



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTILÁN**

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE DE VACA  
POR ELECTROFORESIS CAPILAR”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTAN:**

**RAMÍREZ AGUILAR AARÓN GUSTAVO**

**SANTOS OROZCO DAPHNE DENNISE**

**ASESORA:**

**DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

**Desarrollo de un método para la determinación de antibióticos en leche de vaca por electroforesis capilar**

---



---



---

Que presenta el pasante: **Aarón Gustavo Ramírez Aguilar**

Con número de cuenta: **40708139-6** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

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

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de junio de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Elia Granados Enriquez	
<b>VOCAL</b>	QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Víctor Hugo Abregó Reyes	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm



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

U.N.A.M.  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

**Desarrollo de un método para la determinación de antibióticos en leche de vaca por electroforesis capilar**

---



---



---

Que presenta la pasante: **Daphne Dennise Santos Orozco**

Con número de cuenta: **30424594-7** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

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

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de junio de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Elia Granados Enriquez	
<b>VOCAL</b>	QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
<b>2do SUPLENTE</b>	QFB. Víctor Hugo Abrego Reyes	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm



¿Se acuerdan de aquellas vacaciones haciendo el trabajo de “*Los Presidentes*” que me dejaron en la primaria? Si me pidieran describir de manera sencilla todo lo que tuvo que suceder para que este proyecto concluyera, simplemente les haría la pregunta anterior.

Por estar conmigo al igual que aquella vez, por todo el apoyo y confianza que me han brindado, porque gracias a ello soy quien soy, la misma niña exigente consigo misma tratando de ser mejor cada día; este trabajo es por y para ustedes a quienes amo incondicionalmente...

...gracias papás!!!

Por todo el apoyo y los “paros” que me hicieron durante este camino, porque aun cuando casi no las veo desde que me subí a este barco, siempre están en mi corazón; porque confiaron plenamente en que podría con el paquete de “ser el ejemplo” de sus hijos, mis niños que tanto adoro...

...gracias hermanas.

Por haberme dado la oportunidad de conocerte y terminar juntos lo que empezamos juntos; porque este proyecto costó mucho tiempo, esfuerzo y lágrimas también; porque en ti encontré un gran compañero y amigo...

...gracias Aarón.

Por ser y por estar; porque ante todo eres mi “muy mejor amigo”...

...gracias “Compañero”.

Por la amistad, las enseñanzas de Química analítica y de vida que nos compartiste...

...gracias Gaby.

Atte. Daphne



---

Bueno... ha llegado el momento de concluir una de las etapas más importantes en mi vida por tal motivo agradezco:

#### **A MIS PADRES**

Por todo el apoyo brindado en toda etapa de mi vida, por haber hecho el esfuerzo de sacarnos adelante, porque sin ustedes no habría logrado llegar hasta este momento, por todas esas lecciones que aprendí y me quedan por aprender junto a ustedes pero sobre todo por haberme dado la vida, No hay palabras que describan lo agradecido y feliz que me siento de tenerlos como padres.

#### **A MI HERMANA**

Que durante todo este tiempo me ha aguantado el mal carácter, por ser cómplice, por mostrarme que a pesar de las típicas peleas siempre cuento con ella, por las ocasiones en que sin saberlo me ha dado grandes lecciones, por eso te digo que siempre contaras conmigo he!..... esperando haber sido un ejemplo para tí!

#### **A MI FAMILIA**

Por haber creído siempre en mí y haberme apoyado e impulsado en todo momento.

..... ! LOS AMO !

#### **A MIS AMIGOS**

A todos aquellos que me han brindado su amistad y apoyo sincero GRACIAS por haberme dejado compartir los buenos y malos momentos, por las palabras de ánimo cuando fueron necesarias, por soportarme (que supongo en ocasiones es complicado), esperando haber correspondido al menos un poco de toda aquello que me brindaron y seguirán brindando (espero), deseando que me permitan seguir acumulando muchas mas vivencias junto a ustedes...



### A GABY

Por haberme soportado tanto tiempo en el laboratorio, por todo el apoyo y palabras que nos compartiste, por no solo haber sido mi asesora sino también mi "gurú" y sobre todo la amistad brindada, gracias por toda esa confianza que depositaste en nosotros para realizar este trabajo, reitero... GRACIAS.

### A la Dra. ALMA REVILLA

Por todas esas asesorías y consejos durante mi estancia en el laboratorio... muchas gracias.

### A DAPHNE

Por haber compartido conmigo esta hazaña y todo lo que conllevó (y mira que fue mucho), por el haberme permitido conocerte y la amistad que me brindaste.

### A LOS SINODALES

Q.F.B. Elía Granados, Q.F.B. Martha Patricia Zuñiga, M.C. Víctor Abrego y Q.F.B. Jose Antonio Garduño, ya que gracias a sus comentarios y observaciones fue posible la mejora de este trabajo.

Atte. Aarón

GRACIAS TOTALES!.....

GUSTAVO CERATI



---

## **AGRADECIMIENTOS**

AL PROYECTO PAPIIT IN228009 DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL  
PERSONAL ACADÉMICO UNAM, POR LOS RECURSOS FINANCIEROS PARA LA  
REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.



## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS PARTICULARES .....	6
<b>I. GENERALIDADES.....</b>	<b>7</b>
<b>1. LECHE.....</b>	<b>8</b>
1.1 LA LECHE Y SU IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	8
1.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE .....	8
1.2.1 Carbohidratos .....	9
1.2.2 Lípidos.....	10
1.2.3 Proteínas .....	12
1.2.4 Agua .....	13
1.2.5 Componentes minoritarios .....	14
1.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA LECHE .....	15
1.4 CONTAMINANTES DE LA LECHE.....	16
1.4.1 Antibióticos como contaminantes.....	17
1.4.2 Límites permisibles de antibióticos.....	17
<b>2. ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 CLASIFICACIÓN Y PROPIEDADES .....	21
2.1.1 $\beta$ -Lactámicos .....	21
2.1.2 Tetraciclinas.....	24
2.1.3 Macrólidos .....	25
2.1.4 Enrofloxacina.....	26
2.1.5 Trimetoprim.....	27
2.1.6 Cloranfenicol.....	28
2.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS FÁRMACOS DE IMPORTANCIA EN ESTE PROYECTO	28
<b>3. ELECTROFORESIS CAPILAR.....</b>	<b>30</b>
3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	30
3.2 DEFINICIÓN Y PRINCIPIOS DE LA TÉCNICA .....	32
3.2.1 Movilidad electroforética, movilidad aparente y velocidad de migración .....	33
3.2.2 Flujo electroosmótico (FEO).....	36



