



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CONTROL DE  
CALIDAD DE LECHE USANDO ELECTROFORESIS CAPILAR

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. MIRIAM AIDE CASTILLO RODRÍGUEZ



TUTOR: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segundo hogar, por mi formación y por ser orgullosamente universitaria.*

*A la DGEP por la beca otorgada.*

*Al jurado, por el tiempo invertido en la revisión de éste trabajo.*

*La Dra. Virginia Angélica Robinson Fuentes por su apoyo, aportaciones y comentarios para el mejoramiento del presente trabajo.*

*Al M. en C. Francisco Rojo Callejas, mi profesor de estadística, por sus valiosos comentarios y apoyo brindado.*

*A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, por sus aportaciones, apoyo, críticas asesoramiento y comentarios en la revisión de éste trabajo.*

*A la M. en C. Ángeles Valdivia López, por sus aportaciones, críticas y comentarios en la revisión del presente trabajo.*

*A mi asesora la Dra. Gabriela Vargas Martínez por su apoyo brindado durante todo éste tiempo.*

*Al proyecto PAPIIT IN228009 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, por el apoyo financiero otorgado.*

## CONGRESOS

*El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos, y fue presentado en los siguientes congresos:*

1. *“Desarrollo de métodos analíticos para el control de calidad en leche de vaca por métodos electroforéticos”, XXI Congreso Nacional de Química Analítica. Septiembre, 2007 (Monterrey, Nuevo León).*
2. *“Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca por electroforesis capilar”, XIX Congreso Nacional de Química Analítica. Octubre, 2005 (Guadalajara, Jalisco).*
3. *“Determinación de Antibióticos en leche usando Electroforesis Capilar” XVIII Congreso Nacional de Química Analítica. Julio, 2004 (Pachuca, Hidalgo).*
4. *“Analytical methods for the milk quality control by capillary electrophoresis”, 9th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. Diciembre, 2003 (Ciudad de México, México).*
5. *“Desarrollo de un método Analítico para el control de adulteración en leche usando Electroforesis Capilar”, XXXVIII Congreso Mexicano de Química. Septiembre, 2003 (Ixtapa, Guerrero).*

---

---

## ÍNDICE GENERAL

Índice General	I
Índice de Figuras	V
Índice de Gráficos	VIII
Índice de Tablas	IX
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Objetivos	15
I. GENERALIDADES	17
1. SOYA	17
1.1. COMPOSICIÓN	17
1.2. PROTEÍNAS AISLADAS DE SOYA	18
2. LECHE	20
2.1. COMPOSICION DE LA LECHE DE VACA	21
2.1.1. AGUA	22
2.1.2. HIDRATOS DE CARBONO	22
2.1.3. PROTEÍNAS	23
2.1.3.1. CASEÍNAS	25
2.1.3.2. PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO	26
2.1.4. GRASAS	27
2.1.5. MINERALES Y VITAMINAS	28
2.1.6. CÉLULAS EN LA ECHE	29
2.1.7. COMPONENTES INDESEABLES EN LA LECHE	29
2.2. ESPECIFICACIONES DE LA LECHE	30

---

2.3. MÉTODOS DE PRUEBA EN LECHES	30
2.3.1. ÍNDICE CRIOSCÓPICO	31
2.3.2. CASEÍNA EN LECHE	31
2.3.3. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ	32
2.3.4. DETERMINACIÓN PROTEÍNAS (MICRO KJELDAHL)	32
2.3.5. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS NO GRASOS	33
2.3.6. DETERMINACIÓN DE LA ADULTERACIÓN	33
2.3.7. DENSIDAD	33
2.3.8. GRASA BUTÍRICA	34
2.3.9. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS	34
3. ANTIBIÓTICOS	35
3.1. CLASIFICACION SEGÚN SUS ESTRUCTURAS QUIMICA	35
3.1.1. GRUPO DE LOS BETALACTAMICOS	35
3.1.2. GRUPO DE LAS TETRACICLINAS	38
3.1.3. GRUPO DE LOS MACROLIDOS	40
3.1.4. GRUPO DE LAS SULFAMIDAS	41
3.1.5. GRUPO DE LOS QUINOLONAS	43
3.1.6. GRUPO DE LOS AMFENICOLES	45
3.2. LÍMITE MÁXIMO RESIDUAL DE UN ANTIBIÓTICO	46
3.3. TÉCNICAS ANALITICAS EN EL ANALISIS DE RESIDUOS	50
4. ELECTROFORESIS	52
4.1. PROCESO ELECTROFORÉTICO	52
4.1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR	53
4.2. PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	56

---

4.2.1. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	56
4.2.2. FLUJO ELECTROOSMÓTICO	57
4.3. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA	58
4.4. CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROCINÉTICA MICELAR	60
II. PARTE EXPERIMENTAL	66
5. METODOLOGÍA	66
5.1. EQUIPO	66
5.2. REACTIVOS	66
5.3. PREACONDICIONADO DEL CAPILAR	67
5.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS EN LA DETERMINACIÓN DE SOYA	68
5.4.1. PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO	68
5.4.2. PROTEÍNAS DE SOYA	69
5.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA VALIDACIÓN	69
5.5.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA	69
5.5.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA	70
5.5.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO	70
5.5.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	71
5.6. SOLUCIONES EN LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	72
5.6.1. SOLUCIONES EN LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	72
5.6.2. PRETRATAMIENTO DE LECHE EN LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS	72
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOYA EN LECHE	73
6.1. OPTIMIZACIÓN DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE BUFFER	73

---

6.2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN	81
6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	82
6.3.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA	84
6.3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA	84
6.3.3. EXACTITUD DEL MÉTODO	89
6.3.4. LINEALIDAD DEL MÉTODO	90
6.3.5. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO	94
6.3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO	96
6.3.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	97
7. DETERMINACION ANTIBIÓTICOS EN LECHE	103
7.1. DESARROLLO DEL METODO PARA ANTIBIÓTICOS	103
7.2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN	112
7.3. PRETRATAMIENTO DE LECHE CRUDA DE VACA	113
7.3.1. EXTRACCION LÍQUIDO-LÍQUIDO	113
7.3.2. PRECIPITACION DE PROTEINAS TOTALES	117
7.3.3. PRECONCENTRACIÓN EN LINEA	121
7.3.3.1. INYECCIÓN HIDRODINÁMICA	121
7.3.3.2. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA	122
7.4. PRECISIÓN DEL SISTEMA CON INYECCIÓN HIDRODINÁMICA	127
7.5. PRECISIÓN DEL SISTEMA CON INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA	129
7.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	131
CONCLUSIONES	133
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	135

**ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA No. 1 PROCESAMIENTO DE LA SEMILLA DE SOYA	18
FIGURA No. 2 CURVA DE SOLUBILIDAD DE LA PROTEÍNA DE SOYA	19
FIGURA No. 3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE VACA (POR LITRO)	21
FIGURA No. 4: SINTESIS DE LACTOSA	23
FIGURA No.5: ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	24
FIGURA No. 6: FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO	26
FIGURA No. 7: ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICÉRIDOS	28
FIGURA No. 8 ESTRUCTURAS DEL GRUPO DE LOS BETALACTÁMICOS	37
FIGURA No. 9. ESPECTROS DE ABSORCION DE 6 $\beta$ -LACTÁMICOS	38
FIGURA No. 10 ESTRUCTURAS DE TETRACICLINAS	39
FIGURA No. 11 ESPECTROS DE ABSORCION DE 3 TETRACICLINAS	39
FIGURA No. 12 ESTRUCTURAS DE MACRÓLIDOS	40
FIGURA No. 13. ESPECTROS DE ESPIRAMICINA Y TILOSINA	41
FIGURA No. 14 ESTRUCTURA DEL TRIMETOPRIM	42
FIGURA No. 15 ESPECTRO DE ABSORCION DEL TRIMETOPRIM	43
FIGURA No. 16 ESTRUCTURA DE LA ENROFLOXACINA	44
FIGURA No. 17 ESPECTRO DE ABSORCION DE ENROFLOXACINA	44
FIGURA No. 18 ESTRUCTURA DEL CLORANFENICOL	45
FIGURA No. 19 ESPECTRO DE ABSORCION DEL CLORANFENICOL	46
FIGURA No. 20 PROCESO DE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	53
FIGURA No. 21. SISTEMA GENERAL DEL EQUIPO DE EC	54
FIGURA No. 22 REPRESENTACIÓN DE LOS GRUPOS SILANOL EN LA PARED DEL CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA EN FUNCION AL pH	57

---

FIGURA No. 23 ILUSTRACIÓN DE UNA SEPARACIÓN ZONAL	59
FIGURA No.24. SEPARACIÓN EMPLEANDO MICELAS	62
FIGURA No.25. REPRESENTACIÓN DE UNA $\beta$ CICLODEXTRINA	64
FIGURA No. 26. PROTEÍNAS DE SUERO Y SOYA A pH 2.0	75
FIGURA No. 27. PROTEÍNAS DE SUERO Y SOYA A pH 4.0.	76
FIGURA No. 28. PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO Y SOYA A pH 6.0 .	77
FIGURA No. 29. PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO Y SOYA A pH 8.0.	78
FIGURA No. 30. PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO Y SOYA A pH 10.0.	79
FIGURA No. 31 REPETIBILIDAD DEL PERFIL DEL SUERO LÁCTEO.	80
FIGURA No. 32 LECHE ADULTERADA CON HARINA DE SOYA AL 20%.	81
FIGURA No. 33. EFECTO DEL pH SOBRE LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS 50 $\mu$ g/mL.	103
FIGURA No. 34. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL BUFFER EN LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS 50 $\mu$ g/mL.	104
FIGURA No. 35. EFECTO DEL DSS SOBRE LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS.	105
FIGURA No. 36. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DEL DSS EN LA SEPARACIÓN	106
FIGURA No. 37. ESTUDIO DE LA ADICION DE SOLVENTES.	107
FIGURA No. 38. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL.	107
FIGURA No. 39. ESTUDIO DE LA ADICION DE CICLODEXTRINAS.	108
FIGURA No. 40. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE $\alpha$ -CICLODEXTRINA.	109
FIGURA No. 41. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROXIPROPIL $\alpha$ - CICLODEXTRINA.	110
FIGURA No. 42. ESTUDIO DE LA ADICION DE CICLODEXTRINAS.	111
FIGURA No. 43. COMPLETA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS.	112

FIGURA No. 44. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO ACETATO DE ETILO.	113
FIGURA No. 45. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO CLOROFORMO.	114
FIGURA No. 46. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO CLORURO DE METILENO.	115
FIGURA No. 47. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO ÉTER ETÍLICO.	115
FIGURA No. 48. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO METIL ISOBUTILCETONA.	116
FIGURA No. 49. PRETRATAMIENTO DE LECHE USANDO ACETONITRILO, ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y ÁCIDO PERCLÓRICO.	117
FIGURA No. 50. PRETRATAMIENTO DE LECHE CON Y SIN ANTIBIÓTICOS USANDO ACETONITRILO.	118
FIGURA No. 51. PRETRATAMIENTO DE LECHE CON Y SIN ANTIBIÓTICOS USANDO ÁCIDO PERCLÓRICO.	118
FIGURA No. 52. PRETRATAMIENTO DE LECHE CON Y SIN ANTIBIÓTICOS USANDO ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.	119
FIGURA No. 53. ESTUDIO DE LA PRESION EN LA INYECCIÓN HIDRODINÁMICA DE $\beta$ -LACTÁMICOS.	121
FIGURA No. 54. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA DE $\beta$ -LACTÁMICOS.	122
FIGURA No. 55. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA -10Kv X 20s.	123
FIGURA NO. 56. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA CON PLUG DE AGUA DE 0.5 PSI X 80s.	123

FIGURA NO. 57. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA CON PLUG DE AGUA DE 0.5 psi x 3 min.	124
FIGURA NO. 58. COMPARACIÓN DEL TIPO DE INYECCIÓN.	125
FIGURA NO. 59. REPETIBILIDAD DE LA SEPARACIÓN USANDO INYECCIÓN HIDRODINÁMICA	126

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1 LINEALIDAD DEL SISTEMA	86
GRÁFICO No. 2 CONC. DE SOYA EN FUNCIÓN DE LOS RESIDUALES	89
GRÁFICO No. 3 REGRESIÓN PARA EL MODELO LINEAL DEL MÉTODO	91

**ÍNDICE DE TABLAS**

TABLA No. 1 PROTEINAS DE LECHE DE VACA	24
TABLA No. 2 ESPECIFICACIONES LECHE DE VACA NOM-155-SCFI-2003	30
TABLA No. 3 LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN LECHE	48
TABLA No. 4 PROPIEDADES FISICAS DE LOS 14 ANTIBIÓTICOS	49
TABLA No. 5 REPETIBILIDAD DEL PERFIL DE SUERO BOVINO	80
TABLA No. 6. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LA VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOYA EN LECHE DE VACA	83
TABLA No. 7. PRECISIÓN DEL SISTEMA-PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	84
TABLA No.8 CONCENTRACIÓN-ÁREA	85
TABLA No. 9 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN DEL SISTEMA	87
TABLA No.10 ANALISIS DE VARIANZA DEL SISTEMA	87
TABLA No.11 ANALISIS DE REGRESIÓN – MODELO LINEAL $Y = a + b \cdot X$	88
TABLA No. 12 CONCENTRACIÓN ADICIONADA-% DE SOYA RECUPERADA	89
TABLA No.13 DETERMINACIÓN DE EXACTITUD DEL MÉTODO	90
TABLA No. 14 CONCENTRACIÓN ADICIONADA-CONCENTRACIÓN RECUPERADA-PORCENTAJE DE RECOBRO	91
TABLA No. 15 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA SOYA RECUPERADA	92
TABLA No. 16 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN	92
TABLA No. 17 ANÁLISIS DE REGRESIÓN-MODELO LINEAL	93
TABLA No. 18 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL % SOYA RECUPERADA	94
TABLA No.19 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE SOYA	95
TABLA No. 20 ANALISIS DE VARIANZA PARA EL PORCENTAJE DE SOYA RECUPERADA	96

---

TABLA No. 21 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN	97
TABLA No. 22 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	98
TABLA No. 23 COMPARANDO EL MÉTODO CON NOM-155-SCFI-2003	99
TABLA No. 24 COMPARANDO EL MÉTODO CON EL ISO/DIS 17129 IDF 206.	101
TABLA No. 26. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO $t_m$ (INYECCIÓN HIDRODINÁMICA)	127
TABLA No. 27. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO ÁREA – (INYECCIÓN HIDRODINÁMICA)	128
TABLA No. 28. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO $t_m$ – (INYECCIÓN ELECTROCINÉTICA)	129
TABLA No. 29. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO ÁREA – (INYECCIÓN ELECTROCINÉTICA)	130
TABLA No. 30 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS 14 ANTIBIÓTICOS	131

## RESUMEN

El control de calidad en la leche de vaca tiene como fin, asegurar que el producto no causará ningún daño al consumidor, por lo que es altamente recomendable monitorear sustancias que no deben estar presentes como son las proteínas no lácteas y los residuos de antibióticos. Debido a lo anterior, el objetivo principal del presente trabajo fue desarrollar métodos analíticos para la determinación de 14 antibióticos (que comúnmente se encuentran como contaminantes) y proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca usando la técnica de Electroforesis Capilar, que sean eficientes, sensibles, que no contaminen y que además sean de bajo costo, a fin de proponerlos como métodos rutinarios en el control de calidad de los productos lácticos.

Para el desarrollo de los métodos se evaluó la influencia de diversas variables experimentales tales como tipo y concentración del buffer, tamaño del capilar, pH, tipo del capilar, adición de selectores como SDS y ciclodextrinas, en parámetros analíticos tales como la resolución, eficiencia de los picos y tiempos de análisis. Los métodos analíticos diseñados en este trabajo, previa optimización de las variables analizadas, fueron primeramente el método de monitoreo de adulteración con proteínas de soya, realizándose la identificación de los perfiles de leche de vaca y de proteínas de soya e identificando sus diferencias, se puede saber cuando hay adulteración por éste tipo de proteínas, cabe mencionar que para este

primer método se realizó la validación completa. Respecto al método de antibióticos se evaluaron parámetros analíticos indispensables para la determinación de éstos como adecuabilidad, precisión, linealidad, límite de detección y de cuantificación y el pretratamiento de leche de vaca para determinar los 14 antibióticos sin interferencias.

Se desarrollaron dos métodos: uno para la determinación de proteínas no lácteas, que a su vez permite la diferenciación de los perfiles de leche de vaca y de proteínas de soya, por lo que se puede saber cuando hay adulteración por éste tipo de proteínas; cabe mencionar que para este primer método además de desarrollarlo, se realizó la validación completa. Respecto al método para antibióticos; además de desarrollarlo se evaluaron parámetros analíticos indispensables para la determinación de éstos como precisión, linealidad, límite de detección y de cuantificación, así como el pretratamiento de leche de vaca para determinar 14 antibióticos sin interferencias.

Resumiendo; se desarrollaron 2 métodos uno para la determinación de proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca y otro para determinar 14 antibióticos como contaminantes en leche de vaca.

## **ABSTRACT**

The quality control in commercial cow milk is necessary to ensure that the product will not cause any damage to the consumer. For this reason, it is highly recommendable to monitor substances that must not be present in the product such as the non-dairy proteins and antibiotic remains. On the other hand, the compositional standards of most milk products require that they contain exclusively milk proteins, but the lower prices of some vegetable proteins could make it attractive to add them as adulterants and this is a fraud. Soya protein is probably the most common non-dairy protein used in milk replacers such as simulated yoghurts, coffee whiteners and frozen desserts and it is likely to be a major adulterant.

Authorities worldwide are heavily involved in controlling the residue levels of antibiotics in food, amongst others substances. These levels have to be beneath the Maximum Residue Limit (MRL) defined for each type of substance. Due to the previous thing, the primary target of the present work was to develop to analytical methods for the determination of antibiotics like polluting agents and soy proteins like adulterants in cow milk using Capillary Electrophoresis, that will be efficient, sensible, that does not contaminate and in addition is of low cost in order of proposing them like routine methods in the control of quality of dairy products.

For the method development, the influence of diverse experimental variables was evaluated such as type and concentration of the buffer, size of the capillary, pH, type of the capillary, selector addition of additives such as SDS and ciclodextrins, in analytical parameters such as the resolution, efficiency and analysis times.

The designed analytical methods in this work were previously optimized for all analytical ariables. In the case of the first one, the identification of soy protein as adulterant present in cow milk was carried out comparing the electropherograms of the cow milk profile and that one of the soy proteins profile at the same conditions. It was possible to appreciate clear differences on the signal profile when soy protein was added to cow milk. Quantification and complete validation of the method was also possible. For the case of second method for the monitoring the presence of 14 antibiotic in cow milk, all analytical parameters were also optimized and evaluation of some validation parameters such as precision, linearity, limits of detection and quantification were also carried out during our study.

## INTRODUCCIÓN

México es el principal país importador de leche en el mundo; dada la apertura comercial y desregulación gubernamental de los mercados, la mayor parte de la leche importada es descremada en polvo (70.36%), seguida de entera en polvo (26.35%) y una pequeña parte de líquida (0.69%). Los principales proveedores son Estados Unidos, la Unión Europea, Oceanía, Uruguay, Argentina y Suiza. También se importan productos lácteos sin transformar (suero en polvo y preparaciones alimenticias) así como productos terminados (queso, yogurt, mantequilla, etc.). La producción nacional en 1996 fue de 7,586 millones de litros y en 2005 fue de 9,555 millones de litros. [SIAP-SAGARPA / AGA-SHCP].

El gran flujo de importaciones ha propiciado que el precio nacional de la leche baje, lo que ocasiona un decremento en los ingresos de los productores nacionales. La Confederación Nacional Campesina (CNC) elaboró una propuesta al Gobierno federal que contempla, entre otras acciones, disminuir las importaciones de leche en polvo para rescatar de la crisis a más de 200 mil productores del país que aseguran se encuentran indefensos por la compra anual de 120 mil toneladas de lácteo libres de arancel desde hace 15 años, en clara violación al Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN). [José Luna. 20 de abril de 2009. Organización Editorial Mexicana. El Sol de México]

Uno de los problemas que enfrenta el consumidor es que los productos lácteos deben contener sólo proteínas de leche, pero los precios bajos de algunas proteínas de origen vegetal disponibles podrían hacer atractivo el adicionarlas a los productos lácteos adulterando el contenido del mismo. Este es el caso particular de la proteína de soya, que probablemente sea la proteína más utilizada al adicionarla a los sustitutos de leche, yogurt, postres congelados, entre otros. .

[García-Ruiz. 1999, Herrero-Martínez J. 2000, López-Tapia J. 1999, Murphy. 1997]

Por ejemplo la adulteración de leche para bebés fue un incidente acaecido en 2008 en China, en el que leche para bebés y otros productos lácteos fueron adulterados con melamina (producto químico utilizado en la industria del plástico y la fabricación de colas o resinas). En estos casos habría sido agregada a estos productos para que parezca tener un mayor contenido de proteínas, produciendo graves daños a quienes los ingieren. [AFP. 23 de septiembre de 2008.La jornada]

Es importante mencionar que de acuerdo a los ministerios de salud/los gobiernos nacional o internacionales (en México la NOM-155-SCFI-2003) para cumplir la especificación de contenido de proteínas en leche, se realiza siguiendo el procedimiento del método micro kjeldahl, en el cuál se determina nitrógeno total presente en leche sin importar el origen de éste. Las proteínas de soya se encuentran disponibles en harinas (42–52%), concentrados (62–29%), aislados

(82–87%) e hidrolizados (alrededor del 20%) y con cualquier de estos productos se puede adulterar a la leche de vaca, ya que contienen nitrógeno. [Clyde E. S., 2002]

En los últimos años la leche de soya y las proteínas de soya han recibido gran atención en la manufactura de alimentos, como una alternativa dado el origen económico y nutritivo de la proteína. Especialmente en los países en vías de desarrollo donde existe la escasez de las proteínas de origen animal y las proteínas de soya pueden combatir la desnutrición. Sin embargo a pesar del valor nutricional y funcional de las proteínas de soya las autoridades de muchos países están renuentes a aclarar legalmente el uso de proteínas no lácteas y suplementos a leche de vaca.

El análisis de soya en leche debe realizarse para detectar adulteraciones y cumplir con especificaciones del contenido de proteína en leche muchas veces se recurre a la adición de proteínas de soya, esto se presenta principalmente pues el valor de la leche esta medido en base a la calidad de la misma a través del nivel proteínico y dicha adición permite cumplir con los niveles requeridos para estos componentes. La soya es un aditivo muy utilizado generalmente para mejorar la textura. La detección de alérgenos también es importante puesto que si la leche fue adulterada con proteína de soya, la etiqueta no presenta esta información al consumidor pudiendo ser un peligro para personas alérgicas a la soya.

Las reacciones alérgicas alimenticias causadas por ciertas proteínas de soya contenidas en los alimentos hacen que el organismo reaccione en forma negativa. Hay personas que pueden tener reacciones bastante fuertes, aunque la cantidad de comida ingerida sea muy pequeña, mientras que otras, sólo tienen molestias leves que desaparecen sin consecuencias. Es más común la alergia alimenticia en niños que en adultos. La mayoría de los niños verán su alergia alimenticia desaparecer al ir creciendo. La sensibilización a la soya es relativamente común, pero la alergia acentuada a la soya es escasa.

Los métodos de procesamiento de alimentos han hecho difícil la detección de la presencia de proteínas de soya en productos lácteos. La detección de este tipo de adulteración presenta un problema peculiar en el análisis de alimentos que necesita la identificación específica para distinguir las características del adulterante. Se ha usado SDS electroforesis en gel para identificar proteínas de soya en productos lácteos [Guy et al., 1973]

Basados en este tipo de problemas los residuos de antibióticos en leche han atraído la atención a nivel mundial de los consumidores y de los legisladores generando reglas estrictas que controlan el uso de antibióticos en los ranchos lecheros. [<http://www.extension.org/pages/UsodeAntibioticosenlaGanaderiaLechera>, 2009]

Numerosos informes refieren la presencia de residuos y contaminantes presentes en la leche abarcan los grupos de plaguicidas, antibióticos, sulfonamidas, nitrofuranos, fasciolidas, metales pesados, micotoxinas, bifenilos policlorados, dibenzo-p-dioxinas, dibenzofuranos policlorados, nitratos, nitritos, nitrosaminas, detergentes y desinfectantes. Entre las múltiples causas de esta presencia, se pueden citar las condiciones actuales del progreso en las actividades agrícolas y veterinarias, la industrialización, el aumento de la basura y su tratamiento, las explotaciones mineras y el control de plagas; contaminando los pastos y forrajes que consume el ganado vacuno afectando la calidad de la leche. [Cancho G. B. 2000, Losada H. 2001]

La presencia de residuos de antibióticos en leche es un problema que aqueja a toda la industria lechera, se ha determinado que pequeñas cantidades de antibióticos en leche, como 0.003 UI (unidades internacionales) de penicilina/ ml, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho antibiótico con problemas como ardor en la piel, comezón, asma y shock anafiláctico. Además, existe el problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos que puede reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades.

La administración de antibióticos en medicina veterinaria es un riesgo potencial porque los residuos de éstos pueden estar presentes en diferentes tejidos. Pero el principal riesgo a la salud humana del uso de antibióticos en animales es que las bacterias pueden desarrollar una resistencia a éstos antibióticos, ya sea por mutación, adquisición de genes o combinación de ambas.

De ahí la importancia de saber cuándo hay presencia de inhibidores en la leche, ya que aunque no esté reglamentado, existen Límites Máximos de Residuos (LMR) de éstos contaminantes permisibles en leche, pensando principalmente en las propiedades alergénicas de ciertos medicamentos que hacen que su presencia en la leche sea peligrosa para los consumidores.

Otro problema relacionado con los antibióticos es la clara interferencia en el procesado de queso, mantequilla y yogurt, por ejemplo los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, como el queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de antibióticos; su presencia disminuye el ácido y afecta el sabor característico de la mantequilla; en el caso de los quesos, la presencia de antibióticos disminuye el cuajado de la leche y causa una mala maduración del queso, además, debido al efecto inhibitorio que tienen éstos en los procesos de fermentación y maduración, la presencia de antibióticos causa pérdidas económicas a la industria de los

derivados lácteos cada año. [García-Ruiz. 1999, Herrero-Martínez J. 2000, López-Tapia J. 1999, Murphy. 1997]

Por otra parte se ha demostrado que los residuos de medicamentos o productos químicos empleados pueden presentar efectos como alergias, hipersensibilidad, ser mutagénicos, teratogénicos y/o carcinogénicos. Y cada vez es mayor el número de casos en que los medicamentos que son considerados eficaces en un tratamiento dejan de responder repentinamente a las expectativas generadas por una experiencia clínica anterior. La razón de éste fenómeno es la aparición de resistencia de microorganismos patógenos a los medicamentos. [Kennedy D.G. 1998, Knarreborg A. 2002, Prado F. G. 2002; Ramírez, 2003] Muchos microorganismos patógenos, como la *salmonella*, adquieren resistencia múltiple al ser sometidos a bajas concentraciones de antibióticos, lo cual representa un serio peligro potencial para el ser humano.

La mastitis, es una enfermedad que afecta a una gran población de vacas, y para atacarla se administra penicilina tanto por vía intramamaria como parenteral, esto a su vez genera residuos en la leche. Un ejemplo del grado de afectación que puede representar el tratamiento con penicilina para el procesamiento industrial refiere que un tratamiento con 200 mg de penicilina G es capaz de contaminar la leche de 8.000 vacas. Las tetraciclinas se llaman antibióticos de amplio espectro

porque muestran un más amplio intervalo de actividad antibacteriana que la penicilina, la estreptomicina y el cloranfenicol, en general son consideradas como bacteriostáticas. Los residuos de las tetraciclinas se registran en la leche en concentraciones relativamente elevadas.

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro, que es más activo que la penicilina y la estreptomicina y ha sido usado ampliamente por vía oral y parenteral en el tratamiento de infecciones urinarias, mastitis, salmonelosis aguda y otras infecciones resistentes a otros antibióticos. La prohibición de su uso en muchos países tiene origen en su propiedad de producir en los humanos una reacción adversa fatal, la anemia aplásica, aun en concentraciones subterapéuticas. Por esta razón, su uso ha decrecido notablemente y de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration) y a la UE (Unión Europea), el cloranfenicol no debe encontrarse en leche. Sin embargo, es inevitable la administración de medicamentos en animales para prevenir enfermedades, promover el crecimiento, incrementar el peso del animal y reducir la cantidad de alimento por unidad de ganado. Los medicamentos son administrados en el alimento a dosis por debajo de las terapéuticas durante el periodo de crecimiento.

[<http://www.sagarpa.gob.mx>, 2004; <http://www.fda.gov/cvm>., 2004]

Actualmente, los ministerios de salud/los gobiernos nacional o internacionales establecen que se deben identificar los residuos o adulterantes de la leche. Una parte importante es complementar y homogeneizar los métodos de análisis para el control de calidad en leche. Lamentablemente en México la Norma Oficial (NOM-155-SCFI-2003) solo especifica la metodología utilizada para analizar antibióticos principalmente de tipo beta lactámicos. De esta manera, no se sabe qué otros antibióticos pueden estar presentes ni en qué cantidad se encuentran en la leche. Como consecuencia, puede haber una gran variedad de antibióticos como las tetraciclinas, cefalosporinas, aminoglicosidos, quinolonas, amfenicoles y macrólidos que se excretan en leche sin ser detectados. Su presencia indica que la leche fue obtenida de animales sometidos a un tratamiento con antibióticos o bien que se le agregó algún germicida con el objeto de evitar la multiplicación microbiana; y esto a su vez invalida completamente los resultados de las cuentas bacterianas. [ISO 17129 | IDF 206. 2006, NOM-155-SCFI-2003]

Por lo que es importante conocer la presencia de inhibidores en la leche, ya que existen Límites Máximos de Residuos (LMR) de éstos contaminantes permisibles en leche. Algunos de estos residuos pueden tener las propiedades alergénicas que hacen que su presencia en la leche sea peligrosa para los consumidores. Además existen estudios que han demostrado que los residuos de medicamentos o productos químicos empleados pueden presentar efectos de hipersensibilidad,

ser mutagénicos, teratogénicos y/o carcinogénicos. Cada vez es mayor el número de casos de resistencia a los antibióticos que usa el hombre como consecuencia de su exposición en alimentos como la leche. [Kennedy D.G. 1998, Knarreborg A. 2002, Prado F. G. 2002; Ramírez, 2003]

Para éste estudio fue necesario hacer una investigación previa para conocer cuáles son los antibióticos de uso veterinario más utilizados en nuestro país y conocer cuáles de ellos pueden ser excretados en leche, encontrándose que los más comunes que los más comunes son: penicilina G, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, dicloxacilina, clortetraciclina, espiramicina, tilosina, cefalexina, trimetoprim, enrofloxacina, tetraciclina, oxitetraciclina y cloranfenicol. [Kennedy D.G. 1998, Knarreborg A. 2002, Prado F. G, 2002, Ramírez. 2003]

Debido a lo anterior, es fundamental contar con métodos analíticos que a su vez sean eficientes, sensibles, repetibles, de corto tiempo de análisis, de fácil realización, que no contaminen y de bajo costo. El presente trabajo de investigación, es de gran importancia para la industria lechera, ya que plantea el desarrollo de dos métodos analíticos: uno para la determinación de proteínas de soya como adulterantes y otro para la identificación y cuantificación de antibióticos como contaminantes en leche de vaca, que permitan establecer una metodología para el control de calidad en leches como método de rutina

## OBJETIVOS

### GENERAL:

- ✿ Desarrollar dos métodos analíticos usando electroforesis capilar para determinar la calidad de leche de vaca, y evaluar los parámetros estadísticos relacionados con su desempeño. Con la finalidad de usar ambas metodologías en el control de calidad de leches en la industria lechera.

### PARTICULARES:

- ✿ Desarrollar y validar un método analítico usando electroforesis capilar para determinar proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca.
- ✿ Desarrollar y validar un método analítico usando electroforesis capilar para identificar y cuantificar 14 antibióticos como contaminantes en leche de vaca.
- ✿ Determinar la influencia de diversas variables experimentales como pH, tipo y concentración de buffer, tipo y diámetro del capilar, temperatura de separación y voltaje aplicado en parámetros experimentales como resolución, eficiencia y tiempos de análisis.

- ✿ Analizar cada variable para optimizar ambos métodos de separación tanto para la determinación de proteínas de soya como para los antibióticos y lograr la mejor separación en menor tiempo de análisis.
  
- ✿ Determinar el pretratamiento que deberá hacerse a la leche cruda de vaca para cada método analítico.
  
- ✿ Aplicar los métodos desarrollados a muestras de leche de vaca con la finalidad de evaluar si el pretratamiento es el adecuado para medir proteínas de soya o antibióticos según sea el caso.

---

## I. GENERALIDADES

### 1. SOYA

#### 1.1. COMPOSICIÓN

La soya pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia *Papilionacea*, y al género *Glycine max*. La soya es una leguminosa típica que presenta variación en color, tamaño y forma, dependiendo de la variedad y condiciones en las que crece. Los granos de soya están compuestos por un 30 por ciento de carbohidratos (de los cuales un 15% es fibra), 18 % de aceite (85% no saturado), 14 % de humedad y 38 % de proteína. Es la única legumbre que contiene los nueve aminoácidos esenciales en la proporción correcta para la salud humana. Por lo tanto, la proteína de soya está calificada como una proteína completa de alta calidad. Uno de sus beneficios nutritivos es que es una buena fuente de fósforo, potasio, vitaminas del Grupo B, zinc, hierro y la vitamina E antioxidante. [http://www.solae.com/company/sp/soyessentials/soyessentials.html, 2003; http://www.botanical-online.com, 2004]

El procesamiento de los granos de soya se describe en la figura No. 1; primero se limpian los granos y luego son abiertos, descascarados y laminados en hojuelas. El paso siguiente consiste en extraer el aceite de soya de las hojuelas. Éstas son luego secadas, obteniéndose “hojuelas de soya desgrasadas”.

Este material desgrasado constituye la base para las tres principales categorías de productos a base de proteína de soya: harinas, concentrados y aislados. [2006

[http://www.cipca.org.pe/cipca/informacion\\_y\\_desarrollo/agraria/fichas/soya.htm.](http://www.cipca.org.pe/cipca/informacion_y_desarrollo/agraria/fichas/soya.htm.)]

