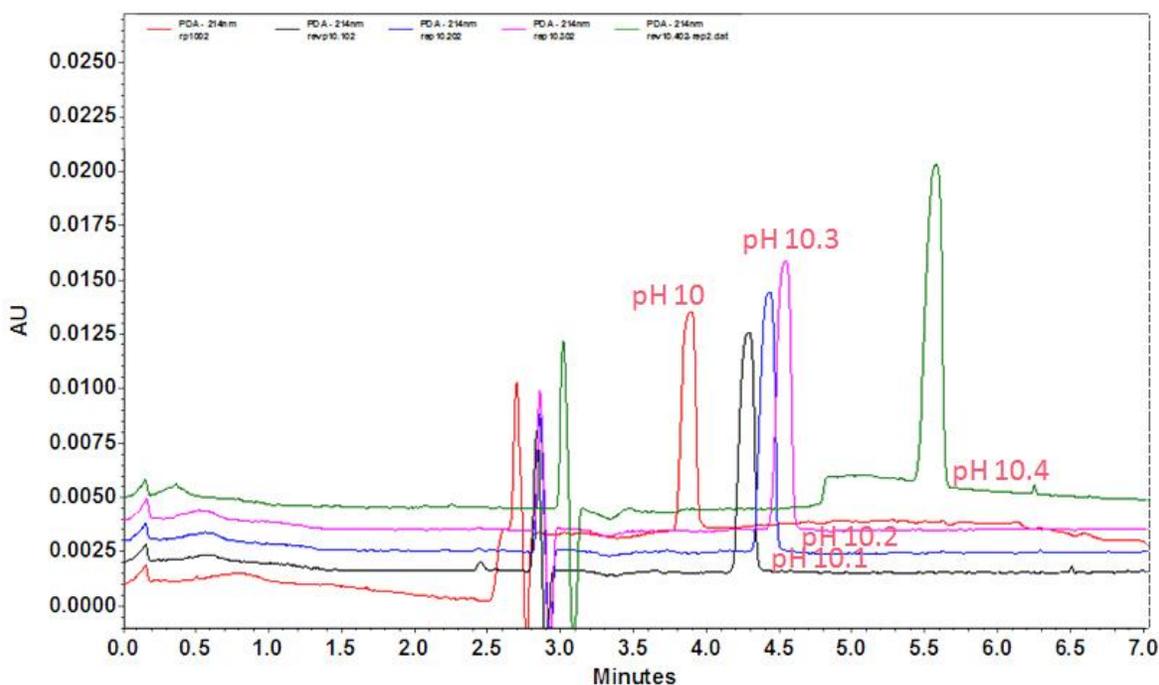


Figura 5.1-J Electroferogramas en el estudio del pH para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 µm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM

Como la simetría y eficiencia de los picos obtenidos para ractopamina con el cambio del pH de 10 a 10.5 es similar, se seleccionó el pH de 10.2, ya que es un valor cercano al

segundo pKa del ácido carbónico (10.35) (Ringbom, 1979) y así se asegura un buen amortiguamiento del buffer y consecuentemente una buena repetibilidad en la validación.

5.1.4 Influencia de la longitud del capilar

En un principio el capilar que se utilizó fue de 58 cm de longitud total y 48 cm de longitud efectiva, a un voltaje de 19 kV, sin embargo los tiempos de migración eran altos, con corrientes que superaban los 280 μA (con la consecuente generación de calor de Joule), por lo que se optó por utilizar un capilar más pequeño de 31.5 cm de longitud total y 20 cm de longitud efectiva, con lo que disminuyó drásticamente (menores a 70 μA las corrientes obtenidas (Figura 5.1 K).

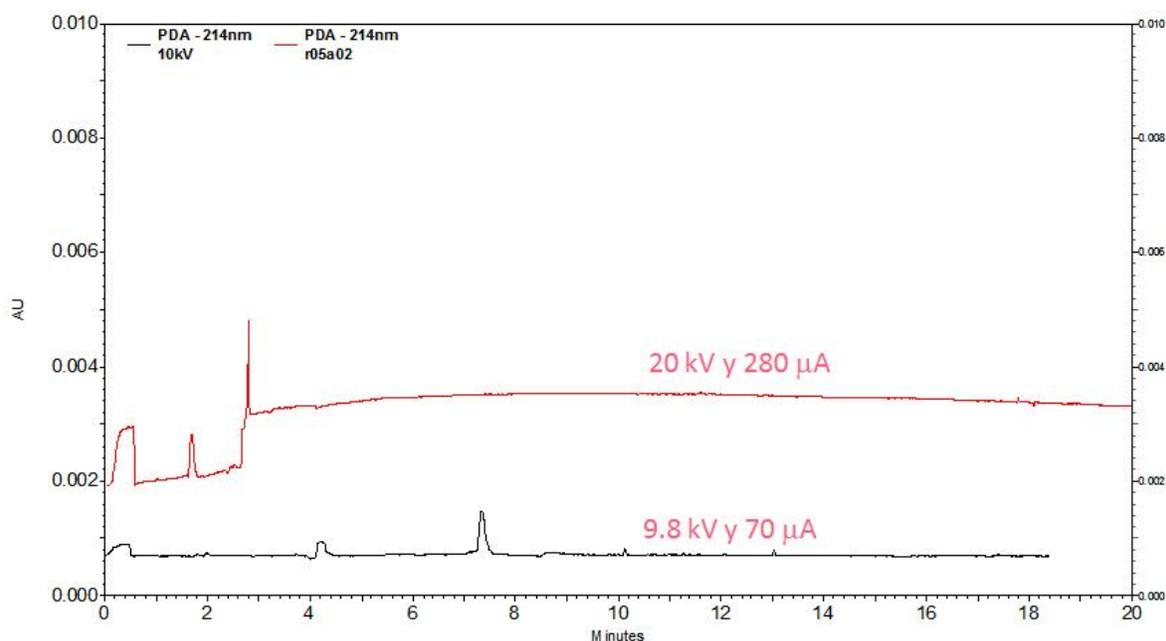


Figura 5.1-K Electroferograma longitud del capilar en la señal de Ractopamina [0.1mg/mL].
Condiciones: Capilar de sílice fundida), 50 μm de d.i, buffer de carbonatos 70 mM, pH: 10

En la Figura 5.1-K podemos ver que utilizando el capilar de 31.5 cm de longitud total (L.T) electroferograma color rojo a 20 kV da una corriente muy grande (280 μA) y modulando el voltaje la corriente vuelve a 70 μA .

La selección del voltaje de 9.8 kV se realizó calculando con la ecuación:

$$E = \frac{V}{L}$$

Donde, E es el campo eléctrico, V es el voltaje y L es la longitud del capilar. Y sabiendo lo anterior podemos ver que el campo eléctrico en el capilar de 61 cm era:

$$E = \frac{V}{L} = \frac{1900v}{61cm} = 311.47540v/cm$$

Por lo que para tener el mismo campo se sustituyen las medidas del capilar chico, quedando:

$$v = E * L = \frac{311.47540v}{cm} * 31.5cm = 9811.4751V$$

El voltaje que se debe imponer es de 9811.4751 V lo cual es 9.811 kV.

5.1.5 Estándar interno

La adición de un estándar interno tiene como finalidad minimizar las diferencias en los tiempos de migración, áreas y alturas de los picos obtenidos, debido a los cambios de viscosidad entre las muestras, errores en toma correcta de alícuotas durante la preparación, errores en el volumen de inyección que el equipo toma de cada vial y errores en aforos etc. con la finalidad de proporcionar resultados más precisos.

Cabe mencionar que para la elección del E.I más adecuado, consiste en seleccionar un compuesto de estructura similar al analito en estudio, que cumpla con las siguientes características: que sea de alta pureza, estable, que no esté presente en la muestra de forma natural; además, su señal no se vea traslapada con la de estudio y que sea lo más simétrica posible (gaussiana), para facilitar su buena integración.

Ya que el E.I se utiliza a una concentración constante en cada vial, se espera obtener una respuesta de la misma magnitud (área constante) en todos los viales, de esta forma pequeñas variaciones en el área obtenidas de E.I son incluidas en las ecuaciones para la cuantificación.

5.1.5.1 Selección del estándar Interno. (E.I)

Como se puede observar en la Figura 5.1-L el pico de la ractopamina presenta una buena precisión en tiempos de migración (%RSD<1.5 %), sin embargo al presentar una precisión

baja en las áreas bajo la curva, se decidió utilizar un estándar interno con la finalidad de lograr una mejora considerable en la variabilidad producida principalmente por pequeños cambios en los volúmenes de inyección.

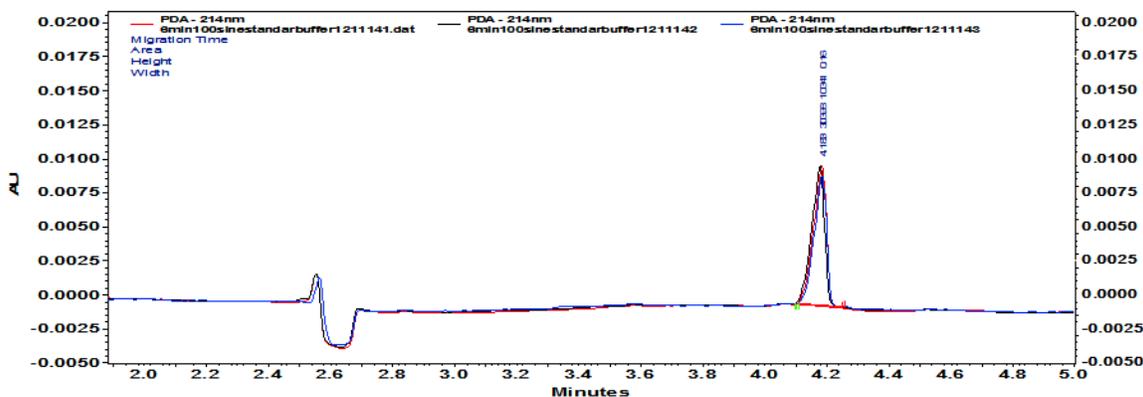


Figura 5.1-L Electroferograma de la ractopamina para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2

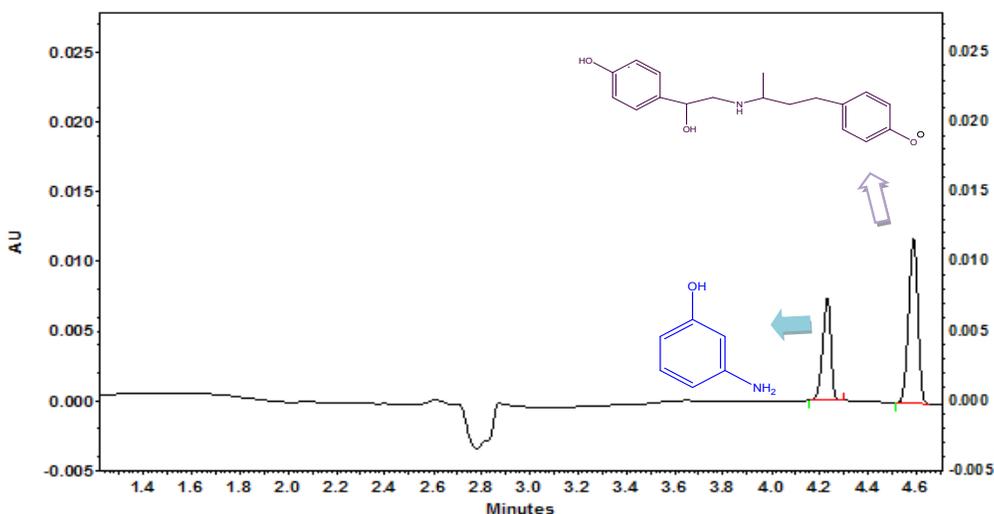


Figura 5.1-M Electroferograma de la ractopamina y el estándar interno 3 amino fenol para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Las mismas de la Figura 5.1-L

De esta forma el 3-aminofenol fue elegido como estándar interno y su señal se puede observar en la Figura 5.1-M, observándose que no se traslapa con el de la ractopamina y posee un tiempo de migración de alrededor de 4.6 min.

5.1.6 Resumen de las condiciones óptimas de separación para el control de calidad de la Ractopamina

Resumiendo, las condiciones óptimas para la medición del pico de la ractopamina en la Tabla 5.1-1.

Tabla 5.1-I Condiciones óptimas de separación para el control de calidad de la ractopamina

CONDICIÓN	VALOR
Estándar Interno	3-Aminofenol
Capilar de sílice fundida	L.T: 31.5 cm, L.E: 20 cm, 50 µm de d.i
Electrolito soporte	Buffer de carbonatos 70 mM, pH 10.2
Voltaje de separación	9.8 kV
Detector UV	λ=214 nm

5.1.7 Validación del método analítico.

Con la finalidad de asegurar que se cuenta con un método confiable para la determinación de ractopamina en muestras comerciales, se llevó a cabo la validación de éste. Los resultados de la serie de pruebas realizadas se presentan en seguida.

5.1.7.1 Precisión del sistema

Se evaluó la precisión del sistema, realizando 6 mediciones consecutivas del estándar y reportando él %RSD (C.V.) para tiempos de migración (t_m) relación de áreas ($A_{\text{Ractopamina}}/A_{\text{EI}}$) y relación de alturas ($H_{\text{Ractopamina}}/H_{\text{EI}}$) mostradas en la Tabla 5.1-II.

En lo que respecta a los tiempos de migración se obtienen %RSD < 0.5 % (Tabla 5.1-II) y de acuerdo a los criterios de aceptación (%RSD<1.5 %) mostrados en el apartado 4.5.3 y según la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010) este método es preciso.

Tabla 5.1-II Precisión (%RSD) para tiempos de migración, áreas y alturas de la ractopamina

Precisión del sistema

[racto]	Ractopamina			Estándar Interno			Relación	
	Tm	Área	Altura	Tm	Área	Altura	Área racto/Área EI	Altura racto/Altura EI
100	4.237	56071	21314	4.642	55053	21671	1.0185	0.9835
100	4.222	55540	21006	4.652	54548	21501	1.0182	0.9770
100	4.2	54662	20847	4.654	52984	20962	1.0317	0.9945
100	4.242	57698	21506	4.642	55248	21851	1.0443	0.9842
100	4.237	56416	21376	4.638	55980	22016	1.0078	0.9709
100	4.246	54564	20749	4.615	53014	21058	1.0292	0.9853
Promedio(\bar{X})	4.2307	55825.1667	21133	4.6405	54471.1667	21509.8333	1.0250	0.9826
σ	0.017	1178.2904	308.6487	0.0140	1229.5919	424.9534	0.0128	0.0080
RSD	0.4038	2.1107	1.4605	0.3010	2.2573	1.9756	1.2508	0.8150

En cuanto a la relación de áreas y alturas cuando se utilizó como E.I al 3-aminofenol observamos que se tienen %RSD <1.5%, de acuerdo a los criterios de aceptación, se considera que el método es preciso.

5.1.7.2 Linealidad del sistema

Se realizó la curva de calibración de acuerdo a lo establecido en el Apartado 4.5.3 y Anexo 4, en la siguiente Figura 5.1-N se observan la curva de calibración del sistema y sus corrientes respectivamente.

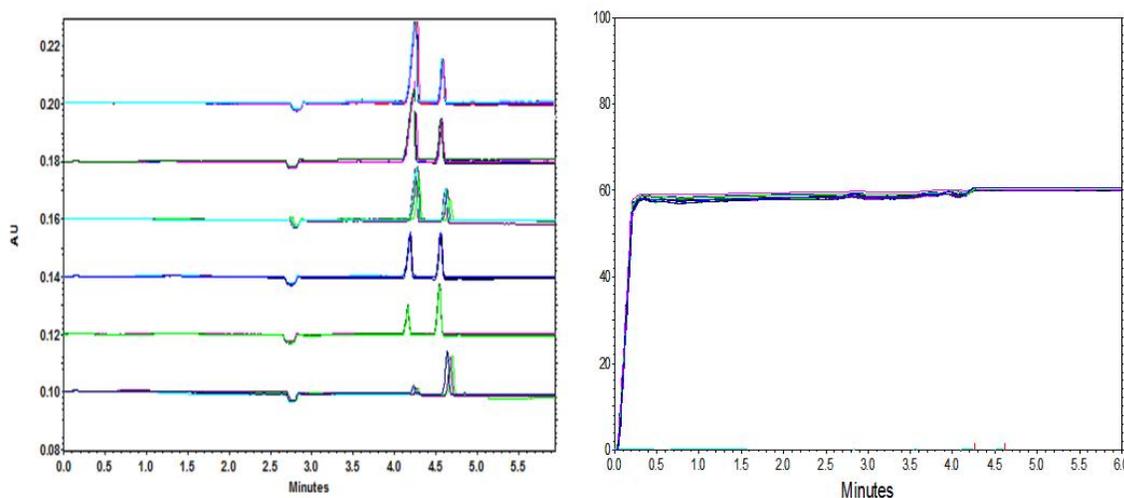


Figura 5.1-N Electroferograma de la linealidad del sistema y sus corrientes. Señales de (4.2 min) y E.I (4.6 min) Condiciones: Capilar de sílice fundida, L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2, E.I: 3-aminofenol [25.5 ppm]

Posteriormente se eligió a “la relación de áreas” como la respuesta analítica a seguir, ya que aunque la “relación de alturas” presenta una mejor precisión, posteriormente se

observará que los modelos encontrados son más confiables en relaciones de áreas (Tabla 5.1-III).

Tabla 5.1-III Ecuación obtenida de la curva de calibración del sistema para la ractopamina en relación en Áreas

Respuesta	Ecuación
Relación de Áreas	$\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}} = -0.0206 \pm 0.0607 + 0.0107 \pm 0.0005 [Ractopamina]$

En la Tabla 5.1-IV se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la relación de áreas y alturas.

Tabla 5.1-IV Resultados obtenidos de la curva de calibración del sistema para la ractopamina

Solución	[Ractopamina] (mg/L)	[3-aminofenol] (mg/L)	A _{Ractopamina}	A _{A3-aminofenol}	A _{Ractopamina/A3-aminofenol}	H _{Ractopamina}	H _{A3-aminofenol}	H _{Ractopamina/H3-aminofenol}
1	11.875	25.5	6807	57001	0.1194	3112	21540	0.1445
1	11.875	25.5	6708	56944	0.1178	3114	21685	0.1436
1	11.875	25.5	6665	55131	0.1209	3073	21073	0.1458
2	47.5	25.5	23492	48611	0.4833	10571	19185	0.5510
2	47.5	25.5	21392	45041	0.4749	9699	17845	0.5435
2	47.5	25.5	21631	44301	0.4883	9919	18410	0.5388
3	95	25.5	56071	55053	1.0185	21314	21671	0.9835
3	95	25.5	55540	54548	1.0182	21006	21501	0.9770
3	95	25.5	54662	52984	1.0317	20847	20962	0.9945
4	142.5	25.5	78204	55171	1.4175	26807	21446	1.2500
4	142.5	25.5	79109	56436	1.4017	26970	21875	1.2329
4	142.5	25.5	77146	56029	1.3769	26549	21640	1.2268
5	190	25.5	84013	40510	2.0739	27880	16258	1.7148
5	190	25.5	70185	34450	2.0373	27412	15755	1.7399
5	190	25.5	81411	39069	2.0838	27034	15607	1.7322

En el Gráfico 5.1-1 se observa la curva de calibración de la relación de áreas vs. [Ractopamina], donde se puede apreciar que los datos tienen una tendencia lineal y cumplen con el criterio de homocedasticidad necesario para su evaluación por regresión de mínimos cuadrados (ver Anexo 6, Gráfico 1).

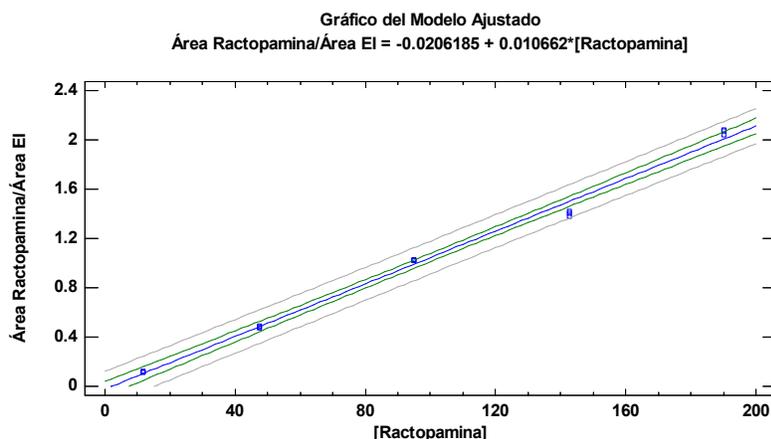


Gráfico 5.1-1 Curva de calibración del sistema para el control de calidad

Se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9934 el cual cumple con el criterio ($r^2 > 0.98$).

Se determinó el intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)) siendo este:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 0.0107 \pm (2.160)(0.0002) = 0.0107 \pm 0.0005$$

Donde el intervalo va de 0.0102 hasta 0.0112 por lo que no incluye al cero, cumpliendo entonces este modelo con todos los criterios establecidos por la guía de validación del colegio de QFB's (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

Cabe hacer mención que aunque esta prueba cumple con todos los parámetros establecidos por la guía de validación, no cumple con la prueba de ANOVA con falta de ajuste. (Ver Anexo 6, Tabla 1).

5.1.7.3 Selectividad (Especificidad)

Se realizó la preparación de soluciones de placebo (cascarilla de maíz) proporcionado por la compañía Paffa, preparándose ésta como si fuera una muestra comercial.

Al mostrar en la Figura 5.1-O, la ausencia de interferencias (señales) en el placebo al tiempo de migración de la ractopamina y el estándar interno 3-aminofenol, podemos afirmar que el método es selectivo (específico).

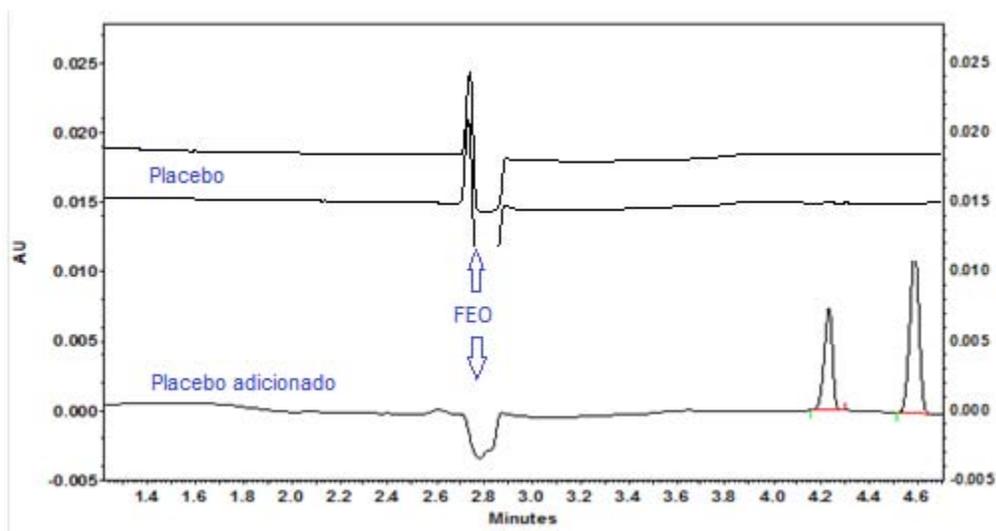


Figura 5.1-O Electroferograma del placebo y el placebo adicionado con Ractopamina [0.1mg/mL] y E.I: 3-aminofenol. Condiciones: Capilar de sílice fundida, L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2, E.I: 3-aminofenol [25.5 ppm]

5.1.7.4 Precisión del método

Se evaluó la repetibilidad del método sabiendo que era selectivo (específico) para ello se realizaron 6 mediciones consecutivas del estándar con la ractopamina reportando el %RSD (C.V.) para tiempos de migración (t_m) relación de áreas ($A_{\text{Ractopamina}}/A_{\text{EI}}$) y relación de alturas ($H_{\text{Ractopamina}}/H_{\text{EI}}$) mostradas en la Tabla 5.1-V

En lo que respecta a los tiempos de migración se obtienen %RSD < .2% (Tabla 5.1-V) y de acuerdo a los criterios de aceptación (%RSD < 3 %) el método es preciso.

Tabla 5.1-V Precisión del método para el control de calidad de la ractopamina, mostrando el %RSD de tm, y relación áreas y alturas de la ractopamina y el 3-aminofenol

Precisión del método

[racto]	Ractopamina			Estándar Interno			Relación	
	Tm	Área	Altura	Tm	Área	Altura	Área racto/Área EI	Altura racto/Altura EI
100	4.24	49912	15688	4.602	48758	15551	1.0237	1.0088
100	4.246	50433	15863	4.58	49221	15684	1.0246	1.0114
100	4.238	50487	15911	4.6	48794	15660	1.0347	1.0160
100	4.249	49857	15687	4.567	49344	15738	1.0104	0.9968
100	4.24	49440	15611	4.591	48525	15463	1.0189	1.0096
100	4.254	49397	15578	4.618	48677	15476	1.0148	1.0066
Promedio	4.2445	49921	15723	4.5930	48886.5000	15595.3333	1.0212	1.0082
σ	0.0063	467.4642	134.9326	0.0179	322.7499	114.9916	0.0085	0.0064
RSD	0.1473	0.9364	0.8582	0.3900	0.6602	0.7373	0.8347	0.6387

En lo que respecta a la relación de áreas y alturas cuando se utilizó como E.I al 3-aminofenol observamos que se tienen %RSD <1%, los cuales cumplen con los criterios de aceptación, establecidos (%RSD <3 %), por lo que se considera que el método es preciso.

5.1.7.5 Linealidad del método y Exactitud (Recobro)

Se realizó la curva de calibración de acuerdo a lo establecido en el apartado 4.5.3 y Anexo 5 y 7, en la siguiente Figura 5.1-P se observan los Electroferogramas de la curva de calibración del método y sus corrientes respectivas.

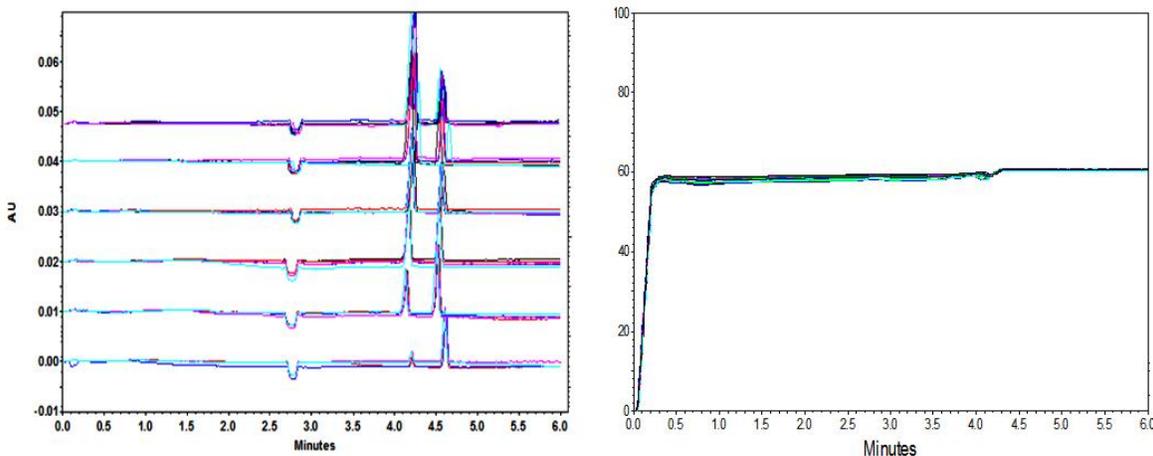


Figura 5.1-P Electroferograma de la linealidad del método y sus corrientes. Señales de Ractopamina (4.2 min) y E.I (4.6 min) Condiciones: Capilar de sílice fundida, L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 E.I: 3-amino fenol [25.5 ppm] Placebo

Se aplico el método de mínimos cuadrados a los datos obtenidos de las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el 3-amino fenol y obteniendo

como respuesta el área, la altura, las relaciones de área (Rel. A) y las relaciones de altura (Rel. H) de los picos. Estos datos se muestran en el Anexo 7.

Inicialmente se utilizó un intervalo de concentraciones de 12.5 a 250 ppm, solo que como puede verse en la Figura 5.1-Q inciso A, la linealidad comienza a perderse a concentraciones mayores a 200 ppm. Con este experimento podemos concluir que el intervalo lineal para la evaluación de la curva es de 12.5 a 200 ppm. La curva y los residuales obtenidos se pueden ver en la Figura 5.1-Q inciso B, siendo los residuales homocedásticos. Se eligió la relación de áreas como respuesta analítica a seguir, ya que con estos datos se obtiene una mayor precisión (Anexo 7).

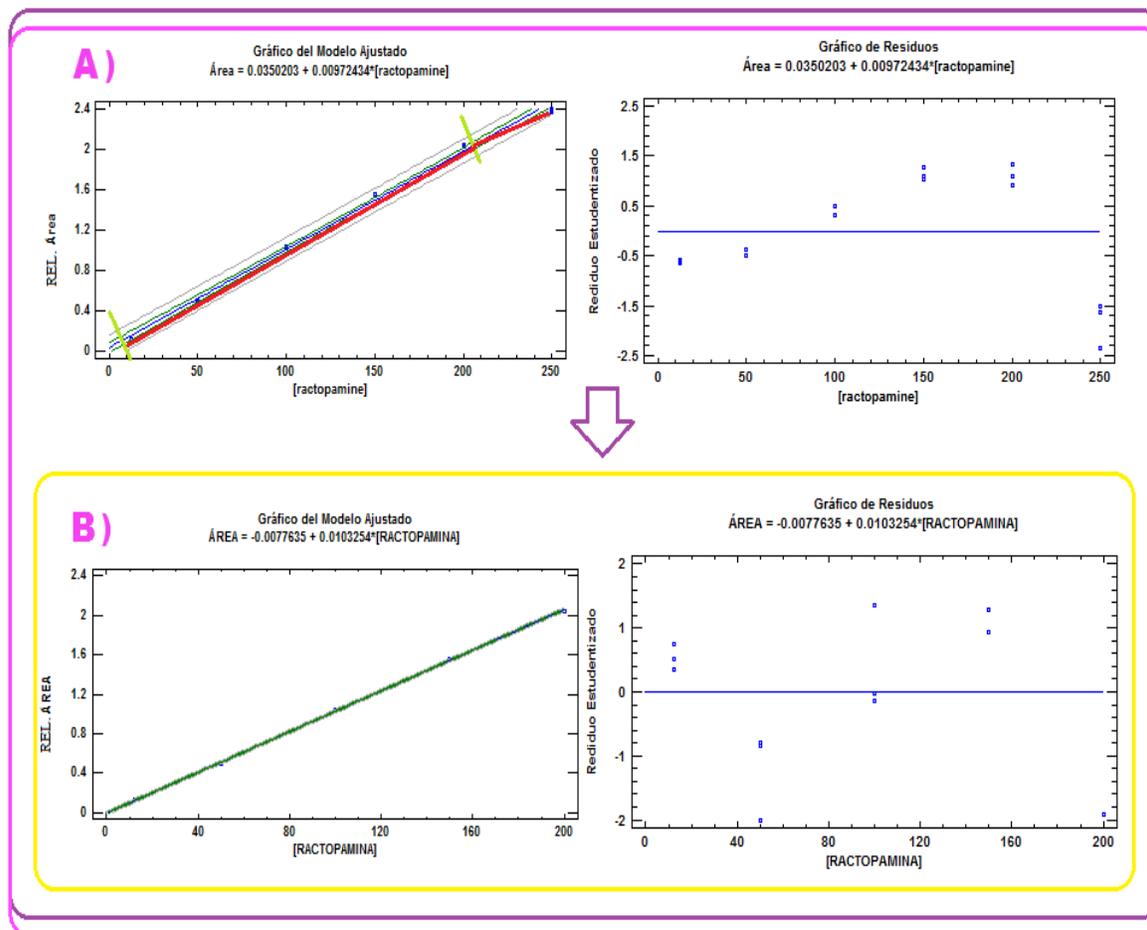


Figura 5.1-Q Selección del rango de concentraciones a utilizar, mostrando en la imagen A) el gráfico de regresión con sus respectivos residuales y B) el gráfico ajustado con sus respectivos residuales

En la Tabla 5.1-VI se muestran los valores obtenidos de áreas, alturas, relaciones de áreas y alturas de la medición de las soluciones de las curvas de calibración, para la evaluación de la linealidad del método.