3.3	INSTRUMENTO.....	38
3.3.1	<i>Detector</i> .....	40
3.3.2	<i>Inyección de la muestra</i> .....	40
3.4	MODOS DE SEPARACIÓN POR EC.....	41
3.4.1	<i>Electroforesis capilar de zona</i> .....	41
3.5	APLICACIONES .....	45
<b>II.</b>	<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>48</b>
4.1	MATERIAL .....	48
4.2	EQUIPOS.....	48
4.3	REACTIVOS .....	48
4.4	ESTRATEGIA GENERAL PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROFORÉTICO .....	49
4.4.1	<i>Preacondicionamiento del capilar</i> .....	50
4.4.2	<i>Lavado del capilar</i> .....	50
4.4.3	<i>Preparación de soluciones</i> .....	51
4.4.4	<i>Tratamiento de la muestra</i> .....	52
4.4.5	<i>Desarrollo del proceso electroforético</i> .....	53
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>5.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA SEPARACIÓN DE 14 ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>56</b>
5.1	ESTUDIO DE LAS CONDICIONES INSTRUMENTALES .....	57
5.1.1	<i>Influencia de la longitud del capilar</i> .....	58
5.2	ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LA TÉCNICA.....	59
5.2.1	<i>Influencia de la fuerza iónica del búfer</i> .....	60
5.2.2	<i>Influencia del pH del búfer</i> .....	61
5.2.3	<i>Influencia de la concentración de aditivos (HP <math>\alpha</math>-CD y <math>\alpha</math>-CD)</i> .....	63
5.3	BÚSQUEDA DE UN ESTÁNDAR INTERNO (EI).....	67
<b>6.</b>	<b>PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE LECHE ENTERA DE VACA.....</b>	<b>70</b>
6.1	ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	70
6.2	METODOLOGÍA DE PRECONCENTRACIÓN.....	72
6.2.1	<i>Interacción analito-matriz bajo condiciones de preconcentración</i> .....	74
6.2.2	<i>Medio de reconstitución</i> .....	76
6.2.3	<i>Efecto de la temperatura sobre el proceso de preconcentración</i> .....	78
6.3	EXTRACCIÓN LÍQUIDO/LÍQUIDO .....	80
6.3.1	<i>Extracción Selectiva</i> .....	82
6.3.2	<i>Extracción sucesiva</i> .....	85
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES Y REFERENCIAS .....</b>	<b>89</b>



---

---

<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>90</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>93</b>
<b>V. ANEXOS</b> .....	<b>97</b>
ANEXO 1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA LECHE EN MÉXICO .....	98
ANEXO 2. ELECTROFEROGRAMA DE CORRIDAS DE IDENTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS INDIVIDUALMENTE. CONDICIONES COMO EN LA FIGURA 30.....	103
ANEXO 3. DIAGRAMAS DE ZONAS DE PREDOMINIO DE LOS ANTIBIÓTICOS DE INTERÉS PARA EL PROYECTO.....	106



---

## RESUMEN

En México y el mundo, la leche es un fluido excretado por los mamíferos, cuyo aprovechamiento tiene un gran impacto económico y alimenticio para el ser humano. La obtenida del ganado bovino es la más aprovechada, por lo cual la industria ganadera es un sector muy importante para su producción, así como de una infinidad de derivados de éstos (yogurt, queso, mantequilla), consumidos diariamente por el hombre.

En ocasiones, el ganado bovino sufre enfermedades de origen bacteriano. Una de las más comunes es la mastitis. Este padecimiento consiste en la inflamación de las glándulas mamarias y sus tejidos secretores, por lo cual es necesario implementar tratamientos antimicrobianos (tanto en terapias simples como combinadas), para inhibir el crecimiento de agentes microbiológicos y garantizar la salud de los animales. Sin embargo, la ausencia de un especialista que prescriba y monitoree dicho tratamiento, puede concluir en la contaminación de la leche por antibióticos, generando repercusiones económicas tanto en la industria como en la salud pública.

Debido a que los antimicrobianos son eliminados por fluidos biológicos, es importante tener medidas de seguridad que garanticen la calidad de la leche y el cumplimiento con los límites permisibles reportados en las normas internacionales, para no comprometer la salud de los consumidores por resistencia a antibióticos.

Actualmente, la detección de residuos de antibióticos se realiza en su mayoría mediante pruebas cualitativas y, aunque existen pruebas analíticas que permiten hacer análisis cuantitativos, tienen como limitación que no se pueden detectar diferentes grupos de antibióticos simultáneamente.



En este trabajo experimental, se expondrá la primer fase del proyecto, la cual consiste en el desarrollo y optimización de un método para el análisis de una mezcla de los 14 antibióticos más utilizados en ganado vacuno, así como el tratamiento y concentración de muestra para ser aplicado a la determinación cuantitativa de dichos analitos en leche de vaca, ya que los procedimientos utilizados actualmente (p.e. inmunoensayos), simplemente permiten realizar determinaciones cualitativas o semi cuantitativas o bien, existen reportes de métodos que permiten cuantificar ciertos antibióticos por familias específicas, limitando su aplicación.



---

## INTRODUCCIÓN

La industria ganadera es un sector muy importante para la producción de insumos básicos de consumo humano, como los derivados lácteos. La leche es un alimento de importancia nutricional, así como también de gran relevancia a nivel ganadero e industrial en México y el mundo. Por tal motivo, es necesario implementar medidas de seguridad que garanticen la salud del ganado y consecuentemente la calidad de los productos obtenidos de esta actividad.

Entre los padecimientos del ganado causados por microorganismos se encuentran la neumonía, tuberculosis, brucelosis, entre otras, sin embargo, uno de los más comunes es la mastitis. Dicha enfermedad consiste en la inflamación de las glándulas mamarias, provocando alteraciones en la composición y cantidad de la leche excretada por los animales, además de elevar la carga bacteriana y afectar al animal, **(Gasque, 2008)**.

Para dar tratamiento a ésta y demás afecciones es común el uso de antibióticos (como las penicilinas y tetraciclinas), cuya terapia depende del agente infeccioso presente, por ejemplo, el género *Streptococo sp* es tratado principalmente con ampicilina de forma efectiva. Para la mayor parte de los microorganismos patógenos para el ganado bovino, se emplean algunas tetraciclinas, así como la espiramicina y eritromicina, **(Alais, 1971)**. Sin embargo, una consecuencia de dicho tratamiento es la presencia de residuos (trazas) en la leche, ya que dependiendo de sus características fisicoquímicas y farmacológicas, es posible encontrarlos a cierta concentración, la cual puede impedir el uso normal debido a que afecta los procesos industriales tales como fermentaciones lácticas.

La leche es un líquido constituido por el 87% de agua y el 13% de materia seca, de la cual, 4.2% son grasa. El resto, que son sólidos no grasos, está dividido en lactosa (47%), proteína (3.3%), sustancias minerales (0.65%) y ácidos orgánicos (0.18%). Algunas causas de la presencia de antibióticos en ella son el uso desmedido sin prescripción médica, así como el incumplimiento del periodo requerido de descanso del animal para su extracción libre de residuos, posterior a la administración de agentes antibacteriales.



