



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

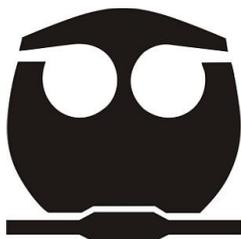
**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
TETRACICLINA PRESENTE EN LECHE
EMPLEANDO ESPECTROSCOPIA DE
UV-VIS E INFRARROJO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

JESICA NAVARRO TALAVERA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. C. LUCIA CORNEJO BARRERA
VOCAL: DR. PANDIYAN THANGARASU
SECRETARIO: M. C. JUAN CARLOS RAMÍREZ OREJEL
1er SUPLENTE: DR. LUIS ALEJANDRO DÍAZ FLORES
2° SUPLENTE: DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 114 Y 117, EDIFICIO F. FACULTAD DE QUÍMICA. CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA: DR. PANDIYAN THANGARASU _____
SUPERVISOR TÉCNICO: M. C. EVA MARINA BRIZ LÓPEZ _____
SUSTENTANTE: JESICA NAVARRO TALAVERA _____

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
GLOSARIO	IV
ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 2 -
1. ANTECEDENTES	- 5 -
1.1 ESTRUCTURA DE LA TETRACICLINA	- 13 -
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS TETRACICLINAS	- 14 -
1.2.1. Clasificación por Generación	- 15 -
1.2.2. Clasificación de acuerdo a su naturaleza y síntesis	- 15 -
1.2.3. Clasificación según su farmacocinética	- 16 -
1.3. ABSORCIÓN	- 16 -
1.4. DIFUSIÓN	- 17 -
1.5. EXCRESIÓN	- 18 -
1.6. MECANISMO DE ACCIÓN	- 18 -
1.7. CALIDAD DE LA LECHE	- 19 -
1.7.1. Composición de la leche	- 19 -
1.7.2. Pruebas de plataforma y de laboratorio	- 20 -
1.7.3. Pruebas microbiológicas	- 25 -
1.8. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	- 28 -
1.8.1. Espectroscopia de UV-Vis	- 28 -
1.8.2. Espectroscopia Infrarroja	- 29 -
2. JUSTIFICACIÓN	- 30 -
3. HIPÓTESIS	- 30 -

4.	OJETIVOS	- 31 -
4.1.	OBJETIVO GENERAL	- 31 -
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	- 31 -
5.	MATERIALES	- 33 -
5.1.	MUESTRA BLANCO	- 33 -
5.2.	DISOLVENTES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	- 33 -
5.3.	EQUIPO, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	- 34 -
6.	METODOLOGÍA	- 35 -
6.1.	METODOLOGÍA PARA LAS PRUEBAS DE CALIDAD DE LA LECHE	- 35 -
6.2.	METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE	- 37 -
6.3.	METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TETRACICLINA EN LECHE	- 39 -
6.3.1.	Caracterización y estandarización del método y límites de detección	- 39 -
6.3.2.	Muestra blanco y contaminación de la muestra	- 39 -
6.3.3.	Identificación y cuantificación de tetraciclina	- 40 -
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 41 -
7.1.	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE	- 41 -
7.2.	DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA	- 47 -
7.3.	DETERMINACIÓN DE TETRACICLINA	- 52 -
7.3.1.	Curvas de calibración de estándares	- 53 -
7.3.2.	Validación del método	- 55 -
7.3.2.1.	Reproducibilidad del método	- 55 -
7.3.3.	Recuperación de tetraciclina en muestras de leche contaminadas (expresado en %) - 64	- 64 -
7.3.3.1.	Leche UHT	- 65 -
7.3.3.2.	Leche bronca	- 65 -
7.3.4.	Identificación con espectroscopia Infrarroja (IR)	- 66 -
8.	CONCLUSIONES	- 71 -
9.	ANEXOS	- 72 -
	ANEXO 1	- 72 -
	ANEXO 2	- 72 -
	ANEXO 3	- 73 -

GLOSARIO

PALABRA	DEFINICIÓN
ABSORBANCIA	Medida de la cantidad de luz absorbida por una solución a una longitud de onda. Se mide con un colorímetro o con un espectrómetro.
BLANCO DE MUESTRA	Son matrices que no contienen el analito de interés. Son difíciles de obtener pero son necesarios para estimar las interferencias que pudieran encontrarse durante el análisis de las muestras de prueba.
CALIDAD	El grado de satisfacción que ofrecen las características del producto con relación a las exigencias del consumidor.
CURVA DE CALIBRACIÓN	Es la representación gráfica de la señal medida como una función de cantidad del analito.
ESPECTROSCOPIA	La espectroscopia es una técnica instrumental de análisis que se basa en la absorción de radiación por parte de las moléculas que absorben radiación electromagnética.
LONGITUD DE ONDA	Distancia existente entre dos crestas o valles consecutivos. Se representa con la letra griega “ λ ”.
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

RECUPERACIÓN

Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje.

SANIDAD

Engloba a todas las instituciones federales y estatales encargadas de proveer servicios que satisfagan las necesidades de prevención, diagnóstico, tratamiento y recuperación de las personas y, en el caso del sector agropecuario, también de animales y cultivos.

UHT (Ultra High Temperature)

Proceso al cual es sometido el producto a una adecuada relación de temperatura y tiempo, envasado asépticamente para garantizar la esterilidad comercial.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
CV	Coefficiente de Variación
°C	Grados Celsius
DS	Desviación Estándar
EtOH	Etanol
HCl	Ácido Clorhídrico
IR	Infrarrojo
λ	Longitud de onda
mg	miligramo
mL	mililitro
μ g	microgramo
nm	nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
UV-Vis	UV-Visible

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Nombre	Página
1.1	Sustituyentes en el núcleo cilopentanoperhidrofenantraceno	25
1.2	Clasificación de tetraciclinas según su generación	26
1.3	Clasificación de tetraciclinas de acuerdo a su naturaleza y síntesis	27
1.4	Farmacocinética de las tetraciclinas	27
1.5	Clasificación de las leches con base al tiempo de reducción del azul de metileno. (Temperatura 37°C)	34
1.6	Categoría de las leches con base a las características organolépticas después de incubación. (37°C/24h)	35
1.7	Microorganismos indicadores y patógenos involucrados en leche	38
1.8	Regiones de UV-Visible	39
1.9	Regiones de IR	40
7.1	Características organolépticas de muestras de leche vs normatividad vigente	52
7.2	Análisis químico proximal de las muestras de leche UHT y bronca	53
7.3	Análisis de varianza del análisis químico proximal de las muestras de leche	54
7.4	Calidad de leche UHT y bronca y su comparación con la normatividad	55
7.5	Análisis de varianza de la calidad de las muestras de leche	55
7.6	Determinación de microorganismos indicadores y patógenos	58
7.7	Ecuaciones del comportamiento lineal de la tetraciclina	66
7.8	Límites de detección y de cuantificación de la tetraciclina	66
7.9	Longitud de onda de tetraciclina experimental vs reportada	70
7.10	Reproducibilidad de la tetraciclina en las muestras de leche	71
7.11	Control Levey-Jennings de los extractos de tetraciclina de las muestras de leche UHT y Bronca	72
7.12	Control Levey-Jennings de las diluciones de los extractos de tetraciclina de las muestras de leche UHT y Bronca	72
7.13	Porcentaje de recuperación de la tetraciclina (TC) en leche UHT	76
7.14	Porcentaje de recuperación de la tetraciclina (TC) en leche UHT	76

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Nombre	Página
1.1	Resistencia antimicrobiana en la cadena alimenticia	17
1.2	Análisis de redundancia parcial que diferencia el efecto de las concentraciones de antibióticos y metales en la alimentación porcina, la composición de la comunidad microbiana del intestino porcino y los elementos genéticos móviles en los perfiles generales de ARG	21
1.3	Estructura de cilopentanoperhidrofenantraceno	24
1.4	Estructura de las Tetraciclinas	25
1.5	Mecanismo de acción de la Tetraciclina. 1. Sitio donador 2. Peptidación 3. Liberación 4. Translocación	30
1.6	Espectro Electromagnético. λ en metros	40
5.1	Diagrama de experimentación de tetraciclina en leche	43
6.1	Metodología para pruebas de plataforma y pruebas de laboratorio en muestras de leche	46
6.2	Metodología para pruebas microbiológicas de Mesófilos aerobios y Coliformes totales y fecales	48
6.3	Metodología para pruebas microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> y Hongos	49
6.4	Metodología para la caracterización, estandarización y determinar límites de detección y para la obtención de la curva patrón	50
6.5	Metodología para la contaminación de las muestras de leche a partir del stock de tetraciclina	51
6.6	Metodología para la determinación y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche	51
7.1	Vertido en placa. Presencia de Mesófilos aerobios en leche bronca.	59
7.2	Tubos positivos. Fase presuntiva de Coliformes totales y fecales en leche bronca.	59
7.3	Tubos positivos. Fase confirmativa de Coliformes totales en leche bronca	60
7.4	Tubos positivos. Fase confirmativa de Coliformes fecales en leche bronca	60
7.5	Agotamiento. Caja representativa para de <i>E. coli</i> en leche bronca	61
7.6	Agotamiento. Cajas representativas para mohos y levaduras en leche bronca	61

7.7	Agotamiento. Cajas representativas para <i>S. aureus</i> en leche bronca	62
7.8	Esquema de pasos representativos de la experimentación de la extracción y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche	63
7.9	Espectro de UV-Vis de los estándares de tetraciclina en etanol	64
7.10	Curva de calibración para la señal de longitud de onda a 235 nm	65
7.11	Curva de calibración para la señal de longitud de onda a 437 nm	65
7.12	Espectro de UV- Vis de la muestra blanco de la leche UHT	67
7.13	Espectro de UV- Vis del extracto de leche UHT	68
7.14	Espectro de UV-Vis de la dilución del extracto de leche UHT	68
7.15	Espectro de UV- Vis de la muestra blanco de la leche Bronca	69
7.16	Espectro de UV- Vis del extracto de leche bronca	69
7.17	Espectro de UV- Vis de la dilución del extracto de leche bronca	70
7.18	Gráfica Levey-Jennings. Precisión de las pruebas del extracto de las muestras de leche	73
7.19	Gráfica Levey-Jennings. Precisión de las pruebas de las disoluciones del extracto de las muestras de leche	73
7.20	Ejemplo de gráfica de Distribución Gaussiana	74
7.21	Espectros IR de tetraciclina y etanol	78
7.22	Espectro IR de Curva de calibración	79
7.23	Espectro IR de los extractos de leche UHT	79
7.24	Espectro IR de diluciones de los extractos de leche UHT	80
7.25	Espectro IR de los extractos de leche bronca	80
7.26	Espectro IR de las diluciones de los extractos de leche bronca	81

RESUMEN

La contaminación de productos lácteos, especialmente la acumulación de antibióticos como la tetraciclina (TC) conlleva riesgos a la salud humana, pudiendo generar al consumidor alergias y resistencia a antibióticos. De tal manera, que la determinación de residuos de antibióticos en los alimentos se convierte en un imperativo. Por lo tanto, la medición exacta de TC en alimentos ayudaría a evitar graves consecuencias clínicas. En el presente trabajo, se determinó el porcentaje de tetraciclinas en muestras de leche de diferente origen (UHT y bronca) mediante el método de Espectroscopia de UV-Visible. Primero, las diferentes muestras de leche se obtienen comercialmente, la leche UHT en distintos meses y diferentes lotes, de locales ubicados en el campus de Facultad de Química, UNAM, y localmente, la leche bronca de un rancho de la Delegación Xochimilco en distintos meses. Segundo, la tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) se obtuvo de Sigma Aldrich (CAS Number: 60-54-8), la cual presenta grado HPLC y 98% de pureza, a continuación, las muestras de leche son contaminadas por el antibiótico y se hace una extracción líquido-líquido con una mezcla de solventes (ácido clorhídrico + acetonitrilo). Posteriormente, a la fase acuosa donde se encuentra el antibiótico disuelto, se purificó mediante una membrana de nylon Millex (poro de $0.45\mu\text{m}$) para clarificación de agua y soluciones orgánicas, empleando como fase móvil etanol. La solución fue detectada por los espectros UV-Visible, y la intensidad de la señal de absorción se transformó a concentración mediante el uso de la ecuación de línea recta ($y = mx + b$). La concentración de tetraciclina extraída de las muestras de leche se comparó con el estándar calibrado y los resultados muestran que la metodología propuesta es capaz de recuperar tetraciclina alrededor 77 a 88% para la primera señal ($\lambda = 280\text{ nm}$) y 11% para la segunda señal ($\lambda = 370\text{ nm}$) y el límite de detección de recuperación de absorbancia de cuantificación fue alrededor de 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Los espectros de IR se utilizan para identificar los grupos funcionales de la tetraciclina.

Palabras claves: leche UHT, leche bronca, tetraciclina, UV-Vis, IR.

INTRODUCCIÓN

La leche es indispensable para el desarrollo humano en las primeras etapas de vida, es un alimento completo y nutrimental porque aporta macro y micronutrientes esenciales. Está constituida por el 87% de agua y 13% de materia seca, de la cual 3% son grasa. El resto, que son sólidos no grasos, se distribuye en lactosa (4.7%), proteínas (3.3%), sustancias minerales (0.65%) y ácidos orgánicos (0.18%) [1]. Por lo anterior, su producción, transporte, procesamiento y conservación requiere una estrategia de seguridad alimentaria para garantizar la inocuidad del producto original y de sus derivados.

La *leche de vaca* para consumo humano¹ – es un producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro, debe ser sometida a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede ser sometida a operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación [2], [3]. Según se define en el Manual de Normas de Control de Calidad de Leche Cruda, la *leche bronca*– es aquella que se obtiene de la secreción natural de las glándulas mamarias, sin calostro y sin sustracción alguna de sus componentes y que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico [4].

Hay dos aspectos importantes en la calidad de la leche: *la sanidad y los residuos de medicamentos*. La *sanidad* de la leche UHT² y sus derivados en una industria láctea depende directamente de la calidad del producto original, la conservación de dicho producto y, en general, la manipulación de la leche antes de llegar a la planta. Esto quiere decir que el éxito, el buen nombre de la industria y, en última instancia, la calidad del producto que llega al consumidor, depende del control que se lleve sobre la leche bronca.

Por su parte, los *residuos de medicamentos* en leche pueden generar un problema posterior a la salud humana, por ejemplo, ocasionando fenómenos de resistencia a antibióticos, reacciones alérgicas y toxicidad aguda o crónica. Por esta razón, se requiere

¹De acuerdo a la NOM-091-SSA1-1994 y a la NOM-155-SCFI-2012.

²El término “UHT” hace referencia a leche -que ya ha pasado por un proceso de ultrapasteurización- por otro lado, “leche bronca” es la leche que proviene directamente de la vaca sin un proceso de pasteurización.

un empleo adecuado de antibióticos en el campo de la veterinaria³, en términos generales, considerando al menos, dos puntos importantes, la aplicación del antibiótico al bovino y la eliminación completa de dicho antibiótico. Esto quiere decir que los residuos de medicamentos no deben superar los LMR y, en general, que es de vital importancia llevar un control adecuado de los residuos médicos en la industria láctea [5], [6].

Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, se convierte en un problema significativo cuando se ve exacerbado por el abuso y el mal empleo de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en la ganadería o la agricultura [7].

Como resultado, existe la necesidad de desarrollar métodos analíticos rápidos, sensibles y de bajo costo para detectar con precisión la tetraciclina dentro de las diferentes matrices alimentarias. Los métodos analíticos actuales se pueden dividir en dos grupos generales, la prueba diagnóstica de cribado y pruebas de confirmación [8]. Los métodos confirmatorios como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV [9], la cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS) [10] y la electroforesis capilar (CE) [9]–[11] han demostrado una alta sensibilidad hacia la doxiciclina⁴ con un alto grado de precisión y exactitud. Sin embargo, estas técnicas a menudo requieren mucho tiempo y son costosas.

Se han descrito muchos métodos analíticos para determinar los residuos de TC en la leche, como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con espectrometría de masas o sensor electroquímico [12]. Los métodos tradicionales para la detección de antibióticos de tetraciclina incluyen inmunización [13], [14], microbiología [15], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [16], espectro de masas (EM) [17], LC-MS [18], [19] etc. Hasta ahora, la detección rápida y precisa de TC se ha logrado mediante diversos métodos instrumentales, como la cromatografía líquida de alto rendimiento [9], la cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas [20], la electroforesis capilar [21], el análisis colorimétrico, la fotografía método electroquímico [22] y fluorescencia [23], [24], [25].

³La Tetraciclina es un antibiótico empleado en el campo de la veterinaria para el tratamiento de los animales.

⁴ Antibiótico basado en la tetraciclina.

Debido a la interferencia de la compleja matriz en las muestras de leche, el análisis de residuos de TC requiere pre-tratamiento de muestra como extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida (SPE) y extracción de fluido supercrítico [21]. SPE es la técnica más común para el pre-tratamiento de la muestra. Los adsorbentes utilizados en SPE son un factor clave que afecta la eficiencia de la extracción. Los adsorbentes comunes de SPE, incluyendo C18, C8⁵ y sílice, tienen falta de selectividad y el alto consumo de solvente [26]–[28]. Sin embargo, estas metodologías inevitablemente tienen algunas desventajas, como instrumentos costosos, pre-tratamiento de la muestra que requiere mucho tiempo, baja selectividad y contaminantes secundarios. Con base en las consideraciones anteriores, es de gran necesidad desarrollar un método simple, rápido, sensible y eficiente para la detección cualitativa y cuantitativa de TC, cuyas características son bajas concentraciones y alta toxicidad. Como se sabe, los sensores químicos y biológicos han sido el punto de mira de la investigación en química, biomedicina y materiales, debido a sus grandes ventajas en la ciencia analítica, como la alta eficiencia, la simplicidad y la sensibilidad [29]–[31]. El núcleo de un sensor químico se encuentra en los sitios de identificación del material, que pueden reconocer y determinar directamente las especies objetivo [32], [33]. Entre los sensores desarrollados actualmente, los sensores de detección fluorescente en particular han mostrado ventajas únicas para la detección molecular debido a su rápida respuesta de señal, bajo costo y fácil operación. Desde el punto de vista de una perspectiva evolutiva más amplia, los sensores de detección de fluorescencia basados en diferentes sondas modificadas, como los nanoclústeres de oro, los puntos cuánticos y los colorantes fluorescentes modificados, se han diseñado para la detección de dianas específicas.

Por lo tanto, es urgente el desarrollo de técnicas de tratamiento eficientes y económicas, así como la mejora de los métodos actuales para la eliminación de tetraciclina (TC).

Por lo cual, el planteamiento de métodos analíticos como la espectroscopia de UV-Vis e Infrarrojo, para la determinación de tetraciclina en leche, permitirá un análisis químico confiable, ya que, mediante la técnica de UV-Vis se pueden detectar las señales de absorción características de la tetraciclina, mientras que la técnica de espectroscopia de infrarrojo nos proporciona información acerca de la estructura química y propiedades físicas de los componentes químicos en las muestras de leche.

⁵ Tipo de columnas para HPLC.

1. ANTECEDENTES

La producción industrial de leche ha ido en incremento principalmente por tres factores: incremento en el nivel adquisitivo de la población, desarrollo de nuevos productos y desarrollo del mercado de exportación. Actualmente, las grandes empresas son las que aportan el mayor volumen en exportación, pero las pequeñas y medianas empresas se están posicionando en el mercado extranjero [34].

La demanda de leche y derivados está generando un cambio en los hábitos de consumo hacia productos que contribuyen a mejorar las condiciones de salud de la población. Estas contribuciones a mejorar la salud, no solamente se relacionan con la producción de lácteos reducidos en grasa o azúcar, sino con la disponibilidad en la ingesta de componentes vitamínicos, pre y probióticos, así como fibra. En general, el avance en la mejora de salud está relacionado con componentes que no proceden directamente de la leche de la vaca, pero que al adicionarlos representan una opción funcional que mejora la dieta de los consumidores de leche y sus derivados [35].

En consecuencia, la calidad de la materia prima es de vital importancia para la obtención de productos inocuos. Debido a esto, asegurar la salud del ganado, es una de las etapas importantes en el proceso de producción de la leche. Por esta razón la administración de antibióticos sin supervisión veterinaria, el uso desmedido de los mismos o el incumplimiento de la eliminación de residuos del antibiótico en el animal, perjudica directamente la sanidad de la leche.

Algunas de las posibles consecuencias del uso de antibióticos en animales son, la generación de bacterias resistentes, que son aquellas bacterias inofensivas para el ganado pero que pueden infectar al hombre y causarle diversas enfermedades o en algunos casos la muerte. La transmisión de determinantes de resistencia⁶ a otras bacterias del entorno y la selección de microorganismos resistentes entre la propia microbiota endógena del individuo a través de la cadena alimentaria [7].

Los animales productores de leche pueden ser portadores de agentes patógenos para los seres humanos. Estos patógenos presentes en la leche pueden aumentar el riesgo de

⁶ Los determinantes de resistencia se encuentran en genes que se localizan normalmente en elementos móviles, como plásmidos, transposones conjugativos e integrones [66].

enfermedades transmitidas por los alimentos. Aunado a esto, las actividades de ordeño, la mezcla posterior de la leche y su almacenamiento entrañan riesgos de contaminación, debido al contacto que se tiene con el hombre o el medio y al riesgo que se tiene de una proliferación de patógenos intrínsecos. Por consiguiente, la aplicación de medidas adecuadas de control de la higiene de la leche y los productos lácteos a lo largo de toda la cadena alimentaria es esencial para garantizar la inocuidad de estos alimentos y su idoneidad para el uso al que se destinan (figura 1.1) [6].

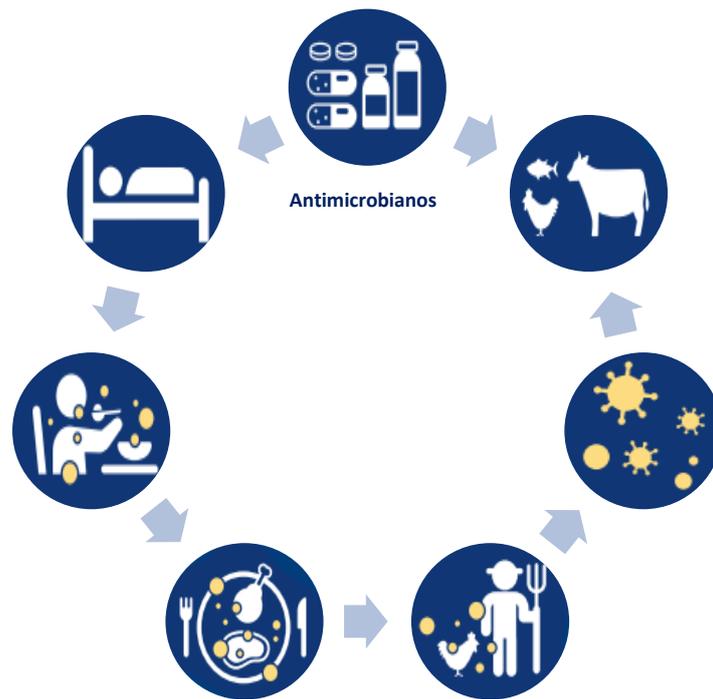


Figura 1.1. Resistencia antimicrobiana en la cadena alimenticia [6].

Existen pruebas que son aplicadas en las industrias lácteas con la finalidad de verificar la calidad sanitaria de la leche bruta como materia prima destinada a la elaboración de otros productos.

Dichas pruebas son métodos de análisis que pueden realizarse en el campo o en la recepción de la planta y son conocidas como pruebas de plataforma; tal es el caso de las determinaciones de temperatura, características organolépticas y prueba lacto métrica

(peso específico), mediante las cuales es posible reconocer algunas leches inaceptables. El resto de las pruebas de calidad se determinan en laboratorio, tales como, pH, acidez titulable, prueba del alcohol y de neutralizantes, prueba de reacción del metileno, lactofermentación, determinación de inhibidores (H_2O_2) y grasa (método de Gerber), con el objeto de determinar leches adulteradas o bien como técnicas rutinarias de control [36], [37].

Además de estas pruebas de calidad sanitarias, es necesario sumar análisis microbiológicos, para establecer el grado de calidad de la leche, ya que se pueden encontrar presente en el producto microorganismos tanto indicadores como patógenos de diferentes grupos: bacterias, hongos (mohos y levaduras) y virus.

En la industria láctea, una de las ramas de producción depende en gran medida de la actividad de los microorganismos deseables que son seleccionados por su habilidad de producir sabor, aroma y acidez en la elaboración de productos. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta las buenas prácticas de manufactura durante la ordeña y en la manipulación de la leche para evitar hasta donde sea posible su contaminación, ya que la presencia de microorganismos indeseables, los cuales, encuentran en la leche un medio favorable para su reproducción, tienen la capacidad de alterar la composición y características organolépticas del producto e incluso enfermedades en el consumidor [38].