Tabla 5.1-VI Datos obtenidos para la linealidad del método para la ractopamina

Solución	[Ractopamina] (mg/L)	[3-aminofenol] (mg/L)	A _{Ractopamina}	A _{A3-aminofeol}	A _{Ractopamina/A3-aminofeol}	H _{Ractopamina}	H _{A3-aminofeol}	H _{Ractopamina/H3-aminofeol}
1	12.5	25.5	6327	50547	0.1252	2512	16056	0.1565
1	12.5	25.5	6346	51237	0.1239	2474	15940	0.1552
1	12.5	25.5	6325	49866	0.1268	2446	15544	0.1574
2	50	25.5	25579	51655	0.4952	9288	16224	0.5725
2	50	25.5	25872	51537	0.5020	9381	16369	0.5731
2	50	25.5	25612	50993	0.5023	9344	16272	0.5742
3	100	25.5	49912	48758	1.0237	15688	15551	1.0088
3	100	25.5	50433	49221	1.0246	15863	15684	1.0114
3	100	25.5	50487	48794	1.0347	15911	15660	1.0160
4	150	25.5	73414	47360	1.5501	20283	15200	1.3344
4	150	25.5	73803	47351	1.5586	20350	15208	1.3381
4	150	25.5	73922	47759	1.5478	20363	15320	1.3292
5	200	25.5	94075	46216	2.0356	24185	15167	1.5946
5	200	25.5	95035	46429	2.0469	24368	15252	1.5977
5	200	25.5	94933	46839	2.0268	24270	15412	1.5747

En el Gráfico 5.1-2 se observa la curva de calibración para la ractopamina, donde es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

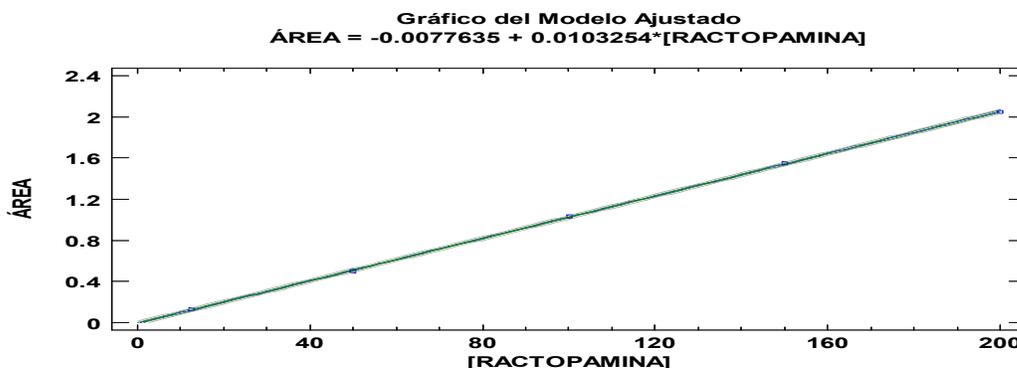


Gráfico 5.1-2 Curva de calibración del método de la ractopamina

El coeficiente de determinación (r^2) obtenido es de 0.9999, el cual es mayor al criterio de la guía de validación ($r^2 > 0.98$) (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010)

La ecuación obtenida para la relación de áreas vs [Ractopamina] en un intervalo de 12.5 a 200 ppm se muestra en la Tabla 5.1-VII.

Tabla 5.1-VII Ecuación de la linealidad del método para la ractopamina en relación de áreas

Respuesta	Ecuación
Relación de Áreas	$\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}} = -0.0078 \pm 0.0091 + 0.0103 \pm 9 \times 10^{-5} [Ractopamina]$

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)). El procedimiento del cálculo se puede ver en el Anexo 7.

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 0.0103 \pm (2.228)(4 \times 10^{-5}) = 0.0103 \pm 9 \times 10^{-5}$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.0102 hasta 0.0104. E incluye a la unidad, de esta forma se aceptó el intervalo como válido y de nuevo se ve un ajuste de los datos al modelo lineal.

Evaluación de la Exactitud (Recobro)

Con los datos obtenidos de la curva de calibración y la ecuación generada, se construyó el gráfico de [Ractopamina] adicionada vs. [Ractopamina] recuperada que se muestra en

el Gráfico 5.1-3. A partir de éste gráfico y los datos mostrados en la Tabla 5.1-VIII se realizan los cálculos para la evaluación de la exactitud del método.



Gráfico 5.1-3 Grafico de recuperación de la ractopamina para el cálculo de la exactitud y el (IC (μ))

Se puede observar que la ractopamina adicionada vs la recuperada tiene un comportamiento lineal con un coeficiente de determinación (R^2)=0.9999 además de que su pendiente (b_1) tiende a 1 mientras que el intercepto (b_0) tiende a 0.

Tabla 5.1-VIII Datos para el cálculo del intervalo de confianza del porcentaje de recobro (IC (μ)) del gráfico de recuperación [ractopamina adicionada] [ractopamina recuperada]

[Ractopamina]	[Ractopamina recuperada]	%Recobro
12.5	12.8773	103.0186
12.5	12.7514	102.0114
12.5	13.0323	104.2582
50	48.7113	97.4226
50	49.3699	98.7397
50	49.3989	98.7978
100	99.8957	99.8957
100	99.9829	99.9829
100	100.9611	100.9611
150	150.8768	100.5845
150	150.6541	100.4360
200	198.9912	99.4956
	\bar{x}	100.4670
	σ	1.9086
	%RSD	1.9175

Podemos observar en la Tabla 5.1 VIII mostrada anteriormente el porcentaje de recobro presenta un intervalo en porcentaje desde 97.4226 hasta 104.2582% con lo cual cumple según el criterio de aceptación que va de 97-103% por lo tanto es un método exacto.

Y en cuanto CV_{recobro} el cual tiene un valor de 1.918 por lo tanto podemos ver que cumple de acuerdo al criterio de aceptación del CV_{recobro} el cual es menor al 2%

Evaluando el IC (b_1) de acuerdo a la guía de validación.

$$IC(\mu) = y \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} = 1.02117 \pm 2.447 \left(\frac{0.0085}{\sqrt{6}} \right) = 1.02117 \pm 0.0085$$

Se obtuvo un intervalo de 1.0123 a 1.0297 el cual colocándolo en porcentaje va desde 99.1662 hasta 100.8838 % con lo cual según el criterio de aceptación (incluye el 100 %) lo cumple de acuerdo al criterio de aceptación de la guía de validación (%RSD<2%). (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

5.1.7.6 Efecto de la matriz

Se evaluó el efecto de la matriz con base en las curvas de calibración de las pruebas de linealidad del sistema y método, de acuerdo a las ecuaciones de las Tablas 5.1.III y 5.1.VII. Estas ecuaciones se superponen en el Gráfico 5.1 4, donde se compararán sus pendientes, a fin de concluir si existe o no efecto de matriz.

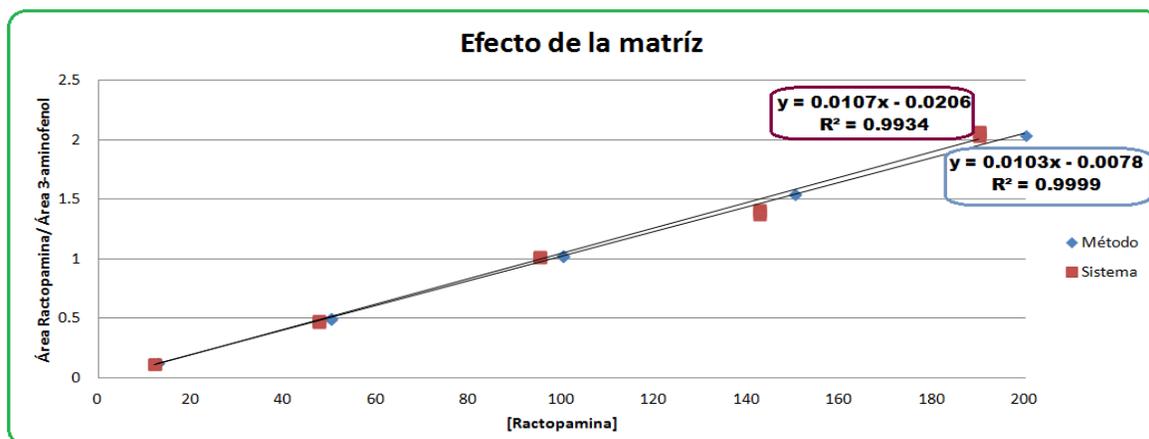


Gráfico 5.1-4 Evaluación del efecto matriz de las pendientes de las curvas de calibración de sistema y método para el control de calidad de la ractopamina

Realizando una prueba de hipótesis para la comparación de las pendientes de linealidad de sistema y linealidad de método (medias) se obtuvo que la $t_{cal} (-4.1432) < t_{tablas} (2.064)$ por lo tanto no existe efecto de la matriz.

El desglose completo del procedimiento para la comparación de estas pendientes se puede ver en el Anexo 9. Se concluye entonces que la interpolación y posterior cuantificación de las muestras comerciales puede realizarse indiferentemente en la curva de calibración preparada en el disolvente ó la preparada ya incluyendo el placebo.

5.1.7.7 Límite de detección y límite de cuantificación

En la Tabla 5.1-IX se muestran el cálculo para la obtención de los límites de detección y cuantificación de acuerdo al Apartado 3.3.1.7 y 3.3.1.8.

Tabla 5.1-IX Cálculo de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) a partir del modelo mostrado en Tabla 5.1.VII y en el Anexo 7, Tabla 2 y Tabla 3

LD (mg/L)	LC (mg/L)
$LD = \left(\frac{3.3 * S_{y/x}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.00826743}{0.0103254} \right) = 2.64 \text{mg/L}$	$LC = \left(\frac{10 * S_{y/x}}{b_1} \right) = \left(\frac{10 * 0.00826743}{0.0103254} \right) = 8.00 \text{mg/L}$
ó	ó
$LD = \left(\frac{3.3 * S_{b0}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.004098070491}{0.0103254} \right) = 1.30 \text{mg/L}$	$LC = \left(\frac{3.3 * S_{b0}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.004098070491}{0.0103254} \right) = 1.30 \text{mg/L}$

El procedimiento completo se puede ver en el Anexo 8.

5.1.7.8 Tabla resumen de la validación

En la Tabla 5.1-X se muestran los parámetros evaluados en la validación para el control de calidad de la ractopamina de acuerdo a la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

Tabla 5.1-X Tabla de resumen de los parámetros evaluados en la validación de la ractopamina para el control de calidad de este fármaco

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumplimiento
Precisión del sistema	%RSD < 1.5%	%RSD < 1.5% $T_M = 0.40$ $\frac{A_{Ractopamina}}{A_{EI}} = 1.25$ $\frac{H_{Ractopamina}}{H_{EI}} = 0.81$	Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ IC(β_1), no debe incluir el cero	$R^2 = 0.9999$ IC(β_1) = 0.0107 ± 0.0005 0.0102 hasta 0.0112	Cumple
Selectividad (Especificidad)	Respuesta del analito	Respuesta de la ractopamina	Cumple

Exactitud y repetibilidad del método	<p><u>IC(μ)</u> debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % recobro se incluya en el intervalo: 97-103%</p> <p><u>CV del % recobro</u> < 3%</p>	<p><u>IC(μ)</u> 97.4226 hasta 104.2582</p> <p>CV_{recobro} 1.9175</p>	Cumple
Precisión del método	<p>$CV \leq 2\%$</p>	<p style="text-align: center;">$T_M = 0.14$</p> <p style="text-align: center;">$\frac{A_{\text{Ractopamina}}}{A_{EI}} = 0.83$</p> <p style="text-align: center;">$\frac{H_{\text{Ractopamina}}}{H_{EI}} = 0.63$</p>	Cumple
Linealidad del método	<p><u>Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:</u></p> <p>$R^2 > 0.98$</p> <p>El $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad</p> <p>El $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero</p> <p>El RSD o $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro < 2%</p>	<p style="text-align: center;">$R^2 = 0.9999$</p> <p style="text-align: center;">$IC(\beta_1) = 0.0103 \pm 9 \times 10^{-5}$</p> <p style="text-align: center;">0.0102 hasta 0.0103</p> <p style="text-align: center;">$IC(\beta_0) = -0.0078 \pm 0.0091$</p> <p style="text-align: center;">-0.0169 hasta 0.0013</p>	Cumple
Límite de cuantificación y detección.	<p>Calculada a partir de:</p> <p>1) $S_{y/x}$</p> <p>2) S_{bo}</p>	<p>1) $LD = 2.64 \text{ mg/L}$</p> <p style="text-align: center;">ó</p> <p>2) $LD = 1.30 \text{ mg/L}$</p> <p>1) $LC = 8.00 \text{ mg/L}$</p> <p style="text-align: center;">ó</p> <p>2) $LC = 1.30 \text{ mg/L}$</p>	

Continuación de la Tabla 5.1-X

5.1.8 Cuantificación de Muestras

La cuantificación de la ractopamina se llevó a cabo por la interpolación de las señales obtenidas por CE, con la Ecuación 4 mostrada en el Anexo 11. Utilizando las ecuaciones de calibración de sistema y método respectivamente.

5.1.8.1 Racmina premix, Pafmine y Paylean

En la Tabla 5.1-XI podemos observar las concentraciones de la ractopamina presente en las muestras: Racmina premix (Con un contenido del 10 % de ractopamina) Pafmine y Paylean (Con un contenido del 2% de ractopamina) además de los gramos de ractopamina obtenidos por cada 100 g de cada muestra:

Tabla 5.1-XI Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en las muestras Racmina Premix, Pafmine y Paylean.

Curva utilizada: Método	$A_{\text{Ractopamina}}/A_{3\text{-aminofenol}}$	[Ractopamina] mg/L	mg Ractopamina/100 g muestra
Racmina premix	0.9220	90.0484	9.0048
	0.9155	89.4139	8.9414
	0.8994	87.8563	8.7856
Pafmine	0.8975	87.6778	1.7536
	0.9076	88.6522	1.7730
	0.8845	86.4190	1.7284
Paylean	0.7575	74.1137	1.4823
	0.7383	72.2508	1.4450
	0.7520	73.5785	1.4716

Por lo tanto el promedio obtenido para cada uno de ellos se observa en la Tabla 5.1-XII.

Tabla 5.1-XII Promedio obtenido para cada muestra comercial

Muestra comercial	mg Ractopamina/100 g muestra
Racmina premix	8.9106 ± 0.1138
Pafmine	1.7517 ± 0.0224
Paylean	1.4663 ± 0.0192

Para establecer que el producto cumple con la especificación de porcentaje de contenido químico se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- 1) Conclusión sobre el % de contenido utilizando el criterio aceptado a nivel industrial.
- 2) Conclusión sobre el % de contenido utilizando la prueba de hipótesis al 95 %.

1) Conclusión sobre el % contenido utilizando el criterio aceptado a nivel industrial.

Los fabricantes de producto con contenido de ractopamina en premezclas utilizan el criterio de aceptación de $\pm 15\%$, por lo que se observa un intervalo amplio de aceptación. Quizá esto se deba a su utilización como producto veterinario y a que se considera que la toma correcta de muestra, tiene una alta variación en composición ya que las premezclas como forma farmacéutica, tienden a poseer poca estabilidad física. Considerando que el producto está compuesto de cascarilla de maíz mezclado con el polvo del principio activo, es muy difícil la obtención de una mezcla uniforme (debido a los muy diferentes tamaños de partícula), tendiendo muchas veces a la segregación*. Debe también tomarse en cuenta que el tamaño de muestra de las premezclas utilizado en este trabajo fue de 10 g, lo cual es muy poco para minimizar este fenómeno de segregación. Finalmente, se debe aclarar que éste tipo de productos (alimento en premezclas con aditivos para engorda) no están regulados en cuanto al % de contenido por la SAGARPA, hecho que influye en su laxo % de aceptación.

* Tendencia a la separación de los componentes de una mezcla

2) Conclusión sobre el % de contenido utilizando la prueba de hipótesis al 95%

Utilizando el criterio estadístico del 95 % de confianza se realizó la siguiente prueba de hipótesis

$H_0: \bar{X}_{exp} = \mu = 10\%$ (ó 2% según el % ractopamina especificado en el marbete)

$H_1: \bar{X}_{exp} \neq \mu$

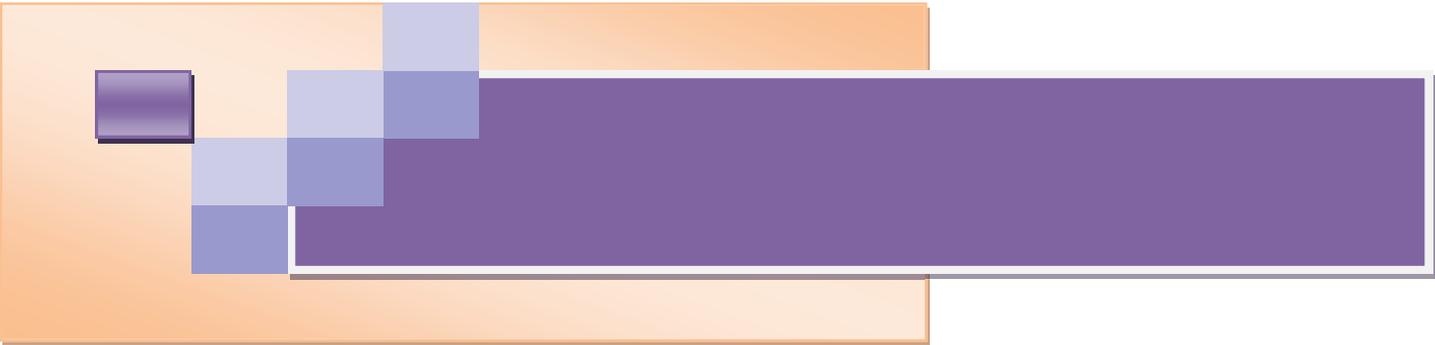
Se acepta H_0 si $t_{exp} < t_{tablas}$

En la Tabla 5.1-XIII se muestran los resultados obtenidos de la prueba de hipótesis para ver si cumple con la especificación del porcentaje de contenido para cada muestra comercial.

Tabla 5.1-XIII Datos para la prueba de hipótesis para cumplimiento de especificación del porcentaje de contenido para cada muestra comercial

Muestra comercial	T_{Tablas}	T_{exp}	Cumplimiento de la prueba de hipótesis
Racmina premix	4.3027	$t_{exp} \frac{10 - 8.9106}{\frac{0.1138}{\sqrt{3}}} = 16.7278$	16.7278 > 4.3027 Se rechaza H_0
Pafmine	4.3027	$t_{exp} \frac{2 - 1.7517}{\frac{0.0224}{\sqrt{3}}} = 19.1995$	19.1995 > 4.3027 Se rechaza H_0
Paylean	4.3027	$t_{exp} \frac{2 - 1.4663}{\frac{0.0192}{\sqrt{3}}} = 48.1456$	48.1456 > 4.3027 Se rechaza H_0

Se puede observar en la Tabla 5.1-XIII que las tres muestras comerciales no cumplen con la especificación por tanto se concluye que los 3 productos comerciales Racmina premix, Pafmine y Paylean contienen porcentajes de contenido del principio activo ractopamina, más bajos que los que reportan en su marbete. Lo anterior puede deberse principalmente a la utilización de una materia prima de ractopamina con baja pureza, la cual ha sido sobreestimada.



5.2 DESARROLLO DEL MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN QUIRAL DE LOS ISOMEROS DE LA RACTOPAMINA



5.2 Desarrollo del método analítico para la separación de los isómeros de la ractopamina.

Inicialmente se midió la señal de la ractopamina en CE utilizando un buffer de tetraboratos 50 mM sin ningún selector quiral, obteniéndose el siguiente electroferograma mostrado en la Figura 5.2-A.

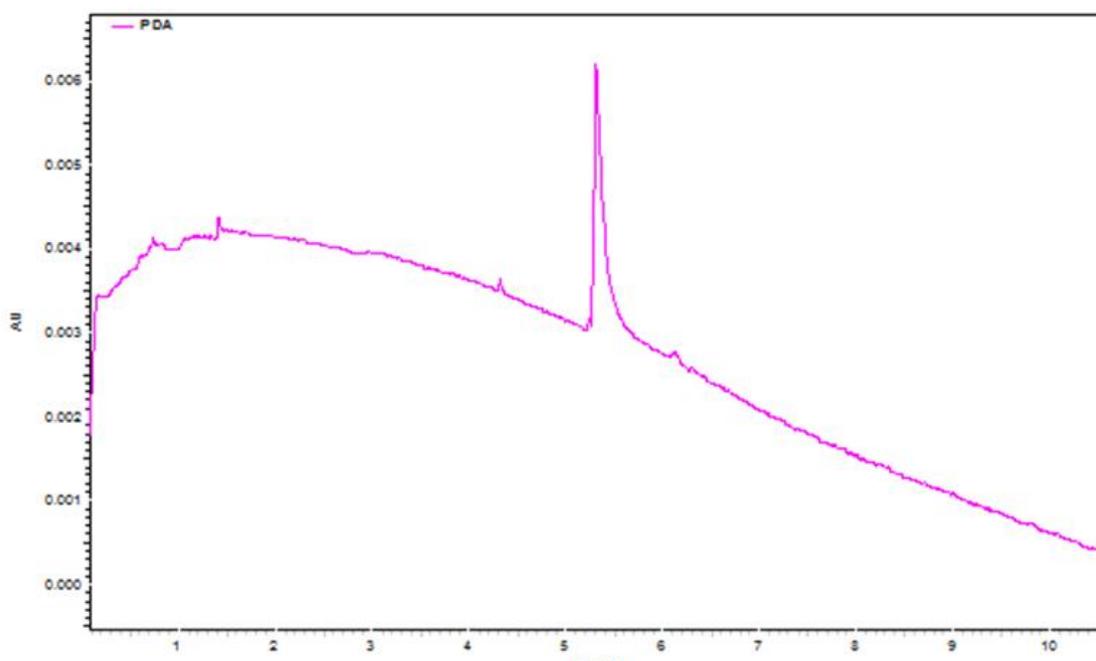


Figura 5.2-A Ractopamina sin selector quiral Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 °C

Como se observa en la Figura 5.2-A, sin el selector quiral no es posible la separación de los enantiómeros de la ractopamina, por lo que es necesario agregar al buffer algún selector que haga posible la separación. Esto era de esperarse, ya que enantiómeros de la ractopamina presentan idénticas propiedades fisicoquímicas, por lo tanto, también la movilidad es la misma.

5.2.1 Tipo de Selector Quiral (Ciclodextrina)

La selección del selector quiral es uno de los parámetros más importantes en el desarrollo de las separaciones quirales, ya que la interacción (complejo de inclusión) que se forma

entre el analito con un particular tipo de ciclodextrina es totalmente dependiente de las características enantioselectivas y conformación espacial del analito (Guttman & Brunet S, 1996). Para la elección del selector quiral los tipos de ciclodextrina altamente sulfatada utilizados fueron: HS α CD, HS β CD y HS γ CD sabiendo con anterioridad que este tipo de CD's son electrolitos fuertes, por lo que poseen cargas negativas a cualquier pH. Por lo anterior, se pensó que serían unos buenos selectores quirales para la ractopamina, ya que podrían interaccionar con ésta (pH<8.82), cuando se comporta como catión y adicionalmente habría atracción de cargas ó cuando la molécula estuviera neutra (8.82<pH<9.2). Los Electroferogramas con los resultados de las pruebas con diferentes CD's se observan en la Figuras 5.2-B y 5.2-C.

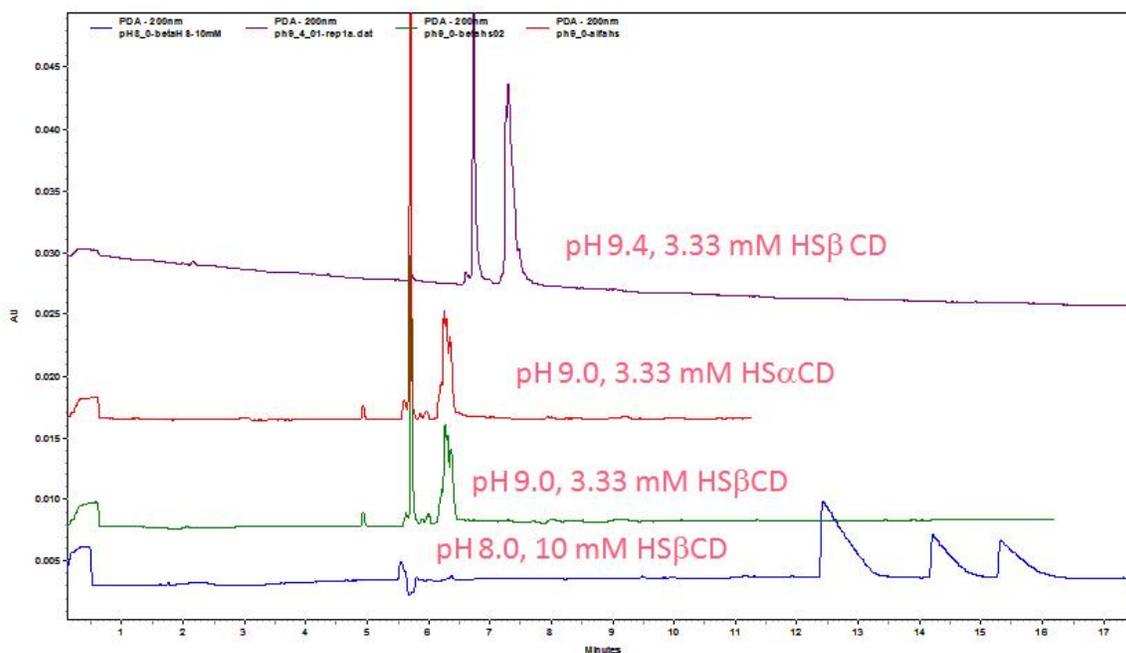


Figura 5.2-B Electroferograma del estudio del selector quiral para la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL] así como el pH. Condiciones: L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 μ m de d.i., buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 $^{\circ}$ C

Todas las ciclodextrinas se midieron a pH 8 y 9, cuando la molécula de ractopamina es catiónica y neutra respectivamente (ver Anexo 1) a las concentraciones de 3.33 y 10 mM. Como podemos ver (Figuras 5.2-B y 5.2-C) el electroferograma donde se observa la mayor enantioselectividad es el correspondiente a la utilización de la ciclodextrina HS β CD a un pH de 8.0, ya que es la única traza donde se observan 3 señales, a un

tiempo de análisis de aproximadamente 16 min. Aunque existe otro experimento donde se utilizó 10 mM de HS α CD a pH 9.0, está CD no presenta una considerable enantioselectividad ya que solo se observan 2 picos. De igual manera, cuando las CD's se utilizan a la concentración de 3.33 mM solo se observan 2 picos, no lográndose la separación de las 4 señales buscadas de los isómeros.

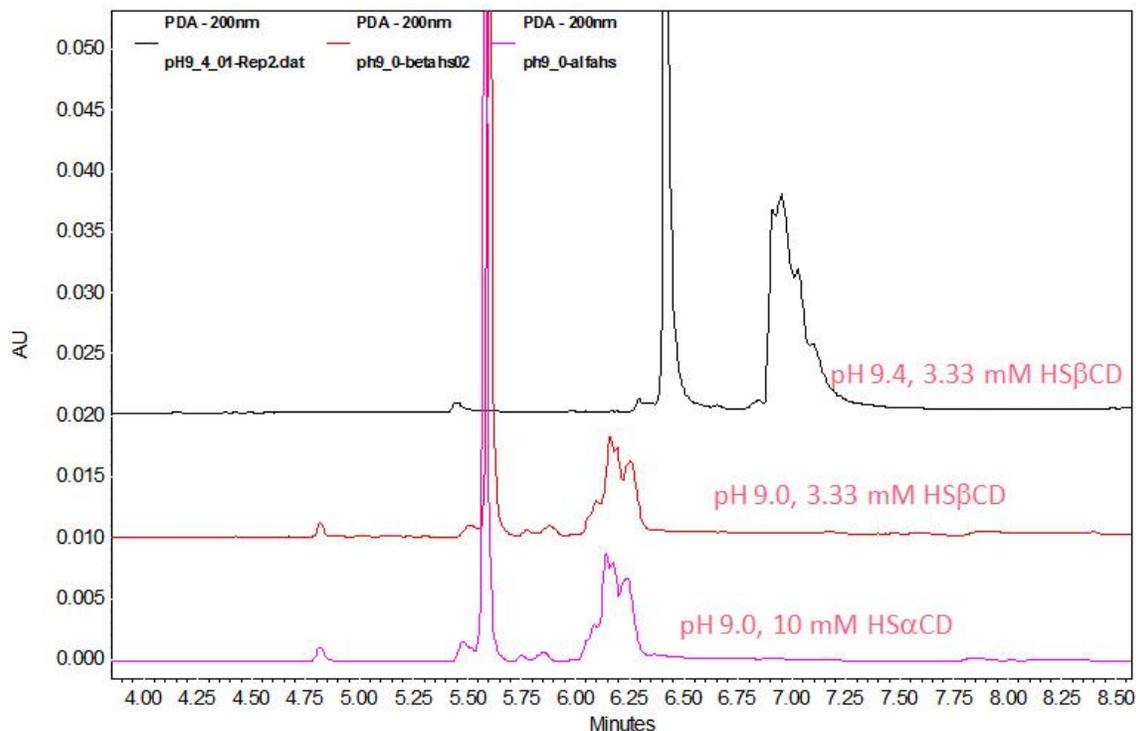


Figura 5.2-C Electroferograma del estudio del selector quiral para la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL] así como el pH. Condiciones: L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 $^{\circ}$ C. Variando concentración de ciclodextrinas

Tomando en cuenta lo anterior la HS β CD es el selector quiral que presentó más enantioselectividad, por lo que se elige para continuar con el estudio. Teniendo lo anterior se prosigue a llevar a cabo un diseño experimental, con la utilización de la HS β CD ya seleccionada.

La separación quiral se realizó con ayuda del software Design Expert 6.0, con el cual se diseñaron (ver Apartado 4.6.4, Tabla 4) y se midieron los siguientes experimentos en el equipo de EC. El análisis completo de la significancia de los factores (pH, [HS β CD] y su interacción) puede verse en el Anexo 3.

5.2.2 Influencia del pH

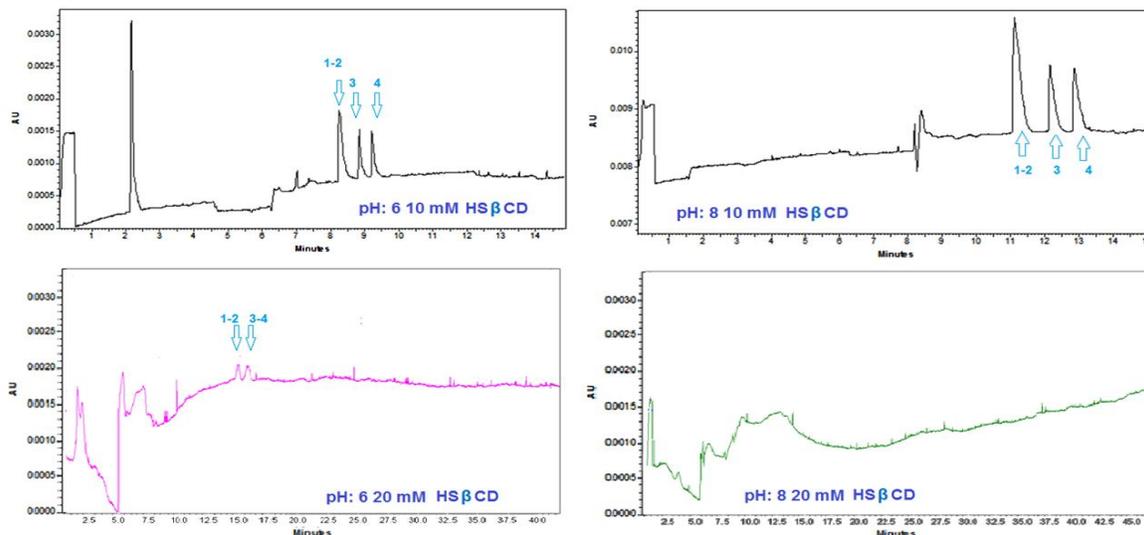


Figura 5.2-D Electroferogramas del estudio de la influencia del pH en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL]. Condiciones: Mismas de la figura 5.2-B, [HSβCD] 10 mM. Solo varía el pH

Comparando los Electroferogramas a pH 8 y 6 de la Figura 5.2-D se puede apreciar, que los tiempos de migración varían, obteniéndose a pH= 8 (tiempo de análisis 13.5 min) una mayor resolución para los picos de los enantiómeros 2 y 3, que a pH 6 (tiempo de análisis 9.5 min), por lo que se seleccionó pH 8 para realizar los experimentos posteriores.