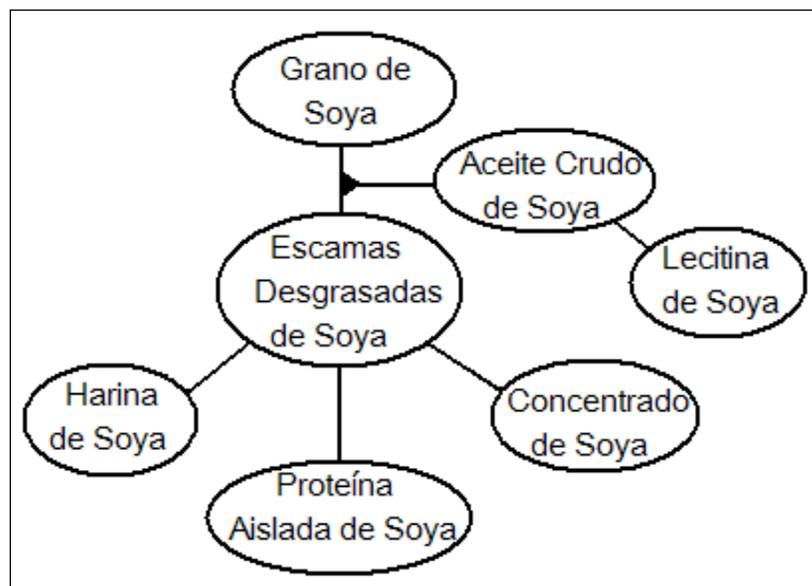


FIGURA No. 1 PROCESAMIENTO DE LA SEMILLA DE SOYA.

## 1.2. PROTEÍNAS AISLADAS DE SOYA

Se preparan a través de un proceso de extracción de agua y aplicación de temperatura mínima sobre las hojuelas de soya. Prácticamente no contiene carbohidratos ni grasa y es un 90 % proteína, calculada por peso en base seca.

Las proteínas aisladas de soya se utilizan como una alternativa nutricional, funcional o económica de las proteínas tradicionales, en barras de alimentos, bebidas, alimentos horneados, panes, cereales, aves, carnes rojas y mariscos.

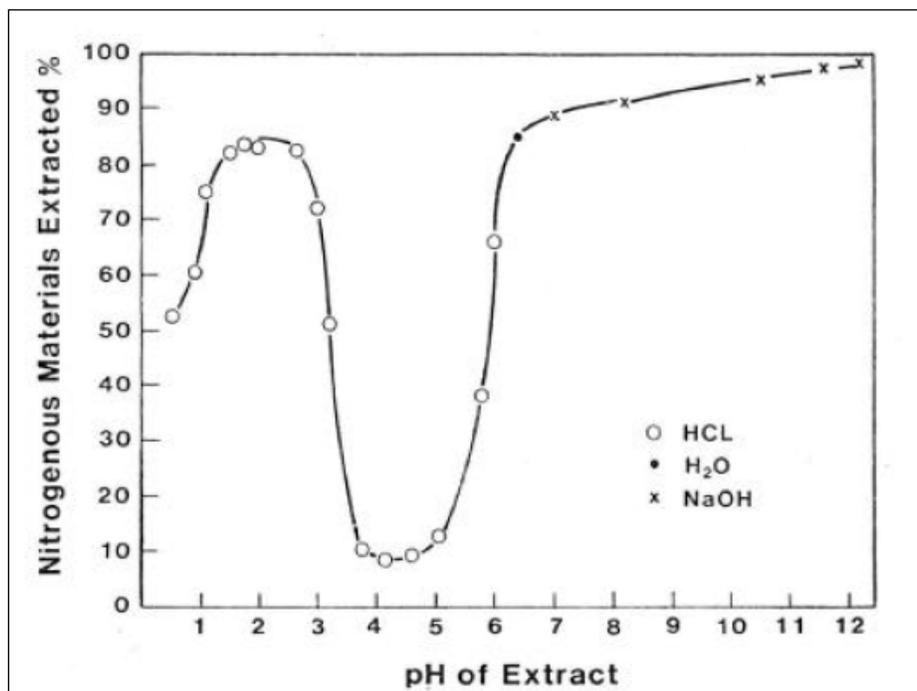


FIGURA No. 2 CURVA TÍPICA DE SOLUBILIDAD DE LA PROTEÍNA DE SOYA.

[Clyde E. Stauffer, 2002]

En la figura No. 2 se observa una curva típica de solubilidad de la proteína de soya, la cuál será muy útil en el desarrollo del método para determinar soya en leche de vaca.

## 2. LECHE

La leche es el producto normal de secreción de la glándula mamaria; es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua. La composición de la leche varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores. Aún así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche. Por ejemplo, la leche con una composición normal posee una gravedad específica que normalmente varía de 1,023 a 1,040 (a 20°C); un punto de congelamiento que varía de -0,518 a -0,543°C y un pH de 6.5 a 6.6. Cualquier alteración, por agregado de agua por ejemplo, puede ser fácilmente identificada debido a que estas características se verán modificadas. La leche es un producto altamente perecedero que debe ser enfriado a 4°C lo más rápidamente posible luego de su colección. [Norma Oficial Mexicana [NOM-155-SCFI-2003; Singh, 1997, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>, 2004; <http://www.nationaldairycouncil.org/lvl04/nutrilib/newknow/nkb4.html>, 2001]

Las temperaturas extremas, la acidez (pH) o la contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente. En la figura No. 3 se presentan los promedios de la composición de la leche de vaca. [Jensen G, 1995]

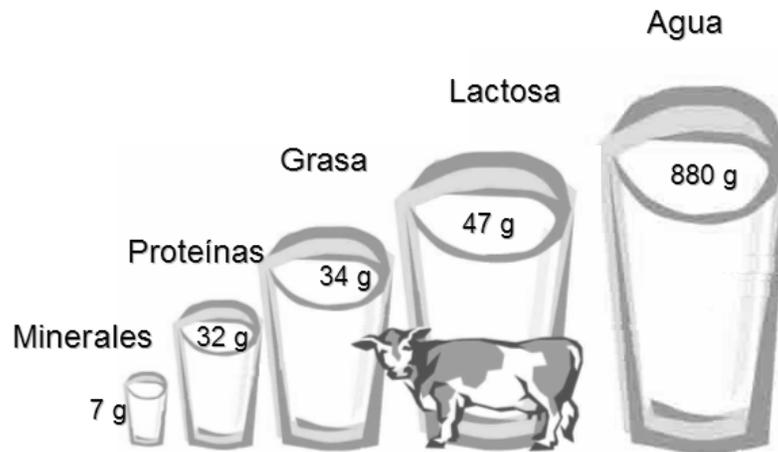


FIGURA No. 3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE VACA (POR LITRO)

Otras características secundarias de la leche son una débil reacción alcalina y una reacción ácida. Esta última indica alteración por fermentación. Sin embargo, la leche tiene algunas desventajas: es, por un lado, fácilmente alterable, por lo que en muchas ocasiones se encuentra adulterada, y es, por otro lado, vehículo frecuente de gérmenes y su consumo es a veces causa de enfermedades endémicas. [[http://www.infocarne.com/ovino/composicion\\_leche\\_asp](http://www.infocarne.com/ovino/composicion_leche_asp), 2004. ]

## 2.1. COMPOSICION DE LA LECHE DE VACA

Los gérmenes de la leche son de cuatro tipos: bacterias no patógenas; bacterias formadoras de ácido láctico, causantes de la fermentación; bacterias de putrefacción, y bacterias patógenas, siendo estas últimas las únicas peligrosas para la salud porque provocan serias enfermedades e infecciones. Las bacterias

---

patógenas más comunes en la leche son: el bacilo de Koch (que causa la tuberculosis de tipo alimenticio), bacilos tíficos y paratíficos, bacilo diftérico, germen de la escarlatina y *Brucella mellitensis* (que provoca la brucelosis) [Rodríguez-Díaz, 2000, [http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de\\_html/ch19.es.html](http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch19.es.html), 2004; Singh, H., 1997, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>, 2004]

### 2.1.1. AGUA

El valor nutricional de la leche como un todo es mayor que el valor individual de los nutrientes que la componen debido a su balance nutricional único. La cantidad de agua en la leche refleja ese balance. En todos los animales, el agua es el nutriente requerido en mayor cantidad y la leche suministra una gran cantidad de agua, conteniendo casi el 90% de la misma. La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria. La producción de leche es afectada rápidamente por una disminución de agua y cae el mismo día que su suministro es limitado o no se encuentra disponible. Esta es una de las razones por las que la vaca debe de tener libre acceso a una fuente de agua abundante todo el tiempo. [Jensen G, 1995]

### 2.1.2. HIDRATOS DE CARBONO

El principal carbohidrato en la leche es la lactosa que se produce en la ubre de la vaca a partir de glucosa y galactosa como se observa en la figura No. 4. A pesar

de que es un azúcar, la lactosa no produce un sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante entre el 4.8% y 5.2%.

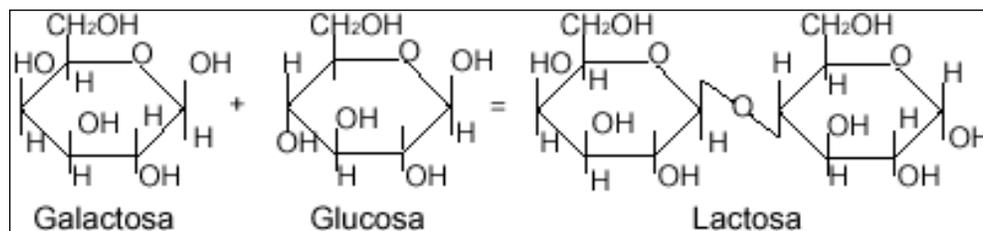


FIGURA No. 4: SINTESIS DE LACTOSA.

A diferencia de la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación. Las moléculas que componen la lactosa se encuentran en una concentración mucho menor en la leche: glucosa (14 mg/100 g) y galactosa (12 mg/ 100 g). En una proporción significativa de la población humana, la deficiencia de la enzima lactasa en el tracto digestivo resulta en la incapacidad para digerir la lactosa. La mayoría de los individuos con baja actividad de lactasa desarrollan síntomas de intolerancia a grandes dosis de lactosa, pero la mayoría puede consumir cantidades moderadas de leche sin padecer malestares.

[[http://www.infocarne.com/ovino/composicion\\_leche\\_asp](http://www.infocarne.com/ovino/composicion_leche_asp). 2004, Veisseyre Roger. 1980 ]

### 2.1.3. PROTEÍNAS

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en la forma de proteína; las sustancias nitrogenadas contenidos en un litro de leche varía de 30-40 gramos por

litro. El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche.

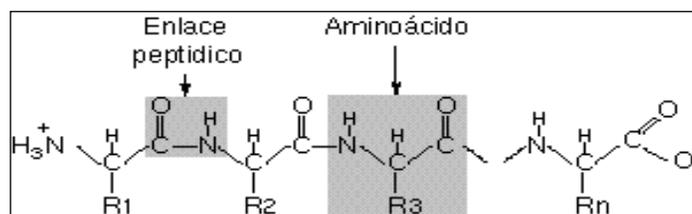


FIGURA No.5: ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE.

En la figura No. 5 se muestra la estructura de las proteínas ( $R_1$ ,  $R_2$ , etc., son los radicales específicos de cada aminoácido. el número de aminoácidos en la caseína de la leche varía de 199 a 209).

TABLA No. 1 PROTEÍNAS DE LECHE DE VACA

PROTEÍNAS	[g / L]	PROTEÍNAS	[g / L]
CASEÍNAS	29.5	LACTOSUERO	6.3
$\alpha_{s1}$ - caseína	11.9	$\alpha$ - Lactoglobulina	3.2
$\alpha_{s2}$ - caseína	3.1	$\beta$ - Lactalbúmina	1.2
$\beta$ - caseína	9,8	Albúmina sérica	0.4
$\kappa$ - caseína	3.5	Inmunoglobulinas	0.8
$\gamma$ - caseína	1.2	Proteosa-peptonas	1.0

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%) como se observa en la tabla No. 1; ésta clasificación es debida al

proceso de fabricación de queso, que consiste en la separación del cuajo de las proteínas séricas luego de que la leche se ha coagulado bajo la acción de la renina<sup>2</sup>. [[http://www.infocarne.com/ovino/composicion\\_leche\\_asp](http://www.infocarne.com/ovino/composicion_leche_asp). 2004, Jensen G, 1995]

### 2.1.3.1. CASEÍNAS

Caseína, la principal proteína de la leche, se encuentra dispersa como un gran número de partículas sólidas tan pequeñas que no sedimentan y permanecen en suspensión. Estas partículas se llaman micelas y la dispersión de las mismas en la leche se llama suspensión coloidal. Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo (en forma de monoéster fosfórico de los aminoácidos alcoholes serina y treonina) y un gran número de aminoácidos, entre los cuales los más abundantes son el ácido glutámico y en menor grado la leucina y la prolina.

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\gamma$ -caseína), en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, proveen las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche (condensada, en polvo, etc.). [Jensen G, 1995, Veisseyre Roger.1980]

---

<sup>2</sup> una enzima digestiva colectada del estómago de los terneros

## 2.1.3.2. PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

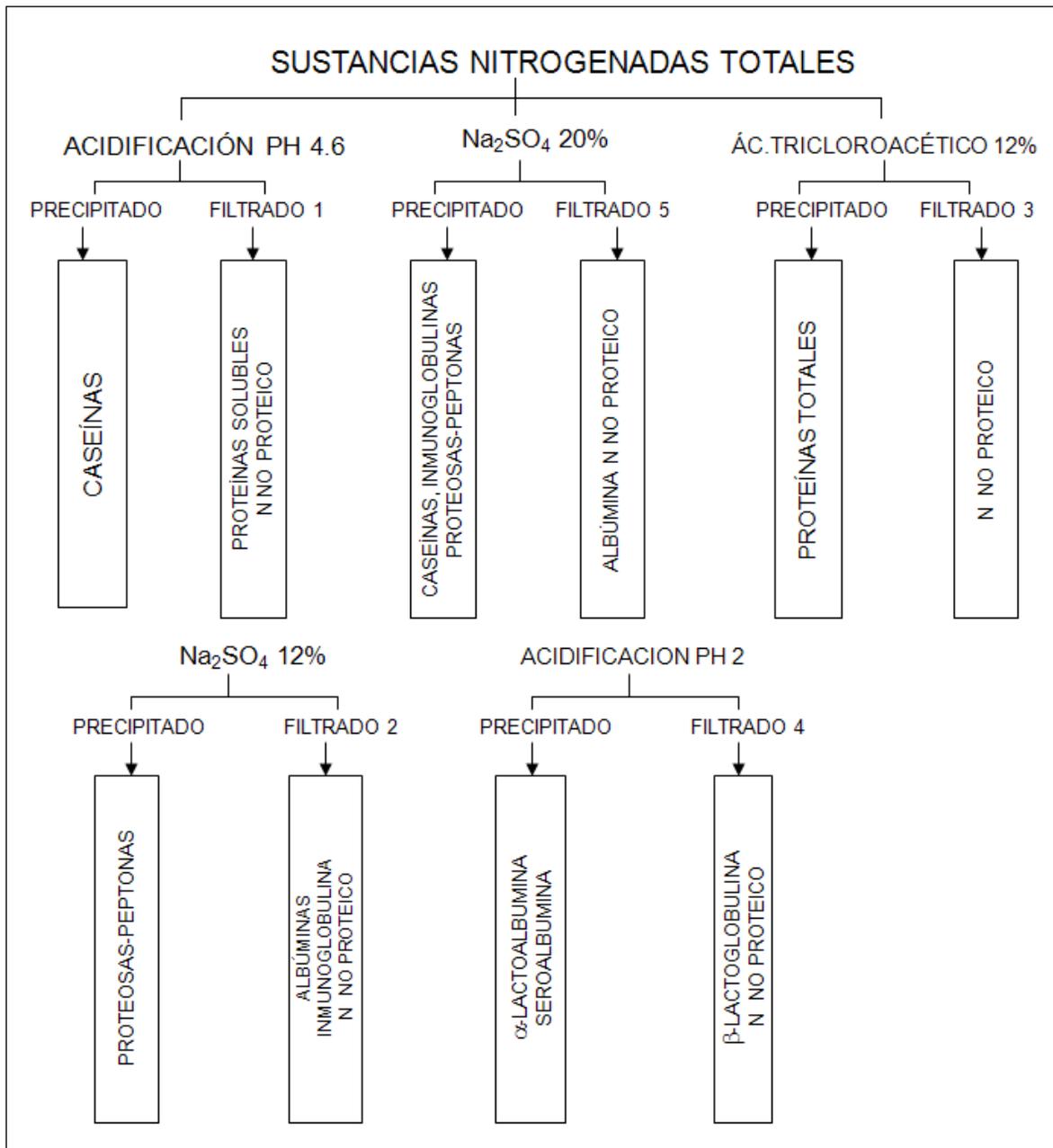


FIGURA No. 6: FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO.

Reciben este nombre el conjunto de sustancias nitrogenadas que no precipitan cuando el pH de la leche se lleva a 4.6 o menos que corresponde al punto

isoeléctrico de la caseína bruta. También se les denomina proteínas solubles. Representan aproximadamente el 20 % del total de proteínas de la leche, los diversos métodos de fraccionamiento según Aschaffenburg y Drewry permiten distinguir cuatro grandes fracciones: albúminas, globulinas, fracción proteosa-peptosa y proteínas menores como se observa en la figura No. 6. [Jensen G. 1995, Veisseyre Roger.1980]

#### 2.1.4. GRASAS

Normalmente, la grasa (o lípido) constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche, variando entre razas de vacas y con las prácticas de alimentación. Una ración demasiado rica en concentrados que no estimula la rumia en la vaca, puede resultar en una caída en el porcentaje de grasa (2,0 a 2,5%).

La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos (ver figura No. 7).

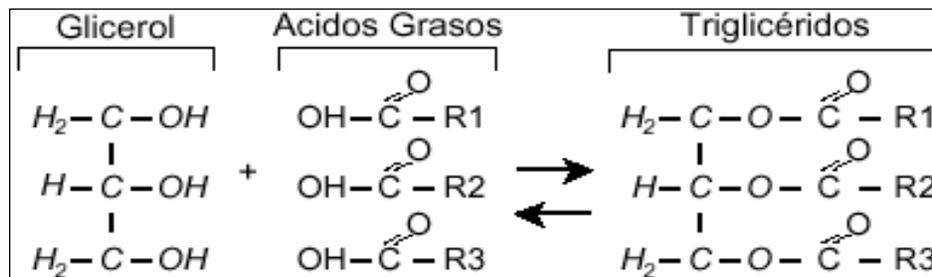


FIGURA No. 7: ESTRUCTURA DE LOS TRIGLICÉRIDOS

Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polinsaturados linoleico y linolénico.

[[http://www.infocarne.com/ovino/composicion\\_leche\\_asp](http://www.infocarne.com/ovino/composicion_leche_asp), 2004, Veisseyre Roger.1980]

### 2.1.5. MINERALES Y VITAMINAS

La leche es una fuente excelente para la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento del lactante. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. Otro mineral de interés en la leche es el hierro. Las bajas concentraciones de hierro en la leche limita el crecimiento bacteriano en la leche ya que el hierro es esencial para el crecimiento de muchas bacterias.

### 2.1.6. CÉLULAS EN LA LECHE

Las células somáticas en la leche no afectan la calidad nutricional; son importantes como indicadores de otros procesos que pueden estar sucediendo en el tejido mamario, incluyendo inflamación. Cuando las células se encuentran presentes en cantidades mayores de medio millón por mililitro, existe una razón para sospechar de mastitis. [<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>, 2004; <http://www.nationaldairycouncil.org/lvl04/nutrilib/newknow/nkb4.html>, 2001]

### 2.1.7. COMPONENTES INDESEABLES EN LA LECHE

La leche y sus subproductos son alimentos perecederos. Altos estándares de calidad a lo largo de todo el procesado de la leche son necesarios para alcanzar o mantener la confianza del consumidor, y para hacer que ellos decidan comprar productos lácteos. La leche que deja la finca debe de ser de la más alta calidad nutricional-inalterada y sin contaminar. Presentamos aquí una lista parcial de las sustancias indeseables más comunes que se encuentran en la leche:

- ☛ Agua adicional
- ☛ Proteínas de naturaleza vegetal
- ☛ Antibióticos
- ☛ Detergentes y desinfectantes
- ☛ Pesticidas o insecticidas;
- ☛ Bacterias
- ☛ Micotoxinas

La vigilancia de los productores en seguir las instrucciones en el uso de productos químicos, como también un buen ordeño, limpieza y almacenamiento de los productos no son solo esenciales para su éxito propio pero también para el éxito de la industria lechera en general. [Rodríguez-Díaz. 2000, [http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de\\_html/ch19.es.html](http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch19.es.html), 2004; Singh, H., 1997]

## 2.2. ESPECIFICACIONES DE LA LECHE

Las especificaciones de las leches las establece la norma oficial mexicana NOM-155-SCFI-2003, para el presente trabajo solo nos referiremos a la leche entera de vaca, tal y como se presenta en la tabla No 2.

**TABLA No. 2 ESPECIFICACIONES DE LECHE ENTERA DE VACA. (NOM-155-SCFI-2003)**

DENSIDAD A 15° C, [G/ML]	1.029 MÍN.
Grasa butírica [g/L]	30 mín.
Acidez (expresada como ácido láctico) [g/L]	1.3 mín. 1.7 máx.
Sólidos no grasos de la leche [g/L]	83 mín.
Punto crioscópico ° C	Entre -0.510 y-0.536
Lactosa [g/L]	43 mín. 50 máx.
Proteínas propias de la leche [g/L]	30 mín.
Caseína [g/L]	21 mín.

## 2.3. MÉTODOS DE PRUEBA EN LECHE

De acuerdo a la norma oficial mexicana la NOM-155-SCFI-2003, los métodos de prueba que se realizan a la leche entera de vaca en México son los siguientes:

### 2.3.1. ÍNDICE CRIOSCÓPICO

El principio en el cual se basa la técnica de la crioscopia es la Ley de Raoult, que señala, que tanto el descenso crioscópico, como el ascenso ebulloscópico, están determinados por la concentración molecular de las sustancias disueltas. Al enfriar una solución diluida se alcanza eventualmente una temperatura en la cual el solvente sólido (soluto) comienza a separarse. La temperatura a la cual comienza tal separación se conoce como punto de congelación de la solución. [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.2. CASEÍNA EN LECHE

La caseína se precipita con ácido acético en su punto isoelectrico a pH 4,6 y posteriormente se cuantifica por el método de Kjeldahl-Gunning. La caseína y demás materias orgánicas son oxidadas por el ácido sulfúrico y el nitrógeno orgánico de las proteínas se fija con sulfato de amonio; esta sal se hace reaccionar con una base fuerte para desprender amoniaco que se destila y se recibe en un ácido débil, en el cual se puede titular el amoniaco con un ácido fuerte. En este método de Kjeldahl-Gunning, se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión. [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.3. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ

La leche generalmente tiene una acidez de 1,3 a 1,7 g/L expresada en ácido láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0,05-0,08%) y de fosfatos. También contribuyen a la acidez el dióxido de carbono (0,01-0,02%), los citratos (0,01%) y la albúmina (menos de 0,001%). La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio 0,1 N utilizando fenoltaleína como indicador o, en su caso, utilizando un potenciómetro para detectar el pH de 8,3 que corresponde al fin de la titulación. [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICRO KJELDAHL

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en sulfato, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio. El amoníaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una solución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de potasio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión. [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.5. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS NO GRASOS

Una vez determinado el contenido de sólidos totales de la leche y el contenido de grasa, se determina el contenido de sólidos no grasos por cálculo, ya que los sólidos no grasos están formados por lactosa, proteínas y sales minerales.

### 2.3.6. DETERMINACIÓN DE LA ADULTERACIÓN DE ACUERDO A LA NOM-155-SCFI-2003.

El monitoreo de la adulteración de la leche se puede realizar separando las diferentes proteínas presentes en el suero y la grasa. El método que se puede usar exitosamente para este tipo de prueba es la técnica de Electroforesis Capilar. Esta técnica se aplica para cualquier tipo de adulteración proteica. El perfil de proteínas obtenido por Electroforesis Capilar es característico del origen de la leche. Generando tal perfil, se puede determinar si existe una adulteración y cuál es el origen y la proporción de ésta. Esta técnica permite la separación simultánea de las proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina) y las de la grasa (caseínas). Comparando los perfiles estándares de leche de vaca con los perfiles de muestras desconocidas y perfiles de productos adulterantes posibles se determina el tipo de adulteración.

### 2.3.7. DENSIDAD

Además de cumplir con la NMX-F-424-S-1982 los resultados deben expresarse en gramos por mililitros (g/mL). [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.8. GRASA BUTÍRICA

Caracterización del perfil de ácidos grasos C-4 a C-22 aplicando el método de prueba descrito en la Norma Mexicana NMX-F-490-NORMEX-1999, así como el que a continuación se describe. La grasa de la muestra se saponifica con una solución de KOH y acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para liberar los ácidos grasos, insolubles y solubles en agua. Los ácidos grasos se separan por filtración. El ácido butírico se determina como ácido libre, por cromatografía de gases, usando estándar interno. La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol amílico, el cual actúa como un agente tensoactivo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa. [NOM-155-SCFI-2003]

### 2.3.9. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS (LACTOSA)

Las proteínas de la muestra de leche, utilizando soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio. Se filtra y en el filtrado se determina la lactosa aprovechando su propiedad de ser un azúcar reductor directo el cual reduce el cobre de sus sales alcalinas mediante una valoración volumétrica, según el método de Lane y Eynon. [NOM-155-SCFI-2003]

### 3. ANTIBIÓTICOS

Antibiótico (del griego, anti, “contra”; bios; “vida”), es cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. Una propiedad común de todos los antibióticos es la toxicidad selectiva: la toxicidad es superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan.

#### 3.1. CLASIFICACION SEGÚN SUS ESTRUCTURAS QUIMICAS

Esta clasificación es la más utilizada en la literatura científica. Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas, en dependencia también de las adiciones de grupos químicos que posean en dichos núcleos base. [Cué B. M. 1998, Marín M. 2003, Prado F. G. 2002]

##### 3.1.1. GRUPO DE LOS BETALACTAMICOS

Fleming descubrió de forma accidental la penicilina en 1928 (un derivado del hongo *Penicillium notatum*); esta sustancia demostró su eficacia frente a cultivos

de laboratorio de algunas bacterias patógenas como las de la gonorrea, las de la meningitis o la septicemia. Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos. Howard Florey y Ernst Chain, en 1940, fueron los primeros en utilizar la penicilina en seres humanos. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas. Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cistina para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades. [Cué B. M. 1998, Marín M. 2003, Prado F. G. 2002, Mendoza Z. R. 2002, Merck & Co., 1996]

En la actualidad, el término penicilina se usa para denominar a un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético, que tienen un núcleo base común que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Las penicilinas son bactericidas debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana y de activar enzimas que destruyen dicha pared. Su principal inconveniente son las reacciones alérgicas que originan, las cuales se producen entre el 5 % y el 10 %

de las personas, y que van desde una erupción leve hasta una anafilaxia que puede causar la muerte. No obstante, éstas se encuentran entre los antibióticos más útiles y que con más frecuencia se prescriben. Los antibióticos betalactámicos que más comúnmente se pueden encontrar en la leche son: penicilina G, ampicilina, amoxicilina, dicloxacilina, oxacilina y cefalexina como se muestra en la figura No. 8. [<http://www.chemfinder.com>, 2003]

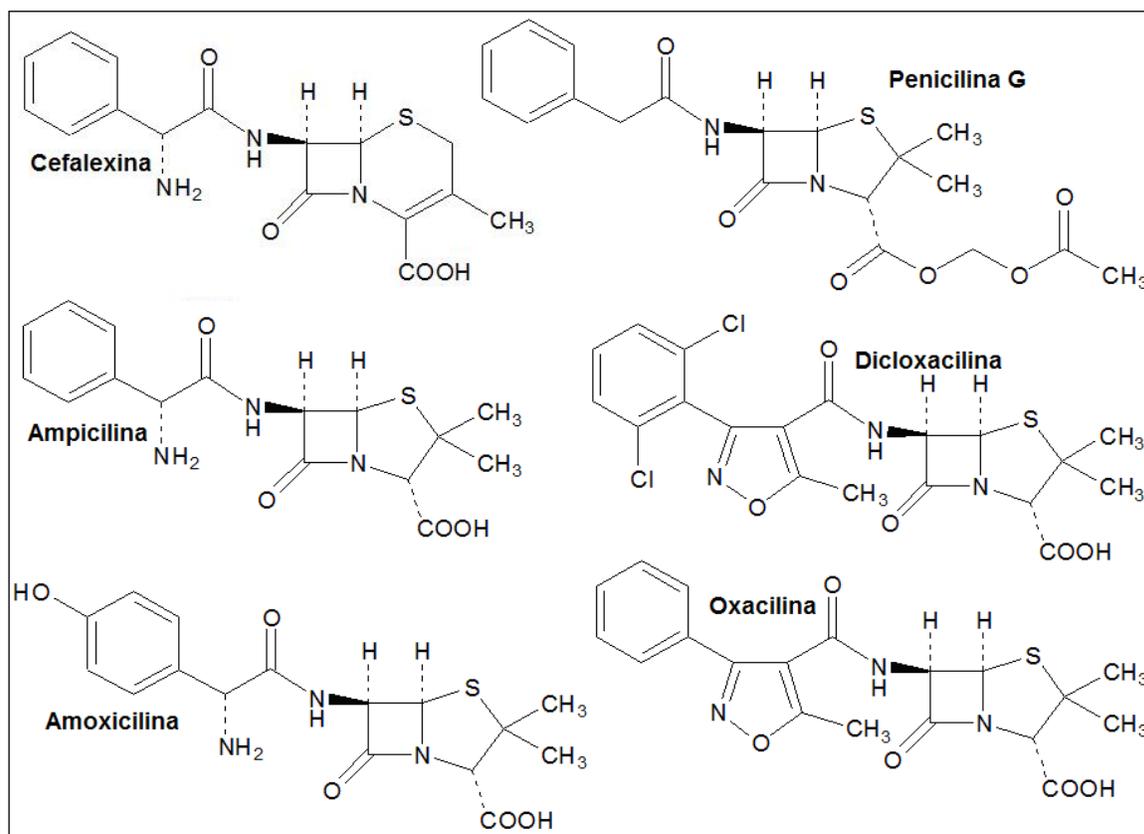


FIGURA No. 8 ESTRUCTURAS DEL GRUPO DE LOS BETALACTÁMICOS.

En la figura 9 se muestran los espectros de absorción obtenidos para estos 6 antibióticos; cuyo medio de disolución fue buffer de boratos 50 mM a pH 8.0, en la cual se puede observar que presentan mayor absorción de 200 a 240 nm.

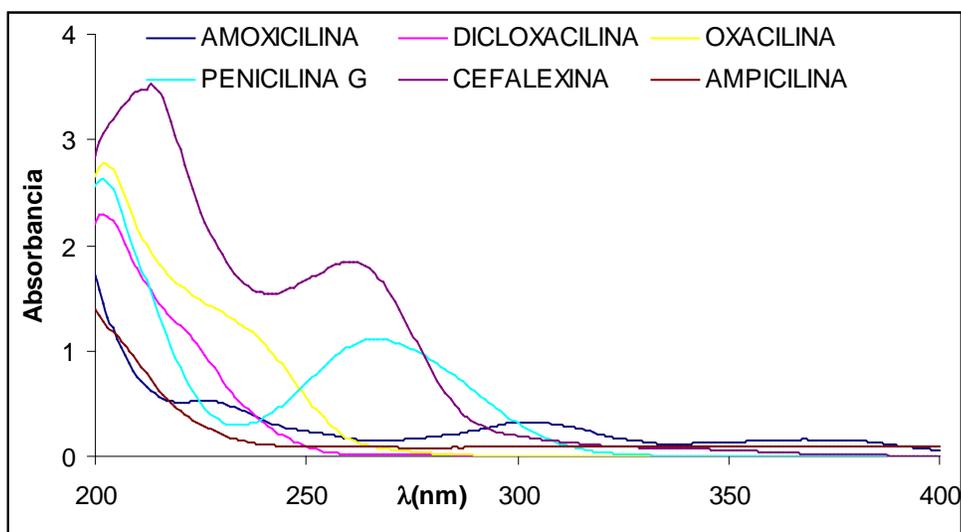


FIGURA No. 9. ESPECTROS DE ABSORCION DE 6 BETA-LACTAMICOS.

### 3.1.2. GRUPO DE LAS TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro eficaces frente a cepas de estreptococos, bacilos Gram negativos, las bacterias del género *Rickettsia* (las bacterias que producen el tifus) y espiroquetas (las bacterias que producen la sífilis) que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Todas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados como se muestra en la figura No. 10. [Marín M. 2003, Pérez-Trallero. 2003]

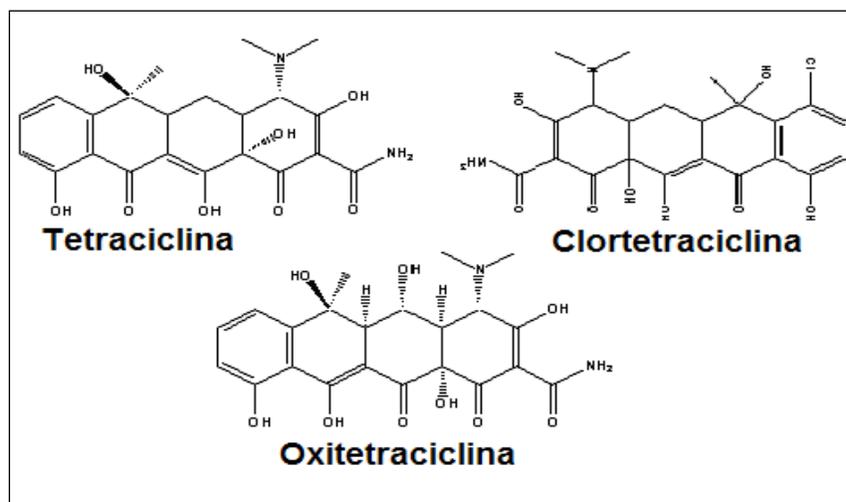


FIGURA No. 10 ESTRUCTURAS DE TETRACICLINAS. [http://www.chemfinder.com, 2003]

En la figura 11 se muestran los espectros de absorción obtenidos para las 3 las tetraciclinas analizadas; cuyo medio de disolución fue buffer de boratos 50 Mm a pH 8.0, observando que absorben en toda la región ultravioleta.

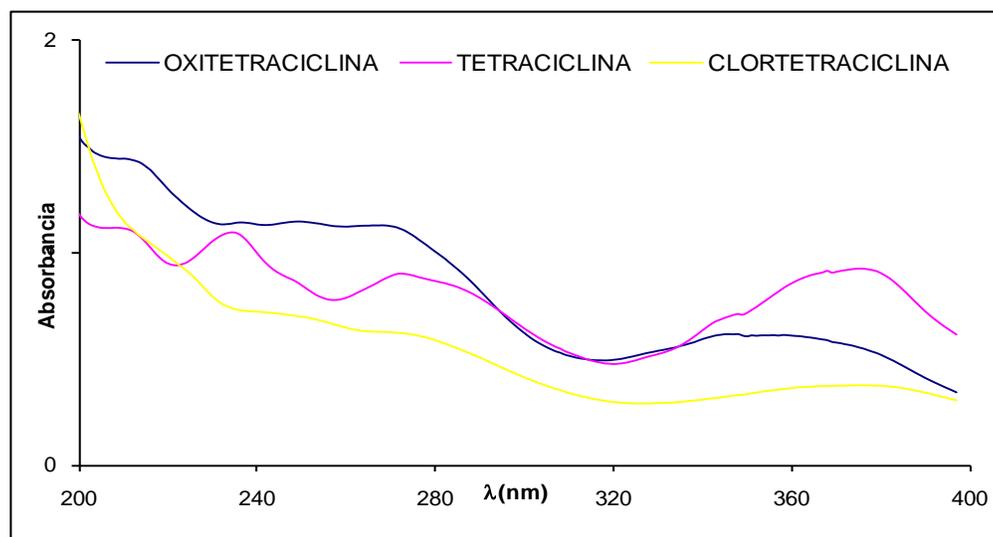


FIGURA No. 11 ESPECTROS DE ABSORCION DE 3 TETRACICLINAS.