La tetraciclina (TC) [39] es uno de los antibióticos de amplio espectro más utilizados en acuicultura y cría de animales [40], ya que puede inhibir eficazmente diversas bacterias y puede utilizarse para tratar enfermedades como la infección del tracto respiratorio superior y gastrointestinal [8], [39], y además, la tetraciclina (TC) inhibe eficazmente la actividad de crecimiento bacteriano contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Por lo tanto, las tetraciclinas (TC`s) se utilizan ampliamente en la práctica veterinaria para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas como resultado de su actividad antibacteriana de amplio espectro y su bajo costo [39]. Además, la TC se usa como aditivo alimentario común en el sector agrícola para promover el crecimiento del ganado [41]. Como resultado, se utiliza comúnmente como medicamento veterinario o aditivo alimenticio, y la cantidad anual de tetraciclina utilizada en la cría de animales y la acuicultura casi alcanza las 2300 toneladas [42]. Por ejemplo, en la acuicultura, el rápido crecimiento del sistema de producción de pescado ha generado preocupaciones sobre la calidad y la seguridad de los peces, ya que está creciendo a nivel

mundial más rápido que cualquier otro sector productor de alimentos para animales [43], [44].

Los antibióticos más utilizados en la acuicultura en todo el mundo son tetraciclina, oxitetraciclina (tetraciclinas), ácido oxolínico, flumequina, sarafloxacin, enrofloxacin (quinolonas), amoxicilina (β -lactama), eritromicina (macrólido), sulfadimetoxina (sulfonamida), ormetoprina (diaminopirimidina) y florfenicol(amphenicol) [20], [21]. Cada país tiene su propia legislación con respecto a la aprobación de antibióticos y concentraciones para su uso en la acuicultura. Sin embargo, el uso de antibióticos debe limitarse tan solo a ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) para evitar impactos adversos importantes en los sistemas biológicos. Por lo tanto, es importante controlar la presencia de antibióticos en los peces para permitir el comercio internacional y proteger a los consumidores de los riesgos para la salud. La presencia de tales residuos en los alimentos puede ser responsable de efectos tóxicos, reacciones alérgicas en individuos con hipersensibilidad y también puede dar como resultado el desarrollo de cepas de bacterias resistentes. De hecho, en los últimos años, la resistencia bacteriana se ha convertido en una preocupación mundial y los animales son una fuente potencial de bacterias resistentes a los antibióticos en humanos [22].

La aparición y propagación frecuente de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos es un desafío mundial y puede atribuirse en gran medida al uso de antibióticos en animales y humanos [22]. Como resultado, existe una presión creciente sobre los laboratorios responsables de garantizar la inocuidad de los alimentos para el consumo humano con respecto al desarrollo de métodos confiables y sensibles para el análisis de residuos de antibióticos en los alimentos [24]. Las bacterias patógenas acuáticas se transmiten entre animales acuáticos más fácilmente a través del agua que las bacterias patógenas terrestres a través del aire. Los antibióticos han sido bien aceptados desde que se descubrieron en la década de 1940 como los agentes terapéuticos más exitosos utilizados en el tratamiento y control de enfermedades infecciosas bacterianas relacionadas tanto con animales como con humanos [25], [29].

El uso excesivo e imprudente de diversos antimicrobianos en medicina humana y veterinaria, agricultura y acuicultura ha inducido la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos [30]. En consecuencia, el uso intensivo de antibióticos en la acuicultura

ha provocado un problema creciente para la salud humana, animal y para el medio ambiente [31], [44].

Sin embargo, el abuso de TC resulta en su acumulación en el cuerpo humano, lo que puede aumentar ciertos riesgos graves, incluida la resistencia a los medicamentos de cepas microbianas, reacciones alérgicas o tóxicas entre algunos individuos hipersensibles, y la inhibición del crecimiento óseo, etc. [32]. La Unión Europea ha regulado los niveles máximos permisibles de TC en el huevo (440 nM), en la leche o en los tejidos musculares (220 nM) [33] y en la miel (22 nM), etc. [33]. Sin embargo, el uso generalizado de TC podría dar como resultado niveles traza de residuos de antibióticos en alimentos derivados de animales [40]. Puede causar reacciones alérgicas en poblaciones susceptibles y es probable que desarrolle resistencia a los medicamentos [8], [41]. La leche es llamada sangre blanca, que es una de las bebidas naturales más antiguas de los animales. Con la creciente presencia de residuos antibacterianos en los alimentos de origen animal, se ha hecho énfasis en la seguridad de la leche [42]. La Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU., La Unión Europea y el Ministerio de Agricultura de China han establecido un límite máximo de residuos (LMR) de 0.1 mg/kg para las TC en la leche [43]. Muchos alimentos de origen animal, leche, huevos, carne y miel pueden suponer un riesgo para el consumidor. Las tetraciclinas como la tetraciclina (TC), la clortetraciclina (CTC), la metaciclina (MTC) y la doxiciclina (DOC) se usan generalmente contra las enfermedades bacterianas en la alimentación animal y la apicultura [45], [46]. Los límites máximos de residuos de antibióticos de tetraciclina se determinan ($\mu\text{g}/\text{kg}$) como 100 para la leche, 200 para la miel y 10 a 50 para los huevos en la Unión Europea. La determinación de residuos de tetraciclina en alimentos, suelo, alimento animal y agua se realiza por análisis cromatográfico [47]–[50]. Por lo tanto, es esencial desarrollar algunos métodos simples, selectivos y económicos para monitorear residuos antibacterianos en la leche y garantizar la seguridad alimentaria. El uso excesivo de antibióticos es una preocupación considerable para la salud pública, ya que estos medicamentos pueden posiblemente ingresar a la cadena alimentaria. Estos residuos pueden acumularse en el cuerpo y causar efectos adversos para la salud, así como aumentar la probabilidad de resistencia a los antibióticos.

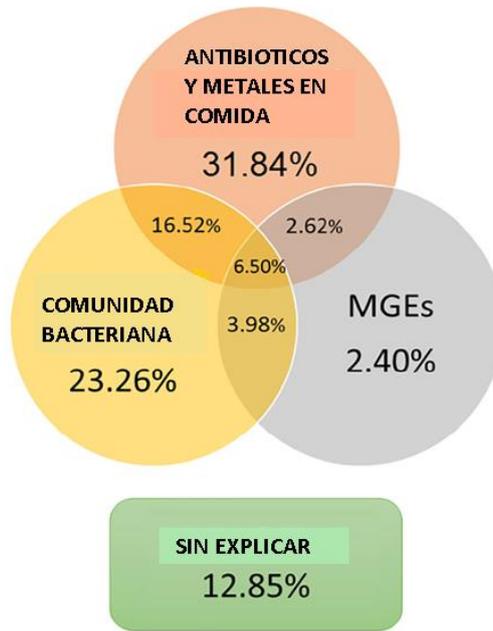


Figura 1.2. Análisis de redundancia parcial que diferencia el efecto de las concentraciones de antibióticos y metales en la alimentación porcina, la composición de la comunidad microbiana del intestino porcino y los elementos genéticos móviles (MGEs) en los perfiles generales de ARG [51].

Los genes de resistencia a los antibióticos (ARG), cada vez, son considerados más como contaminantes emergentes, lo que representa una amenaza para la salud humana y ambiental [51]–[55]. China es uno de los mayores consumidores de antibióticos en el mundo [56], [57] con una fracción significativa de todos los antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades animales y la promoción del crecimiento. Los antibióticos se utilizaron por primera vez como aditivos en China a mediados de la década de 1970, pero el consumo ha aumentado dramáticamente a la par con el crecimiento económico en las últimas décadas. Un informe anterior reveló que casi la mitad de la producción anual de antibióticos en China, un total de alrededor de 97,000 toneladas, se destinó a la industria animal [42]. Además, los metales tales como el cobre y el zinc también están aprobados como aditivos según la estipulación en China para la promoción del crecimiento y el control de enfermedades. Se ha observado que estos metales en algunos casos pueden causar la co-selección de los ARG en la microbiota intestinal, pero se necesitan más estudios para dilucidar por completo los vínculos entre los metales en los piensos y los ARG en la microbiota intestinal [58].

Por el contrario, está bien establecido que el uso de antibióticos en animales puede contribuir a la crisis de resistencia a los antibióticos en humanos [54]. Por lo tanto, la microbiota intestinal porcina ahora se considera un reservorio importante de patógenos con el potencial de transferir patógenos antibiótico-resistentes a los humanos [59]. De hecho, el uso excesivo de antibióticos en animales chinos posiblemente pueda explicar por qué los chinos albergan un mayor número de ARG en intestinos que los europeos [60].

La producción mundial de antibióticos tiene dos principales aplicaciones destinadas al uso veterinario, para el tratamiento de animales enfermos, así como, para promover el crecimiento del ganado. Según un estudio realizado por Thomas Van Boekel y colaboradores, publicado en 2015 en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, se estima que en 2010 el consumo mundial de antimicrobianos en animales destinados a la alimentación ascendió a 63 151 toneladas, cuya mayor proporción, el 23%, correspondió a China, el 13% a los Estados Unidos, el 9% a Brasil y el 3% a la India. El uso de antibióticos como promotores de crecimiento animal se prohibió en la Unión Europea (UE) en 2006, y se adoptó el concepto de reducir al mínimo su uso profiláctico en la ganadería [6].

Sin embargo, algunos antibióticos han sido administrados al ganado con el fin de debilitar el efecto barrera de la flora intestinal, con el objetivo de favorecer la absorción de nutrientes y acelerar el crecimiento del animal. Un ejemplo de esto es el uso de la tetraciclina, el cual es un antibiótico que empleado desde la década de los 50's, al mezclar en pequeñas dosis el antibiótico con agua se lograba mejorar el crecimiento del ganado [7]. Desafortunadamente, estos actos conllevan a potenciar el uso de una mayor cantidad de antibióticos, ya que estos al ser mal empleados, el ganado no logra desarrollar su sistema inmune con facilidad, produciendo animales enfermos y candidatos a administrarles una amplia gama de antibióticos para resguardar su salud.

En 1960 los consejos de investigación agrícola y médica, crearon un comité para investigar los posibles riesgos de los antibióticos para la alimentación humana y animal. El reporte fue publicado en 1962 y no se encontró evidencias convincentes de preocupación. En 1969, el informe Swann, recomienda una prohibición de ciertos antibióticos sin receta para el uso de alimentos en la producción ganadera y pidiendo la supervisión veterinaria de todos los usos de antibióticos. Con base en esto, penicilina, tetraciclinas y tilosina fueron prohibidos para uso sin receta veterinaria bajo acto de

sustancias terapéuticas. Eventualmente la presión de la industria, resultó en la reversión de estos cambios regulatorios permitiendo que estos antibióticos fueran comprados una vez más por los agricultores para la promoción de crecimiento animal sin supervisión veterinaria. Finalmente, a medida que los expertos de salud pública empezaron a articular la amenaza planteada por la resistencia antimicrobiana a mediados de la década de los 90's, Estados Unidos eliminó el uso del promotor del crecimiento de antibióticos entre 1999 y 2006 [61].

Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aclara que, los antibióticos no deben ser empleados para promover el crecimiento ni para prevenir enfermedades, sin embargo, estos deben ser administrados únicamente bajo supervisión veterinaria, así también, se debe considerar como primera opción, vacunar a los animales para reducir la necesidad de antibióticos y utilizar alternativas⁷ siempre y cuando las haya. También señala, que la persistencia en la resistencia a los antimicrobianos podría tener graves consecuencias sociales, económicas y de salud pública en todo el mundo. El Banco Mundial ha advertido de que la resistencia a los antimicrobianos podría ser tan dañina para la economía mundial como la crisis financiera de 2008 [6].

Uno de los antibióticos de uso frecuente en humanos y animales, es la tetraciclina, y es regularmente aplicada para la prevención o el tratamiento de mastitis en vacas. Por lo que su aplicación sin un control adecuado en animales destinados para consumo humano puede resultar en residuos de ésta presentes en leche.

⁷Fomentar la seguridad biológica en las granjas para prevenir las infecciones mediante la mejora de higiene y el bienestar de los animales.

1.1 ESTRUCTURA DE LA TETRACICLINA

La tetraciclina, cuyo nombre es, de acuerdo a la International Union of Pure and Applied Chemistry, (IUPAC): 4-(dimethylamino)-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide, es un antibiótico de amplio espectro, básicamente bacteriostáticos⁸, para el control de infecciones bacterianas causadas por Gram-positivos, Gram-negativos, aerobios y anaerobios y gérmenes beta lactámicos como: *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Brucela*, *Vibrio cholerae*, entre otros [62]. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y el Codex Alimentarius (FAO/CODEX), el Límite Máximo Residual (LMR) de tolerancia de tetraciclina en leche es de 100 µg/L.

Las tetraciclinas están formadas por una estructura policíclica compleja derivada de ciclopentanoperhidrofenantraceno [63] (figura 1.3), con distintas variaciones en sus sustituyentes, los cuales le aportan distintas características fisicoquímicas (Tabla 1.1, figura 1.4). En su forma libre son sustancias anfotéricas cristalinas de baja solubilidad, que forman cristales ácidos y básicos. Usualmente están disponibles como clorhidratos, característica que les proporciona una mayor solubilidad en agua y otros disolventes polares, la cual se ve influenciada por la polaridad de los distintos grupos funcionales presentes en su estructura (como grupos hidroxilo) [1]. Su nombre se origina por tener en su estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos bencénicos fusionados.

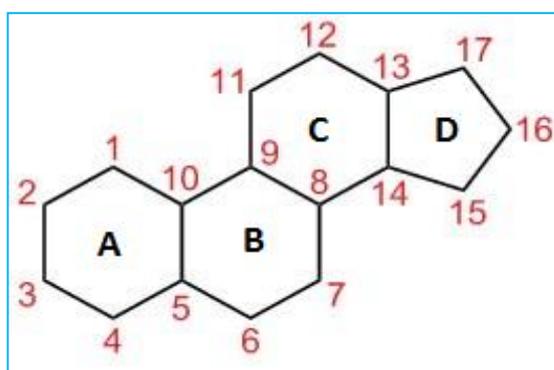


Figura 1.3. Estructura de ciclopentanoperhidrofenantraceno [63].

⁸Acción del antibiótico sobre el agente patógeno. Disminuye el crecimiento y reproducción, permaneciendo el microorganismo de forma viable y siendo eliminado por el sistema inmune del huésped.

Tabla 1.1. Sustituyentes en el núcleo ciclopentanoperhidrofenantraceno [64], [65]

ANTIBIÓTICO	R ₅	R ₆	R ₇	R ₉
Tetraciclina	H, H	OH, CH ₃	---	---
Oxitetraciclina	H, OH	OH, CH ₃	---	---
Clortetraciclina	H, H	OH, CH ₃	Cl	---
Demeclociclina	H, H	OH, H	Cl	---
Metaciclina	H, OH	=CH ₂	---	---
Doxiciclina	H, OH	CH ₃ H	---	---
Minociclina	H, H	OH, CH ₃	N(CH ₃) ₂	---
Tigeciclina			N(CH ₃) ₂	HNONH(CH ₃) ₃

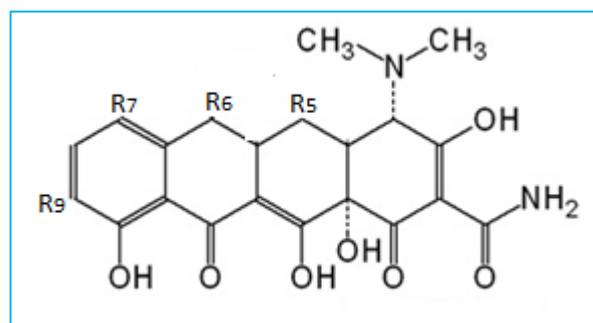


Figura 1.4. Estructura de las Tetraciclinas [65].

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS TETRACICLINAS

Las tetraciclinas se pueden clasificar de la siguiente manera [5], [64], [66]:

- ❖ Generación
- ❖ Naturaleza y síntesis
- ❖ Farmacocinética

1.2.1. Clasificación por Generación

A finales de la década 50, aparece el primer antibiótico del grupo de tetraciclinas. Eventualmente, en los años siguientes se descubren el resto de ellas. Con el avance de la bioquímica se logra sintetizar el resto de las tetraciclinas y posteriormente, se desarrollan las últimas de ellas, modificando la posición 9 del anillo tetracíclico, aumentando de esta manera su actividad antimicrobiana.

Además, se incluyen nuevos compuestos en desarrollo, como las aminometilciclinas, de cuyo grupo ya ha pasado a experimentación humana la PTK 0796 [66].

Tabla 1.2. Clasificación de tetraciclinas según su generación [5], [67].

	Generación		
	Primera (1948 a 1963)	Segunda (1965 a 1972)	Tercera (1993-)
Nombre genérico	-Clortetraciclina -Oxitetraciclina -Tetraciclina -Demeclociclina (Demetilclortetraciclina)	-Metaciclina -Doxiciclina -Minociclina	-Gliciclinas (Tigeciclina) -Aminometaciclinas (PTK 0796)

1.2.2. Clasificación de acuerdo a su naturaleza y síntesis

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales o biosintéticos y semisintéticos derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp.

Las tetraciclinas biosintéticas o de primera generación, constituyen un grupo de antibióticos de amplio espectro, encabezados por la clortetraciclina o aureomicina, aislada a partir de un cultivo de *Streptomyces aureofaciens*. Poco tiempo después surgieron, la oxitetraciclina o terramicina generada por *Streptomyces rimosus* y la tetraciclina propiamente dicha, las cuales son consideradas, tetraciclinas de primera generación. Las tetraciclinas de segunda y tercera generación (minociclina, doxiciclina, metaciclina y tigeciclina), son tetraciclinas producidas, mediante la modificación química de la tetraciclina base, generada biosintéticamente [68].

Tabla 1.3. Clasificación de tetraciclinas de acuerdo a su naturaleza y síntesis [5], [66], [68].

Naturales o biosintéticas		Semisintéticas
Especie	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Clortetraciclina
	<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxitetraciclina
		Tetraciclina Demeclociclina Metaciclina Doxiciclina Minociclina Tigilciclina

1.2.3. Clasificación según su farmacocinética

Farmacocinéticamente las tetraciclinas se pueden diferenciar en tres grupos. A continuación, en la Tabla 1.4, se muestra la clasificación.

Tabla 1.4. Farmacocinética de las tetraciclinas [67].

Farmacocinética	Horas (h)	Ejemplo de Antibiótico
Vida media corta	6 a 8	Clortetraciclina Oxitetraciclina Tetraciclina
Vida media intermedia	12a14	Demeclociclina Metaciclina
Vida media larga	16a18	Doxiciclina Minociclina (las más liposolubles)

1.3. ABSORCIÓN

La administración de las tetraciclinas es variable, puede ser por vía oral o intravenosa. Generalmente las tetraciclinas no se administran vía intramuscular ya que el compuesto causa un dolor muy intenso. Teniendo una mayor absorción en el ayuno ya que no existe interferencia de los alimentos durante la ingestión. El mecanismo que explica la disminución de la absorción es la formación de compuestos quelantes de cationes di y trivalentes insolubles con Ca^{2+} por el consumo de productos lácteos, o aquellos que aumenten el pH del estómago con Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} como los antiácidos, geles de

hidróxido de aluminio, sales de calcio, magnesio, hierro o cinc y subsacilato de bismuto [62], [66].

La absorción de las tetraciclinas suministradas por vía oral, varía desde un 30% hasta un 90% y se absorben a nivel gástrico y de intestino delgado proximal, dependiendo de la tetraciclina considerada. Por ejemplo, la doxiciclina y la minociclina son las que mejor se absorben (90 a 100%) pues en ellas no interfiere de forma significativa la alimentación, para la doxiciclina y minociclina y de 75 a 80 % para la tetraciclina, pero de solo el 30 % para la clortetraciclina. La doxiciclina y la minociclina tienen una mayor unión a las proteínas que la tetraciclina (60 a 95, 55 a 76 y 20 a 65 % respectivamente) por lo que deben administrarse fuera de las comidas [5], [66].

Por otra parte, la tasa de metabolismo de las tetraciclinas en las vacas lecheras se ha estimado en un 25 a 75% y un porcentaje significativo de las tetraciclinas administradas se excreta en la leche bovina [69].

1.4. DIFUSIÓN

Las tetraciclinas se unen a las proteínas plasmáticas, sin embargo su unión es variable pues la doxiciclina y minociclina tienen mayor unión a las proteínas que la tetraciclina.

Se distribuyen en todos los órganos y tejidos. La acumulación de tetraciclinas en el organismo es en las células reticuloendoteliales de hígado, bazo y médula ósea, así mismo en hueso, dentina y se logran concentrar en pulmones, hígado, vía biliar, riñones, líquido cefalorraquídeo y sinovial, además de acumularse también en lágrimas, saliva y leche materna, y logrando cruzar la barrera placentaria llegando al tejido fetal y al líquido amniótico, en especial los de vida media larga [70], [71].

1.5. EXCRESIÓN

Todos los compuestos, excepto tetraciclina, que presenta un metabolismo hepático, se eliminan sin metabolizar a través de las vías biliar y renal. Sin embargo algunas son reabsorbidas por la circulación enterohepática [71].

La eliminación por orina varía según el compuesto, y es muy escasa para minociclina (6%) y clortetraciclina (18%), moderada-baja para doxiciclina (42%) y aceptable para tetraciclina (60%), por lo que con la posible excepción de las 2 primeras se alcanzan concentraciones terapéuticas en la orina para el tratamiento de infecciones urinarias por microorganismos sensibles. El resto del fármaco se elimina en las heces. La doxiciclina es la tetraciclina habitualmente recomendada en pacientes con fallo renal [66].

1.6. MECANISMO DE ACCIÓN

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteínica de las bacterias (figura 1.5). Se fijan con gran afinidad a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que impiden la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico de transferencia a la subunidad 30S ribosomal, y de esta forma se paraliza la incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteínica. Atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de porinas mediante difusión pasiva y llegan al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía. Las glicilciclinas, entre las que se encuentra la tigeciclina, se fijan al mismo punto de unión del ribosoma bacteriano, pero la última lo hace con una fuerza 5 veces superior a la de la tetraciclina y la minociclina. Probablemente esta fuerza de anclaje sea la que permite a la tigeciclina vencer el mecanismo de resistencia ribosomal frente a las tetraciclinas clásicas. La fijación de todas las tetraciclinas a la subunidad ribosomal es reversible, lo que explicaría su efecto bacteriostático [66].

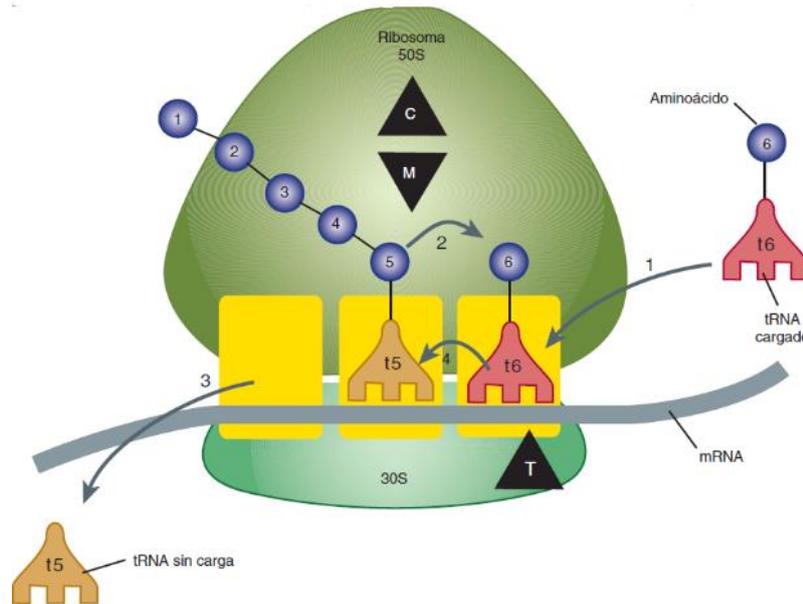


Figura 1.5. Mecanismo de acción de la Tetraciclina. 1. Sitio donador 2. Peptidación 3. Liberación 4. Translocación [65].

Las bacterias desarrollan resistencia a una tetraciclina, habitualmente la presentan cruzada con otras, es decir, que ya hayan presentado resistencia de otra tetraciclina. La resistencia es adquirida por plásmidos y es un rasgo inducible. Los tres mecanismos que dan lugar a este fenómeno son: 1) pérdida o disminución de la permeabilidad bacteriana para el antibiótico o la adquisición de una vía de salida dependiente de energía; 2) menor acceso de la tetraciclina al ribosoma bacteriano; 3) formación de enzimas bacterianas que metabolizan al antibiótico [71].