Cabe destacar que la ractopamina en este intervalo de pH 6-8 impuesto está en forma catiónica ver en Anexo 1 mientras la HSβCD se encuentra en forma aniónica, por lo tanto hay una estabilización adicional (por atracción de cargas) de los enantiómeros de la ractopamina por la ciclodextrina (CD).

5.2.3 Concentración del selector quiral

Con lo anterior se prosigue a realizar un experimento en el que se varía la concentración de la HSβCD desde 5 mM hasta 20 mM para saber la concentración óptima de la HSβCD en la separación de la Ractopamina obteniéndose así el siguiente electroferograma.

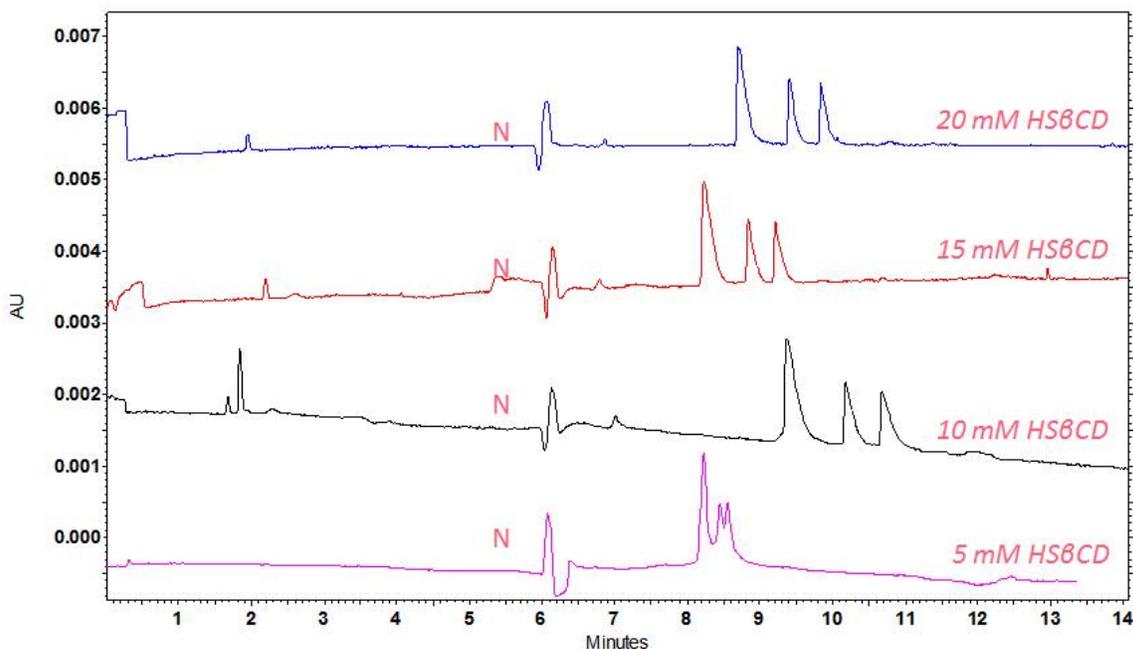


Figura 5.2-E Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de HS β CD en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2mg/mL] así como el pH. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.t: 58 cm (L.E: 48cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. N: FEO

Podemos apreciar en la Figura 5.2-E que a partir de concentraciones mayores de 5.0 mM el selector quiral (HS β CD) ya presenta cierta enantioselectividad aunque no suficiente para separar en línea base a los diferentes estereoisómeros de la Ractopamina.

A mayores concentraciones de 10 mM, ya es posible apreciar la separación en línea base de al menos 2 de los 4 estereoisómeros de la ractopamina utilizando la HS β CD, ya que dos de los estereoisómeros coeluyen en un solo pico. Además ya no fue posible usar concentraciones más altas debido a que 20 mM es la máxima concentración de HS β CD disponible comercialmente. También se observó un aumento en los tiempos de migración de los isómeros, con el aumento en la concentración de CD debido al aumento en la viscosidad del medio por adición del selector.

Como era de esperar, el aumento en la concentración de HS β CD conduce a tiempos de análisis más largos y una mayor movilidad negativa del complejo enantiómero-CD, debido a la carga negativa neta de esta entidad. (Asensi-Bernadi, Escunder-Gilabert, Martín-Biosca, Sagrado, & Medina.Hernández, 2014).

5.2.4 Modificador orgánico.

Como en el apartado anterior solo se pudieron separar 3 de las 4 señales de los isómeros de la ractopamina (ya que 2 isómeros coeluyen), entonces se propuso la adición de un modificador orgánico al buffer, con la finalidad de lograr un cambio en la selectividad de los isómeros no separados aun, por el selector quiral HS β CD. Para ello fueron seleccionados 2 modificadores: el Acetonitrilo y el metanol.

La adición de un modificador orgánico al buffer se ha convertido en algo muy común en los métodos por electroforesis capilar. En consecuencia, varios grupos han estudiado el efecto que los modificadores orgánicos tienen con la unión de los enantiómeros y ciclodextrinas. (R.Gratz & M. Stalcup, 1998) (Bressolle, Audran, Pham, & Vallon, 1996).

5.2.4.1 Tipo de modificador orgánico

ACETONITRILO

En primera instancia se utilizó Acetonitrilo (CH_3CN) como modificador orgánico, variando la concentración de este en 5 y 10 % a las concentraciones de ciclodextrina de 10 y 20 mM HS β CD como se describe en seguida:

- 10mM HS β CD 5% CH_3CN
- 10mM HS β CD 10% CH_3CN
- 20mM HS β CD 5% CH_3CN
- 20mM HS β CD 10% CH_3CN

Como se observa en la Figura 5.2-F mostrada a continuación.

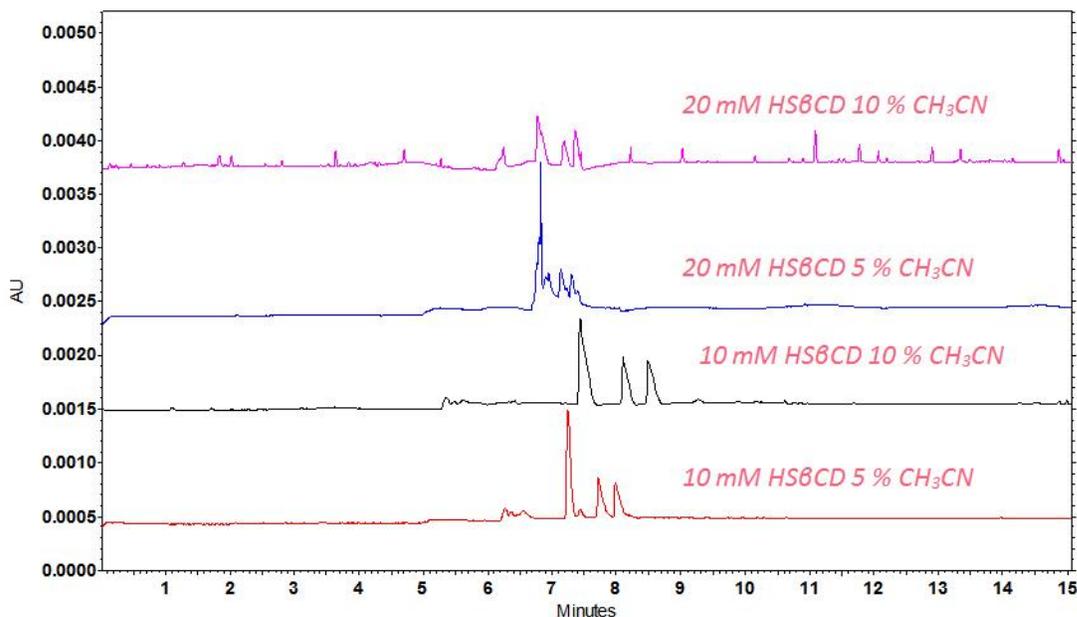


Figura 5.2-F Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Acetonitrilo) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2 mg/mL] Condiciones: L.t: 58 cm (L.E: 48cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. N: FEO, excepto la concentración de la HS β CD

Como podemos ver en la Figura 5.2-F A una concentración de 20 mM de HS β CD con 5 % Acetonitrilo se logran apreciar 4 picos no tan definidos por lo que se opta por elegir otro modificador orgánico en este caso MeOH.

METANOL

Se utiliza MeOH variando la concentración de este a 5 y 10 % a 2 concentraciones de ciclodextrina 10 y 20 mM de HS β CD como sigue:

- 10 mM HS β CD 5% MeOH
- 10 mM HS β CD 10% MeOH
- 20 mM HS β CD 5% MeOH
- 20 mM HS β CD 10% MeOH

Como se observa en la Figura 5.2-G mostrada a continuación.

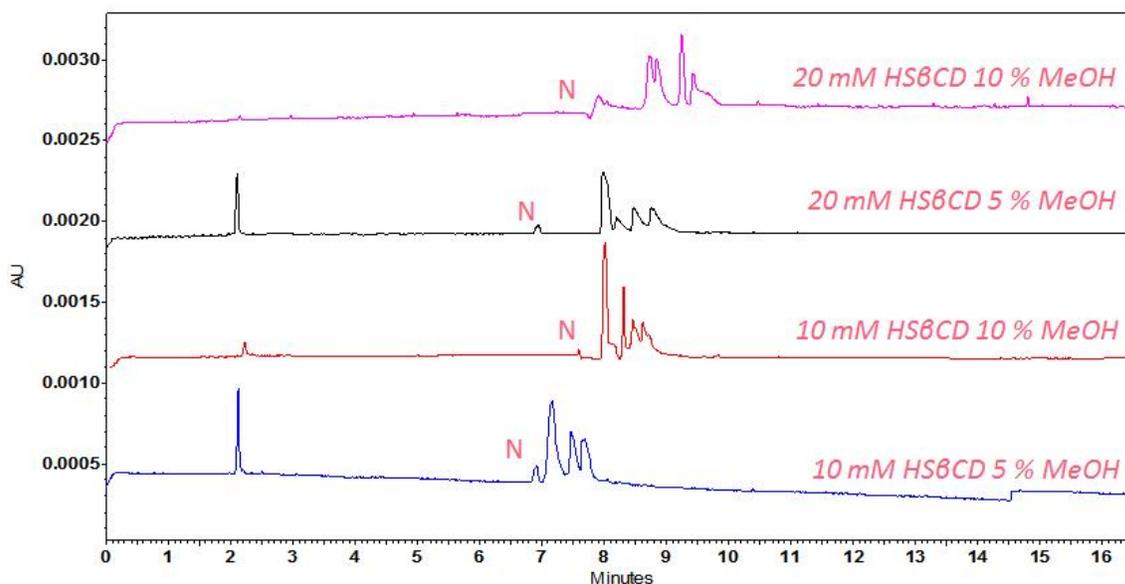


Figura 5.2-G Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Como en la figura 5.2-F N: FEO

Al observar en la Figura 5.2-G existe una mayor enantioselectividad utilizando MeOH como modificador orgánico, observándose ya los 4 picos (aunque no resueltos) en los diferentes Electroferogramas obtenidos. Se seleccionó la concentración de 20 mM HSβCD para aumentar la concentración del modificador orgánico, por lo que se hizo un sistema a 20 y 30% MeOH mostrado en la Figura 5.2-H.

5.2.4.2 Concentración de MeOH como modificador orgánico

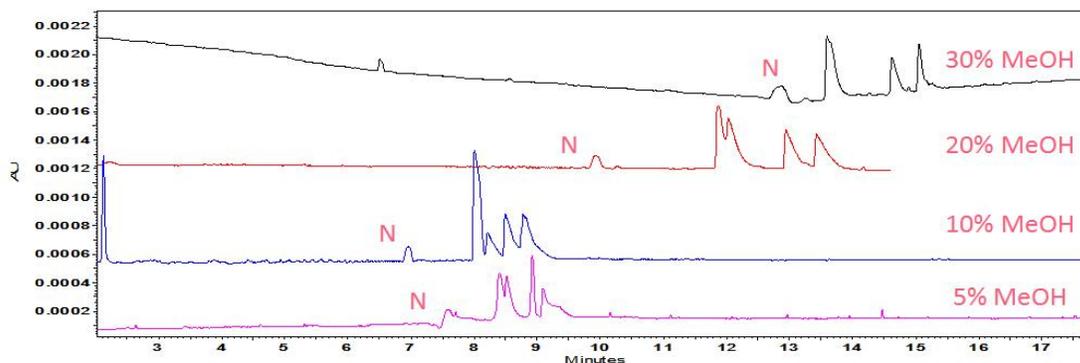


Figura 5.2-H Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Capilar de sílice fundida L.t: 58cm (L.E: 48cm), 50 μm de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. [HSβCD]=20mM N: FEO

La Figura 5.2-H ilustra el efecto al aumentar el %MeOH de 5 a 30 % v/v (a una concentración HS β CD constante), la separación entre enantiómeros aumenta desde 8 hasta 16 min. A concentraciones altas de MeOH se logran separar más los picos y apreciar mejor los 4 estereoisómeros no separados completamente en línea base, sin embargo a una concentración de 30 % MeOH volvieron a traslaparse 2 isómeros por lo que la concentración más adecuada del MeOH es 20 %. Se puede observar también un aumento en los tiempos de migración a concentraciones mayores de MeOH debido al efecto conocido en la disminución de la constante dieléctrica del buffer. (R.Gratz & M. Stalcup, 1998).

En la Figura 5.2-I podemos apreciar la influencia de la concentración del MeOH en la corriente, a mayores concentraciones de MeOH, la corriente disminuye debido a un aumento en la resistencia del buffer por influencia de una mayor proporción de disolvente orgánico.

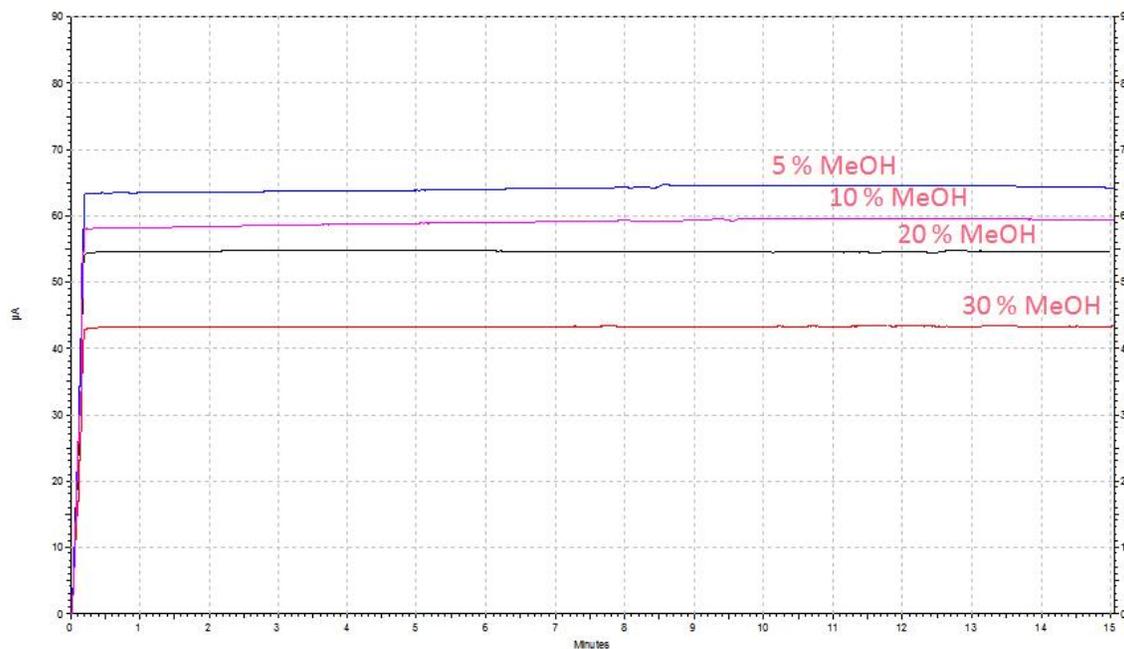


Figura 5.2-I Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Como en la figura 5.2-H

Se puede concluir de éste apartado que la adición de modificadores orgánicos tales como metanol o acetonitrilo disminuye la magnitud de las constantes de unión CD-analito. La explicación más común para esto es que el modificador orgánico reduce interacción del

analito por la cavidad de la HS β CD, compitiendo por la solubilidad del analito por el electrolito soporte.

La HS β CD siendo un selector quiral negativo ha demostrado ser un selector quiral eficaz (usada en 20 mM) para la separación de los enantiómeros de cuatro enantiómeros de la ractopamina, siendo necesario adicionar MeOH al 20 % como modificador orgánico para lograr obtener las 4 señales de los isómeros.

5.2.5 Estudio de otros parámetros secundarios

5.2.5.1 Concentración del buffer

Se pensó que posiblemente al cambiar la concentración del buffer, podría observarse una mejora en la resolución de los 4 isómeros, se realizaron pruebas al respecto. Los resultados se observan en el electroferograma mostrado en la Figura 5.2-J.

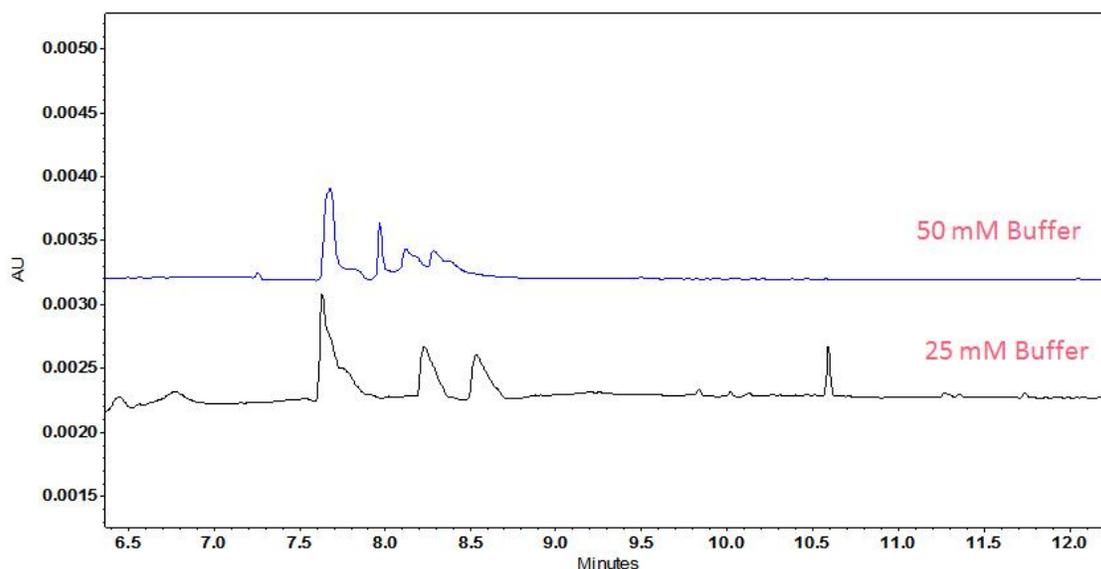


Figura 5.2-J Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración del buffer en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina (0.2mg/mL). Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 μ m de d.i, 10 mM HS β CD 10% MeOH, pH: 8, 20 kV, 25 $^{\circ}$ C.

A una concentración alta (50 mM) de buffer Figura 5.2-J se observan 4 señales mientras que al disminuirlo a 25 mM ya solo se observan 3. Seleccionando la concentración de 50 mM como óptima del buffer.

5.2.5.2 Efecto del Voltaje aplicado

Como factor secundario se modificó el voltaje al utilizar HS β CD a 10 y 20 mM con acetonitrilo 5 y 10 %. Por lo que el diseño experimental quedo como se muestra en la Tabla 5.2-I.

Tabla 5.2-I Diseño factorial 2³ para el estudio de la influencia del voltaje en la separación de los isómeros de la ractopamina

Factores*	Niveles	
	-1	+1
[HS β CD] mM	10	20
% M.O Acetonitrilo	5	10
Voltaje kV	10	30

Como se puede observar en las Figuras 5.2-K y 5.2-L para todos los casos:

1. Al aumentar el voltaje de separación (de 15 a 30 kV), disminuye el tiempo de migración de los isómeros de la ractopamina, lo cual es predecible ya que eluyen más rápido, por el aumento de su velocidad de migración.
2. Al aumentar el porcentaje de acetonitrilo, aumenta el tiempo de migración de los isómeros de la ractopamina, debido a la disminución de la constante dieléctrica del medio que impacta en la disminución de la movilidad de FEO.
3. Solo utilizando HS β CD 20 mM, con 5 % acetonitrilo e indiferentemente a 15 o 30 kV (Figura 5.2-L) se observa la separación de los 4 isómeros, aunque a muy baja resolución.

Se concluye entonces que el voltaje no tiene ninguna influencia en la resolución de los isómeros de ractopamina, solo influye en los tiempos de migración obtenidos.

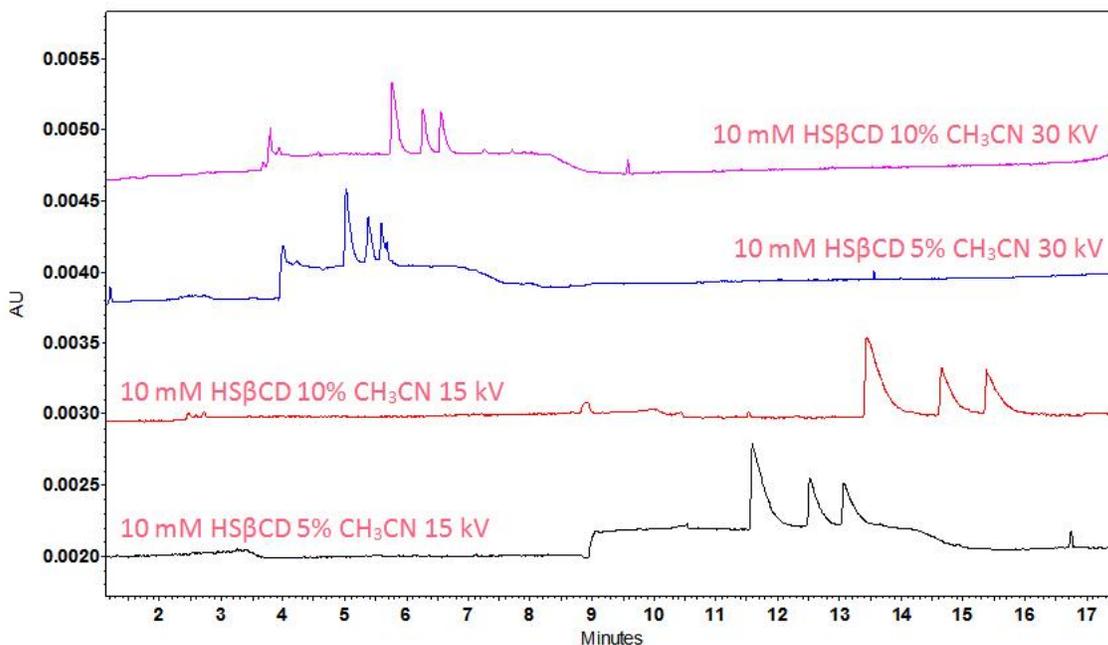


Figura 5.2-K Electroferograma del estudio de la influencia del voltaje en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Igual a la figura 5.2-J, excepto 5% y 10% MeOH y el voltaje 15 kV y 30 kV.

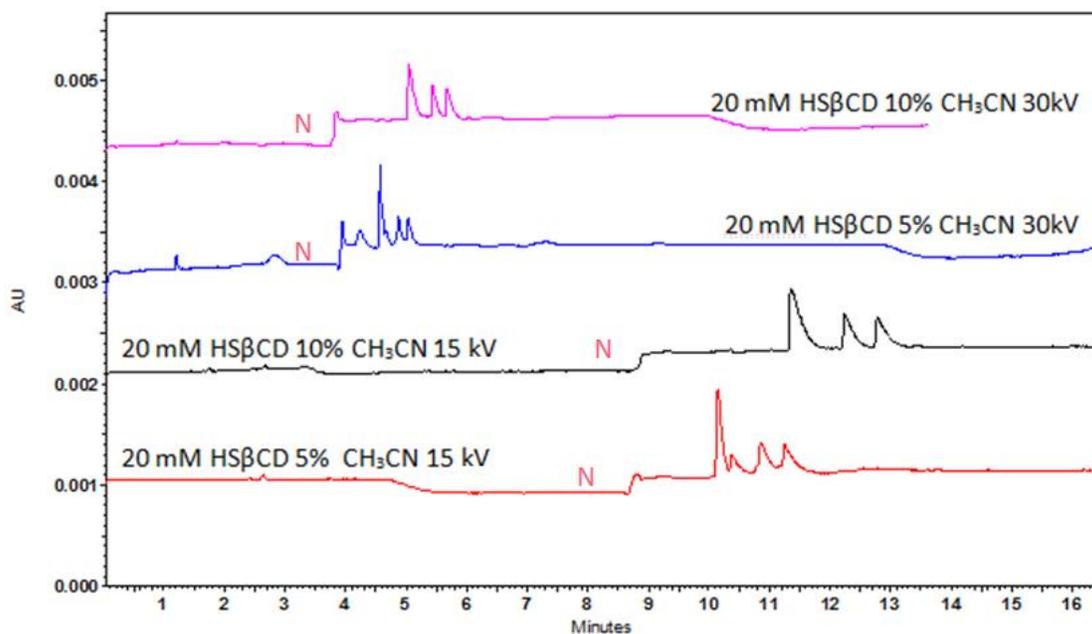


Figura 5.2-L Electroferograma del estudio de la influencia del voltaje en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina Condiciones iguales a la figura 5.2-L excepto [HSβCD]=20mM N: FEO

A pesar de los experimentos realizados anteriormente, los resultados no superaron a los obtenidos al utilizar MeOH como modificador orgánico, por lo que se continuó utilizando éste en la separación quiral.

5.2.6 Resumen de las condiciones óptimas para la separación quiral de los estereoisómeros de la ractopamina

Por lo tanto, las condiciones óptimas para la separación de los estereoisómeros de la ractopamina encontradas son las mostradas en la Tabla 5.2-II y Figura 5.2-M.

Tabla 5.2-II Condiciones óptimas de separación para la separación quiral de los estereoisómeros de la ractopamina

CONDICIÓN	VALOR
Capilar de sílice fundida	L.T: 58 cm, L.E: 48 cm, 50 μ m de d.i
Electrolito soporte	Buffer de boratos 50 mM, pH 8
Selector quiral	[HS β CD]=20 mM
Modificador Orgánico	MeOH= 20 %
Voltaje de separación	20 kV
Detector UV	λ =214 nm
Temperatura	25 °C

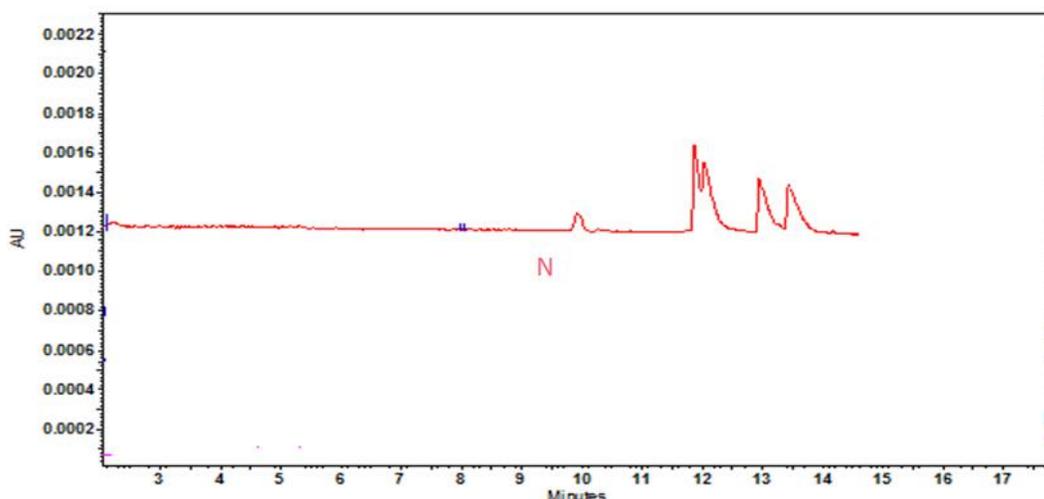


Figura 5.2-M Electroferograma de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina. Condiciones óptimas ractopamina a excepción del cambio de buffer son: Capilar de sílice fundida L.t: 58cm (L.E: 48cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. [HS β CD]=20mM y 20% MeOH, N: FEO

Sin embargo debido a la falta del reactivo de la ciclo dextrina HS β CD ya no se pudo concluir la separación de línea base de los 4 estereoisómeros de la ractopamina.

5.2.7 Comparación del método de separación de enantiómeros del método desarrollado con el método reportado en la literatura

Con la finalidad de seleccionar el método más adecuado para el control de calidad de la pureza isomérica de las premezclas comerciales de ractopamina, se realizó la comparación de la medición del estándar de ractopamina utilizando los 2 métodos quirales:

- El método reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007).
- El método desarrollado en la presente investigación (ver Apartado 5.2.6).

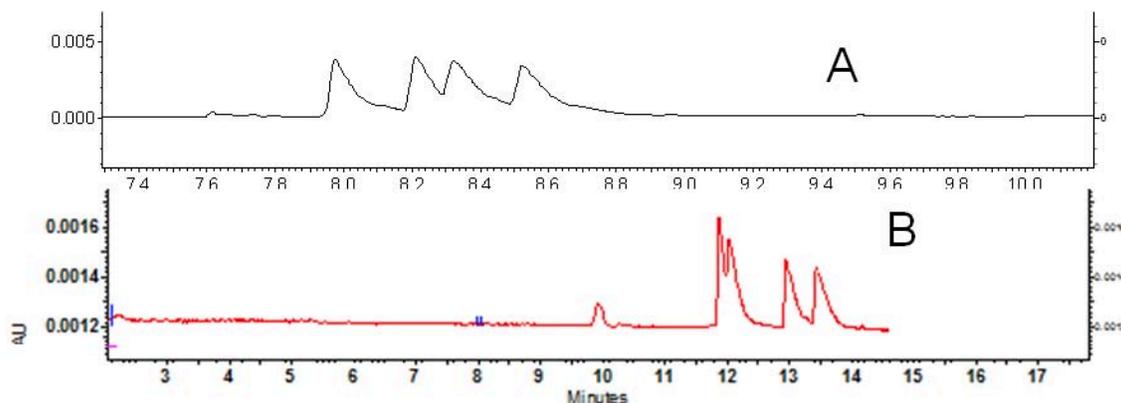


Figura 5.2-N Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina A) reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) B) Desarrollado en el presente trabajo

En la Figura 5.2.N se muestra la separación de los isómeros de la ractopamina con el método: **A)** el reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) y donde se usa S α CD, 10.391 mg/mL (1.0391%), pH 6 y el **B)** desarrollado en el presente trabajo HS β CD, 20 mM y 20 % MeOH ambos métodos separan los 4 estereoisómeros, sin embargo en el B) se presenta una menor resolución entre los picos 1 y 2, por lo que se opta por utilizar el método reportado para la realización del control de calidad de la pureza enantiomérica de los productos comerciales que contienen ractopamina.