## 3.1.3. GRUPO DE LOS MACROLIDOS

Los macrólidos son un grupo de antibióticos que poseen un anillo lactónico macrocíclico al que se unen diversos deoxiazucares; se clasifican de acuerdo al número de carbonos de la molécula, como se muestra en la figura No. 12.

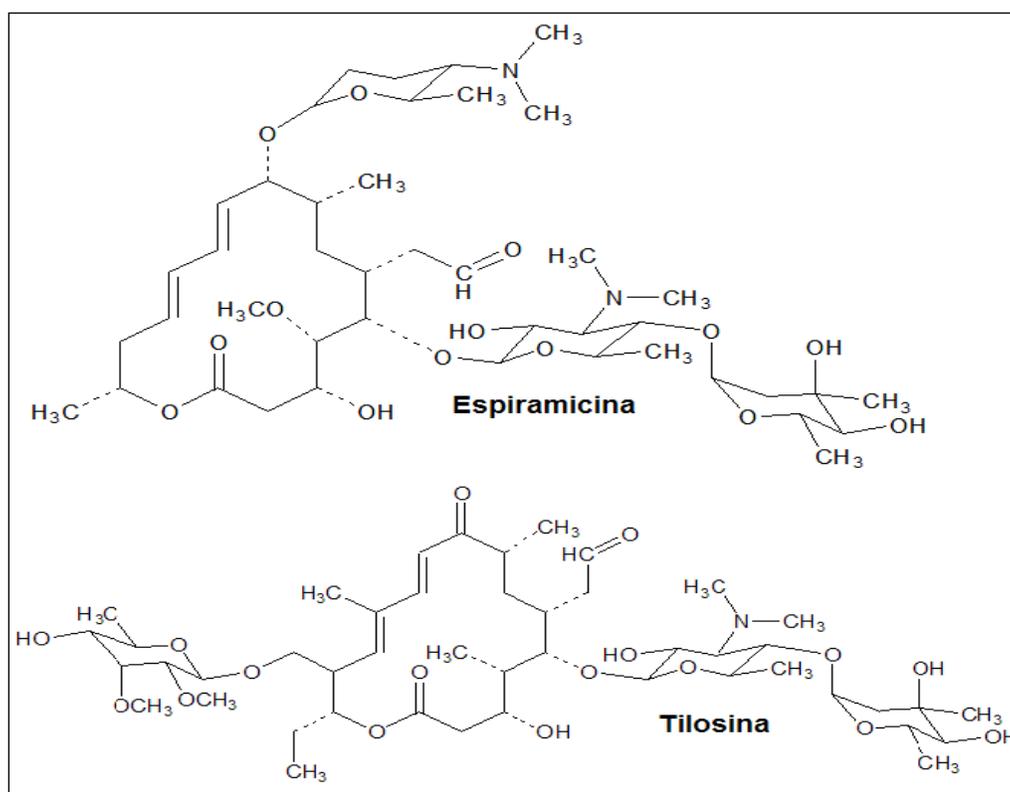


FIGURA NO. 12 ESTRUCTURAS DE MACRÓLIDOS. [<http://www.chemfinder.com>, 2003]

Los macrólidos son bacteriostáticos. Se unen a los ribosomas bacterianos para inhibir la síntesis de proteínas; como la eritromicina que es un antibiótico con un amplio margen de seguridad y mínimos efectos adversos.

[<http://www.encolombia.com/veterinaria/fenavi9202-tecnico.htm>, 2006]

La Tilosina es un antibiótico del grupo de los macrólidos presentando acción bacteriostática sobre una amplia gama de patógenos como Estafilococos, Streptococos, Clostridios, Leptospiras, Chlamydas, Diplococos, Bacilos, Micoplasmas y es utilizado para combatir neumonía, septicemia hemorrágica, mastitis, conjuntivitis, leptopirosis, micoplasmosis, etc. en diversos animales domésticos como ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y aves.

[<http://es.wikipedia.org/wiki/Tilosina>, 2007, Mourier P.2004]

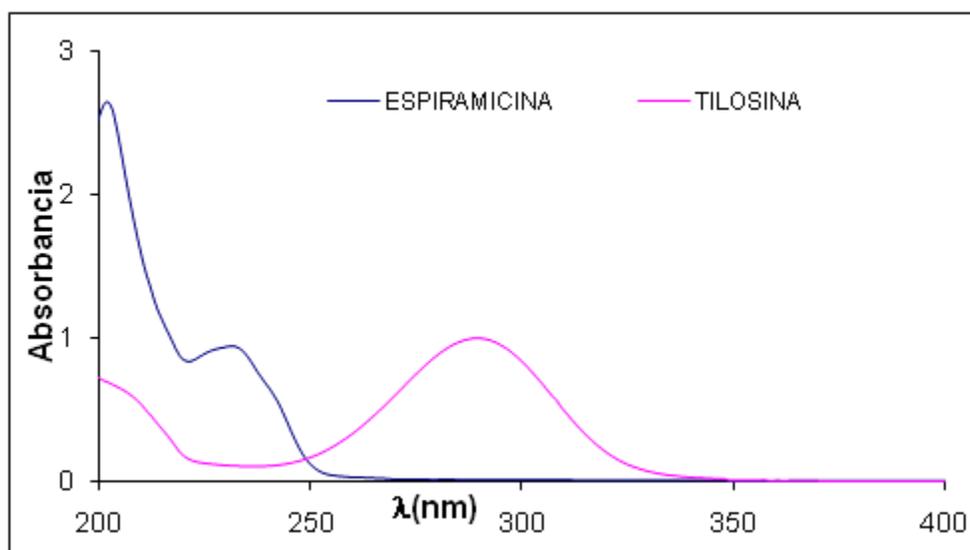


FIGURA NO. 13. ESPECTROS DE ABSORCION DE ESPIRAMICINA Y TILOSINA.

#### 3.1.4. GRUPO DE LAS SULFAMIDAS.

Las sulfamidas son antibióticos bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro, eficaces contra la mayoría de las bacterias Gram positivas y muchas bacterias Gram negativas.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del ADN<sup>3</sup> bacteriano. Debido a su toxicidad y elevada resistencia adquirida su uso actualmente es muy escaso. Las diaminopirimidinas como el trimetoprim, (ver figura 14) al igual que las sulfamidas, interfieren en el metabolismo del ácido fólico por lo que combinadas tienen efecto sinérgico. Los residuos en alimentos principalmente en leche son preocupantes debido a su naturaleza carcinógena, además del posible desarrollo a la resistencia del antibiótico en los seres humanos. Las sulfamidas se utilizan con propósitos profilácticos y terapéuticos; aunque también actúan como sustancias promotoras del crecimiento. El trimetoprim es administrado junto con las sulfamidas para potenciar su efecto. Las comisiones europeas y de Norteamérica han fijado los LMR permisibles en leche en 100 µg/kg, de la suma de todas las sulfamidas presentes en leche. [Stolker A. 2005, Cué B. M.1999, Nevado B. 2001]

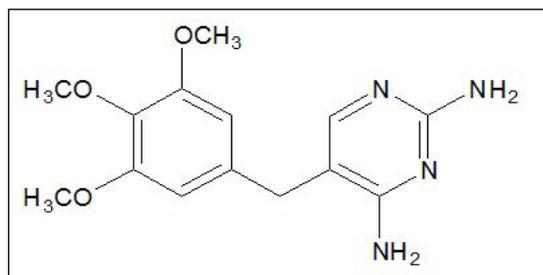


FIGURA NO. 14 ESTRUCTURA DEL TRIMETOPRIM. [<http://www.chemfinder.com>, 2003]

<sup>3</sup> Ácido desoxirribonucleico

En la figura 15 se muestra el espectro de absorción del trimetoprim, el cual puede ser detectado en toda la región ultravioleta, lo que no presenta problema para el desarrollo del método.

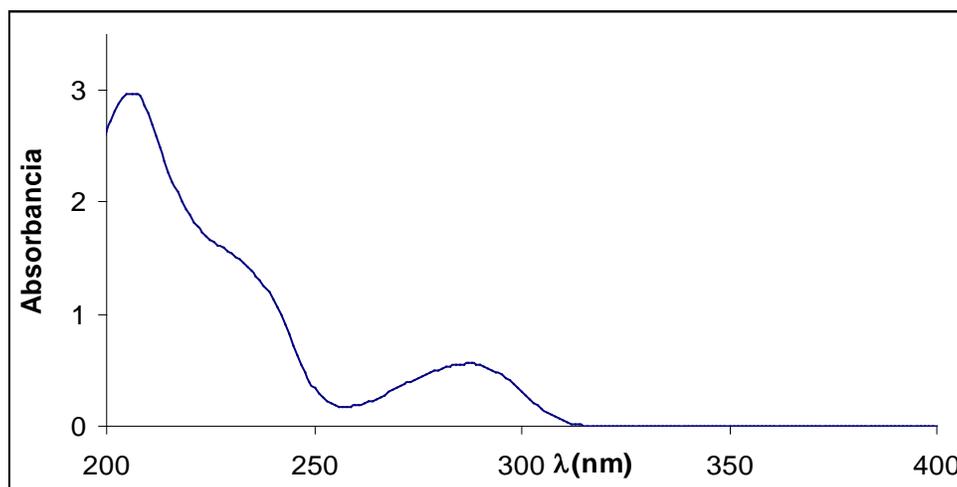


FIGURA No. 15 ESPECTROS DE ABSORCION DEL TRIMETOPRIM.

### 3.1.5. GRUPO DE LOS QUINOLONAS

Las quinolonas, es una familia de fármacos antibacterianos producidos por síntesis en laboratorio y formada por el ácido nalidíxico y sus derivados fluorados y no fluorados ofloxacina, norfloxacina, pefloxacina, ciprofloxacina, lomefloxacina y enrofloxacina (figura 16 y 17). Producen la muerte bacteriana al inhibir la actividad de la subunidad A de la enzima bacteriana ADN girasa, encargada de formar la hélice del ADN bacteriano.

Algunas bacterias (estafilococos, pseudomonas) desarrollan resistencias frente a estos fármacos por mutación de la ADN-girasa o por impermeabilidad de la pared bacteriana a su penetración. No deben emplearse en niños ni en gestantes porque pueden alterar el desarrollo de los cartílagos en crecimiento. Producen, en menos de un 5% de los pacientes, efectos secundarios leves de carácter gastrointestinal (diarrea, náuseas) o nervioso (insomnio, mareos). [Hernández M. 2002, Stolker A. 2005, <http://www.chemfinder.com>, 2003]

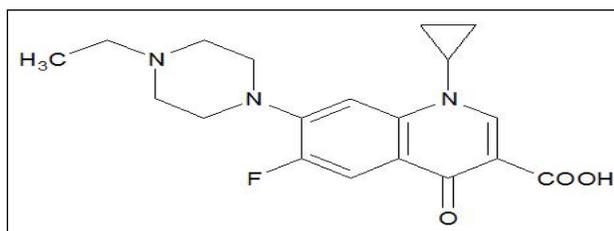


FIGURA NO. 16 ESTRUCTURA DE LA ENROFLOXACINA.

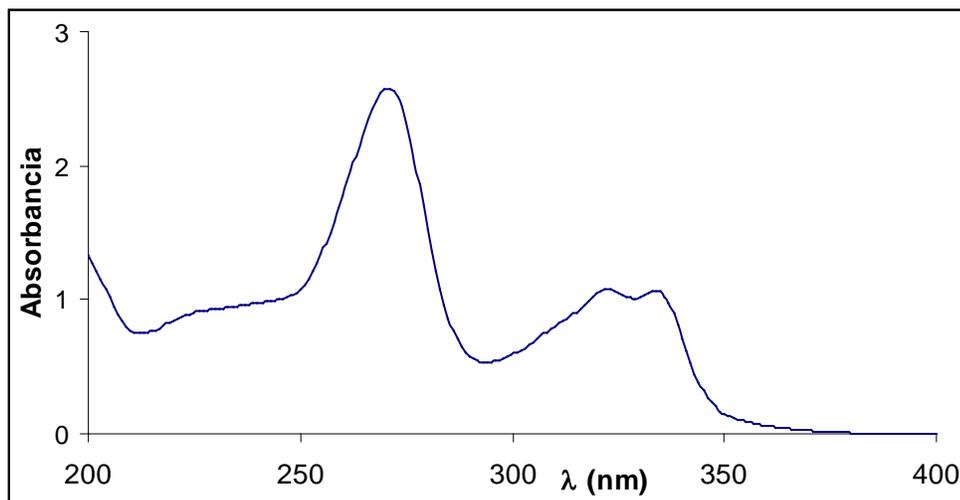


FIGURA No. 17 ESPECTRO DE ABSORCION DE ENROFLOXACINA

## 3.1.6. GRUPO DE LOS AMFENICOLES

El cloranfenicol (ver figura 18) tiene un gran espectro de actividad contra rickettsias, bacterias gram positivas y gram negativas y es más activo que la penicilina y la estreptomicina. Ha sido usado ampliamente por vía oral y parenteral en el tratamiento de infecciones urinarias, mastitis, salmonelosis aguda y otras infecciones resistentes a otros antibióticos. La prohibición de su uso en muchos países tiene origen en su propiedad de producir en los humanos una reacción adversa fatal, la anemia aplásica, aun en concentraciones subterapéuticas. [Prado F. G. 2002, Gómez M. 2003, Merck & Co. 1996]

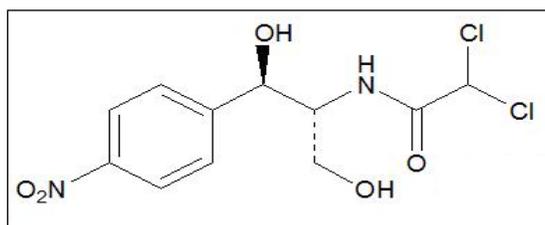


FIGURA NO. 18 ESTRUCTURA DEL CLORANFENICOL.

En la figura 19 se puede observar el espectro de absorción del cloranfenicol cuyo medio de disolución fue buffer de boratos 50 Mm a pH 8.0., y como se puede observar se puede trabajar en dos zonas en la primera que abarca de 208 a 220nm o bien a 282 nm tiene otro máximo.

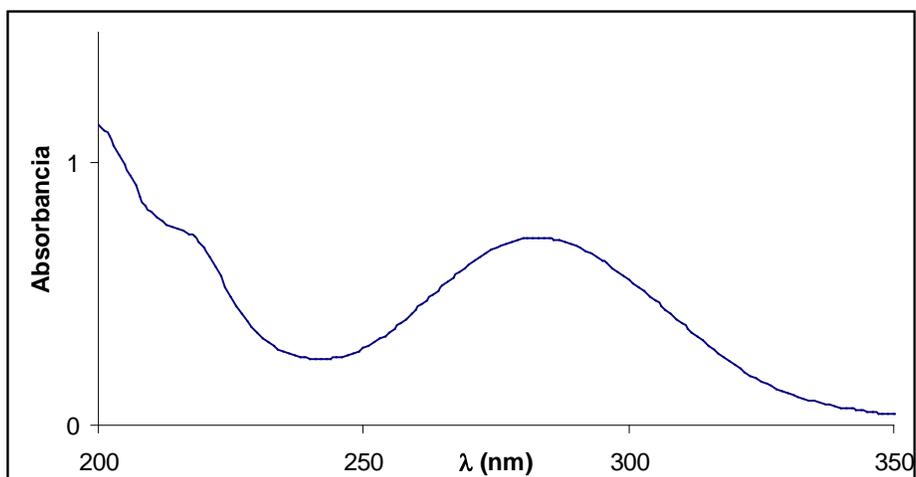


FIGURA No. 19 ESPECTRO DE ABSORCION DEL CLORANFENICOL

### 3.2. LÍMITE MÁXIMO RESIDUAL DE UN ANTIBIÓTICO

Los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados, tanto a nivel médico como veterinario, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas. El empleo indiscriminado de estos productos puede acompañarse de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del germen causal; quizás, una de las complicaciones más importantes es la aparición de gérmenes antibiótico-resistentes que a su vez, crea la necesidad cada vez mayor de nuevas drogas. [Prado F. G. 2002, Ramírez. 2003]

Tras la administración de un antibiótico a un animal tiene lugar una metabolización que favorece su eliminación y en conjunto, la desintoxicación. Ahora bien, los antibióticos de los piensos medicamentosos pueden originar la presencia de

residuos de dichos fármacos en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano. Los residuos de cualquier medicamento veterinario, en general, son sustancias farmacológicamente activas (ya sean principios activos, excipientes o bien productos de degradación y metabolitos) que permanecen en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les ha administrado el medicamento veterinario. La localización de estos residuos es variable.

El tejido muscular y la grasa son los lugares preferentes, aunque también se han identificado en los tejidos menos consumidos como son el hígado o el riñón. La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad hasta presentar consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas, anatomopatológicas o incluso, causar la muerte. Otros, en cambio, pueden originar residuos cuya desaparición es difícil necesitando un largo periodo para su eliminación o incluso, la prohibición de su uso. Para garantizar que la concentración residual de los antibióticos no sea superior a su correspondiente LMR, es necesario establecer un tiempo de espera. Este tiempo de espera es el plazo de tiempo que debe transcurrir, y ser respetado, desde el último tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales para poder consumir la carne o recoger sus productos (leche, huevos) para su comercialización. [Knarreborg A. 2002, Kennedy D.G. 1998, Prado F. G. 2002, Ramírez. 2003 Zhang C. 1994]

El análisis de residuos involucra seguridad en los alimentos, es decir si un alimento es seguro o inseguro para el consumo humano; y es parte de los programas de monitoreo de agencias regulatorias como la Organización Mundial de la salud (OMS), en inglés World Health Organization (WHO) y la Organización de Alimentos y Agricultura en inglés Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). Es muy importante desarrollar procedimientos analíticos para la determinación de antibióticos en matrices biológicas a muy bajas concentraciones. Algunos valores de concentración máxima de antibióticos permisibles en leche se muestran en la tabla No 3. [ALTAGA. 2000, Mendoza Z. R. 2002, Prado F. G. 2002]

**TABLA No. 3 LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN LECHE**

LMR [ $\mu\text{g/L}$ ]			
PENICILINA G	4	TILOSINA	50
AMPICILINA	4	CEFALEXINA	100
AMOXICILINA	4	TRIMETOPRIM	50
OXACILINA	30	ENROFLOXACINA	100
DICLOXACILINA	30	TETRACICLINA	100
CLORTETRACICLINA	100	OXITETRACICLINA	100
ESPIRAMICINA	200	CLORANFENICOL	0

Concretando, son 14 antibióticos que se detectaran en leche de vaca como contaminantes, como se muestra en la tabla No. 4, se muestran algunas propiedades importantes de dichos antibióticos para ser determinados por electroforesis capilar.

TABLA No. 4 PROPIEDADES FISICAS DE LOS 14 ANTIBIÓTICOS.

NOMBRE	FORMULA Y P.M.	SOLUBILIDAD EN AGUA	pKa
AMOXICILINA	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S P.M.: 365.4032	3.4g/L a 25° C	2.8 Y 7.2.
AMPICILINA	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S P.M.: 349.41	10g/L a 25° C	2.53
PENICILINA G	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> S P.M.: 356.37107	5-10 g/100 mL a 25° C	2.7
OXACILINA	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S P.M.: 401.4362	27.8 mg/L a 25° C	2.72
DICLOXACILINA	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S P.M.: 470.3264	3.63 mg/ a 25° C	2.80
CEFALEXINA	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S P.M.: 347.388	1790 mg/L a 25° C	5.3 y 7.3
TETRACICLINA	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P.M.: 444.4402	231 mg/L a 25° C	3.3
CLORTETRACICLINA	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P.M.: 478.8853	630 mg/L a 25° C	3.3
OXITETRACICLINA	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> P.M :460.4396	313 mg/L a 25° C	3.27
ESPIRAMICINA	C <sub>43</sub> H <sub>74</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> P.M : 843.05.	ligeramente soluble a 25° C	8.2
TILOSINA	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub> P.M.: 916.1108	5000 mg/L a 25° C	7.1
ENROFLOXACINA	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P.M :359.3995	ligeramente soluble a 25° C	2.74±.4 7.11±0.5 *
CLORAMFENICOL	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> P.M.: 323.13.	2500 mg/L a 25° C	11.05±0.46 13.41±0.2 14.97±0.1*
TRIMETOPRIM	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	400mg/L L a 25° C	6.6

\* Los pKa's fueron calculados con el software ACD/LABS versión 6.0.

### 3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN EL ANÁLISIS DE RESIDUOS.

Los métodos de análisis de residuos han tenido un desarrollo importante desde 1980, tanto en métodos analíticos, equipo y automatización; enfocándose principalmente a la determinación de técnicas con alta sensibilidad y especificidad, debido a la demanda regulatoria, es por ello que la cantidad de métodos analíticos para el control de contaminantes químicos ha aumentado dramáticamente en la última década. Las técnicas cromatográficas han jugado un papel importante, especialmente la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), usada para el análisis de residuos de antibióticos en muestras biológicas. Sin embargo CLAR está limitada algunas veces con pobre eficiencia en la separación, columnas muy caras y el consumo de gran cantidad de buffer y solventes orgánicos. [Knarreborg A. 2002, Kennedy D.G. 1998, Zhang C. 1994, Benito-Peña. 2006, Cinquina A. L. 2003, Cinquina A. L. 2003]

Una buena alternativa es la Electroforesis Capilar (EC) especialmente cuando se tienen pequeñas cantidades de muestra considerando grandes ventajas como gran eficiencia de separación, pequeños volúmenes de muestra, y pequeñas cantidades de solventes orgánicos y bajos costos en los capilares (columnas). Esta técnica analítica es muy recomendable por su bajo costo, automatización, múltiples modos de detección, además para el monitoreo de antibióticos en su gran variedad de matrices, así como plasma, tejidos, orina, suero y leche. Una

desventaja importante dentro de la electroforesis capilar es que algunas veces no es suficientemente sensible para determinar bajas concentraciones debido a que el volumen de inyección de muestra es extremadamente pequeño y la longitud del capilar en el paso óptico es muy corta.

Hablando específicamente de la determinación de los 14 antibióticos, respecto a la bibliografía se han reportado algunas separaciones que involucran algún antibiótico presente en una mezcla, preparado o formas farmacéuticas incluso en plasma; Hernández M. 2002, Kowalski P. 2003 Nevado B. 2001, Pajchel G. 2002, Yongxin Z., 1997 y Calavska J. 1993 ellos plantean separaciones con sólo algunos antibióticos; a diferencia del método desarrollado en el presente trabajo, el cuál se propuso para separar a 14 de ellos; considerando que en las granjas lecheras se realiza la ordeña y se mezcla la leche de todas las vacas, así que posiblemente se encuentren muchos de los antibióticos que no deberían estar presentes en leche.

## 4. ELECTROFORESIS

Durante muchos años, las técnicas electroforéticas se realizaron en geles hidrofílicos y otros medios de soporte, pero en los últimos años, se han llevado a cabo en capilares de sílice fundida de solo unas cuantas micras de diámetro interno. Se ha demostrado su gran utilidad en la separación de diversas sustancias, especialmente macromoléculas y su uso se ha extendido a muchas áreas de la ciencia. A fin de seguir un orden lógico y comprensible, primero se describe en que consiste el proceso electroforético en general y posteriormente la Electroforesis Capilar y sus ventajas.

### 4.1. PROCESO ELECTROFORÉTICO

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración como se muestra en la figura 20. Las partes básicas de dicho sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor. La electroforesis clásica se ha utilizado tradicionalmente para analizar y purificar biopolímeros, sin embargo los métodos de separación para esta clase de compuestos son generalmente lentos y requieren de un intenso trabajo. [Marina, 1994, Skoog, 1994]

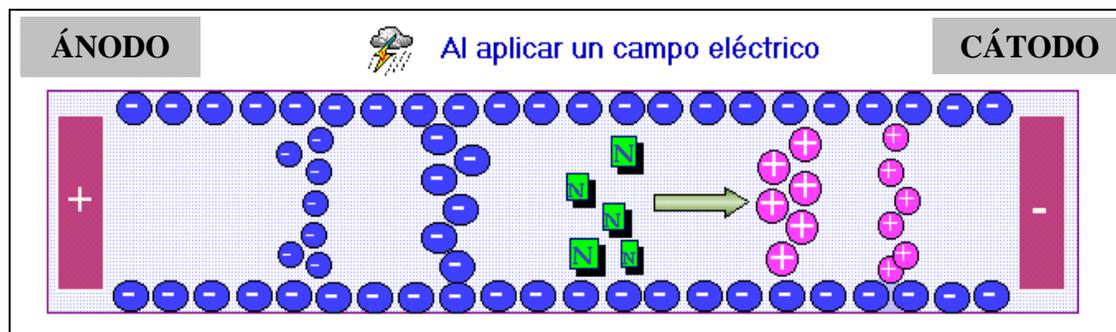


FIGURA No. 20 PROCESO DE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA [Castillo, 2001]

#### 4.1.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis realizada en tubos capilares ha aumentado el interés en esta técnica desde el punto de vista analítico, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, ampliado increíblemente su campo de aplicación.

Esta técnica electroforética es conocida como Electroforesis Capilar (EC), Electroforesis Capilar de Zona (ECZ). Es importante hacer notar que aunque este método se parece a la CLAR o HPLC), los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos, con excepción de la CCEM, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos. [Skoog, 1994]

El mecanismo de separación en la EC es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación masa/carga y con la conformación de los analitos. La EC consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico.

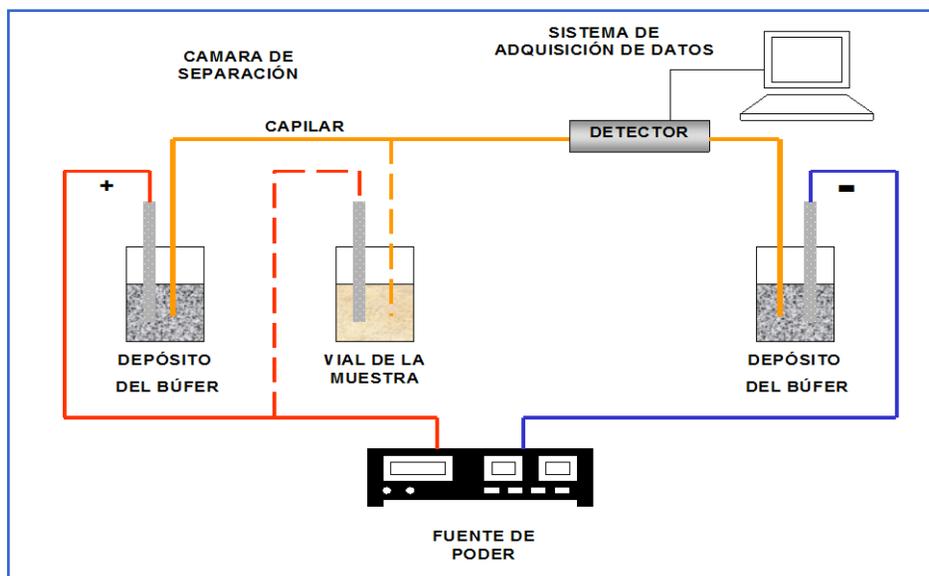


FIGURA 21. SISTEMA GENERAL DEL EQUIPO DE EC

Un sistema de EC consiste básicamente en las siguientes partes básicas, como se muestra en la Figura No. 21:

- ⊕ Dos electrodos de platino (ánodo y cátodo)
- ⊕ Fuente de poder de alto voltaje autoreversible (0-30kV)

- ⊕ Depósito (viales) donde se colocan los electrodos respectivamente
- ⊕ Capilar de sílice fundida sin o con recubrimiento en la pared (compartimiento donde se lleva a cabo la separación)
- ⊕ Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido recirculante)
- ⊕ Un sistema que introduce la muestra
- ⊕ Un detector

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente búfer) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La introducción de una muestra se realiza sustituyendo un depósito de búfer por el contenedor con la muestra (generalmente un vial) durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje por algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma. [Skoog. 1994, Rivera. 1996]

## 4.2. PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

### 4.2.1. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. [Heiger. 1997, Marina. 1994]. La velocidad de un analito, cuando ningún flujo electroosmótico está presente puede ser dada por la ecuación 1:

$$\boxed{v = \mu E} \quad (1)$$

Donde:  $v$  es la velocidad del analito,  $\mu$  es la movilidad electroforética y  $E$  es el campo eléctrico, que es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética<sup>4</sup> depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito. De la ecuación 2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

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

Donde:  $\mu$  es la movilidad electroforética del analito,  $q$  es la carga del analito,  $\eta$  es la viscosidad de la solución y  $r$  el radio molecular.

---

<sup>4</sup> Es la movilidad de las moléculas en solución bajo la influencia de un campo eléctrico.

## 4.2.2. FLUJO ELECTROOSMÓTICO

Un constituyente fundamental de la Electroforesis Capilar es el llamado Flujo Electroosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 5-6) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica. [Castillo Rodríguez. 2005]

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico, ver figura 22.

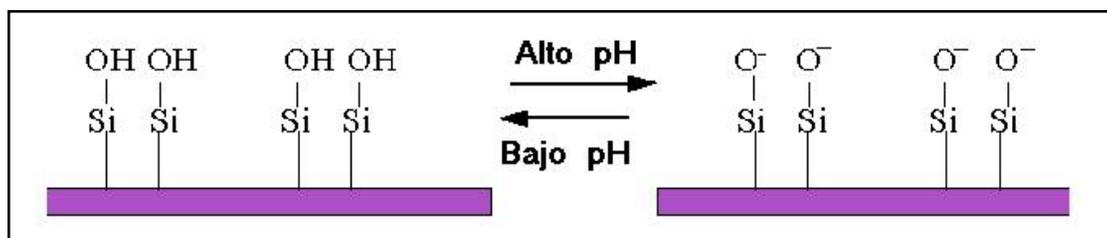


FIGURA No. 22 REPRESENTACIÓN DE LOS GRUPOS SILANOL EN LA PARED DEL CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA EN FUNCION AL pH

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas. Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base), de la adsorción<sup>5</sup> de las especies iónicas a la superficie, o de ambas. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma ionizada (SiO<sup>-</sup>). Aunque el punto isoeléctrico exacto de la sílice fundida es difícil de determinar, se sabe que el FEO llega a ser significativo a pH mayor de 5. Los materiales no iónicos como el teflón exhiben también cierto FEO, y se presume que resulta de la adsorción de aniones por la superficie de la pared del capilar.

#### 4.3. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

La Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y su versatilidad. La ECZ es la forma más simple de EC principalmente porque el capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Los analitos neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del FEO.

---

<sup>5</sup> Es el proceso de interacción entre el analito y la superficie de un adsorbente. Las fuerzas involucradas pueden ser fuertes (por ejemplo, los puentes de hidrógeno) o débil (fuerzas de Van Der Waals).

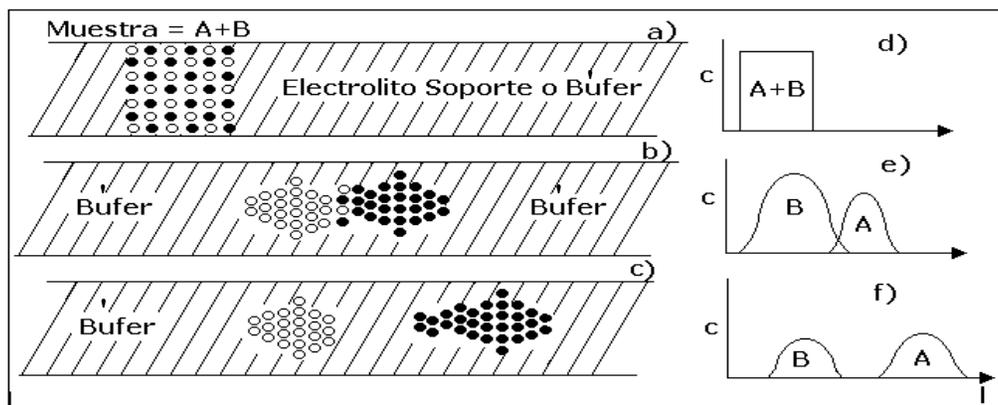


FIGURA No. 23 REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACION ZONAL.

La figura 23 representa lo que sucede en la Electroforesis Capilar de Zona:

- El capilar se llena con el búfer y se introduce la muestra (analitos A y B)
- Los analitos A y B se separan con base en su distinta movilidad electroforética, al aplicarse una diferencia de potencial eléctrico
- Los analitos A y B se han separado en zonas discretas
- Es el comienzo
- representan el perfil de concentración a lo largo del capilar:
- Durante el proceso de separación

Cuando se tiene flujo electroosmótico (pH entre 4–12) y polaridad positiva, las especies cargadas positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor que la del FEO, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción de sus cargas al electrodo negativo. Los analitos

cargados negativamente se mueven en sentido contrario y más lentamente y en contra del flujo electroosmótico debido a que son atraídos por el electrodo positivo.

Los analitos neutros se mueven a través del capilar con el FEO, por lo general durante este movimiento no se produce separación entre las especies no cargadas. La velocidad de los analitos puede modificarse al controlar el pH, la viscosidad o concentración del búfer, o con cambio de voltaje como ya se mencionó anteriormente.

#### 4.4. CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR

La Cromatografía Capilar Electrokinética Micelar (CCEM) es un híbrido de la electroforesis y la cromatografía y fue introducida por Terabe y compañía en 1984. Aquí se describe una modificación del método que permite la separación de fenoles y nitrocompuestos aromáticos de bajo peso molecular por la adición de surfactantes o tensoactivos, como el Dodecil Sulfato de Sodio (DSS, en inglés SDS) al electrolito soporte, en concentraciones tales que se forman micelas, las cuales ayudan a la separación de especies neutras y aún especies cargadas.

Generalmente a bajas concentraciones los surfactantes se presentan como monómeros. Las micelas se forman usualmente en disoluciones acuosas cuando la concentración de una especie iónica que tiene una cola de hidrocarburo de cadena larga, es mayor a su Concentración Micelar Crítica (CMC). En éste punto

los iones empiezan a agregarse y forman partículas generalmente esféricas constituidas entre 40 y 100 moléculas cuyas colas de hidrocarburo están en el interior de la esfera, y los extremos cargados en contacto con el agua exterior. Las micelas se constituyen como una segunda fase estable (fase pseudo-estacionaria) que es capaz de interactuar con los compuestos no polares, “solubilizando” parcialmente las especies no polares de manera diferencial.