1.7. CALIDAD DE LA LECHE

1.7.1. Composición de la leche

La leche es un producto natural obtenido de la secreción de las mamas de la vaca y de otras especies utilizadas como productoras de leche. Al igual que otros alimentos tiene la característica de que su composición es extremadamente compleja y consta de una homogeneidad tanto física como química entre sus componentes. Está conformado por tres grupos principales de moléculas: hidratos de carbono, lípidos y proteínas, sin dejar de lado a otros componentes que a pesar de estar presentes en menor cantidad tienen

importancia, tales como: sales minerales, vitaminas, hormonas, enzimas, sólidos no lipídicos, microorganismo, etc. [1].

1.7.2. Pruebas de plataforma y de laboratorio

Comúnmente, las industrias lácteas emplean algunas pruebas con la finalidad de establecer la calidad sanitaria. Las pruebas de campo o en la receptoría de la planta (pruebas de plataforma) son pruebas mediante las cuales es posible reconocer posibles leches inaceptables y se evita la contaminación de leches de buena calidad al mezclarse en cisternas o tanques de almacenamiento. Las pruebas realizadas en laboratorio, incluyen aquellas pruebas que por la necesidad de equipos o materiales especiales, solo pueden ser realizadas dentro de los mismos [4], [36], [37], [72].

Pruebas de plataforma:

A) Temperatura

La leche debe entregarse a la planta dentro de las primeras 2 horas que siguen al ordeño para evitar el rápido crecimiento bacteriano que ocasiona la disminución de su calidad y su rápida descomposición. De lo contrario, la leche debe refrigerarse rápidamente después del ordeño y mantenerse entre 0 a 5 °C hasta su procesamiento. Es importante, que durante su trayecto, los tanques cuenten con aislantes que permitan conservar la temperatura en caso de no contar con sistema de refrigeración, siempre cuidando que no llegue a más de 10 °C a la planta para evitar el rechazo del lote.

B) Características organolépticas

Viscosidad: permite evaluar posible alteración de la leche por desarrollo de microorganismos capaces de producir polisacáridos que por la acción de ligar agua aumentan la viscosidad (leche mastítica, leche hilante). La leche tiene una viscosidad ligeramente superior a la del agua (1.005cp) de 1.5 a 2.0 centipoises a 20 °C. Sin embargo, algunas personas bien entrenadas pueden detectar leches mastíticas o hilantes observando el comportamiento de la leche, describiéndola bajo una escala de poco-mucho en viscosidad.

Color: el color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a la reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato-fosfato-cálcico en suspensión

coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Las leches de retención o mastíticas presentan un color gris amarillento. Un color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos. Otros colores (amarillo, azul, etc.), puede ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimiento de ciertos microorganismos. Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarilla-verdosa debido a la presencia de riboflavina.

Olor: es característico (puede describirse como tal) y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular (ácidos, aldehídos, cetonas, trazas de sulfato de metilo). La técnica más común consiste en oler inmediatamente después de ser destapado el contenido del tanque o del recipiente que la contiene. Esta prueba permite la segregación de leches de peor calidad.

Sabor: es característico de la leche y puede describirse como tal. Normalmente no es ácido ni amargo, sino, ligeramente dulce debido a su contenido en lactosa. Un sabor salado se debe a la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre (mastitis).

C) **Prueba lactométrica (Peso específico, Pe)**

El Pe de la leche se determina con un lactómetro a una determinada temperatura (60°F ó 15.6 °C). La leche tiene un Pe de 1.028 a 1.034 (28 a 34 °Q) que varía considerablemente con el contenido de lípidos y de sólidos totales. Esta medición no debe determinarse recién ordeñada, sino 4 horas después, ya que luego de la extracción la leche sufre un proceso de contracción e incrementos de Pe hasta que se estabiliza.

Un lactómetro es un aerómetro de bulbo voluminoso y vástago graduado para lograr una mayor sensibilidad. Está dotado de una escala especial dividida en grados Quevenne (°Q) o en grados de salud Pública de New York (°NBH). Los grados Quevenne corresponden a la segunda y tercera cifra decimal del valor del peso específico y equivalen a los grados NBH multiplicados por 0.29. Por lo tanto, un lactómetro permite hacer determinaciones aproximadas en las zonas de producción, en la receptoría o en el laboratorio, y detectar adulteraciones de la leche original por separación de la grasa, por adición de leche descremada o agua.

Pruebas de Laboratorio:

D) **pH**

El pH normal de la leche bronca es 6.5 a 6.7. Valores superiores representan leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican acidificación posiblemente por fermentación de la lactosa. Se mide el potencial directamente en un potenciómetro calibrado con solución buffer de pH conocido.

E) **Acidez titulable**

Normalmente la leche no tiene ácido láctico; sin embargo, por acción bacteriana la lactosa sufre un proceso de fermentación formándose ácido láctico que aumentan la acidez titulable. La leche fresca tiene una acidez titulable equivalente a 15 a 19 mL de NaOH 0.1 N/100 mL (0,13 a 0,16 % ácido láctico) debido a su contenido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato, etc.

En México y en los Estado Unidos se emplea el sistema de expresión en términos de ácido láctico y en Europa se usan diversos sistemas como son los grados Soxhlet-Henkel (°SH) o los grados Dornic (°D).

F) **Prueba del alcohol y de neutralizantes**

La descomposición bacteriana propia de leches de baja calidad (valores superiores de acidez y disminución de pH) puede demostrarse mezclando la leche con igual volumen de etanol al 68%, ya que el alcohol a esa concentración produce floculación o coagulación del producto cuando la acidez es equivalente o superior a 22.5 mL de NaOH 0.1N/100 mL. Una prueba del alcohol positiva indica poca estabilidad de la leche a tratamientos térmicos.

Para detectar la presencia de neutralizantes en leche utilizados para disminuir la acidez y aumentar el pH, se hace uso de indicadores tales como el ácido rosálico o coralina al 1% en solución alcohólica, que determina la presencia de compuestos alcalinos como bicarbonato de sodio, en un rango de pH entre 5.0 a 6.8. El cambio de coloración del indicador determina una prueba positiva o negativa, siendo una coloración rosa pálido una prueba negativa y una coloración rosa fuerte indica prueba positiva.

G) Prueba de reducción del metileno

El principio se basa en el potencial de óxido-reducción (Eh) de la leche fresca aireada (+0.035 a +0.40 voltios), el cual se debe principalmente al contenido de oxígeno disuelto en el producto. Si el oxígeno es separado, el Eh disminuye. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en la leche y consumen oxígeno. Por lo que a mayor número de microorganismos presentes en la leche, el consumo de oxígeno será mayor y el Eh caerá rápidamente; si por el contrario el número de microorganismos es menor, el Eh disminuirá lentamente.

En la determinación de la calidad sanitaria de la leche, se utiliza como indicador de óxido-reducción al azul de metileno que se presenta de color azul en su forma oxidada y es incoloro en su forma reducida. Esta solución acuosa de pH 7.0 su oxidación es completa a Eh +0.075 voltios y su reducción completa a Eh -0.015 voltios. En la leche, por existir un pH menor de 7 (6.5 a 6.7), la reducción completa del azul de metileno ocurre a un Eh más positivo (+0.075 a +0.225).

La manera de medir esta determinación es el tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno en su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora), generando una proporcionalidad de calidad sanitaria de la leche, clasificando el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables y el número de microorganismos por mL correspondientes a cada tiempo, con base a los siguientes valores de la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Clasificación de las leches con base al tiempo de reducción del azul de metileno. (Temperatura 37°C)⁹ [36].

Clasificación de la leche	Tiempo de decoloración	Número aproximado de microorganismos por mL
Buena a excelente	Más de 8 horas	Menos de 500 000
Regular a buena	6 a 8 horas	1 000 000 – 4 000 000
Aceptable	2 a 6 horas	4 000 000 – 20 000 000
Mala	Menos de 2 horas	Más de 20 000 000

⁹Los números indicados en el cuadro de ninguna manera son exactos ya que además de la población microbiana, existen otros factores que pueden afectar el tiempo de reducción, entre ellos, el tipo de microorganismos, el número de leucocitos, el periodo de exposición a la luz, la cantidad de oxígeno disuelto y la tendencia de la leche a elevar los microorganismos hacia la superficie a medida que se va separando la crema en el tubo de prueba.

H) Prueba de lactofermentación

La prueba se realiza de forma similar a la del azul de metileno, pero las lecturas y la interpretación de los resultados deben hacerse considerando el proceso de fermentación de la lactosa y la aparición de características organolépticas. Cuando la flora de la leche está integrada exclusivamente por bacterias lácticas homofermentadoras, los caracteres organolépticos son típicos de la leche. Por el contrario, la presencia de organismos heterofermentadores con capacidad gasógena o de bacterias indeseables determina la aparición de otros caracteres como son cuajada con aspecto gelatinoso, grumoso con presencia de gas, coágulo con gas y suero separado. Estas características en el producto, se observan después de incubar las muestras de leche a una temperatura de 37 °C por 24 horas, y permite, en cierta forma establecer la calidad del producto original y clasificarlo dentro de ciertas categorías como se describen en la Tabla 1.6.

Tabla 1. 6. Categoría de las leches con base a las características organolépticas después de incubación. (37°C/24h) [36].

Categoría de la leche	Descripción	Calidad
Líquida	Estado líquido. Leche con bajo contenido microbiano.	Óptima
Gelatinosa	Aspecto de coágulo gelatinoso, homogéneo. Leche rica en gérmenes homofermentativos (fermentan lactosa con producción de gas). El coágulo puede ser homogéneo y sin gas o contener pequeñas burbujas de gas.	Aceptable
Con cuajada definida	Cuajada bien definida, con separación de coágulo completo. Leche rica en bacterias que producen enzimas tipo cuajo.	Aceptable (elaboración de quesos)
Grumosa con gas	Leche con proceso de coagulación por gérmenes heterofermentativos.	Mala
Gaseosa con suero separado	Leche coagulada por gérmenes homofermentadores y de enzimas tipo cuajo	Mala

I) Determinación de inhibidores (Peróxido de hidrógeno)

Detectar sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en la leche es de singular importancia ya que la leche puede contaminarse con sustancias de diferente naturaleza, ya sea de manera accidental como consecuencia de negligencia en la producción e industrialización (residuos de antibióticos, detergentes y derivados clorados) o intencional con el propósito de impedir la

descomposición de la leche (peróxido de hidrógeno, formaldehído, ácido benzoico, ácido bórico y boratos). El peróxido de hidrógeno, es un agente oxidante de acción bacteriostática que mantiene la cuenta bacteriana aún sin refrigeración durante 12 a 24 horas, posteriormente este conservador desaparece por acción de la catalasa propia de la leche y por el calor durante el procesamiento, sin embargo, el uso de este inhibidor no es aceptado pues no destruye todos los microorganismos patógenos y enmascara procesos deficientes.

J) **Grasa. Método Gerber**

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método de Gerber se basa en el empleo de H_2SO_4 , alcohol isoamílico¹⁰ y la fuerza de la centrífuga para separar nítidamente la capa de grasa y la capa ácido-acuosa de la leche o sus derivados (ruptura de la emulsión). La determinación del porcentaje de grasa en la leche y sus derivados se efectúa en butirómetros.

1.7.3. Pruebas microbiológicas

Todas las transformaciones que experimenta la leche ya sean deseables o indeseables, son el resultado de la acción de microorganismos, pero ciertos microorganismos deben ser estudiados por la capacidad de alterar la composición y características organolépticas de la leche y derivados lácteos o por ser agentes causales de enfermedad en los consumidores. La importancia del estudio microbiológico de la leche está basada en dos aspectos [73]:

- Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.
- Los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos haciéndolos inadecuados para el consumo.

¹⁰Reactivo que disminuye la tensión interfacial de la grasa, favorece la ruptura de la emulsión, la separación de esa grasa y previene la sulfonación y carbonización de la misma. Reacciona con el H_2SO_4 formando un éster que es soluble en el ácido.

Los principales grupos de microorganismos presentes en leche son: bacterias, hongos y virus. Aquellas de mayor importancia para su estudio son las siguientes:

Microorganismos indicadores¹¹:

- ✚ Mesófilos aerobios
- ✚ Coliformes totales
- ✚ Coliformes fecales
- ✚ *Eschericiacoli*
- ✚ Mohos y levaduras

Microorganismos patógenos¹²:

- ✚ *Staphylococcus aureus*
- ✚ *Salmonella*

¹¹Son aquellos que indican la calidad microbiológica, así como, la posible presencia de microorganismos patógenos, ya que, proporcionan información simple, rápida y confiable de fallas en el proceso, contaminación postproceso, contaminación del ambiente y nivel general de higiene bajo el cual se produjo y almacenó el alimento.

¹²Son aquellos microorganismos que causan intoxicación.

Tabla 1.7. Microorganismos indicadores y patógenos involucrados en leche [74].

Microorganismo	Características	Importancia de análisis
Mesófilos aerobios	-Bacterias Gram (+) -Bacterias Gram (-) -Mohos y levaduras	-Materias primas contaminadas -Condiciones de manipulación -Condiciones de almacenamiento
Coliformes totales	-Bacilos Gram (-) cortos -No esporulados -Anaerobios facultativos -Fermentan lactosa -Resisten sales biliares	-Fallas de procesos -Recontaminación post-proceso -Condiciones de manipulación -Eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección -Posible contaminación fecal
Coliformes fecales	-Bacilos Gram (-) cortos -Aerobios facultativos -No esporulados -Fermentan lactosa -Resisten sales biliares	-Contaminación con heces Menor margen de seguridad que coliformes totales
<i>Escherichiacoli</i>	-Bacilo Gram (-) corto -Móvil (flagelado) -No esporulado -Aerobio facultativo -Fermenta lactosa y glucosa -Algunas cepas son patógenas	-Contaminación fecal reciente -Menor margen de seguridad que coliformes totales y fecales
Mohos y levaduras	-Hongos filamentosos aerobios y multicelulares -Hongos no filamentosos y unicelulares	-Síntesis de metabolitos tóxicos -Resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación - Alteración de sustratos que causan malos olores y sabores -Fermentación y acidificación
<i>Staphylococcus aureus</i>	-Cocos Gram (+) -No esporulados -No móviles -Agrupación en racimos -aerobios facultativos -Halotolerante (10 a 20% NaCl)	-Condiciones de almacenamiento -Condiciones de higiene -Causa intoxicación
<i>Salmonella</i>	-Bacilo Gram (-) -Móvil (flagelado) -Anaerobio facultativo Fermenta Glucosa	-Causa intoxicación

1.8. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Son métodos de análisis óptico más usado en el área de investigación, pues proporcionan información acerca de la medida de la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra en función de las longitudes de onda (λ) específicas. Estos métodos se basan en la capacidad de las sustancias de *absorber* y *emitir* radiación electromagnética, y dichos métodos se pueden emplear para determinar la concentración de un reactivo o producto durante una reacción [75].

1.8.1. Espectroscopia de UV-Vis

Estudia el fenómeno de adsorción de la radiación UV-Visible de moléculas orgánicas e inorgánicas. La región de UV del Espectro Electromagnético [76] se encuentra entre 0.6 y 380 nm, y hasta 780 nm en la región visible. En la Tabla 1.8 se describen las regiones.

Tabla 1.8. Regiones de UV-Visible [77].

UV lejano	UV cercano	Visible
0.6 a 190 nm	190 a 380 nm	380 a 780 nm

El *UV cercano de cuarzo* es la región en la que el aire y el cuarzo son transparentes, mientras que el *UV lejano o de vacío*, requiere técnicas especiales, ya que el aire que se encuentra en el trayecto óptico absorbe intensamente en esta región, y por lo tanto no es útil desde un punto de vista práctico. El *UV visible*, es la región visible a la que es sensible el ojo humano. La absorción de la radiación por moléculas, generalmente se produce por la excitación de los electrones de enlace, donde la λ de los máximos de absorción y se puede relacionar con los enlaces de las especies absorbentes [77].

La base de la Espectroscopia Visible y Ultravioleta consiste en medir la intensidad del color (o de la radiación absorbida en UV) a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Para tener esta relación se emplea la Ley de Beer, que establece que para una misma especie absorbente en una celda de espesor constante, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración [78].

1.8.2. Espectroscopia Infrarroja

Es de mucha utilidad para determinaciones cualitativas de compuestos orgánicos y para deducir estructuras moleculares a partir de sus grupos funcionales tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos. En el análisis cualitativo la Espectroscopia de Infrarrojo puede usarse para la identificación de sustancias puras o para la absorción, localización e identificación de impurezas [78].

La región del infrarrojo se extiende desde 0.8 a 100 μm (corresponde al número de onda comprendidos entre los 12800 y los 10 cm^{-1}) en tres regiones como se describe en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9. Regiones de IR [78].

IR cercano	IR medio o fundamental	IR lejano
0.8 a 2.5 μm	2.5 a 50 μm	50 a 1000 μm

El espectro de infrarrojo es una de las propiedades más características de un compuesto ya que no existen dos espectros iguales para dos compuestos diferentes, es como una huella dactilar, donde, la región de importancia analítica es la región del IR fundamental ya que la mayoría de los instrumentos infrarrojos cubren ésta región.

La figura 1.6, se muestra el Espectro Electromagnético, donde se observa detalladamente las regiones de Espectroscópicas de UV-Visible e Infrarrojo.

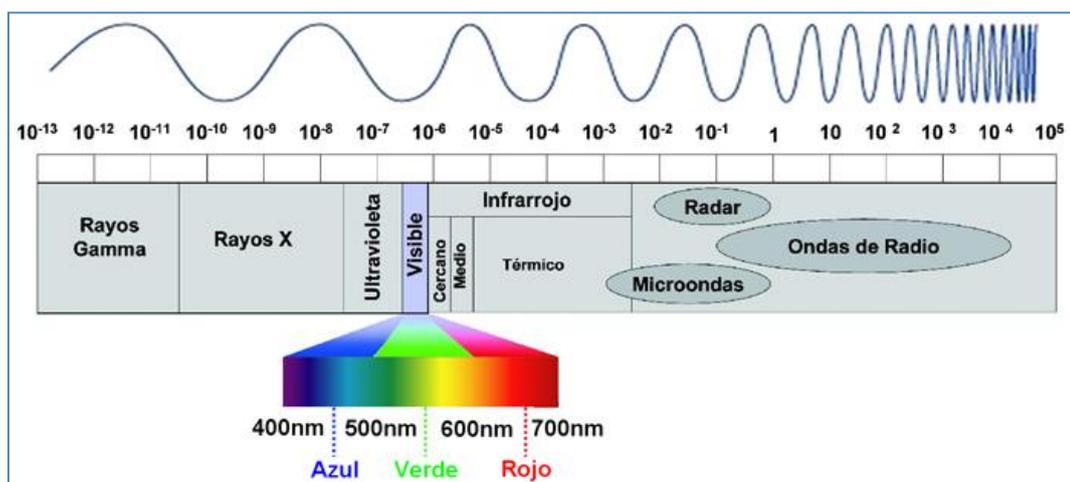


Figura 1.6. Espectro Electromagnético. λ en metros [76].

2. JUSTIFICACIÓN

Existe una gran cantidad de métodos reportados por diversas organizaciones para la identificación de antibióticos en leche. Muchas de estas metodologías están basadas en el empleo de la cromatografía de líquidos (HPLC) con UV Visible, espectroscopia de masas, microextracciones, y generalmente es para una determinación simultánea de tetraciclinas en leche de vaca. Por lo que en el presente trabajo, se describe el desarrollo de una metodología alternativa para la determinación únicamente de tetraciclina en leche mediante Espectroscopia UV Visible y confirmación del antibiótico en Espectroscopia Infrarroja, con la finalidad de minimizar tiempos de detección, uso de reactivos y economizar recursos.

3. HIPÓTESIS

Si el método alternativo propuesto mediante Espectroscopia de UV Visible para la determinación y cuantificación de tetraciclina en leche detecta los Límites Máximos Residuales (LMR) cercanos a los reportados por las normas establecidas para la presencia de tetraciclina en leche, y se identifica la molécula del antibiótico mediante y Espectroscopia Infrarroja, entonces, dicha técnica será posible utilizarla para la determinación del antibiótico presente en leches.

4. OJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método basado en la espectroscopia de absorción para la determinación de tetraciclina en leche, y estudiar su precisión, reproducibilidad y aplicabilidad en diferentes leches.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Análisis de calidad de leches producidas y vendidas en México utilizando la NOM-155-SCFI-2012.
- Determinación de microorganismos indicadores y patógenos utilizando la NOM-243-SSA1-2010.
- Desarrollo de un método basado en espectroscopia para determinar y cuantificar el antibiótico de tetraciclina en leche producida en México.
- Estudio de la recuperación de tetraciclina a partir de leche, reproducibilidad y aplicabilidad del método.

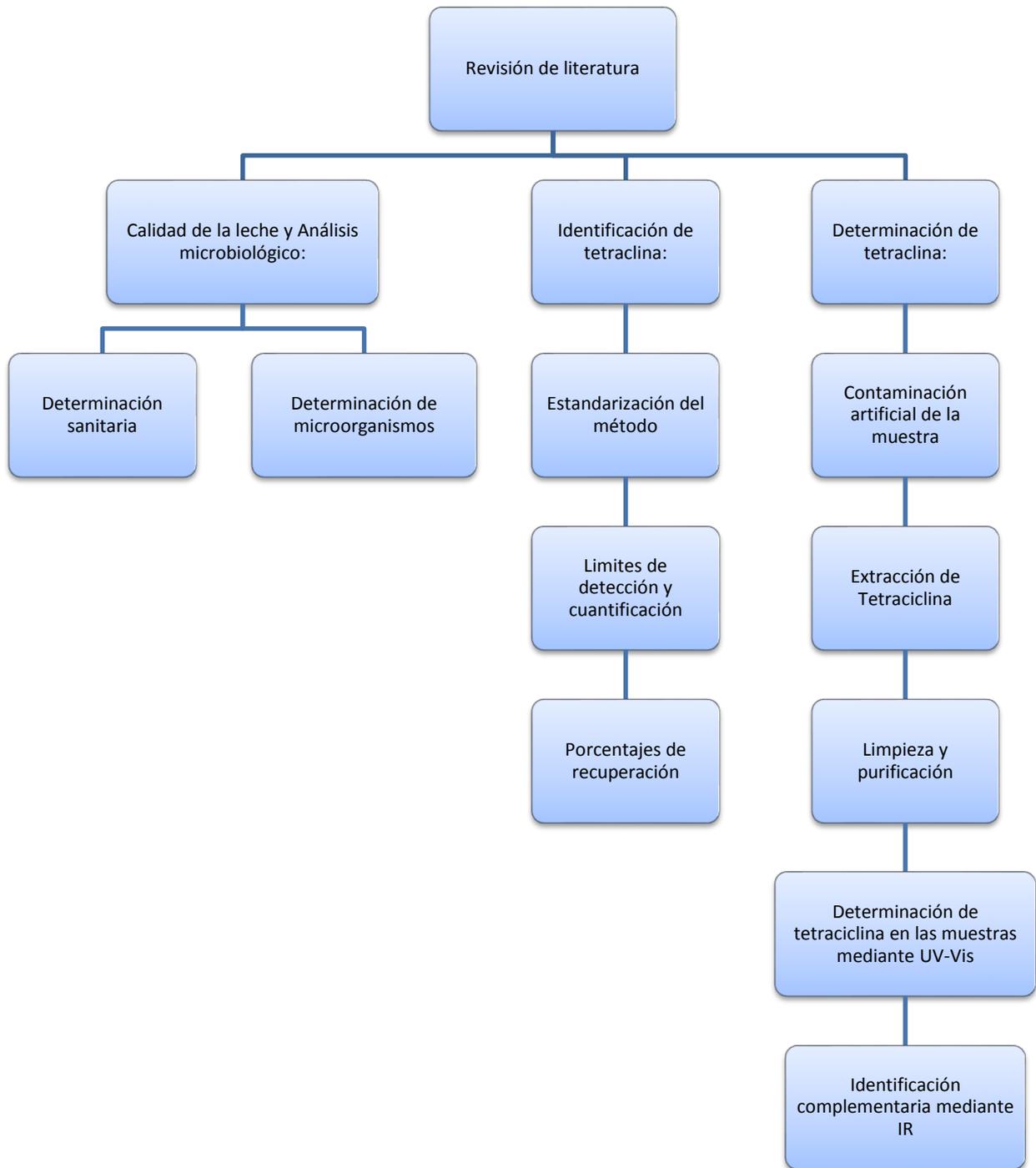


Figura 5.1. Diagrama de experimentación de determinación de tetraciclina en leche.

5. MATERIALES

5.1. MUESTRA BLANCO

Las dos muestras de leches utilizadas como blanco, fueron obtenidas de diferentes sitios. Leche UHT fue obtenida, en distintos meses y diferentes lotes, de locales ubicados en el campus de Facultad de Química, UNAM, la leche bronca se obtuvo de diferentes vacas de un rancho junto al canal de Apatlalco en la Delegación Xochimilco en distintos meses.