---

La presencia de cantidades mínimas de antimicrobianos, afecta a la industria de los lácteos (como son los quesos y yogurt), ya que se inhibe el crecimiento de los microorganismos responsables de la producción de dichos derivados. Por otro lado, la salud de los consumidores también se puede ver afectada, ya que hay individuos altamente sensibles a algunos antibióticos, cuyo contacto con estos podría derivar en reacciones físicas como irritaciones, comezón, asma o hasta un shock anafiláctico, **(Zubeldia, 2012)**.

Entre las metodologías para evidenciar la presencia de antibióticos en leche, se encuentran las pruebas microbiológicas, las cuales requieren un tiempo prolongado para obtener resultados, debido al largo tiempo de incubación, la necesidad de cepas de microorganismos estandarizadas y es común la presencia de falsos positivos o falsos negativos. También se encuentran algunas técnicas inmunológicas como radioinmunoensayos competitivos, por ejemplo el CharmII<sup>TM</sup> y Penzime<sup>TM</sup>, donde el test detecta varias de éstas moléculas, que a pesar de presentar mejoras con respecto a los inmunoensayos en disco (técnica comúnmente usada), tienen como inconveniente el uso de material radioactivo, **(Varnam, 1995)**. Sin embargo, aun cuando el empleo de estos procedimientos aporta valores útiles, son sólo de carácter cualitativo y presuntivo, lo cual solo las hace útiles para el monitoreo (screening) del antibiótico de interés.

Es por ello que la implementación de técnicas analíticas modernas, como cromatografía de líquidos (HPLC), cromatografía de gases (CG), biosensores (BS), electroforesis capilar (EC), ha facilitado el control de calidad de la leche, tanto para la identificación como para la cuantificación de adulterantes y contaminantes dentro de especificaciones de normas nacionales (NOM-184-SSA1-2002), e internacionales (EEC-1999). Sin embargo, en el caso de la detección de antibióticos, los métodos han sido diseñados para determinar moléculas específicas o fármacos por familia, limitando el uso y haciendo poco rentable los análisis de este tipo.

Dentro de las técnicas de separación está la Electroforesis Capilar (EC), la cual se ha popularizado debido a las ventajas que ofrece en términos de rapidez, bajo costo, alta eficiencia, sensibilidad y poca generación de residuos tóxicos. En estos análisis, las moléculas



---

ionizadas son separadas por la diferencia de movilidad que presentan cuando se encuentran bajo un campo eléctrico, el cual es generado dentro de un capilar al aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos (un ánodo de carga positiva y un cátodo de carga negativa), que se encuentran en los extremos inmersos y el interior lleno de electrolito soporte.

Dado que las paredes de la columna capilar presentan cargas negativas por la presencia de grupos silanol ionizados, se genera un flujo electroosmótico (FEO) hacia el cátodo debido a la migración de la gran cantidad de contraiones aportados por el búfer. Bajo estas condiciones, los analitos de carga positiva son atraídos hacia el cátodo y los de carga negativa hacia el ánodo, sin embargo todas las moléculas son arrastradas por el FEO, cuya fuerza es muy alta a pH alcalinos, pasando a diferentes tiempos a través del detector.

Finalmente y una vez estudiadas las ventajas de la EC como técnica de separación y cuantificación, este proyecto tiene como objetivo el desarrollo e implementación de un método que permita, tanto identificar como cuantificar 14 de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de las enfermedades del ganado bovino, en muestras de leche bronca, sin limitarse a una sola familia.

Lo anterior, pretende dar pauta a la implementación de dicho método en el análisis rutinario de leche en la industria, permitiendo cuantificar y cumplir los límites con referencia de otros países, o bien, establecerlos de acuerdo a los resultados correspondientes a México.



---

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Desarrollar un método para el monitoreo de los 14 antibióticos más utilizados<sup>1</sup> en bovinos, que puedan estar presentes como contaminantes en leche, empleando la técnica de electroforesis capilar, para su futura aplicación en el análisis rutinario de la calidad de ésta y así contribuir con una metodología única y económica, cuya implementación beneficie a la industria de los lácteos y sus fermentados.

### Objetivos Particulares

- Seleccionar las condiciones experimentales ideales de pH, tipo y concentración del búfer, concentración de los aditivos  $\alpha$ -ciclodextrina e hidroxipropil (HP)  $\alpha$ -ciclodextrina, además de la longitud del capilar, en la separación de 14 analitos, con la finalidad de optimizar la resolución entre las señales y el tiempo de análisis.
- Seleccionar un estándar interno para minimizar la variabilidad de los resultados en la determinación de antibióticos, en una matriz compleja como lo es la leche.
- Realizar el estudio del pretratamiento de las muestras de leche de vaca, para disminuir las señales interferentes de la matriz, en la cuantificación de antibióticos como contaminantes y de ésta forma, comprobar la selectividad del método.
- Desarrollar una técnica de concentración para la muestra de leche pretratada de vaca, que no sólo permita la identificación de los antibióticos de interés, sino también su cuantificación en concentraciones reportadas por las normas internacionales.

<sup>1</sup> Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina, Cloranfenicol, Clortetraciclina, Dicloxacilina, Enrofloxacin, Espiramicina, Oxacilina, Oxitetraciclina, Penicilina G, Tetraciclina, Tilosina, Trimetoprim.



## **I. GENERALIDADES**



---

## 1. LECHE

### 1.1 La leche y su importancia económica

La leche es un fluido característico producido y excretado por muchos mamíferos, y utilizado como alimento básico para las crías recién nacidas y durante las primeras etapas de su vida. Es un producto muy completo de alto valor nutrimental que aporta proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales; es importante mencionar que los tres primeros componentes son los causantes del color, sabor y olor característico, así como de las propiedades fisicoquímicas, (**Mazza, 2000**).

La leche de vaca y sus derivados son alimentos de carácter fundamental para la dieta básica de gran parte de la población, ya que resulta ser, al igual que muchos otros alimentos, de una importancia indiscutible en la alimentación y desarrollo de niños, adultos y personas de la 3ª edad.