En la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, se añaden al búfer cantidades de surfactante o tensoactivo<sup>6</sup> que exceden la concentración micelar crítica a fin de obtener las respectivas micelas. Hasta ahora en la mayoría de las aplicaciones los surfactantes que han sido más utilizados son Dodecil Sulfato de Sodio (DSS), Bromuro de Cetiltrimetilamonio (BCTA) y Bromuro de Dodeciltrimetilamonio (BDTA).

Para especies neutras, el equilibrio entre la micela y el electrolito soporte rige su movilidad electroforética y por lo tanto sus posibilidades de separación como se muestra en la figura 24. Cuando el analito neutro es muy polar no interacciona con la micela es simplemente acarreado por el FEO, sin embargo, la mayoría de los analitos interaccionan de una u otra forma con la micela. Los compuestos

---

<sup>6</sup> Son moléculas que poseen dos extremos con distinta solubilidad. Un extremo denominado cola, consiste en una larga cadena hidrocarbonada soluble en compuestos orgánicos, no polares. El otro, llamado cabeza, a menudo es una sal de sodio o potasio, soluble en agua que sirve para disminuir la tensión superficial.

hidrofóbicos en general interaccionan fuertemente con la micela y son retenidos en mayor proporción que los hidrofílicos. [Heiger. 1997]

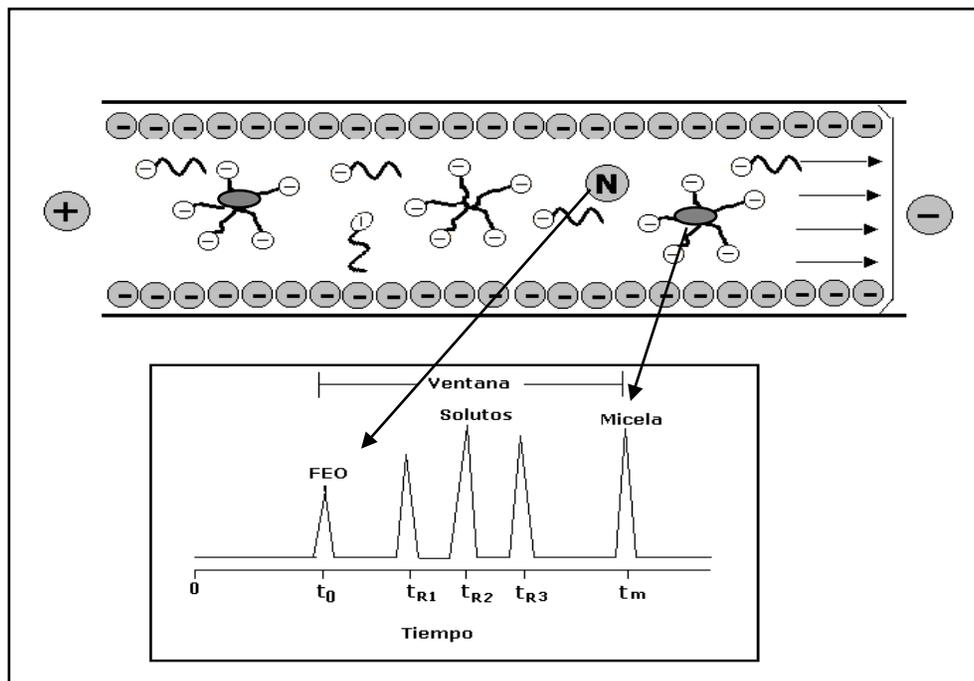


FIGURA No.24. SEPARACIÓN EMPLEANDO MICELAS

La resolución es mejorada extendiendo el rango de elución, también llamado "ventana analítica". Mientras la ventana analítica es moderadamente pequeña, la capacidad del pico puede ser muy alta debido a la alta eficiencia. Esto es deseable para emplear condiciones que pueden ampliar la ventana analítica, y se hace disminuyendo el FEO, incrementando la velocidad de las micelas o ambos.

El sistema que se ha descrito es bastante similar al que existe en una columna cromatográfica de reparto líquido-líquido excepto en que la fase estacionaria aquí se mueve a lo largo de la columna, pero con una velocidad mucho más pequeña

que la fase móvil. En los dos casos el mecanismo de separación es idéntico (para compuestos neutros), y depende de las diferencias en las constantes de distribución de los analitos entre la fase acuosa móvil y la fase pseudo-estacionaria constituida por las micelas. El proceso de este modo implica además un proceso cromatográfico, de aquí que se le denomine Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM). La selectividad puede ser manipulada fácilmente en CCEM, variando la naturaleza física (como tamaño, carga, geometría) de la micela. Usando diferentes surfactantes u otros aditivos como alcoholes se logran cambios dramáticos en la selectividad.

Existen otros aditivos que son incorporados al electrolito soporte en CCEM, y que de alguna manera interaccionan con el analito para poder ser separado, dentro de ellos están:

- ⊕ Ciclodextrinas
- ⊕ Disolventes Orgánicos

Las ciclodextrinas (CD) son polisacáridos macrocíclicos, neutros y naturales que contienen 6, 7 u 8 unidades de (+)-glucosa y son llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas respectivamente. Las ciclodextrinas se obtienen por un tratamiento enzimático del almidón. Su forma es similar a un cono hueco; el diámetro de su cavidad está determinado por el número de unidades de glucosa (ver figura 25). La cavidad es relativamente hidrófoba mientras la superficie externa es hidrofílica. Las CD

pueden formar complejos por inclusión o huésped-anfitrión y se usan como selectores quirales para separar isómeros ópticos, de posición y de estructura.

[Castillo Rodríguez. 2005]

Varios tipos de atracción de carácter débil como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno, atracciones electrostáticas, hidrofóbicas, etc. Se ven involucradas en la estabilización de los complejos formados entre la CD y el compuesto de interés. El equilibrio asociado a la formación de estos compuestos conocidos como de inclusión, depende de la concentración de la CD y de la fuerza de interacción del compuesto. Además, la velocidad a la cual se forma este complejo está determinada en gran medida por la accesibilidad de la molécula huésped a la cavidad hidrofóbica de la CD.

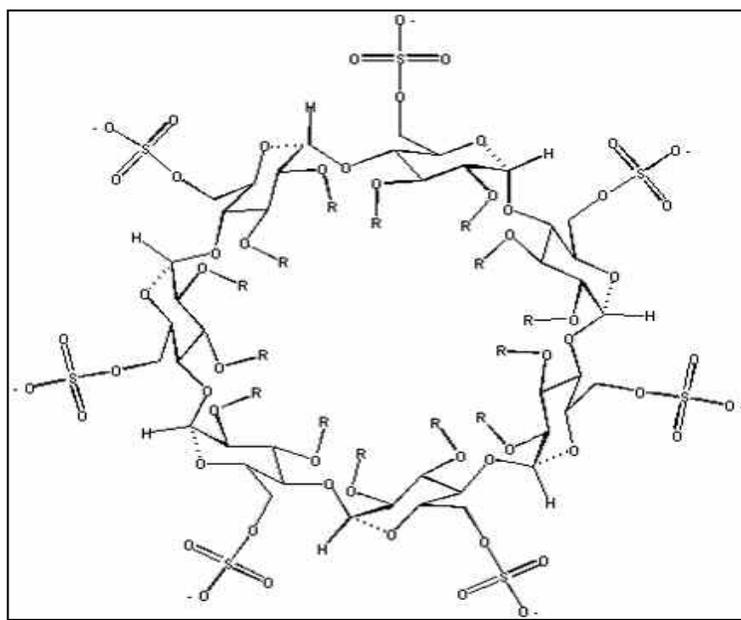


FIGURA No.25. REPRESENTACIÓN DE UNA  $\beta$  CICLODEXTRINA

Los disolventes orgánicos se han utilizado para mejorar la resolución en CCEM, juegan un papel importante en el control de la retención y un cambio en la selectividad. Normalmente la adición de disolventes orgánicos permite incrementar el tamaño de la ventana analítica. Provocan disminución del FEO debido a la disminución del potencial zeta, resultando baja corriente y disminución del calor de Joule. Los más usados son el metanol, el 2-propanol y el acetonitrilo. [Castillo Rodríguez,2005]

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 5. METODOLOGÍA

#### 5.1. EQUIPO.

Se utilizó un equipo de Electroforesis Capilar AGILENT CE de Agilent Technologies, Modelo G1600AX, con software HP 3D-CE ChemStation para el desarrollo del método analítico en la determinación de proteínas de suero bovino y de soya. Posteriormente se traspaso el método a un equipo de Electroforesis Capilar P/ACE TM MDQ, Beckman Coulter Capillary Electrophoresis system (Fullerton, CA, USA); y se realizó la validación completa de soya. Este último equipo mencionado también fue utilizado para desarrollar el método en la determinación de antibióticos. Las mediciones para determinar adulteraciones en leche por proteínas de soya se hicieron utilizando capilares de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 48 cm de longitud total y 40 cm de longitud efectiva, la detección se realizó a 214 nm. Para la separación de antibióticos se utilizó un capilar de sílice fundida de 82 cm de longitud total y 71.5cm de longitud efectiva con un diámetro interno de 50 $\mu\text{m}$ , la detección se realizó a 210 nm.

#### 5.2. REACTIVOS

Fosfato de sodio monobásico y dibásico, Ácido acético, Ácido fosfórico, Ácido clorhídrico, trietanolamina, Hidróxido de sodio, ácido etanosulfónico-2-[N-morfolino] (MES), Citrato de sodio, Borato de sodio (grado analítico) todos ellos de

J.T Baker, (Xalostoc, Estado de México), Dodecil sulfato de sodio de Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo, USA). El metanol se obtuvo de por Mallinckrodt, (Kentucky, USA). Cloroformo grado HPLC por Caledon laboratories LTD (Ontario Canada). El nitrógeno de 99.998% de pureza se obtuvo de Infra Air Products (Tlalnepantla Estado de México). Para la preparación de soluciones se utilizó agua desionizada de un sistema Milli-Q Plus (Molsheim, Francia).

Aislado de Soya (SOYPRO 900) proporcionado por nutrer S.A. de C.V. (Naucalpan, Edo. De México)

Los antibióticos: Dicloxacilina de sodio monohidrato, Clorhidrato de Tetraciclina, Clorhidrato de Clortetraciclina, Clorhidrato de Oxitetraciclina, Amoxicilina, Penicilina G de sodio, Oxacilina de sodio, Espiramicina de *Streptomyces* sp, Tartrato de Tilosina, Enrofloxacina, Cefalexina y Trimetoprim se obtuvieron de Sigma aldrich (Toluca, Estado de México).

### 5.3. PREACONDICIONADO DEL CAPILAR

Al inicio de cada día el capilar se preconditiona lavando con agua desionizada durante 5 minutos posteriormente con NaOH 0.1 M por 10 minutos seguida con agua desionizada durante 5 minutos y por 10 minutos con el buffer de corrida; aplicando una presión de 20 psi. La introducción de la muestra se hizo

hidrodinámicamente durante 5 segundos a 0.5 psi. La temperatura del capilar se mantuvo a 25 °C para todos los análisis.

#### 5.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS EN LA DETERMINACIÓN DE SOYA.

Considerando que la leche de vaca tiene una gran variedad de proteínas tales como caseína ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína y  $\gamma$ -caseína), proteínas de suero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albúmina de suero), inmunoglobulinas y proteasa-peptonas, se realizó una precipitación de la proteína mayoritaria que es la caseína (en 85%), con el fin de evitar su interferencia en la determinación de proteínas de soya; de esta forma las proteínas adulterantes de soya se cuantifican en el suero de leche de vaca. Como ya se explicó el suero lácteo se obtiene una vez que se induce la precipitación de la caseína, esto se logra cuando el pH de una muestra de leche entera (que tiene un pH normal de 6.6 a 25° C), se ajusta a pH 2.5, eliminándose la caseína por precipitación. Consecuentemente en el sobrenadante quedan presentes únicamente las proteínas  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina y albúmina de suero.

##### 5.4.1. PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTEO.

Para obtener las proteínas de suero se tomaron 10 mL de leche de vaca bronca/sin procesar a la cuál se le midió el pH (normalmente se encuentra en 6.6),

se agregó 200µL de una solución 2 M de ácido clorhídrico a pH 2.5 para provocar la precipitación de la caseína ya que es la proteína mayoritaria en la leche. La solución anterior se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm. Posteriormente se tomaron 150 µL de sobrenadante (suero de leche) y 450 µL de agua desionizada y se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45 µm.

#### 5.4.2. PROTEÍNAS DE SOYA.

Para medir las proteínas de soya se pesó aproximadamente 20 mg de aislado de proteínas de soya (SOY PRO 900) y se disolvió en agua, se ajustó el pH de esta solución a 2.5; enseguida se centrifugó la solución a 10000 rpm durante 10 minutos, para seguir el mismo procedimiento de la obtención de suero lácteo; posteriormente se toman 150 µL de sobrenadante y 450 µL de buffer de corrida el cuál se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45 µm de diámetro.

#### 5.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA VALIDACIÓN.

##### 5.5.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Para realizar precisión del sistema, se pesó aproximadamente 10 mg de aislado de proteínas de soya (SOY PRO 900), se disolvió en 80 mL de agua y se ajustó el pH de esta solución a 2.5; después se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua. Posteriormente se tomó 1 mL de sobrenadante se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a la marca

de aforo con agua, por último se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se repitió el paso anterior por sextuplicado con el fin de obtener 6 sistemas y evaluar precisión.

#### 5.5.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se pesó aproximadamente 10, 15, 30, 40, 50 mg de aislado de proteínas de soya (SOY PRO 900) respectivamente para cada nivel de concentración, después se disolvió en 80 mL de agua y se ajustó el pH de esta solución a 2.5; después se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca de aforo con agua. Posteriormente se tomó 1 mL de sobrenadante se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó a la marca de aforo con agua; por último se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se repitió por triplicado el paso anterior con el fin de obtener 3 sistemas de cada nivel de concentración.

#### 5.5.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Se pesó aproximadamente 20, 40, 70, 100, 120 mg de aislado de proteínas de soya (SOY PRO 900) y se disolvió en 10 mL de leche, se ajustó el pH de esta solución a 2.5; enseguida se centrifugó la solución a 10000 rpm durante 10 minutos, para seguir el mismo procedimiento de la obtención de suero lácteo; posteriormente se toman 1mL de sobrenadante, se colocan en un matraz

volumétrico de 10 mL y se llevó a la marca de aforo con agua (solución A). Se tomaron 5 mL de la solución A y se llevó a un volumen de aforo de 100 mL con agua, por último se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. Repetir por triplicado el paso anterior con el fin de obtener 3 sistemas de cada nivel de concentración.

#### 5.5.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Para la evaluación de éste parámetro, el analista preparó el placebo analítico con el tipo de componentes que están presentes en la muestra (únicamente leche de vaca), y se adicionó (aislado de proteínas de soya) la cantidad del analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Los placebos adicionados fueron analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones.

Para preparar cada sistema se pesó aproximadamente 10 mg de aislado de proteínas de soya (SOY PRO 900) y se disolvió en 10 mL de leche, se ajustó el pH de esta solución a 2.5; enseguida se centrifugó la solución a 10000 rpm durante 10 minutos, para seguir el mismo procedimiento de la obtención de suero lácteo; posteriormente se toma 1 mL de sobrenadante se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL se llevó a la marca de aforo con agua (solución A). Se tomaron 5 mL de la solución A y se llevó a un volumen de aforo de 100 mL con agua, por último se filtró a través de acrodiscos millipore de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de

diámetro. Repetir por el paso anterior con el fin de obtener al menos 6 sistemas. Es importante mencionar que el estudio de repetibilidad del método sólo se realizó en dos días diferentes por un mismo analista.

## 5.6. SOLUCIONES EN LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

### 5.6.1. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCION LÍQUIDO-LÍQUIDO.

Se preparó una mezcla de los 14 antibióticos a una concentración de 5 ppm en agua a pH de 6.5 (solución A); para realizar la extracción se tomaron 2 mL de la solución A y se le agregó 4 mL del disolvente (éter, acetato de etilo, cloroformo, cloruro de metileno y metil isobutilcetona), se colocó en un embudo de separación y se agitó durante 2 minutos, posteriormente se dejó reposar y separó las fases. La fase orgánica se evaporó a sequedad con N<sub>2</sub> y el extracto se resuspendió en 700µL de agua.

### 5.6.2. PRETRATAMIENTO DE LECHE EN LA DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Se tomaron 10 mL de leche cruda de vaca, y se agregó 200 µL de ácido tricloroacético 2M para precipitar todas las proteínas de la leche, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos para remover la grasa. Se tomó el sobrenadante y se ajustó el pH a 8 con búfer de boratos 100 mM, se filtró y se introdujo la muestra al equipo de electroforesis capilar.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOYA EN LECHE.

##### 6.1. OPTIMIZACIÓN DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DE BUFFER.

Los primeros experimentos se realizaron utilizando únicamente las proteínas de suero lácteo (precipitando la caseína) con el fin de conocer el comportamiento de éstas en un amplio intervalo de pH, así que para ello se prepararon varias soluciones buffer, iniciando con un buffer de fosfatos pH 2, acetatos pH 4, MES pH 6, fosfatos pH 8, boratos pH 9.27 y 10, cada solución buffer a una concentración de 50 mM ajustando cada valor de pH con NaOH 0.1 M o bien con HCl 0.1 M hasta alcanzar el valor deseado.

Se consideró la norma NOM 155-SCFI-2003, que establece que un litro de leche de vaca debe tener 32 g de proteínas totales; de las cuales el 80% son caseínas y el 20% proteínas séricas. El principal objetivo es determinar las proteínas de soya en la leche cruda de vaca, por lo que al inicio se planteó diferenciar éstas de las caseínas pero considerando la proporción era muy difícil ver la diferencia entre las caseínas y la soya, además de que no se tenían los estándares para hacerlo.

Por lo que de aquí partimos para proponer que la determinación de proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca se realice usando sólo el suero bovino, por tanto se elimina la caseína por precipitación ácida; esto se logra ajustando el pH (específicamente se ajustó a 2.5 unidades de pH) por de bajo del punto isoeléctrico de la caseína que es de 4.6, con lo que precipita la caseína; quedando en el sobrenadante únicamente las proteínas del suero que son la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina y albúmina de suero; ya que sus  $pI$  están alrededor de 2.[Veisseyre,1980, Pp 28-32].

Al eliminar la caseína se pretende evitar la presencia de picos que puedan interferir en la determinación; mientras que al mismo tiempo se quiere observar señales de las proteínas de soya lo mayores posibles para hacer la determinación más sensible.

Ahora bien para poder desarrollar un método, que ayude a la determinación de proteínas de soya como adulterantes en leche de vaca; es necesario conocer el comportamiento de éstas proteínas a distintos valores de pH, para lo cuál se realiza el mismo pretratamiento a las proteínas de soya, y se mide a pH de 2, 4, 6, 8 y 10, con el fin de conocer el comportamiento de éstas en todo el intervalo de pH, así que para ello se prepararon soluciones buffer, iniciando con fosfatos pH 2, acetatos pH 4, MES pH 6, fosfatos pH 8 y boratos pH 10, cada solución buffer a una concentración de 50 mM.

En la figura 26 se muestran los electroferogramas de la separación de proteínas tanto de suero bovino como de soya, y se puede apreciar que tanto para el perfil de suero bovino existen 2 picos bien definidos como para el perfil de soya; y es importante señalar la diferencia que existe entre estos, ya que tienen tiempos de migración muy diferentes.

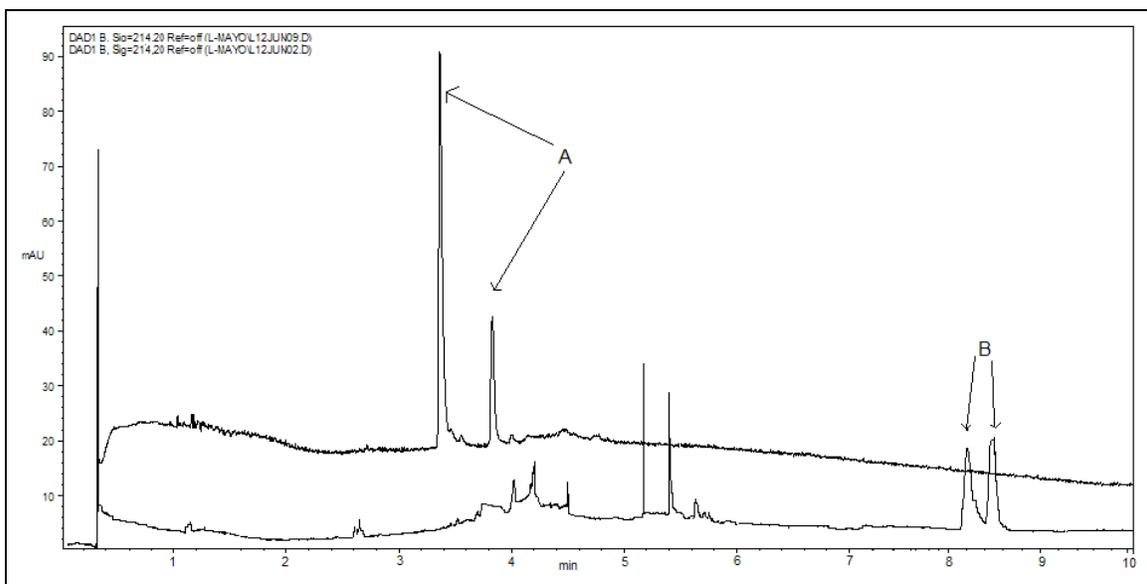


FIGURA No. 26. ELECTROFEROGRAMAS DE LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE A) SUERO LÁCTEO Y B) DE AISLADO DE SOYA. Los electrolitos soporte utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM de fosfatos pH 2.0. CONDICIONES: capilar de 50  $\mu$ m de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° C, detección a 214nm.

Ahora bien en la figura 27 se muestran los electroferogramas de estas mismas muestras pero usando un buffer de acetatos 50 mM a pH 4.0, con la finalidad de poder observar el comportamiento de estas proteínas lácteas y no lácteas; en este se puede ver que la muestra de suero bovino deja ver tres picos con tiempos de

migración menores 5 minutos. Sin embargo en la muestra del aislado de soya no se observa pico alguno.

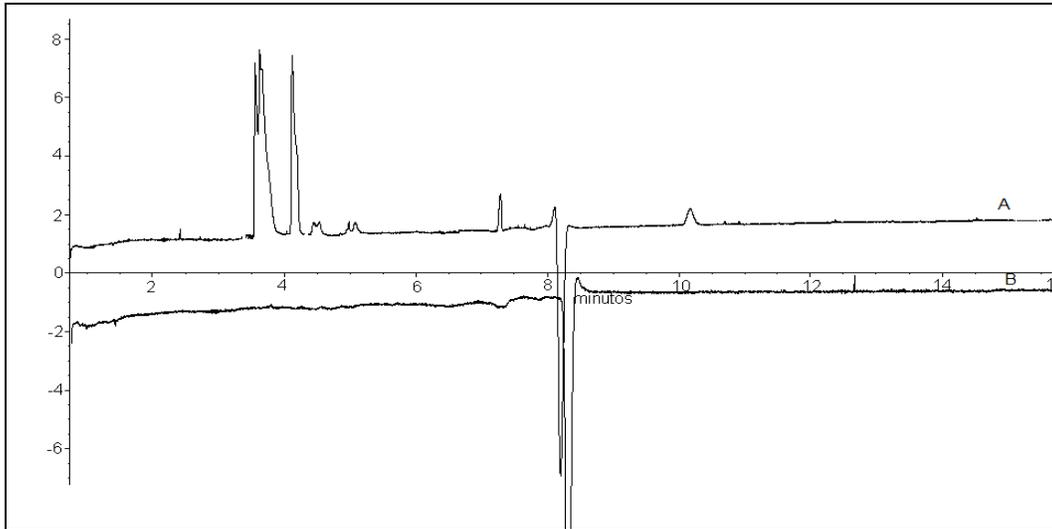


FIGURA No. 27. ELECTROFEROGRAMAS DE LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE A) SUERO LÁCTEO Y B) AISLADO DE SOYA. Los electrolitos soporte utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM de acetatos pH 4.0. CONDICIONES: capilar de 50  $\mu$ m de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° C, detección a 214nm.

Como se observa hasta el momento, trabajando a valores de pH ácidos se evita la precipitación de ciertas proteínas dentro del capilar, en la figura 28 se observan las muestras de suero bovino y aislado de soya usando un buffer de MES 50 mM a pH 6; sólo se observan picos muy delgados provenientes de la precipitación de las proteínas en estudio, por lo que se imposibilita la determinación por la presencia

de sólidos<sup>7</sup>. Es importante descartar que estos picos son debidos a burbujas ya que el buffer fue filtrado con membranas de 45  $\mu\text{m}$ .

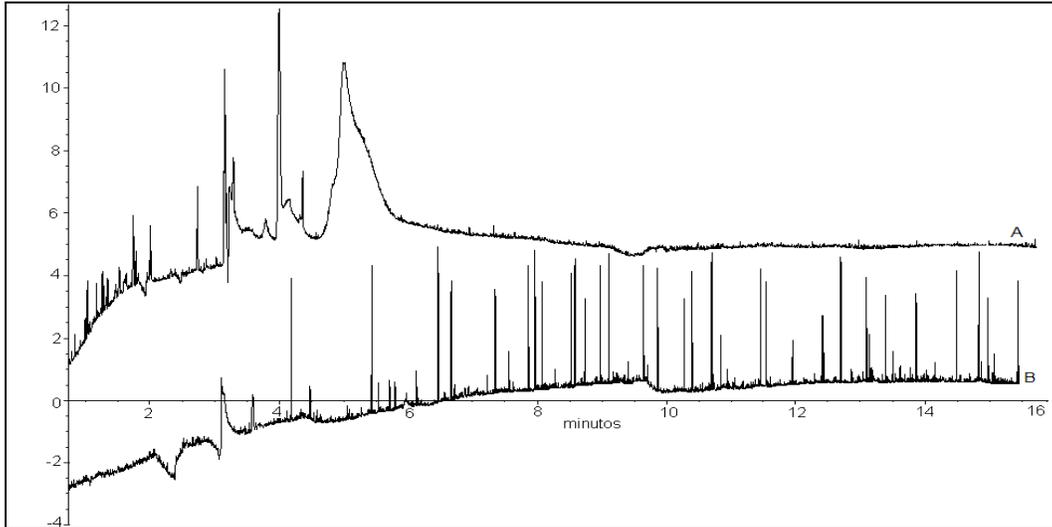


FIGURA No. 28. ELECTROFEROGRAMAS DE LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE A) SUERO LÁCTEO Y B) AISLADO DE SOYA. Los electrolitos soporte utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM de MES pH 6.0. CONDICIONES: capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° C, detección a 214nm.

En la figura 29 ocurre algo muy parecido a la figura 28 solo que ahora se utiliza un buffer de fosfatos 50 mM pH 8.0 y de igual manera se observa la presencia de sólidos en los electroferogramas y no se observan mas picos por lo que tal vez a ese valor de pH se encuentran cargadas negativamente y es por ello que no se puede observar pico alguno de las proteínas de soya aunque el tiempo total de análisis para estas mediciones es de 30 minutos.

<sup>7</sup> Los picos extremadamente delgados que parecen líneas en los electroferogramas, son sólidos provenientes de la precipitación de las proteínas de vaca y soya a esos valores de pH.

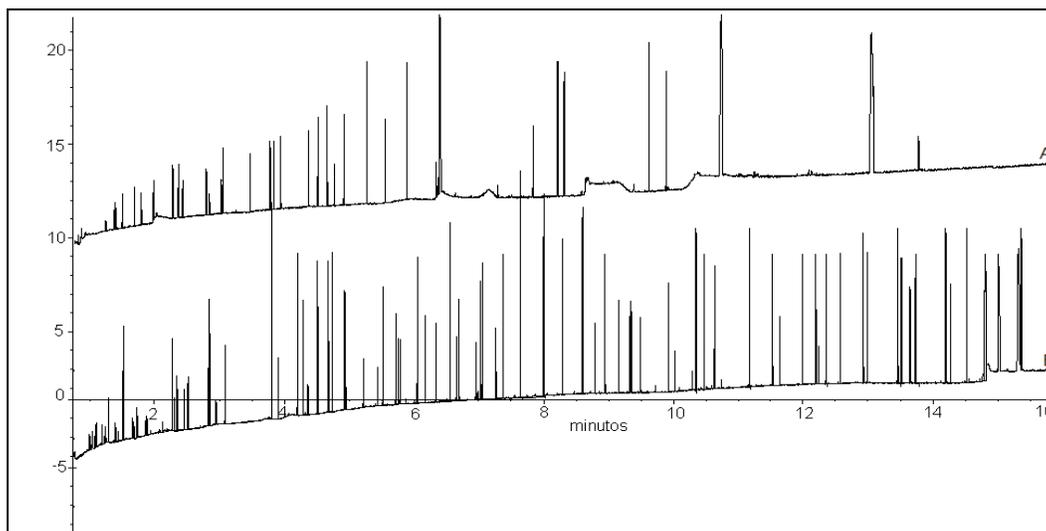


FIGURA No. 29. ELECTROFEROGRAMAS DE LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE A) SUERO LÁCTEO Y B) AISLADO DE SOYA. Los electrolitos soporte utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM de fosfatos pH 8.0. CONDICIONES: capilar de 50  $\mu$ m de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° C, detección a 214nm.

Se estudia un valor más de pH usando un buffer de boratos 50 mM a pH 10, en el cual el perfil del suero bovino se observa a los 2 minutos sin embargo para el aislado de soya no se observa picos alguno como se muestra en la figura 30.

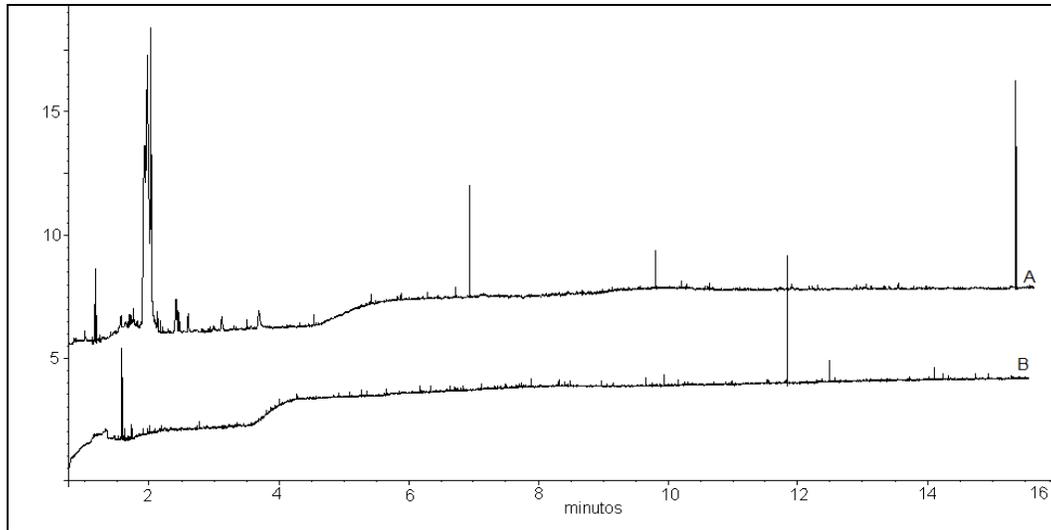


FIGURA No. 30. ELECTROFEROGRAMAS DE LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE A) SUERO LÁCTEO Y B) AISLADO DE SOYA. Los electrolitos soporte utilizados se prepararon a una concentración de 50 mM de boratos pH 10.0. CONDICIONES: capilar de 50  $\mu$ m de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° C, detección a 214nm.

Analizando la información que se tiene se decide trabajar a pH 2.0 con un buffer de fosfatos 50 mM, ya que a este valor de pH es donde se pueden diferenciar los dos perfiles; por lo que partir de este momento estas serán las condiciones óptimas para la identificación del perfil de suero bovino. Es importante demostrar que este es el perfil del suero bovino por lo que el estudio se enfocó en su repetibilidad entre corrida y corrida, usando leche de 7 vacas diferentes como se muestra en la figura 31, es importante mencionar que la leche se obtuvo de diferentes granjas con lo que se deduce que la dieta alimenticia no es igual, esto repercutirá en la cantidad de proteínas.

En la tabla No. 5, se muestran los valores de desviación estándar y coeficientes de variación para los dos picos representativos del perfil de suero bovino, teniendo valores de coeficientes de variación muy pequeños, menores a 1.5 %.

**TABLA No. 5 REPETIBILIDAD DEL SUERO LÁCTEO DE DISTINTAS VACAS**

vaca	tm <sub>1</sub>	tm <sub>2</sub>
1	3,311	3,743
2	3,313	3,754
3	3,326	3,763
4	3,324	3,819
5	3,352	3,795
6	3,315	3,756
7	3,334	3,831
<b>promedio</b>	3,325	3,780
<b>desvest</b>	0,014	0,035
<b>c.v.</b>	0,434	0,920

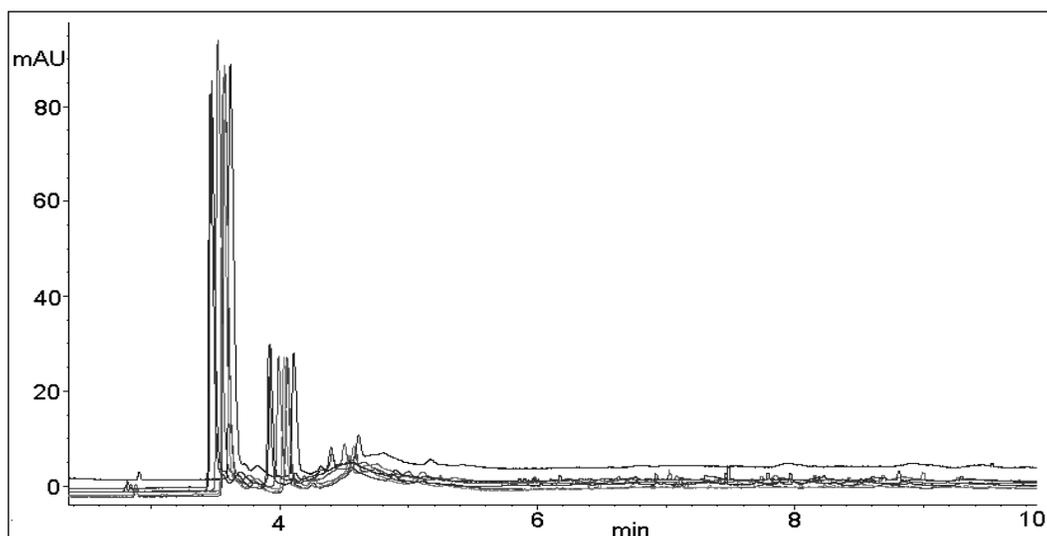


FIGURA No. 31 ELECTROFEROGRAMA DEL ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD DEL PERFIL DEL SUERO LÁCTEO OBTENIDO DE LECHE DE 7 VACAS. Condiciones: capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 1s, +25kv de voltaje a 25° c, detección a 214nm, buffer 50 mM de fosfatos pH 2.0.