5.2. DISOLVENTES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Para el análisis microbiológico, se utilizó agua peptonada, caldo lactosado, agar nutritivo, caldo BRILA, caldo *E. coli*, agar Mc Conkey, EMB, agar Baird Parker, caldo tetrionato, verde brillante, yodo yodurado, agar Hektoen, agar XLD y agar papa. Estos medios fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y por Griffith Foods S. A. de C. V.
- Los reactivos y disolventes empleados en el análisis de determinación y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche fueron proporcionados por el laboratorio F 114 de la Facultad de Química.
- Para la determinación y cuantificación de tetraciclina en leche se utilizó alcohol etílico anhidro J. T. Baker (grado HPLC; pureza 99.9%), acetonitrilo J. T. Baker (grado HPLC; pureza 99.98%), ácido clorhídrico Golden Bell (grado A. C. S), tetraciclina SIGMA-ALDRICH (CAS Number: 60-54-8; grado HPLC; pureza $\geq 88\%$) y agua purificada.
- Para la preparación de las soluciones patrón se pesó la tetraciclina en polvo y se diluyó en alcohol etílico. También se preparó el stock de la tetraciclina en agua purificada, pesando y diluyendo.
- Todos los medios y soluciones de trabajo se mantuvieron en refrigeración a 4°C y protegidos de la luz.

5.3. EQUIPO, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

- Para la parte microbiológica, se usaron cajas petri desechables y esteriles, y material de vidrio como matraces de 500 mL, tubos de ensaye de 10 mL con taparroscas, campanas Durham, asa bacteriológica, todo previamente esterilizado. Para la zona de asepsia se utilizaron tres lamparas de alcohol y Lysol en spray para limpiar y desinfectar el área de trabajo. Para el crecimiento de bacteria, hongos y levaduras se ocupó una incubadora y para la seguridad personal, fue indispensable usar bata, cubrebocas, lentes y guantes.
- Para la preparación del stock se usaron micropipetas P100 y P10 para las alícuotas y se utilizó una celda de cuarzo en el equipo de UV-Vis y pipeta Pasteur de vidrio para la alícuota en el equipo de IR.
- Para el tratamiento de la muestra se utilizaron tubos falcón de 15 mL, pipetas graduadas de 5 y 10 mL, matríz bola para rotavapor de 50 mL, probeta 50 mL, membrana para clarificación de agua y soluciones orgánicas Millex de 0.45 μ m, celda de cuarzo, Vortex (Genine2), Centrifuga (EBA 21 Hettich), Rotavapor (BÜCHI B-490), Espectrofotómetro de UV-Vis (SEC2000 AS), Espectrofotómetro Infrarrojo (Perkin Elmer).

6. METODOLOGÍA

6.1. METODOLOGÍA PARA LAS PRUEBAS DE CALIDAD DE LA LECHE

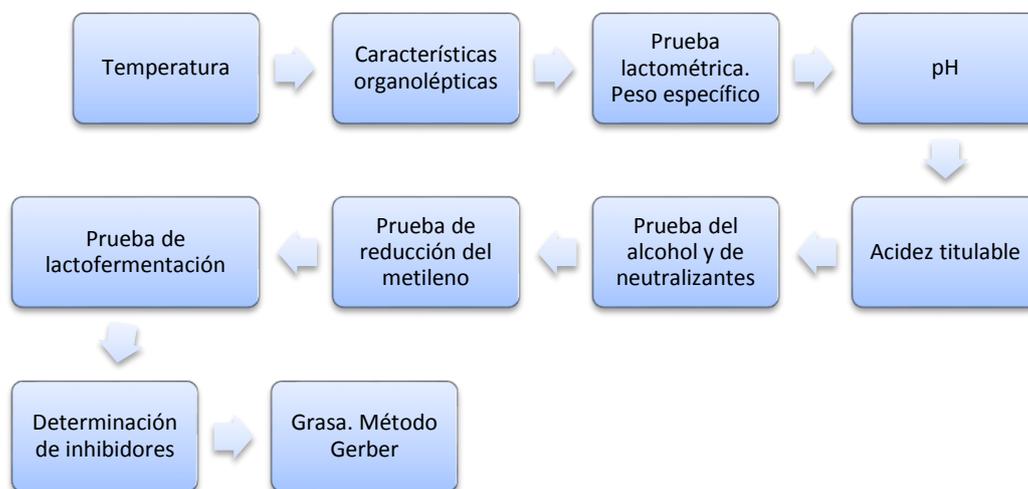


Figura 6.1. Metodología para pruebas de plataforma y pruebas de laboratorio en muestras de leche.

Pruebas de plataforma:

- A) **Temperatura.** Se utilizaron termómetros bimetálicos, limpios y libres de contaminación, calibrados y con una graduación de -10 a +100 °C, con divisiones de 1 °C. Para la lectura de temperatura, se dejaron el tiempo suficiente para que el termómetro se estabilice a la temperatura de la muestra.
- B) **Características organolépticas.** Para la evaluación olfativa se olieron las muestras de leche directamente del recipiente en donde fueron trasladadas. La evaluación visual se realizó vertiendo las muestras en vasos de precipitado de 100 mL para evaluar su coloración. Posteriormente se realizó la parte gustativa con excepción de la leche bronca, probando directamente del vaso de precipitados.
- C) **Prueba lactométrica (Peso específico).** Se transfirieron las muestras de leche a una probeta de 250 mL evitando la formación de burbujas. Se introdujo el lactómetro dejándolo flotar libremente durante 30 segundos. Posteriormente se

tomó la lectura lactométrica leyendo la división de la escala más alta que alcanza el menisco de la leche.

Pruebas de Laboratorio (por triplicado):

- D) **pH.** Se Preparó el potenciómetro calibrándolo con soluciones buffer. Posteriormente, se transfirieron 9 mL de las muestras en vasos de precipitado de 125 mL y se midió el pH.
- E) **Acidez titulable.** De las muestras utilizadas para el pH, se adicionaron 2 a 3 gotas de la solución indicadora de Fenolftaleína. Posteriormente, se tituló con una solución de NaOH 0,1 N utilizando una bureta de 50 mL. hasta el vire de color (rosa claro). Se expresó la acidez en términos de ácido láctico, Soxhlet-Henkel (°SH) y grados Dornic (°D) mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{array}{l} \% \text{ác. láctico} \\ = \frac{\text{mL NaOH} \times 0,1 \text{ N} \times 0,09 \text{ meq. ácido láctico}}{9 \text{ mL muestra}} \times 100 \end{array} \quad \left| \begin{array}{l} \text{°SH} = \frac{\% \text{acidez}}{0.0225} \\ \text{°D} = \% \text{acidez} \times 100 \end{array} \right|$$

- F) **Prueba del alcohol y de neutralizantes.** Se transfirieron 5 mL de las muestras a tubos de ensaye y se agregaron 5 mL de etanol al 68% lentamente por las paredes. Posteriormente, se añadió 2 gotas de reactivo coralina al 0,1% y se calentó con el puño unos segundos.
- G) **Prueba de reducción del metileno.** Transferir 1 mL de solución de azul de metileno con pipeta estéril a tubos de ensaye previamente esterilizados y se adicionaron 10 mL de las muestras. Se llevaron a 37 °C en baño maría y se mezclaron para su homogeneidad y se tomó el tiempo de reducción cada 30 minutos. Se tapó el baño maría para tener en abrigo de luz las muestras.
- H) **Prueba de lactofermentación.** En tubos de ensaye se colocaron 10 mL de las muestras y se llevaron a 37 °C/ 24h en estufa.
- I) **Determinación de inhibidores. H₂O₂.** Se colocó 10 mL de cada muestra en tubos de ensaye y se adicionó a cada tubo 15 gotas del reactivo V₂O₅.
- J) **Grasa. Método Gerber.** Se transfirieron 10 mL de H₂SO₄ a un butirómetro de Gerber. Se adicionó cuidadosamente 11 mL de cada muestra y 1 mL de alcohol isoamílico. Se tapó y mezclo el butirómetro y se llevaron a la centrífuga Gerber durante 5 minutos.

6.2. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE

Con base a las normas NOM-092-SSA1-1994 [79] y NOM-112-SSA1-1994 [80], se realizó el análisis microbiológico de Mesófilos aerobios y Coliformes totales y fecales.

Por duplicado:

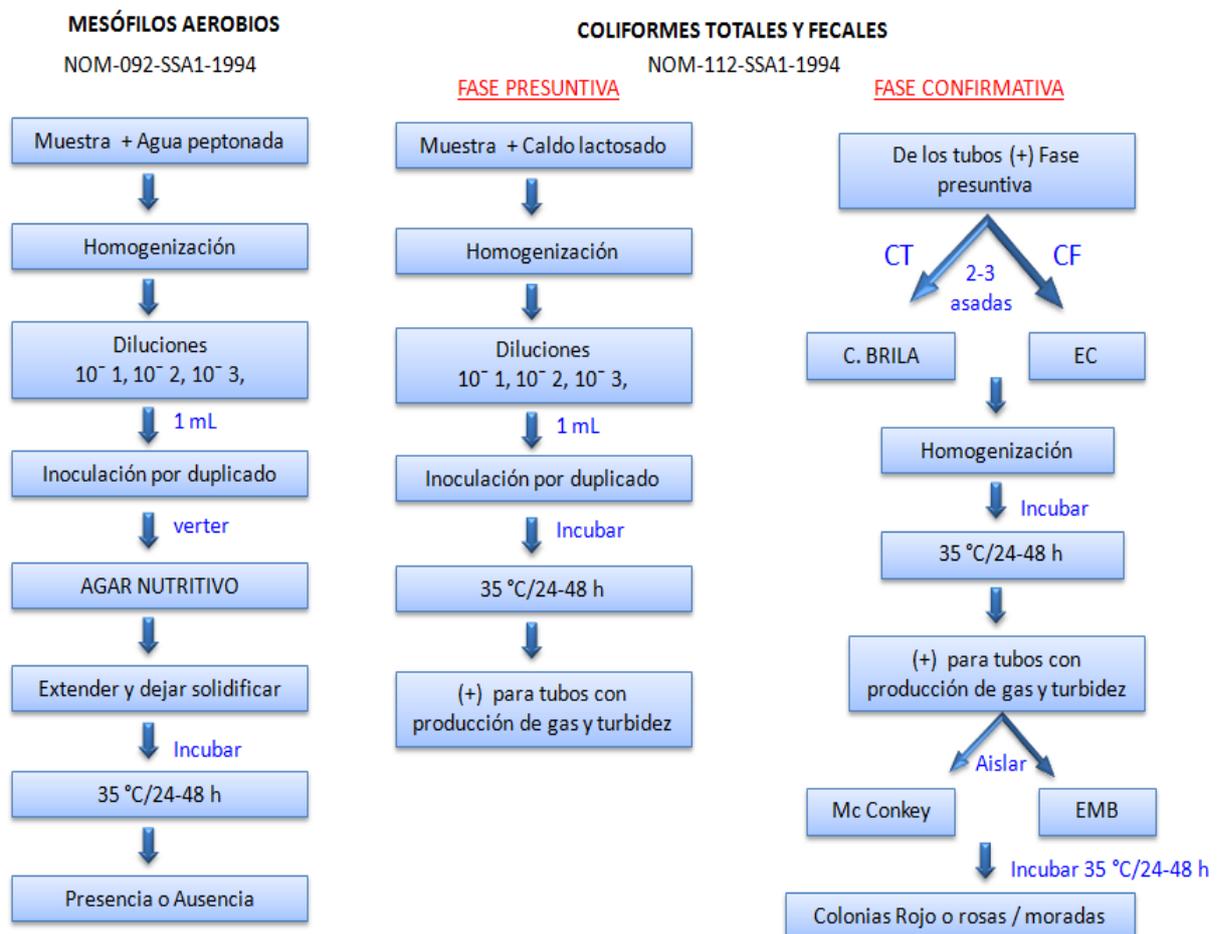


Figura 6.2. Metodología para pruebas microbiológicas de Mesófilos aerobios y Coliformes totales y fecales.

Con base a las normas NOM-115-SSA1-1994 [81], NOM-114-SSA1-1994 [82] y NOM-111-SSA1-1994 [83], se realizó el análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y Mohos y levaduras.

Por duplicado:

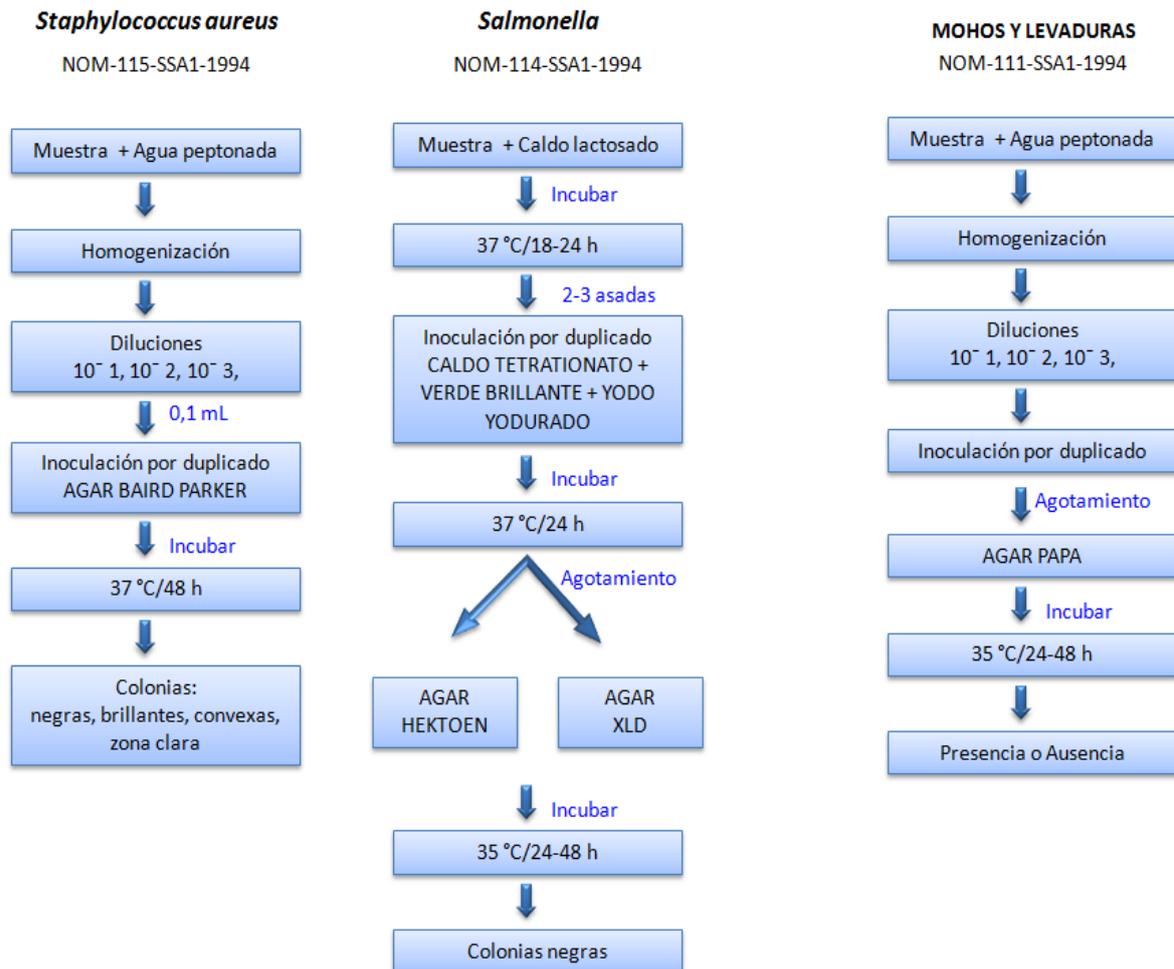


Figura 6.3. Metodología para pruebas microbiológicas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y Hongos.

6.3. METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TETRACICLINA EN LECHE

6.3.1. Caracterización y estandarización del método y límites de detección

Por triplicado:

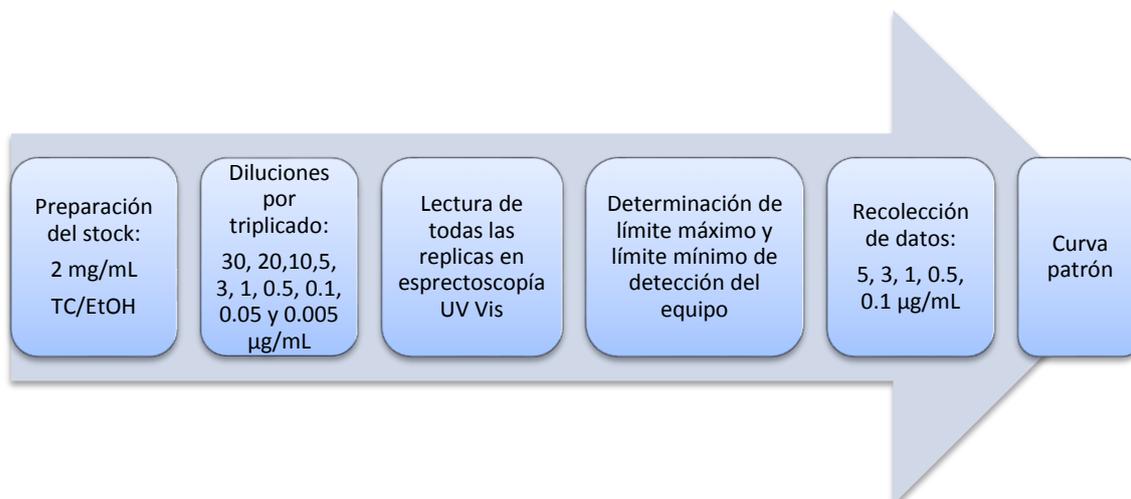


Figura 6.4. Metodología para la caracterización, estandarización, determinar límites de detección y para la obtención de la curva patrón.

6.3.2. Muestra blanco y contaminación de la muestra

La muestra blanco (muestra de leche sin contaminar) se trata con la metodología de identificación y cuantificación de tetraciclina que se muestra en la figura 6.6. Para la contaminación de las muestras de leche se muestra la metodología en la figura 6.5.

Por triplicado



Figura 6.5. Metodología para la contaminación de las muestras de leche a partir del stock de tetraciclina.

6.3.3. Identificación y cuantificación de tetraciclina

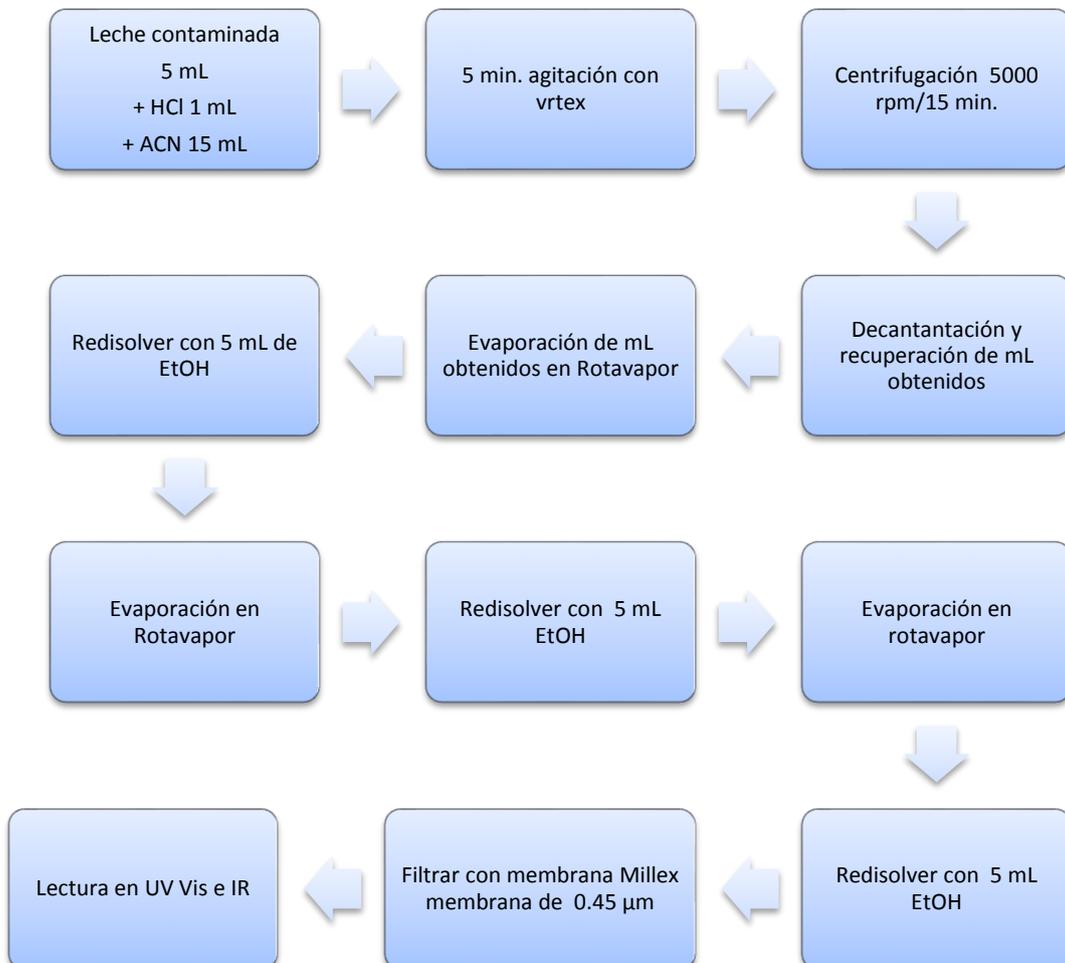


Figura 6.6. Metodología la determinación y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de proponer un método alternativo para la determinación de tetraciclina presente en leche usando Espectroscopia UV-Visible e IR, es que se combinan dos técnicas analíticas (cuantitativa y cualitativa, respectivamente) para la determinación y caracterización únicamente de este antibiótico.

7.1. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE

Para saber si las leches analizadas son aptas para consumo o bien, útil para su uso en fabricación de subproductos, se debe comprobar si su estado es normal y fresco, y determinar si ha sufrido algún tipo de alteración por adulteración o por acción microbiana. Por lo cual, para las determinaciones de calidad en la leche se realizan análisis organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos.

La Tabla 7.1 resume las características organolépticas de las muestras de leches analizadas (UHT y bronca), a temperatura ambiente y evaluadas enseguida de abrir el empaque en el que se almacenan.

Tabla 7.1. Características organolépticas de muestras de leche vs normatividad vigente [3], [4], [84].

Características Organolépticas	TIPO DE LECHE		NOM-155-SCFI-2012 y MNCCLB*
	UHT	Bronca	
Textura	Fluida	poco viscosa	Fluida
Color	Blanco	poco amarilla	Blanco
Olor	Característico	Característico	Característico
Sabor	Característico	No se probó	Característico

*Manual de Normas de Control de Calidad de Leche Cruda.

De la Tabla 7.1, podemos clarificar que tanto la textura como el color de la leche bronca, no cumplen con las especificaciones establecidas. Esto puede indicar posible alteración por acción microbiológica, dado que el desarrollo microbiano en la leche ocasiona una serie de modificaciones fisicoquímicas, donde la textura se altera por la capacidad de ciertos organismos de producir polisacáridos, mientras que la coloración amarilla puede

indicar crecimiento de ciertos microorganismos o bien por presencia de riboflavina¹³ por adulteración de suero de queserías [84].

En la Tabla 7.2 y 7.3 se muestran los resultados tanto el análisis químico proximal y su comparación con la normatividad de la leche UHT y la leche bronca, para verificar si cumplen o no cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos en la norma NOM 155-SCFI-2012 [3] y en el Manual de Normas de Control de la Leche Cruda [4].

Tabla 7.2. Análisis químico proximal de las muestras de leche UHT y bronca.

MUESTRA	DETERMINACIÓN					
	Hidratos de carbono (g azúcar/100g muestra)	Humedad (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	% Sólidos totales	Cenizas (%)
Bronca	2.02	88.741	2.431	2.580	11.260	2.433
UHT	3.02	88.166	2.66	2.948	11.834	2.033
NORMATIVIDAD NOM 155-SCFI-2012 y MNCCLB*	4.3 a 5.2 y 4.9	**	Mín. 3.0 y 3.5	Mín. 3.0 y 3.4	11.5 a 12.5 y 12.4	**

*Manual de Normas de Control de Calidad de Leche Cruda; **No especificado; Los resultados de las medias son por triplicado y con un CV<5.

Para determinar si existe diferencia significativa en las varianzas (ANOVA) entre las muestras de leche y las determinaciones, se realizó un estadístico de análisis de varianza para obtener evidencia estadística y aceptar ($H_0 = \mu_0 = \mu_1$)¹⁴ o rechazar ($H_1 = \mu_0 \neq \mu_1$) si las muestras de leche cumplen o no con las normas establecidas. En la Tabla 7.3, se observan los resultados de la ANOVA y en el anexo 1, se muestra el desarrollo del estadístico.

¹³ Pigmento amarillo verdoso fluorescente que solo se observa en el lactosuero.