5.2.7.1 Mediciones del estándar de ractopamina

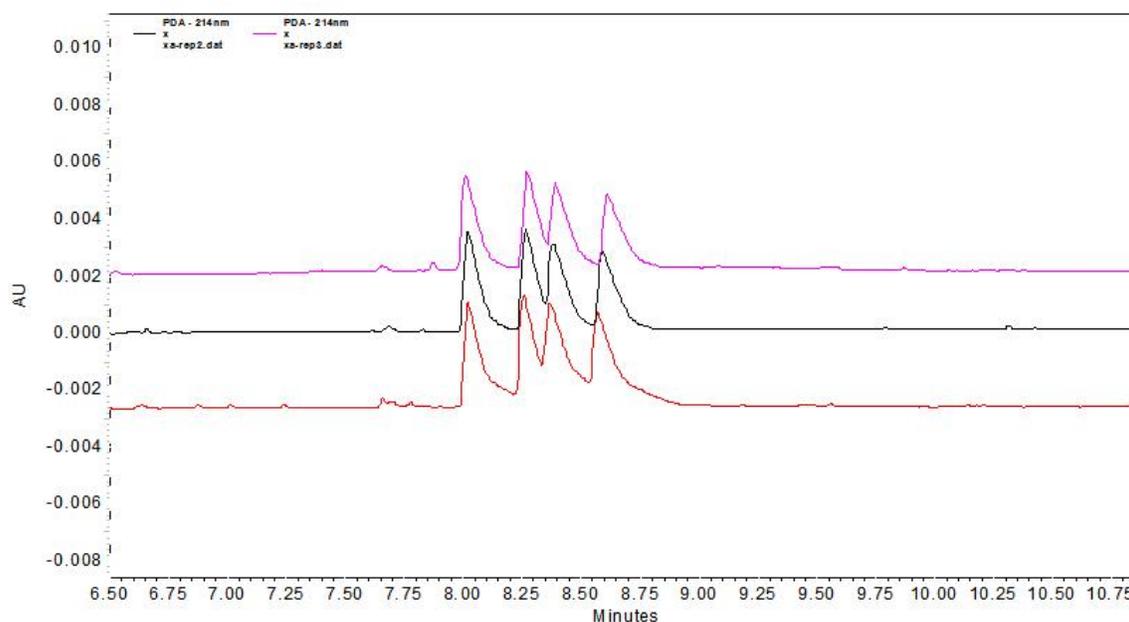


Figura 5.2-O Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S- α -CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV

Podemos ver que el estándar de ractopamina (Sigma-Aldrich) Figura 5.2.O es una mezcla racémica de los 4 estereoisómeros. Bajo estas condiciones de separación se observan todos los estereoisómeros separados, aunque no en línea base, debido a la asimetría (coleo) de los picos. Aunque esto no impide que pueda realizarse una evaluación de las áreas bajo la curva de cada isómero en el estándar de ractopamina.

Se sugiere para posteriores determinaciones de la pureza enantiomérica de las muestras, aumentar la concentración de la S- α CD aproximadamente al doble de la utilizada en todo este estudio (20 mg/mL = 2%) y aumentar (optimizar) el lavado entre corridas, para lograr la completa resolución en línea base y mejorar el porcentaje de desviación estándar relativa, %RSD (a <2%).

Se evaluaron las áreas de cada isómero y se reportan los porcentajes de área normalizados, siendo el área total de todos los isómeros el 100% y el porcentaje especificado para cada isómero se puede ver en la Tabla 5.2.III.

Tabla 5.2-III Áreas de cada isómero de el estándar de la ractopamina

Ractopamina estándar	Isómero	% Área
repetición 1	SR	23.23
	RS	19.64
	SS	28.41
	RR	28.72
repetición 2	SR	25.05
	RS	23.60
	SS	26.56
	RR	24.80
repetición 3	SR	25.04
	RS	23.80
	SS	26.51
	RR	24.64

De las mediciones anteriores podemos obtener un promedio el cual se indica en la Tabla 5.2.IV, junto con su correspondiente dispersión:

Tabla 5.2-IV Promedio del área de cada isómero de ractopamina con su %RSD

Isómero de ractopamina	% Área promedio	STD	%RSD
SR	24.44	1.05	4.29
RS	22.35	2.34	10.49
SS	27.16	1.08	3.98
RR	26.05	2.31	8.87

5.2.7.2 Mediciones de las muestras Pafmine, Racmina Premix y Paylean.

Pafmine es una marca registrada de Paffa que indica contiene Clorhidrato de Ractopamina al 2%. La muestra de Racmina Premix®, Pisa agropecuaria, S.A. de C.V. nos indica que el contenido de Clorhidrato de Ractopamina es del 10% y Paylean® es una marca registrada de Eli Lilly and Company para el Clorhidrato de Ractopamina de Elanco®. Las soluciones se prepararon como lo indica la Tabla 4.6-IV, para

posteriormente el sobrenadante ser inyectado por triplicado mostrándose los electroferogramas en la Figura 5.2.P.

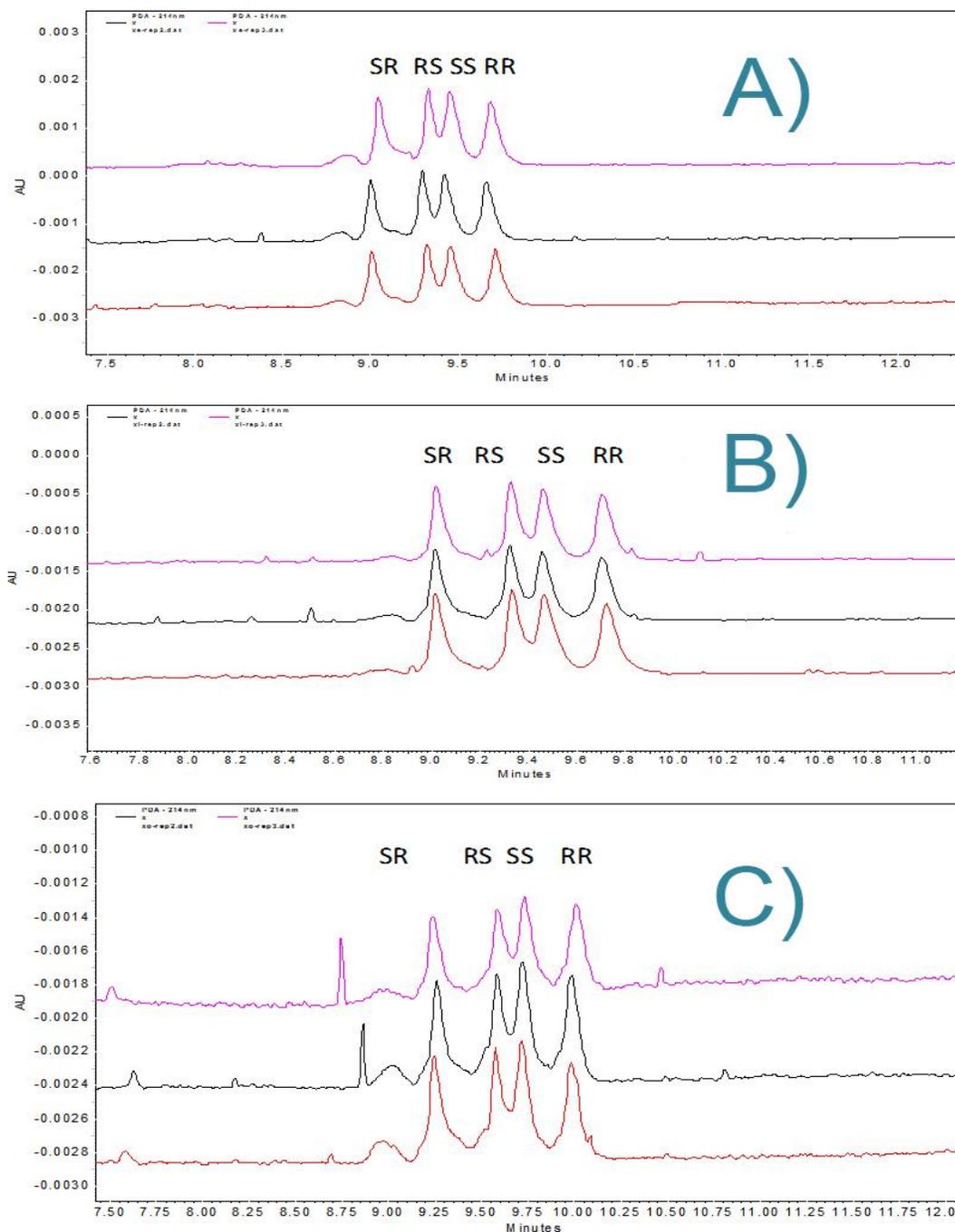


Figura 5.2-P Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina muestras: A) Pafmine B) Racmina Premix y C) Paylean reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S- α -CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV

Podemos ver que las muestras son una mezcla racémica de los 4 estereoisómeros. Se evaluaron las áreas de cada isómero y se reportan los porcentajes de área normalizados, siendo el área total de todos los isómeros el 100% y el porcentaje especificado para cada isómero se puede ver en la Tabla 5.2.V.

Tabla 5.2-V Muestras comerciales: porcentaje de área de cada isómero

Muestra	Isómero	% Área Pafmine	% Área Racmina premix	% Área Paylean
repetición 1	SR	23.17	24.34	25.09
	RS	23.37	25.06	24.52
	SS	28.62	25.84	27.84
	RR	24.84	24.75	22.54
repetición 2	SR	23.21	24.53	21.22
	RS	23.30	25.31	24.00
	SS	28.54	25.90	29.42
	RR	24.95	24.27	25.36
repetición 3	SR	25.17	23.57	17.40
	RS	21.53	25.64	24.03
	SS	28.85	26.62	29.82
	RR	24.44	24.17	28.76

El promedio de los % de área normalizados de tres repeticiones de las mediciones de las muestras, así como la concentración de cada isómero por cada 100 g de la pre mezcla se reportan en la Tabla 5.2.VI.

Tabla 5.2-VI Promedio de %áreas, %RSD de cada isómero, g Ractopamina/100g de muestra

Isómero de ractopamina en muestra	% Área promedio	STD	g c/100 Pafmine	Ractopamina g de	STD	%RSD	Muestra
SR	23.85	1.14	0.48	0.02	4.80	Pafmine	
RS	22.73	1.04	0.45	0.02	4.58		
SS	28.67	0.16	0.57	0.01	0.57		
RR	24.74	0.27	0.50	0.01	1.08		
SR	24.15	0.51	2.41	0.05	2.11	Racmina premix	
RS	25.34	0.29	2.53	0.03	1.13		
SS	26.12	0.44	2.61	0.04	1.67		
RR	24.40	0.31	2.44	0.03	1.28		
SR	21.24	3.85	0.42	0.08	18.12	Paylean	
RS	24.18	0.30	0.48	0.01	1.22		
SS	29.03	1.05	0.58	0.02	3.60		
RR	25.55	3.11	0.51	0.06	12.18		

A continuación en la Figura 5.2.Q, se presenta una comparación de los Electroferogramas obtenidos de las señales de los estereoisómeros tanto para el estándar de ractopamina como para cada una de las premezclas, con la finalidad de poder observar si existen diferencias.

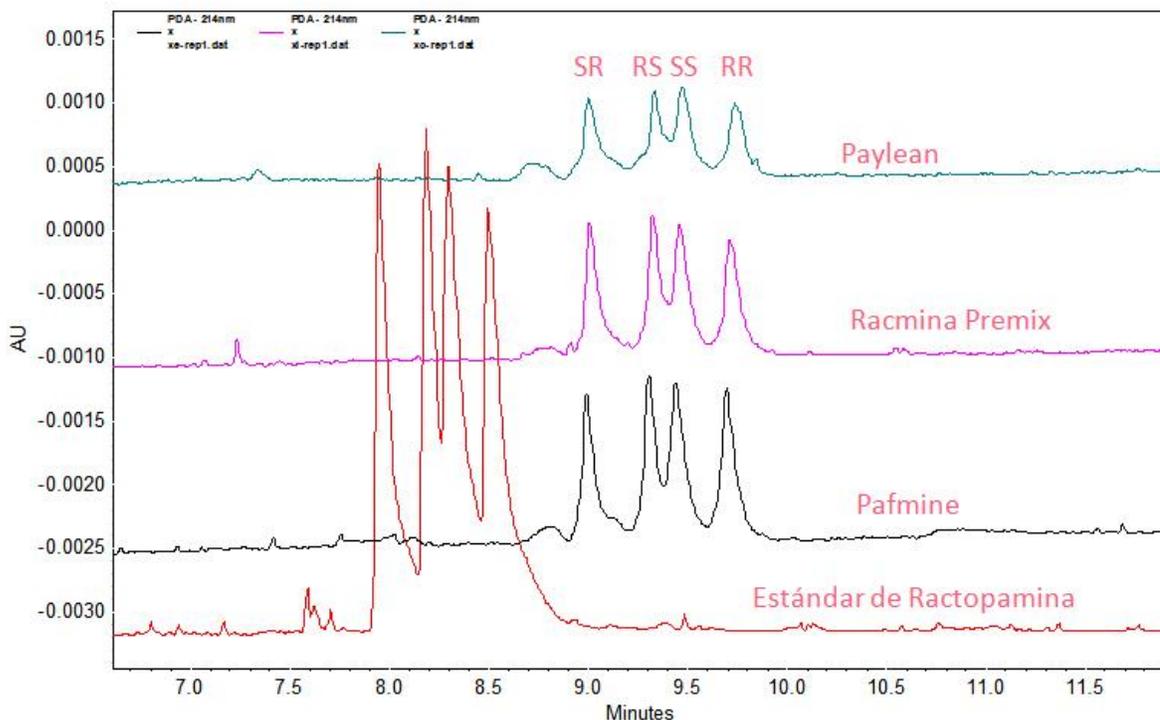


Figura 5.2-Q Comparación de Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina para estándar y muestras reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007)
Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S- α -CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV

Además presentamos en la Tabla 5.2.VII, el resumen de los porcentajes presentes de cada uno de los estereoisómeros, tanto para el estándar, como para cada una de las premezclas.

Tabla 5.2-VII Resumen de porcentajes presentes en cada estereoisómero del estándar y muestras

Estereoisómero de Ractopamina	% Área \pm Desviación Estándar			
	Estándar de Ractopamina (Sigma)	Pafmine	Racmina Premix	Paylean
SR	24.44 \pm 1.05	23.85 \pm 1.14	24.15 \pm 0.51	21.24 \pm 3.85
RS	22.35 \pm 2.34	22.73 \pm 1.04	25.34 \pm 0.29	24.18 \pm 0.30
SS	27.16 \pm 1.08	28.67 \pm 0.16	26.12 \pm 0.44	29.03 \pm 1.05
RR	26.05 \pm 2.31	24.74 \pm 0.27	24.40 \pm 0.31	25.55 \pm 3.11

ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES

Se realizó el análisis de varianza para la variable dependiente (% Área), con respecto a los factores:

- A) Tipo de estereoisómero (SR, RS, SS, RR)
- B) Tipo muestra (estándar de ractopamina, Pafmine, Racmina premix o paylean).

Prueba de Hipótesis:

Para la realización de la prueba de hipótesis, tomamos como hipótesis nulas, las siguientes aseveraciones:

Ho: No existen diferencias significativas en el % de Áreas obtenidas, con respecto al tipo de estereoisómero (SR, RS, SS, RR).

Ho: No existen diferencias significativas en el % de Áreas con respecto al tipo de muestra (estándar, Pafmine, Racmina premix o paylean).

Ho: No hay interacción entre los factores Tipo de muestra y Tipo de estereoisómero.

Para contrastar la hipótesis: Se acepta Ho, si $F_{Exp} < F_{Tab}$ ($P < 0.05$) y los resultados de éste análisis los podemos ver en la Tabla 5.2.VIII.

Tabla 5.2-VIII Análisis de varianza para % Área- Tipo III Sumas de cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Rel. F	Valor P
Efectos principales					
A:Tipo de Estereoisómero	142.74	3	47.5799	18.16	0.0000
B:Tipo de Muestra	0.0	3	0.0	0.00	1.0000
INTERACCIONES					
AB	58.1074	9	6.45638	2.46	0.0291
RESIDUO	83.8299	32	2.61968		
TOTAL (CORR.)	284.677	47			

Podemos concluir que:

- a) El % de Área de las señales obtenidas, depende de forma significativa del tipo de estereoisómero del que se trate ($P < 0.05$).

b) Además de que el tipo de muestra, no afecta de forma significativa en el % de Área de las señales ($P > 0.05$).

c) No existe una interacción significativa ($P < 0.05$) entre los factores A y B (Tipo de estereoisómero y tipo de muestra).

De lo anterior podemos inferir que:

d) No existe diferencia significativa entre los % de área del estereoisómero más activo RR dentro de los diferentes tipos de muestra (estándar de ractopamina, Pafmine, Racmina premix o paylean).

Observado la Figura 5.2.R se puede notar que las varianzas de los residuales se encuentran normalmente distribuidas (ver datos inferiores). El tipo de estereoisómero si contribuye de forma significativa a la varianza, mientras que el tipo de muestra no contribuye en absoluto a la varianza. Ver como los diagramas de caja con bigote del tipo de muestra se traslapan (Figura 5.2.S).

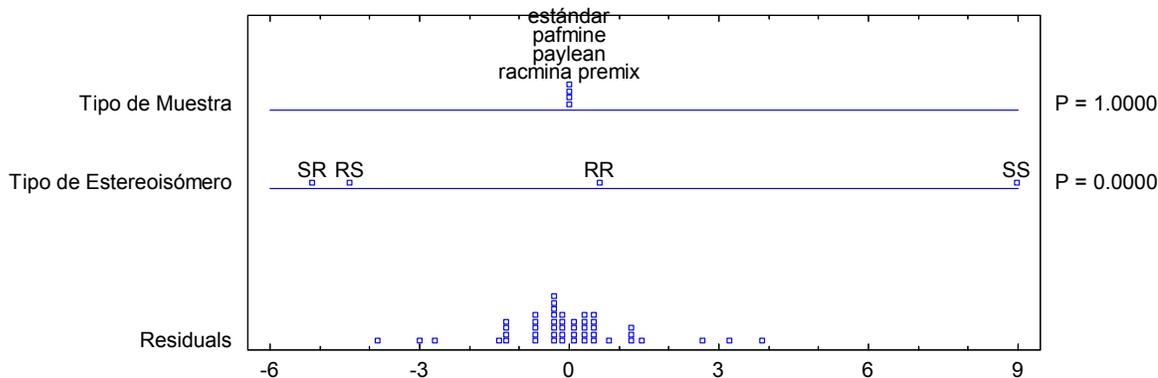


Figura 5.2-R Residuales de las muestras y el tipo de estereoisómero (Inoue & Chang Jen, 2007)

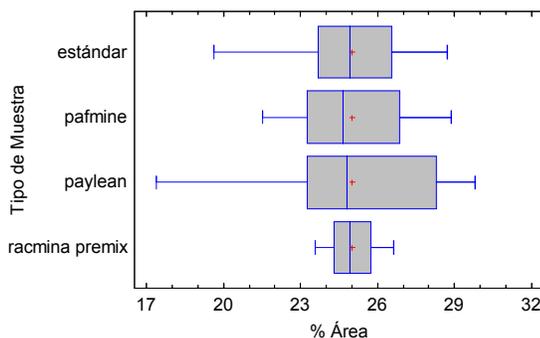


Figura 5.2-S Residuales de la muestra y tipo de estereoisómero

En la Figura 5.2.T podemos observar las medias del % de Área de cada isómero y su desviación estándar, así como el contraste de hipótesis (Tabla 5.2.IX) de si existen diferencias entre sus medias, observándose lo siguiente:

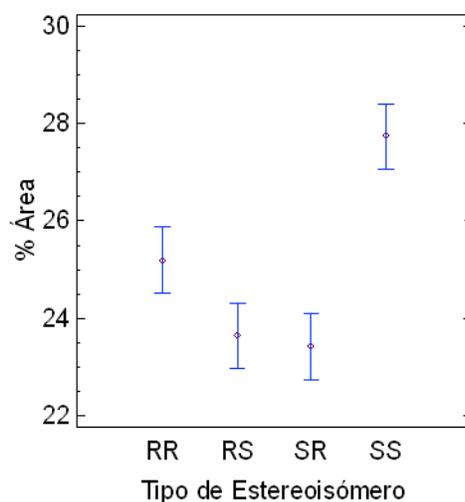


Figura 5.2-T Medias del % Área de cada isómero

Tabla 5.2-IX Contraste de hipótesis de isómeros y sus diferencias

Contraste	Sig	Diferencia	+/- Límites
RR - RS	*	1.53696	1.34594
RR - SR	*	1.76847	1.34594
RR - SS	*	-2.55828	1.34594
RS - SR		0.231506	1.34594
RS - SS	*	-4.09524	1.34594
SR - SS	*	-4.32675	1.34594

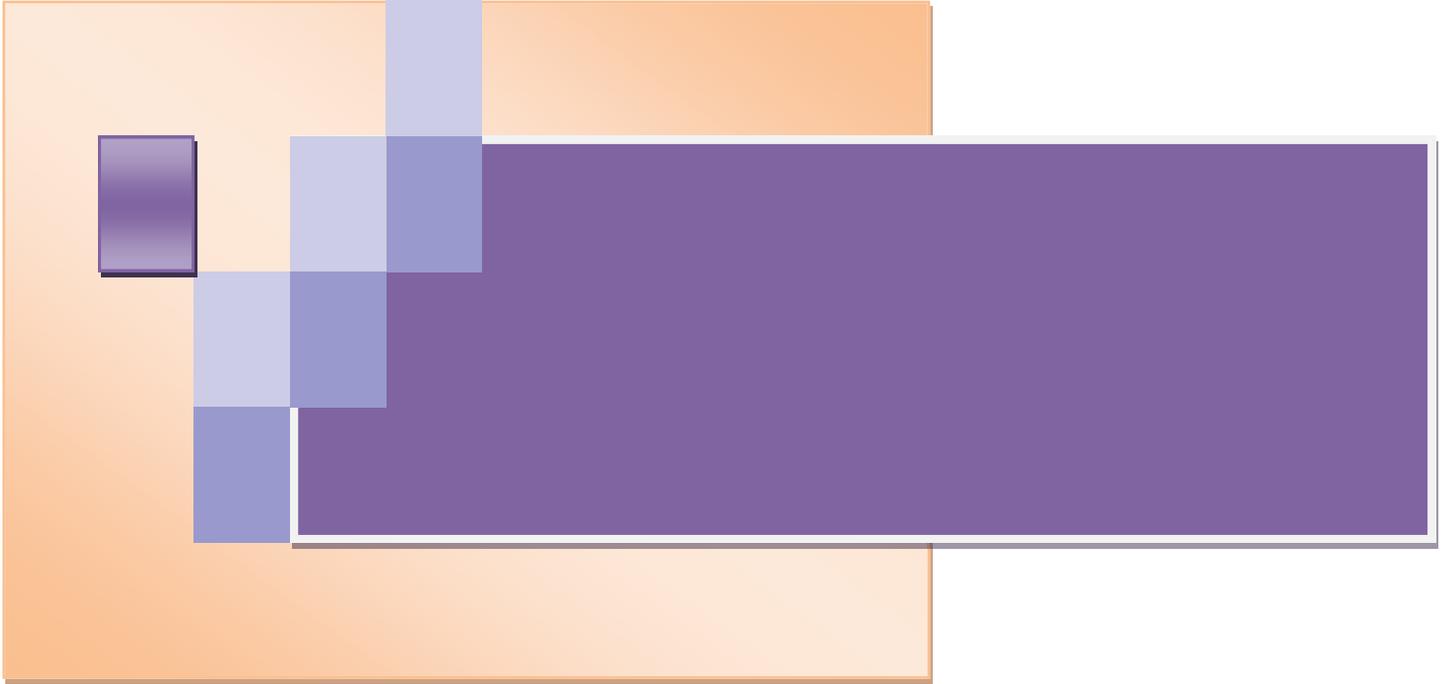
*Denota que existe diferencia significativa entre las medias de éstos isómeros (ya que el límite es ± 1.34594).

- 1) La media del % de Área del estereoisómero SS es significativamente diferente del resto de los isómeros, siendo el isómero SS el de mayor % de área de todos los 4.
- 2) La media del % de Área del estereoisómero más activo RR es significativamente diferentes al resto de los isómeros, aunque no es el isómero de mayor % de área, sino el segundo mayoritario.

- 3) Los % de Áreas de los isómeros RS y SR no tienen diferencias significativas entre sí, por lo que sus medias pueden considerarse iguales. Aunque debe hacerse notar que estos dos isómeros en conjunto si poseen diferencia significativas con los isómeros SS y RR, por lo que sus % de Áreas pueden considerarse diferentes.
- 4) Ya que no existen diferencias significativas del % de Áreas con el tipo de muestra, podemos afirmar que los % de Áreas del estándar de ractopamina, Pafmine, Racmina premix y paylean son iguales. Esto hace posible el poder reportar los resultados como un promedio y su dispersión, solo especificando el tipo de estereoisómero ya que éste factor si fue significativo. Estos resultados se pueden observar resumidos en la Tabla 5.2.X.
- 5) Con estos resultados podemos afirmar que los productos Pafmine, Racmina premix y paylean son equivalentes.

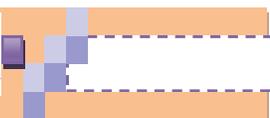
Tabla 5.2-X Promedio y dispersión de cada estereoisómero con sus intervalos de confianza 95%

<i>Nivel</i>	<i>Cant.</i>	<i>Significado</i>	<i>Stnd. Error</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Tipo de Estereoisómero					
RR	12	25.1868	0.4672	24.2351	26.1385
RS	12	23.6498	0.4672	22.6981	24.6016
SR	12	23.4183	0.4672	22.4666	24.37
SS	12	27.7451	0.4672	26.7933	28.6968



6. CONCLUSIONES





6. CONCLUSIONES

Se desarrollaron exitosamente dos métodos para el control de calidad de la ractopamina: A) Para evaluar el porcentaje de contenido químico y B) Para la determinación de la pureza enantiomérica del mismo, ambos métodos fueron aplicados al análisis de las premezclas comerciales (de alimento para cerdos) Racmina premix, Pafmine y Paylean usando la técnica de Electroforesis Capilar.

Los métodos desarrollados durante el presente trabajo, contribuyen a un mejor control de calidad de los productos comerciales (premezclas con ractopamina), pudiendo ser utilizados durante las diversas etapas del control rutinario de éstos productos.

Método para la evaluación del porcentaje de contenido químico.

Se validó exitosamente el método de acuerdo a la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010). Los parámetros de validación evaluados fueron: precisión del sistema, linealidad del sistema, selectividad (especificidad), precisión del método, linealidad del método, exactitud (recobro) y límites de detección y cuantificación. Se concluye por lo tanto que el método es confiable para ser utilizado en el control rutinario.

Se evaluó el contenido químico en las premezclas Racmina premix 10%, Pafmine 2% y Paylean 2%, obteniéndose valores de contenido del 8.9, 1.8 y 1.5 % de ractopamina; los cuales cumplen con el criterio de tolerancia a nivel industrial del ± 15 %, por lo que son aceptados.

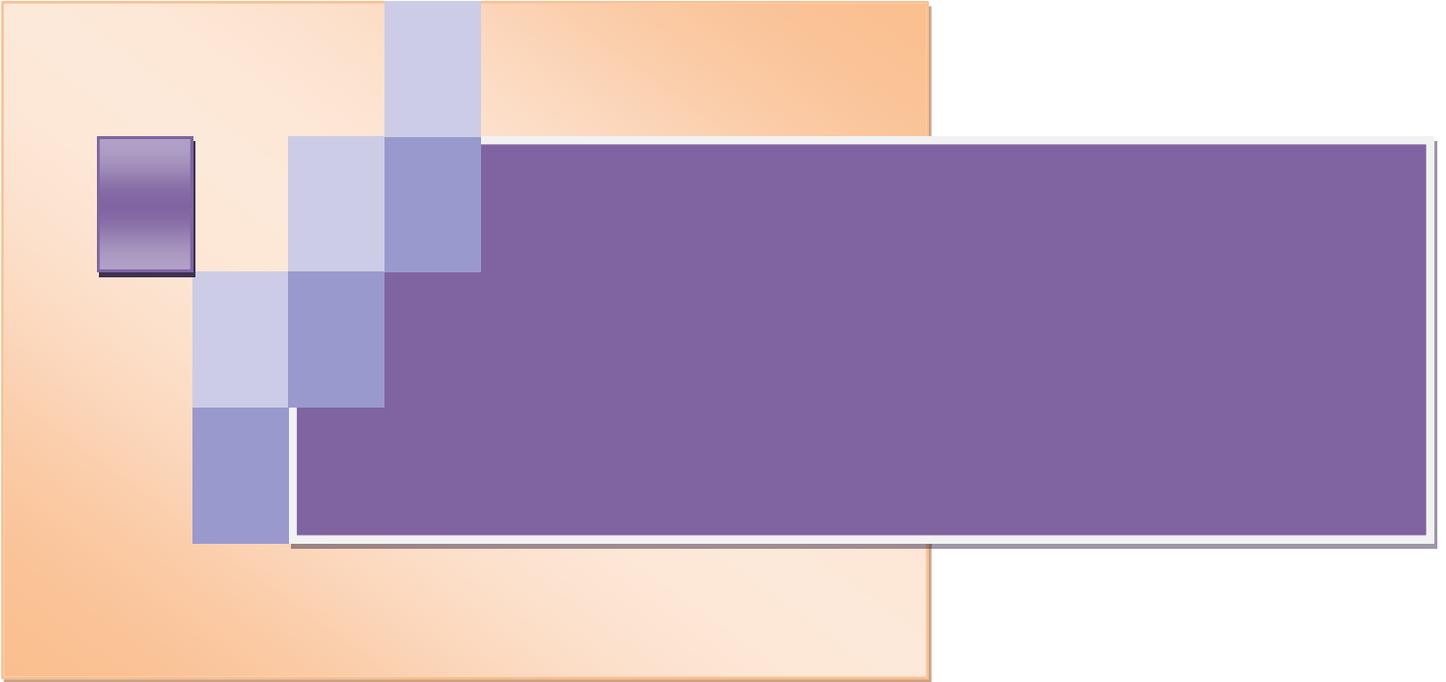
Método para la determinación de la pureza enantiomérica.

Se desarrolló exitosamente un método nuevo para la separación quiral de los isómeros de la ractopamina usando diseños experimentales factoriales. Los diseños multivariantes resultaron ser una herramienta útil y rápida en la selección de las mejores condiciones de separación, considerándose como una estrategia más rápida y económica comparada con los diseños tradicionales de estudio de un factor a un tiempo.

Con respecto a la comparación del método desarrollado en esta tesis para la separación quiral, con el reportado por Inoue & Chang Jen, se obtuvieron mayores resoluciones en éste último, por lo que se seleccionó para ser utilizado en la evaluación quiral de los productos comerciales.

No se encontraron diferencias significativas (en cuanto a sus medias) en porcentajes de cada isómero entre los productos Racmina premix, Pafmine y Paylean, con el método de Inoue & Chang Jen, por lo que se pueden considerar equivalentes en cuanto a su contenido de isómeros.

Se observó que en cuanto al contenido de cada isómero (individual), si existen diferencias significativas (en sus medias), siendo el enantiómero mayoritario el SS (27.75 %), seguido por el RR (25.19 %) y en tercer lugar considerados con medias iguales los RS (23.65 %) y SR (23.42 %).



7. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS



7. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

Índice de figuras

Figura 3.1-A Entidades de la República Mexicana productora en el 2012.....	12
Figura 3.1-B Productores de carne de cerdo mundial.....	20
Figura 3.1-C Ejemplo de los componentes de los beta adrenérgicos utilizando programa Chemoffice 2004.....	24
Figura 3.2-A Estructura de la ractopamina utilizando programa Chemoffice 2004.....	26
Figura 3.2-B Estructura de la ractopamina utilizando programa chemoffice 2004: 1) 4-(-2(-4-p-ilbutanl-2-ilamino)-1-hidroxietil) fenol 2) 4-(1-hidroxi-2-[4-(4-hidroxifenil) butan-2-il] amino} etil) fenol 3) 4-(2[[3-(4-hidroxifenil)-(1-metilpropil] amino)-1-hidroxi-etil] fenol.....	29
Figura 3.2-C Estructura de la ractopamina utilizando programa chemoffice 2004.....	29
Figura 3.2-D Metabolitos de la ractopamina en puercos, ratas y perros.....	31
Figura 3.4-A Representación de un tetraedro.....	35
Figura 3.4-B Átomo tetraédrico con su imagen especular.....	36
Figura 3.4-C Enantiómeros, notación R/S de una molécula con 2 centros quirales.....	37
Figura 3.4-D Estructura del clorhidrato de la ractopamina mostrando sus centros quirales con programa chemoffice 2004.....	38
Figura 3.5-A Proceso electroforético.....	40
Figura 3.5-B Componentes del equipo de CE.....	42
Figura 3.5-C Representación del flujo electrosmótico.....	44
Figura 3.6-A Ciclodextrinas según las unidades de α -D-[1,4] glucosa, así como estructura molecular.....	45
Figura 5.1-A Electroferograma del estudio de la influencia del pH en el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 50 mM.....	61
Figura 5.1-B Electroferograma del estudio de la influencia del pH en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL] en un intervalo 3.5-5. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-A excepto que la composición del buffer fue de acetatos.....	62
Figura 5.1-C Electroferograma del estudio de la influencia del pH en la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-B excepto que la composición del buffer fue de fosfatos.....	63
Figura 5.1-D Electroferograma del estudio de la adición de trietanolamina al buffer en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Las mismas que la figura 5.1-C excepto que a los buffers 50 mM se les adiciono a no trietanolamina.....	64
Figura 5.1-E Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración de buffer en la forma del pico la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-A con buffer de boratos pH 3.0 excepto que la concentración del buffer varía.....	65
Figura 5.1-F Fenómeno de Stacking en Electroforesis Capilar.....	66
Figura 5.1-G Electroferograma del estudio de la influencia del pH en el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 μ m de d.i, buffer de boratos 70mM.....	66
Figura 5.1-H Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración del buffer de boratos en el pico de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-C excepto que la concentración del buffer de boratos se varió.....	67
Figura 5.1-I Electroferogramas del estudio de la influencia del tipo buffer 70 mM y pH 10-10.5 en la señal de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Mismas que la figura 5.1-G excepto que se varió el tipo de buffer y el pH de 10 a 10.5,.....	68
Figura 5.1-J Electroferogramas en el estudio del pH para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM.....	69
Figura 5.1-K Electroferograma longitud del capilar en la señal de Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida), 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos 70 mM, pH: 10.....	70
Figura 5.1-L Electroferograma de la ractopamina para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2.....	72
Figura 5.1-M Electroferograma de la ractopamina y el estándar interno 3 amino fenol para el control de calidad de la Ractopamina [0.1mg/mL]. Condiciones: Las mismas de la Figura 5.1-L.....	72
Figura 5.1-N Electroferograma de la linealidad del sistema y sus corrientes. Señales de (4.2 min) y E.I (4.6 min) Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2, E.I: 3-aminofenol [25.5 ppm].....	74

Figura 5.1-O Electroferograma del placebo y el placebo adicionado con Ractopamina [0.1mg/mL] y E.I: 3-aminofenol. Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 µm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2, E.I: 3-aminofenol [25.5 ppm].....	77
Figura 5.1-P Electroferograma de la linealidad del método y sus corrientes. Señales de Ractopamina (4.2 min) y E.I (4.6 min) Condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 µm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 E.I: 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo.....	78
Figura 5.1-Q Selección del rango de concentraciones a utilizar, mostrando en la imagen A) el gráfico de regresión con sus respectivos residuales y B) el gráfico ajustado con sus respectivos residuales	79
Figura 5.2-A Ractopamina sin selector quiral Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 °C.....	91
Figura 5.2-B Electroferograma del estudio del selector quiral para la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL] así como el pH. Condiciones: L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 °C.....	92
Figura 5.2-C Electroferograma del estudio del selector quiral para la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL] así como el pH. Condiciones: L.T: 58 cm (L.E:48 cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, 20 kV, T: 25 °C. Variando concentración de ciclodextrinas.....	93
Figura 5.2-D Electroferogramas del estudio de la influencia del pH en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2 mg/mL]. Condiciones: Mismas de la figura 5.2-B, [HSβCD] 10 mM. Solo varía el pH	94
Figura 5.2-E Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de HSβCD en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2mg/mL] así como el pH. Condiciones: Capilar de sílice fundida L.t: 58 cm (L.E: 48cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. N: FEO.....	95
Figura 5.2-F Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Acetonitrilo) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2 mg/mL] Condiciones: L.t: 58 cm (L.E: 48cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. N: FEO, excepto la concentración de la HSβCD	97
Figura 5.2-G Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Como en la figura 5.2-F N: FEO.....	98
Figura 5.2-H Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Capilar de sílice fundida L.t: 58cm (L.E: 48cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. [HSβCD]=20mM N: FEO.....	98
Figura 5.2-I Electroferograma del estudio de la influencia de la adición de diferentes concentraciones de modificador orgánico (Metanol) en la separación de los estereoisómeros de la ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Como en la figura5.2-H	99
Figura 5.2-J Electroferograma del estudio de la influencia de la concentración del buffer en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina (0.2mg/mL). Condiciones: Capilar de sílice fundida L.T: 58 cm (L.E: 48 cm), 50 µm de d.i, 10 mM HSβCD 10% MeOH, pH: 8, 20 kV, 25 °C.....	100
Figura 5.2-KElectroferograma del estudio de la influencia del voltaje en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina [0.2mg/mL] Condiciones: Igual a la figura 5.2-J, excepto 5% y 10% MeOH y el voltaje 15 kV y 30 kV.....	102
Figura 5.2-L Electroferograma del estudio de la influencia del voltaje en la separación de los estereoisómeros de la Ractopamina Condiciones iguales a la figura 5.2-L excepto [HSβCD]=20mM N: FEO.....	102
Figura 5.2-M Electroferograma de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina Condiciones óptimas ractopamina a excepción del cambio de buffer son: Capilar de sílice fundida L.t: 58cm (L.E: 48cm), 50 µm de d.i, buffer de boratos 50 mM, pH 8, 20 kV, T: 25°C. [HSβCD]=20mM y 20% MeOH, N: FEO	103
Figura 5.2-N Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina A) reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) B) Desarrollado en el presente trabajo.....	104
Figura 5.2-O Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S-α-CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV.....	105
Figura 5.2-P Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina muestras: A) Pafmine B) Racmina Premix y C) Paylean reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S-α-CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV	107
Figura 5.2-Q Comparación de Electroferogramas de la separación de los 4 estereoisómeros de la ractopamina para estándar y muestras reportado en la literatura (Inoue & Chang Jen, 2007) Condiciones de separación: buffer fosfatos pH: 6 S-α-CD capilar de L.T 57 cm V: 19 kV.....	110
Figura 5.2-R Residuales de las muestras y el tipo de estereoisómero (Inoue & Chang Jen, 2007)	112
Figura5.2-S Residuales de la muestra y tipo de estereoisómero.....	112



Figura 5.2-T Medias del % Área de cada isómero 113

Anexo 1 Figura 1 Escala de zonas de predominio del fármaco ractopamina para su control de calidad y la separación de los estereoisómeros 135

Anexo 2 Figura 1 Estructura de la ractopamina con sus centros quirales mostrados con * realizados con el programa Chemoffice 2004. 136

Anexo 2 Figura 2 Estereoisómeros de la ractopamina RR, SS, SR, RS. Realizados con programa Chemoffice 2004..... 137

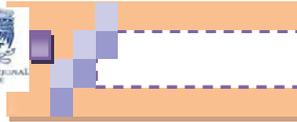
Anexo 3 Figura 1 Gráficos de resolución de los picos 2 y 3 A) Influencia pH con Rs B) [HSβCD] con RS C) interacción de pH y [HSβCD] con Rs 138

Anexo 3 Figura 2 Gráficos de resolución de los picos 3 y 4 A) Influencia pH con Rs B) [HSβCD] con RS C) interacción de pH y [HSβCD] con Rs 139

Anexo 11. Figura 1 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Racmina premix condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo 163

Anexo 11. Figura 2 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Pafmine condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo 164

Anexo 11. Figura 3 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Paylean condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μm de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo 166



Índice de ilustraciones

Ilustración 0-1 Modelo doble recíproco curva de calibración del sistema para ractopamina	152
Ilustración 0-2 Modelo doble recíproco sin residuos atípicos curva de calibración del sistema para ractopamina	153
Ilustración 0-3 Modelo multiplicativo curva de calibración del sistema para ractopamina	154
Ilustración 0-4 Modelo multiplicativo sin residuos atípicos curva de calibración del sistema para ractopamina ..	155
Ilustración 0-5 Modelo polinomial orden 2 curva de calibración del sistema para ractopamina	156
Ilustración 0-6 Modelo multiplicativo curva de calibración del método para ractopamina	157
Ilustración 0-7 Modelo doble raíz cuadrada curva de calibración del método para ractopamina	158
Ilustración 0-8 Modelo polinomial orden 2 curva de calibración del método para ractopamina	159
Ilustración 0-9 Modelo polinomial orden 2 sin residuos atípicos curva de calibración del método para ractopamina	160

Índice de tablas

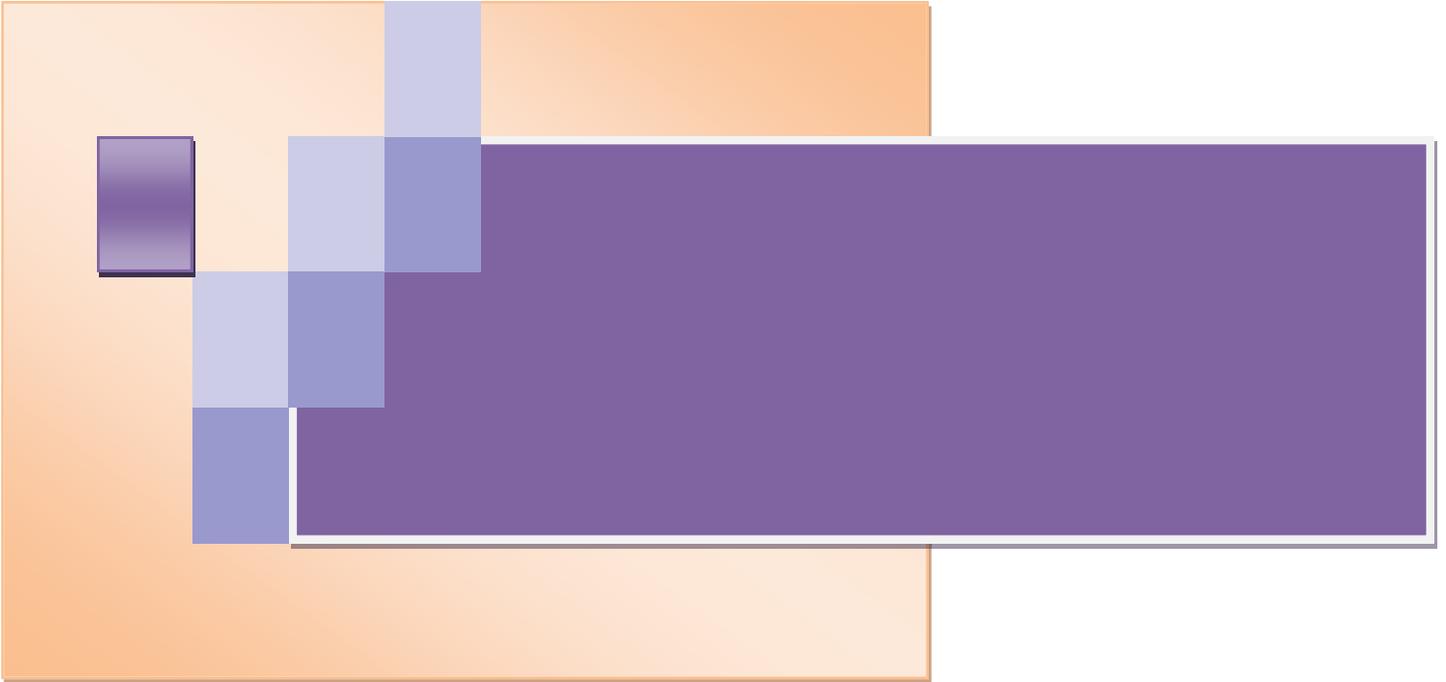
Tabla 4.5-I Procedimiento del lavado del capilar al inicio de cada sesión	52
Tabla 4.5-II Procedimiento del control de calidad de la ractopamina por electroforesis capilar	52
Tabla 4.5-III Parámetros de integración para el control de ractopamina por EC.	53
Tabla 4.5-IV Descripción de la preparación de soluciones para la linealidad del sistema para el control de calidad de la ractopamina utilizando como E.I al 3-aminofenol.....	53
Tabla 4.5-V Descripción de la preparación de las soluciones para la linealidad del método para el control de calidad de la ractopamina utilizando como E.I al 3-aminofenol.....	54
Tabla 4.6-I Procedimiento de lavado de capilar al inicio de cada sesión	56
Tabla 4.6-II Procedimiento de separación de los enantiómeros por electroforesis capilar	57
Tabla 4.6-III Concentración de ractopamina para cada solución a medir	58
Tabla 4.6-IV Análisis estadístico factorial 2^2	58
Tabla 5.1-I Condiciones óptimas de separación para el control de calidad de la ractopamina	73
Tabla 5.1-II Precisión (%RSD) para tiempos de migración, áreas y alturas de la ractopamina	74
Tabla 5.1-III Ecuación obtenida de la curva de calibración del sistema para la ractopamina en relación en Áreas.....	75
Tabla 5.1-IV Resultados obtenidos de la curva de calibración del sistema para la ractopamina	75
Tabla 5.1-V Precisión del método para el control de calidad de la ractopamina, mostrando el %RSD de t_m , y relación áreas y alturas de la ractopamina y el 3-aminofenol	78
Tabla 5.1-VI Datos obtenidos para la linealidad del método para la ractopamina	80
Tabla 5.1-VII Ecuación de la linealidad del método para la ractopamina en relación de áreas	81
Tabla 5.1-VIII Datos para el cálculo del intervalo de confianza del porcentaje de recobro (IC (μ)) del gráfico de recuperación [ractopamina adicionada] [ractopamina recuperada]	82
Tabla 5.1-IX Cálculo de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) a partir del modelo mostrado en Tabla 5.1.VII y en el Anexo 7, Tabla 2 y Tabla 3	84
Tabla 5.1-X Tabla de resumen de los parámetros evaluados en la validación de la ractopamina para el control de calidad de este fármaco	85
Tabla 5.1-XI Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en las muestras Racmina Premix, Pafmine y Paylean.....	87
Tabla 5.1-XII Promedio obtenido para cada muestra comercial	88
Tabla 5.1-XIII Datos para la prueba de hipótesis para cumplimiento de especificación del porcentaje de contenido para cada muestra comercial.....	89
Tabla 5.2-I Diseño factorial 2^3 para el estudio de la influencia del voltaje en la separación de los isómeros de la ractopamina	101
Tabla 5.2-II Condiciones óptimas de separación para la separación quiral de los estereoisómeros de la ractopamina	103
Tabla 5.2-III Áreas de cada isómero de el estándar de la ractopamina	106
Tabla 5.2-IV Promedio del área de cada isómero de ractopamina con su %RSD	106
Tabla 5.2-V Muestras comerciales: porcentaje de área de cada isómero	108
Tabla 5.2-VI Promedio de %áreas, %RSD de cada isómero, g Ractopamina/100g de muestra	109
Tabla 5.2-VII Resumen de porcentajes presentes en cada estereoisómero del estándar y muestras.....	110
Tabla 5.2-VIII Análisis de varianza para % Área- Tipo III Sumas de cuadrados	111
Tabla 5.2-IX Contraste de hipótesis de isómeros y sus diferencias.....	113
Tabla 5.2-X Promedio y dispersión de cada estereoisómero con sus intervalos de confianza 95%.....	114
Anexo 4 Tabla 1 Datos de la preparación de la solución patrón en la curva de calibración del sistema de la ractopamina	140
Anexo 4 Tabla 2 Datos de la preparación de la curva de calibración a partir de la solución patrón (sistema).....	140
Anexo 5 Tabla 1 Datos de la preparación de la solución patrón en la curva de calibración del método para la ractopamina	141
Anexo 5 Tabla 2 "Procedimiento de la preparación del placebo para la curva de calibración del método.....	141
Anexo 5 Tabla 3 Datos de la preparación de la curva de calibración a partir de la solución patrón (método).....	142
Anexo 6. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).....	143
Anexo 6. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)).....	144



Anexo 7. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)	145
Anexo 7. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)) para el método	146
Anexo 7. Tabla 3 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la ordenada al origen o intercepto (IC (b_0)) para el método.....	147
Anexo 9. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para evaluar el efecto matriz utilizando sistema y método.....	149
Anexo 9. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del efecto matriz en el estudio de la ractopamina sistema y método	150
Anexo 11. Tabla 1 Procedimiento de las muestras analizadas por electroforesis capilar con el método analítico para el control de calidad de la ractopamina	161
Anexo 11. Tabla 2 Ecuaciones de las curvas de calibración de sistema y método respectivamente	162
Anexo 11. Tabla 3 Datos de la ractopamina presente en la muestra Racmina premix.....	162
Anexo 11. Tabla 4 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Racmina Premix	163
Anexo 11. Tabla 5 Datos de la ractopamina presente en la muestra Pafmine	164
Anexo 11. Tabla 6 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Pafmine.	165
Anexo 11. Tabla 7 Datos de la ractopamina presente en la muestra Paylean.....	166
Anexo 11. Tabla 8 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Paylean	167

Índice de gráficos

Gráfico 3.1-1 Unidades con ganado porcino y existencia por entidad	11
Gráfico 3.1-2 Producción de carne en canal de porcino en México (SAGARPA, Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2009, 2013).....	13
Gráfico 3.1-3 Producción de ganado en pie en México (Financiera Rural, 2015).....	13
Gráfico 3.1-4 Producción de porcino en pie	14
Gráfico 3.1-5 Producción de carne en canal de porcino del año 2000 al 2012.....	15
Gráfico 3.1-6 Distribución porcentual mensual de la producción de carne de porcino en canal años 2009-2012 15	
Gráfico 3.1-7 TMAC del volumen y valor de producción de la carne en canal en México 2000-2010. ● Tamaño de la burbuja indica volumen de producción del año 2010	16
Gráfico 3.1-8 Consumo nacional aparente de carne porcino en México, exportaciones e importaciones	16
Gráfico 3.1-9 Importaciones de carne porcino: carne fresca, congelada, despojo y procesada.	17
Gráfico 3.1-10 Exportaciones de carne porcina: carne fresca, congelada, despojos y procesada.	18
Gráfico 3.1-11 TMAC del volumen de producción y de exportación de la carne en canal mundial ● Tamaño de la burbuja indica el volumen de producción 2010	19
Gráfico 3.1-12 Principales productores de carne de porcino en el mundo.....	20
Gráfico 3.1-13 Producción mundial de carne de cerdo	21
Gráfico 3.1-14 Porcentaje del consumo mundial de la carne de cerdo.....	21
Gráfico 3.1-15 Principales países consumidores de cerdo en el mundo	22
Gráfico 5.1-1 Curva de calibración del sistema para el control de calidad.....	76
Gráfico 5.1-2 Curva de calibración del método de la ractopamina	81
Gráfico 5.1-3 Grafico de recuperación de la ractopamina para el cálculo de la exactitud y el (IC (μ)).....	82
Gráfico 5.1-4 Evaluación del efecto matriz de las pendientes de las curvas de calibración de sistema y método para el control de calidad de la ractopamina	83
Anexo 6. Gráfico 1 Residuales de la curva de calibración del sistema para el control de calidad de la ractopamina	143
Anexo 7. Gráfico 1 Residuales de la curva de calibración del método para la ractopamina	145
Anexo 9. Gráfico 1 Evaluación del efecto matriz de las pendientes de las curvas de calibración de sistema y método para el control de calidad de la ractopamina.....	151



8. BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- ✳ A. Goodman-Gilman, L. G. (1985.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, NY: McMillen Publishing Co.
- ✳ A.Frazier, R., M.Ames, J., & E.Nursten, H. (1999). The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis. *Electrophoresis* , 20, 3156-3180.
- ✳ Additives, J. F. (2004). Evaluación de ciertos residuos de fármacos veterinarios en alimentos. *Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives WHO Technical Report Series 925* , Sexta edición, 37-48.
- ✳ Allevato, M., & Negroni, R. (2007). "Antifúngicos: ayer, hoy y mañana". *Act. terap dermatol* , 30 (8), 8-19.
- ✳ Amin, J., Marchant, J., & et al. (2003). The effects of ractopamine on the behavior and physiology of finishing pigs. *Journal of animal science* , 81, 416-422.
- ✳ Amran, M., Lakkis, M., Lagarde, F., Leroy, M., López Sanchez, J., & Rauret, G. (1993). *Journal Analytical Chem.* , 345, 420.
- ✳ ANSWERS OF RACTOPAMINE Healthy animal diets are vital to providing safe meat. (21 de Noviembre de 2014). Obtenido de WE care: <http://www.porkcares.org/node/150?gclid=CICq5K3bwbGCFYcDOgodhiEAqQ>
- ✳ Asensi-Berdani, L., & Martín-Biosca, Y. (2013). In-line capillary electrophoretic evaluation of the enantioselective metabolism of verapamil by cytochrome P3A4. *Journal of Chromatography* , A (129), 139 –145.
- ✳ Asensi-Bernadi, L., Escuder-Gilabert, L., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., & Medina-Hernández, J. (2014). Characterizing the interaction between enantiomers of eight psychoactive drugs and highly sulfated- β -cyclodextrin by counter-current capillary electrophoresis. *Biomedical chromatography* , 28, 120-126.
- ✳ Asensi-Bernardi, L., Escuder-Gilabert, L., Martín-Biosca, Y., & Medina-Hernández, M. (2013). Modeling the chiral resolution ability of highly sulfated -cyclodextrin for basic compounds in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography* , A (1308), 152-160.
- ✳ Barry, E. (5 de Noviembre de 2014). *Russia Announces Barriers on Imports of U.S. Meat*. Obtenido de The New York Times: http://www.nytimes.com/2012/12/09/world/europe/russia-announces-barriers-on-imports-of-us-meat.html?_r=2&
- ✳ Blaschke, G., & Chankvetadze, B. (2000). Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration. *Journal of Chromatography* , A (875), 3-25.
- ✳ Bottemiller, H. (8 de Diciembre de 2013). *U.S. and Russia Spar Over Ractopamine in Pork and Beef*. Obtenido de Food Safety News: http://www.foodsafetynews.com/2012/12/u-s-and-russia-spar-over-ractopamine-in-pork-and-beef/#.VRSAY_mG92F
- ✳ Bressolle, F., Audran, M., Pham, T.-N., & Vallon, J.-J. (1996). Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *Journal of Chromatography* , B (687), 303-336.
- ✳ Brown, J. H., & Taylor, P. (2007). Agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos. En L. L. Brunton, J. S.Lazo, & K. L.Parker, *Goodman & Gilman's: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Undécima ed., pág. 195). México: Mc Graw Hill.
- ✳ C. Westfall, T., & P. Westfall, D. (2007). Agonistas y antobonistas andrenérgicos. En L. L. Brunton, J. S.Lazo, & K. L.Parker, *Goodman & Gilman's :Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Undécima ed., págs. 237-291). México: Mc Graw Hill.
- ✳ Camacho Cruz, S. (2002). Desarrollo de métodos de separación quiral y aquiral de compuestos derivados del imidazol por electroforesis capilar (Tesis de Maestría). *Universidad Nacional Autónoma de México* . México, DF.
- ✳ Castillo, M. A., Revilla, A. L., López, R., & Rivera, P. (2005). *Fundamentos de electroforesis capilar*. México: UNAM.

- * Chang, T., Inoue, P., & Jen. (2007). Capillary Electrophoretic Separation and Quantitation of Ractopamine Stereoisomers Using Cyclodextrins as Chiral Additives. *Journal of liquid chromatography & related technologies* , 26 (11), 1677-1693.
- * Chankvetadz, B. (2007). Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques. The story of 20 and a few more years. *Journal of Chromatography , A* (1168), 45-70.
- * Chankvetadze, B. (2002). Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* , 23, 4022-2035.
- * Chankvetadze, B., & Blaschke, G. (2001). Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. *Journal of Chromatography , A* (906), 309-363.
- * Chevolleau, S., & Tulliez, J. (1995). Optimization of the separation of β -agonists by capillary electrophoresis on untreated and C18 bonded silica capillaries. *Journal of Chromatography , A* (715), 345-354.
- * Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, .. (2010). GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.
- * Comercio. (Noviembre de 29 de 2014). *Comercio internacional de cerdo en 2013*. Obtenido de <http://www.elsitioporcino.com>: <http://www.elsitioporcino.com/articles/2560/comercio-internacional-de-cerdo-en-2013>
- * Comisión Europea. (28 de Agosto de 2013). *Ractopamine*. Obtenido de http://ec.europa.eu/index_es.htm: http://ec.europa.eu/index_es.htm
- * Cruz Pardos, P., Fernández Riveira, C., & Garutti, I. (2005). Betabloqueantes: utilidad perioperatoria en cirugía no cardíaca. *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación* , 52, 617-626.
- * Cserhádi, T. (2008). New applications of cyclodextrins in electrically driven chromatographic systems: a review. *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY* , 22, 563-571.
- * D.E. Drayer, i. I. (1988). *Drug Stereochemistry*, Marcel Dekker. New York Basel: Marcel Dekker.
- * Dodds, E., Drew, R., & Perfect, J. (2000). Antifungal Pharmacodynamics: Review of the Literature and Clinical Applications. *Pharmacotherapy* , 20 (11), 1335-1355.
- * Dodziuk, H. (2006). Molecules with Holes – Cyclodextrins. En H. Dodziuk, *Cyclodextrins and Their Complexes*. (págs. 1-30). Weinheim: WILEY-VCH.
- * Dodziuk, H., M. Demchuk, O., Bielejewska, A., Kozminski, W., & DolGonos, G. (2004). A Study of Multiple Complexation of α , β and γ -Cyclodextrins: Surprisingly Differing Stoichiometries of β - and γ -Cyclodextrin Complexes. *Supramolecular Chemistry* , 16 (4), 287-292.
- * Dr. Ritter, L. (5 de Noviembre de 2014). *Ractopamine*. Obtenido de <http://www.inchem.org>: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je09.htm>
- * E. Klabunde, R., & Ph, D. (13 de Marzo de 2013). *Beta-Adrenoceptor Antagonists (Beta-Blockers)*. Obtenido de <http://www.cvpharmacology.com> Cardiovascular Pharmacology Concepts : <http://www.cvpharmacology.com/cardioinhibitory/beta-blockers>
- * E.Davis, M., & E. Brewster, M. (2004). CYCLODEXTRIN-BASED PHARMACEUTICS: PAST, PRESENT AND FUTURE. *Nature reviews, drug discovery* , 3, 1023-1035.
- * Fanali, S. (2000). Enantioselective determination by capillary electrophoresis with. *Journal of Chromatography , A* (875), 89-122.
- * FAO. (28 de Marzo de 2013). *Ractopamine*. Obtenido de <ftp://ftp.fao.org>: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/vetdrug/41-5-ractopamine.pdf>
- * Farmayuda.tk. (3 de Enero de 2014). *Farmacología I*. Obtenido de <https://docs.google.com/document/d/1OAjeobDXkZISRm32c939RZ5IRL30gcTaAKjh4ACRaMo/edit?pli=1>
- * FDA. (25 de Mayo de 2014). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21 food and drugs*. Obtenido de <http://www.fda.gov>: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=558.500>

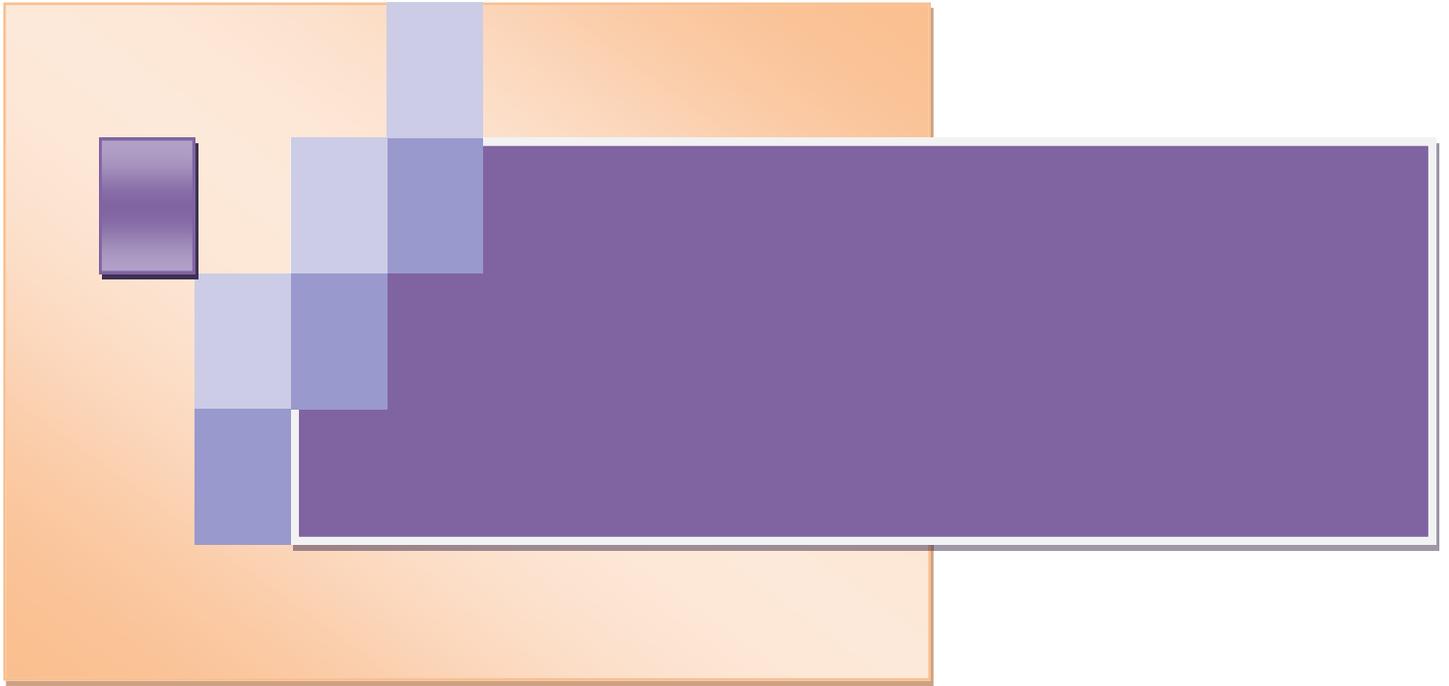
- * FDA. (May de 1992). *FDA Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs*.
- * FDA. (25 de Mayo de 2014). *Ractopamine hydrochloride*. Obtenido de FDA U.S. Food and Drug Administration:
http://google2.fda.gov/search?q=ractopamine&client=FDAgov&site=FDAgov&lr=&proxystylesheet=FDAgov&requiredfields=-archive%3AYes&output=xml_no_dtd&getfields=*
- * FDA., & Zoetis Inc. (25 de Mayo de 2014). *Ractopamine and Tylosin Finishing Swine Feed Concentrate Type B Medicated Feed for Control of Swine Dysentery and Control of Ileitis*. Obtenido de FDA U.S. Food and Drug Administration:
<http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/products/animalfoodfeeds/medicatedfeed/bluebirdlabels/ucm432204.pdf>
- * Financiera Rural. (11 de Enero de 2015). *Panorama del porcino*. Obtenido de <http://www.financierarural.gob.mx>:
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Porcino%20\(may%202014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Porcino%20(may%202014).pdf)
- * Financiera Rural. (21 de Agosto de 2013). *Monografía de Ganado Porcino*. Obtenido de Financiera rural Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial:
<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPorcinos%28jun2012%29.pdf>
- * Flynn, D. (20 de Noviembre de 2014). *Lost Meat Sales to Russia Over Ractopamine Costing Millions, Not Billions*. Obtenido de Food Safety News: <http://www.foodsafetynews.com/2013/12/millions-but-not-billions-lost-in-beef-and-pork-sales-to-russia-over-ractopamine/#.VQm-GY6G92F>
- * Francis, A., & Carey. (2006). En *Química orgánica* (pág. 199). México: Sexta edición, Mac Graw- Hill Interamericana editores S.A de C.V.
- * Francis, A., & Carey. (2006). Estereoquímica. En *Química Orgánica* (págs. 287-302). México: Sexta edición, Mac Graw- Hill Interamericana editores S.A de C.V.
- * Fritz, R. U. (s.f.). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residue in food "Ractopamine (addendum)"*. Recuperado el 09 de Abril de 2013, de www.inchem.org:
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v53je08.htm>
- * *Fundamentos de la Electroforesis Capilar*. (24 de Febrero de 2015). Obtenido de <http://www.tdx.cat/>:
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6423/04cap1.pdf.txt?sequence=17>
- * Fu-tai, A., Shen, G., & A. Evangelista, R. (2001). Characterization of highly sulfated cyclodextrins. *Journal of Chromatography*, A (924), 523-532.
- * G. Kottke, A., & Dhein, S. &. (2003). Pharmacological and biochemical characterization of beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochemistry, Pharmacol.*, 66, 1067-1081.
- * G. Pérez, J. (2004). Aspectos estereoquímicos en el diseño de nuevos fármacos (3D QSAR). En J. G. Pérez, *Panorama actual de la química farmacéutica* (Segunda ed., págs. 353,). España.
- * Garina, A. (5 de Noviembre de 2014). *Russia throws poisonous meat back to US*. Obtenido de Pravda.Ru: http://english.pravda.ru/business/companies/11-12-2012/123129-russia_usa_meat_imports-0/
- * Goetz, G. (10 de Noviembre de 2014). *Nonprofits Sue FDA Claiming Agency Hasn't Proven Safety of Animal Growth Drug*. Obtenido de Food Safety News: <http://www.foodsafetynews.com/tag/ractopamine/#.VQm9b46G92F>
- * Gómez Ruíz, S., & et-al. (2010). En S. Gómez Ruíz, M. Sierra Alonso, & D. Pérez Quintanilla, *Análisis Instrumental* (Vol. 1, págs. 172-189). España: Netbiblo S.L.
- * Gómez-Gomar, A., Ortega, E., Calvet, C., Andaluz, B., Mercé, R., & Frigola, J. (2003). Enantioseparation of basic pharmaceutical compounds by capillary electrophoresis using sulfated cyclodextrins Application to E-6006, a novel antidepressant. *Journal of Chromatography*, A (990), 91-98.