Una vez que se ha identificado el perfil proteínico del suero lácteo y de las proteínas de soya, se realizó una mezcla para observar ambos perfiles y verificar que no migran al mismo tiempo las proteínas de soya como las de leche de vaca. Es por ello que se adulteró la leche de vaca con proteínas de soya y se realizó el mismo pretratamiento descrito anteriormente para la obtención de suero lácteo ver figura 32.

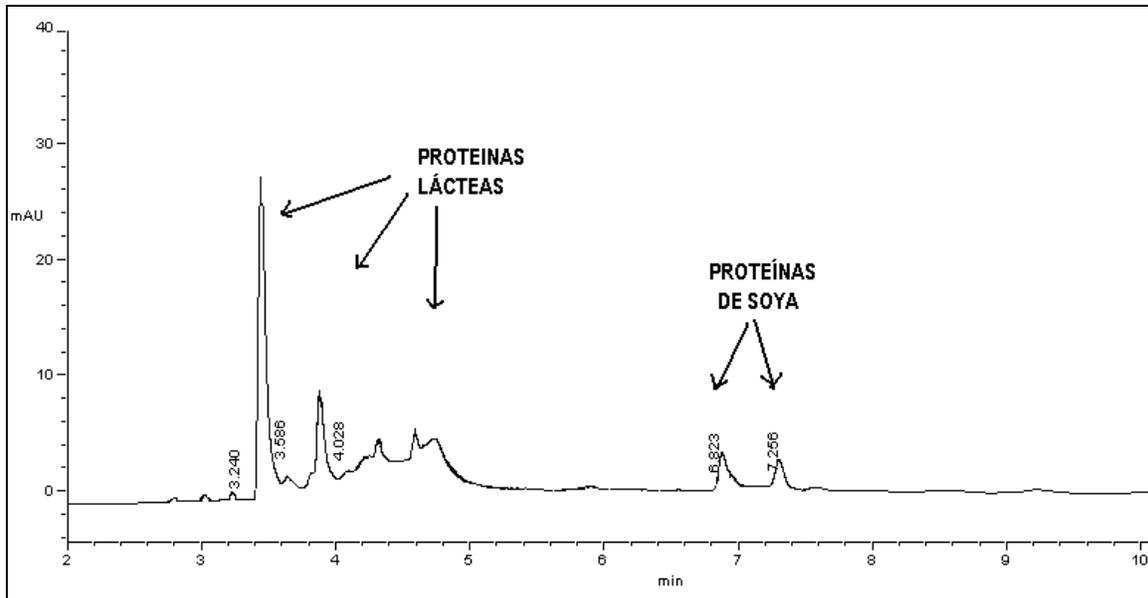


FIGURA No. 32 MUESTRA DE LECHE ADULTERADA CON HARINA DE SOYA AL 20%.

CONDICIONES: COMO EN LA FIGURA 31.

## 6.2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN

Hasta ahora con las condiciones de trabajo utilizadas, se puede diferenciar tanto el perfil de suero bovino como el de proteínas de soya, y si se encuentran ambos en una muestra. Cabe mencionar que hasta aquí se ha usado un equipo de Electroforesis Capilar AGILENT CE de Agilent Technologies, Modelo G1600AX, con

software HP 3D-CE ChemStation. Para seguir adelante con éste método ahora se parte de que las mediciones se realizan en un equipo de Electroforesis Capilar P/ACE™ MDQ CE System de Beckman Coulter como se describe en la parte experimental. Por lo tanto es importante hacer hincapié en las condiciones de separación adecuada, ya que con éstas se realiza la validación del método, y son; usando un capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5s, +25kv de voltaje a 25° c, detección a 214nm, buffer 50 mM de fosfatos pH 2.0.

### 6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El objetivo de un método es producir los mejores resultados analíticos posibles y que además sean confiables. Para ello deben ser consideradas todas las variables del método incluyendo el procedimiento de muestreo, los pasos para la preparación de la muestra, así como las condiciones electroforéticas y el tipo de detección.

La validación del método para la determinación de soya en leche de vaca, se realizó de acuerdo a la Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, y se evaluaron los parámetros establecidos en la tabla No. 6.

TABLA No. 6. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LA VALIDACIÓN PARA EL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOYA EN LECHE DE VACA.

PARÁMETRO ANALÍTICO	CRITERIO DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	EVALUACIÓN
LINEALIDAD DEL SISTEMA	C.V. (COEFICIENTE DE VARIACIÓN) r <sup>2</sup> (COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN) r (COEFICIENTE DE CORRELACIÓN)	C.V. ≤ 3.0% r <sup>2</sup> ≥ 0.98 r ≥ 0.99 B ≈ 0	C.V. = 2.57% r <sup>2</sup> = 0.996 r = 0.998 b = -1675.29
PRECISIÓN DEL SISTEMA	C.V.	C.V. ≤ 2 %	C.V. <sub>tm</sub> = 0.913 % C.V. <sub>AREA</sub> = 1.371 %
LINEALIDAD DEL MÉTODO	C.V. (COEFICIENTE DE VARIACIÓN) r <sup>2</sup> (COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN) r (COEFICIENTE DE CORRELACIÓN)	C.V. ≤ 5.0% r <sup>2</sup> ≥ 0.98 r ≥ 0.99 b ≈ 0 M ≈ 1	C.V. = 3.12% r <sup>2</sup> = 0.997 r = 0.999 b = 0.0002 m = 0.999
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	C.V. PRUEBA "t" STUDENT	C.V. ≤ 5.0% IC(%RECOBRO) = 95-105	C.V. = 0.39% IC(%RECOBRO) es 98.44 a 99.10
PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD	DIFERENTES DÍAS C.V. <sub>tm</sub> C.V. <sub>AREA</sub>	C.V. ≤ 5.0%  F <sub>cal</sub> < F crítica (α, gl día, gl error) P-valor > 0.05	DIA 1 C.V. <sub>tm</sub> = 0.91% C.V. <sub>AREA</sub> = 1.37% DIA 2 C.V. <sub>tm</sub> = 1.10% C.V. <sub>AREA</sub> = 0.51% 4.12 < 5.53 P-valor = 0.0507
LÍMITE DE DETECCIÓN	OBTENER RUIDO	SEÑAL/RUIDO = 3	1.3 ppm
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	USANDO PLACEBO ANALÍTICO	SEÑAL/RUIDO = 10	1.65 ppm

### 6.3.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar la precisión del sistema, se realizó la medición por sextuplicado de las soluciones de soya a una concentración de 4.2 ppm, de la respuesta analítica se obtuvo la desviación estándar y coeficiente de variación.

**TABLA No. 7. PRECISIÓN DEL SISTEMA-PARÁMETROS ESTADÍSTICOS**

RESPUESTA	tm	AREA	ALTURA
PROMEDIO n=6	6.114	4508.47	599.117
DESV. EST.	0.056	61.826	49.347
C.V.	0.913	1.371	8.236

La precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y como se puede observar en la tabla No. 7, el coeficiente de variación obtenido a partir de los datos de altura es muy grande, esto es debido principalmente cuando hay ensanchamiento de picos; es por ello que para el método desarrollado sólo utilizaremos el coeficiente de variación obtenido a partir de los datos de área, ya que éste es menor de 5%, de acuerdo a los criterios de aceptación, se considera que el método es preciso.

### 6.3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

La evaluación de la linealidad puede ser definida como la caracterización de una curva de respuesta en función de la concentración del analito, frecuentemente se

espera que sea lineal en un rango específico de concentraciones. Para evaluar la linealidad del sistema se prepararon 5 niveles de concentración en un rango de 3 a 21 ppm por triplicado; con los datos obtenidos se realizó el análisis de regresión obteniendo el modelo lineal que describe la relación entre el área y la concentración en la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = -1675.29 + 1482.55*[\text{Soya}]$$

En la tabla No. 8 se encuentran los resultados de la propiedad medida para las diferentes concentraciones del intervalo de trabajo y evaluar la linealidad del sistema. El análisis estadístico se realizó aplicando el software *Statgraphics plus* 5.0.

**TABLA No.8 CONCENTRACIÓN-ÁREA**

SISTEMA	[SOYA] ppm	ÁREA
1	3.33	2853
2	3.33	2810
3	3.33	2859
4	5.916	7311
5	5.916	7336
6	5.916	7344
7	11.167	15702
8	11.167	15723
9	11.167	15709
10	16.5	21770
11	16.5	21782
12	16.5	21975
13	21.083	29899
14	21.083	29882
15	21.083	29862

En el gráfico No 1 se muestra la linealidad del sistema así como sus intervalos de confianza al 97.5% utilizando el software *Statgraphics plus 5.0*.

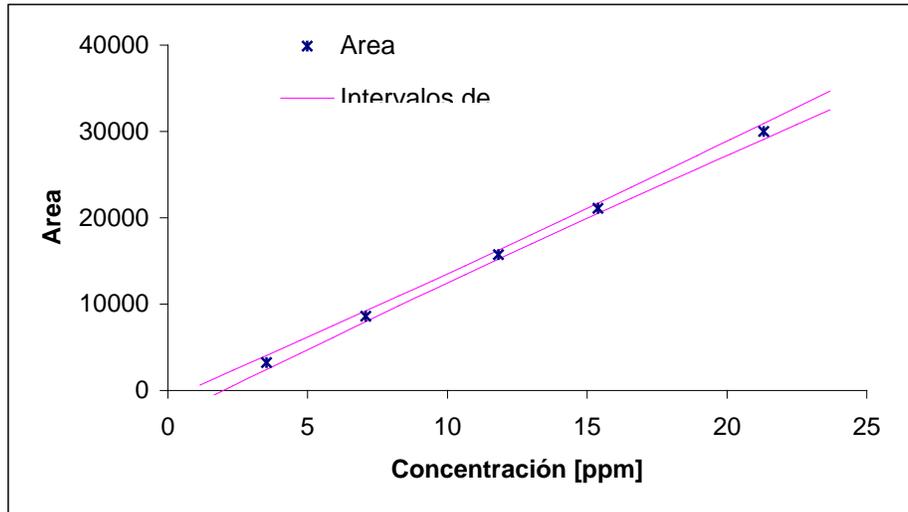


GRÁFICO No. 1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

De acuerdo a los datos de regresión (ver tabla No. 9) se observa que el coeficiente de determinación para el modelo propuesto explica que el 99.59% de la variabilidad en el área es debida a los cambios de concentración de soya; éste coeficiente de correlación nos indica que existe una fuerte relación entre el área y la concentración. Por otro lado el Coeficiente de variación (C.V. %) calculado se encuentra dentro del criterio de aceptación para métodos con muestras biológicas que debe ser menor al 5%.

TABLA No. 9 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN DEL SISTEMA

PENDIENTE (m)	1482.55
INTERCEPTO (b)	-1675.29
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	0.998
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r <sup>2</sup> )	0.996
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V. %)	2.57

Para demostrar que existe una relación lineal entre las variables en estudio se realizó un análisis de varianza y se estableció la siguiente hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** No existe una relación lineal entre la concentración y el área.

**H<sub>i</sub>:** Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterio de aceptación:

Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  no se rechaza **H<sub>0</sub>**.

Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  se rechaza **H<sub>0</sub>**.

TABLA No.10 ANALISIS DE VARIANZA DEL SISTEMA

Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	F <sub>crítica</sub>
Regresión	1	1416534808	1416534808	3206.24	5.99E-17
Residuos	13	5743468	441805.2308		
Total	14	1422278276			

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza que se muestran en la tabla No. 10 a la hipótesis establecida, observamos que el valor de la  $F_{cal}$  es mucho mayor que la  $F_{crítica}$  por lo que se rechaza  $H_0$  por lo que existe una relación lineal

entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 97.5%; lo que significa que el área medida es debida a la variación de la concentración de soya.

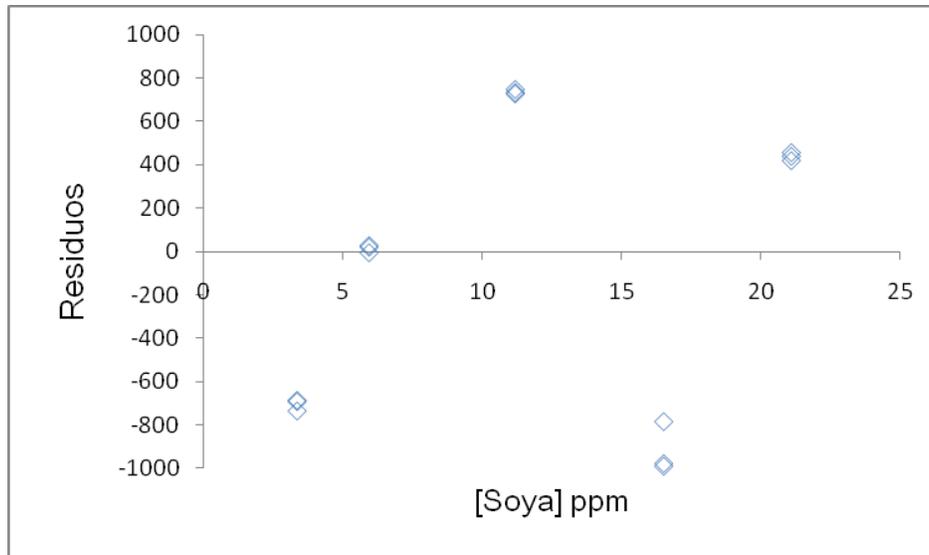
Ahora bien se realiza la prueba del intercepto (b) evaluada para la recta, y se establece la siguiente hipótesis:

<p><math>H_0: b = 0</math> La ordenad al origen es cero.</p> <p><math>H_1: b \neq 0</math> La ordenada al origen es diferente de cero</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p style="text-align: center;">Si <math>t_{cal} &lt; t_{critica}</math> no se rechaza <math>H_0</math>.</p> <p style="text-align: center;">Si <math>t_{cal} &gt; t_{critica}</math> se rechaza <math>H_0</math>.</p>
---

TABLA No.11 ANALISIS DE REGRESIÓN – MODELO LINEAL  $Y = a + b \cdot X$

Parámetro	Estimados	Error estándar	P-Valor	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	LCI al 97.5%	LCS al 97.5%
Intercepto	-1675.29	348.83	0.000345	-4.8025	2.145	-2558.76	-791.82
pendiente	1482.55	26.18	5.99E-17	56.624		1416.24	1548.86

Como la  $t_{calculada}$  es menor a la  $t_{critica}$ , entonces no se rechaza  $H_0$  por lo que la ordenada al origen (b) no es estadísticamente diferente de cero (ver tabla No. 11). Aunque el intervalo de confianza no incluya al cero, la ordenada al origen esta dentro del intervalo de confianza del intercepto, por tanto se acepta  $H_0$  y se dice que la ordenada al origen es cero.



**GRÁFICO No. 2 CONCENTRACIÓN DE SOYA EN FUNCIÓN DE LOS RESIDUALES.**

Como se puede observar en el gráfico No. 2 los residuales están distribuidos al azar, por lo tanto son homosedásticos y no existe algún dato anómalo.

### 6.3.3. EXACTITUD

Se evaluaron la exactitud y repetibilidad a un nivel de concentración dentro del intervalo utilizado para evaluar la linealidad del método. Se determinó el porcentaje de recobro como se muestra en la tabla No. 12.

**TABLA No. 12 CONCENTRACIÓN ADICIONADA-% DE SOYA RECUPERADA**

SOYA ADIC [mg/L]	% SOYA REC
8.83	99.33
8.83	98.52
8.83	98.99
8.83	98.96
8.83	98.38
8.83	98.44

Con estos datos se calculó el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza del % recobro como se muestra en la tabla No. 13.

**TABLA No.13 DETERMINACIÓN DE EXACTITUD DEL MÉTODO.**

PROMEDIO % [SOYA] RECOBRO	98.77
DESVIACIÓN ESTANDAR	0.3803
C.V. %	0.3851
INTERVALO DE CONFIANZA AL 97.5%	98.44 a 99.10

De acuerdo a los resultados obtenidos el método es exacto y repetible con un nivel de confianza de 97.5%, ya que el intervalo de confianza del % de recobro incluye el promedio y también esta dentro del intervalo que establece el criterio de aceptación, es decir del 95 al 105%.

#### 6.3.4. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para éste parámetro se prepararon 5 niveles de concentración por triplicado por pesadas independientes cada nivel; en la tabla No. 14 se encuentran los resultados de cada sistema preparado.

Se determinó el modelo que explica la variación de la Concentración recuperada en función de la Concentración adicionada de soya mediante el análisis de regresión lineal obteniendo la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración recuperada} = 0.0002 + 0.99998 * \text{Concentración adicionada}$$

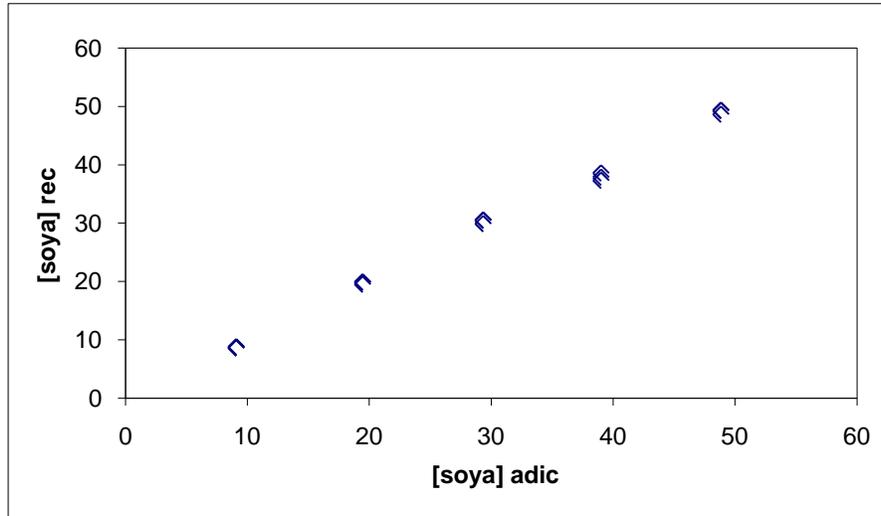


GRÁFICO No. 3 REGRESIÓN PARA EL MODELO LINEAL DEL MÉTODO.

En el gráfico No. 3 podemos observar la relación lineal entre las dos variables mencionadas con un coeficiente de determinación de 0.9971.

TABLA No. 14 CONC. ADICIONADA-CONC. RECUPERADA-PORCENTAJE DE RECUBRO

SISTEMA	[soya] adic	[soya] rec	% Recobro
1	9.08	7.8857	95.3033
2	9.08	8.0075	96.6550
3	9.08	7.9981	94.4715
4	19.45	20.9222	101.8100
5	19.45	20.8941	102.2954
6	19.45	20.8379	100.2569
7	29.33	30.5192	104.0470
8	29.33	29.9007	101.9221
9	29.33	30.4536	103.8217
10	29.33	29.8632	97.0495
11	39	37.7919	98.8899
12	39	36.7423	95.6934
13	39	36.4236	101.0439
14	48.83	49.1978	99.6514
15	48.83	50.1537	100.9279

Para comprobar que existe una relación lineal entre la cantidad de soya adicionada y la cantidad de soya recuperada se establece la siguiente hipótesis:

**H<sub>0</sub>**: No existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

**H<sub>1</sub>**: Existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Criterio de aceptación: Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  no se rechaza **H<sub>0</sub>**.

Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  se rechaza **H<sub>0</sub>**.

TABLA No. 15 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA SOYA RECUPERADA

<i>Fuente</i>	<i>G.L.</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>F crítica</i>
<b>Regresión</b>	1	2943.2766	2943.2766	4399.0292	7.7208E-18
<b>Residuos</b>	13	8.6980	0.6691		
<b>Total</b>	14	2951.9746			

De acuerdo al análisis de varianza que se muestra en la tabla 15 y al criterio de aceptación; como la  $F_{calculada}$  es mayor a la  $F_{crítica}$  se rechaza **H<sub>0</sub>** por lo que con un nivel de confianza de 97.5%; la variación de la cantidad de soya recuperada está relacionada linealmente con la cantidad de soya adicionada.

TABLA No. 16 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN

PENDIENTE (m)	0.9999
INTERCEPTO (b)	0.0002
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	0.9985
COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r <sup>2</sup> )	0.9971
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (C.V. %)	3.12
INTERVALO DE CONFIANZA b al 97.5%	-1.2344 a 1.2347
INTERVALO DE CONFIANZA m al 97.5%	0.9618 a 1.0382

En la tabla No 16 se muestran los parámetros estadísticos de la regresión; y analizando el coeficiente de determinación, la regresión indica que el 99.71% de la variación de la cantidad recuperada se expresa en función del cambio en la cantidad adicionada.

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro es de 3.12% y de acuerdo a la guía de validación de la FDA (Bioanalytical Method validation) para métodos con muestras biológicas debe ser menor a 5%; por lo tanto el método tiene una precisión adecuada para su aplicación.

El intervalo de confianza para el porcentaje de recobro es 97.87 al 101.31, de acuerdo al criterio de aceptación que es de 95 al 105% entonces el intervalo del porcentaje de recobro es el adecuado para éste método considerando las muestras son biológicas.

Así también se realizó el análisis estadístico para el intercepto evaluado para la recta, se establece la siguiente hipótesis:

**H<sub>0</sub>:**  $b = 0$  La ordenada al origen es cero.

**H<sub>1</sub>:**  $b \neq 0$  La ordenada al origen es diferente de cero

Criterio de aceptación: Si  $t_{cal} < t_{crítica}$  no se rechaza **H<sub>0</sub>**.

Si  $t_{cal} > t_{crítica}$  se rechaza **H<sub>0</sub>**.

TABLA No. 17 ANÁLISIS DE REGRESIÓN-MODELO LINEAL

Parámetro	Estimados	Error estándar	P-Valor	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
Intercepto	0.00016	0.4875	0.9997	0.000326	2.145
pendiente	0.99998	0.0151	7.721E-18	66.3252	

De acuerdo a la hipótesis establecida y el análisis obtenido en la tabla No. 17; se acepta  $H_0$ , es decir que la ordenada al origen no es significativa, esto se comprueba con el intervalo de confianza del intercepto que incluye al cero; además de que el intervalo de confianza para la pendiente también incluye a la unidad en un nivel de confianza del 97.5% como lo establecen las guías de validación de métodos analíticos.

En la tabla No. 18 se tienen los parámetros estadísticos del porcentaje de recobro, donde el C.V. no excede del criterio de aceptación establecido ya que es  $< 5\%$  y el intervalo de confianza para  $\mu$  incluye el promedio del porcentaje de proteína de soya recuperada.

TABLA No. 18 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL % SOYA RECUPERADA

PROMEDIO % DE RECOBRO	99.5893
DESVIACIÓN ESTANDAR	3.1068
C.V. %	3.1196
INTERVALO DE CONFIANZA (MEDIA POBLACIONAL) $\mu$ %	97.8686 a 101.3099

## 6.3.5. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

La evaluación de este parámetro, permite investigar la variabilidad entre días (reproducibilidad interdías) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad).

Este parámetro es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de tolerancia del método a estas fuentes de variación.

TABLA No.19 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE SOYA.

DÍA 1			DÍA 2		
% recobro	tm	AREA	% recobro	tm	AREA
101.9919	6.012	4625	99.9683	6.292	4500
99.0456	6.154	4443	100.5673	6.096	4537
101.1015	6.146	4570	100.1140	6.083	4509
101.8300	6.113	4615	100.3245	6.129	4522
98.7380	6.092	4424	101.1987	6.129	4576
100.0169	6.108	4503	100.8587	6.125	4555
99.6769	6.125	4482	100.7130	6.142	4546
99.7093	6.15	4484	100.2759	6.15	4519
99.1265	6.046	4448	100.6321	6.171	4541
99.5636	6.233	4475	100.9720	6.204	4562
99.8065	6.136	4490	100.6968	6.25	4545
99.4017	6.017	4465	100.3569	6.26	4524
100.9720	6.075	4562	101.2148	6.24	4577
100.9073	6.088	4558	101.1663	6.26	4574
100.9882	6.137	4563	100.7454	6.26	4548
99.0618	6.158	4444	100.2759	6.233	4519
99.8550	6.154	4493	100.6644	6.262	4543
PROMEDIO		100.368811			
C.V.(%)		0.78832872			

La evaluación de éstos parámetros estadísticos se muestran en la tabla No. 19 en la que se analiza el porcentaje de recobro de soya; en dos días diferentes el mismo analista. Por otra parte podemos observar que el método es reproducible y preciso ya que el coeficiente de variación es mucho menor al 5% de acuerdo al criterio de aceptación para métodos biológicos.

Además por medio de un análisis de varianza se estudió si existe diferencia entre los porcentajes de recobro de soya evaluados en dos días diferentes por el mismo analista, para lo que se estableció la siguiente hipótesis:

$H_0$ : No existe variabilidad entre días en el % de recobro de soya.  
 $H_1$ : Existe variabilidad entre días en el % de recobro de soya.  
 Criterio de aceptación: Si  $F_{cal} < F_{crítica}$  ó  $P > 0.05$  no se rechaza  $H_0$ .  
 Si  $F_{cal} > F_{crítica}$  ó  $P < 0.05$  se rechaza  $H_0$ .

**TABLA No. 20 ANALISIS DE VARIANZA PARA EL PORCENTAJE DE SOYA RECUPERADA.**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>G.L.</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de cuadrados</i>	<i>F<sub>calculada</sub></i>	<i>P</i>	<i>F<sub>crítica</sub></i>
Entre grupos	1	2.3571	2.3571	4.12111	0.0507	5.5311
Dentro de los grupos	32	18.3027	0.57196			
Total	33	20.6598				

Analizando los resultados de la tabla 20, la  $F_{calculada}$  es menor a la  $F_{crítica}$  y además el valor de P es mayor a 0.05, entonces decimos que no se rechaza  $H_0$ , por lo tanto no existe diferencia significativa en las determinaciones realizadas en diferentes días. Y como se puede observar la variabilidad medida está explicada

solo por el cambio en la concentración de soya, y sin embargo no afecta de ninguna manera el cambiar el día en el cuál se hacen las mediciones.

### 6.3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

Para la estimación del límite de detección de las proteínas de soya, se determinó la relación señal/ruido; de las mediciones de placebos analíticos. Estos placebos contienen exclusivamente proteínas de leche y como se probó anteriormente que el método es específico; estas señales no interfieren con las obtenidas al tiempo de migración de la proteína de soya, evaluándose a este tiempo el ruido presentado. Al integrar la señal/ruido y multiplicarla por 3 tenemos una altura que corresponde a un área promedio de 223, como se aprecia en la tabla No. 21 por lo que al diluir la muestra de soya hasta poder diferenciar dicha muestra hasta alcanzar la misma área, se obtiene el límite de detección.

**TABLA No. 21 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.**

MUESTRA	SEÑAL ANALÍTICA (AREA)
PLACEBO ANALITICO (LECHE) RUIDO	74.33
3 * RUIDO	223
ANALITO ppm	
1.3	242
1.3	249
1.3	251
PROMEDIO $\bar{A}$ = 247.33	
C.V. $\bar{A}$ % = 1.9107	

El límite de detección es de 1.3 ppm que es la cantidad del analito, inmediatamente posterior a 3 veces el ruido.

### 6.3.7. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

La determinación del límite de cuantificación se realiza de la misma manera que el límite de detección pero ahora, la proporción de la señal de la muestra respecto al blanco es de 10 a 1 tal como se muestra en la tabla No. 22.

**TABLA No. 22 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.**

MUESTRA	SEÑAL ANALÍTICA (AREA)
PLACEBO ANALITICO (LECHE)	74.33
10 * RUIDO	743.3
ANALITO ppm	814
1.65	825
1.65	844
PROMEDIO <sub>ÁREA</sub> = 827.66	
C.V. <sub>ÁREA</sub> % = 1.8336	

El límite de cuantificación se estima en 1.65 ppm que es la cantidad del analito, inmediatamente posterior a 10 veces el ruido.

Es importante mencionar que en la NOM-155-SCFI-2003, se desglosa una lista de métodos de prueba y especificaciones fisicoquímicas que deben ostentar los diferentes tipos de leche y dentro de éstos métodos concretamente se realiza la determinación de proteínas totales por micro Kjendahl como se explica en el

capítulo 6 de leche, que además de que el procedimiento es largo, se generan vapores tóxicos. De igual manera en la NOM-155-SCFI-2003, se describe una metodología para la determinación de la adulteración usando electroforesis capilar, que analizando este procedimiento es mucho mas complicado y el tiempo para ejecutarlo por lo tanto es mayor, además del consumo de reactivos. Por lo que en la tabla No. 23 se hace una comparación de dicho método con el desarrollado en el presente trabajo.

**TABLA No. 23 COMPARANDO EL MÉTODO CON NOM-155-SCFI-2003.**

CONDICIONES DE SEPARACIÓN	MÉTODO DESARROLLADO	NOM-155-SCFI-2003
SOLUCIÓN DE SEPARACIÓN	fosfatos 0.05M pH 2.0	Mezcla de fosfatos 0.005M, urea 6M pH 2.5
PRETRATAMIENTO	10 mL leche + 200 $\mu$ L HCl 2M y centrifugo a 10 000 rpm durante 10 min, se toman 150 $\mu$ L de sobrenadante + 450 $\mu$ L de buffer, se filtra con membranas de nylon 0.45 $\mu$ m.	3 mL leche centrifugar a 18000 g durante 15 min, tomar 1 mL de sobrenadante + 4 mL de urea 6M y fosfato de potasio 0.005M + 10 $\mu$ L de ditiotreitolo 0.2M, se agita durante 30 min, se filtra con tamaño de poro de 0.2 $\mu$ m.
CAPILAR	Sílice fundida 50 $\mu$ m d.i. 40 cm de longitud efectiva.	Neutro recubierto de poliacrilamida 50 $\mu$ m d.i., 50 cm de longitud efectiva
DETECCIÓN	214 nm	214 nm
INYECCIÓN	0,5 psi durante 5 s	0,5 psi durante 20 s
VOLTAJE	25 kV a 25° C	30 V/cm a 35° C
TIEMPO ANÁLISIS	8 minutos	30 minutos

Como se muestra en la tabla 23, los métodos son diferentes, ya que el método propuesto en el presente trabajo usa sólo un simple buffer de fosfatos pH 2.0, un capilar común y solo 8 minutos de corrida además que el tiempo de preparación de la muestra es de 12 minutos aproximadamente, así como se usan menos reactivos por lo que es más económico y no contamina en lo más mínimo, ya que las cantidades que se utilizan de ácido son mínimas.

En la tabla 24 se hace una comparación del método propuesto en el presente trabajo con el que se publicó en ISO/DIS 17129 IDF 206 "MILK AND MILK PRODUCTS-DETERMINATION OF SOY AND PEA PROTEINS USING SDS-CE (SCREENING METHOD)".y como se puede apreciar existen diferencias muy marcadas en cuanto al tiempo de preparación de soluciones, preparación de muestras y tiempo de análisis, así como la cantidad y número de reactivos a utilizar, analizando el procedimiento podría tener un tiempo total de análisis de horas, contando desde la preparación de soluciones hasta el resultado final (obtención del electroferograma). Además estudiando los electroferogramas obtenidos con éste método, se muestra el perfil de leche genuina, y el perfil de leche en polvo adicionada con proteína de soya, de tal manera que los picos debidos a soya se observan pegados a los de leche genuina, por tal motivo existe la posibilidad de que la señal obtenida para soya no sea el 100 % para esta, sino sea debida también a los picos propios de la leche, además de que la línea base

sube ligeramente y puede ser posible que no se realice una buena integración (Se anexó una copia de éste documento al final).

TABLA No. 24 COMPARANDO EL MÉTODO CON EL ISO/DIS 17129 IDF 206.

CONDICIONES DE SEPARACIÓN	MÉTODO DESARROLLADO	ISO/DIS 17129 IDF 206
SOLUCIÓN DE SEPARACIÓN	fosfatos 0.05M pH 2.0	Disolver 606 mg TRIS, 1g SDS, 37 mg EDTA, 14,7 mL HCl 0.1M y 2 mL de mercaptoetanol llevar a 100 mL pH 8.7.
PRETRATAMIENTO	10 mL leche + 200 $\mu$ L HCl 2M y centrifugo a 10 000 rpm durante 10 min, se toman 150 $\mu$ L de sobrenadante + 450 $\mu$ L de buffer, se filtra con membranas de nylon 0.45 $\mu$ m.	Pesar la muestra, agregar 1 mL buffer de extracción (boratos 0.03M + EDTA 0.04M pH 8.3) mezclar vortex 2500 rpm x 1.5 min. Reposar por 5 min y mezclar otra vez. Centrifugar la mezcla a 6500 g x 30 min tomar 1 mL de sobrenadante y lavarlo con buffer de extracción, centrifugar la mezcla a 6500 g x 20 min, tomar 1 mL de sobrenadante y lavarlo una vez mas como se menciona. Anteriormente. Agregar 250 $\mu$ L de buffer de separación, cerrar el vial y calentarlo a 95° C x 10 min, mientras se mezcla a 1000 rpm, enfriar en hielo, después centrifugar a 3000 g x 5 min, por ultimo transferir 200 $\mu$ L de sobrenadante y colocarlo en un vial para su inyección.
CAPILAR	Sílice fundida 50 $\mu$ m d.i. 40 cm de longitud efectiva.	Sílice fundida 75 $\mu$ m d.i., 20 cm de longitud efectiva
DETECCIÓN	214 nm	214 nm
INYECCIÓN	0,5 psi durante 5 s	0,5 psi durante 60 s
VOLTAJE	25 kV a 25° C	Iniciar con 2 KV, seguir con un gradiente lineal de voltaje de 2 a 7 kV en 1.7 min, mantenerlos 7 min durante 16 minutos a 25° C
TIEMPO ANÁLISIS	8 minutos	16 minutos

Sin embargo, el método desarrollado en éste trabajo, es más sencillo de realizar ya que el número y la cantidad de reactivos es menor, así como el tiempo de preparación ya que son menos soluciones y el tiempo de análisis es de 8 minutos. Además de que al realizarse la validación cumple con los parámetros establecidos en las guías de armonización, por lo que el método es tan recomendable como el que propone la ISO/DIS 17129 IDF 206.

## 7. DETERMINACION ANTIBIÓTICOS EN LECHE.

Para éste trabajo en primer lugar se investigaron las propiedades fisicoquímicas de cada antibiótico, su constante de acidez, solubilidad en diferentes medios, estructura, además se obtuvieron sus espectros de absorción; una vez que se conocen estas propiedades, se realiza una mezcla de los 14 antibióticos a separar.