¹⁴ Dónde: H_0 : es la hipótesis nula; $\mu_0 = \mu_1$: igualdad entre varianzas.

H_1 : es la hipótesis verdadera; $\mu_0 \neq \mu_1$: diferencia entre las varianzas.

Tabla 7.3. Análisis de varianza del análisis químico proximal de las muestras de leche.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIAS DE CUADRADOS	ESTADÍSTICO DE PRUEBA / ESTADÍSTICO DE TABLAS ¹⁵
Entre leches	2.85	1	2.85	F ₀ =0.03
Entre Determinaciones	11923.44	5	---	
Del error	443.96	5	88.79	f _{0.05,1,5} =6.61
Total	12370.25	11	---	
Conclusión	F ₀ < f _{α,(a-1),(a-1)(b-1)}			

En la Tabla 7.4 y 7.5 se muestran los resultados de la calidad de la leche y su comparación con la normatividad, así como, los resultados del estadístico de análisis de varianza (respectivamente) para determinar si existe diferencia significativa entre las varianzas de dichos resultados y verificar si cumplen o no con las especificaciones o requerimientos establecidos en la norma NOM 155-SCFI-2012 [3] y en el Manual de Normas de Control de la Leche Cruda [4]. En el anexo 2, se muestra el desarrollo del estadístico.

¹⁵ Tablas de distribución F de área 0.05.

Tabla 7.4. Calidad de las muestras de leche UHT y bronca y su comparación con la normatividad.

MÉTODO	TIPO DE LECHE		NORMATIVIDAD
	UHT	Bronca	NOM 155-SCFI-2012; MNCCLB*
Temperatura (°C)	20	20	x
Prueba Lactométrica (°Q)	28.08	29.03	28 a 34 °Q
Densidad (g/mL)	1.02808	1.03	1.029 mín.
pH	6.55	6.32	6.5 a 6.7
% de acidez	0.18	0.23	0.13 a 0.17% ác. Lac. y 0.13 a 0.16% ác. Lac. Para leche bronca
Ácido láctico (°D)	18	23	14 a 16 °D
Soxlet-Henkel (°SH)	8	10.22	1 °SH=2.25 °D
Alcohol	Negativo	Positivo	Negativo
Neutralizantes	Negativo	Positivo	x
Azul de metileno	Negativo	Positivo	x
Lactofermentación	Negativo	Cuajada definida	x
Inhibidores (Peróxido)	Negativo	Negativo	Negativo
% Sólidos no grasos	7.54	7.9	8.5 a 9.0%

*Manual de Normas de Control de Calidad de Leche Cruda; x: Valores específicos de acuerdo a los resultados obtenidos

A continuación, en la Tabla 7.5 se muestran los resultados del estadístico de análisis de varianza para obtener evidencia estadística y aceptar ($H_0 = \mu_0 = \mu_1$) o rechazar ($H_1 = \mu_0 \neq \mu_1$) si las muestras de leche cumplen o no con las normas establecidas.

Tabla 7.5. Análisis de varianza de la calidad de las muestras de leche.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIAS DE CUADRADOS	ESTADÍSTICO DE PRUEBA / ESTADÍSTICO DE TABLAS
Entre leches	0.128	1	0.128	F ₀ =1.233
Entre Determinaciones	1062.563	4	---	
Del error	0.415	4	0.1038	f _{0.05,1,4} =7.71
Total	1063.106	9	---	
Conclusión	F ₀ < f _{α,(a-1),(a-1)(b-1)}			

Con los datos obtenidos del estadístico de las ANOVAS de las Tablas 7.3 y 7.5, se concluye que los estadísticos de prueba son menores que los estadísticos de Tablas de distribución F, por lo que hay evidencia estadística para aceptar la H_0 que indica que no hay diferencia significativa entre las varianzas y por lo tanto las determinaciones de las muestras de leche cumplen con las normas establecidas.

Los resultados obtenidos en las Tablas 7.2-7.4, se puede concluir que en primera instancia la temperatura de las muestras de leche fue a temperatura ambiente y considerando que la leche UHT es un producto envasado y ultrapasteurizado, que no requiere refrigeración hasta que el producto sea abierto, la temperatura registrada cumple con las especificaciones establecidas en la norma, mientras que la leche bronca, por ser un producto sin proceso de esterilización y leche recién ordeñada, se espera registrar una temperatura de 0 a 5 °C para evitar crecimiento microbiano, sin embargo, el registro de la temperatura fue muy elevada (20° C), lo cual indica que, el transporte de leche desde el rancho de Xochimilco a la Facultad de Química, no fue a una temperatura adecuada.

Para la prueba lactométrica y de densidad, ambas muestras de leche cumplen con las especificaciones establecidas, sin embargo, la densidad de la muestra UHT presenta un valor de 0,001 g/mL menor al establecido, pero estadísticamente no hay diferencia significativa.

El pH de la leche bronca tiene un valor por debajo del establecido [36], lo cual indica posible acidificación por fermentación de la lactosa por desarrollo de microorganismos [36], [84]. De tal manera que el porcentaje de acidez está por encima del valor establecido. Los grados Dornic (°D) indican precipitación de caseína al haber agregado alcohol al 68% (por arriba de 20°D la reacción ocurre). Así mismo, con la prueba del alcohol indica poca estabilidad proteínica y por tanto la estabilidad para tratamiento térmico es menor y la prueba de neutralizantes indica que se agregó un compuesto alcalino para estabilizar el pH. Por otro lado, la leche UHT a pesar de tener un valor 0.01% mayor de acidez y 1°D mayor a los establecidos; no presentó precipitación de caseína indicando buena estabilidad proteínica para tratamientos térmicos.

Para calcular los grados Soxlet-Henkel (°SH), se consideró la siguiente igualdad:
 $1\text{ }^\circ\text{SH}=2.25\text{ }^\circ\text{D}$.

Los resultados de la prueba de reducción del azul de metileno, los cuales se muestran en la Tabla 7.4, indican que la muestra de leche UHT tiene alrededor de 50×10^{-4} UFC¹⁶ de microorganismos por mililitro, ya que el tiempo que tardó en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora), fue de más de 8 horas, mientras que la muestra de leche bronca tardó 2 horas, teniendo un número aproximado de microorganismos por mililitro entre 40×10^{-5} a 20×10^{-6} UFC.

En la prueba de lactofermentación se determinó que la leche UHT es de calidad óptima, porque la leche se mantuvo en estado líquido después de 24 horas de incubación. Por otro lado, la leche bronca es rica en bacterias que producen gran cantidad de enzimas tipo cuajo, siendo de calidad aceptable y sólo para la elaboración de queso.

Para la prueba de detección de inhibidores de crecimiento bacteriano, no se detectó presencia de peróxido de hidrógeno (mismo que agregan a la leche como conservador para mantener la cuenta microbiana de las muestras de leche), por lo que las pruebas fueron negativas para la leche UHT y la leche bronca.

Así mismo, los resultados obtenidos para la determinación de porcentaje de sólidos totales, los cuales se muestran en la Tabla 7.2, muestran valores inferiores a los establecidos para la leche UHT, por lo que, su contenido de componentes lípidos o liposolubles (vitaminas) en emulsión, proteínas en suspensión coloidal y glúcidos, vitaminas hidrosolubles, sales y otros componentes orgánicos e inorgánicos en solución son menores. Mientras que, la leche bronca sí cumple con las especificaciones establecidas. Sin embargo, ambas muestras de leche, presentan valores inferiores a los indicados por las normas¹⁷ para el porcentaje de sólidos no grasos, y aunque estadísticamente no hay diferencia significativa, estos valores pueden indicar que el contenido de lactosa, proteínas y minerales son menores. Los porcentajes de grasa en las muestras de leche (Tabla 7.2), muestran ser inferiores al establecido, pero tampoco muestran una diferencia significativa en el análisis de varianza.

¹⁶ Unidades Formadoras de Colonias

¹⁷ NOM 155-SCFI-2012 y el Manual de Normas de Control de Calidad de la leche Bronca.

7.2. DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

Para evaluar la presencia de microorganismos en las muestras lácteas, se estudiaron microorganismos indicadores tales como Mesófilos aerobios, Coliformes totales, Coliformes fecales, Mohos y Levaduras, así como, microorganismos patógenos como, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* (Tabla 7.6), con base a las normas establecidas vigentes. Para cada determinación, se realizó tres diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) por duplicado (#1 y#2) realizando un pre-enriquecimiento con agua peptonada para Mesofilos aerobios, *Staphylococcus aureus* y Hongos, y caldo lactosado para Coliformes y *Salmonella* como se muestra en las figuras 6.2 y 6.3.

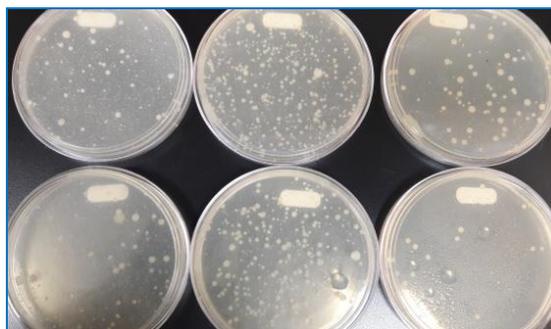
Tabla 7.6. Determinación de microorganismos indicadores y patógenos.

MICROORGANISMO	LECHE COMERCIAL	LECHE BRONCA
Mesófilos aerobios	Sin presencia	Presencia
Coliformes totales	Sin presencia	Presencia
Coliformes fecales	Sin presencia	Presencia
<i>Escherichia coli</i>	No se realizó*	Presencia
Mohos y Levaduras	Sin presencia	Presencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sin presencia	Presencia
<i>Salmonella sp.</i>	Sin presencia	Sin presencia

*No se realizó debido a que su aislamiento debía provenir de la fase presuntiva donde no hubo crecimiento bacteriano.

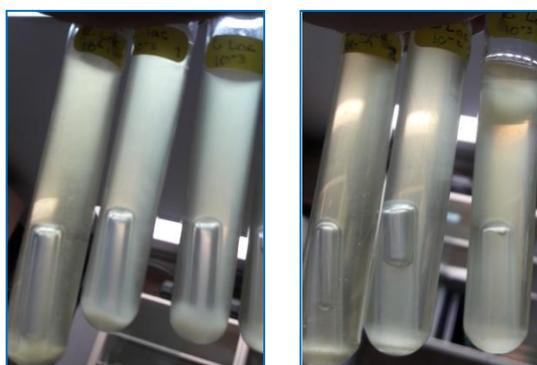
En las figuras 7.1 a 7.7 se muestra la presencia de microorganismos de las muestras.

Figura 7.1. Vertido en placa. Presencia de Mesófilos aerobios en leche bronca. Duplicados: 1 (arriba) y 2 (abajo). Diluciones: 10^{-1} (izquierda), 10^{-2} (centro), 10^{-3} (derecha).



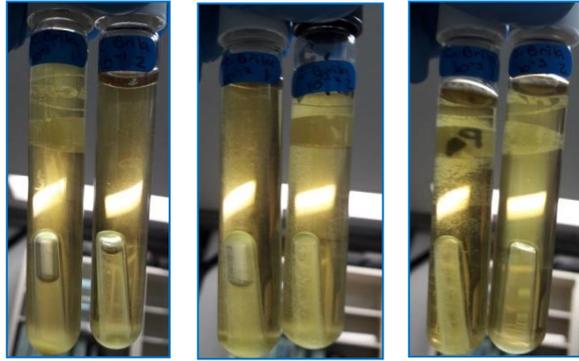
Agar Nutritivo: se observan colonias blancas y sin cambio de coloración en el medio. Indica malas condiciones de almacenamiento, materia prima expuesta al medio ambiente y posible presencia de microorganismos patógenos. Su *importancia como indicadores* que los lácteos son productos frescos y refrigerados y la leche bronca es un producto consumido por los sistemas campesinos y en la producción de subproductos artesanales.

Figura 7.2. Tubos positivos. Fase presuntiva de Coliformes totales y fecales en leche bronca. Duplicados: 1 (izquierda) y 2 (derecha). Diluciones: 10^{-1} (izquierda), 10^{-2} (centro), 10^{-3} (derecha).



Caldo Lactosado: tubos con presencia de gas y turbidez. Indican posible contaminación fecal, malas prácticas de higiene del personal y mal manejo de los animales. Su *importancia como indicador* es evidenciar la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección tanto de las ubres de la vaca así como de los utensilios dispuestos en el proceso de obtención de la leche y almacenamiento.

Figura 7.3. Tubos positivos. Fase confirmativa de Coliformes totales en leche bronca. Duplicados en cada imagen: 1 (izquierda) y 2 (derecha). Diluciones: 10^{-1} (izquierda), 10^{-2} (centro), 10^{-3} (derecha).



Caldo BRILA: tubos con presencia de gas y turbidez. Indica posible presencia de microorganismos patógenos y confirma malas prácticas de manufactura. Se eliminan falsos positivos de bacterias lácticas y levaduras por ser un medio selectivo que permite el desarrollo de microorganismos tolerantes a sales biliares y al verde brillante e inhibe el desarrollo de anaerobios facultativos fermentadores de lactosa (Gram + y la mayoría de Gram – excepto coliformes).

Figura 7.4. Tubos positivos. Fase confirmativa de Coliformes fecales en leche bronca. Duplicados en cada imagen: 1 (izquierda) y 2 (derecha). Diluciones: 10^{-1} (izquierda), 10^{-2} (centro), 10^{-3} (derecha).



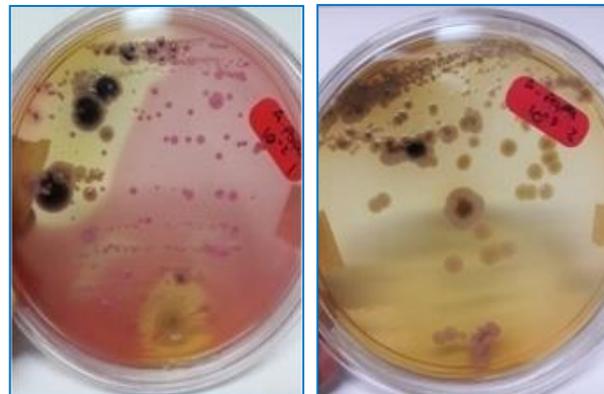
Caldo EC: tubos con presencia de turbidez pero sin presencia de gas. Confirma contaminación con heces fecales. Las sales biliares del medio inhiben el crecimiento de microorganismos Gram + mientras que los fosfatos mono y di potásico constituyen un sistema regulador de pH que impide que los productos ácidos originados por la fermentación de lactosa afecten el crecimiento microbiano manteniendo el equilibrio osmótico mediante el cloruro de sodio.

Figura 7.5. Agotamiento. Caja representativa para de *E. coli* en leche bronca.
Dilución: 10^{-1}
Duplicado: 1



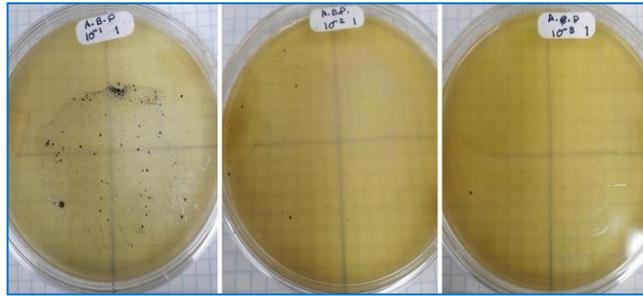
Agar EMB: presencia de colonias redondas, de color negro azulado y brillo metálico, sin cambio de color en el medio. Confirma contaminación fecal. Su *importancia como indicador* es que este microorganismo es el coliforme fecal de mayor importancia en alimentos, y la diferencia entre microorganismos capaces de utilizar lactosa y/o sacarosa y aquellos que incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno, ya que ejercen un efecto inhibitorio sobre microorganismos Gram +.

Figura 7.6. Agotamiento. Cajas representativas para mohos y levaduras en leche bronca.
Duplicados: 1 (izquierda) y 2 (derecha).
Dilución: 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente.



Agar papa: presencia de colonias de hongos y colonias de levaduras, cambio de coloración en el medio de rojo-rosa a un amarillo ambar. El desarrollo es favorecido por la glucosa y la infusión de papa mientras que el ácido tartárico inhibe crecimiento de bacterias. Su importancia como indicador es evidenciar malas prácticas de almacenamiento y contacto del producto con el aire.

Figura 7.7. Agotamiento. Cajas representativas para *S. aureus* en leche bronca.
Duplicado: 1
Diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de izquierda a derecha.



Agar Biard Parker: presencia de colonias negras metálicas con opalescencia alrededor. Por ser un medio sólido selectivo se estimula el crecimiento del patógeno por la glicina y el piruvato de sodio, mientras que el cloruro de litio inhibe la microbiota acompañante. La coloración y brillo de las colonias se debe a la reducción del Te^{4+} - Te^0 de la solución de telurito de potasio y la opalescencia a la ruptura de uniones proteínicas que liberan grasas insolubles en el medio. Confirma refrigeración inadecuada y malas prácticas de manufactura.

Podemos analizar que la leche UHT es completamente inocua porque está exenta de microorganismos indicadores y patógenos, ya que en cada uno de los análisis las pruebas fueron negativas. Por tanto, es de excelente calidad y es apta para el uso de subproductos, garantizando la salud del consumidor. Por otro lado, la leche bronca, es un producto con presencia de microorganismos indicadores y patógenos, ya que en cada una de las pruebas de análisis fueron positivas con excepción para *Salmonella*. Estos resultados obtenidos indican que hay malas prácticas de manufactura, inadecuada rutina de ordeño, contaminación fecal, fallas en el proceso de obtención, almacenamiento inadecuado y contaminación cruzada. Por consiguiente, se recomienda pasteurizar el producto lácteo antes de hacer consumo directo y emplearlo como materia prima de subproductos, pues su uso sin tratamiento térmico, podría comprometer la salud del consumidor por la presencia de las especies de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y mohos.

7.3. DETERMINACIÓN DE TETRACICLINA



Figura 7.8. Esquema de pasos representativos de la experimentación de la extracción y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche.

7.3.1. Curvas de calibración de estándares

Se identificaron las longitudes de onda (λ) correspondientes a cada uno de las señales características de la tetraciclina, los cuales se encuentran separadas aproximadamente por 200 nm de longitud de onda, como se muestra en la figura 7.9.

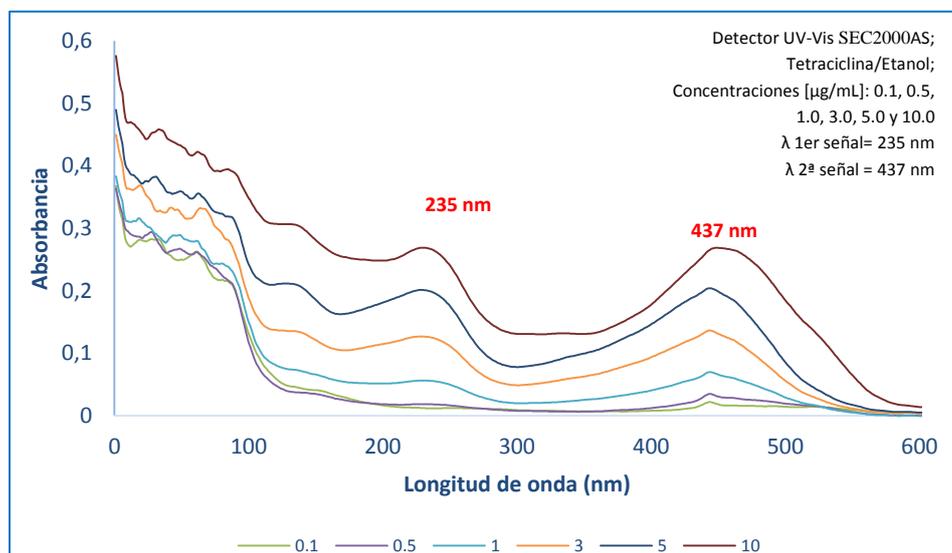


Figura 7.9. Espectro UV-Vis de los estándares de tetraciclina en etanol.

En la figura 7.9 se muestran los espectros de la tetraciclina a diferentes concentraciones. Así también, se determinaron los límites mínimos y máximos de detección y de cuantificación, el coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar (DS) y graficas de Levey-Jennings para el control de calidad interno. Inicialmente se revisó en la literatura las longitudes de onda a las que se esperaba encontrar los picos representativos para la tetraciclina y se revisaron los Límites Máximos Residuales (LMR) de tolerancia establecidos por la World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO), European Union (EU), Chinese Ministry of Agriculture y el Codex Alimentarius para establecer las concentraciones de los niveles de calibración.

Una vez establecidas las longitudes de onda de los estándares, se obtuvieron las curvas de calibración para cada señal y las ecuaciones de linealidad como se muestran en las figuras 7.10, 7.11 y en la Tabla 7.7.

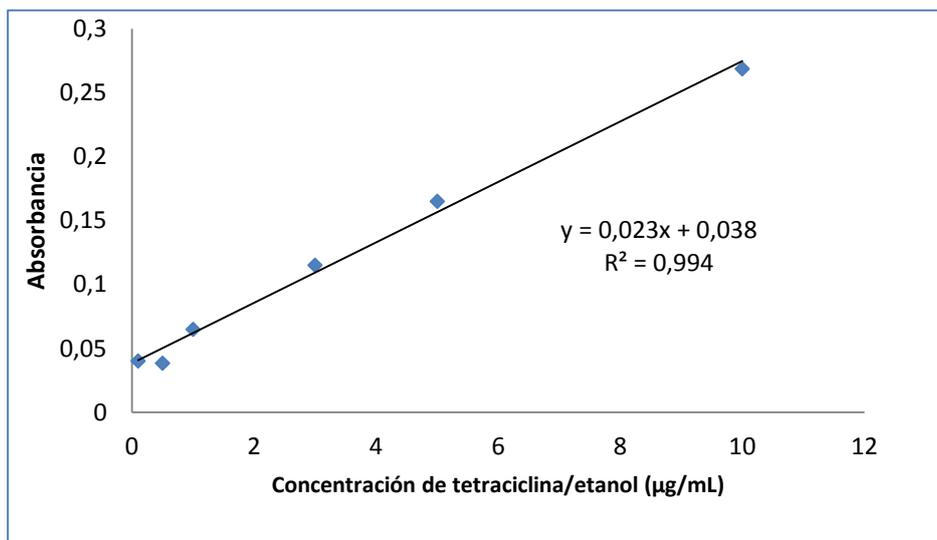


Figura 7.10. Curva de calibración para la señal de longitud de onda a 235

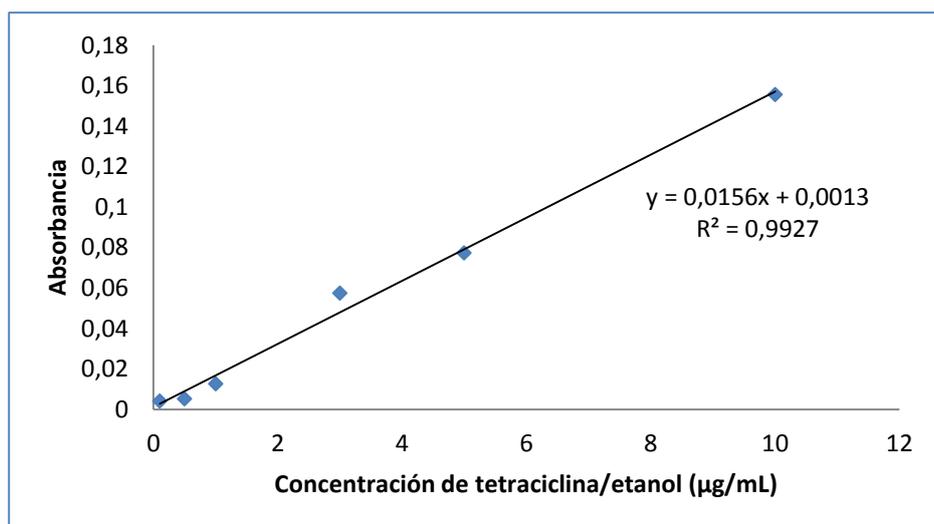


Figura 7.11. Curva de calibración para la señal de longitud de onda a 437 nm.

Los resultados obtenidos de las curvas de calibración con los estándares de tetraciclina muestran una buena linealidad de las respuestas de cada concentración de la prueba, con coeficientes de correlación lineal (R^2) de 0.99, como se muestra en la Tabla 7.7, donde se presenta la ecuación de la recta obtenida para cada señal representativa.

Tabla 7.7. Ecuaciones del comportamiento lineal de la tetraciclina.

Antibiótico	λ (nm)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación lineal (R^2)
Tetraciclina	1 ^{er} señal: 235 \pm 2	$y = 0,023x + 0,038$	0,994
	2 ^a señal: 437 \pm 2	$y = 0,015x + 0,001$	0,992

7.3.2. Validación del método

7.3.2.1. Reproducibilidad del método

Para el aseguramiento interno de calidad de la metodología, en el análisis se usaron 6 estándares de muestras de leche contaminada con tetraciclina por triplicado con los que se determinaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del equipo UV-Vis. En la Tabla 7.8 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 7.8. Límites de detección y de cuantificación de la tetraciclina.