- ✳ Gregori Valdés, S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Instituto cubano de investigaciones de derivados de la caña de azúcar. Revista Cubana Farm.* , 39 (2).
- ✳ Gunnar Aberg, A., Reuter, K., Meier, V., Stolz, F., & Gogritchiani, E. (17 de Dic de 2014). *Use of RR/SR-ractopamine*. Obtenido de <http://www.google.com/patents/http://www.google.com/patents/US7723392>
- ✳ Guttman, A., & Brunet S, C. N. (1996). Capillary electrophoresis separation of enantiomers by ciclodextrin array chiral analysis. *LC-GC* , 9, 88-95.
- ✳ Hudson, C., & Coulter Beckman, I. (2008). In search of a generic chiral strategy: 101 separations with one method. *Place setter the worldwide newsietter for capillary electrophoresis* , 12 (2), 1-12.
- ✳ Hudson, J., & Beckman Coulter. (10 de Enero de 2015). Rapid Enantiomeric Separation of 101 Basic Drugs and Metabolites:. CA, USA.
- ✳ HUFFSTUTTER, P. (6 de Noviembre de 2014). *Cargill sets September 30 for last purchases of Zilmax-fed cattle*. Obtenido de Reuters: <http://www.reuters.com/article/2013/08/26/us-usa-cargill-zilmax-idUSBRE97P0MS20130826?feedType=RSS&feedName=healthNews>
- ✳ Index, M. (3 de Enero de 2015). *Ractopamine*. Obtenido de <https://www.rsc.org/Merck-Index/https://www.rsc.org/Merck-Index/searchresults?searchterm=Ractopamine>
- ✳ Inoue, T., & Chang Jen, P. (2007). Capillary Electrophoretic Separation and quantitation of Ractopamine Stereoisomers Using Ciclodextrins as Chiral Additives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* , 26 (11), 1677-1693.
- ✳ J. Thompson, M., & al, e. (1980). Hemodynamic effects of Intravenous Butopamine In Congestive Heart Failure. *Clin. Pharmacol. Ther.* , 28 (3), 324-334.
- ✳ J. Ward, T., & Ward, J. D. (2012). Chiral Separations by High-performance Liquid Chromatography . *EncyclopediaofAnalyticalChemistry* , 1-25.
- ✳ Johnson, M. (2006). Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol* , 18-24.
- ✳ Kavran-Belin, G., & Rudaz, S. &. (2005). Enantioseparation of baclofen with highly sulfated β -ciclodextrin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal Sep. Science.* , 28, 2187-2192.
- ✳ Kuiper, H., Noordan, M., Dooren-Flipsen, M., Schilt, R., & Roos, A. (1998). Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. *Journal of animal science* , 76 (1), 195-207.
- ✳ L. Brunton, L., S.Lazo, J., & L.Parker, K. (2007). *Goodman & Gilman's: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Undecima ed.). México: Mc Graw Hill.
- ✳ Lafontaine, C., Haigiang, Y., Espeurteile, F., & Shi, Y. (2012). Quantitative analysis of ractopamine in beef using automated online sample preparation with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* , 4, 3536-3541.
- ✳ Li, W., Tan, G., Zhao, L., Chen, X., & Zhang, X. (2012). Computer-aided molecular modeling study of enantioseparation of iodiconazole and structurally related triadimenol analogues by capillary electrophoresis:Chiral recognition mechanism and mathematical model for predicting chiral. *Analytica Chimica Acta* , 718, 138-147.
- ✳ Loftsson, T., & Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* , 329, 1-11.
- ✳ Marchant-Forde, J., Lay, D. C., Jr, Pajor, E. A., & Richert, B. T. (2002). The Effects of Ractopamine on Behavior and Physiology of Finishing Pigs . *Purdue University* , 118-126.
- ✳ Marti, D., Johnson, R., & Mathews, K. J. (28 de Julio de 2014). Obtenido de <http://www.ers.usda.gov/http://www.ers.usda.gov/media/147867/ldpm20901.pdf>
- ✳ Martínez, G., & Gómez, M. (2007). Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Reviste Iberoamericana de polímeros* , 8 (4), 300-3012.

- ✿ México: mejores pronósticos de producción de cerdo no obstante la ped. (30 de Mayo de 2014). Obtenido de El sitio porcino: <http://www.elsitioporcino.com/articles/2505/maxico-mejores-pronosticos-de-produccion-de-cerdo-no-obstante-la-ped>
- ✿ Mikkers, F., Evaraerts, F., & Verheggen, T. (1979). Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* , 169, 1-10.
- ✿ Mills, S. (2002). Biological basis of ractopamine response. *J. Anim. Science* , 80, 28-32.
- ✿ Mills, S., Kissel, J., Bidwel, C., & Smith, D. (2003). Stereoselectivity of porcine β -adrenergic receptors for ractopamine stereoisomers. *Journal of animal science* , 81, 122-129.
- ✿ Negroni, M. (2009). Microbiología estamotológica, Fundamentos y guía práctica. Segunda edición, Panamericana.
- ✿ Neilson Boyd, R., & Thornton Morrison, R. (1998). Ciclodextrinas. En *Química Orgánica* (págs. 1309, 1315, 1316). México: Pearson Educación, Quinta edición.
- ✿ Nishi, H., & Kawahara, Y. (2002). Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboximethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors. 27, 577-585.
- ✿ *Nutriplex PMC-PL*. (11 de Diciembre de 2013). Obtenido de <http://www.mnademexico.com>: <http://www.mnademexico.com/cerdos/>
- ✿ OCDE/FAO(2013)Texcoco, E. d. (26 de Octubre de 2014). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022*. Obtenido de <http://www.fao.org>: <http://www.fao.org/docrep/018/i3307s/i3307s.pdf>
- ✿ P. Lewis, K., González, R., & Balonov, K. (2010). Vasoactive amines and inotropic agents. En J. M. O'Donnell, & F. Nacul, *Surgical Intensive Care Medicine* (Segunda ed., págs. 46-49). Springer.
- ✿ Pascuzzo-Lima, & Carmine. (2008). Farmacología básica.
- ✿ *Pasta de canola en la alimentación de cerdos*. (13 de Diciembre de 2014). Obtenido de <http://www.elsitioporcino.com>: <http://www.elsitioporcino.com/articles/2564/pasta-de-canola-en-la-alimentacion-de-cerdos>
- ✿ *Paylean*. (11 de Diciembre de 2013). Obtenido de <http://www.elanco.com.mx>: <http://www.elanco.com.mx/products-services/swine/paylean.aspx>
- ✿ PiSA. (2013). PiSA. Obtenido de PiSA Farmacéutica: <http://www.pisa.com.mx/>
- ✿ Pleadin, J., Vulie, A., & Persi, N. a. (10 de Enero de 2015). *Determination of Ractopamine Residues in Pigs by Ultra performance Liquid Chromatography tandem Mass spectrometry*. Obtenido de Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles: www.intechopen.com
- ✿ Poole Arcangelo, P., & M. Peterson, A. (2006). *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach* (Segunda ed., Vol. 536). USA: Wolters Kluwer/ Lippincot Williams & Wilkins.
- ✿ Porcicultura. (11 de Diciembre de 2013). *La ractopamina y su relación con los nutrientes sobre la productividad de los cerdos*. Obtenido de <http://www.porcicultura.com>: http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=915
- ✿ *Producción y consumo de carne de cerdo a nivel mundial*. (21 de Enero de 2014). Obtenido de <http://www.sofoscorp.com>: <http://www.sofoscorp.com/produccion-y-consumo-de-carne-de-cerdo-a-nivel-mundial/>
- ✿ R.Gratz, S., & M. Stalcup, A. (1998). Enantiomeric Separations of Terbutaline by CE with a Sulfated - Cyclodextrin Chiral Selector: A Quantitative Binding Study. *Anal. Chem.* , 70, 5166-5171.
- ✿ *Racmina Premix* ® 2%. (11 de Diciembre de 2013). Obtenido de <http://www.pisaagropecuaria.com.mx>: <http://www.pisaagropecuaria.com.mx/racmina-premix-2/>
- ✿ *Ractopamine hydrochloride* (CAS 90274-24-1). (4 de Noviembre de 2013). Obtenido de <http://www.scbt.com>: <http://www.scbt.com/es/datasheet-205832-Ractopamine-hydrochloride.html>
- ✿ Ramírez Aguilar, A. G. (2012). Desarrollo de un método para la determinación de antibioticos en la leche de vaca por electroforesis capilar(Tesis de Licenciatura). *FES-Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México*. Cuautitlán, Estado de México.

- * Ringbom, A. (1979). *Formación de complejos en química analítica*. Alhambra: Pearson .
- * Romero, B. (2009). DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES(Tesis de doctorado). *Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Química* .
- * Rosenberg, M. (5 de Noviembre de 2014). . Obtenido de Ractopamine: The Meat Additive on Your Plate That's Banned Almost Everywhere But America: http://www.cornucopia.org/2013/10/ractopamine-meat-additive-plate-thats-banned-almost-everywhere-america/?utm_so
- * Rosenberg, M. (31 de Octubre de 2013). *Ractopamine: The Meat Additive on Your Plate That's Banned Almost Everywhere But America*. Obtenido de The cornucopia Institute: <http://www.cornucopia.org/2013/10/ractopamine-meat-additive-plate-thats-banned-almost-everywhere-america/>
- * Rudaz, S., Le Saux, T., Prat, J., Gareil, P., & Veuthey, J. (2004). Ultrashort partial-filling technique incapillary electrophoresis for infinite resolution of tramadol enantiomers and its metabolites with highly sulfated cyclodextrins. *Electrophoresis* , 25, 2761–2771.
- * Rudolph Macy, P. (2005). *Química Orgánica simplificada*. España: Reverte.
- * SAGARPA. (18 de Diciembre de 2014). *11 Sistema de producción porcina*. Obtenido de SAGARPA Subsecretaría de Desarrollo Rural Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Sistema%20de%20producci%C3%B3n%20Porcina.pdf>
- * SAGARPA. (10 de Enero de 2013). *Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2009*. Obtenido de SAGARPA: Coordinación General de Ganadería: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Estudios%20de%20situacin%20actual%20y%20perspectiva/Attachments/27/sitpor09a.pdf>
- * Sakai, T., Hotomi, T. S., Kai, S., Murayama, M., & Maitani, T. (2007). Determination method for ractopamine in swine and cattle tissues using LC/MS. *Journal Food Hyg. Soc. Japan* , 48 (5), 144-147.
- * Santamaría G., H., & Castejón O., A. (2009). *Electrotecnia*. Editex.
- * Sears, M. (2002). Adverse effects of beta-agonists. *J. Allergy clin. Immunol.* , 110, S322-S328.
- * Shishani, E. I., Chai, S. C., Jamokha, S., & Aznar, G. (2003). Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* , 483.
- * Silva, L. (2004). Antifúngicos del futuro. *Medicina cutánea* , 32 (6).
- * Simuli Wabuyele, I., & Xu, Y. (2012). Capillary Electrophoresis in Clinical Chemistry. *Encyclopedia of analytical Chemistry* , 1-19.
- * Sitio Porcino. (30 de Mayo de 2014). *Análisis de mercado internacional de cerdo en 2013*. Obtenido de El sitio porcino: <http://www.elsitioporcino.com/articles/2549/analisis-de-mercado-internacional-de-cerdo-en-2013>
- * Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental*. España: Mc Graw Hill.
- * SNIIM. (30 de Diciembre de 2014). *Mercados Pecuarios*. Obtenido de SNIIM: <http://www.economia-sniim.gob.mx/nuevo/>
- * Sofoscorp. (20 de Septiembre de 2014). *Producción y consumo mundial en 2010 de carne de cerdo*. Obtenido de <http://www.sofoscorp.com/>: <http://www.sofoscorp.com/produccion-y-consumo-de-carne-de-cerdo-a-nivel-mundial/>
- * Stephano, A. (28 de Noviembre de 2013). *Situación de la porcicultura mexicana*. Obtenido de <http://www.porcicultura.com/>: http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=865

- * Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* , 1743-1753.
- * Szejtli, J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin. *Pure Appl.Chem* , 76 (10), 1825–1845.
- * Tai, F., Chen, A., Shen, G., & A.Evangelista, R. (2001). Characterization of highly sulfated cyclodextrins. *Journal of Chromatography , A* (924), 523-532.
- * Ungemach Fritz, R. (2004). Ractopamine. *WHO Food Additives Series* , 53, 119-164.
- * USDA. (3 de Noviembre de 2014). <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>. Obtenido de USDA.gov.
- * W.E., D. C. (1993). *J. Pharm. Biomed. Anal* , 11, 1167-1172.
- * Walker, D. K. (2008). *Effect of ractopamine on growth in cattle*. Manhattan, Kansas: UMI.
- * Wallukat, H., & Herz. (Vol. 27 de Noviembre de 2002). *The β -Adrenergic Receptors*. Obtenido de Springer: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00059-002-2434-z>
- * Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Shi, X., & Ye, J. (2010). Determination of b-agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Meat Science* , 85, 302-305.
- * Wu, J., Liu, X., & Peng, Y. (2014). Determination of ractopamine in pig hair using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Pharmacological and Toxicological Method* , 69, 211-2116.
- * Y.Zhang, L., Chang, B., Dong, T., He, P., & Yang, W. W. (2009). Simultaneous Determination of Salbutamol, Ractopamine, and Clenbuterol in Animal Feeds by SPE and LC–MS. *Journal of Chromatographic Science* , 47, 324-328.
- * Yongfei, Y., Xionge, P., Huhua, C., & Congying, Z. (9 de Enero de 2015). *Determination of ractopamine in animal Urine by SPE- HPLC*. Obtenido de <http://www.fsis.usda.gov: http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/39781797-3a8d-4f39-ba40-ebc1ed271d55/CLG-RAC1.pdf?MOD=AJPERESCLG-RAC>
- * Zhang, Y., Wang, F., Fang, L., & Wang, S. a. (2009). Rapid Determination of Ractopamine Residues in Edible Animal Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Development and Investigation of Matrix Effects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* , 2009, 9 pág.
- * Zou, P., Zhang, Y., & Ye, B. (2010). Determination of beta-adrenergic agonists by hapten microarray. *Talanta* , 82 (1), 61-66.



9. ANEXOS

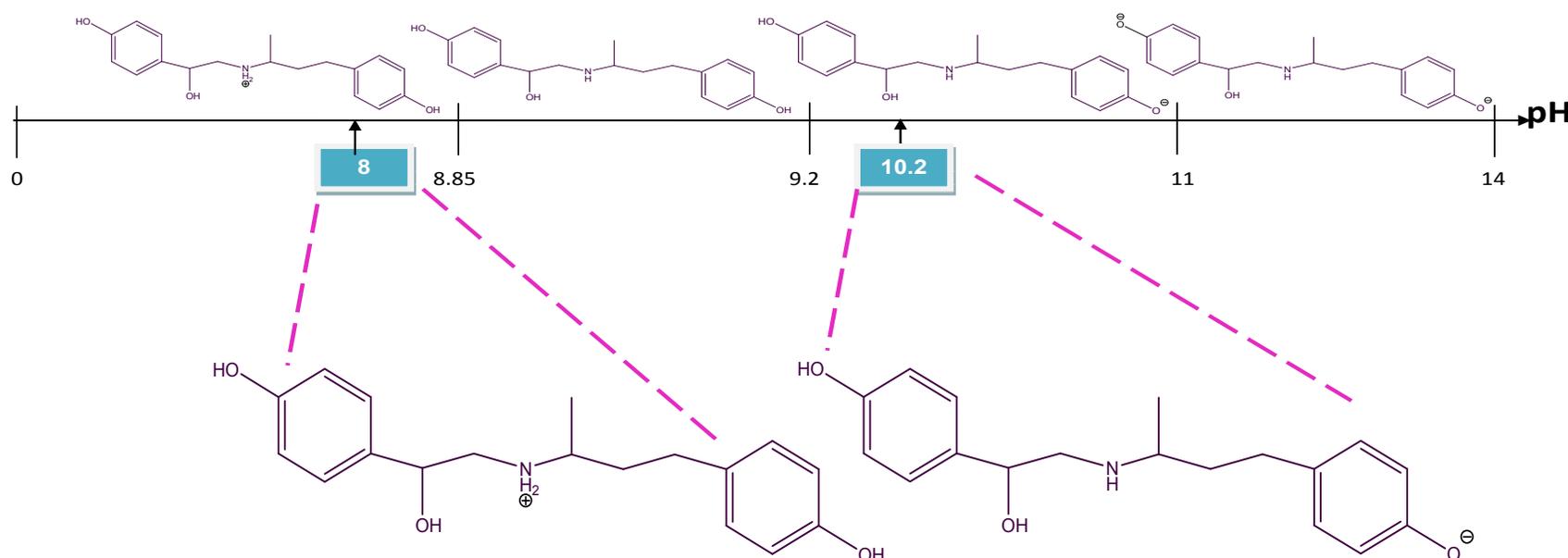


9. ANEXOS

Anexo1: Escala de zonas de predominio del fármaco ractopamina

La siguiente EZP muestra las especies de la ractopamina presente en el rango de pH de 0 a 14, además señala la especie predominante a pH de 8 para la separación de los enantiómeros, mientras que a un pH de 10.20 para la cuantificación de la ractopamina total.

Ractopamina

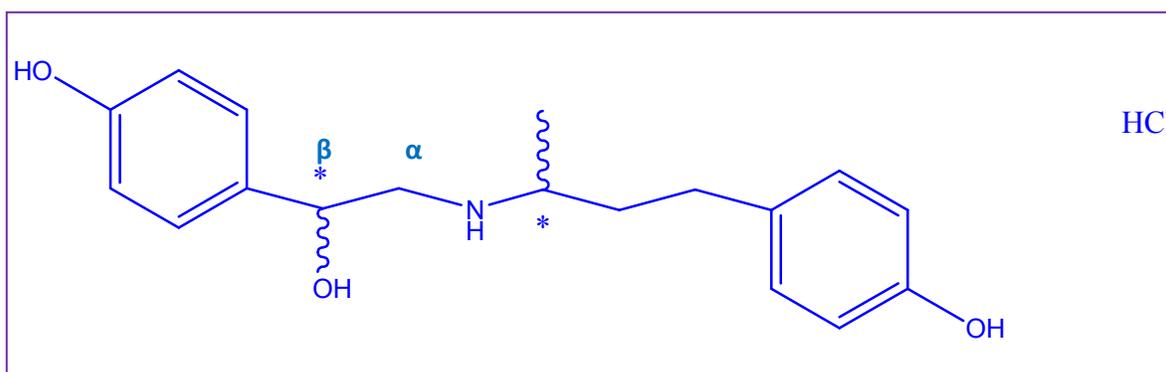


Anexo 1 Figura 1 Escala de zonas de predominio del fármaco ractopamina para su control de calidad y la separación de los estereoisómeros

Anexo 2: Estereoisómeros del fármaco ractopamina.

Se muestra los estereoisómeros de la ractopamina de acuerdo a la notación de Cahn-Ingold-Prelog y a la fórmula 2^n donde n es el número de centros quirales.

Sabiendo que la ractopamina posee 2 centros quirales mostradas en la Figura: Anexo 2 Figura 1 en *.

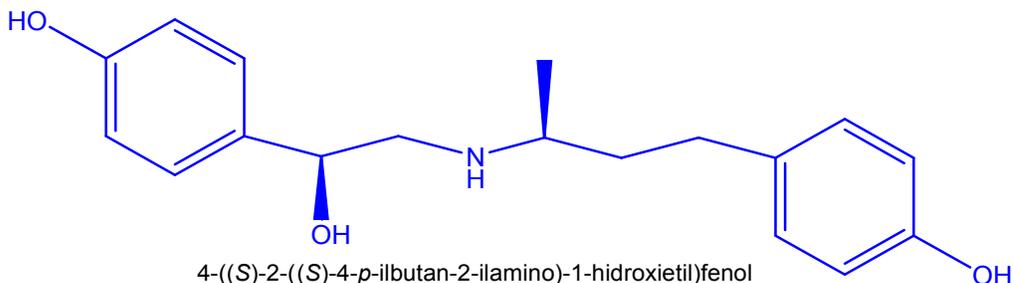


Anexo 2 Figura 1 Estructura de la ractopamina con sus centros quirales mostrados con * realizados con el programa Chemoffice 2004.

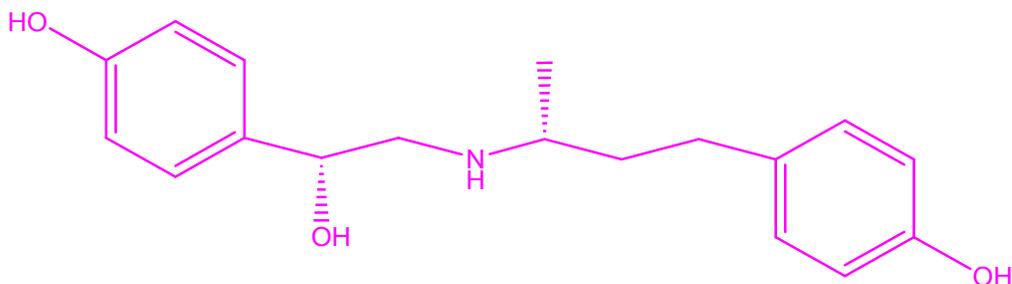
Y haciendo caso a la fórmula:

$$2^n = 2^2 = 4 \text{ estereoisómeros}$$

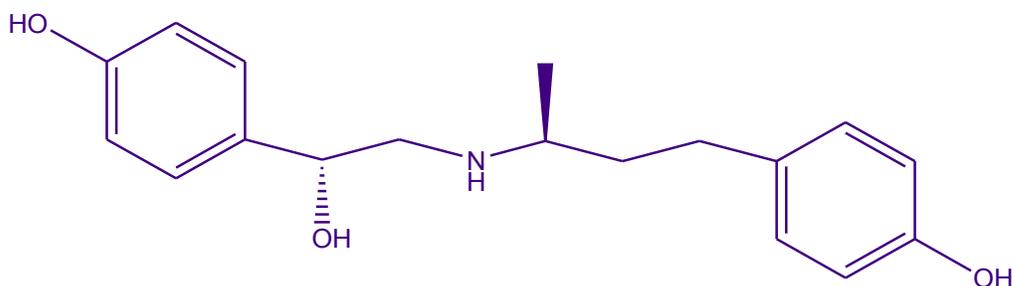
Los cuales podemos ver a continuación en la Figura Anexo 2 Figura 2



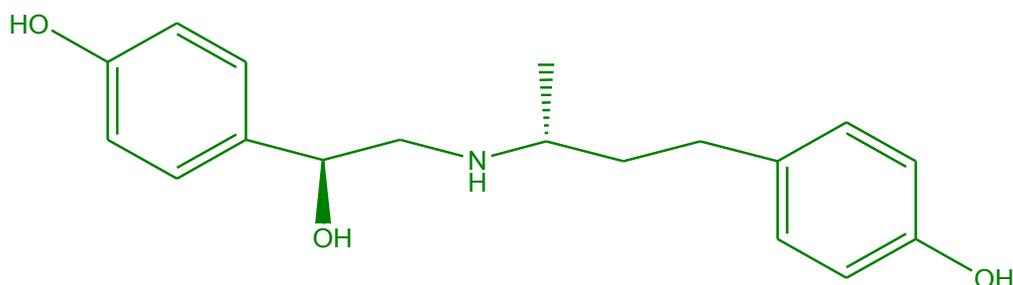
4-((S)-2-((S)-4-*p*-ilbutan-2-ilamino)-1-hidroxi-etil)fenol
 4-((S)-1-hidroxi-2-[[4-(4-hidroxi-fenil)butan-(S)-2-il]amino]etil)fenol
 4-((S)-2[[3-(4-hidroxi-fenil)-(S)-1-metil-propil]amino-1-hidroxi-etil]fenol



4-((R)-2-((R)-4-*p*-ilbutan-2-ilamino)-1-hidroxi-etil)fenol
 4-((R)-1-hidroxi-2-[[4-(4-hidroxi-fenil)butan-(R)-2-il]amino]etil)fenol
 4-((R)-2[[3-(4-hidroxi-fenil)-(R)-1-metil-propil]amino-1-hidroxi-etil]fenol

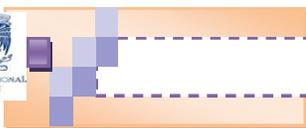


4-((R)-2-((S)-4-*p*-ilbutan-2-ilamino)-1-hidroxi-etil)fenol
 4-((R)-1-hidroxi-2-[[4-(4-hidroxi-fenil)butan-(S)-2-il]amino]etil)fenol
 4-((R)-2[[3-(4-hidroxi-fenil)-(S)-1-metil-propil]amino-1-hidroxi-etil]fenol



4-((S)-2-((R)-4-*p*-ilbutan-2-ilamino)-1-hidroxi-etil)fenol
 4-((S)-1-hidroxi-2-[[4-(4-hidroxi-fenil)butan-(R)-2-il]amino]etil)fenol
 4-((S)-2[[3-(4-hidroxi-fenil)-(R)-1-metil-propil]amino-1-hidroxi-etil]fenol

Anexo 2 Figura 2 Estereoisómeros de la ractopamina RR, SS, SR, RS. Realizados con programa Chemoffice 2004

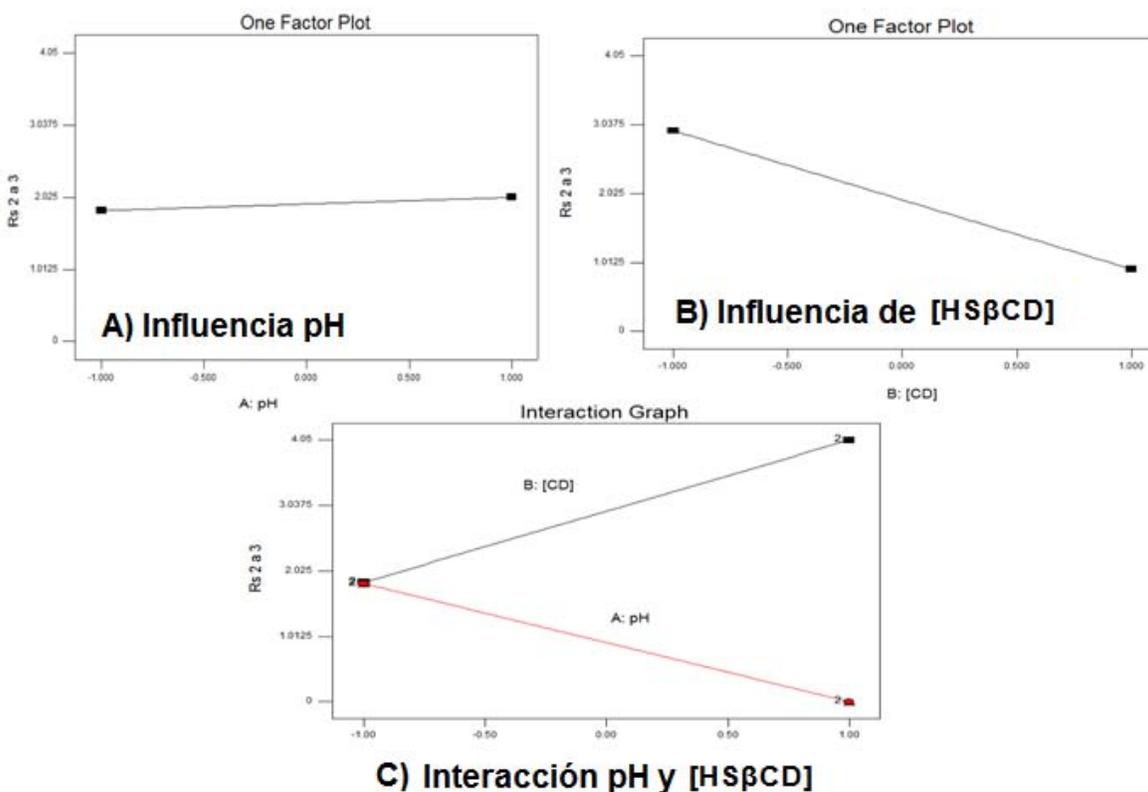


Anexo 3: Análisis estadístico de la separación de los isómeros de la ractopamina.

Resultados del programa Design Expert para la influencia de los factores:

Resolución 2-3

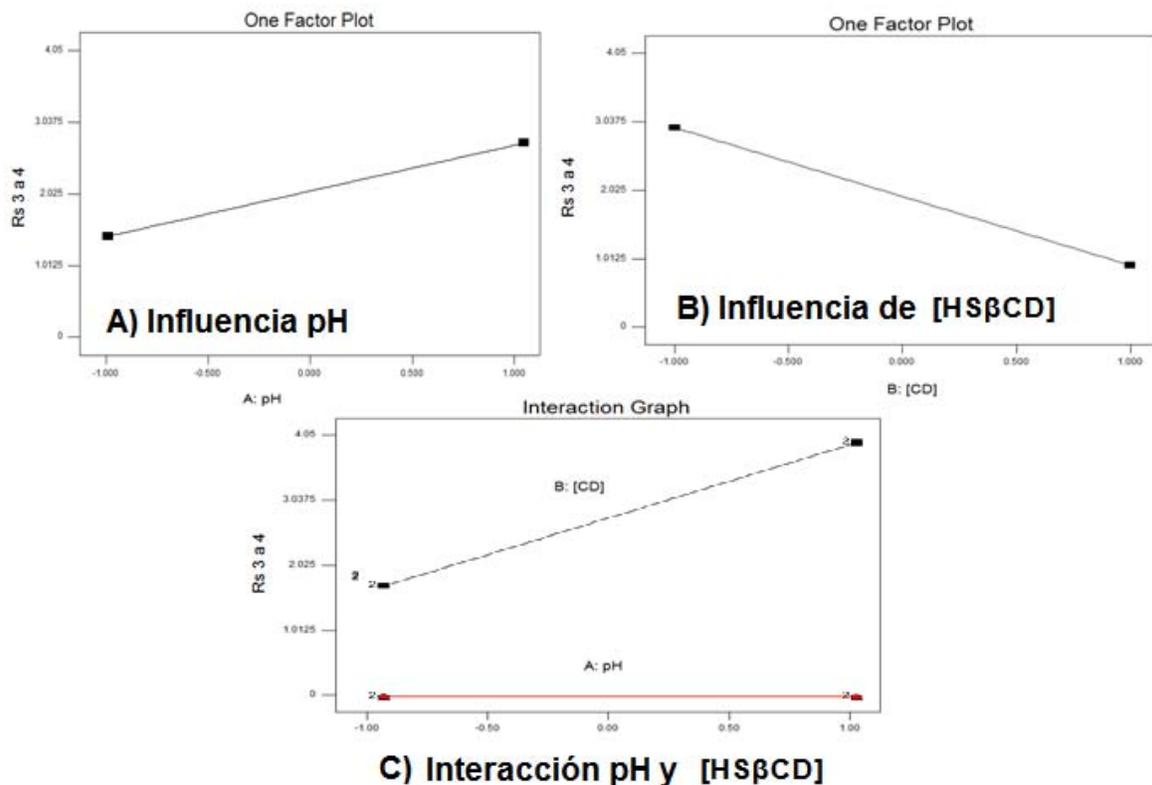
Como podemos apreciar en la figura: Anexo 3 Figura 1 en el gráfico A) el efecto del pH con respecto a la resolución (R_s) es muy baja (lo que se puede apreciar por el poco valor de la pendiente). Mientras que en el gráfico B) la influencia de la concentración de $[HS\beta CD]$ es muy significativa y en el gráfico C) la interacción entre los factores no se puede despreciar, por lo que el factor pH no puede ser descartado.