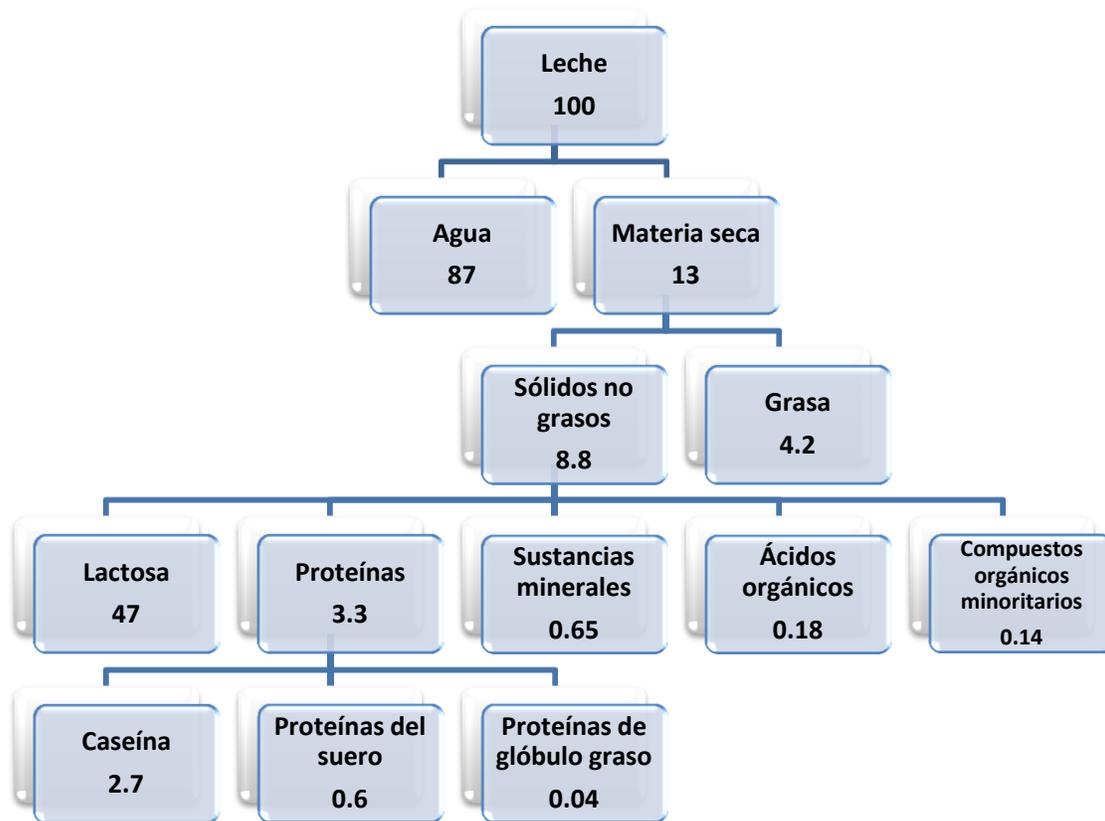
En México el consumo de leche se ha incrementado, alcanzando la ingesta per cápita hasta 124 litros (L) al año, lo cual continúa por debajo de las recomendaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), que es de 188 L por año. A pesar de que en el país el consumo no es proporcional a la producción, ésta también ha crecido (principalmente en los últimos diez años), llegando a un aproximado de 98 L por cada mexicano anualmente, generando una derrama económica importante así como el aporte de 83,550 empleos directos, (**Ver Anexo 1**).

### 1.2 Composición de la leche

Dado que la leche es un producto natural, al igual que muchos otros alimentos tiene como característica, el hecho de que su composición es extremadamente compleja. Es conocida ampliamente por la homogeneidad tanto física como química entre sus componentes, así como por las variaciones de estos entre especies y razas diferentes de animales.



Este fluido está conformado por tres grupos principales de moléculas: carbohidratos, grasas y proteínas, sin dejar de lado a otros que a pesar de estar presentes en menor cantidad tienen importancia, tales como sales minerales, vitaminas, hormonas, enzimas, algunas células, sólidos no grasos, microorganismos, sustancias inhibidoras, etc. En la **Figura 1** se observa un esquema de la composición general de la leche.



*Figura 1. Composición general promedio de la leche expresada en porcentaje con respecto al total de una muestra*

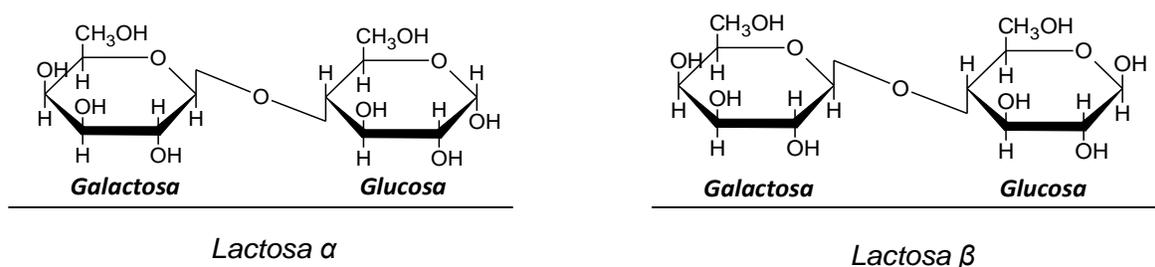
## 1.2.1 Carbohidratos

### 1.2.1.1 Lactosa

El principal carbohidrato presente en la leche es la lactosa; es el componente más simple, constante en proporción y existe en cantidad importante en la leche de todas las especies. Se debe a esta molécula el ligero sabor dulce característico, además de ser la principal fuente de energía necesaria para los neonatos de los mamíferos, (Thompson, 2009).



La lactosa es un disacárido reductor, compuesto por galactosa y glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -O-glicosídico. Se clasifica como una hexobiosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) con un peso molecular de 342 g/mol y existe bajo dos formas isoméricas, la  $\alpha$  y  $\beta$  lactosa, cuya diferencia radica simplemente en la posición de un grupo hidroxilo en la glucosa. Son caracterizadas sólo por propiedades físicas como rotación, temperatura de fusión, cristalización y solubilidad. En la **Figura 2**, se muestran ambos isómeros cuyas propiedades organolépticas (como el sabor), no difieren entre ellas.



**Figura 2. Estructura básica de la lactosa formada por los monosacáridos galactosa y glucosa**

Se sabe que la leche es la única fuente conocida de lactosa, por lo cual se parte del suero para su extracción, obteniéndose de un 95 a 98% de forma bruta. Tras un proceso de purificación se puede llegar a purezas elevadas con gran importancia tecnológica, (Alais, 1987). La  $\alpha$ -lactosa se encuentra en la leche con purezas de hasta el 99.4%, razón por la cual se puede emplear en la industria farmacéutica como excipiente para la formulación de tabletas. También se puede utilizar sin problemas en la industria de los alimentos por las características de inocuidad, así como acarreador de esencias y saborizantes.

### 1.2.2 Lípidos

Los lípidos son moléculas también conocidas como aceites o grasas, que son líquidos o sólidos dependiendo de su temperatura de fusión. La cantidad de grasa que se encuentra en la leche, aporta a las crías la mayor cantidad de energía requerida para su desarrollo. Son mezclas químicas complejas que se encuentran distribuidas de forma homogénea en forma de pequeños glóbulos dispersos (emulsión). En la **Tabla 1**, se describen los compuestos lipídicos y sus porcentajes en la leche.