Antibiótico	Límite de detección ($\mu\text{g/mL}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)
Tetraciclina	0.1 a 10	0.1 a 10

Espectrofotómetro de UV-Vis (SEC2000 AS), programa: Visual Spectra 2.1, $\lambda = 235$ y 437 nm, etanol:tetraciclina.

Los valores obtenidos en la Tabla 7.8 representan el promedio de los resultados obtenidos en cada ensayo, los cuales se determinaron considerando dos aspectos: la sensibilidad del equipo y el LMR del antibiótico.

La reproducibilidad del método se evalúa realizando el análisis de las muestras de leche UHT y bronca contaminadas con tetraciclina por triplicado ($n=3$). Los resultados son obtenidos por el programa *VisualSpectra 2.1* y se grafican en *Excel* para obtener los promedios de las absorbancias (figuras 7.13, 7.14, 7.16 y 7.17). En las figuras 7.12 y 7.15, se muestran las absorbancias de las leches sin tratamiento, donde se puede observar que muestran las mismas señales en la misma longitud de onda que las absorbancias de las leches contaminadas.

La desviación estándar y el coeficiente de variación se evalúan para determinar la precisión de la técnica (Tabla 7.10). Para calcular los valores se emplea la ecuación 1 y ecuación 2.

Ecuación 1:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Donde:

S: desviación estándar

x: valor de la réplica

\bar{x} : promedio

n: número total de réplicas

Ecuación 2:

$$\text{Coeficiente de Variación} = \left(\frac{S}{\bar{x}}\right) \times 100$$

En las figuras 7.13, 7.14, 7.16 y 7.17, se muestran los espectros de UV-Vis de los extractos de las leches contaminadas tras el tratamiento descrito en la figura 6.6, donde se puede observar los picos representativos de la tetraciclina. Mientras que en las figuras 7.12 y 7.15 se muestra el espectro de UV-Vis de las leches sin contaminar y con tratamiento.

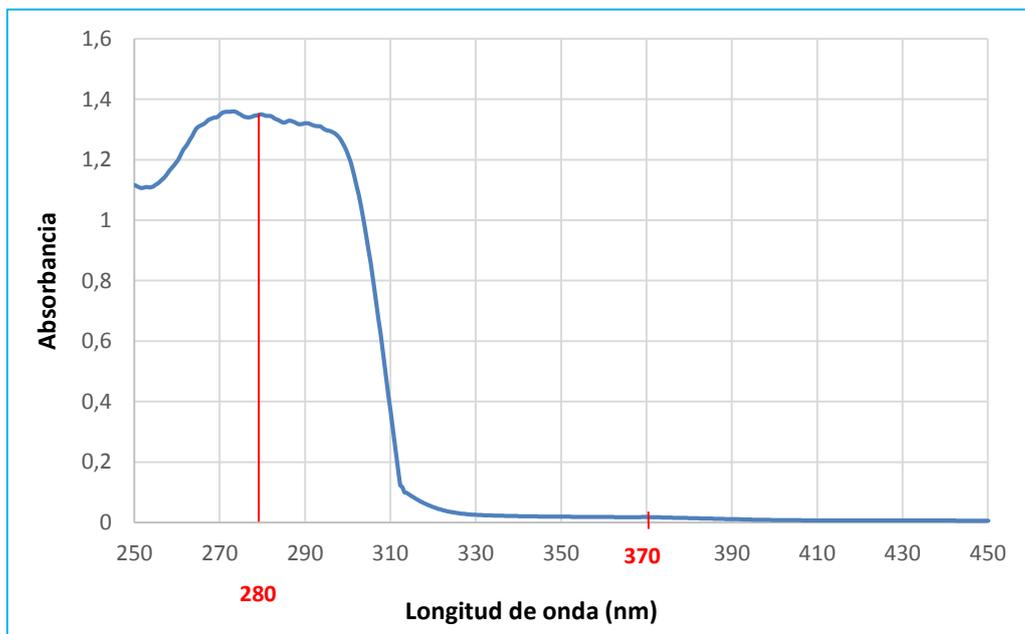


Figura 7.12. Espectro de UV- Vis de la muestra blanco de la leche UHT.

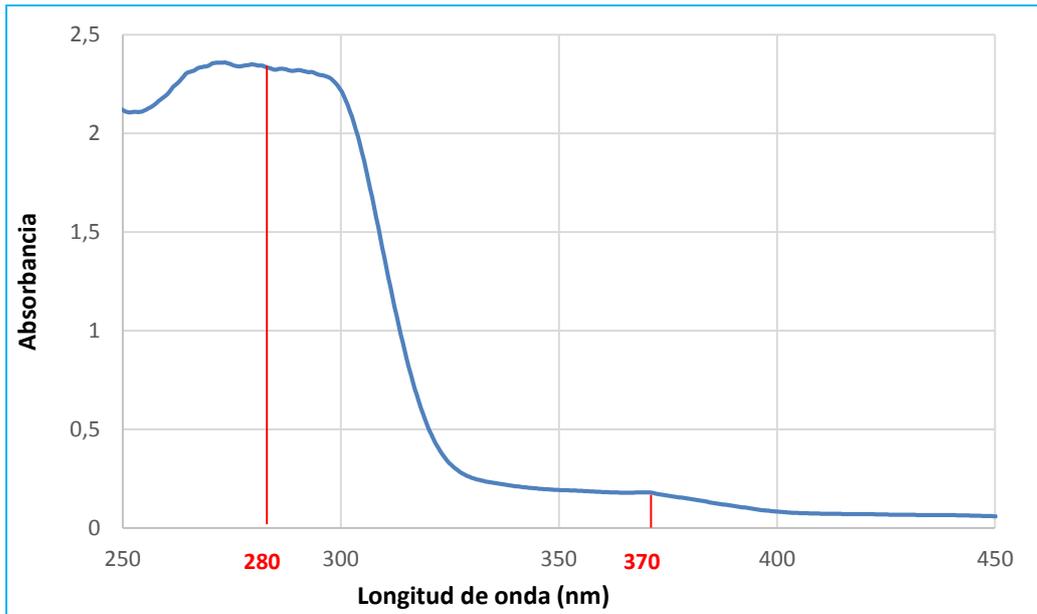


Figura 7.13. Espectro de UV- Vis del extracto de leche UHT.

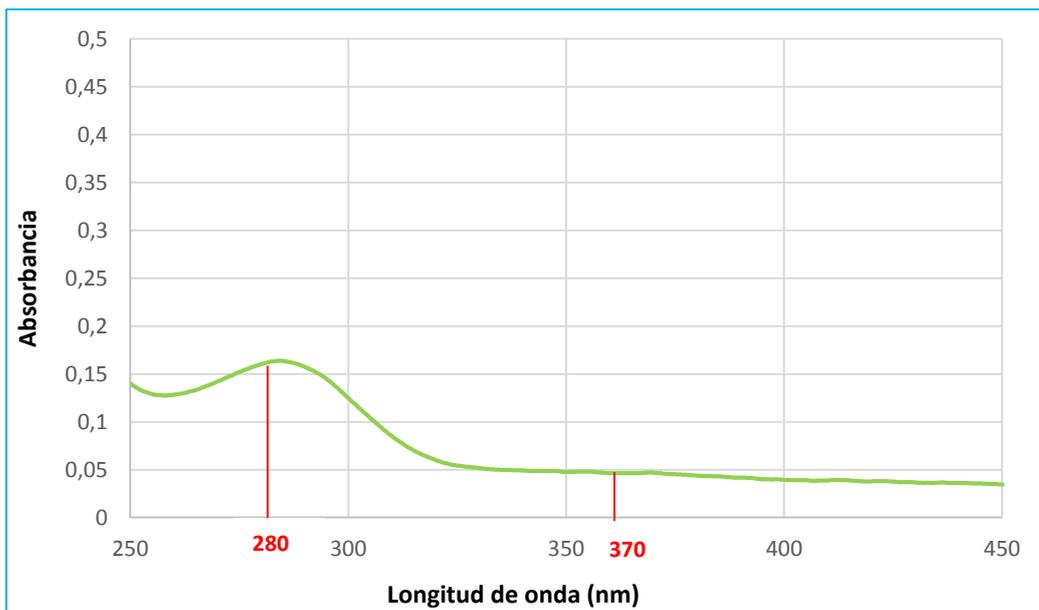


Figura 7.14. Espectro de UV- Vis de la dilución del extracto de leche UHT.

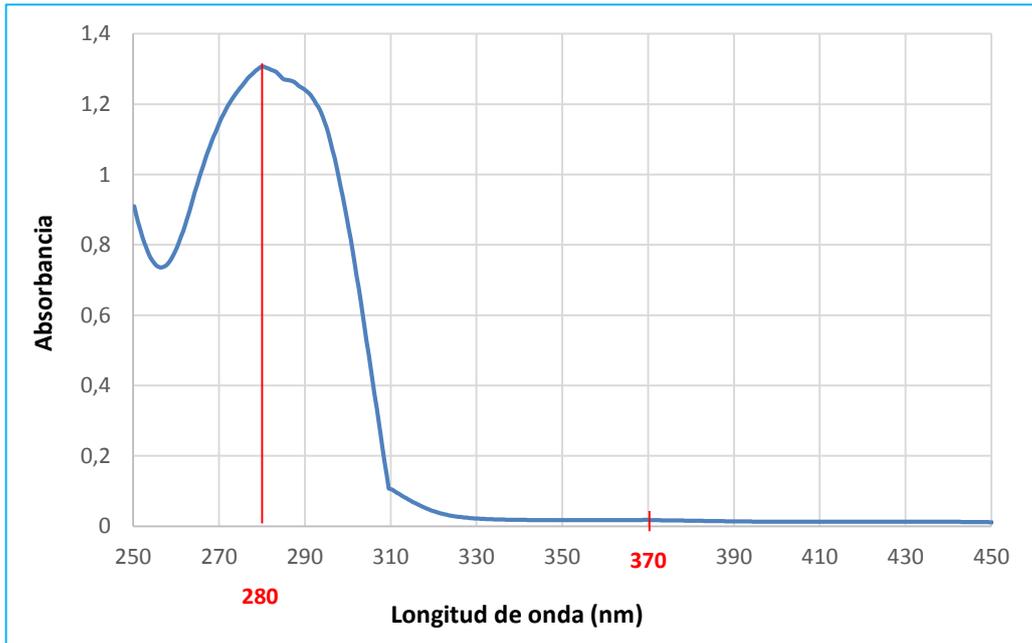


Figura 7.15. Espectro de UV- Vis de la muestra blanco de la leche Bronca.

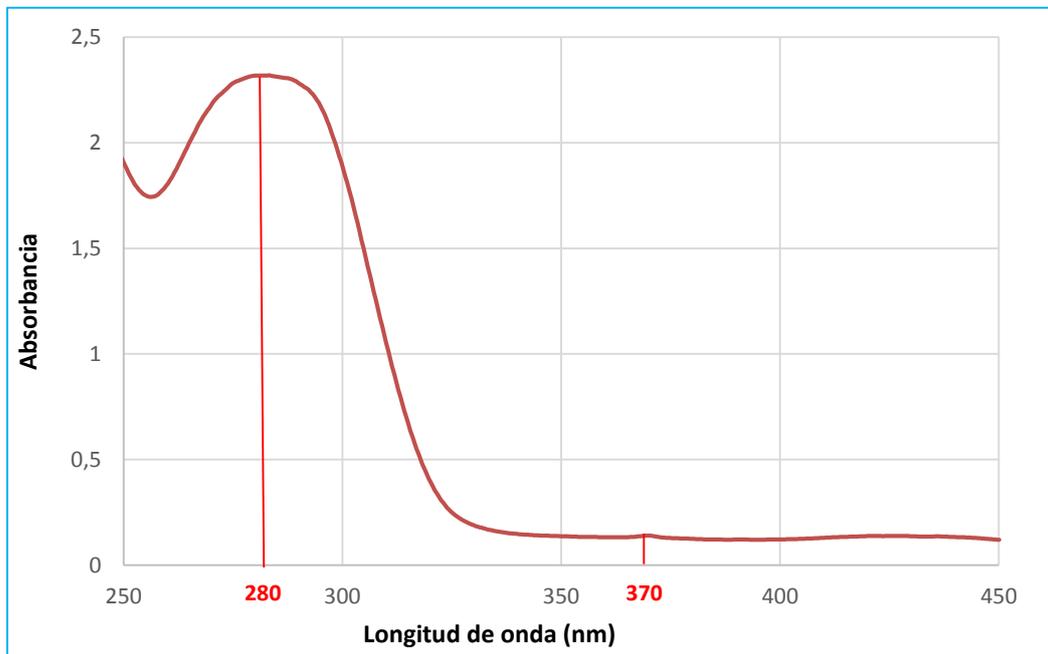


Figura 7.16. Espectro de UV- Vis del extracto de leche bronca.

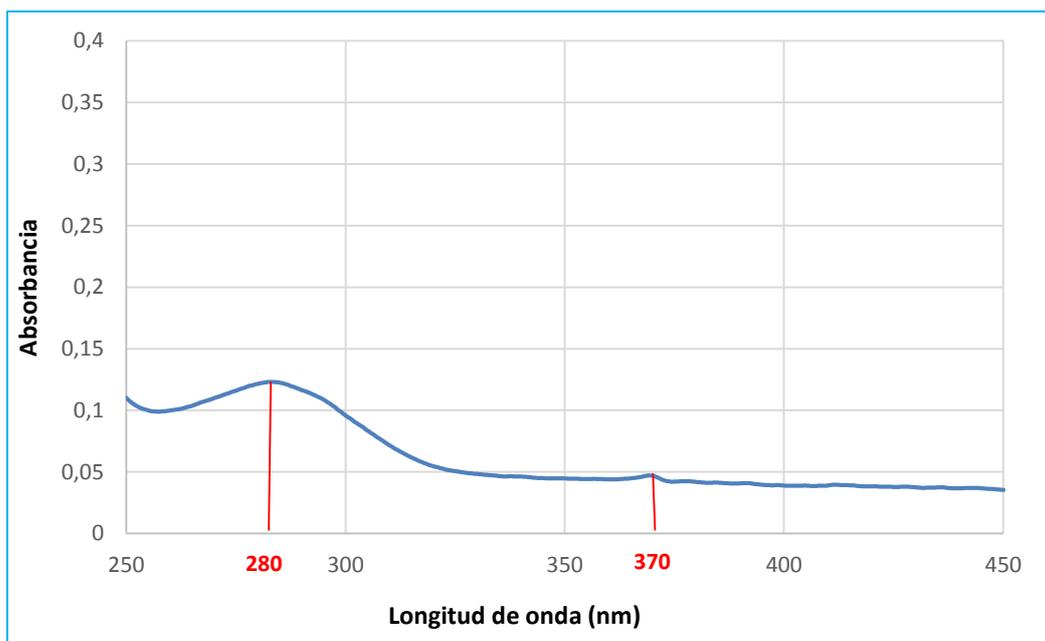


Figura 7.17. Espectro de UV- Vis de la dilución del extracto de leche bronca.

Se puede observar que los espectros correspondientes al tratamiento de la leche UHT y bronca sin contaminar, tiene señales exactamente en la misma longitud de onda que las leches contaminadas. Estas señales representan una lectura de absorbancia que permite verificar que no toda el área bajo la curva es de la tetraciclina.

De los espectros, tanto de los extractos como de las diluciones se localizó la primera señal a 280 ± 2 nm y la segunda señal a 370 ± 2 nm. En la Tabla 7.9 se muestran las longitudes de onda experimental y la reportada.

Tabla 7.9. Longitud de onda de tetraciclina experimental vs reportada [85].

Determinación	Longitud de onda (nm)	
	1 ^{er} señal	2 ^a señal
Experimental	280 ± 2	370 ± 2
Curva patrón	235 ± 2	437 ± 2
Reportada	269	360

En los valores que se presentan en la Tabla 7.9 se observa que las longitudes de onda correspondientes al experimental y los reportados en la literatura, existe un desplazamiento de 10 nm entre sí, mientras que, las longitudes de onda entre la curva patrón y las experimentales, existe a lo más 45 nm y 67 nm respectivamente.

Los desplazamientos encontrados entre las señales pueden explicarse a la diferencia de los tratamientos en las muestras de leches, ya que, en el caso de las longitudes de onda reportadas y la obtenida experimentalmente, las extracciones y el uso de diferentes reactivos son diferentes.

En el caso de la determinación de las longitudes de onda en la curva patrón, no llevo un tratamiento como el de las muestras de leche, esto explica la diferencia entre las longitudes de onda en las que se observaron las señales en ambos casos.

Para determinar la precisión de la técnica, se realiza una dilución de 3:100 de cada uno de los extractos de las leches UHT y Bronca para obtener valores de absorbancia aceptables, tomando una alícuota de 90 μ L del extracto en 3 mL de etanol, los resultados se muestran en la Tabla 7.10.

Tabla 7.10. Reproducibilidad de la tetraciclina en las muestras de leche.

Extracto de leche	Coeficiente de variación (%CV)		Desviación estándar (S)	
	1 ^{er} señal	2 ^a señal	1 ^{er} señal	2 ^a señal
UHT	4.69	4.62	1.16×10^{-1}	8.229×10^{-3}
Bronca	0.28	3.29	6.45×10^{-3}	5.784×10^{-3}
UHT diluida	1.31	4.07	1.69×10^{-3}	1.995×10^{-3}
Bronca diluida	3.55	7.94	4.481×10^{-3}	4.068×10^{-3}

La precisión, expresada como coeficiente de variación, de las áreas de cada uno de los compuestos presentan valores menores al 10% lo que significa que los valores obtenidos son reproducibles y por tanto la metodología empleada es estadísticamente confiable.

Además, se dispone de gráficos de Levey-Jennings para complementar el control de calidad interno y así determinar si el procedimiento de medición está bajo o fuera de control, donde a partir de la media y la desviación estándar se establecen límites de decisión (Tabla 7.11 y 7.12) y se crea el gráfico (figuras 7.18 y 7.19).

Tabla 7.11. Control Levey-Jennings de los extractos de tetraciclina de las muestras de leche UHT y Bronca.

Número de datos (n)	6
Media (\bar{x})	2,3868 $\mu\text{g/mL}$
Desviación Estándar (DS)	0,1110 $\mu\text{g/mL}$
1s	0,11104 $\mu\text{g/mL}$
2s	0,2221 $\mu\text{g/mL}$
3s	0,3331 $\mu\text{g/mL}$
Límites de decisión	
Para el rango $\pm 1s$	2,5025 $\mu\text{g/mL}$ 2,2712 $\mu\text{g/mL}$
Para el rango $\pm 2s$ (Límite de precaución)	2,6089 $\mu\text{g/mL}$ 2,1648 $\mu\text{g/mL}$
Para el rango $\pm 3s$ (Límite de control)	2,72 $\mu\text{g/mL}$ 2,0537 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 7.12. Control Levey-Jennings de las diluciones de los extractos de tetraciclina de las muestras de leche UHT y Bronca.

Número de datos (n)	6
Media (\bar{x})	0,1275 $\mu\text{g/mL}$
Desviación Estándar (DS)	0,0034 $\mu\text{g/mL}$
1s	0,0034 $\mu\text{g/mL}$
2s	0,0068 $\mu\text{g/mL}$
3s	0,0102 $\mu\text{g/mL}$
Límites de decisión	
Para el rango $\pm 1s$	0,1309 $\mu\text{g/mL}$ 0,1242 $\mu\text{g/mL}$
Para el rango $\pm 2s$ (Límite de precaución)	0,1343 $\mu\text{g/mL}$ 0,1208 $\mu\text{g/mL}$
Para el rango $\pm 3s$ (Límite de control)	0,1377 $\mu\text{g/mL}$ 0,1174 $\mu\text{g/mL}$

En las figuras 7.18 y 7.19, se muestran los gráficos de Levey-Jennings que complementan el control de calidad interno de la reproducibilidad de la metodología diseñada para la determinación y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche.

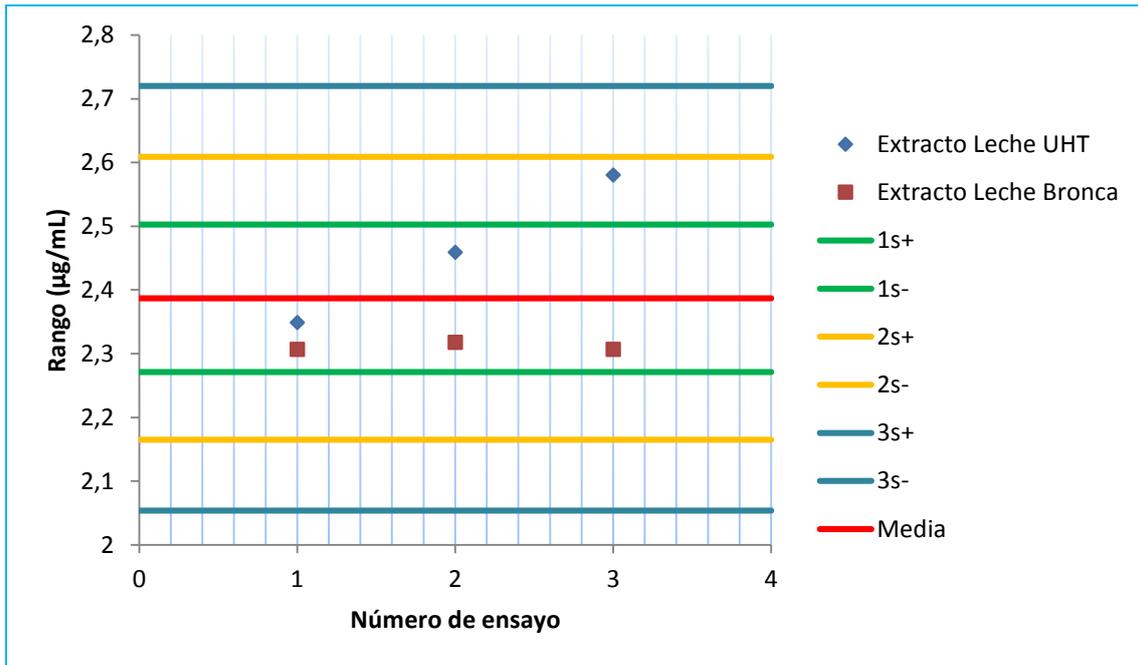


Figura 7.18. Gráfica Levey-Jennings. Precisión de las pruebas del extracto de las muestras de leche.

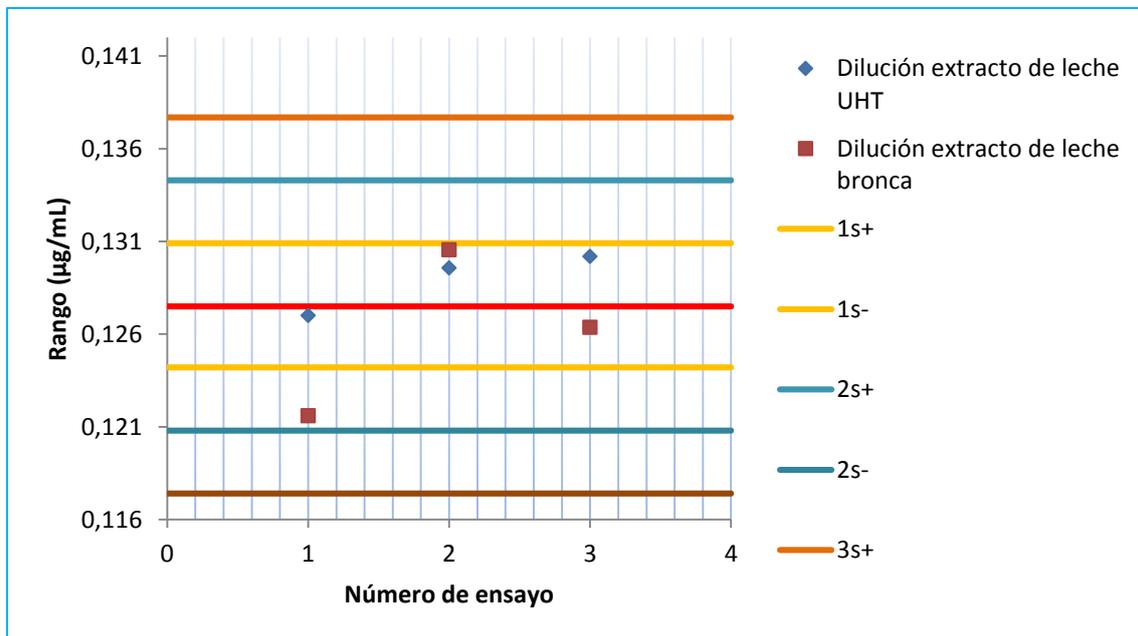


Figura 7.19. Gráfica Levey-Jennings. Precisión de las pruebas de las diluciones del extracto de las muestras de leche.