Anexo 3 Figura 1 Gráficos de resolución de los picos 2 y 3 A) Influencia pH con R_s B) $[HS\beta CD]$ con R_s C) interacción de pH y $[HS\beta CD]$ con R_s

Resolución 3-4

Observando los gráficos de la figura: Anexo 3 Figura 2, podemos apreciar que el pH es poco significativo (aunque en mayor medida que en el apartado anterior, ya que la pendiente de la recta es más grande), mientras que la [HSβCD] es un factor muy significativo al igual que la interacción de estos, por lo que no se puede descartar fácilmente el pH. Sin embargo nos brinda una idea más clara de que factor tenemos que tomar en cuenta con mayor importancia, siendo este la [HSβCD].



Anexo 3 Figura 2 Gráficos de resolución de los picos 3 y 4 A) Influencia pH con Rs B) [HSβCD] con RS C) interacción de pH y [HSβCD] con Rs

Anexo 4: Detalle de la preparación de la solución patrón para la realización de la curva de calibración del sistema

Se preparó una solución patrón que consistió en el estándar de 3-aminofenol y ractopamina se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla: Anexo 4 Tabla 1.

Anexo 4 Tabla 1 Datos de la preparación de la solución patrón en la curva de calibración del sistema de la ractopamina

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V _{aforo} (mL)	[I] (mg/L)
3-aminofenol	0.0102g	98	20	500
Ractopamina	0.025	-	50	500

De esta forma se tiene una concentración de la ractopamina 500 mg/L ya que este está en distintas concentraciones en los puntos de la curva de calibración se va adicionando de 0.5 mL a 10 mL respectivamente para tener las concentraciones de ractopamina requeridas llevando a un aforo de 20 mL y posteriormente tomando una dilución de cada punto de 9.5 mL y aforando a un volumen de 10 mL. Con el 3-aminofenol 500 mg/L, ya que el estándar interno, está presente en la misma concentración para todos los puntos de la curva de calibración, por lo que se adiciona de 3-aminofenol 0.5 mL de esta solución en cada una de las soluciones de la curva de calibración y son aforadas a 10 mL, se obtiene una concentración final de 3-aminofenol 25.5 mg/L; en la Tabla Anexo 4 Tabla 2 se muestran las concentraciones para cada solución de la curva de calibración.

Anexo 4 Tabla 2 Datos de la preparación de la curva de calibración a partir de la solución patrón (sistema)

Soln.	V _{aforo} (mL)	V _{adición} ractopamina (mL)	[Ractopamina] (mg/L)	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} Ractopamina (mL)	V _{adicionado} 3-aminifanol (mL)	[Ractopamina] (mg/L)	[3-aminofenol] (mg/L)
1	20	0.5	12.5	10	9.5	0.5	11.88	25.5
2	20	2	50	10	9.5	0.5	47.50	25.5
3	20	4	100	10	9.5	0.5	95	25.5
4	20	6	150	10	9.5	0.5	142.50	25.5
5	20	8	200	10	9.5	0.5	190	25.5
6	20	10	250	10	9.5	0.5	237.50	25.5

Anexo 5: Detalle de la preparación de la solución patrón para la realización de la curva de calibración del Método

Para la curva de calibración del método se preparó una solución patrón que consistió en el estándar de *3-aminofenol*, *ractopamina* y *placebo*, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla: Anexo 5 Tabla 1 para cada estándar y se llevó a un aforo de 100 mL.

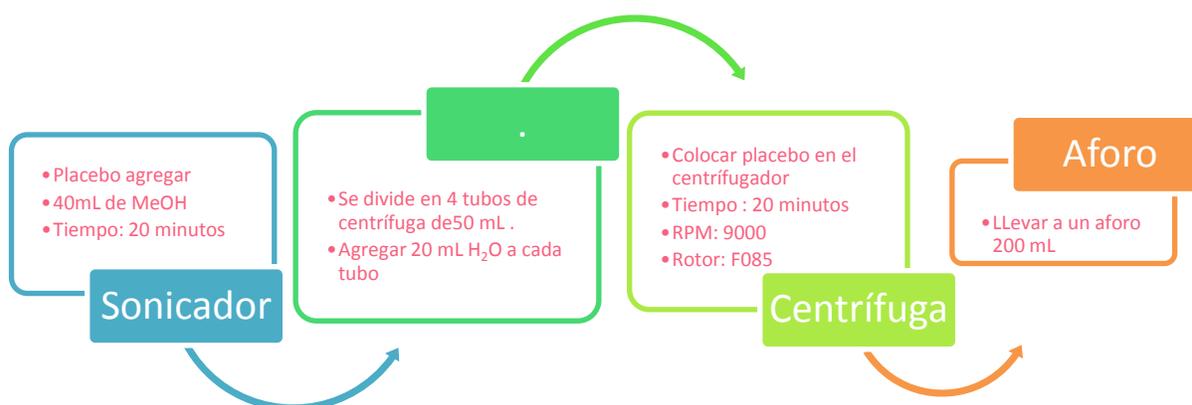
Anexo 5 Tabla 1 Datos de la preparación de la solución patrón en la curva de calibración del método para la ractopamina

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V _{aforo} (mL)	[I] (mg/L)
3-aminofenol	0.0102g	98	20	500
Ractopamina	0.025	100	5	5000
Placebo	1.0001		200	

Placebo:

El placebo tuvo el siguiente procedimiento, mostrado en el siguiente esquema: Anexo 5 Tabla 2, llegando a un aforo de 200mL.

Anexo 5 Tabla 2 "Procedimiento de la preparación del placebo para la curva de calibración del método.



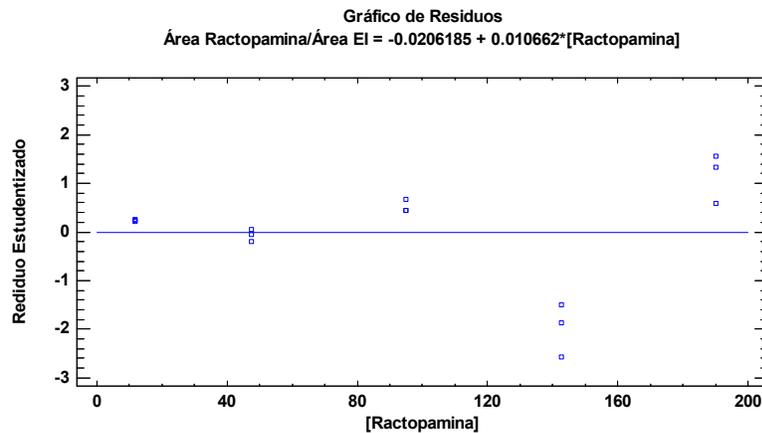
De esta forma se tiene por separado una concentración de ractopamina 5000 mg/L y de 3-amino fenol mg/L, ya que la ractopamina se encuentra en diferentes concentraciones en los puntos de la curva que va adicionando de 50 μ L a 1 mL, por otro lado el estándar interno de 3-aminofenol, está presente en la misma concentración para todos los puntos de la curva de calibración, se adicionan 1 mL de esta solución en cada una de las soluciones de la curva de calibración y son aforadas a 20 mL con el placebo se obtiene una concentración final de 3-aminofenol de 25.5 mg/L en la tabla: Anexo 5 Tabla 3 se muestran las concentraciones para cada solución de la curva de calibración.

Anexo 5 Tabla 3 Datos de la preparación de la curva de calibración a partir de la solución patrón (método)

Solución	V _{aforo} placebo (mL)	V _{adicionado} ractopamina (mL)	V _{adicionado} 3- aminofenol (mL)	[Ractopamina] (mg/L)	[3-aminofenol] (mg/L)
1	20	0.05	1	12.5	25.5
2	20	0.2	1	50	25.5
3	20	0.4	1	100	25.5
4	20	0.6	1	150	25.5
5	20	0.8	1	200	25.5
6	20	1	1	250	25.5

Anexo 6: Validación del modelo lineal: curva de calibración del sistema, gráfico de residuales y cálculo de intervalo de confianza de la pendiente (IC (b₁)) para control de calidad de la ractopamina

Se muestran los residuales obtenidos en la linealidad del sistema en el Anexo 6 Gráfico 1, donde se observa que los datos se distribuyen al azar (aunque existe un ligero aumento en sus varianzas con el aumento en la concentración, pero este no es significativo, ya que los valores no salen del intervalo (+3, -3) como para considerarlos valores atípicos. En resumen, podemos considerarlos homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y que se puede aplicar el método de regresión por mínimos cuadrados.



Anexo 6. Gráfico 1 Residuales de la curva de calibración del sistema para el control de calidad de la ractopamina

Se realizó la prueba de hipótesis correspondiente, dónde:

H_0 : Hay ajuste al modelo

H_1 : No hay ajuste al modelo

Dónde se acepta H_0 si $F_{Exp} < F_{Tablas}$ ó $P > 0.05$

En la siguiente tabla (Anexo 6 Tabla 1) se muestran los resultados del análisis ANOVA.

Anexo 6. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados(SS)	Gl	Cuadrado Medio (MS)	Valor P
Modelo	6.96335	1	6.96335	0.0000
Residuo	0.0463733	13	0.00356718	
Carencia de Ajuste	0.0441203	3	0.0147068	0.0000
Error Puro	0.00225299	10	0.000225299	
Total (Corr.)	7.00972	14		

$$F_{EXP} = \frac{MS_{FDA}}{MS} = \frac{0.0147068}{0.000225299} = 65.28$$

Se concluye que:

$H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 65.28 > 3.708$ ó $0 < 0.05$, por lo que no hay ajuste al modelo lineal.

Por lo que se puede utilizar otros modelos alternos que se muestran en el anexo 10, aunque no ofrecieron ninguna mejora substancial al modelo lineal anteriormente propuesto.

Una vez validado el modelo lineal se calculó el intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)) obteniéndose los valores reportados en la tabla Anexo6. Tabla 2.

Anexo 6. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1))

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	22.5425719	$S_{y/x}$	0.0597579
Σxy	2139.4552	Σx	1460.64
Σy	15.2641	Σx^2	203485.903
n-2	13	S_{b1}	0.0002414
b_1	0.010662	$t_{0.975,13}$	2.160
b_0	-0.0206185		

El IC (b_1) por consiguiente:

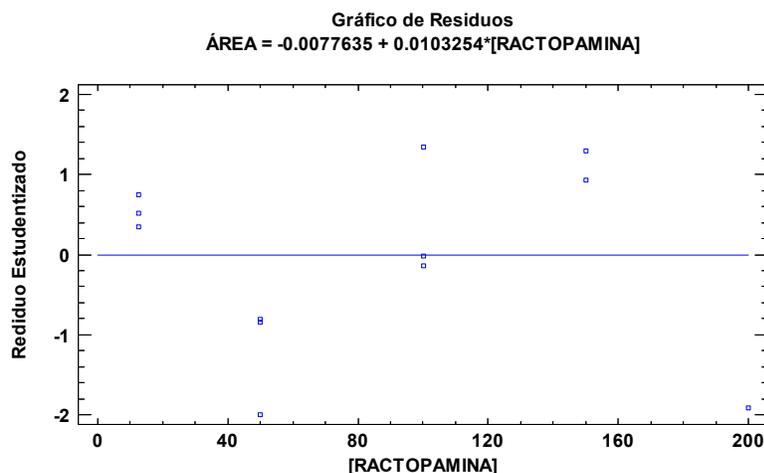
$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975,n-2} S_{b1} = 0.010662 \pm (2.160)(0.0002414) = 0.010662 \pm 0.000521424$$

Por lo tanto el intervalo va de 0.010140576 hasta 0.011183424 y no incluye al cero, cumpliendo con lo establecido por la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010).

Anexo 7: Validación del modelo lineal curva de calibración del método, gráfico de residuales y cálculo de intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)) así como el intervalo de confianza del intercepto (IC (b_0)) para el control de calidad de la ractopamina

En el gráfico Anexo 7 grafico 1 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, sin embargo se aprecia que éstos son heterocedásticos, esto

indica que sus varianzas no son homogéneas y por lo tanto no se ajustan al modelo lineal ya que llegan a tener una tendencia.



Anexo 7. Gráfico 1 Residuales de la curva de calibración del método para la ractopamina

En la siguiente Tabla Anexo 7. Tabla 1 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Anexo 7. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados(SS)	Gl	Cuadrado Medio (MS)	Valor P
Modelo	4.44644	1	4.44644	0.0000
Residuo	0.000645787	10	0.0000645787	
Carencia de Ajuste	0.000532069	3	0.000177356	0.0050
Error Puro	0.000113718	7	0.0000753878	
Total (Corr.)	4.44708	11	0.0000162455	

A partir de los datos mostrados en la tabla Anexo 7. Tabla 1 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{EXP} = \frac{MS_{FDA}}{MS} = \frac{0.000177356}{0.0000162455} = 10.92$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=3$ y $n-k=7$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=4.347$; por lo que se cumple:

$H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 10.92 > 4.347$ Hay falta de ajuste de los datos al modelo lineal.

Por lo que se puede utilizar otros modelos más complicados mostrados a en el anexo 10.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla Anexo 7. Tabla 2.

Anexo 7. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC (b_1)) para el método

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	12.9533022	$S_{y/x}$	0.00826743
Σxy	1262.03875	Σx	987.5
Σy	10.1032	Σx^2	122968.75
$n-2$	10	S_{b1}	4.0483E-05
b_1	0.0103254	$t_{0.975,10}$	2.228
b_0	-0.0077635		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla Anexo 7. Tabla 2 se obtuvo el IC (b_1) de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 IC(\beta_1) &= b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 0.0103254 \pm (2.228)(0.000040483) \\
 &= 0.0103254 \pm 0.000090196124
 \end{aligned}$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.0102 hasta 0.0104. E incluye a la unidad, de esta forma se aceptó el intervalo como válido y de nuevo se ve un ajuste de los datos al modelo lineal.

También se determinó el intervalo de confianza para la ordenada al origen o intercepto (IC (b_0)) se obtuvieron los valores reportados en la tabla Anexo 7. Tabla 3.

Anexo 7. Tabla 3 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la ordenada al origen o intercepto (IC (b_0)) para el método

Término	Valor	Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	12.9533022	$S_{y/x}$	0.00826743	Y	0.84193333
Σxy	1262.03875	Σx	987.5	X	82.2916667
Σy	10.1032	Σx^2	122968.75	$cv_{y/x}$	0.98195777
n	12	S_{b_0}	0.004098070491		
b_1	0.0103254	$t_{0.975,10}$	2.228		
b_0	-0.0077635	$cv_{y/x}$	0.98195777		

De acuerdo a la ecuación obtenida de la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010) y los valores de los términos de la tabla Anexo 7. Tabla 3 se obtuvo el IC (b_0) de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 IC(\beta_0) &= b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0} = -0.0077635 \pm (2.228)(0.004098070491) \\
 &= -0.0077635 \pm 0.009130501054
 \end{aligned}$$

Por lo tanto el intervalo va desde -0.01689400105 hasta 0.001367001054 e incluye al cero, de esta forma se aceptó el intervalo como válido y de nuevo se ve un ajuste de los datos al modelo lineal.

Anexo 8: Validación: Cálculo del límite de detección y cuantificación para el control de calidad de la ractopamina

Se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas 1-3 del anexo 7 y la ecuación de acuerdo a la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010) se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = \left(\frac{3.3 * S_{\frac{y}{x}}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.00826743}{0.0103254} \right) = 2.64 \text{ mg/L}$$

ó

$$LD = \left(\frac{3.3 * S_{b0}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.004098070491}{0.0103254} \right) = 1.30 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de ractopamina es de 2.64 o 1.30 mg/L.

Se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas 1-3 del anexo 7, y la ecuación obtenida de la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010) se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = \left(\frac{10 * S_{\frac{y}{x}}}{b_1} \right) = \left(\frac{10 * 0.00826743}{0.0103254} \right) = 8.00 \text{ mg/L}$$

ó

$$LC = \left(\frac{3.3 * S_{b0}}{b_1} \right) = \left(\frac{3.3 * 0.004098070491}{0.0103254} \right) = 1.30 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de ractopamina es de 8 o 1.30 mg/L.

Anexo 9: Validación: Estudio efecto matriz para control de calidad de la ractopamina

Se evaluó el efecto de la matriz con base en la curva de calibración de sistema y método, de acuerdo a los datos obtenidos del análisis ANOVA respectivamente mostrando los valores en la tabla Anexo 9. Tabla 1 y de acuerdo a las ecuaciones obtenidas de la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010) se obtuvo de la siguiente forma:

Anexo 9. Tabla 1 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para evaluar el efecto matriz utilizando sistema y método

Fuente	Suma de Cuadrados(SS)	Gl	Cuadrado Medio (MS)	
Modelo	6.96335	1	6.96335	sistema
Residuo	0.0463733	13	0.00356718	
Carencia de Ajuste	0.0441203	3	0.0147068	
Error Puro	0.00225299	10	0.000225299 Se²₂	
Total (Corr.)	7.00972	14		
Fuente	Suma de Cuadrados(SS)	Gl	Cuadrado Medio (MS)	
Modelo	4.44644	1	4.44644	método
Residuo	0.000645787	10	0.0000645787	
Carencia de Ajuste	0.000532069	3	0.000177356	
Error Puro	0.000113718	7	0.0000753878 Se²₁	
Total (Corr.)	4.44708	11	0.0000162455	

A partir de los datos mostrados en la tabla Anexo 9 Tabla 1 y de acuerdo a la ecuación se calculó F_{exp} para ver si son o no iguales las varianzas de las curvas de calibración y de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F = \frac{0.000225299}{0.0000753878} = 2.9885$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $n1-k=7$ y $n2-k=10$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=3.637$ por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 2.9885 < 3.637 \text{ Varianzas iguales}$$

Con lo anterior y con lo establecido en el Apartado 4.6.4.1, se prosiguió a calcular la $T_{calculada}$ de acuerdo con la guía de validación (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2010). Se calcularon los siguientes valores para el cálculo del efecto matriz de la pendiente mostrada en la tabla Anexo 9. Tabla 2.

Anexo 9. Tabla 2 Valores de los términos utilizados para el cálculo del efecto matriz en el estudio de la ractopamina sistema y método

Término	Valor
$X_{i1} - \bar{x}_{1met}$	41705.7292
$X_{i2} - \bar{x}_{2sis}$	61254.6226
n_{1met}	12
n_{2sis}	16
$t_{0.025} (n_1+n_2-4)$	24
m_{1met}	0.0103254
m_{2sis}	0.010662

Con los datos anteriores se prosigió a realizar el cálculo de varianza estimada común:

$$S_{ep}^2 = \frac{(12 - 2)0.0000753878 + (16 - 2)0.000225299}{12 + 16 - 4} = 1.6281 \times 10^{-4}$$

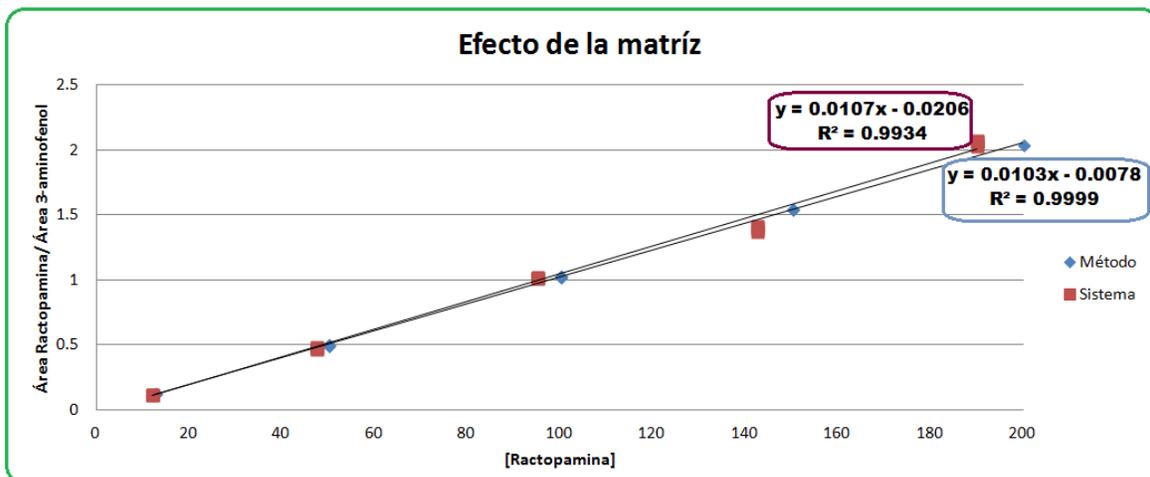
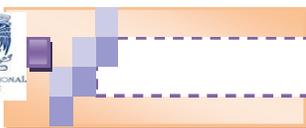
Con el cálculo anterior y con base a la eq. 10 se realiza el cálculo de la $t_{calculada}$ dando un valor mostrado a continuación:

$$t_{calculada} = \frac{0.0103254 - 0.010662}{\sqrt{1.6281 \times 10^{-4} \left(\frac{1}{41705.7292} + \frac{1}{61254.6226} \right)}} = -4.1432$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (T student), con el cálculo de $t_{0.025} (n_1+n_2-4=24)$, de esta forma se obtuvo un valor de $T_{Tablas0.025}=2.064$ por lo que se cumple:

$$H_0 = T_{cal} < T_{Tablas} = -4.1432 < 2.064 \text{ No efecto de matriz } m_1 = m_2$$

Por lo que se concluye que no existe efecto de matriz. Y se puede optar por utilizar la curva de calibración de sistema o método, no hay diferencias y con ella la posterior cuantificación de muestras y se puede observar en Anexo 9 Gráfico1.



Anexo 9. Gráfico 1 Evaluación del efecto matriz de las pendientes de las curvas de calibración de sistema y método para el control de calidad de la ractopamina

Anexo 10: Validación: Modelos alternos al modelo lineal de las curvas de calibración del control de calidad de la ractopamina

A continuación se presentan modelos alternos al modelo lineal de las curvas de calibración para la ractopamina total en sistema y en método, así como el cálculo de los algunos parámetros de validación mencionados con anterioridad.

Ractopamina (Sistema)

Modelos alternos al modelo lineal de la curva de calibración para la ractopamina en el sistema mostrados a continuación en las siguientes ilustraciones:

Doble recíproco

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.0323771	0.0183373	-1.76565	0.1009
Pendiente	99.9082	0.46678	214.037	0.0000

Regresión Simple - Área vs. [racto]

Variable dependiente: Área
Variable independiente: [racto]

$$\text{Doble Recíproco: } Y = 1/(a+b/X)$$

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	132.891	1	132.891	45811.98	0.0000
Residuo	0.0377102	13	0.00290078		
Total (Corr.)	132.928	14			

Coefficiente de Correlación = 0.999858

R-cuadrada = 99.9716 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9694 por ciento

Error estándar del est. = 0.0538589

Error absoluto medio = 0.0380352

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	132.891	1	132.891	45811.98	0.0000
Residuo	0.0377102	13	0.00290078		
Carencia de Ajuste	0.0119009	3	0.00396698	1.54	0.2649
Error Puro	0.0258093	10	0.00258093		
Total (Corr.)	132.928	14			

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Doble Inverso	0.9999	99.97%
Multiplicativa	0.9993	99.86%
Raíz Cuadrada Doble	0.9982	99.65%
Lineal	0.9967	99.34%

Residuos Atípicos

Fila	X	Y	Predicciones	Residuos	Residuos Studentizados
2	11.88	0.1178	0.119369	-0.00156866	3.38
3	11.88	0.1209	0.119369	0.00153134	-3.08

Gráfico del Modelo Ajustado
Área Ractopamina/Área EI = 1/(-0.0323771 + 99.9082/[Ractopamina])

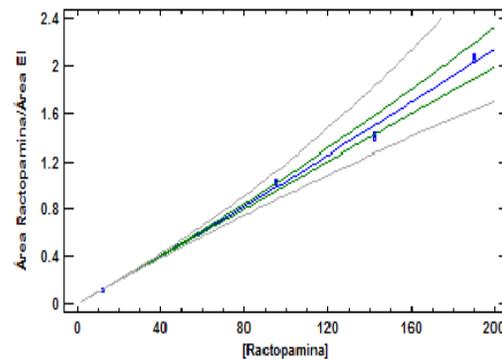


Gráfico de Residuos
Área Ractopamina/Área EI = 1/(-0.0323771 + 99.9082/[Ractopamina])

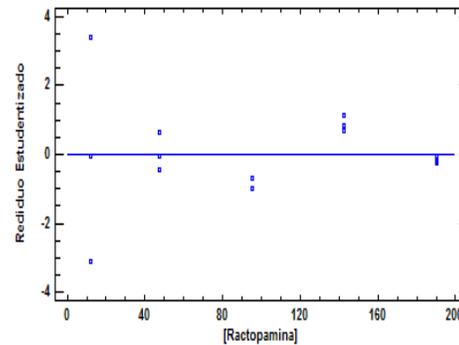


Ilustración 0-1 Modelo doble recíproco curva de calibración del sistema para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es mayor al modelo lineal de 0.993384 a 0.999716 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 1.54$ comparando con el modelo lineal disminuyó el valor drásticamente de 65.28 a 1.54; con lo cual cumple con la prueba de hipótesis: $H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 1.54 < 3.708$ hay ajuste al modelo, sin embargo al tener residuos atípicos mayores a 3 se prosigue a la eliminación de estos.

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.0316644	0.0127516	-2.48317	0.0304
Pendiente	99.8401	0.48522	205.762	0.0000

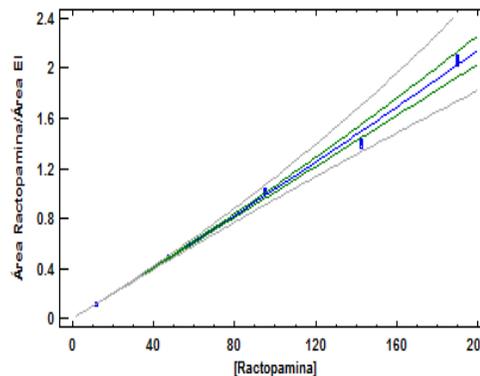
Regresión Simple - Area vs. [racto]

Variable dependiente: Área
Variable independiente: [racto]

Doble Recíproco: $Y = 1/(a+b/X)$

Gráfico del Modelo Ajustado

Área Ractopamina/Área EI = $1/(-0.0316644 + 99.8401/[Ractopamina])$



Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	53.8033	1	53.8033	42338.13	0.0000
Residuo	0.0139788	11	0.0012708		
Total (Corr.)	53.8173	12			

Coefficiente de Correlación = 0.99987

R-cuadrada = 99.974 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9717 por ciento

Error estándar del est. = 0.0356483

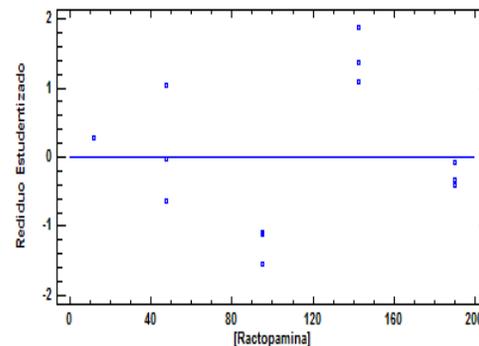
Error absoluto medio = 0.0271625

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	53.8033	1	53.8033	42338.13	0.0000
Residuo	0.0139788	11	0.0012708		
Carencia de Ajuste	0.0118749	3	0.00395829	15.05	0.0012
Error Puro	0.00210393	8	0.000262992		
Total (Corr.)	53.8173	12			

Gráfico de Residuos

Área Ractopamina/Área EI = $1/(-0.0316644 + 99.8401/[Ractopamina])$



Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Doble Inverso	0.9999	99.97%
Multiplicativa	0.9987	99.74%
Raíz Cuadrada Doble	0.9973	99.45%
Lineal	0.9955	99.11%

		Predicciones	Residuos
Fila	X	Y	Residuos Studentizados

Ilustración 0-2 Modelo doble recíproco sin residuos atípicos curva de calibración del sistema para ractopamina

Una vez quitado los residuos atípicos podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es mayor al modelo lineal de 0.993384 a 0.99974 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 15.05$ comparando con el modelo lineal disminuyó el valor drásticamente de 65.28 a 15.05; sin embargo aun no cumple con la prueba de hipótesis: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 15.05 > 3.708$ No hay ajuste al modelo.

Modelo multiplicativo:

Coefficientes

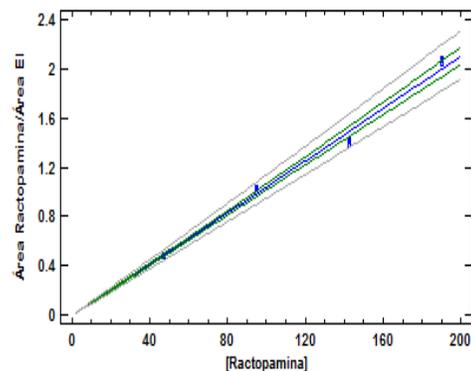
	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-4.64512	0.0457921	-101.439	0.0000
Pendiente	1.01696	0.0105671	96.2377	0.0000

Regresión Simple - Area vs. [racto]

Variable dependiente: Área
Variable independiente: [racto]

Multiplicativo: $Y = a * X^b$

Gráfico del Modelo Ajustado
 $\text{Área Ractopamina}/\text{Área EI} = \exp(-4.64512 + 1.01696 * \ln([\text{Ractopamina}]))$



NOTA: intercepto = ln(a)

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	15.1639	1	15.1639	9261.70	0.0000
Residuo	0.0212844	13	0.00163726		
Total (Corr.)	15.1851	14			

Coefficiente de Correlación = 0.999299

R-cuadrada = 99.8598 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.8491 por ciento

Error estándar del est. = 0.0404631

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	15.1639	1	15.1639	9261.70	0.0000
Residuo	0.0212844	13	0.00163726		
Carencia de Ajuste	0.0197253	3	0.0065751	42.17	0.0000
Error Puro	0.00155914	10	0.000155914		
Total (Corr.)	15.1851	14			

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Doble Inverso	0.9999	99.97%
Multiplicativa	0.9993	99.86%
Raíz Cuadrada Doble	0.9982	99.65%
Lineal	0.9967	99.34%

Residuos Atípicos

			Predicciones	Residuos	Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados
12	142.5	1.3769	1.48931	-0.112411	-2.39

Gráfico de Residuos
 $\text{Área Ractopamina}/\text{Área EI} = \exp(-4.64512 + 1.01696 * \ln([\text{Ractopamina}]))$

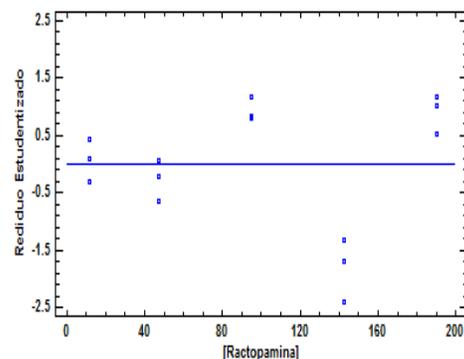


Ilustración 0-3 Modelo multiplicativo curva de calibración del sistema para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es mayor al modelo lineal de 0.993384 a 0.998728 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven heterocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 42.17$ comparando con el modelo lineal disminuyo el valor de 65.28 a 42.17; con lo cual no cumple con la prueba de hipótesis: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 42.17 > 3.708$ No hay ajuste al modelo. Y tiene residuos atípicos menores a 3 con lo cual se prosigue a quitarlo.