### 7.1. DESARROLLO DEL METODO PARA DETERMINAR ANTIBIOTICOS.

Para desarrollar el método de separación se utilizó la técnica de Electroforesis Capilar de Zona, y para ello se usó un capilar de sílice fundida con el que se obtuvieron los electroferogramas a diferentes valores de pH, trabajando a pH 2, 4, 6, 8 y 10. Como se muestra en la figura No. 33 a pH 8.0 se logran observar 9 picos aunque no están separados, a diferencia de otros valores de pH sólo se observan 6 picos de los 14 compuestos de la mezcla, esto se debe a que a valores de pH ácidos la mayoría de los antibióticos se encuentran en forma neutra y como hay muy poco flujo electroosmótico este no es suficiente para arrastrarlos al detector además algunos son tan similares en sus estructuras que es posible que estén coeluyendo. Sin embargo a valores de pH alcalinos se tiene a la mayoría de los antibióticos en forma aniónica es decir cargados negativamente; éstos son arrastrados por el alto flujo electroosmótico, y llevados al detector es por ello que es posible observarlos.

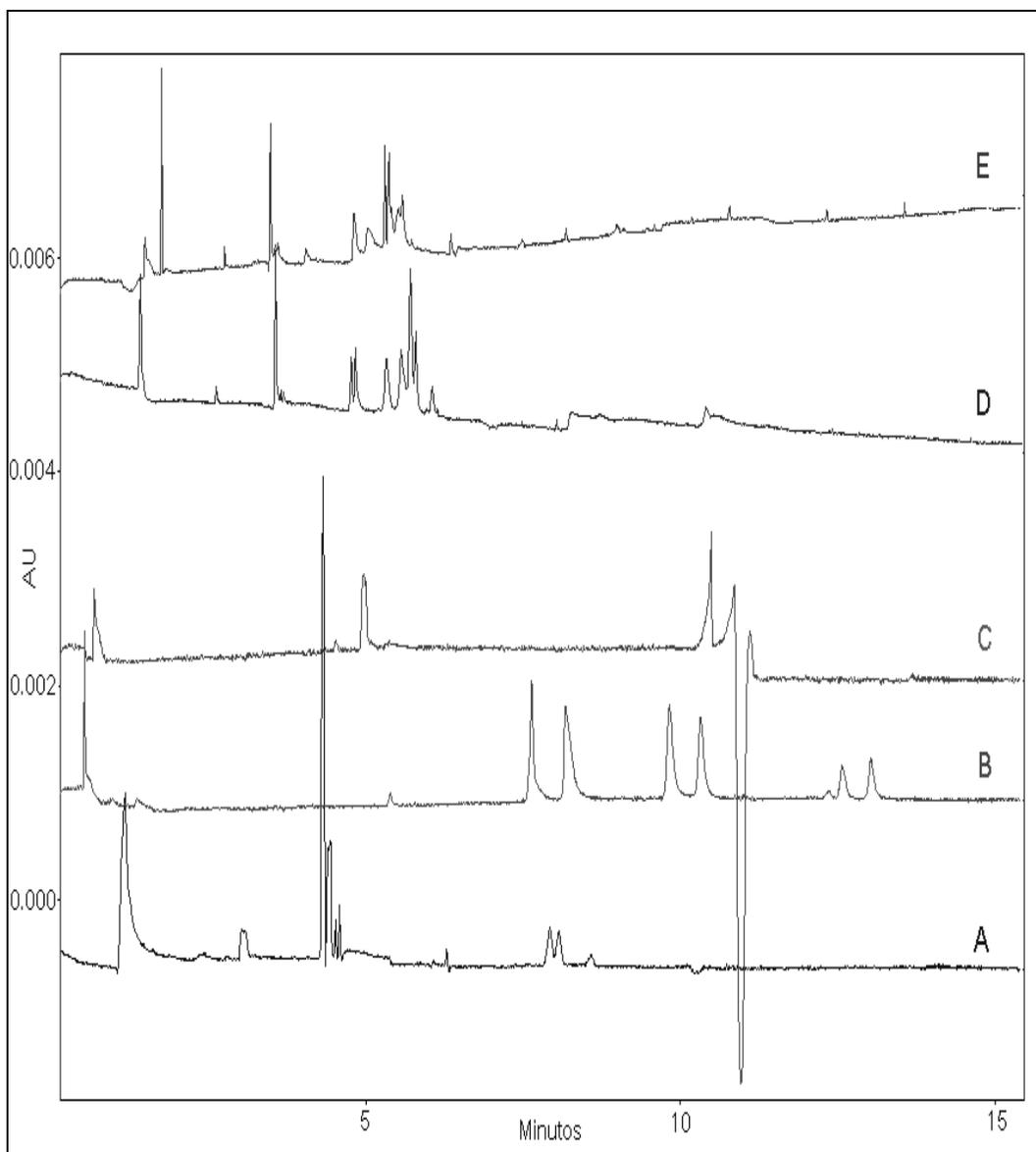


FIGURA No. 33. EFECTO DEL pH SOBRE LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS 50 $\mu$ g/mL. Condiciones: capilar de sílice fundida de 50  $\mu$ m de diámetro interno (72 cm de longitud total), inyección hidrodinámica a 0.5psi durante 5s, +30kv de voltaje a 25° c, detección a 210nm. Buffer de 50 mM de a) fosfatos pH 2.0, b) acetatos pH 4.0, c) MES pH 6.0, d) boratos pH 8.0 y e) boratos pH 10.

Es importante mencionar que durante el desarrollo del método se introdujo la mezcla de los 14 antibióticos; y no fue primordial identificar cada pico, ya que no estaban completamente separados y había picos muy anchos en los que seguramente co-eluían

2 o 3 antibióticos. Por lo que hasta que se observaron los 14 picos se procedió a su identificación tanto por el espectro de absorción como adicionando uno a uno e identificarlos de ésta manera.

Otro aspecto importante es el que las tetraciclinas son más solubles a valores de pH alcalinos, por lo que se decide elegir un pH 8.0, cabe aclarar que todas las corridas se realizaron con un tiempo total de 50 minutos, observándose que después de 15 minutos no aparecía pico alguno.

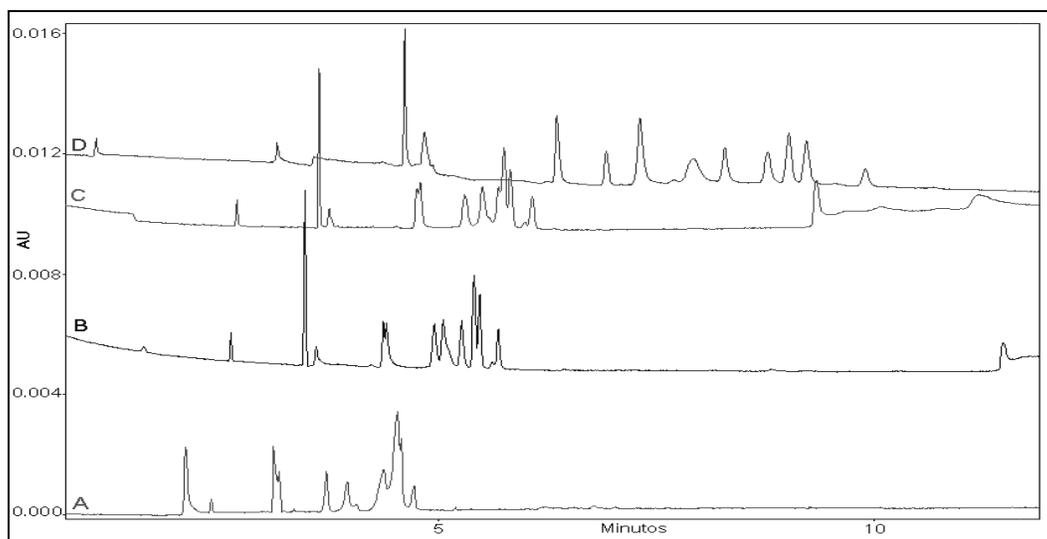


FIGURA No. 34. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL BUFFER EN LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS 50 $\mu$ g/mL. Condiciones: capilar de sílice fundida de 50  $\mu$ m de diámetro interno (72 cm de longitud total), inyección hidrodinámica a 0.5psi durante 5s, +30kv de voltaje a 25° c, detección a 210nm. Usando a) 25mM, b) 50 mM, c) 75 mM y d) 100 mM de buffer de boratos pH 8.0.

Una vez que se ha seleccionado el pH, se prueban diferentes concentraciones de buffer de boratos a pH 8.0, por lo que se realizan experimentos utilizando 25, 50, 75 y 100 mM de concentración de boratos, como se observa en la figura No. 34. Se decide utilizar

100 mM de boratos, ya que se observa una mejor separación pero no lo suficiente como para observar los 14 picos.

Como todavía existen picos que coeluyen, se introduce un surfactante, el Dodecil Sulfato de Sodio (DSS) para observar si se mejora la separación de los antibióticos.

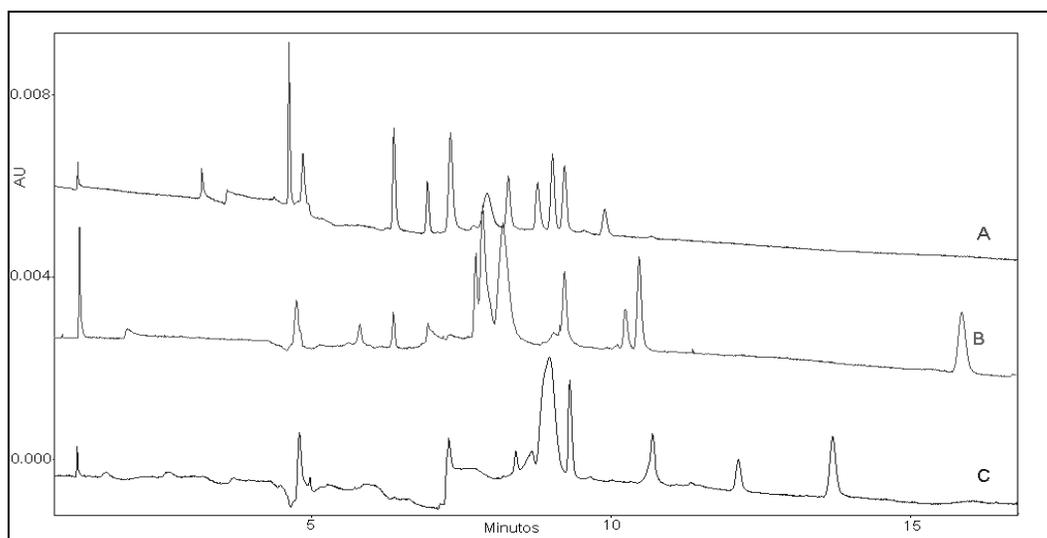


FIGURA No. 35. ESTUDIO DEL EFECTO DEL DSS SOBRE LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS.

Condiciones: Buffer de boratos 100 mM pH 8.0. a) sin DSS, b) 20 mM, c) 40 mM de DSS.

Desafortunadamente la separación no mejora, como se observa en la figura No. 35, como la corriente es un tanto elevada en las separaciones anteriores y para evitar que subiera aun mas por el exceso de iones presentes en el buffer se decide agregar 20mM, 40mM y 60mM DSS al buffer pero en menor concentración de boratos es decir con 50mM de boratos pH 8.0, agregando 20 mM de DSS se observan 6 picos bien definidos y si aumento la concentración a 40mM de DSS se observan 8 picos, pero cuando aumento a 60 mM de DSS se observan 8 picos no resueltos y con una mayor

corriente, con lo que se concluye que el uso de un surfactante no mejora la separación de los antibióticos.

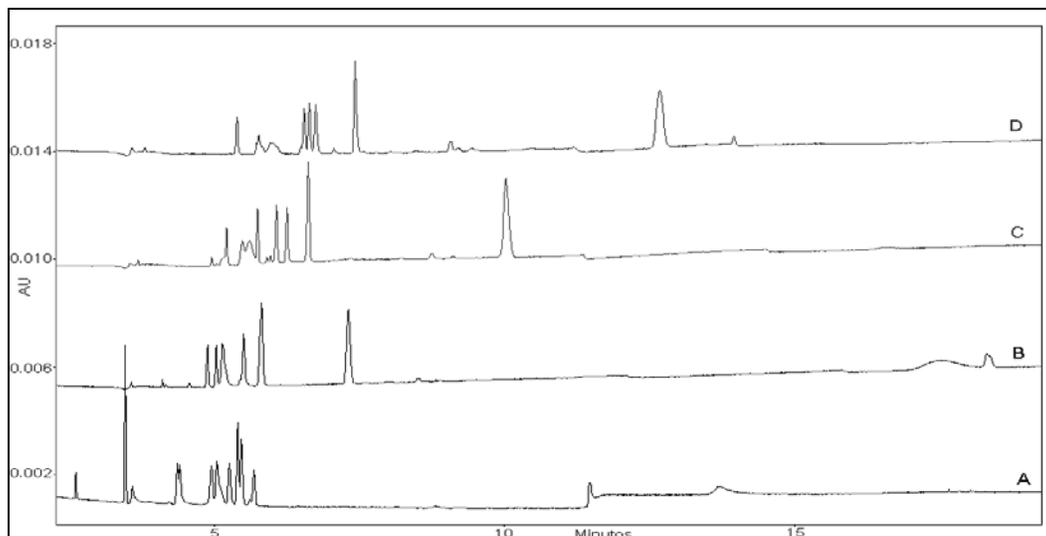


FIGURA No. 36. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DEL DSS EN LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS. Condiciones: Buffer boratos 50 mM pH 8.0. a) sin DSS, b) 20 mM, c) 40 mM y d) 60 mM de DSS.

Hasta este punto, se observa una mejoría en los electroferogramas en términos de una línea base estable y forma de los picos; sin embargo, solo se logran resolver 10 antibióticos. Entonces, usando el buffer de boratos 50mM pH 8.0 se decide agregar 10% de metanol y 10% de acetonitrilo, en forma separada, con la finalidad de mejorar la resolución de los picos. En la figura 36, con 10% de metanol se observa un ligero corrimiento en los tiempos de migración y 9 picos. Y usando 10 % de acetonitrilo, la línea base tiene mas ruido y solo se observan 8 picos por lo que se decidió variar la concentración de metanol de 10 al 30% (ver Figura 38).

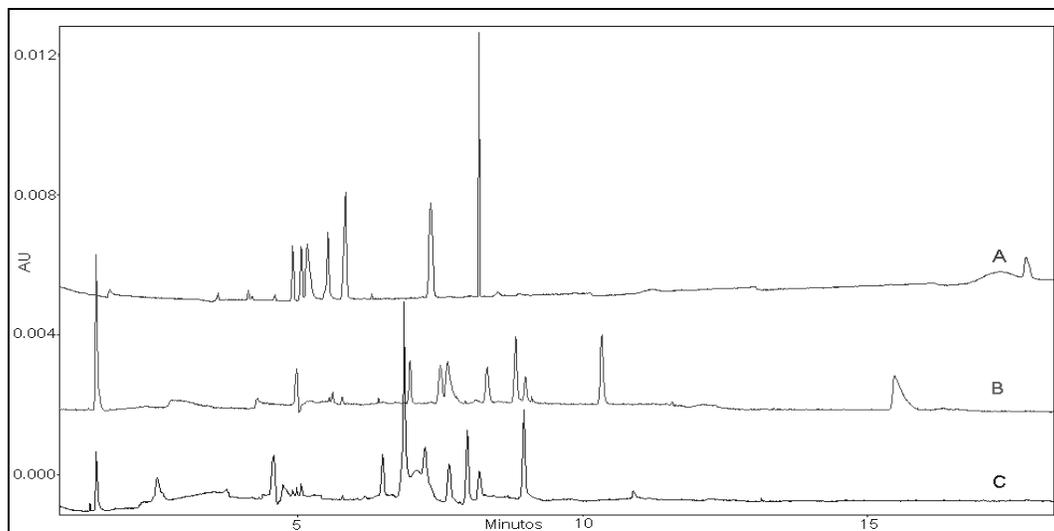


FIGURA No. 37. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE SOLVENTES. Condiciones: Buffer de boratos 50 mM pH 8.0. a) sin solvente, b) 10% Metanol, c) 10 % Acetonitrilo.

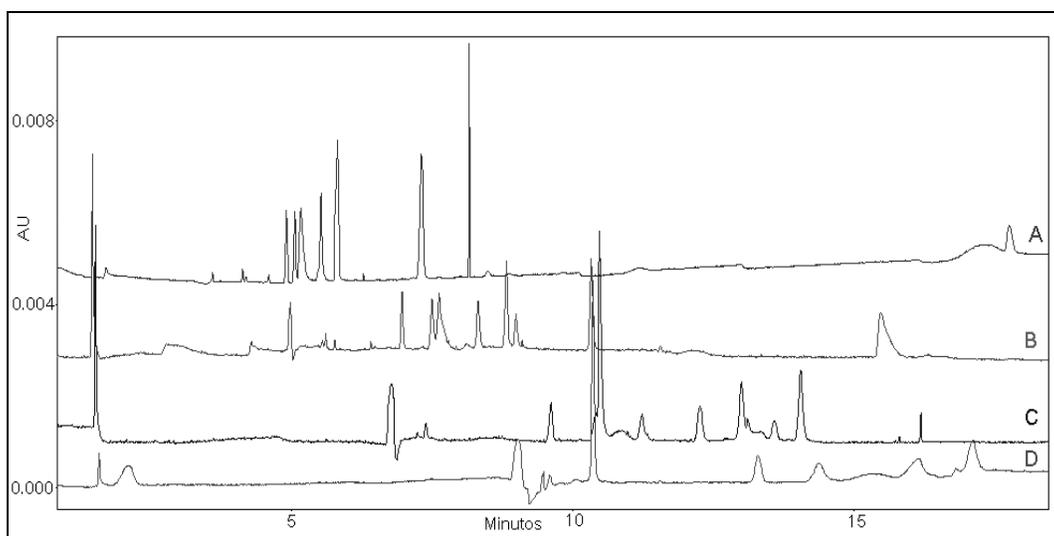


FIGURA No. 38. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE METANOL.

Condiciones: Buffer de boratos 50 mM pH 8.0. a) sin solvente, b) 10%, c) 20% y d) 30% Metanol.

Observando la figura No. 38 se puede decir que la utilización de metanol no mejora la separación ya que aunque se incremente el porcentaje de éste, no se logra la separación completa.

En vista de que todavía no ha sido posible separar a todos los analitos de interés y considerando que las estructuras de algunos de los antibióticos son muy similares se decide utilizar ciclodextrinas para observar si se logra mejorar la separación; hasta el momento las condiciones más prometedoras para la determinación son a pH de 8.0 con buffer de boratos 100mM ya que con este se pueden separar 10 de los 14 antibióticos. Cabe mencionar que para evitar que la corriente aumente aún más se utiliza un capilar 10 cm más largo.

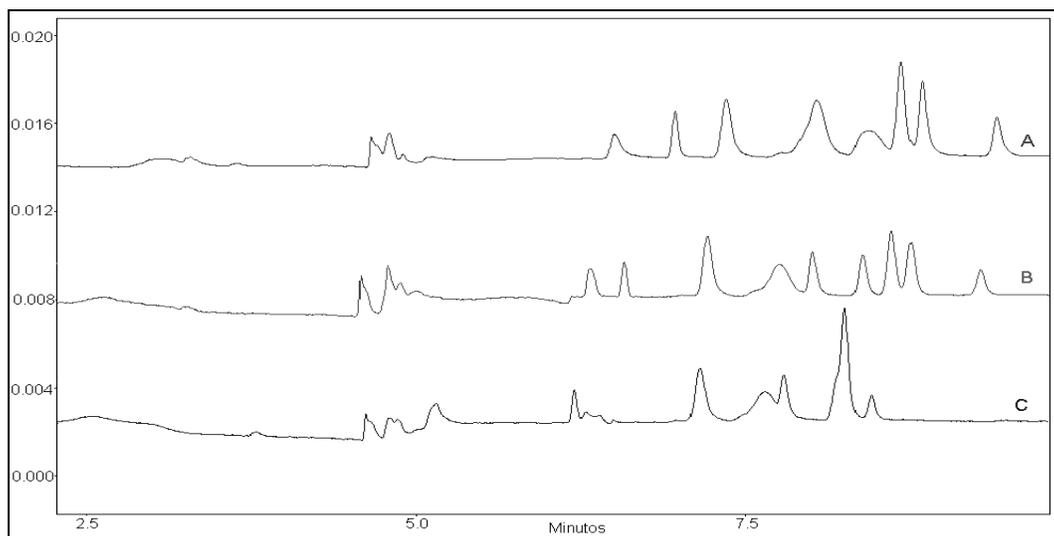


FIGURA No. 39. ESTUDIO DE LA ADICION DE CICLODEXTRINAS. Condiciones: Buffer de boratos 100 mM pH 8.0. a) sin Ciclodextrinas, b) 5 mM de  $\alpha$  -ciclodextrina, c) 5 mM de  $\beta$  -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas son polisacáridos macrocíclicos neutros y naturales que contienen 6, 7 u 8 unidades de glucosa y son llamadas  $\alpha$  ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas respectivamente. Su forma es similar a un cono hueco; el diámetro de su cavidad está determinado por el número de unidades de glucosa. Como las estructuras de los antibióticos son

relativamente pequeñas es por ello que se muestra una mejoría en la separación al usar  $\alpha$ -CD (alfa-ciclodextrina) y como la  $\beta$ -CD (beta-ciclodextrina) tiene una cavidad mayor, (ver figura No. 39) los antibióticos no interaccionan de la misma manera que con la  $\alpha$ -ciclodextrina; esto se explica porque las ciclodextrinas pueden formar complejos por inclusión o huésped.

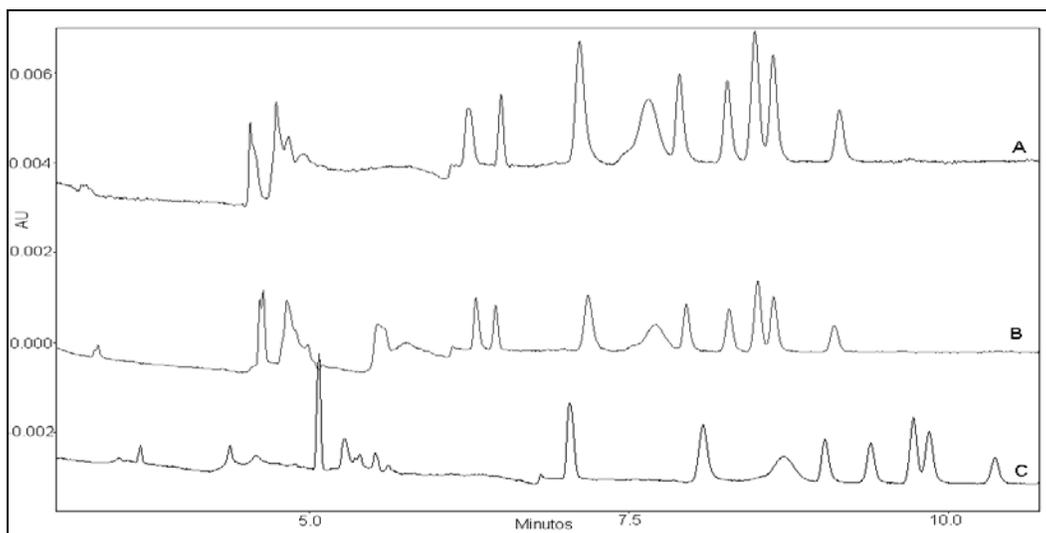


FIGURA No. 40. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE  $\alpha$ -CICLODEXTRINA. Condiciones: Buffer de boratos 100 mM pH 8.0. a) 5 mM de  $\alpha$ -CD, b) 10 mM de  $\alpha$ -CD c) 20 mM de  $\alpha$ -CD.

En la figura No. 39 se realizó la separación usando  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina a una concentración de 5 mM; se mejora ligeramente la separación con  $\alpha$ -ciclodextrina, por lo que se decide probar otras concentraciones de ésta ciclodextrina, como se muestra en la figura No. 40.

Aunque se ha incrementado la concentración de  $\alpha$ -ciclodextrina no se observa una mejoría en la separación, y usando una concentración de 20mM de  $\alpha$ -ciclodextrina

aumenta considerablemente el tiempo total de análisis y no hay una mejora en la resolución. Por lo que se decidió utilizar 5 mM de  $\alpha$ -ciclodextrina como concentración aún cuando todavía no se lograba la completa separación de los 14 antibióticos.

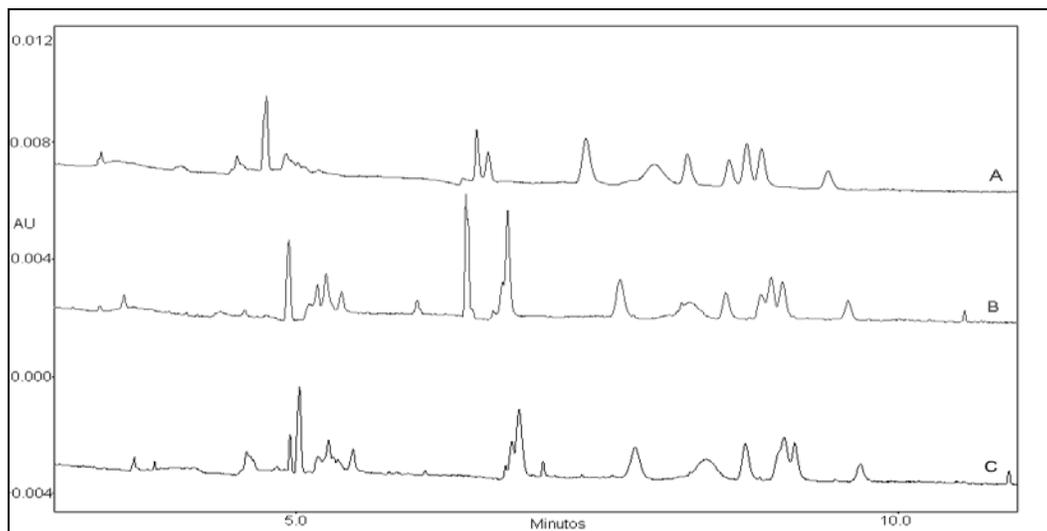


FIGURA No. 41. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROXIPROPIL  $\alpha$ -CICLODEXTRINA. Cond.: Buffer de boratos 100 mM pH 8.0. a) 10 mM HP  $\alpha$ -CD, b) 20 mM HP  $\alpha$ -CD c) 25 mM HP  $\alpha$ -CD.

La cavidad de las ciclodextrinas es relativamente hidrófoba mientras que la superficie externa es hidrofílica, por lo que se decide probar con una  $\alpha$ -CD que tiene un grupo hidroxipropilo, con la finalidad de lograr una interacción más selectiva entre los antibióticos y la estructura de la ciclodextrina. La figura No. 41 muestra que efectivamente hay cambios en la separación conforme se agrega más cantidad de HP  $\alpha$ -CD (hidroxipropil alfa-ciclodextrina) sin que se resuelvan completamente los 14 antibióticos.

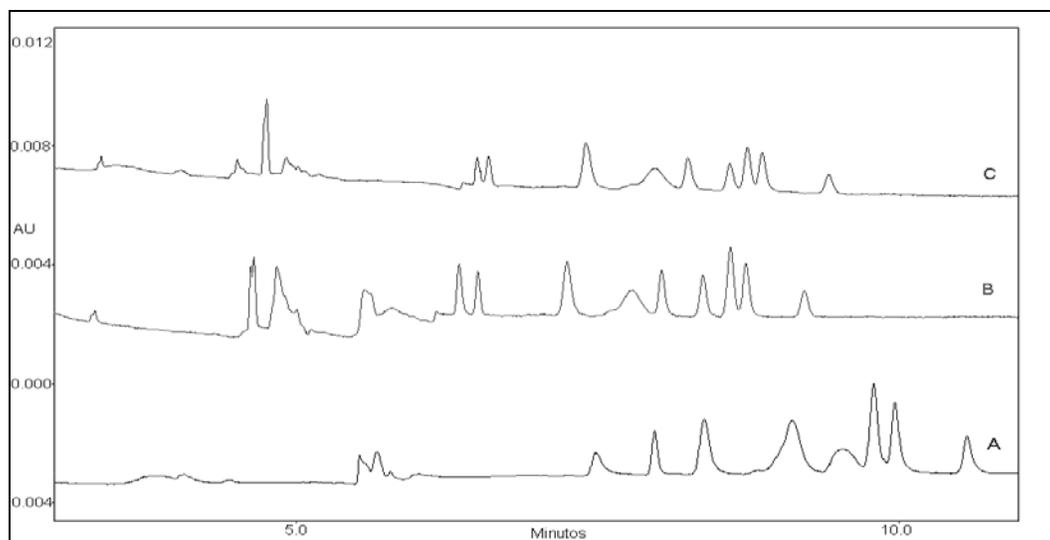


FIGURA No. 42. ESTUDIO DE LA ADICION DE CICLODEXTRINAS. Condiciones: Buffer de boratos 100 mM pH 8.0. a) sin CD, b) 10 mM de  $\alpha$ -CD, c) 10 mM de HP  $\alpha$ -CD.

## 7.2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN

Comparando los electroferogramas de la figura No. 42 se observa que al usar  $\alpha$ -CD se mejora la separación los compuestos que eluyen al principio mientras que al usar HP  $\alpha$ -CD se mejora la separación de los que eluyen al final, entonces, se decide realizar una mezcla de ambos buffer el de 10 mM de  $\alpha$ -CD y el 10 mM de HP  $\alpha$ -CD, dando como resultado que la concentración de ambas ciclodextrinas se diluye a la mitad, y se logra entonces la completa separación como se muestra en la figura No. 43. Por lo que ahora se puede conocer las condiciones optimas de separación para la determinación de los 14 antibióticos.

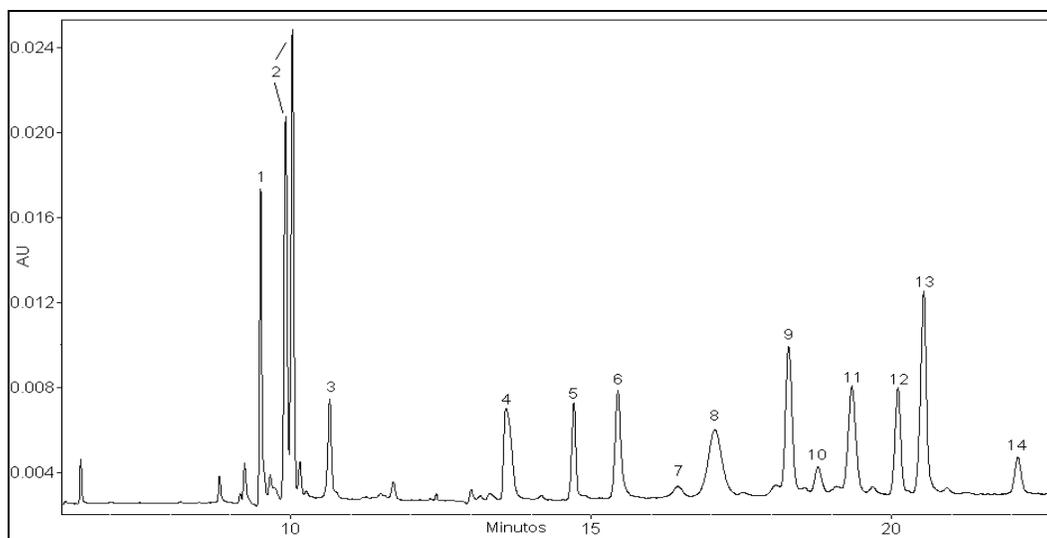


FIGURA No. 43. SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS; DONDE 1) TRIMETOPRIM, 2) ESPIRAMICINA, 3) TILOSINA, 4) ENROFLOXACINA, 5) CLORANFENICOL, 6) TETRACICLINA, 7) OXITETRACICLINA, 8) CLORTETRACICLINA, 9) AMOXICILINA, 10) CEFALEXINA, 11) AMPICILINA, 12) DICLOXACILINA, 13) OXACILINA Y 14) PENICILINA G. Condiciones: buffer de boratos 100 mM pH 8.0 con 5 mM  $\alpha$ -CD Y 5 mM HP  $\alpha$ -CD.

### 7.3. PRETRATAMIENTO DE LECHE CRUDA DE VACA.

#### 7.3.1. EXTRACCION LÍQUIDO-LÍQUIDO

Se ha desarrollado satisfactoriamente la separación de los 14 antibióticos usando ciclodextrinas, sin embargo hay que implementar el pretratamiento en una muestra de leche de vaca, ya que la variedad en su composición puede interferir en la separación; además si se logra elegir un solvente para realizar la extracción de los antibióticos se puede tomar ventaja y preconcentrar la muestra por evaporación del disolvente, por lo que se probaron varias metodologías.

Lo primero que se planteó fue realizar extracciones líquido-líquido, ya que es una técnica de separación que se basa en la transferencia de una o más sustancias entre

dos fases líquidas inmiscibles entre sí; se experimentó con los siguientes disolventes: éter, acetato de etilo, cloroformo, cloruro de metileno y metil isobutilcetona respectivamente; todas las extracciones se realizaron con los antibióticos estándares disueltos en solución acuosa pH 6.5, para asegurarnos que éstos serían extraídos, ya que a este valor de pH tenemos a la mayoría de los antibióticos neutros (ver procedimiento en la parte experimental página 72).

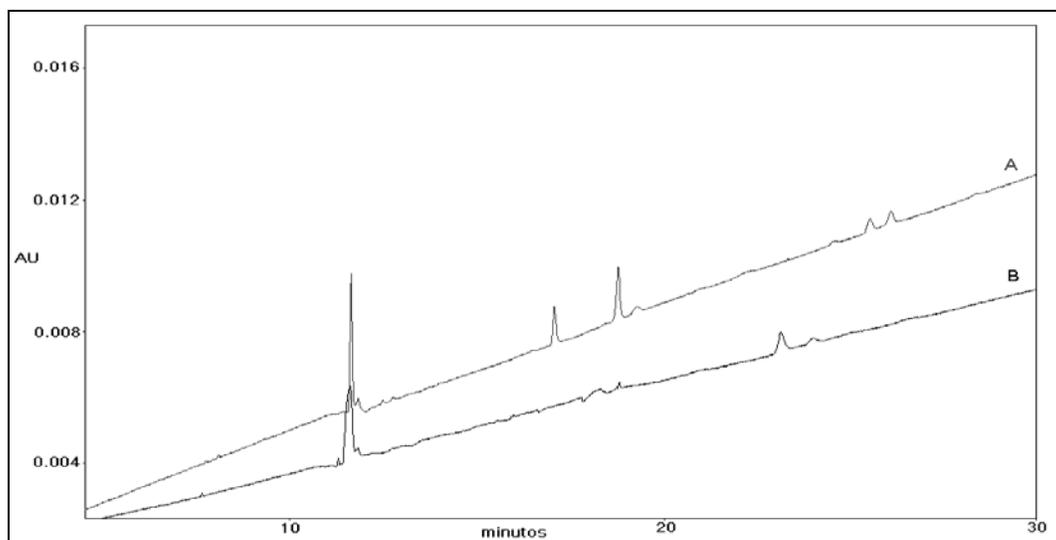


FIGURA NO. 44. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO ACETATO DE ETILO. A) FASE ORGÁNICA Y B) FASE ACUOSA. Condiciones como en la figura 43.