Los resultados del control de calidad forman una Distribución Gaussiana (figura 7.20) [86], donde, la gráfica de precisión de las pruebas del extracto de las muestras de leche (figura 7.18) el 68% de los datos caen dentro de los límites de $\pm 1s$ y el 32% de los datos de la gráfica de precisión de las pruebas de las disoluciones del extracto de las muestras de leche (figura 7.19) caen fuera o son mayores al límite $\pm 1s$, del cual, solo un dato se encuentra dentro de los límites de $\pm 2s$. Por lo tanto, la metodología para la determinación y cuantificación de tetraciclina es aceptada.

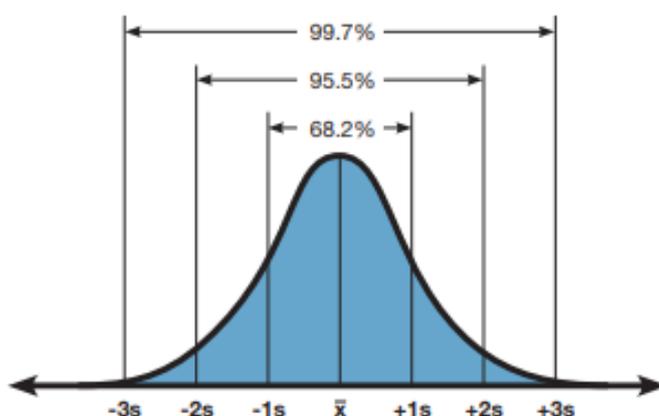


Figura 7.20. Ejemplo de gráfica de Distribución Gaussiana [86].

Con lo anteriormente expuesto, la técnica utilizada para la extracción y cuantificación de tetraciclina en muestras de leche, es confiable de acuerdo con los límites establecidos.

El método de extracción de tetraciclina en leche y la correspondiente cuantificación mediante UV-Vis es un método alternativo para la determinación de este antibiótico. Dado que existen varios estudios reportados para la determinación simultánea de diversas tetraciclinas mediante HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) apoyado de otros métodos de detección (anexo 3), ningún estudio es únicamente enfocado a tetraciclina, sin embargo, la determinación de tetraciclina mediante UV-Vis con IR¹⁸ es una manera simple y precisa de identificar la presencia del antibiótico en muestras de leche. Como se mencionó anteriormente, debido a las diferentes formas de extracción (ya sea por los reactivos empleados y técnicas) las longitudes de onda

¹⁸ El uso de IR es una técnica que se emplea cualitativamente. Identifica y corroborar la presencia de tetraciclina mediante su estructura molecular a partir de sus grupos funcionales.

reportadas en diversos estudios varia para los picos característicos. En este estudio, y con la finalidad de presentar una metodología eficiente y práctica, el proceso de extracción de tetraciclina fue mediante el rompimiento de la emulsión y suspensión de la leche con acetonitrilo y ácido clorhídrico, con agitación y centrifugación.

7.3.3. Recuperación de tetraciclina en muestras de leche contaminadas (expresado en %)

La determinación se desarrolla utilizando dos muestras de leche de diferente procedencia (UHT y Bronca) con un volumen de 20 mL; este volumen se contaminó con 30 µg de tetraciclina y se dejó reposando dos días a 4°C en oscuridad. Posteriormente, por triplicado, se tomó de cada leche una alícuota de 5 mL para realizar el análisis. Seguido de la lectura de los extractos en el espectrofotómetro de UV-Vis, se hace una disolución (3:100) de cada uno de ellos para obtener las lecturas que entraran en el rango de absorción máximo (≤ 1). Una vez que se obtuvieron los espectros se calcula la concentración de cada señal con las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración (Tabla 7.7) y así calcular el porcentaje de recuperación de cada muestra.

Las ecuaciones (3 y 4) empleadas para calcular los porcentajes de recuperación se muestran a continuación.

$$\text{Concentración inicial del extracto} = \frac{(\mu\text{g extracto diluido})(\text{mL disolvente})}{\text{mL alícuota}}$$

Ecuación 3

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\mu\text{g del extracto}}{\mu\text{g de la concentración inicial}} \times 100$$

Ecuación 4

Con base a los μg obtenidos de los extractos y de las diluciones se obtuvieron los resultados de % de recuperación para la leche UHT y leche bronca (apartado 7.3.3.1 y 7.3.3.2).

7.3.3.1. Leche UHT

Se obtuvieron los siguientes resultados para los extractos de la leche UHT:

Tabla 7.13. Porcentaje de recuperación de la tetraciclina (TC) en leche UHT.

1 ^{er} señal	μg del extracto de TC	μg de la dilución del extracto de TC	Concentración inicial ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Porcentaje de recuperación (%)
Muestra 1	100.4917	3.867	128.9	78
Muestra 2	105.2787	3.9817	132.72	79
Muestra 3	110.5421	4.0083	177.09	83
2^a señal			Promedio	80
Muestra 1	12.0027	3.3071	110.24	11
Muestra 2	12.2215	3.2397	107.99	11
Muestra 3	11.1809	3.0506	101.69	11
			Promedio	11

7.3.3.2. Leche bronca

Se obtuvieron los siguientes resultados para los extractos de la leche Bronca:

Tabla 7.14. Porcentaje de recuperación de la tetraciclina (TC) en leche bronca.

1 ^{er} señal	μg del extracto de TC	μg de la dilución del extracto de TC	Concentración inicial ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Porcentaje de recuperación (%)
Muestra 1	98.6496	3.6344	121.1467	81
Muestra 2	99.1352	4.0238	133.4	74
Muestra 3	98.6495	3.8419	186.03	77
2^a señal			Promedio	77
Muestra 1	11.8729	3.0354	101.18	12
Muestra 2	11.205	3.489	116.32	10
Muestra 3	11.8729	3.3481	111.6	11
			Promedio	11

Los resultados de las Tablas 7.13 y 7.14 muestran que para la primera señal de ambas leches, los porcentajes de recuperación están por arriba de 77 a 80% lo que nos indica que el método empleado de extracción con acetonitrilo y ácido clorhídrico durante 15 minutos es suficiente para romper la emulsión y suspensión de la leche y de esta manera aislar las partículas que intervienen en las lecturas de UV-Vis.

La técnica de lavado y purificación empleada (etanol y evaporación) proporciona buenos resultados al eliminar tanto los disolventes usados en la extracción, así como, partículas de la leche y lograr la afinidad del antibiótico al disolvente que se usa como matriz para las lecturas en el espectrofotómetro, mientras que la técnica de filtración elimina el resto de la materia orgánica presente en la muestra.

7.3.4. Identificación con espectroscopia Infrarroja (IR)

La espectroscopia de infrarrojo se aplicó con la finalidad de identificar la tetraciclina de manera cualitativa, ya que por medio de los espectros se puede deducir las estructuras moleculares por medio de los grupos funcionales que forman a este antibiótico.

A continuación, se muestran los espectros obtenidos de la tetraciclina pura en polvo y del disolvente (etanol) utilizado como matriz (figura 7.21), de la curva de calibración (figura 7.22), así como, de los extractos y sus diluciones de las muestras de leches contaminadas (figuras 7.23, 7.24, 7.25 y 7.26).

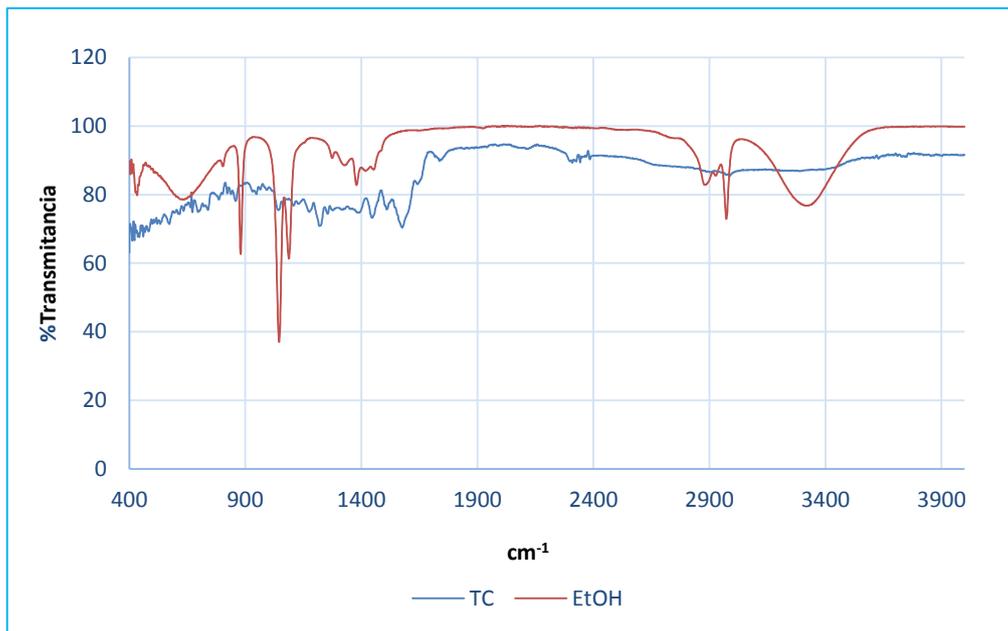


Figura 7.21. Espectros de Infrarrojo de tetraciclina y etanol.

En la figura 7.21 se muestran los espectros de Infrarrojo para el antibiótico (tetraciclina) y para el disolvente (etanol), con los cuales, se puede descartar los picos característicos del disolvente en los espectros de las muestras de leche con tratamiento, y al mismo tiempo, identificar los picos característicos del antibiótico tras el tratamiento de las muestras.

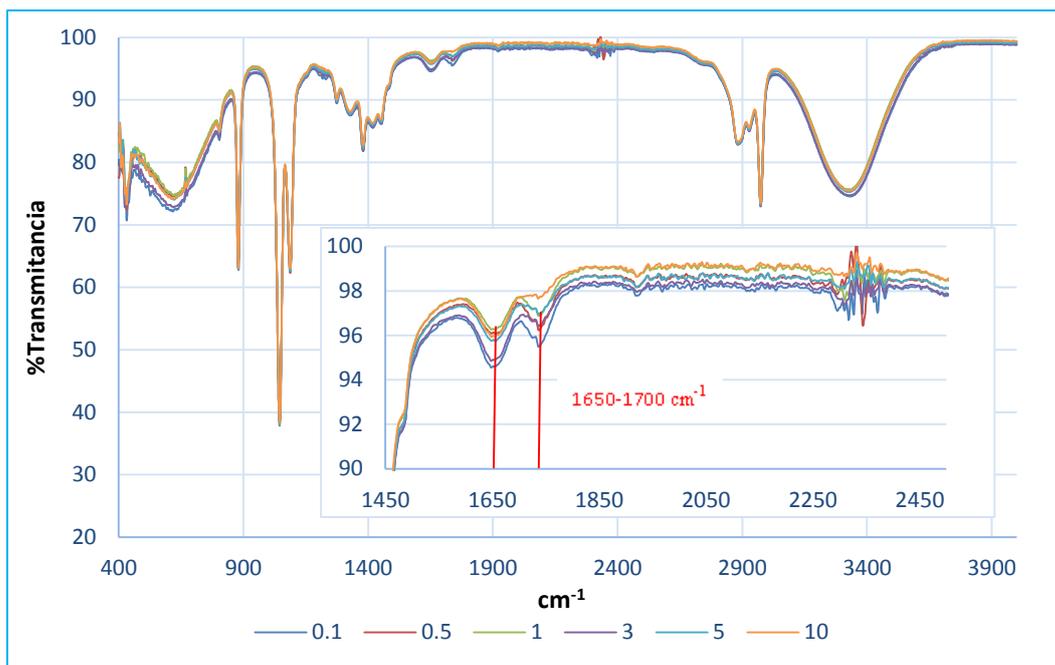


Figura 7.22. Espectro IR de la Curva de calibración.

En las bandas de la región de 1450 a 1700 cm⁻¹ se indica la presencia de anillos aromáticos.

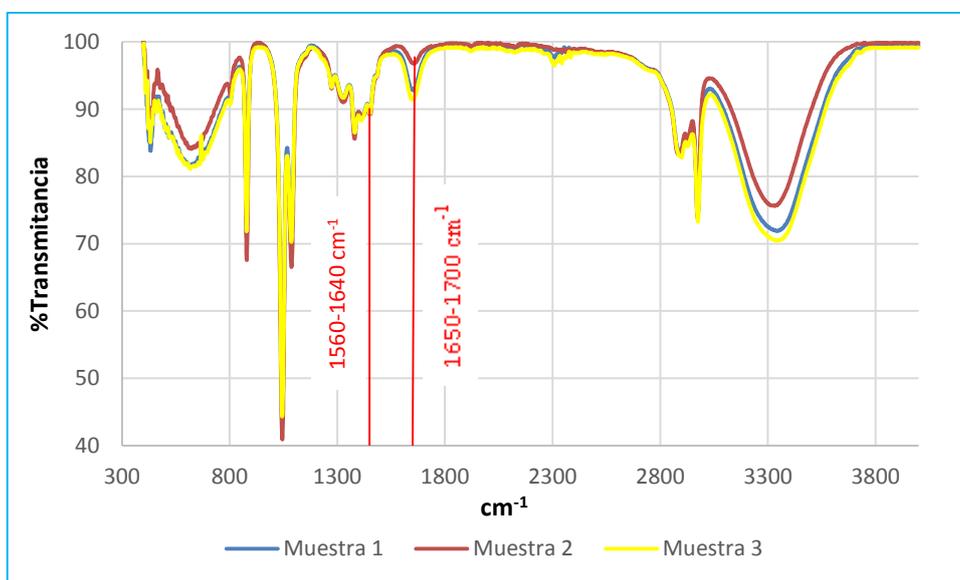


Figura 7.23. Espectro IR de los extractos de leche UHT.

En la región 1560 a 1640 indica una torsión en el plano de una amina secundaria que se representa como una banda gordita.

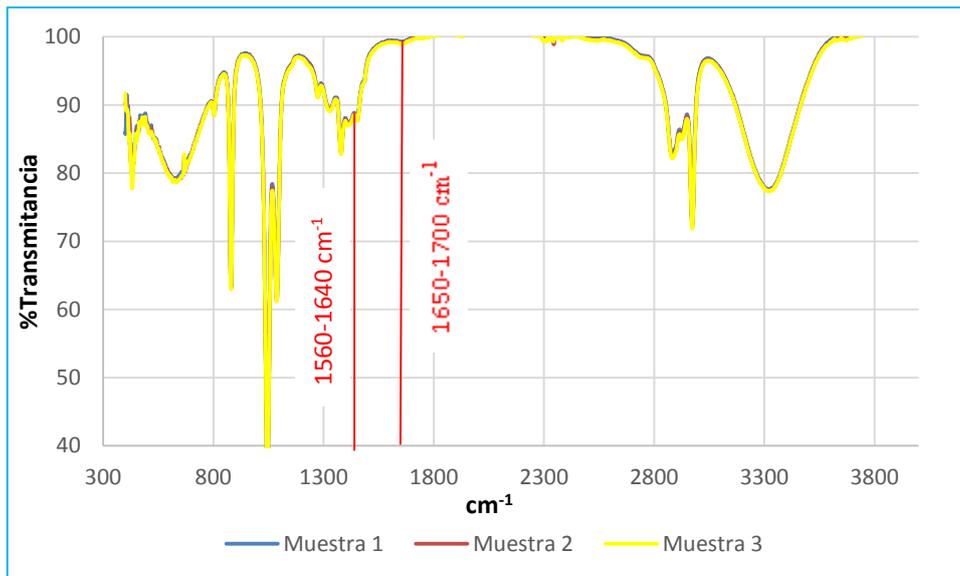


Figura 7.24. Espectro IR de diluciones de los extractos de leche UHT.

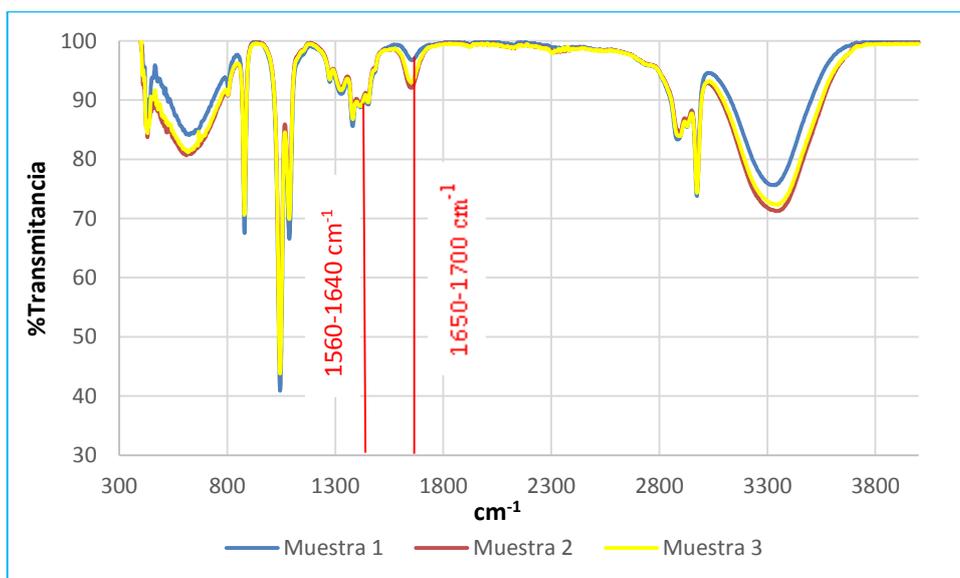


Figura 7.25. Espectro IR de los extractos de leche bronca.

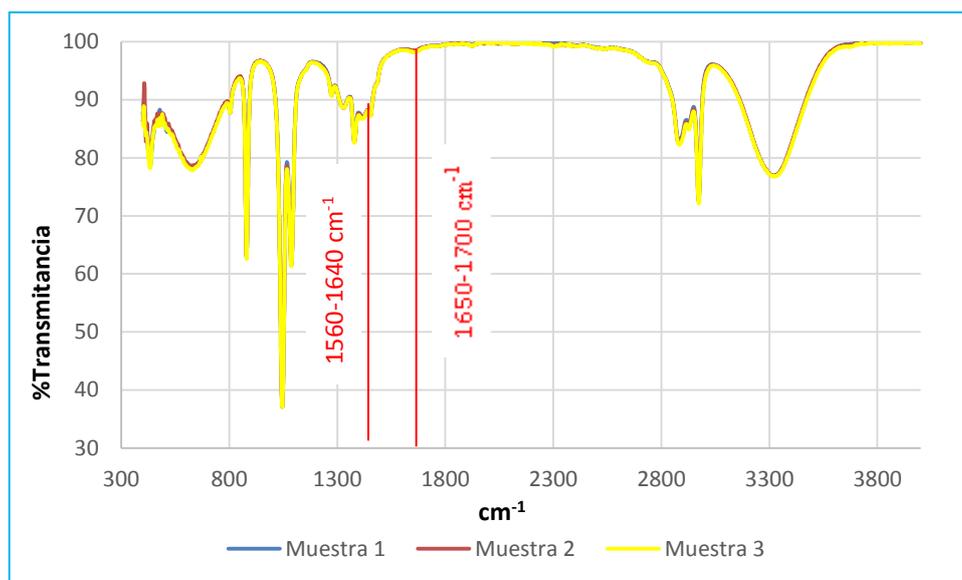


Figura 7.26. Espectro IR de las diluciones de los extractos de leche bronca.

Las figuras 7.23 a 7.26 de los espectros de IR confirman la presencia de los grupos funcionales de la tetraciclina.

8. CONCLUSIONES

- Con la técnica propuesta de extracción y cuantificación, se logró obtener porcentajes de recuperación de tetraciclina en las muestras de leche contaminadas de 77% a 80% para la señal de 280 nm y para la señal de 370 nm de 11%.
- Con la técnica de Espectroscopia de Infrarrojo se identificó los grupos funcionales de las moléculas de la tetraciclina, siendo así una técnica confirmativa en la metodología de determinación.
- Mediante el análisis de varianza del Análisis Químico Proximal y de la calidad de la leche UHT y bronca, se confirmó que no existe diferencia significativa en las determinaciones de los resultados obtenidos y la normatividad vigente.
- Los análisis microbiológicos confirman para la leche UHT por ser un producto procesado, es de excelente calidad y asegura su inocuidad, mientras que la leche bronca, su calidad no es aceptable para consumo directo, sin embargo, la pasteurización, resuelve la presencia de microorganismos que compromete la salud del consumidor y su uso como materia prima pudiendo ser empleado para la elaboración de otros productos.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla A1.1. ANOVA de análisis químico proximal de las muestras de leche.

LECHE	TRATAMIENTOS						$\sum y_i$	$\sum y_{ij}^2$
	Hidratos de carbono	Humedad	Grasa	Proteína	% Sólidos totales	Cenizas		
UHT	y_{11}	y_{12}	y_{13}	y_{14}	y_{15}	y_{16}	$y_{1\cdot}$	y_i^2 y_j^2
Bronca	y_{21}	y_{22}	y_{23}	y_{24}	y_{25}	y_{26}	$y_{2\cdot}$	
$\sum y_j$	$y_{\cdot 1}$	$y_{\cdot 2}$	$y_{\cdot 3}$	$y_{\cdot 4}$	$y_{\cdot 5}$	$y_{\cdot 6}$	y_{\cdot}	

Tabla A1.2. Tabla de ANOVA de análisis químico proximal de las muestras de leche.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIAS DE CUADRADOS	ESTADÍSTICO DE PRUEBA / ESTADÍSTICO DE TABLAS
Entre leches	$SS_t = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a y_i^2 - \frac{y_{\cdot}^2}{ab}$	a-1	$MS_t = \frac{SS_t}{a-1}$	$F_o = \frac{MS_t}{MS_E}$
Entre Determinaciones	$SS_B = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b y_j^2 - \frac{y_{\cdot}^2}{ab}$	b-1	---	
Del error	$SS_E = SS_T - SS_t - SS_B$	(a-1)(b-1)	$MS_E = \frac{SS_E}{(a-1)(b-1)}$	$f_{\alpha, (a-1), (a-1)(b-1)}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij}^2 - \frac{y_{\cdot}^2}{ab}$	ab-1	---	
Conclusión	$F_o < f_{\alpha, (a-1), (a-1)(b-1)}$			

ANEXO 2

Tabla A2.1. ANOVA de calidad de la leche de las muestras de leche.

LECHE	TRATAMIENTOS						$\sum y_i$	$\sum y_{ij}^2$
	Hidratos de carbono	Humedad	Grasa	Proteína	% Sólidos totales	Cenizas		
UHT	y_{11}	y_{12}	y_{13}	y_{14}	y_{15}	y_{16}	$y_{1\cdot}$	y_i^2 y_j^2
Bronca	y_{21}	y_{22}	y_{23}	y_{24}	y_{25}	y_{26}	$y_{2\cdot}$	
$\sum y_j$	$y_{\cdot 1}$	$y_{\cdot 2}$	$y_{\cdot 3}$	$y_{\cdot 4}$	$y_{\cdot 5}$	$y_{\cdot 6}$	y_{\cdot}	

Tabla A2.2. Tabla de ANOVA de análisis químico proximal de las muestras de leche.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIAS DE CUADRADOS	ESTADÍSTICO DE PRUEBA / ESTADÍSTICO DE TABLAS
Entre leches	$SS_t = \frac{1}{b} \sum_{i=1}^a y_{i.}^2 - \frac{y..^2}{ab}$	a-1	$MS_t = \frac{SS_t}{a-1}$	$F_o = \frac{MS_t}{MS_E}$
Entre Determinaciones	$SS_B = \frac{1}{a} \sum_{j=1}^b y_{.j}^2 - \frac{y..^2}{ab}$	b-1	---	
Del error	$SS_E = SS_T - SS_t - SS_B$	(a-1)(b-1)	$MS_E = \frac{SS_E}{(a-1)(b-1)}$	$f_{\alpha, (a-1), (a-1)(b-1)}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij}^2 - \frac{y..^2}{ab}$	ab-1	---	
Conclusión	$F_o < f_{\alpha, (a-1), (a-1)(b-1)}$			

ANEXO 3

Tabla A3.1. Estudios reportados para la determinación de tetraciclinas.