**Tabla 1. Constitución de la fracción lipídica de la leche**

<b>Compuestos lipídicos</b>	<b>Composición (%)</b>
Triglicéridos	96.0-99.0
Diglicéridos	0.30-1.60
Monoglicéridos	0.02-0.10
Fosfolípidos	0.20-1.00
Glicoesfingolípidos	0.01-0.07
Esteroles	0.20-0.40
Ácidos grasos libres	0.10-0.40

Los lípidos que componen la leche, son comúnmente clasificados en tres grupos:

- Lípidos neutros o grasas verdaderas.- A este grupo pertenecen los ácidos grasos mono, di y triglicéridos; los fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, entre otros.
- Lípidos polares.- Estos se presentan en menor cantidad y son un conjunto de ésteres ácidos de glicerol o esfingosina; algunas de estas sustancias son glucolípidos. Actúan en general como emulsificantes naturales que mantienen la estabilidad de la leche y algunos productos lácteos, (**Thompson, 2009**).
- Lípidos variados.- En este grupo se incluyen el colesterol, carotenos, lipoproteínas y las vitaminas liposolubles A, D, E y K, (**Shlimme, 2002**).

Los triglicéridos son los componentes mayoritarios dentro de las grasas de la leche. Estas moléculas son ésteres de glicerol y de ácidos grasos alifáticos compuestos con cadenas de 3–5 o 4–24 átomos de carbono respectivamente, que pueden encontrarse saturados o insaturados, lo cual les confiere características como el punto de fusión o algunas propiedades reológicas a la fracción grasa de la leche.

Los triglicéridos en conjunto con otras moléculas grasas como fosfolípidos, ácidos grasos y lipoproteínas, actúan como agentes emulsificantes naturales que aportan estabilidad a la emulsión formada por la fase grasa y el medio acuoso, (**Thompson, 2009**). El color blanco característico de la leche es en parte debido a los pequeños glóbulos suspendidos en ella.



### 1.2.3 Proteínas

Son moléculas nitrogenadas de peso elevado y gran complejidad en su estructura, se encuentran presentes en la leche aproximadamente en un 3.3%, siendo así que por cada litro de leche se puede encontrar entre 30 y 40 g de ellas, (Shlimme, 2002).

En la leche se encuentran dos tipos principales de proteínas: caseínas y las proteínas del lactosuero, las cuales son la fuente de aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento del estado nutricional del consumidor.

#### 1.2.3.1 Caseínas

Las caseínas mostradas en la **Tabla 2**, son fosfoproteínas sintetizadas exclusivamente en las células de la glándula mamaria, es así que no se encuentra ninguna sustancia parecida ni en sangre ni en tejidos, debido a ello no existe otra fuente de dicha proteína más que la leche, la cual es una dispersión coloidal de micelas de éstas proteínas y los lípidos antes descritos.

**Tabla 2. Caseína total\***

<b>Tipos</b>	<b>% respecto a caseína total</b>
$\alpha$ S1-Caseína	38
$\alpha$ S2-Caseína	10
$\beta$ -Caseína	36
$\gamma$ -Caseína	13
$\kappa$ -Caseína	3

\*Se denomina así al complejo proteico compuesto por varios tipos de caseínas

#### 1.2.3.2 Proteínas del suero

Suero de leche se llama a la solución que se obtiene tras la precipitación de las micelas de caseína y la sustracción de glóbulos grasos. Este líquido contiene a las proteínas del suero, que tienen la característica de permanecer solubles al eliminar la caseína total y se clasifican en dos fracciones, la denominada albúmina y las globulinas.



En conjunto son cinco distintos tipos de proteínas:  $\beta$ -Lactoglobulinas ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbúminas ( $\alpha$ -La), albúmina sérica bovina (seroalbúmina), inmunoglobulinas y lactoferrinas, cuyas proporciones se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Proteínas séricas**

<b>Fracción</b>	<b>Proteína</b>	<b>% referido a proteínas séricas totales</b>
Albúmina	$\beta$ -Lactoglobulina	56
	$\alpha$ -Lactalbúmina	21
	Seroalbúmina	7
Globulinas	Inmunoglobulinas	14
	Lactoferrina	2

Entre sus funciones se encuentra el aporte de protección inmunológica al neonato, fungen también como tensoactivos en la formación de micelas, glóbulos grasos y proteicos, también actúan como proteínas de transporte dentro del organismo, sin embargo, la característica básica es el aporte nutricional. Éstas moléculas se pueden encontrar en cantidades pequeñas o a niveles de trazas, (**Dalgleish, 1992**).

#### 1.2.4 Agua

Es el constituyente mayoritario de la leche y soporte de todos los demás componentes; se pueden encontrar dos tipos:

- Agua libre.- Es la mayor parte del agua contenida en la leche, actuando como disolvente de la lactosa y los minerales; es independiente de las sustancias insolubles.
- Agua ligada.- Controla las velocidades de algunas reacciones y procesos, por ejemplo, el control del obscurecimiento causado por la reacción de Maillard, oxidación de lípidos, actividad enzimática, la presión osmótica causada por la concentración salina y crecimiento microbiológico, por tanto afecta la estabilidad de la leche y algunos productos lácteos, (**Thompson, 2009**).



## 1.2.5 Componentes minoritarios

### 1.2.5.1 Sales minerales

El contenido de sales en la leche corresponde tanto a las sustancias minerales como a los elementos traza, que son determinados bromatológicamente como cenizas. En la **Tabla 4**, se puede observar la composición promedio de éstas.

*Tabla 4. Composición de minerales en la leche\**

Componente salino	Gramos (g)	Elementos traza	Microgramos (µg)
Bicarbonato	0.2	Aluminio	350
Calcio	1.2	Cromo	10
Citrato	2	Hierro	300
Cloruro	1	Flúor	100
Potasio	1.5	Yodo	40
Magnesio	0.1	Cobalto	0.3
Sodio	0.5	Cobre	100
Fosfato	2.1	Manganeso	30
Sulfato	0.1	Molibdeno	60
		Níquel	25
		Selenio	10
		Silicio	800
		Zinc	4000

\* Las cantidades de minerales se expresan con respecto a 100 mL de muestra; (**Shlime, 2002**).

Algunos componentes minerales de la leche se pueden encontrar solubles o unidos a otros componentes dispersos, como las proteínas y lípidos. Su importancia fisiológica nutritiva es alta y los más conocidos popularmente son el calcio y el fósforo. Algunas funciones son el mantenimiento de la presión osmótica y la formación de especies químicas que proporcionan amortiguamiento ante ligeros cambios de pH, (**Shlimme, 2002**). Las cantidades de estos componentes son variables dependiendo de la zona geográfica en donde se encuentren los animales de ordeña.



### 1.2.5.2 Vitaminas

Las vitaminas presentes en la leche tienen gran importancia desde el punto de vista nutricional. Proceden del alimento así como del metabolismo del animal, por lo que las cantidades son variables dependiendo de factores como la salud del animal, dieta, raza, estado sanitario, entre otros, (Thompson, 2009).