Cabe señalar que ambas fases, tanto acuosa como orgánica se leyeron en el equipo de electroforesis capilar; en la figura No. 44 se muestran los electroferogramas obtenidos con las extracciones líquido- líquido usando acetato de etilo como disolvente para la extracción, como se puede ver en ambas fases tenemos antibióticos por lo que no es posible utilizarlo. Es necesario aclarar que las fases orgánicas se evaporaron a

sequedad y se resuspendieron en buffer de corrida. En la figura No. 45 se usó cloroformo, pero al igual que en la figura No. 44, en ambas fases tenemos antibióticos por lo que tampoco sirve como disolvente para la extracción.

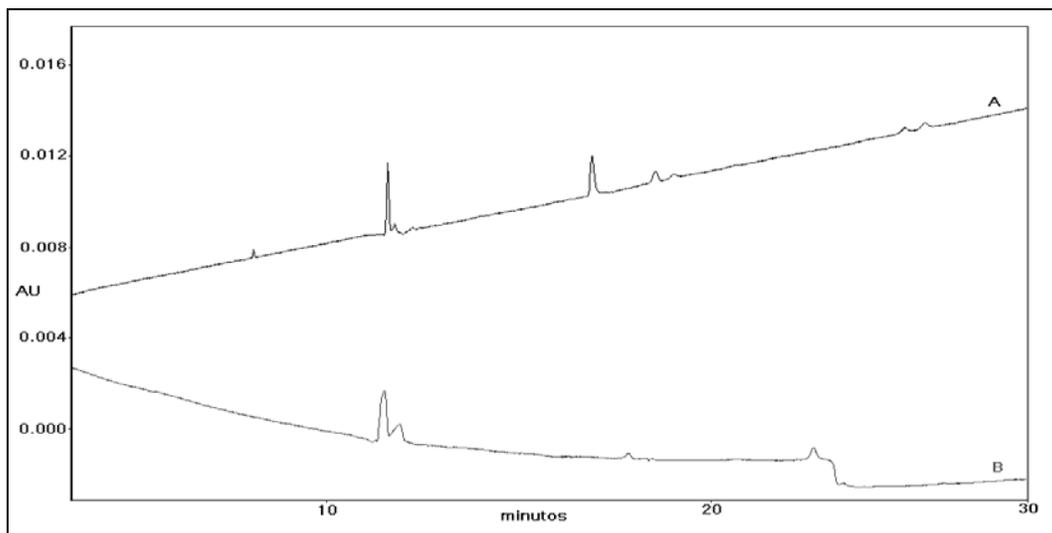


FIGURA NO. 45. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO CLOROFORMO. A) FASE ORGÁNICA Y B) FASE ACUOSA. Condiciones como en la figura 43.

En las figuras No. 46, 47 y 48 se puede ver que la mayoría de los antibióticos permanecen en la fase acuosa; por lo que tampoco podrán ser usados para realizar el pretratamiento de la muestra, aunque es de esperarse éste comportamiento; ya que se tienen 14 distintas estructuras con distintos y varios valores de pka, no es posible tenerlos a todos en su forma neutra al momento de la extracción.

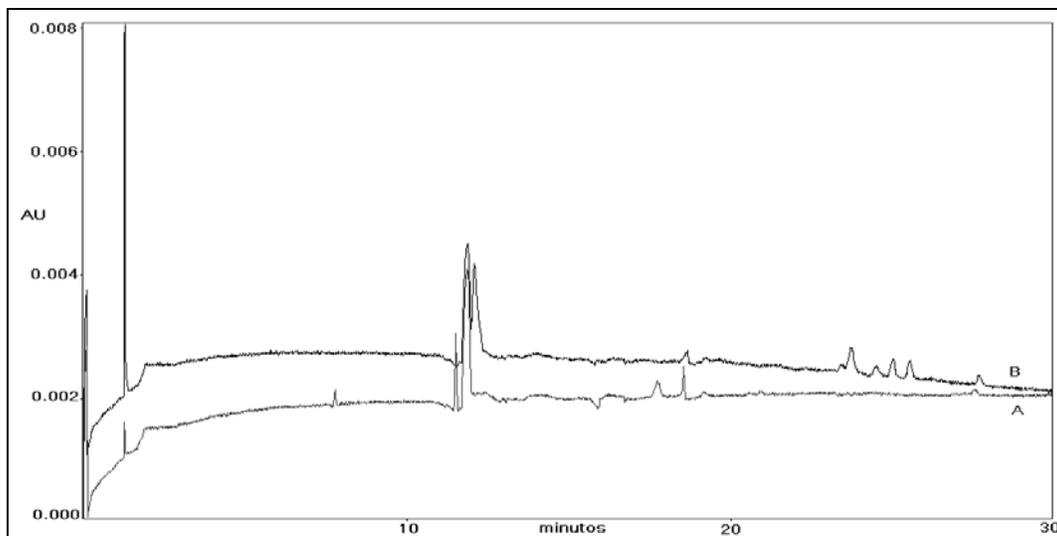


FIGURA NO. 46. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO CLORURO DE METILENO. A) FASE ORGÁNICA Y B) FASE ACUOSA. Condiciones como en la figura 43.

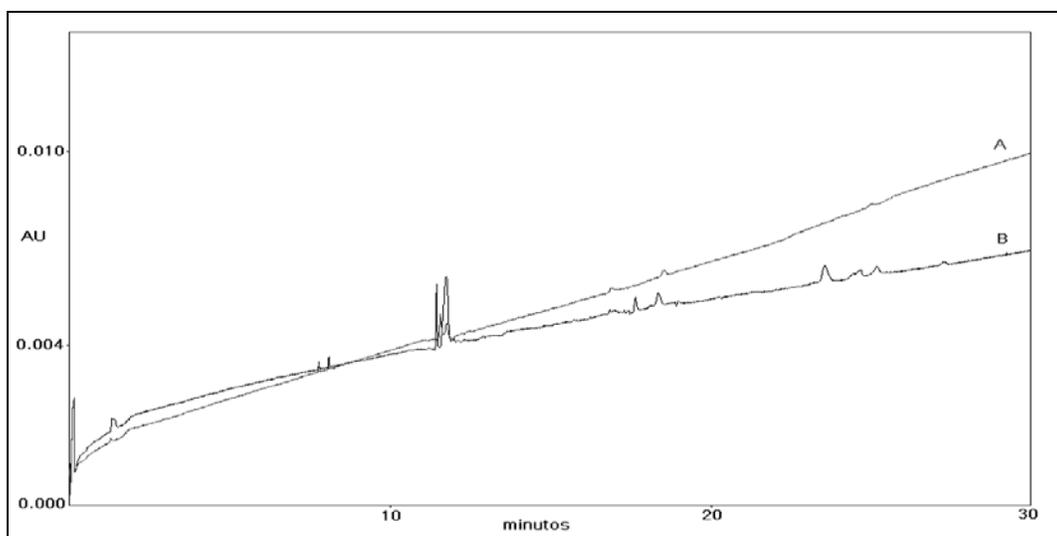


FIGURA NO. 47. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO ÉTER ETÍLICO. A) FASE ORGÁNICA Y B) FASE ACUOSA. Condiciones como en la figura 43.

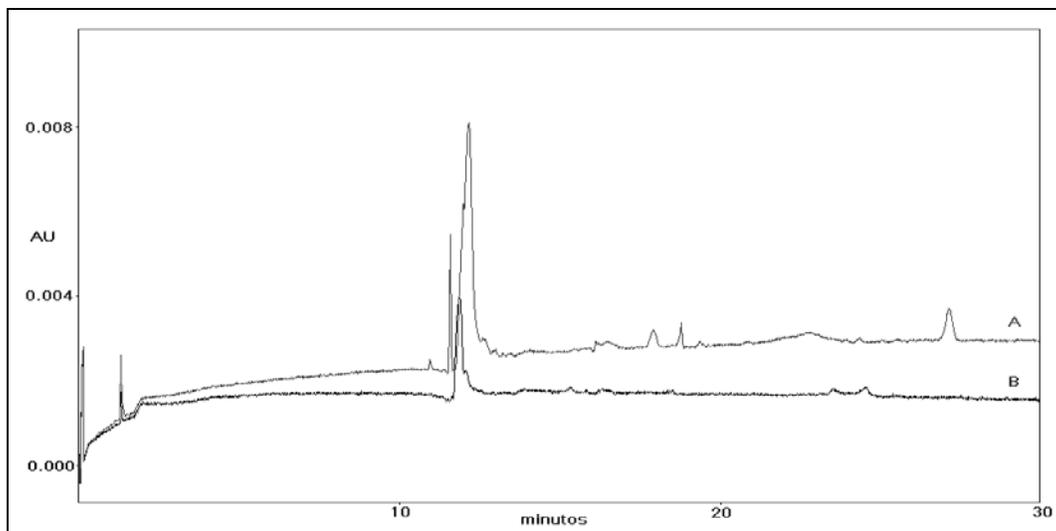


FIGURA NO. 48. EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS USANDO METIL ISOBUTILCETONA. A) FASE ORGÁNICA Y B) FASE ACUOSA. Condiciones como en la figura 43.

Es importante mencionar que no se identificó cada pico de los electroferogramas, ya que lo que se pretendía era primero extraer la mayoría de los antibióticos y cuando se tuviera el solvente que extraía a casi todos, pues se iba a identificar cuales estaban en la fase orgánica y cuáles en la fase acuosa, y dado que esto no se logró, se planteó realizar otro procedimiento para lograrlo.

#### 7.3.2. PRECIPITACION DE PROTEINAS TOTALES DE LA LECHE.

Dado que la extracción liquido-liquido no dio resultados satisfactorios, entonces se planteó la precipitación total de proteínas utilizando 75% de acetonitrilo, ácido tricloroacético 2M y ácido perclórico 2M.

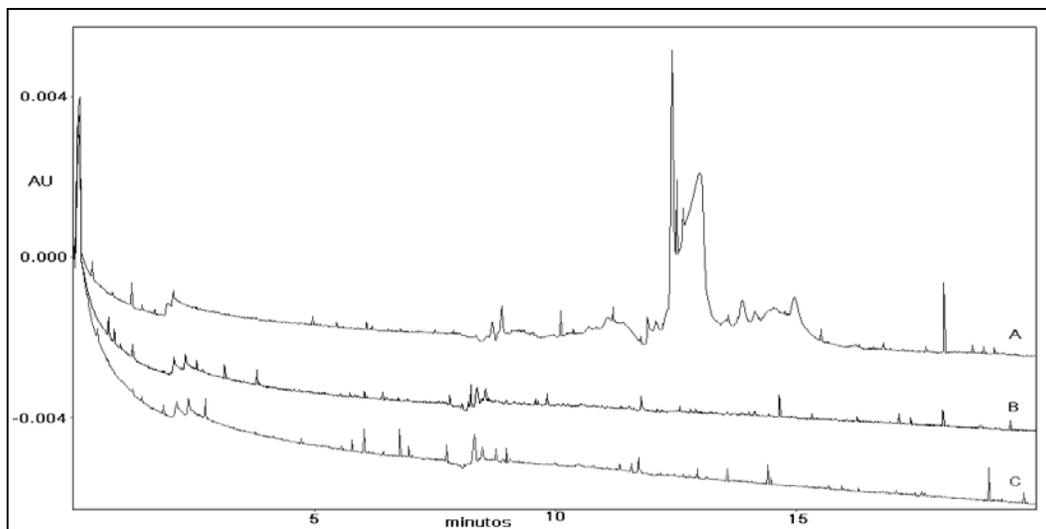


FIGURA No. 49. PRETRATAMIENTO DE LECHE USANDO A) ACETONITRILLO, B) ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y C) ÁCIDO PERCLÓRICO. Condiciones como en la figura 43.

En la figura No. 49, se observa una muestra leche de vaca tratada con acetonitrilo, ácido tricloroacético y ácido perclórico, con la finalidad de eliminar todas las proteínas que pudieran interferir en la separación de antibióticos. Como se puede ver, el acetonitrilo muestra muchos picos interferentes en la separación.

En la figura No. 50 se observa el perfil de leche de vaca y leche de vaca adicionada con 14 antibióticos a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , usando acetonitrilo para eliminar las proteínas de leche, se observan demasiados picos interferentes en la separación, y aunque se pueden identificar algunos antibióticos el resultado no es confiable, porque no se puede realizar una buena integración.

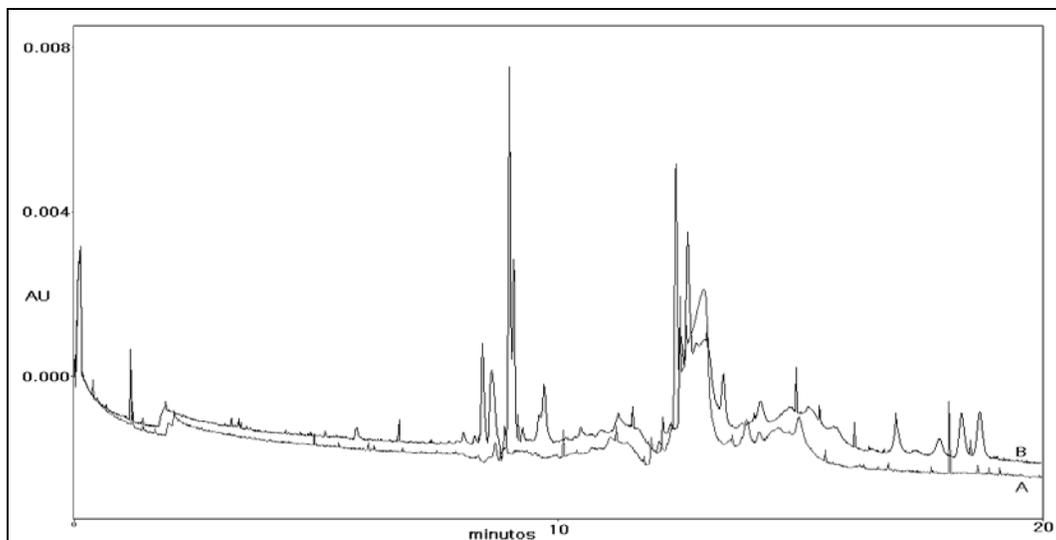


FIGURA No. 50. PRETRATAMIENTO DE LECHE USANDO ACETONITRILO, DONDE A) LECHE, B) LECHE CON 14 ANTIBIÓTICOS. Condiciones como en la figura 43.

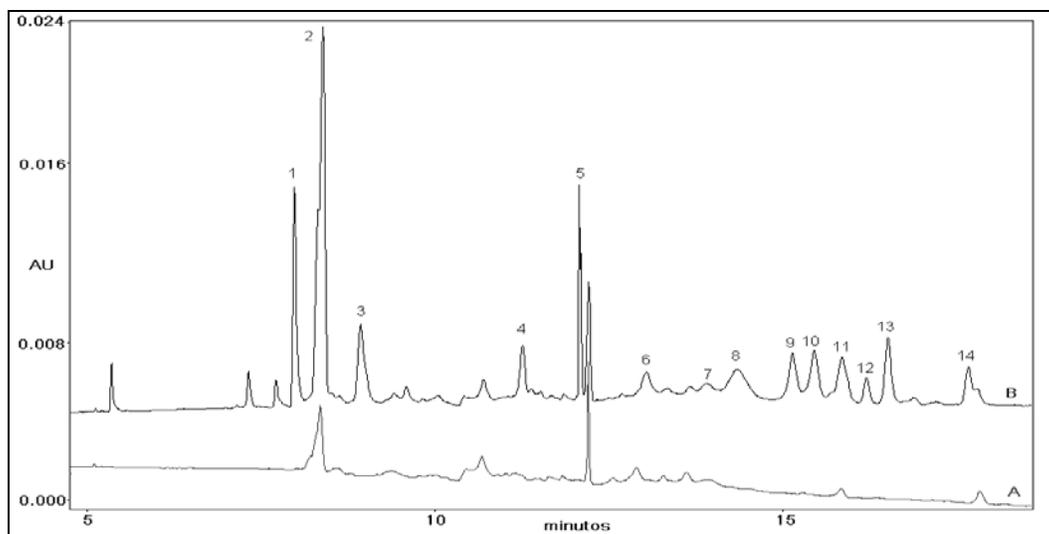


FIGURA No. 51. PRETRATAMIENTO DE LECHE USANDO ÁCIDO PERCLÓRICO, DONDE A) LECHE, B) LECHE CON 14 ANTIBIÓTICOS. 1) TRIMETOPRIM, 2) ESPIRAMICINA, 3) TILOSINA, 4) ENROFLOXACINA, 5) CLORANFENICOL, 6) TETRACICLINA, 7) OXITETRACICLINA, 8) CLORTETRACICLINA, 9) AMOXICILINA, 10) CEFALEXINA, 11) AMPICILINA, 12) DICLOXACILINA, 13) OXACILINA Y 14) PENICILINA G.

En la figura No. 51 se muestra la leche que ha sido adicionada con 14 antibióticos a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y se ha tratado con 200  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 2M en la que se puede apreciar

casi la eliminación total de proteínas, ya que sólo se observan picos muy pequeños que no interfieren en la separación, excepto por el pico 2 que es el de la espiramicina.

Al utilizar ácido tricloroacético (ver figura No. 52), se puede ver un comportamiento muy similar al de la figura No. 51, ya que la línea base del blanco; es decir la leche no muestra picos interferentes con los analitos de interés, además de que para lograr la precipitación de 10 mL de leche de vaca sólo se utilizan 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético 2M, el perfil es muy similar al de la figura 51, finalmente ambos son ácidos fuertes.

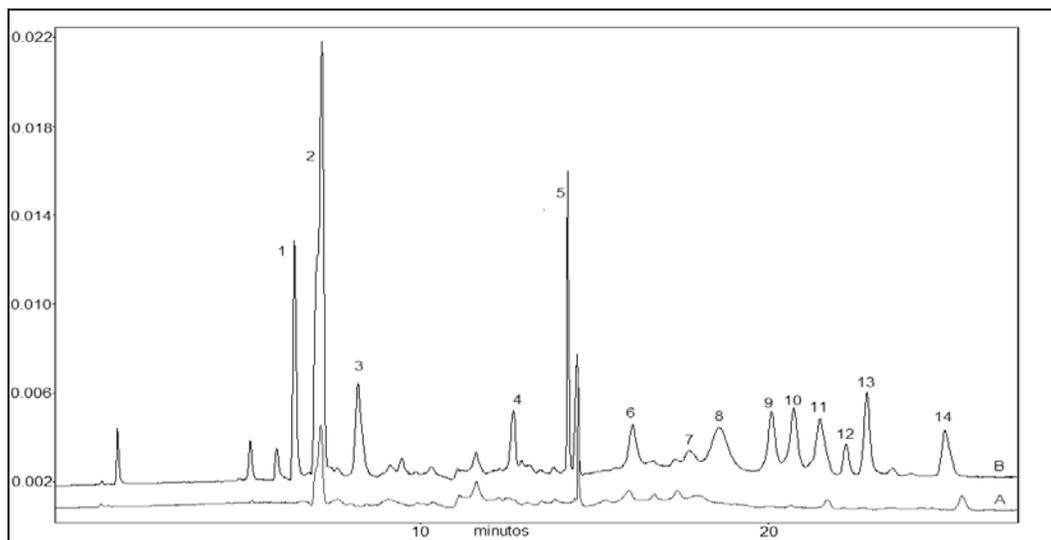


FIGURA No. 52. PRETRATAMIENTO DE LECHE USANDO ÁCIDO TRICLOROACÉTICO. DONDE A) LECHE, B) LECHE ADICIONADA CON 14 ANTIBIÓTICOS. 1)TRIMETOPRIM, 2)ESPIRAMICINA, 3)TILOSINA, 4)ENROFLOXACINA, 5)CLORANFENICOL, 6)TETRACICLINA, 7)OXITETRACICLINA, 8)CLORTETRACICLINA, 9)AMOXICILINA, 10)CEFALEXINA, 11)AMPICILINA, 12)DICLOXACILINA, 13)OXACILINA Y 14)PENICILINA G. Condiciones como en la figura 43.

Por lo tanto, se logró satisfactoriamente la separación de los 14 antibióticos usando ciclodextrinas, y también se probaron varias metodologías teniendo que la mejor para realizar el pretratamiento de leche cruda de vaca, es usando ácido TCA; ahora sólo

queda preconcentrar la muestra, ya que se debe alcanzar una sensibilidad de 5 ppb para las penicilinas, como lo indica la FDA de acuerdo a los límites máximos permisibles en leche.

### 7.3.3. PRECONCENTRACIÓN EN LINEA

#### 7.3.3.1. INYECCION HIDRODINÁMICA

Para aumentar la sensibilidad se trató de introducir mayor cantidad de muestra en el capilar, ya que la inyección estándar es de 0.5 psi durante 5 segundos, por lo que se varió tanto el tiempo como la presión de inyección. Se trabajó 0.5 psi durante 5, 10 y 15s y no se apreció aumento en el área de los picos. Por lo que se probó incrementar la presión de inyección (ver figura 53) de 0.5 a 2 psi durante 5 segundos y se logra ver que hay un ligero aumento en el área por lo que este cambio no logra mejorar notablemente la respuesta. Cabe mencionar que para éstos primeros experimentos sólo se utilizaron las 5 penicilinas ya que como se planteó anteriormente el LMR permisibles en leche es de 5 ppb para estos compuestos.

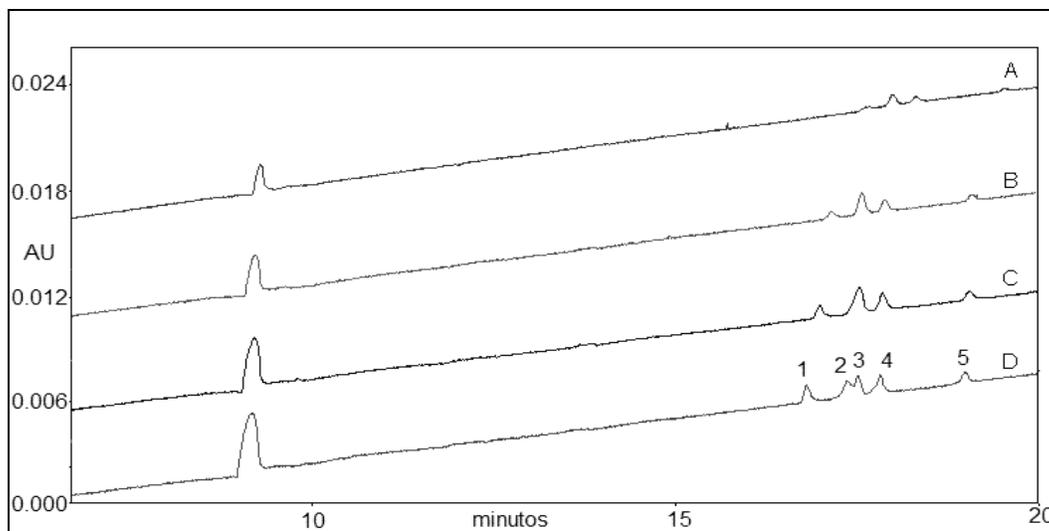


FIGURA No. 53. ESTUDIO DE LA PRESION EN LA INYECCIÓN HIDRODINÁMICA DE  $\beta$ -LACTÁMICOS.

A) 0.5 PSI X 5S, B) 1.0 PSI X 5S, C) 1.5 PSI X 5S Y D) 2.0 PSI X 5S DONDE 1) AMOXICILINA, 2) AMPICILINA, 3) DICLOXACILINA, 4) OXACILINA Y 5) PENICILINA G. Condiciones como en la figura 43.

#### 7.3.3.2. INYECCION ELECTROKINÉTICA

Entonces para lograr preconcentrar la muestra en lugar de utilizar inyección hidrodinámica (0.5 psi por 5 s) se decidió utilizar inyección electrocinética, aprovechando que los antibióticos al pH de separación (8.08) son aniones (-). Se realizaron varios experimentos; se inyectó electrocinéticamente como se muestra en la figura 54. Analizando las áreas obtenidas, se observa que aunque se aumente el tiempo en la inyección electrocinética, no aumenta el área significativamente, por lo que no es útil para realizar la preconcentración de las penicilinas.

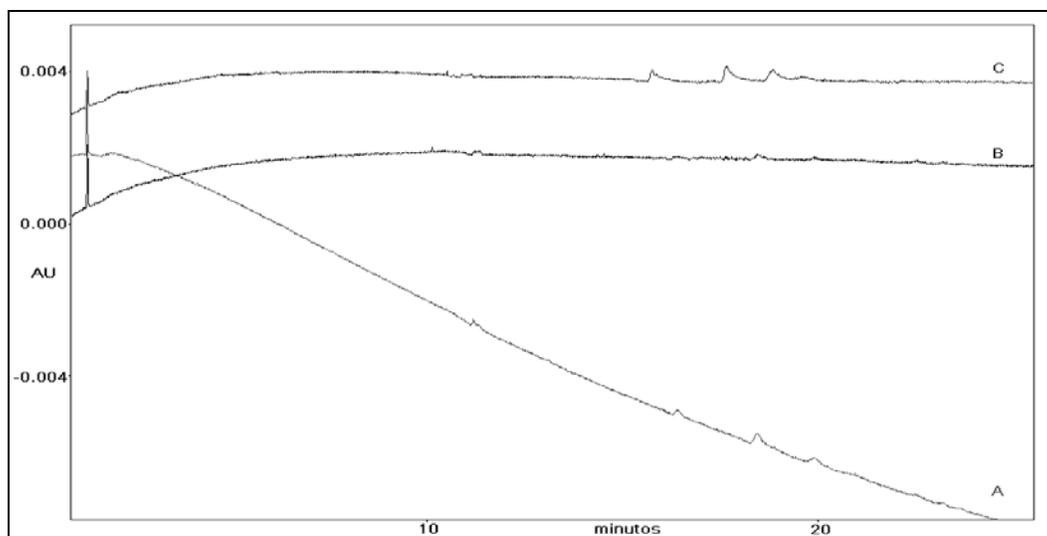


FIGURA No. 54. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA DE  $\beta$ -LACTÁMICOS. DONDE A) -10 KV por 30s, B) -10 KV por 20s Y C) -10 KV X 10s. Condiciones como en la figura 43.

En vista de que no se había logrado realizar la preconcentración en línea, se planteó introducir un volumen pequeño de agua antes de realizar la inyección electrocinética; de esta manera cuando se aplique el voltaje 10kV en polaridad inversa y dado que los analitos son aniones, se incrementa el campo eléctrico y se provoca que los aniones se concentren en ésta zona (agua). Se introdujeron diferentes volúmenes de agua (PLUG) antes de realizar la inyección electrocinética (10 kV durante 20s polaridad inversa), viéndose claramente como aumenta el área de los antibióticos conforme el volumen de agua es mayor (ver Figura 55).

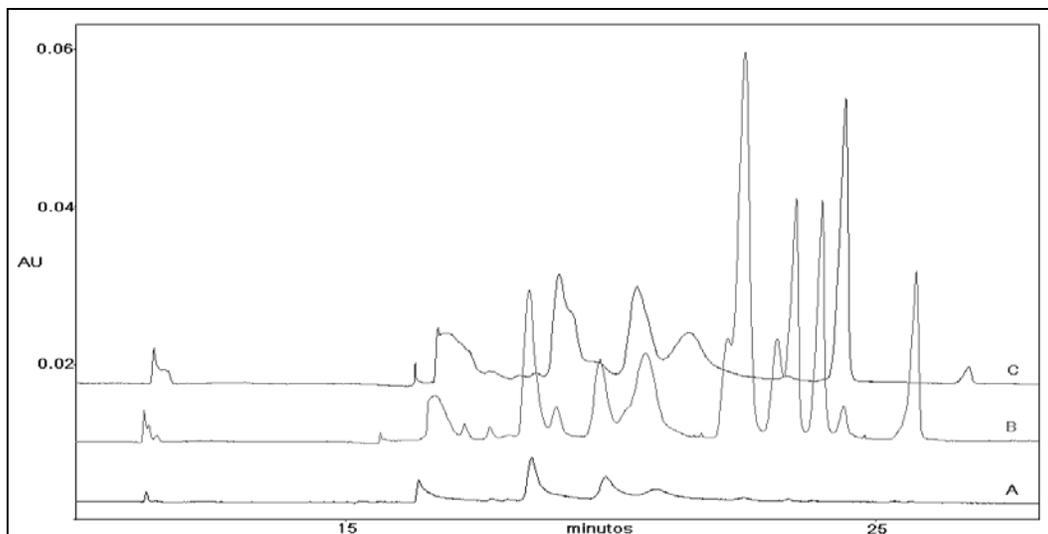


FIGURA No. 55. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA -10Kv X 20s, PLUG AGUA A) 0.5 PSI X 3S, B) 0.5 PSI X 20S, C) 0.5 PSI X 60S. 14 ANTIBIÓTICOS A 4  $\mu\text{g/mL}$ . Condiciones como en la figura 43.

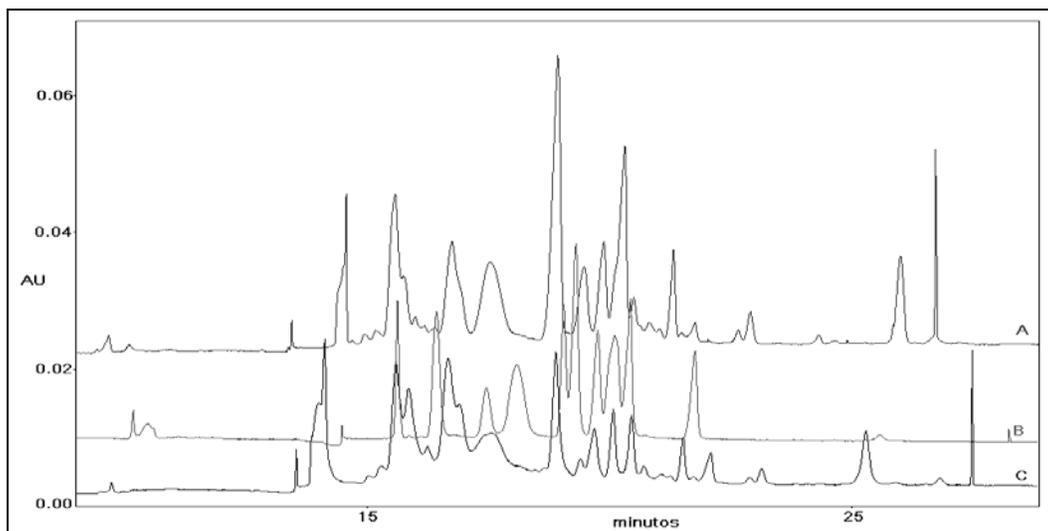


FIGURA NO. 56. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA CON PLUG DE AGUA DE 0.5 PSI X 80s. MEZCLA 14 ANTIBIÓTICOS 4  $\mu\text{g/mL}$  A) -10 KV X 20S, B) -10 KV X 40S, C) -10 KV X 60S. Condiciones como en la figura 43.

En la figura No. 56 se utilizó un mayor volumen de agua de 0.5 psi x 80 s, antes de realizar la inyección electrocinética (10 kV durante 20 s polarivav inversa) y se puede

observar que aumenta el área de los picos, y al aumentar el tiempo en el cual se aplica el voltaje para realizar la preconcentración se logra una mayor área; sin embargo, es importante mencionar que al usar inyección electrocinética se disminuye la repetibilidad en los tiempos de migración.

En vista de que se logró preconcentrar los analitos aumentando el campo eléctrico al usar un volumen de agua antes de realizar la inyección electrocinética, se planteó aumentar éste volumen a 0.5 psi x 3 minutos, como se muestra en la figura No. 57.

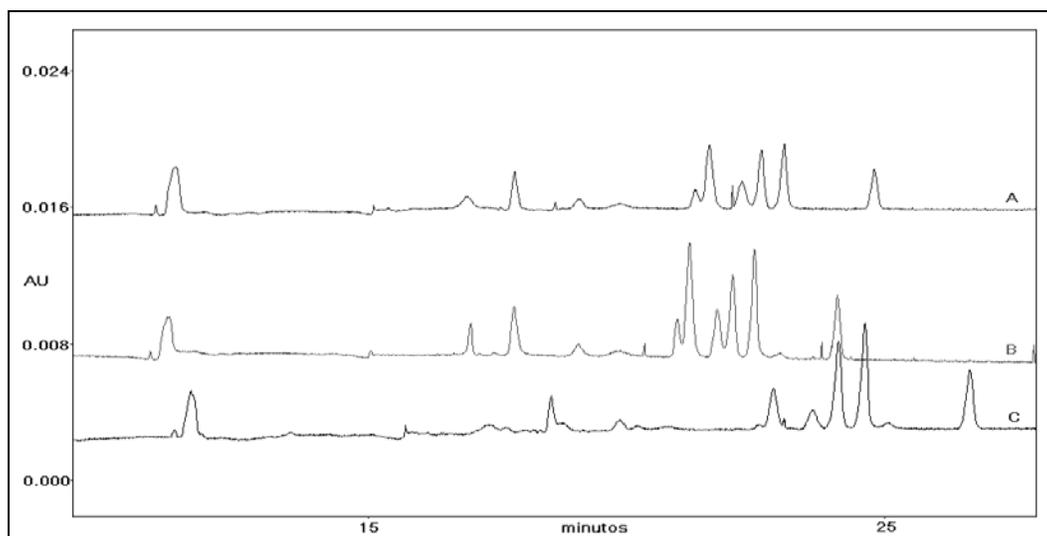


FIGURA NO. 57. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA CON PLUG DE AGUA DE 0.5 psi x 3 min. Inyección electrocinética A) -10kVv x 40s, B) -10kV x 80s, C) -10kV x 99.99s. Condiciones como en la figura 43.

Como se observa en la figura No. 57, cuando se aumenta el tiempo de la inyección electrocinética de 40 a 80 segundos aumenta el área de los picos, sin que se altere la separación de los analitos; sin embargo cuando se aumenta a 99.99 segundos (medida máxima dada por el instrumento) aumenta el área de los picos pero se afecta la

separación de los analitos, ya que se muestran picos más anchos apreciándose un menor número de éstos lo que es indicativo de que disminuye la separación y resolución por lo que no es recomendable usar un tiempo prolongado en la inyección electrocinética.