Reports	Method	Recognition	Real sample	Referen ces
Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor	Biosensor	tetracycline	Milk	Ref[1]
Determination of Fluoroquinolones in Milk by High-Performance Liquid Chromatography Using Mixed-Templates Imprinted Polymer Extraction	HPLC	fluoro-quinolones	Milk	Ref[2]
Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system	Voltammetric	antibiotic residues	Milk	Ref[3]
Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single	Antibody-based immunoassay	tylosin and tilmicosin	Foodstuffs	Ref[4]

antibody-based immunoassay				
Preparation of Antibodies and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of Doxycycline Antibiotic in Milk Samples	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	doxycycline	Milk	Ref[5]
Preparation of doxycycline-imprinted magnetic microspheres by inverse-emulsion suspension polymerization for magnetic dispersion extraction of tetracyclines from milk samples	Magnetic dispersion extraction	tetracyclines	Milk	Ref[6]
A chemiluminescent aptasensor for simultaneous detection of three antibiotics in milk	Chemiluminescent aptasensor	three antibiotics	Milk	Ref[7]
Preparation of tetracycline Surface Molecularly Imprinted Material for the Selective recognition of tetracycline in milk	Tetracycline Surface Molecularly Imprinted Material	tetracycline	Milk	Ref[8]
Analysis of tetracyclines from milk powder by molecularly imprinted solid-phase dispersion based on a metal-organic framework followed by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry	HPLC with tandem mass spectrometry	tetracyclines	Milk	Ref[9]
Single-hole hollow molecularly imprinted polymer embedded carbon dot for fast detection of tetracycline in honey	Polymer embedded carbon dot	tetracycline	Honey	Ref[10]

Aptamer-based photoelectrochemical biosensor for antibiotic detection using ferrocene modified DNA as both aptamer and electron donor	Photoelectrochemical biosensor	antibiotic detection	---	Ref[11]
Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption	Molecularly imprinted cryogel Adsorption	tetracycline	---	Ref[12]
Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples	SPR aptasensor	tetracycline	Honey	Ref[13]
Polyethyleneimine capped bimetallic Au/Pt nanoclusters are a viable fluorescent probe for specific recognition of chlortetracycline among other tetracycline antibiotics	Polyethyleneimine capped bimetallic Au/Pt nanoclusters	chlortetracycline and tetracycline	---	Ref[14]
A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples	Molecularly imprinted polymer-based biosensor	doxycycline	food samples	Ref[15]
Facile microwave synthesis of a Z-scheme imprinted ZnFe₂O₄/Ag/PEDOT with the specific recognition ability towards improving photocatalytic activity and selectivity for tetracycline	Imprinted ZnFe ₂ O ₄ /Ag/PEDOT	tetracycline	---	Ref[16]
Electrochemical and optical aptamer-based	Electrochemical and optical	tetracyclines	---	Ref[17]

sensors for detection of tetracyclines	aptamer-based sensors			
Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline	Fluorescent	tetracycline	---	Ref[18]
A novel visual ratiometric fluorescent sensing platform for highly-sensitive visual detection of tetracyclines by a lanthanide-functionalized palygorskite nanomaterial	Fluorescent	tetracyclines	---	Ref[19]
Label-free colorimetric detection of tetracycline using analyte-responsive inverse-opal hydrogels based on molecular imprinting technology	Colorimetric	tetracycline	---	Ref[20]
One-pot carbonization synthesis of europium-doped carbon quantum dots for highly selective detection of tetracycline	Carbonization synthesis	tetracycline	---	Ref[21]
Two optically active molybdenum disulfide quantum dots as tetracycline sensors	Optically	tetracycline	---	Ref[22]
A mesoporous fluorescent sensor based on ZnO nanorods for the fluorescent detection and selective recognition of tetracycline	Fluorescent	tetracycline	---	Ref[23]
A molecular recognition assisted colorimetric aptasensor for tetracycline	Colorimetric aptasensor	tetracycline	---	Ref[24]

A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in Honey	Assay-based aptasensor	tetracycline	Honey	Ref[24]
Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey	Assay-based aptasensor	tetracycline	Honey	Ref[25]

Tabla A3.2. Referencias de estudios reportados para la determinación de tetraciclinas.

Ref.	Report
[1]	J.K. Zhang, B.B. Zhang, Y. Wu, S.R. Jia, T. Fan, Z.Y. Zhang, C.Z. Zhang, Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor, <i>Analyst</i> , 135 (2010) 2706-2710.
[2]	P.Y. Liu, J. Shen, L. Gao, L. Liu, R. Li, Q.A. Li, Determination of Fluoroquinolones in Milk by High-Performance Liquid Chromatography Using Mixed-Templates Imprinted Polymer Extraction, <i>Asian Journal of Chemistry</i> , 22 (2010) 6275-6288.
[3]	Z.B. Wei, J. Wang, Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system, <i>Analytica Chimica Acta</i> , 694 (2011) 46-56.
[4]	M. Burkin, I. Galvidis, Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay, <i>Food Chemistry</i> , 132 (2012) 1080-1086.
[5]	J. Adrian, F. Fernandez, F. Sanchez-Baeza, M.P. Marco, Preparation of Antibodies and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of Doxycycline Antibiotic in Milk Samples, <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 60 (2012) 3837-3846.
[6]	Y.K. Lv, C.X. Zhao, P. Li, Y.D. He, Z.R. Yang, H.W. Sun, Preparation of doxycycline-imprinted magnetic microspheres by inverse-emulsion suspension polymerization for magnetic dispersion extraction of tetracyclines from milk samples, <i>Journal of Separation Science</i> , 36 (2013) 2656-2663.
[7]	L.L. Hao, H.J. Gu, N. Duan, S.J. Wu, Z.P. Wang, A chemiluminescent aptasensor for simultaneous detection of three antibiotics in milk, <i>Analytical Methods</i> , 8 (2016) 7929-7936.
[8]	Y.L. Niu, C.A. Liu, J. Yang, M.H. Ma, Y.R. Gong, Y. Wang, B.L. Gong, Preparation of Tetracycline Surface Molecularly Imprinted Material for the Selective Recognition of Tetracycline in Milk, <i>Food Analytical Methods</i> , 9 (2016) 2342-2351.

- [9] S.S. Wang, J.F. Zhang, C.Y. Li, L.G. Chen, Analysis of tetracyclines from milk powder by molecularly imprinted solid-phase dispersion based on a metal-organic framework followed by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Separation Science*, 41 (2018) 2604-2612.
- [10] H.Y. Li, L. Zhao, Y. Xu, T.Y. Zhou, H.C. Liu, N. Huang, J. Ding, Y. Li, L. Ding, Single-hole hollow molecularly imprinted polymer embedded carbon dot for fast detection of tetracycline in honey, *Talanta*, 185 (2018) 542-549.
- [11] C.J. Sui, Y.L. Zhou, M.Y. Wang, H.S. Yin, P. Wang, S.Y. Ai, Aptamer-based photoelectrochemical biosensor for antibiotic detection using ferrocene modified DNA as both aptamer and electron donor, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 266 (2018) 514-521.
- [12] E. Yesilova, B. Osman, A. Kara, E.T. Ozer, Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption, *Separation and Purification Technology*, 200 (2018) 155-163.
- [13] S. Wang, Y.Y. Dong, X.G. Liang, Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples, *Biosensors & Bioelectronics*, 109 (2018) 1-7.
- [14] N. Xu, L. Meng, H.W. Li, D.Y. Lu, Y.Q. Wu, Polyethyleneimine capped bimetallic Au/Pt nanoclusters are a viable fluorescent probe for specific recognition of chlortetracycline among other tetracycline antibiotics, *Microchimica Acta*, 185 (2018).
- [15] J. Ashley, X.T. Feng, Y. Sun, A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples, *Talanta*, 182 (2018) 49-54.
- [16] Z.Y. Lu, Z.H. Yu, J.B. Dong, M.S. Song, Y. Liu, X.L. Liu, Z.F. Ma, H. Su, Y.S. Yan, P.W. Huo, Facile microwave synthesis of a Z-scheme imprinted ZnFe₂O₄/Ag/PEDOT with the specific recognition ability towards improving photocatalytic activity and selectivity for tetracycline, *Chemical Engineering Journal*, 337 (2018) 228-241.
- [17] S.H. Jalalian, N. Karimabadi, M. Ramezani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, Electrochemical and optical aptamer-based sensors for detection of tetracyclines, *Trends in Food Science & Technology*, 73 (2018) 45-57.
- [18] C.Y. Sun, R.F. Su, J.X. Bie, H.J. Sun, S.N. Qiao, X.Y. Ma, R. Sun, T.H. Zhang, Label-free fluorescent sensor based on aptamer and thiazole orange for the detection of tetracycline, *Dyes and Pigments*, 149 (2018) 867-875.
- [19] J. Xu, X.K. Shen, L. Jia, T. Zhou, T.L. Ma, Z.Q. Xu, J.L. Cao, Z.J. Ge, N. Bi, T.F. Zhu, S.L. Guo, X.H. Li, A novel visual ratiometric fluorescent sensing platform for highly-sensitive visual detection of tetracyclines by a lanthanide-functionalized palygorskite nanomaterial, *Journal of Hazardous Materials*, 342 (2018) 158-165.

- [20] Q. Yang, H.L. Peng, J.H. Li, Y.B. Li, H. Xiong, L.X. Chen, Label-free colorimetric detection of tetracycline using analyte-responsive inverse-opal hydrogels based on molecular imprinting technology, *New Journal of Chemistry*, 41 (2017) 10174-10180.
- [21] M.L. Liu, B.B. Chen, T. Yang, J. Wang, X.D. Liu, C.Z. Huang, One-pot carbonization synthesis of europium-doped carbon quantum dots for highly selective detection of tetracycline, *Methods and Applications in Fluorescence*, 5 (2017).
- [22] Z.S. Wang, J.T. Lin, J.W. Gao, Q.M. Wang, Two optically active molybdenum disulfide quantum dots as tetracycline sensors, *Materials Chemistry and Physics*, 178 (2016) 82-87.
- [23] Z.P. Zhou, K. Lu, X. Wei, T.F. Hao, Y.Q. Xu, X.D. Lv, Y.F. Zhang, A mesoporous fluorescent sensor based on ZnO nanorods for the fluorescent detection and selective recognition of tetracycline, *Rsc Advances*, 6 (2016) 71061-71069.
- [24] S. Wang, S. Gao, S. Sun, Y. Yang, Y. Zhang, J.H. Liu, Y.Y. Dong, H.J. Su, T.W. Tan, A molecular recognition assisted colorimetric aptasensor for tetracycline, *Rsc Advances*, 6 (2016) 45645-45651.
- [25] S. Wang, W. Yong, J.H. Liu, L.Y. Zhang, Q.L. Chen, Y.Y. Dong, Development of an indirect competitive assay-based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey, *Biosensors & Bioelectronics*, 57 (2014) 192-198.
- [26] N. Li, S.F. Lv, Y.K. Lv, X. Xiong, B.H. Li, Magnetic Dispersion Extraction of Tetracyclines Residues from Milk by Chlortetracycline-Imprinted Magnetic Composite Microspheres, *Asian Journal of Chemistry*, 26 (2014) 3535-3540.

10. REFERENCIAS

- [1] A. Aguilar and D. Orozco, “Desarrollo de un método para la determinación de antibióticos en leche de vaca por electroforesis capilar.,” FES Cuautitlán, UNAM., 2012.
- [2] Diario Oficial de la Federación, “Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994, Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.” .
- [3] Diario Oficial de la Federación, “NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.” .
- [4] M. Santiago, “Manual de normas de control de calidad de leche cruda,” 2007.
- [5] M. A. Jara, “Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana Tetracyclines : a model of antimicrobial resistance,” *Ciencias Vet.*, vol. 22, pp. 49–55, 2007.
- [6] “Lista OMS de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana,” *OMS*, 2016. .
- [7] M. L. Güerri, “Estudio De La Resistencia a Antibióticos [Beta]-Lactámicos En Aislamientos Clínicos De ‘Salmonella Typhimurium,’” Universidad Complutence de Madrid, 2002.
- [8] P. Feng, Y. F. Li, and C. Z. Huang, “Determination of chlortetracycline in body fluids with the complex cation of chlortetracycline–europium(III)–trioctylphosphine oxide by total internal reflected fluorescence at a water/tetrachloromethane interface,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 442, no. 1, pp. 89–95, Aug. 2001.
- [9] A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, F. J. Lara, M. del Olmo Iruela, and C. Cruces-Blanco, “Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, no. 4, pp. 967–986, Oct. 2009.

- [10] A. Gajda, A. Posyniak, and G. Tomczyk, "LC-MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration," *Bull Vet Inst Pulawy*, vol. 58, pp. 573–579, 2014.
- [11] G. Mu, H. Liu, L. Xu, L. Tian, and F. Luan, "Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and Capillary Electrophoresis Determination of Tetracycline Residues in Milk," *Food Anal. Methods*, vol. 5, no. 1, pp. 148–153, Feb. 2012.
- [12] J. Ashley, X. Feng, and Y. Sun, "A multifunctional molecularly imprinted polymer-based biosensor for direct detection of doxycycline in food samples," *Talanta*, vol. 182, pp. 49–54, May 2018.
- [13] S. Yang and K. Carlson, "Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique," *Water Res.*, vol. 38, no. 14–15, pp. 3155–3166, Aug. 2004.
- [14] C. Cháfer-Pericás *et al.*, "Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays," *Anal. Chim. Acta*, vol. 662, no. 2, pp. 177–185, Mar. 2010.
- [15] Jussi Kurittu, Stefan Lönnberg, and Marko Virta, and M. Karp, "A Group-Specific Microbiological Test for the Detection of Tetracycline Residues in Raw Milk," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 3372–3377, 2000.
- [16] H. Xu *et al.*, "Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction," *Food Chem.*, vol. 232, pp. 198–202, Oct. 2017.
- [17] A. L. B. and D. S. Aga*, "Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 9, pp. 2940–2947, 2005.
- [18] M. R. Rezk, S. M. Riad, F. I. Khattab, and H. M. Marzouk, "Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC–ESI-MS/MS method," *J. Chromatogr. B*, vol. 978–979, pp. 103–110, Jan. 2015.
- [19] L. R. Guidi, F. A. Santos, A. C. S. R. Ribeiro, C. Fernandes, L. H. M. Silva, and M. B. A. Gloria, "Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and

- rapid LC-MS/MS method,” *Food Chem.*, vol. 245, pp. 1232–1238, Apr. 2018.
- [20] S. P. Quesada, J. A. R. Paschoal, and F. G. Reyes, “A simple method for the determination of fluoroquinolone residues in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) employing LC-MS/MS QToF,” *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 30, no. 5, pp. 813–825, May 2013.
- [21] S. Pilco Quesada, J. Augusto, R. Paschoal, F. Guillermo, and R. Reyes, “Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones-A Review,” *J. Food Sci.*, vol. 78, pp. 1321–1333, 2013.
- [22] H. Goossens, M. Ferech, R. Vander Stichele, and M. Elseviers, “Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study,” *Lancet*, vol. 365, no. 9459, pp. 579–587, Feb. 2005.
- [23] C. A. Whitehouse, S. Young, C. Li, C.-H. Hsu, G. Martin, and S. Zhao, “Use of whole-genome sequencing for *Campylobacter* surveillance from NARMS retail poultry in the United States in 2015,” *Food Microbiol.*, vol. 73, pp. 122–128, Aug. 2018.
- [24] C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, and R. Puchades, “Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 9, pp. 1038–1049, Oct. 2010.
- [25] R. I. Aminov, “The role of antibiotics and antibiotic resistance in naturee mi_1972 2970..2988,” *Enviromental Microbiol.*, vol. 11, no. 12, pp. 2970–2988, 2009.
- [26] J. Huber, L.-E. Heimbürger, J. E. Sonke, S. Ziller, M. Lindén, and K. Leopold, “Nanogold-Decorated Silica Monoliths as Highly Efficient Solid-Phase Adsorbent for Ultratrace Mercury Analysis in Natural Waters,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 21, pp. 11122–11129, Oct. 2015.
- [27] R. M. Frizzarin *et al.*, “Submicrometric Magnetic Nanoporous Carbons Derived from Metal–Organic Frameworks Enabling Automated Electromagnet-Assisted Online Solid-Phase Extraction,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 14, pp. 6990–6995, Jun. 2016.

- [28] S. H. Shaikh and S. A. Kumar, "Polyhydroxamic acid functionalized sorbent for effective removal of chromium from ground water and chromic acid cleaning bath," *Chem. Eng. J.*, vol. 326, pp. 318–328, Oct. 2017.
- [29] F. Walsh, "Investigating antibiotic resistance in non-clinical environments," *Front. Microbiol.*, vol. 4, Feb. 2013.
- [30] F. C. Cabello, "Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment," *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 7, pp. 1137–1144, Jul. 2006.
- [31] B. Chen *et al.*, "Complex pollution of antibiotic resistance genes due to beta-lactam and aminoglycoside use in aquaculture farming," *Water Res.*, vol. 134, pp. 200–208, May 2018.
- [32] J. Lin and Q. Wang, "Role of novel silicon nanoparticles in luminescence detection of a family of antibiotics," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 35, pp. 27458–27463, Mar. 2015.
- [33] J. Hou, H. Zhang, Q. Yang, M. Li, L. Jiang, and Y. Song, "Hydrophilic-Hydrophobic Patterned Molecularly Imprinted Photonic Crystal Sensors for High-Sensitive Colorimetric Detection of Tetracycline," *Small*, vol. 11, no. 23, pp. 2738–2742, Jun. 2015.
- [34] CANILEC, "Estadística. Producción industrial," 2016. .
- [35] Secretaria de Economía, "Análisis del sector lácteo en México," 2012. .
- [36] A. Mina, F. Nieto, and M. Cañizo, "Protocolos experimentales para Tecnología de Alimentos," CDMX, 2017.
- [37] "Introducción al control de calidad de la leche cruda," *Universidad de Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias*, 2003. .
- [38] M. Celis and D. Juarez, "Microbiología de la leche," *Univ. Tecnol. Nac.*, 2009.
- [39] S. B. Levy *et al.*, "Nomenclature for New Tetracycline Resistance Determinants," 1999.
- [40] Stephen A. Sassman and Lee Linda S., "Sorption of Three Tetracyclines by Several Soils: Assessing the Role of pH and Cation Exchange," vol. 39, pp. 7452–7459,

2005.

- [41] J. Wang *et al.*, “Surface-imprinted fluorescence microspheres as ultrasensitive sensor for rapid and effective detection of tetracycline in real biological samples,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 263, pp. 533–542, Jun. 2018.
- [42] Q. Ouyang *et al.*, “Rapid and specific sensing of tetracycline in food using a novel upconversion aptasensor,” *Food Control*, vol. 81, pp. 156–163, Nov. 2017.
- [43] A. Freitas *et al.*, “Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 31, no. 5, pp. 817–826, May 2014.
- [44] F. C. Cabello *et al.*, “Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health,” *Environ. Microbiol.*, vol. 15, no. 7, pp. 1917–1942, 2013.
- [45] M. Kaynaker and M. Merdivan, “Determination of Tetracyclines in Milk, Eggs and Honey Using in-situ Ionic Liquid Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction 1,” *J. Anal. Chem.*, vol. 73, no. 1, pp. 23–29, 2018.
- [46] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, and Å. Lundström, “Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC–MS/MS,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 529, no. 1–2, pp. 47–51, Jan. 2005.
- [47] V. G. Amelin and A. I. Korotkov, “High-performance liquid chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry in the identification and determination of penicillin and tetracycline group antibiotics in food,” *J. Anal. Chem.*, vol. 70, no. 11, pp. 1383–1389, Nov. 2015.
- [48] V. G. Amelin, A. I. Korotkov, and N. M. Volkova, “High-resolution time-of-flight mass spectrometry combined with high-performance liquid chromatography for detection and determination of quinolones and sulfonamides in foods,” *J. Anal. Chem.*, vol. 70, no. 14, pp. 1629–1634, Dec. 2015.
- [49] C. Robert, N. Gillard, P.-Y. Brasseur, N. Ralet, M. Dubois, and P. Delahaut, “Rapid multiresidue and multi-class screening for antibiotics and benzimidazoles

in feed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry,” *Food Control*, vol. 50, pp. 509–515, Apr. 2015.

- [50] C. Robert, P.-Y. Brasseur, M. Dubois, P. Delahaut, and N. Gillard, “Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry,” *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 33, no. 8, pp. 1–12, Jul. 2016.
- [51] Y. Zhao *et al.*, “Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut,” *Sci. Total Environ.*, vol. 621, pp. 1224–1232, Apr. 2018.
- [52] A. Pruden, Ruoting Pei, A. Heather Storteboom, and K. H. Carlson, “Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado†,” *Environmental Sci. Technol.*, vol. 40, no. 23, pp. 7445–7450, 2006.
- [53] E. McGowan, “Comment on ‘Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado,’” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 7, pp. 2651–2652, 2007.
- [54] N. J. Ashbolt *et al.*, “Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance.,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 121, no. 9, pp. 993–1001, Sep. 2013.
- [55] Y. Zhu, Y. Zhao, C.-L. Huang, and S.-Y. Zhang, “Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes Phosphorus cycle in Chinese agro-ecological system View project role of environmental microbes in the iron biogeo-chemistry cycle in the environment View project,” *Nat. Microbiol.*, vol. 2, 2017.
- [56] V. Boeckel, S. Gandra, and A. Ashok, “Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 17, no. 9, p. 897, May 2017.
- [57] T. P. Van Boeckel *et al.*, “Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 742–750, Aug. 2014.

- [58] S. Yazdankhah, K. Rudi, and A. Bernhoft, "Zinc and copper in animal feed - development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin.," *Microb. Ecol. Health Dis.*, vol. 25, 2014.
- [59] H. Heuer, H. Schmitt, and K. Smalla, "Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 14, no. 3, pp. 236–243, Jun. 2011.
- [60] Y. Hu *et al.*, "Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota," *Nat. Commun.*, vol. 4, Jul. 2013.
- [61] C. Morris, R. Helliwell, and S. Raman, "Framing the agricultural use of antibiotics and antimicrobial resistance in UK national newspapers and the farming press," *J. Rural Stud.*, vol. 45, pp. 43–53, 2016.
- [62] N. Mendoza and A. Campos, "Tetraciclinas," *Rev Fac Med UNAM*, vol. 51, no. 1, 2008.
- [63] J. Beltrán, "Evaluación de la capacidad de biotransformación de la sal sódica del ácido desoxicólico por actinomicetos," Universidad Politécnica Salesiana, 2015.
- [64] A. Canale-Guerrero, P. Chombo-Morales, E. Ramírez-Cerda, and A. I. Feria-Velasco, "El resurgimiento de las tetraciclinas," *e-Gnosis*, vol. 9, pp. 1–6, 2011.
- [65] D. Deck and L. Winston, "Tetraciclinas, macrólidos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas y oxazolidinonas," in *Farmacología básica y clínica*, 13a ed., D. Deck and L. Winston, Eds. McGraw-Hill Interamericana, 2016.
- [66] D. Vicente and E. Pérez-Trallero, "Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 28, no. 2, pp. 122–130, 2010.
- [67] L. Sánchez, E. Sáenz, and J. Pancorbo, "Antibióticos sistémicos en dermatología," 2004.
- [68] A. Canale-Guerrero, P. Chombo-Morales, C. Soto-Velazco, R. Sigüenza-López, and A. I. Feria-Velasco, "Biosíntesis de las tetraciclinas," *e-Gnosis*, vol. 10, pp. 1–10, 2012.
- [69] J. W. Fritz and Y. Zuo, "Simultaneous determination of tetracycline,

- oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 3, pp. 1297–1301, 2007.
- [70] M. Morejón, R. Salup, and M. Cué, “Actualización en tetraciclinas,” *Rev. Cuba. Farm.*, vol. 37, 2003.
- [71] N. Mendoza and A. Campos, “Tetraciclinas,” *Actualidades farmacológicas*. .
- [72] G. E. Heer, “Microbiología de la leche,” México, 2007.
- [73] CANILIEC, *El Libro Blanco de la leche y sus productos lácteos*, 1a ed. México, 2001.
- [74] A. Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano, and O. Velázquez, *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*, 2^a. CDMX: Facultad de Química, UNAM, 2009.
- [75] “Fundamentos de Espectrofotometría, 2a parte.,” *Facultad de Química, UNAM.*, 2010. .
- [76] “Espectro electromagnético,” *educarchile*, 2018. .
- [77] “Fundamentos de Espectrofotometría, 1a parte,” *Facultad de Química, UNAM.*, 2010. .
- [78] S. Douglas A., H. F. James, and N. Timothy A., *Principios de análisis instrumental*, 5a ed. McGrawHill, 2011.
- [79] Diario Oficial de la Federación, “NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.” .
- [80] Diario Oficial de la Federación, “NORMA Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.” .
- [81] Diario Oficial de la Federación, “Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.” .
- [82] Diario Oficial de la Federación, “Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994,

- Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.” .
- [83] Diario Oficial de la Federación, “NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.” .
- [84] M. Celis and D. Juárez, “Procesos Fundamentales Físico-Químicos y Microbiológicos.” Universidad Tecnológica Nacional, 2009.
- [85] P. Su *et al.*, “Simultaneous detection of five antibiotics in milk by high-throughput suspension array technology,” *Talanta*, vol. 85, no. 2, pp. 1160–1165, 2011.
- [86] Bio-Rad Laboratories, “Uso del Control de Calidad,” 2009.