*Tabla 5. Vitaminas presentes en la leche\**

Vitaminas			
Liposolubles		Hidrosolubles	
<b>A</b>	Retinol	<b>B<sub>1</sub></b>	Tiamina
<b>D</b>	Ergocalciferol	<b>B<sub>2</sub></b>	Riboflavina
<b>E</b>	Tocoferol	<b>B<sub>3</sub></b>	Nicotinamida
<b>K</b>	Fitoquinona	<b>B<sub>5</sub></b>	Ácido Pantotéico
	Menaquinona	<b>B<sub>6</sub></b>	Piridoxina
		<b>B<sub>7</sub></b>	Biotina
		<b>B<sub>9</sub></b>	Ácido Fólico
		<b>B<sub>12</sub></b>	Cobalamina
		<b>C</b>	Ácido Ascórbico

\*Se aprecia que se ordenan según la solubilidad, (Schlime, 2002)

La mayoría de las vitaminas necesarias para satisfacer las necesidades nutricionales se encuentran en la leche, ya sea en la fase grasa o en la fase acuosa, según la naturaleza química de la molécula. Por ejemplo, se pueden mencionar algunas vitaminas de carácter hidrosoluble como la vitamina C, ácido fólico, así como el retinol de carácter liposoluble, (ver **Tabla 5**).

## 1.3 Propiedades físicas y químicas de la leche

La complejidad de la composición de la leche le provee algunos aspectos fisicoquímicos de importancia para su caracterización, tales como la coloración blanca característica; el pH que oscila entre 6.5 y 6.7; el punto de congelación (el cual puede variar dependiendo de la raza y estado de salud del animal), que puede ser un marcador importante



para determinar adulteración por adición de agua; el punto de ebullición el cual es aproximadamente  $0.16^{\circ}\text{C}$  más alto que el del agua; la densidad que va de 1.03 -1.033 a  $15^{\circ}\text{C}$ , el índice crioscópico, el índice de refracción, la acidez titulable, la materia grasa, los sólidos no grasos, microorganismos patógenos, la presencia de sustancias inhibidoras, etc., (Magariños, 2011).

En la **Tabla 6** se exponen algunos de los aspectos fisicoquímicos mencionados y sus valores normales, que son base para una caracterización inicial de la leche en la industria.

**Tabla 6. Aspectos fisicoquímicos principales**

<b>Propiedades Físicas</b>		<b>Valores</b>
Densidad	Leche entera	1.032
	Materia Grasa ( $15^{\circ}\text{C}$ $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0.94
pH		6.6-6.8
Punto de congelación		-0.55
Descenso crioscópico		$0.53\text{-}0.57^{\circ}\text{C}$
Índice de refracción		1.34-1.35
Viscosidad absoluta ( $15^{\circ}\text{C}$ )		.0212-.0354
Poder calórico por litro (cal)		700

#### **1.4 Contaminantes de la leche**

La leche en ocasiones suele contener otro tipo de componentes llamados contaminantes, que pueden encontrarse presentes en cantidades bajas. Éstos se pueden definir como productos químicos inexistentes en la leche de vaca bajo condiciones normales, (Walstra, 1987).

Pueden ser sustancias naturales provenientes de la alimentación como la aflatoxina B1, (NOM-184-SSA1-2002), pero principalmente son moléculas químicas manipuladas o elaboradas por el hombre como los plaguicidas, metales pesados, colorantes, fármacos, etcétera, que resultan ser perjudiciales para la leche, provocando alteraciones organolépticas y dificultades en procesos tecnológicos de los derivados, generando mermas económicas importantes.



---

### 1.4.1 Antibióticos como contaminantes

El ganado bovino suele ser susceptible a diversos padecimientos, derivados de malas prácticas de ganadería e instalaciones deficientes en cuidados sanitarios. La mayoría de estas afecciones son originadas por microorganismos tales como hongos, levaduras, bacterias gram positivas y negativas, que son causantes de enfermedades como la neumonía, mastitis y diarrea bacteriana, entre otras, **(Kantiani, 2009)**.

La lesión o infección del tejido mamario conocida como mastitis, es la de mayor presencia. La erradicación de los microorganismos causantes de este mal consiste en el tratamiento con antibióticos de distintas familias, como los  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas principalmente, también algunos macrólidos, aminoglicósidos, etc. Sin embargo, suelen emplearse tanto terapias simples como combinadas de éstos, comúnmente administradas por vía oral, intramuscular, tópica e intramamaria, **(Kantiani, 2009)**.

Los residuos de antibióticos en leche no sólo provocan pérdidas económicas importantes, sino que tienen gran impacto en el sector salud debido al riesgo de desencadenar en algunos individuos reacciones alérgicas y tóxicas, **(Kaale, 2008)**. La presencia de estos contaminantes puede indicar que el animal del cual se obtuvo tiene una infección severa o alguna deficiencia metabólica importante, **(Schenck, 1998)**.

Cabe mencionar que es responsabilidad de un médico veterinario la administración, vigilancia del cumplimiento de la terapia farmacológica y determinación de los tiempos de ordeño de los bovinos, sin embargo se sabe que, con el objetivo de evitar pérdidas monetarias, muchos productores no respetan el periodo de eliminación del fármaco recomendado por el médico, comercializando leche contaminada.

### 1.4.2 Límites permisibles de antibióticos

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), los principales problemas en el humano al consumir leche contaminada por antibióticos, son las reacciones o cuadros alérgicos sobre



---

algunos individuos sensibilizados, (**Koesukwiwat, 2007**). Otros padecimientos que pueden provocar son la alteración de flora gastrointestinal, estimulación de resistencia bacteriana, desarrollo de microorganismos patógenos no sensibles a antibióticos y reducción de síntesis de vitaminas en el individuo.

Algunas instituciones de salud como las de Estados Unidos (U.S.A), Reino Unido (U.K.) y la Unión Europea (U.E.), han establecido regulaciones estrictas sobre los límites máximos permisibles de los antibióticos, fundamentándose en la dosis máxima de sustancia que se considera generalmente segura, basados en los casos conocidos en su territorio sobre individuos con afecciones derivadas de la ingesta de antibióticos, (**Kantiani 2009; Ramírez, 2003**). En la **Tabla 7**, se pueden observar los límites permisibles de los antibióticos de interés para este proyecto en leche de vaca, propuestos en algunos países (México no aplica).



*Tabla 7. Tabla de límites permisibles de antibióticos en leche bovina\**

<b>Clasificación</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>LMR** (µg/L)</b>
<b>B-Lactámicos</b>	Ampicilina	50
	Penicilina G	4
	Amoxicilina	4
	Dicloxacilina	30
	Oxacilina	30
	Cefalexina	100
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	100
	Oxitetraciclina	30-100
	Clortetraciclina	80
<b>Sulfonamida***</b>	Trimetoprim	100
<b>Macrólidos</b>	Tilosina	50
	Espiramicina	40
<b>Anfenícoles</b>	Cloranfenicol	0 (Ausencia total)
<b>Quinolona</b>	Enrofloxacina	100

\* Basada en regulaciones establecidas por diversas naciones U.S.A., R.U., U.E, Brasil y Japón.