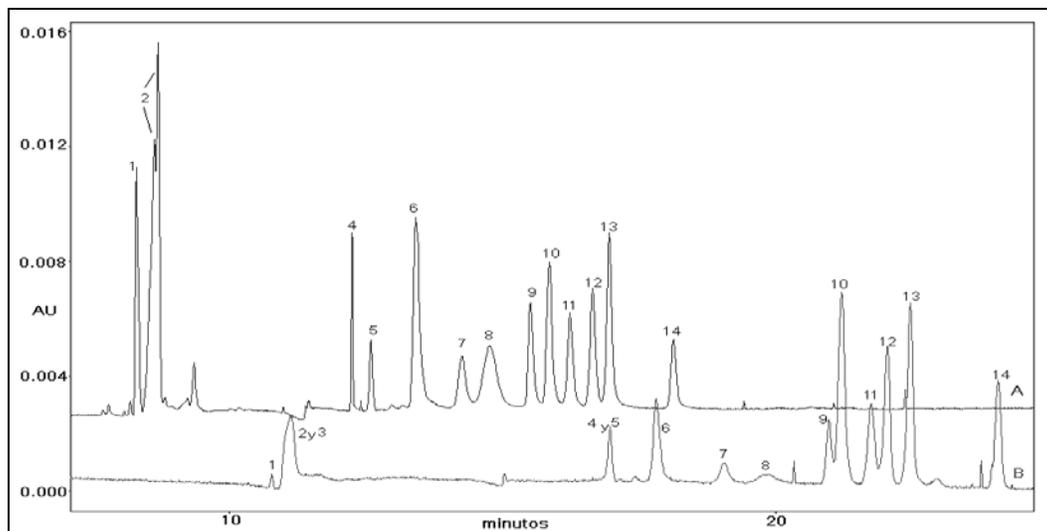


FIGURA NO. 58. COMPARACIÓN DEL TIPO DE INYECCIÓN. A) Inyección hidrodinámica 50 µg/mL 0.5 psi por 5s B) inyección electrocinética 0.5 µg/mL (plug de agua de 0.5 psi x 3 min.) -10 kV x 80s. DONDE 1) TRIMETOPRIM, 2) ESPIRAMICINA, 3) TILOSINA, 4)ENROFLOXACINA, 5) CLORANFENICOL, 6) TETRACICLINA, 7) OXITETRACICLINA, 8) CLORTETRACICLINA, 9) AMOXICILINA, 10) CEFALEXINA, 11) AMPICILINA, 12)DICLOXACILINA, 13) OXACILINA Y 14) PENICILINA G.

Ahora bien si se compara una inyección electrocinética con una hidrodinámica se puede ver que se logra preconcentrar mejor los antibióticos, usando la inyección electrocinética, en la figura No. 58, se hace la comparación de ambas inyecciones; y al obtener las áreas de los antibióticos con los dos tipos de inyección se verifica que se

preconcentra casi 200 veces lo que es muy recomendable, ya que los límites máximos permisibles de estos antibióticos en leche para las penicilinas son de 5  $\mu\text{g/L}$  (ppb), y uno de los propósitos de éste trabajo es poder llevar a cabo la preconcentración en línea.

#### 7.4. PRECISIÓN DEL SISTEMA USANDO INYECCIÓN HIDRODINÁMICA

Hasta ahora se ha desarrollado un método que separa 14 antibióticos en menos de 20 minutos, en el cuál se puede medir de hasta 20  $\mu\text{g/mL}$  usando inyección hidrodinámica y alrededor de 0.1  $\mu\text{g/mL}$  con inyección electrocinética.

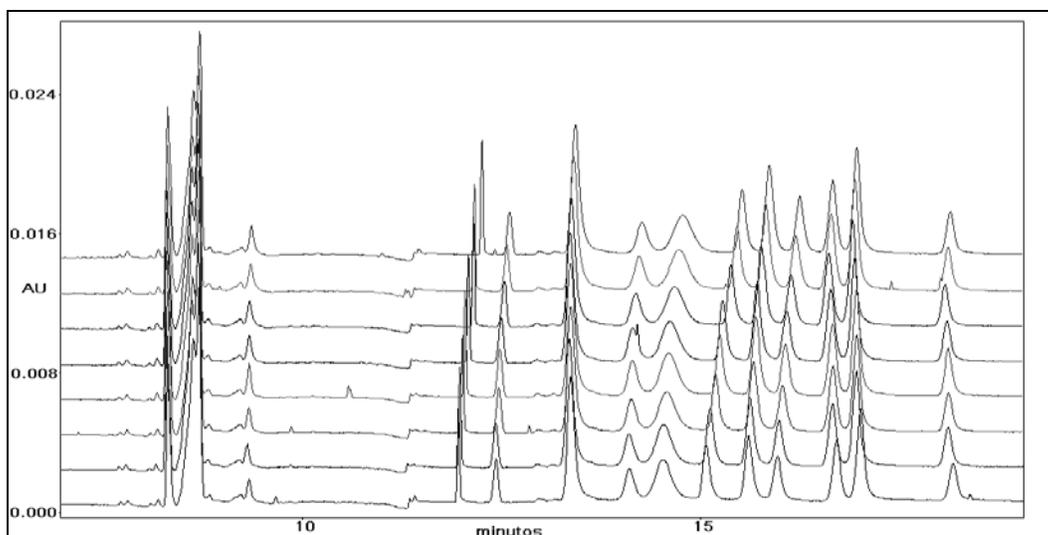


FIGURA NO. 59. REPETIBILIDAD DE LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS 50  $\mu\text{g/mL}$ ; USANDO INYECCIÓN HIDRODINÁMICA 0.5 psi x 5s. Condiciones como en la figura 43.

Explicando la figura No. 59 se observan 8 repeticiones de una muestra de 50  $\mu\text{g/mL}$  usando inyección hidrodinámica y donde se evalúa la repetibilidad del método, con lo que ha sido posible evaluar la precisión del sistema en tiempos de migración y áreas como se muestra en la tabla No. 26 y No. 27 respectivamente.

TABLA No. 26. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO  $t_m$  (INYECCIÓN HIDRODINÁMICA).

ANTIBIÓTICO	1	2	3	4	5	6	C.V. $t_m$ (%)
TRIMETOPRIM	7,813	7,808	7,817	7,825	7,829	7,846	0,1743
ESPIRAMICINA	8,071	8,075	8,079	8,087	8,092	8,113	0,1884
TILOSINA	8,15	8,15	8,155	8,163	8,171	8,188	0,1809
ENROFLOXACINA	11,188	11,163	11,137	11,129	11,063	11,087	0,4179
CLORANFENICOL	11,571	11,554	11,554	11,554	11,55	11,596	0,1530
TETRACICLINA	12,42	12,42	12,433	12,442	12,438	12,5	0,2392
CLORTETRACICLINA	13,212	13,208	13,208	13,208	13,192	13,258	0,1703
OXITETRACICLINA	13,692	13,679	13,675	13,667	13,633	13,708	0,1855
AMOXICILINA	14,217	14,217	14,204	14,196	14,167	14,238	0,1692
CEFALEXINA	14,36	14,367	14,371	14,383	14,379	14,475	0,2978
AMPICILINA	14,655	14,667	14,671	14,679	14,675	14,779	0,3098
DICLOXACILINA	14,767	14,8	14,821	14,863	14,883	15,012	0,5819
OXACILINA	15,012	15,046	15,071	15,113	15,133	15,267	0,5947
PENICILINA G	15,95	15,995	16,025	16,071	16,096	16,246	0,6438

Analizando los datos de la tabla No. 26 se pueden observar los coeficientes de variación de una muestra leída 6 veces; y se pueden observar que estos son menores a 0.7% en tiempos de migración.

Respecto a la tabla No. 27 se pueden ver valores de coeficientes de variación menores al 2% en áreas, lo que demuestra que al menos en éste tipo de inyección el método desarrollado es preciso.

**TABLA No. 27. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO ÁREA – (INYECCIÓN HIDRODINÁMICA).**

ANTIBIÓTICO	1	2	3	4	5	6	C.V. ÁREA (%)
TRIMETOPRIM	50159	50254	50840	50886	52048	50785	1,3263
ESPIRAMICINA	32943	32138	32769	33269	32703	32826	1,1300
TILOSINA	84350	84607	84067	83433	82965	81722	1,2803
ENROFLOXACINA	27531	27488	27308	26710	26943	27065	1,1919
CLORANFENICOL	25656	25853	25388	25214	25249	25310	1,0008
TETRACICLINA	49528	48345	48077	47150	47941	49492	1,9246
CLORTETRACICLINA	16882	16809	16707	16302	16675	16532	1,2540
OXITETRACICLINA	70393	70188	69822	72242	71313	72068	1,4358
AMOXICILINA	24656	24394	24950	25012	25185	25042	1,1758
CEFALEXINA	21823	22837	23855	22415	22816	22162	1,9055
AMPICILINA	21604	21773	22546	22546	22479	22254	1,8657
DICLOXACILINA	55909	56905	57701	56780	55774	54839	1,7971
OXACILINA	55084	54175	55842	55993	54351	54099	1,5408
PENICILINA G	27393	28579	28499	28375	28197	28804	1,7378

#### 7.5. PRECISIÓN DEL SISTEMA USANDO INYECCIÓN ELECTRODINÁMICA

En relación a la inyección electrocinética también se realizaron 6 repeticiones para ver como se ve afectada la precisión en el tiempo de migración y área en éste tipo de inyección, en la tabla No. 28 se muestra que los tiempos de migración de cada analito no se ven afectados ya que se observan datos del coeficiente de variación entre el 1.42

y 1.84% lo que indica que al menos en tiempo se puede confiar en los datos, lo que es conveniente para identificar cada antibiótico.

**TABLA 28. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO  $t_m$  – (INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA).**

ANTIBIÓTICO	1	2	3	4	5	6	C.V. $t_m$ (%)
TRIMETOPRIM	9,78	9,54	9,55	9,43	9,56	9,817	1,56
ESPIRAMICINA	13,36	12,99	12,88	13,02	12,95	13,32	1,54
TILOSINA	14,66	14,15	14,1	14,37	14,32	14,65	1,68
ENROFLOXACINA	15,49	14,94	14,87	15,15	15,11	15,40	1,63
CLORANFENICOL	15,95	15,32	15,67	15,57	15,51	15,80	1,42
TETRACICLINA	16,42	15,78	15,67	15,99	15,92	16,17	1,67
CLORTETRACICLINA	16,63	16,02	15,89	16,24	16,17	16,45	1,68
OXITETRACICLINA	16,95	16,32	16,18	16,53	16,49	16,73	1,68
AMOXICILINA	17,09	16,48	16,25	16,67	16,62	16,92	1,81
CEFALEXINA	17,33	16,71	16,47	16,9	16,85	17,15	1,81
AMPICILINA	17,75	17,16	16,90	17,33	17,28	17,57	1,74
DICLOXACILINA	17,88	17,27	17,00	17,43	17,38	17,69	1,78
OXACILINA	18,37	17,70	17,43	17,90	17,85	18,133	1,84
PENICILINA G	21,98	21,03	20,92	21,38	21,25	21,346	1,74

Analizando la tabla No. 29 se puede ver que a pesar que se lee la misma muestra 6 veces, (inyección electrocinética) se tienen valores del coeficiente de variación muy altos, entre 12,96 y 18,14 % lo que podría corregirse al utilizar un estándar interno (EI)

TABLA 29. PRECISIÓN DEL SISTEMA EVALUANDO ÁREA – (INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA).

ANTIBIÓTICO	1	2	3	4	5	6	C.V.ÁREA (%)
TRIMETOPRIM	1184	1134	1024	963	1455	1076	15,21
ESPIRAMICINA	10286	8984	8158	11638	8475	9230	13,68
TILOSINA	15494	11364	12631	17660	13618	15406	15,81
ENROFLOXACINA	4997	4451	4136	4726	3414	5591	16,40
CLORANFENICOL	10013	9543	9168	10751	13294	10244	14,03
TETRACICLINA	13002	9753	9636	14206	11945	12752	15,52
CLORTETRACICLINA	2813	2955	2242	3431	3510	3642	17,14
OXITETRACICLINA	6798	6939	4593	7807	7975	7759	18,14
AMOXICILINA	18261	17939	18005	16192	18959	24589	15,22
CEFALEXINA	12149	15458	14747	17632	14367	17015	12,96
AMPICILINA	6217	5605	5151	8194	6341	6773	16,56
DICLOXACILINA	1797	1708	23,06	2511	2081	1590	18,12
OXACILINA	17689	19389	17076	23524	17442	24332	16,19
PENICILINA G	18122	19549	15644	20521	14733	22694	16,22

### 7.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Usando inyección electrocinética, se realizaron varias mediciones, para evaluar los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para los antibióticos estimados se determinaron en base a la relación señal / ruido = 3 para el LD y en base a la relación señal / ruido = 10 para LC.

TABLA No. 30 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS 14 ANTIBIÓTICOS.

ANTIBIÓTICO	LD( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LMR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
TRIMETOPRIM	0.09	0.29	0.05
ESPIRAMICINA	0.03	0.09	0.20
TILOSINA	0.08	0.26	0.05
ENROFLOXACINA	0.02	0.05	0.10
CLORANFENICOL <sup>8</sup>	0.02	0.07	0
TETRACICLINA	0.02	0.07	0.10
CLORTETRACICLINA	0.02	0.07	0.10
OXITETRACICLINA	0.02	0.08	0.10
AMOXICILINA	0.03	0.09	0.004
CEFALEXINA	0.01	0.04	0.10
AMPICILINA	0.01	0.02	0.004
DICLOXACILINA	0.02	0.06	0.03
OXACILINA	0.01	0.03	0.03
PENICILINA G	0.03	0.10	0.004

Analizando los resultados mostrados en la tabla No. 30 se puede ver que para trimetoprim, tilosina, amoxicilina, ampicilina y penicilina G, no se logra preconcentrar suficiente para medir los límites máximos permisibles en leche; sin embargo los límites evaluados son sólo del método analítico desarrollado usando inyección electrocinética.

<sup>8</sup> El LD y LC se obtuvo con el método y tipo de inyección especificada, pero de acuerdo a la FDA el cloranfenicol no debe estar presente en leche de vaca.

Hasta el momento se ha logrado desarrollar el método que separa 14 antibióticos en menos de 20 minutos usando inyección hidrodinámica y menos de 25 minutos usando inyección electrocinética, ya que con éste tipo de inyección se recorren los tiempos de migración, pero se logra preconcentrar casi 200 veces, el inconveniente es que se ve afectada en la repetibilidad.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados, ha sido posible evaluar la influencia de las variables más importantes involucradas en la separación, identificación y cuantificación de nuestros analitos de interés, por una parte las proteínas de soya como adulterantes en leche y por otra parte la determinación de 14 antibióticos como contaminantes en leche cruda de vaca. Con lo que se puede concluir que:

Se desarrolló un método analítico para la identificación, separación y cuantificación de proteínas de soya como adulterantes en leche cruda de vaca usando electroforesis capilar de zona. Encontrándose que las condiciones óptimas de separación son usando un capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (40 cm de longitud efectiva), inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5s, +25kv de voltaje a 25° c, detección a 214nm, buffer 50 mM de fosfatos pH 2.0.

El método analítico para la determinación de proteínas de soya fue validado satisfactoriamente, demostrando que es preciso, exacto, lineal y repetible. Además puede ser utilizado como método de rutina en el control de calidad de leches para la industria de los lácteos.

Se desarrolló un método analítico para la identificación, separación y cuantificación de 14 antibióticos como contaminantes en leche cruda de vaca usando electroforesis capilar. Las condiciones óptimas para la separación de los

antibióticos encontradas son: utilizando un buffer de boratos 100mM + 5mM  $\alpha$ -CD y 5mM HP  $\alpha$ -CD a pH 8.0, a 30 kV, con un capilar de sílice fundida de 82cm de longitud total y de 71.5 cm de longitud efectiva, 50 $\mu$ m de diámetro interno, detectándose a 210 nm.

Si bien no fue posible realizar la validación completa para el método de los antibióticos, se obtuvieron parámetros importantes como la precisión del sistema y el pretratamiento que tendrá que realizarse a la leche para poder determinarlos sin interferencias. Asimismo se establecieron las bases para que se realice la validación completa en futuros trabajos.

Además de se crearon las metodologías adecuadas para realizar el pretratamiento de leche cruda de vaca determinar proteínas de soya y antibióticos según sea el caso.

El método desarrollado para la determinación de 14 antibióticos podría utilizarse no solo en la industria lechera, sino también servir de referencia en la determinación de antibióticos en la industria farmacéutica.

Cabe mencionar que los métodos desarrollados son baratos, ecológicos, sencillos y con tiempos de análisis menores a 10 minutos en el caso de las proteínas de soya; y menores de 25 minutos para el caso de los antibióticos, que bien se podrían proponer como métodos rutinarios en la industria lechera.

---

---

## REFERENCIAS

### ARTÍCULOS

Ahl, A.S.; Buntain, B. Risk and the food safety chain: animal health, public health and the environment. (1997) *Rev. Sci. Tech.* 16:322-330.

Altria K. D. Quantitative aspects of the application of capillary electrophoresis to the analysis pharmaceuticals and drug related impurities. (1993) *J. Chromatogr.* 646, Pp. 245-257.

Altria K. D., Bestford J. Main component assay of pharmaceuticals by capillary electrophoresis; considerations regarding, precision, accuracy, and linearity data. (1996) *J. Cap. Electroph.* 003. 1, Pp. 13-23.

Altria K. D., McLean R. Development and optimization of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. (1998) *J.Pharm. Biom. Anal.*, 18, Pp. 807-813.

Ángeles-Montiel R., Mora-Flores, Martínez-Damián. Efecto de las importaciones de leche en el mercado nacional del producto. (2004) *Agroc.* 38: 5, Pp. 555-564.

Bjersdottir I., Tjernelund J. No aqueous capillary electrophoresis its applicability in the analysis of food, pharmaceuticals and biological fluids. (1998) *Electrophor.*, 19,Pp. 2179-2186.

Baquero F., Baquero-Artigao G., Canton R. Antibiotic consumption and resistance selection in *Streptococcus pneumoniae*. (2002) *J. Antimicrob. Chem.* 50. Supl C:27-38.

Baró L, Jiménez J1, Martínez-Férez A2 Y Bouza Jj1. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. Bioactive milk peptidos and proteins. (2001) *Ars Pharmac.*, 42:3-4; Pp.135-145.

Benito I., Marina M. L. Detection of bovine whey proteins by on-column derivatization capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence monitoring. (1999) *J. Chromatogr. A*, 841, Pp. 105-114.

- Benito-Peña, Partal-Rodera, León-González. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. (2006) *Anal. Chim. Acta* 556. Pp. 415–422.
- Bramanti E., Sortino C., Raspi G. New chromatography method for separation and determination of denatured  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography. (2002) *J. Chromatogr. A*, .958, Pp. 157-166.
- Britz-Mckibbin P., Terabe S. On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis. (2003) *J. Chromatogr. A*, 1000, Pp. 917-934.
- Cabrera P., González D., Experimental and theoretical determination of physicochemical properties in a novel family of microbial Compounds. (2001) *Europ. Bull. Drug Res.* Vol. 9, N° 1.
- Cancho G., García F., Simal G. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. (2000) *Cien. Tecnol. Alim.* 3:39-47.
- Calavska J., Lienhard S. Comparative use of three electrokinetic capillary methods for the determination of drugs in body fluids. (1993) *J. Chromatogr.*, 638, Pp. 335-342.
- Cartón G., Coccioli F. Determination of cow's milk in goat's milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. (1999) *J. Chromatogr. A*, 846, Pp. 135-141.
- Cinquina A. L., Roberti P., Giannetti L. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk high-performance liquid chromatography with diode-array detection optimization and Validation. (2003) *J. Chromatogr. A*, .987, Pp. 221-226.
- Cinquina A. L., Longo F. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. (2003) *J. Chromatogr. A*, 987, Pp. 227-233.
- Cué B. M., Morejón G. M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I antibióticos betalactámicos. (1998) *Rev Cubana Med Gen Integr.*, 14(4) Pp. 347-61.

- Cué B. M., Morejón G. M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte III Sulfonamidas y Tetraciclinas. (1999) *Rev Cubana Med Gen Integr.*, 15(2) Pp. 156-167.
- Dette C. Ebel S., Terabe S. Neutral and anionic cyclodextrins in capillary zone electrophoresis: Enantiomeric separation of ephedrine and related compounds. (1994) *Electrophor.*, 15, Pp. 799-810.
- Fanali S., Cristalli M., Nardi A.,. Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical análisis. (1990) *Soc. Chim.Ital.*, 45, No. 6, Pp. 693-702.
- Flurer C.L., Wolnik K.A. Chemical profiling of pharmaceuticals by capillary electrophoresis in the determination of drug origin. (1994) *J. Chromatogr. B*, 674, Pp. 153-163.
- Flurer C. L. Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. (2001) *Electroph.* 22, Pp. 4249-4261.
- Furusawa N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. (2003). *Talanta*. 59, Pp. 155-159.
- García-Ruiz C., Torre M., Marina M.L. Analysis of bovine whey proteins in soybean dairy-like products by capillary electrophoresis. (1999) *J. Chromatogr. A*, .859. Pp.77-86.
- Gómez M., Olsina R.,. Simultaneous determination of cloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms. (2003) *Talanta*. 61, Pp. 233-238.
- Granizo, J.J.; Aguilar, L.; Casal, J.; García-Rey. Streptococcus pneumoniae resistance to erythromycin and penicillin in relation to macrolide and beta-lactam consumption in Spain. (2000) *J. Antimicrob. Chem.*. 46, Pp. 767-773.
- Guzman N. A., Stubbs R. J. The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: A powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications. (2001) *Electrophor.* 22 Pp. 3602-3628.
- Hernández M., Borrull F., Calull M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. (2003) *Trends Anal. Chem.*, 22, Nos. 7+8, Pp. 416-426.

- Hernández M., Aguilar C. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis- capillary zone electrophoresis. (2002) *J. Chromatogr. B*, 772, Pp. 163-172.
- Herrero-Martínez J. M., Simó-Alfonso E. Determination of cow's milk in non-bovine and mixed cheeses by capillary electrophoresis of whey proteins in acidic isoelectric buffers. (2000) *J. Chromatogr. A*, 878, Pp. 261-271.
- Izco J. M., Ordoñez A. I., Torre P. Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. (1999) *J. Chromatogr. A*, 832, Pp. 239-246.
- Kennedy D.G., McCracken R.J. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. (1998) *J. Chromatogr. A*, 812 Pp 77-98.
- Kaminarides S. E., Koukiassa P. Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para-k-casein. (2002) *Food Chem.* 78, Pp. 53-55.
- Kim J-B., Terabe S. On-line sample preconcentration techniques in micellar electrokinetic chromatography. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 Pp. 1625-1643.
- Knarreborg A., Simon M.A. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68, Pp. 5918-5924.
- Kowalski P., Oledzka I. Capillary electrophoresis in analysis of veterinary drugs. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32 Pp.937-947.
- Lausch R., Scheper T. Rapid capillary gel electrophoresis of proteins. (1993) *J. Chromatogr. A*, 654. PP 190-195.
- López-Tapia J., García-Risco M., Manso M. Detection of the presence of soy protein in milk powder sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis. (1999) *J. Chromatogr. A*, 836, Pp.153-160.
- Losada H., Bennett R., Cortés J. The Mexico City milk supply system: Structure, function, and sustainability. (2001) *Agric. Hum. Values* 18, Pp. 305-317.

- Mammina, C.; Cannova. Drug resistances in salmonella isolates from animal foods. (2002) *Epidemiol. Infect.* 129, Pp. 155-161.
- Marín M., Francesco G. Antibióticos betalactámicos. (2003) *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21(1), Pp. 42-55.
- Martínez D., Borrull F. Sample stacking using field-amplified sample injection in capillary zone electrophoresis in the analysis of phenolic compounds. (1997) *J. Chromatogr. A*, 788, Pp. 185-193.
- Miralles B., Rothbauer V., Manso M. A. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and *para*-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. (2001) *J. Chromatogr. A*, 915, Pp. 225-230.
- Molina E., Martín-Alvarez P. Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis. (1999.) *Internac. Dairy J.* 9, Pp. 99-105.
- Mourier P., Brun A. Study of the metabolism of spiramycin in pig liver. (2004) *J. Chromatogr. B*, 704, Pp. 197-205.
- Murphy, Song, Buseman. Isoflavones in Soy-Based Infant Formulas. (1997) *J. Agric food Chem.*, 45:12. Pp. 4635-4638.
- Nevado B., Castaneda P., Guzman B. Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. (2001) *J. Chromatogr. A*, 918, Pp. 205-210.
- Pajchel G., Pawlowski K. CE versus LC simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 Pp. 75-81.
- Pérez-Trallero. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. (2003) *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 21:9, Pp. 520-529.

- Prado F. G., Carabias M. R. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. (2002) *Rev. Esp. Salud. Pública.*, 76. Pp. 133-147.
- Quirino J., Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. I. Normal Stacking mode. (1997) *J. Chromatogr. A*, 781, Pp. 110-128.
- Quirino J., Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. IV. Field-enhanced sample injection. (1998) *J. Chromatogr. A*, 798, Pp. 251-257.
- Quirino J., Otsuka K. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. VI Stacking using reverse migrating micelles and water plug. (1998) *J. Chromatogr. B*, 714, Pp. 29-38.
- Quirino J., Terabe S. Sample Stacking of fast-moving anions in capillary zone electrophoresis with pH-suppressed electroosmotic flow. (1999) *J. Chromatogr. A*, 850, Pp. 339-344.
- Ramírez, Gutierrez. High-performance thin-layer chromatography–bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. (2003) *J. Chromatogr. B*, 784, Pp. 315–322.
- Recio I., Amigo L., López-Fandiño R. Assesment of the quality products by capillary electrophoresis of milk proteins. (1997) *J. Chromatogr. B*, 697. Pp 231-242.
- Recio I., Pérez-Rodríguez M., Ramos M. Capillary electrophoretic análisis of genetic variants of milk proteins from different species. (1997) *J. Chromatogr. A*, 768, Pp. 47-56.
- Riechel P., Weiss T. Determination of minor whey protein bovine lactoferrin in cheese whey concentrates with capillary electrophoresis. (1998) *J. Chromatogr. A*, 817, Pp. 187-193.
- Rowena M., Monton N., On-line sample preconcentration in micellar electrokinetic chromatography by sweeping with anionic-zwitterionic mixed micelles. *J. Chromatogr. A*, 985, Pp. 435-445.
- Schwer C. Sample Preconcentration in Capillary Zone Electrophoresis. (1993) LC-GC International, 0033
- Shihabi Z. K. Therapeutic drug monitoring by capillary electrophoresis. (1998) *J. Chromatogr. A*, 807, Pp. 27-36.

Soriano, F.; Rodriguez-Cerrato, V. Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. (2002) *J. Antimicrob. Chem.* 50. Supl C, Pp. 51-58.

Stolker A., Brinkman. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. (2005) *J. Chromatogr. A*, 1067 Pp 15–53

Veloso A., Teixeira N. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. (2002) *J. Chromatogr. A*, 967, Pp. 209-218.

Wang Z., Huang A.J., Sun Y.L. Cyclodextrins as buffer additives for the enantiomeric separation of pinacidil in capillary zone electrophoresis. (1996) *J. Chromatogr. A*, 749, Pp. 300-311.

Wainright Ann. Capillary electrophoresis applied to the analysis of pharmaceutical compounds. *J. Microcol. (1990) Separ.*, 2, Pp. 166-175.

Xiuyun Y., Shigeru Y. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, a-lactalbumin, b-lactoglobulin B and b-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. (2000) *J. Biochem. & Cell Biol.* 32 Pp. 1143-1150.

Yongxin Z., Dalle J. Analysis of benzylpenicillin by capillary electrophoresis. (1997) *J. Chromatogr. A*, 792, Pp. 83-88.

Zhang C., Thormann W. Determination of drug levels in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection using different quantitation strategies. (1994) *J. Cap. Electroph.*, 001:3, Pp. 208-218.

## GUÍAS Y NORMAS

Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas y Asociación Nacional de Ganaderos Lecheros, A.C. "SITUACIÓN ACTUAL DE LA LECHE" Consejo Mexicano para el Desarrollo Rural Sustentable.

Sexta Sesión Ordinaria 2006

Evaluación de la Calidad de las Proteínas, Informe de la Reunión Consultiva Conjunta de la FAO/WHO. Roma: Documento N0. 51 sobre Alimentación y Nutrición de la FAO, 1991.

Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Edición 2002.

Guidance for Industry. Bioanalytical method Validation. CDER, CVM, FDA. May 2001.

Guidance for Industry. Q2B Validation of analytical procedures: Methodology. ICH, November 1996.

ISO 17129 | IDF 206. 2006. "Milk and Milk products- Determination of soy and pea proteins using SDS-CE (Screening method). Pp. 1-11.

Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003.

Anteproyecto de Norma Mexicana. Organismo Nacional de Normalización – Subcomité Técnico de Normalización de Métodos de Prueba. Avance 05 diciembre 2007.

Official Journal of the European Communities. COMMISSION DIRECTIVE 98/53/EC of 16 July 1998. laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs.

Official Journal of the European Communities. COMMISSION REGULATION (EC) No 466/2001 of 8 March 2001. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs

## **LIBROS**

Altria K. D., 1998 "Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis". Glaxo Wellcome. Vol.2 Alemania, Pp. 21-30.

ALTAGA. 2000. "el uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual". *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3 (1), Pp. 39-47.

Blanc T., Schaufelberg D. E., Guzman N., 1997. Capillary Electrophoresis. Marcel Dekker, Inc. Las Vegas, New Mexico.

- Claessens H. A., Billiet H. A., 1995 "Capillary Electro separation Methods" Delft University of Technology, ayo, Pp. 113-140, 164-172.
- Clyde E. S., 2002. "La proteína de soya en el horneado", Technical Foods Consultants, Cincinnati, Ohio, EUA.
- Foret Frantisek, Bocek T., Krivánková L., 1993 "Capillary Zone Electrophoresis" Ed. VCH, Alemania, Pp. 7-35, 135-186.
- Gerald L. Klein, Carl R. Jolliff, 1994 "Capillary electrophoresis for the routine clinical laboratory" *CRC Handbook of Capillary Electrophoresis: A Practical Approach*, Pp. 419-457.
- Goodman A., Rall T. W., Nies A.S., 1993. "Las bases Farmacológicas de la terapéutica" 8ª ed. Cap 44. México D.F., Ed. Médica Panamericana. Pp 991-1034.
- Heiger N. D., 1997 "High performance Capillary Electrophoresis ". Hewlett Packard Company. 3a ed. Francia. Pp 13-29, 36-39, 42-75, 78-95.
- Herb Schwartz, Tom Pritchett, 1999 "Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis: application to analytical Biotechnology" Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, Pp. 73-95.
- Jawetz E, Melnick J., Alderberg E., 1988. *Quimioterapia antimicrobiana. Manual de Microbiología*, Médica, 12ª ed. México D.F., Ed. El Manual Moderno, Pp.110-135.
- Jensen G. 1995. "Handbook of Milk Composition" New York Academic Press.
- Klein GeraldL, Jolliff Carl R., 1994 "Capillary electrophoresis for the routine clinical laboratory" *Handbook of capillary electrophoresis*, Florida, Pp.419-457.
- Landers. James P., 1993 "Handbook of Capillary Electrophoresis" CRC press. USA. Pp 26-28, 64-66.
- Mendoza Z. R., 2002. "Antimicrobianos 2002"IPN, México. Pp. 57-95. ISBN 970-18-9200-3.
- Merck & Co., 1996. The Merck Index on CD-ROM version 12:1. Inc., Whitehouse Station., NJ, USA.
- Paul R. Haddad, Dr Mirek Macka, 2000 "Ion analysis by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography" University of Tasmania, Australia, Pp. 1-23.

Rivera Vega, María P. 1996 "Electroforesis Capilar, una nueva herramienta para la química analítica" Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México. Pp.1-13.

Rodríguez-Díaz, Zhu M., Levi V., 2000. "Characterization of Milk and Dairy Products by Capillary Electrophoresis" Life Science Group., California USA..

Rubinson J.F., Rubinson K.A., 2000 "Química Analítica Contemporánea, *Capítulo 14: Separaciones con voltaje aplicado: electroseparaciones*" Pearson Education, México.

Sam F. y Li, 1993 "Capillary Electrophoresis" Elsevier Science, the Netherlands. Amsterdam, USA, Pp. 1-7, 232-236.

Singh, H., O.J. McCarthy. 1997. Physico-chemical properties of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, Water, Salts And Vitamins*. P.F. Fox Chapman & Hall. New York. Pp. 469.

Singhal R., 1997. Handbook of indices of food quality and authenticity. Woodhead Publishing limited. Cambridge CB1 6AH, England ISBN 1 85573 299 8

Skoog D. A., Holler F.J., Nieman T.A., 2001 "Principios de Análisis Instrumental" *Capítulo 30: Electroforesis Capilar y Electro cromatografía*, Mc Graw Hill. 5ª ed., Madrid, España.

Smith Norman. 1999 "Capillary ElectroChromatography" Beckman Coulter Inc, Fullerton California, USA. , Pp. 3-13.

Spicer Edgar. 1991. "Lactología Industrial" 2a ed. Acribia. Zaragoza España. Pp. 25-50

Veisseyre Roger.1980. "Lactología Técnica". Acribia. Zaragoza, España. 629 p.

Winefordner J. D., Khaledi M., 1998 "Chemical Analysis. High-Performance capillary Electrophoresis" Wiley-Interscience, USA., vol.1, Pp. 99-107.

## **PÁGINAS ELECTRÓNICAS**

[http://www.science.oas.org/OERA\\_GTZ/LIBROS/LA\\_LECHE/LE\\_HTML/CAP6\\_LECHE.HTM](http://www.science.oas.org/OERA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/LE_HTML/CAP6_LECHE.HTM), 2004.

<http://www.infoleche.com/PRODUCCION-PRIMARIA/pago-leche/antibioticos.asp>., 2004.

- [http://www.infocarne.com/ovino/composicion\\_leche\\_asp](http://www.infocarne.com/ovino/composicion_leche_asp), 2004.
- <http://www.alimentacion-sana.com.ar>, 2005.
- <http://www.fda.gov/cvm.>, 2004.
- <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>., 2004.
- <http://www.cuencarural.com.ar>., 2002.
- [http://bioaplicaciones.galeon.com/Gelificsntes\\_1.html](http://bioaplicaciones.galeon.com/Gelificsntes_1.html), 2003.
- [http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de\\_html/ch19.es.html](http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch19.es.html), 2004
- <http://www.nationaldairycouncil.org/lv104/nutrilib/newknow/nkb4.html>, 2001.
- <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>, 2004.
- <http://www.chemfinder.com>, 2003.
- <http://www.botanical-online.com>, 2004.
- <http://jeffline.tju.edu/cwis/oac/antibiotics-guide/intro.html>, 2004
- <http://www.aapspharmscitech.org/#B10>, 2002.
- [http://www.kroger.com/Es-Supp/Whey\\_Protein.htm#Condition-Summary](http://www.kroger.com/Es-Supp/Whey_Protein.htm#Condition-Summary), 2003.
- [http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de\\_html/ch19.es.html](http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch19.es.html), 2006.
- [http://www.cipca.org.pe/cipca/informacion\\_y\\_desarrollo/agraria/fichas/soya.html](http://www.cipca.org.pe/cipca/informacion_y_desarrollo/agraria/fichas/soya.html), 2003
- <http://jeffline.tju.edu/cwis/oac/antibiotics-guide/intro.html>, 2003
- <http://www.solae.com/company/sp/soyessentials/soyessentials.html>, 2003.
- <http://www.elsevier.com>
- <http://www.aapspharmscitech.org>, 2006.
- <http://www.sagarpa.gob.mx>, 2004
- <http://www.profeco.gob.mx>, 2004
- <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/52410/lecciones/penicilinas.html>