Coefficientes

	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-4.67929	0.0174573	-268.042	0.0000
Pendiente	1.0302	0.00416777	247.183	0.0000

NOTA: intercepto = ln(a)

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	13.3462	1	13.3462	61099.60	0.0000
Residuo	0.00196591	9	0.000218434		
Total (Corr.)	13.3482	10			

Coefficiente de Correlación = 0.999926

R-cuadrada = 99.9853 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9836 por ciento

Error estándar del est. = 0.0147795

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	13.3462	1	13.3462	61099.60	0.0000
Residuo	0.00196591	9	0.000218434		
Carencia de Ajuste	0.00117927	2	0.000589636	5.25	0.0405
Error Puro	0.000786635	7	0.000112376		
Total (Corr.)	13.3482	10			

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Multiplicativa	0.9999	99.99%
Doble Inverso	0.9999	99.98%
Raiz Cuadrada Doble	0.9999	99.98%
Lineal	0.9998	99.97%

Residuos Atípicos

Fila	X	Y	Predicciones	Residuos	Residuos Studentizados
				Residuos	Studentizados

Regresión Simple - Area vs. [racto]

Variable dependiente: Area

Variable independiente: [racto]

Multiplicativo: $Y = a \cdot X^b$

Gráfico del Modelo Ajustado

Área Ractopamina/Área EI = $\exp(-4.67929 + 1.0302 \cdot \ln([Ractopamina]))$

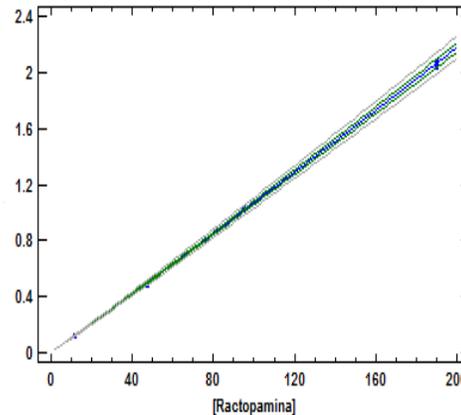


Gráfico de Residuos

Área Ractopamina/Área EI = $\exp(-4.67929 + 1.0302 \cdot \ln([Ractopamina]))$

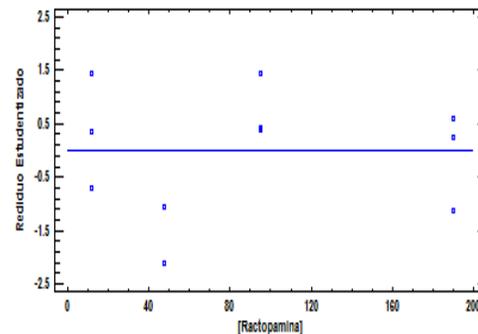


Ilustración 0-4 Modelo multiplicativo sin residuos atípicos curva de calibración del sistema para ractopamina

Una vez quitado los residuos atípicos podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es mayor al modelo lineal de 0.993384 a 0.99853 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 5.25$ comparando con el modelo lineal disminuyó el valor drásticamente de 65,28 a 5.25 aunque aumento con respecto al que tenía residuos; sin embargo aun no cumple con la prueba de hipótesis: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 5.25 > 3.708$ No hay ajuste al modelo.

Modelo polinomial orden 2:

Parámetro	Estimado	Error		Estadístico	Valor-P
		Estándar	T		
CONSTANTE	0.0248049	0.037528	0.660971	0.5211	
[Ractopamina]	0.00915031	0.000919795	9.9482	0.0000	
[Ractopamina] ²	0.00000750284	0.00000442561	1.69532	0.1158	

Regresión Polinomial - Área vs. [racto]

Variable dependiente: Área
Variable independiente: [racto]

Orden del polinomio: 2

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6.97231	2	3.48615	1118.18	0.0000
Residual	0.0374126	12	0.00311772		
Total (Corr.)	7.00972	14			

R-cuadrada = 99.4663 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.3773 por ciento

Error estándar del est. = 0.0558365

Error absoluto medio = 0.0392288

ANOVA para las Variables según Orden de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
[Ractopamina]	6.96335	1	6.96335	2233.48	0.0000
[Ractopamina] ²	0.00896069	1	0.00896069	2.87	0.1158
Modelo	6.97231	2			

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	6.97231	2	3.48615	1118.18	0.0000
Residual	0.0374126	12	0.00311772		
Carencia de Ajuste	0.0351596	2	0.0175798	78.03	0.0000
Error Puro	0.00225299	10	0.000225299		
Total (Corr.)	7.00972	14			

Intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
CONSTANTE	0.0248049	0.037528	-0.0569617	0.106572
[Ractopamina]	0.00915031	0.000919795	0.00714624	0.0111544

Residuos Atípicos

Fila	Y	Predicha	Residuos	Residuos Estudentizados
12	1.3769	1.48108	-0.104178	-2.36

Gráfica del Modelo Ajustado

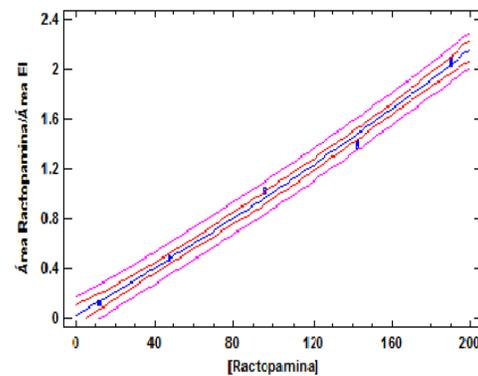


Gráfico de Residuos

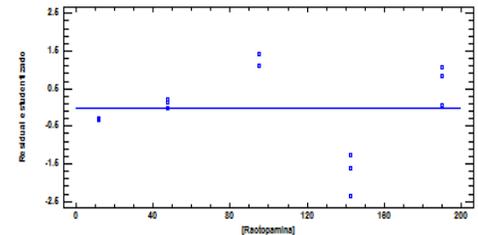


Ilustración 0-5 Modelo polinomial orden 2 curva de calibración del sistema para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es mayor al modelo lineal de 0.993384 a 0.994663 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 78.03$ comparando con el modelo lineal aumentó el valor de 65.28 a 78.03; y no cumple con la prueba de hipótesis: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 78.03 > 3.708$ No hay ajuste al modelo por lo que se descarta este modelo.

Ractopamina (Método)

Modelo multiplicativo:

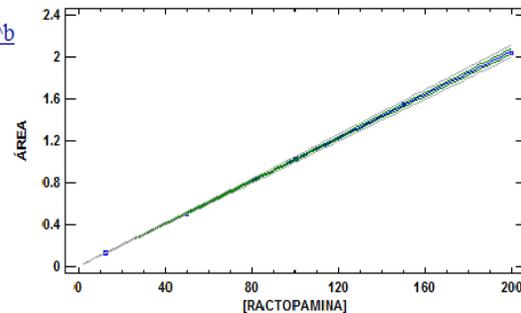
Coefficientes

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	Valor-P
Intercepto	-4.63597	0.014183	-326.867	0.0000
Pendiente	1.01124	0.00341523	296.099	0.0000

Regresión Simple - AREA vs. [RACTOPAMINA]

Variable dependiente: AREA
Variable independiente: [RACTOPAMINA]

Gráfico del Modelo Ajustado
 $AREA = \exp(-4.63597 + 1.01124 \cdot \ln([RACTOPAMINA]))$



NOTA: intercepto = $\ln(a)$

Multiplicativo: $Y = a \cdot X^b$

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11.6108	1	11.6108	87674.47	0.0000
Residuo	0.0013243	10	0.00013243		
Total (Corr.)	11.6121	11			

Coefficiente de Correlación = 0.999943

R-cuadrada = 99.986 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.L.) = 99.9875 por ciento

Error estándar del est. = 0.0115078

Error absoluto medio = 0.00878188

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11.6108	1	11.6108	87674.47	0.0000
Residuo	0.0013243	10	0.00013243		
Carencia de Ajuste	0.000854623	3	0.000284874	4.25	0.0526
Error Puro	0.00046968	7	0.0000670972		
Total (Corr.)	11.6121	11			

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Multiplicativa	0.9999	99.99%
Raíz Cuadrada Doble	0.9999	99.99%
Lineal	0.9999	99.99%

Residuos Atípicos

Fila	X'	Y	Predicciones	Residuos	Studentizados
4	50.0	0.4952	0.50664	-0.0114404	-2.61

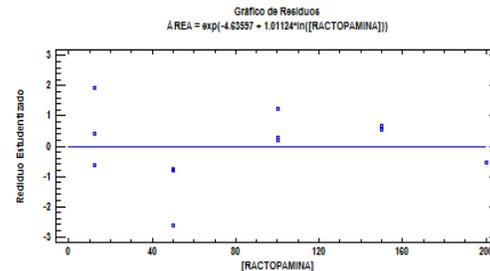


Ilustración 0-6 Modelo multiplicativo curva de calibración del método para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es igual al modelo lineal de 0.9999 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 4.25$ comparando con el modelo lineal disminuyó el valor de 10.92 a 4.25; con lo que cumple con la prueba de hipótesis: $H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 4.25 < 4.347$ Por lo que hay ajuste al modelo.

Modelo doble raíz cuadrada:

Coefficientes

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	-0.00954069	0.00340273	-2.80384	0.0187
Pendiente	0.102118	0.000375102	272.24	0.0000

Regresión Simple - AREA vs. [RACTOPAMINA]

Variable dependiente: AREA
Variable independiente: [RACTOPAMINA]

RAIZ DOBLE CUADRADA:

$$Y=(a+b*\sqrt{X})^2$$

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.52807	1	1.52807	74114.39	0.0000
Residuo	0.000206177	10	0.0000206177		
Total (Corr.)	1.52828	11			

Coefficiente de Correlación = 0.999933

R-cuadrada = 99.9865 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9852 por ciento

Error estándar del est. = 0.00454067

Error absoluto medio = 0.00343062

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.52807	1	1.52807	74114.39	0.0000
Residuo	0.000206177	10	0.0000206177		
Carencia de Ajuste	0.00016305	3	0.0000543499	8.82	0.0089
Error Puro	0.0000431275	7	0.00000616107		
Total (Corr.)	1.52828	11			

Comparación de Modelos Alternos

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Multiplicativa	0.9999	99.99%
Raíz Cuadrada Doble	0.9999	99.99%
Lineal	0.9999	99.99%

Residuos Atípicos

Fila	X	Y	Predicciones	Residuos	Residuos Studentizados
4	50.0	0.4952	0.507713	-0.0125125	-2.54

Gráfico del Modelo Ajustado
ÁREA = (-0.00954069 + 0.102118*sqrt([RACTOPAMINA]))^2

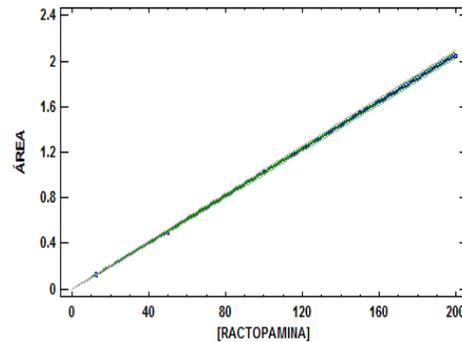


Gráfico de Residuos
ÁREA = (-0.00954069 + 0.102118*sqrt([RACTOPAMINA]))^2

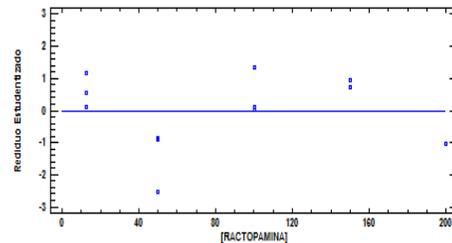


Ilustración 0-7 Modelo doble raíz cuadrada curva de calibración del método para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es igual al modelo lineal de 0.9999 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 8.82$ comparando con el modelo lineal disminuyó el valor de 10.92 a 8.82; pero cumple con la prueba de hipótesis: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 8.82 > 4.347$ por lo que no hay ajuste al modelo.

Modelo polinomial orden 2:

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-0.0093623	0.00581624	-1.60968	0.1419
[RACTOPAMINA]	0.0103807	0.000146215	70.9957	0.0000
[RACTOPAMINA] ²	-2.87523E-7	7.30424E-7	-0.393638	0.7030

Regresión Polinomial - ÁREA versus [RACTOPAMINA]

Variable dependiente: ÁREA
Variable independiente: [RACTOPAMINA]

Orden del polinomio: 2

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.44645	2	2.22322	31517.36	0.0000
Residual	0.000634857	9	0.0000705396		
Total (Corr.)	4.44708	11			

R-cuadrada = 99.9857 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.9826 por ciento
Error estándar del est. = 0.00839879
Error absoluto medio = 0.00651377

ANOVA para las Variables según Orden de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
[RACTOPAMINA]	4.44644	1	4.44644	63034.56	0.0000
[RACTOPAMINA] ²	0.0000109302	1	0.0000109302	0.15	0.7030
Modelo	4.44645	2			

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.44645	2	2.22322	31517.36	0.0000
Residual	0.000634857	9	0.0000705396		
Carencia de Ajuste	0.000521139	2	0.000260569	16.04	0.0024
Error Puro	0.000113718	7	0.0000162455		
Total (Corr.)	4.44708	11			

Intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	Error		
		Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
CONSTANTE	-0.0093623	0.00581624	-0.0225196	0.00379498
[RACTOPAMINA]	0.0103807	0.000146215	0.0100499	0.0107114
[RACTOPAMINA] ²	-2.87523E-7	7.30424E-7	-0.00000193986	0.00000136481

Residuos Atípicos

Fila	Y	Y Predicha	Residuos	Residuos Estudentizados
4	0.4952	0.508952	-0.013752	-2.03
12	2.0469	2.05527	-0.00836924	-3.16

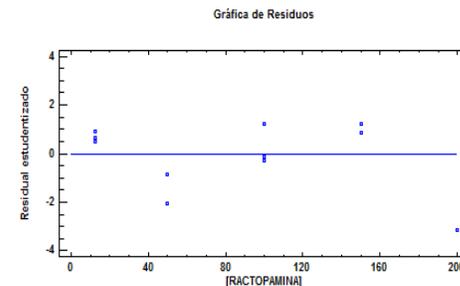
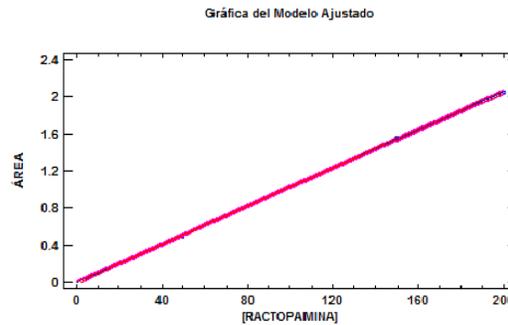


Ilustración 0-8 Modelo polinomial orden 2 curva de calibración del método para ractopamina

Como podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es igual al modelo lineal 0.9999 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 16.04$ comparando con el modelo lineal aumentó el valor de 10.92 a 16.04; por lo que no cumple con la prueba de hipótesis de H_0 , cumpliendo con: $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 16.04 > 4.347$ Por lo que hay falta de ajuste sin embargo posee un dato atípico (residual 3.16) el cual se descarta y se recalcula el modelo siguiente:

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
CONSTANTE	-0.000878084	0.00195772	-0.448523	0.6695
[RACTOPAMINA]	0.0100052	0.0000666783	150.053	0.0000
[RACTOPAMINA]^2	0.00000221313	4.08831E-7	5.41331	0.0016

Regresión Polinomial - ÁREA versus [RACTOPAMINA]

Variable dependiente: ÁREA
Variable independiente: [RACTOPAMINA]

Orden del polinomio: 2

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2.71498	2	1.35749	221427.50	0.0000
Residual	0.0000367838	6	0.00000613064		
Total (Corr.)	2.71502	8			

R-cuadrada = 99.9986 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.9982 por ciento
Error estándar del est. = 0.00247601
Error absoluto medio = 0.00179387

ANOVA para las Variables según Orden de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
[RACTOPAMINA]	2.7148	1	2.7148	442825.70	0.0000
[RACTOPAMINA]^2	0.000179652	1	0.000179652	29.30	0.0016
Modelo	2.71498	2			

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2.71498	2	1.35749	221427.50	0.0000
Residual	0.0000367838	6	0.00000613064		
Carencia de Ajuste	0.0000294688	1	0.0000294688	20.14	0.0065
Error Puro	0.000007315	5	0.000001463		
Total (Corr.)	2.71502	8			

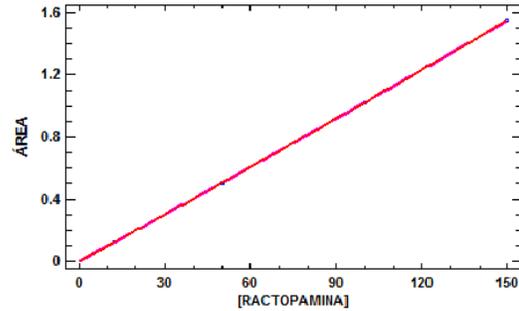
Intervalos de confianza del 95.0% para los coeficientes estimados

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Limite Inferior	Limite Superior
CONSTANTE	-0.000878084	0.00195772	-0.00566847	0.0039123
[RACTOPAMINA]	0.0100052	0.0000666783	0.00984209	0.0101684
[RACTOPAMINA]^2	0.00000221313	4.08831E-7	0.00000121275	0.0000032135

Residuos Atípicos

Fila	Y	Predicha	Residuos	Estudentizados
------	---	----------	----------	----------------

Gráfica del Modelo Ajustado



Gráfica de Residuos

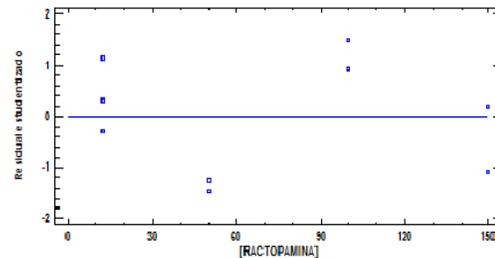


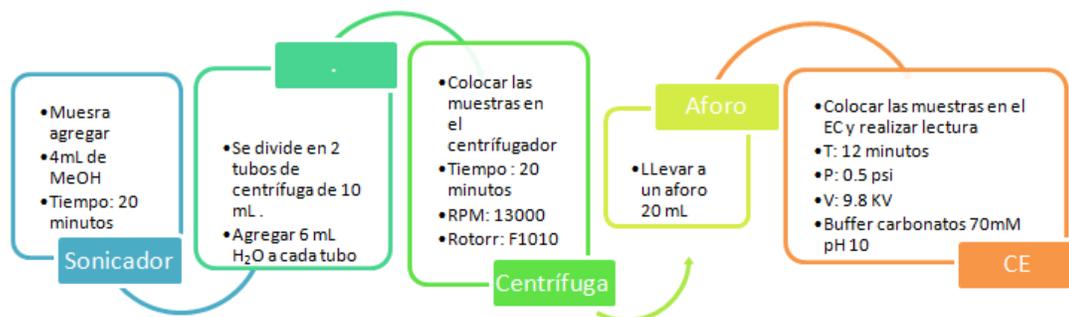
Ilustración 0-9 Modelo polinomial orden 2 sin residuos atípicos curva de calibración del método para ractopamina

Una vez eliminados los residuos atípicos podemos observar el coeficiente de determinación (r^2) es igual al del modelo lineal de 0.9999 en cuanto al gráfico de los residuales, los datos se ven con tendencia homocedásticos teniendo un valor de $F_{Exp} = 20.14$ comparando con el modelo lineal aumentó el valor de 10.92 a 20.14; por lo que no cumple con H_0 , sino con $H_1 = F_{Exp} > F_{Tablas} = 20.14 > 6.608$ por lo que hay falta de ajuste al modelo.

Anexo 11: Detalle del procedimiento y cuantificación de las muestras analizadas por EC con el método analítico para el control de calidad de la ractopamina

Las muestras tuvieron el siguiente procedimiento para cada una de ellas, mostrado en el siguiente esquema (Anexo 11. Tabla 1), cada muestra se lleva a un aforo de 20 mL.

Anexo 11. Tabla 1 Procedimiento de las muestras analizadas por electroforesis capilar con el método analítico para el control de calidad de la ractopamina



La cuantificación de la ractopamina se llevó a cabo por la interpolación de las señales obtenidas por EC, de tal forma que a partir de la ecuación de la curva de calibración (Ecuación 3) obtenemos la concentración de la ractopamina (Ecuación 4).

$$\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}} = b_0 + b_1 [Ractopamina] \dots \dots \dots (3)$$

Donde: A: Área B₀= intercepto B₁= pendiente

$$[Ractopamina] = \frac{\left(\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}}\right) - b_0}{b_1} \dots \dots \dots (4)$$

De esta forma con las ecuaciones de las curvas de calibración del sistema y método mostradas en la tabla Anexo 11 Tabla 2 se muestran las cantidades obtenidas de ractopamina para cada muestra

Anexo 11. Tabla 2 Ecuaciones de las curvas de calibración de sistema y método respectivamente

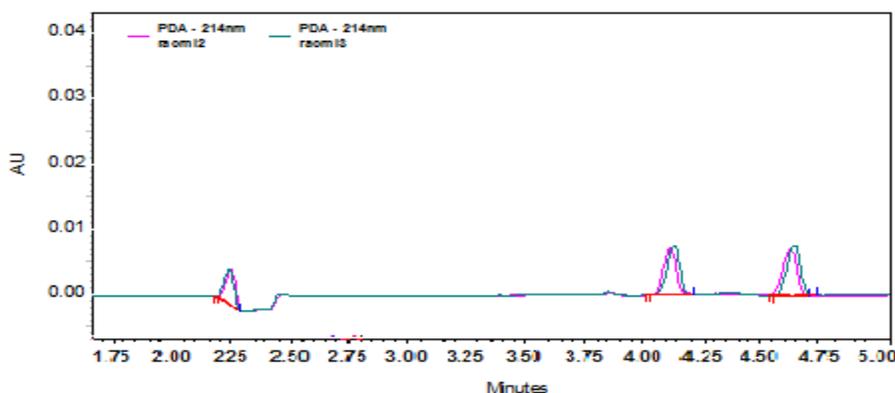
Curva de calibración	Ecuación
Sistema	$\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}} = -0.0206185 \pm 0.06074379393 + 0.010662 \pm 0.000521424 [Ractopamina]$
Método	$\frac{A_{Ractopamina}}{A_{3-aminofenol}} = -0.0077635 \pm 0.009130501054 + 0.0103254 \pm 0.0000901961 [Ractopamina]$

Racmina premix

La cuantificación de la ractopamina en la muestra Racmina premix, se utilizó como estándar interno al 3-aminofenol de 25.5 mg/L de concentración y cuyo pico se registro al minuto promedio de 4.6417 con un área de 23267.67 y una altura de 7082.67 como podemos observar los resultados en la tabla Anexo 11 Tabla 3 y en la Figura Anexo 11 Figura 1.

Anexo 11. Tabla 3 Datos de la ractopamina presente en la muestra Racmina premix

Muestra	Ractopamina			El 3-aminofenol			Relación
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	
Racmina Premix	4.283	20184	6512	4.625	21891	6622	0.922
	4.212	21433	7088	4.642	23412	6999	0.9155
	4.229	22035	7518	4.658	24500	7627	0.8994
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	Relación
\bar{X}	4.24133333	21217.3333	7039.33333	4.64166667	23267.6667	7082.66667	0.9123
S	0.037072	944.158002	504.76265	0.01650253	1310.47485	507.697088	0.0116
CV	0.87406481	4.44993717	7.17060305	0.35553016	5.63217133	7.16816295	1.2767



Anexo 11. Figura 1 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Racmina premix condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo

Mediante las ecuaciones de las curvas de calibración mostradas en la tabla Anexo 12 Tabla 2 y mediante la ecuación (4) despejamos la concentración de ractopamina y se sustituyen los valores de la relación de Áreas de $A_{\text{ractopamina}}/A_{\text{E.I.}}$.

En la tabla Anexo 11 Tabla 4 podemos observar las concentraciones de la ractopamina presente en la Racmina premix, además de los gramos de ractopamina obtenidos por cada 100 g de la muestra: Racmina premix tratada, sabiendo que esta contiene el 10 % de ractopamina.

Anexo 11. Tabla 4 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Racmina Premix

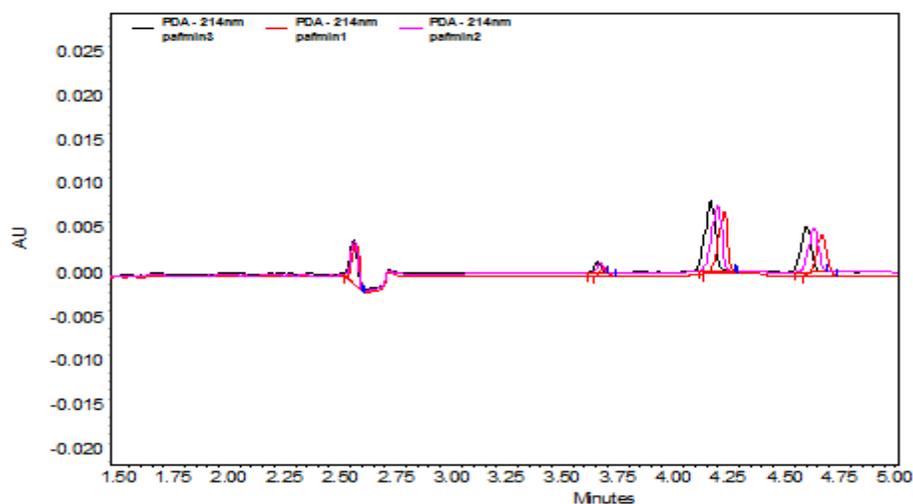
Curva utilizada	$A_{\text{Ractopamina}}/A_{\text{3-aminofenol}}$	[Ractopamina] mg/L	mg Ractopamina/100 g muestra
Sistema	0.9220	88.4113	8.8411
	0.9155	87.7968	8.7797
	0.8994	86.2883	8.6288
Método	0.9220	90.0484	9.0048
	0.9155	89.4139	8.9414
	0.8994	87.8563	8.7856

Pafmine

La cuantificación de la ractopamina en la muestra Pafmine, se utilizó como estándar interno al 3-aminofenol de 25.5 mg/L de concentración y cuyo pico se registro al minuto 4.6083 con un área de 25083.67 y una altura de 4919.67. Como podemos ver los resultados mostrados en la tabla **Anexo 11 Tabla 5** y en la figura **Anexo 11.Figura 2**.

Anexo 11. Tabla 5 Datos de la ractopamina presente en la muestra Pafmine

Muestra	Ractopamina			El 3-aminofenol			Relación
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	
pafmine	4.237	21130	7059	4.575	23542	4589	A _{ractopamina} /A _E
	4.208	23497	7529	4.642	25889	4968	0.8975
	4.279	22839	7958	4.608	25820	5202	0.8845
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	Relación
\bar{X}	4.24133333	22488.6667	7515.33333	4.60833333	25083.6667	4919.66667	0.8966
S	0.03569781	1221.77016	449.655794	0.03350124	1335.56817	309.345007	0.0116
CV	0.84166471	5.43282615	5.98317831	0.72697093	5.3244535	6.28792615	1.2894



Anexo 11. Figura 2 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Pafmine condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo

Mediante las ecuaciones de las curvas de calibración mostradas en la tabla **Anexo 11 Tabla 2** y mediante la ecuación (4) despejamos la concentración de ractopamina y se sustituyen los valores de la relación de Áreas de $A_{\text{ractopamina}}/A_{\text{E.I.}}$

En la tabla **Anexo 11 Tabla 6** podemos observar las concentraciones de la ractopamina presente en la muestra Pafmine, además de los gramos de ractopamina obtenidos por cada 100 g de la muestra: Pafmine tratada, sabiendo que la muestra Pafmine contiene el 2 % de ractopamina.

Anexo 11. Tabla 6 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Pafmine.

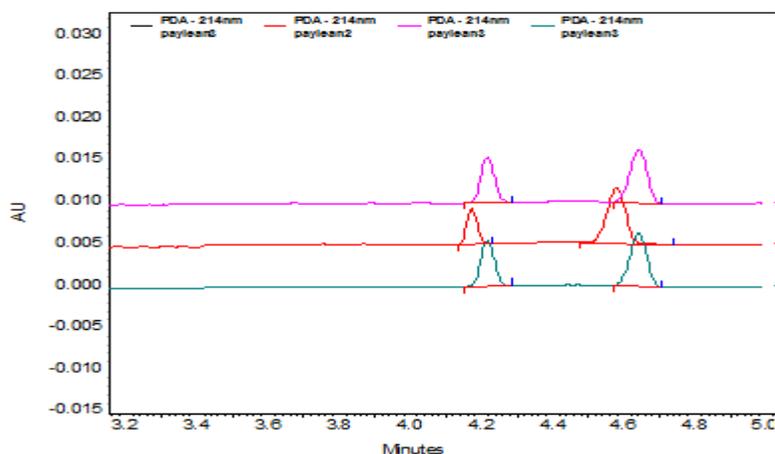
Curva utilizada	$A_{\text{Ractopamina}}/A_{\text{3-aminofenol}}$	[Ractopamina] mg/L	mg Ractopamina/100 g muestra
Sistema	0.8975	86.1155	1.7223
	0.9076	87.0591	1.7412
	0.8845	84.8964	1.6979
Método	0.8975	87.6778	1.7536
	0.9076	88.6522	1.7730
	0.8845	86.4190	1.7284

Paylean

La cuantificación de la ractopamina en la muestra paylean, se utilizó como estándar interno al 3-aminofenol de 25.5 mg/L de concentración y cuyo pico se registro al minuto 4.6307 con un área de 19013.67 y una altura de 6194.67 como podemos observar los resultados mostrados en la tabla **Anexo 11 Tabla 7** y en la figura **Anexo 11. Figura 3**.

Anexo 11. Tabla 7 Datos de la ractopamina presente en la muestra Paylean

Muestra	Ractopamina			El ₃ -aminofenol			Relación
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	
Paylean	4.217	14412	4896	4.646	19026	6206	0.7575
	4.233	13781	4371	4.642	18667	6016	0.7383
	4.279	14549	5429	4.604	19348	6362	0.7520
	T _M	Área	Altura	T _M	Área	Altura	Relación
	\bar{X}	4.243	14247.3333	4898.66667	4.63066667	19013.6667	6194.66667
S	0.03218695	409.624625	529.005041	0.02318045	340.667482	173.278196	0.0099
CV	0.75858953	2.8750968	10.7989597	0.50058562	1.79169798	2.79721583	1.3218



Anexo 11. Figura 3 Electroferograma de la ractopamina en la muestra Paylean condiciones: Capilar de sílice fundida), L.T: 31.5 cm (L.E: 20 cm) 50 μ m de d.i, buffer de carbonatos.70 mM pH: 10.2 3-aminofenol [25.5 ppm] Placebo

Mediante las ecuaciones de las curvas de calibración mostradas en la tabla Anexo 11 Tabla 2 y mediante la ecuación (4) despejamos la concentración de ractopamina y se sustituyen los valores de la relación de Áreas de $A_{\text{ractopamina}}/A_{\text{E.I.}}$.

En la tabla Anexo 11 Tabla 8 podemos observar las concentraciones de la ractopamina presente en la muestra paylean, además de los gramos de ractopamina obtenidos por cada 100 g de la muestra: paylean tratada, sabiendo que la muestra paylean contiene el 2 % de ractopamina.

Anexo 11. Tabla 8 Datos de la cuantificación de la ractopamina presente en la muestra Paylean

Curva utilizada	$A_{\text{Ractopamina}}/A_{3\text{-aminofenol}}$	[Ractopamina] mg/L	mg Ractopamina/100 g muestra
Sistema	0.7575	72.9796	1.4596
	0.7383	71.1755	1.4235
	0.7520	72.4613	1.4492
Método	0.7575	74.1137	1.4823
	0.7383	72.2508	1.4450
	0.7520	73.5785	1.4716