\*\* Límites mínimos de residuos (MLR siglas en inglés).

\*\*\* Clasificado como sulfonamida por el uso frecuente en combinación con antibióticos de este grupo, (Florez, 2003).



---

## 2. ANTIBIÓTICOS

Los antimicrobianos, mejor conocidos como antibióticos, son moléculas derivadas del metabolismo de algunos microorganismos (principalmente hongos), empleadas para combatir infecciones causadas en su mayoría por bacterias. El descubrimiento que dio inicio a la edad de oro de la antibioticoterapia, fue el de la penicilina y su implementación. En 1929 Fleming y en 1940 Florey, Chain y colaboradores, demostraron y publicaron un informe acerca de la potencia y la posibilidad de extracción de los sobrenadantes del cultivo del hongo *Penicillium notatum*, **(Seija, Vignoli; 2008)**.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacológico, que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, **(Seija, Vignoli; 2008)**. Poseen la capacidad de inducir la muerte o detención del crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas, con toxicidad baja o nula para los hospederos. Este concepto también puede ser extendido a algunas otras moléculas con la misma actividad antimicrobiana, obtenidas por procesos de semisíntesis y síntesis química, **(Bryskier, 2005)**.

Existen dos alternativas para clasificar la acción de un antibiótico sobre los agentes patógenos:

- Bactericidas: cuando causan la muerte por destrucción o lisis del patógeno responsable del proceso infeccioso.
- Bacteriostático: disminuye el crecimiento y reproducción del microorganismo, pero permanece de forma viable; la eliminación total del agente infeccioso corresponde al propio sistema inmune del huésped, por lo tanto, de ser suspendido el tratamiento antimicrobiano podría derivar en la reaparición de la infección, **(Florez, 2004)**.

La actividad de un antibiótico se define por el espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de agentes patógenos que resultan afectados por acción de dicho fármaco. En la



actualidad, una gran parte de los antimicrobianos actúan sobre varios microorganismos por diferentes mecanismos como:

- i. Inhibición de síntesis de pared celular.
- ii. Desorganización de membrana citoplasmática.
- iii. Inhibición de síntesis de proteínas.
- iv. Interferencia en síntesis de ácidos nucleicos.
- v. Bloqueo de síntesis de ácido fólico, interfiriendo con el crecimiento.

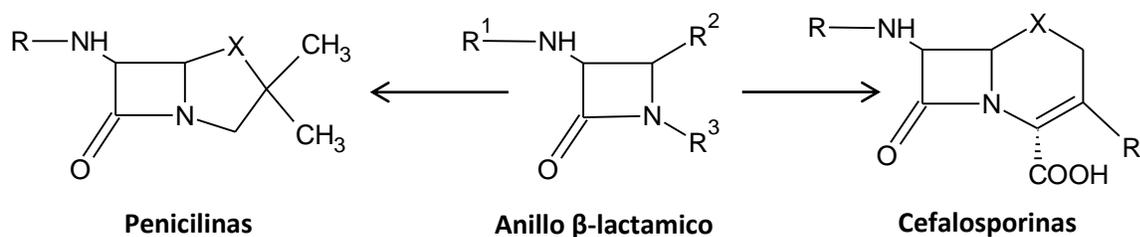
## 2.1 Clasificación y propiedades

Una forma de clasificación de los antibióticos es por las similitudes estructurales entre las moléculas, lo cual aporta características fisicoquímicas específicas a cada fármaco y su grupo o familia. También los mecanismos de acción sobre los microorganismos son caracterizados en parte por su conformación.

### 2.1.1 $\beta$ -Lactámicos

Bajo esta denominación se engloba a las penicilinas y cefalosporinas, moléculas cuya investigación continúa desde el descubrimiento de los hongos *Penicillium sp.* y *Cephalosporium sp* por Fleming y Boutz respectivamente. Dichos antibióticos tienen en común el anillo  $\beta$ -lactámico, el cual se muestra en la **Figura 4**; ésta estructura está unida a un anillo tiazólico en las penicilinas y a un anillo dihidrotiazina en las cefalosporinas, y por otra parte a una cadena lateral, cuyas variantes permiten obtener distintas moléculas con características o cualidades diferentes, (**Bergoglio, 1993**).

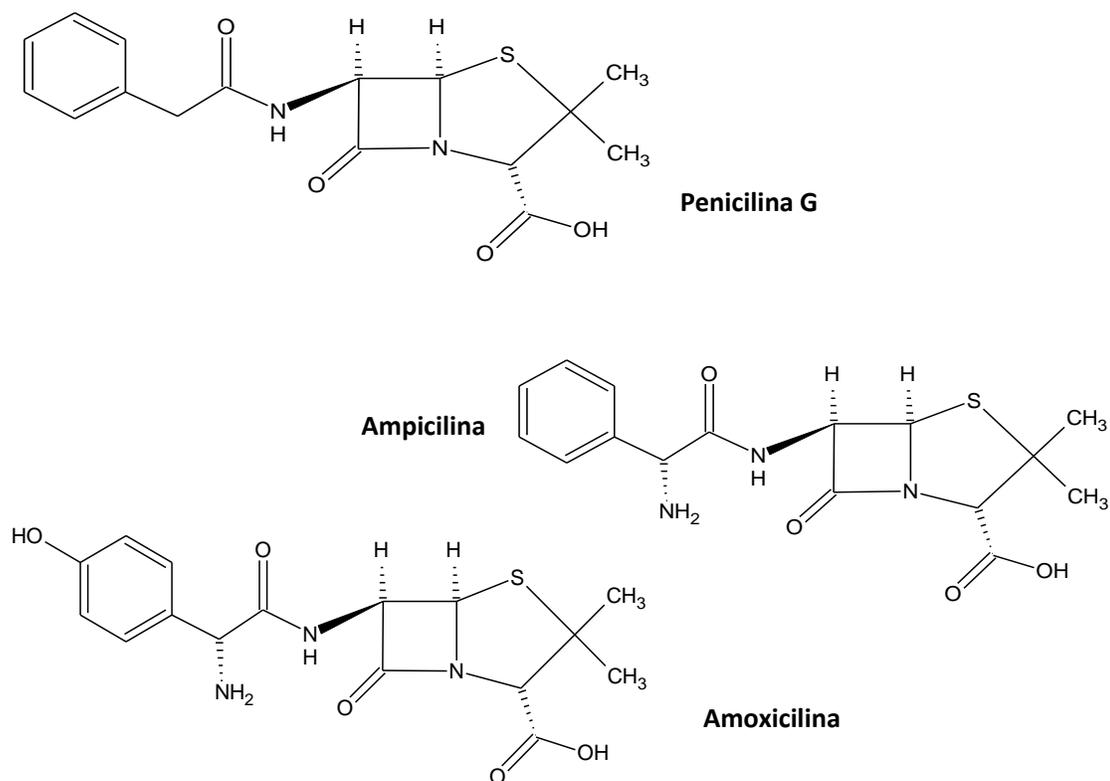
La importancia de estos fármacos en la terapia anti-infecciosa y profiláctica, hace que sean los principales en el uso clínico, debido al amplio espectro de acción sobre los microorganismos, (**Florez, 2004; Kennedy, 1998**).



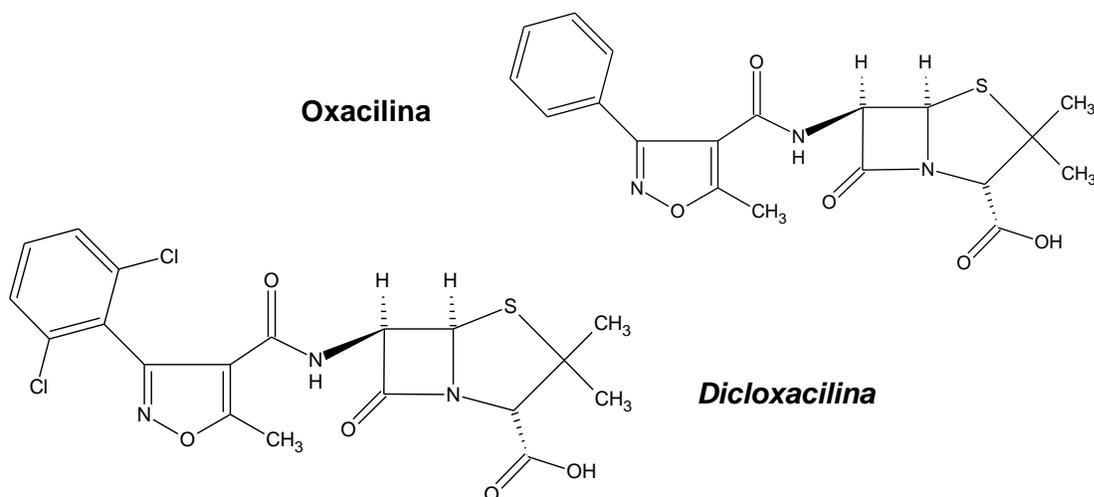
**Figura 3. Estructuras básicas de las penicilinas y cefalosporinas**

### 2.1.1.1 Penicilinas

Son un grupo de antibióticos de origen natural (producidos por diferentes especies de *Penicillium spp*), aunque también los hay semisintéticos. Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición seis del anillo; los cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacológicas, (Vignoli, 2002).



**Figura 4. Penicilinas de importancia en el estudio**

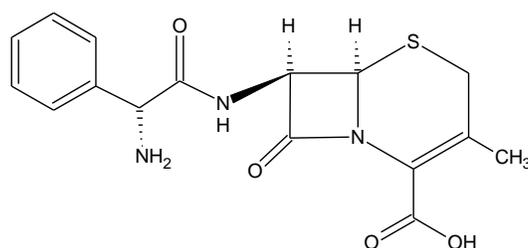


**Figura 4. Penicilinas de importancia en el estudio (Continuación)**

### 2.1.1.2 Cefalosporinas

Son productos de origen natural, algunos derivados de productos de fermentación por *Cephalosporium acremonium*. Las modificaciones en las estructuras moleculares están asociadas con la alteración en su actividad, tanto antibacteriana como farmacológica.

Existe una clasificación de las cefalosporinas por familias según su orden histórico de aparición: 1°, 2°, 3° y 4° generación; la molécula de interés en este trabajo pertenece a la 1°, (**Bergoglio, 1993**). La estructura básica o núcleo es conocido también como ácido 7-aminocefalosporínico, el cual las diferencia de las penicilinas.

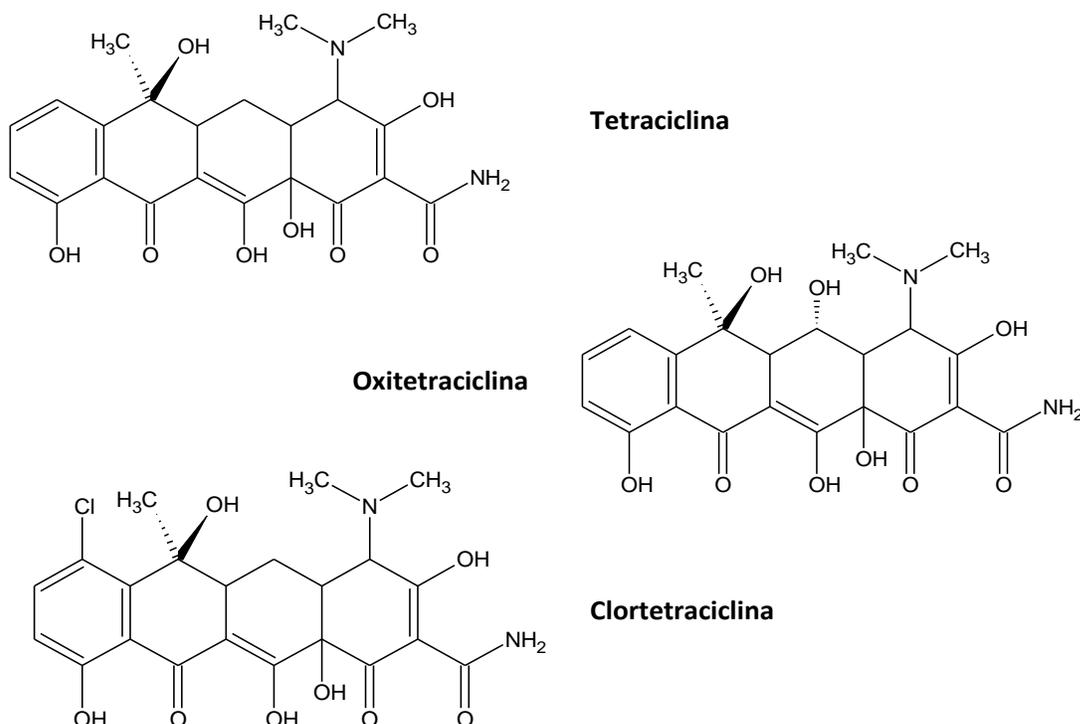


**Figura 5. Estructura de Cefalosporina**



## 2.1.2 Tetraciclinas

Forman una de las familias de antibióticos más antiguas, el primer fármaco descrito fue la clortetraciclina, seguida de la oxitetraciclina, moléculas extraídas de la fermentación realizada por *Streptomyces spp.*, (Kennedy, 1998). Son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. La actividad antimicrobiana de la mayor parte de las tetraciclinas es similar; se emplean de forma rutinaria en el tratamiento y prevención de enfermedades en bovinos, casi de forma similar a los  $\beta$ -lactámicos, (Cinquina, 2003; Vera-Candicioti, 2010).



**Figura 6.** Tetraciclinas de mayor frecuencia de administración en los bovinos

Las tetraciclinas están formadas por una estructura policíclica compleja derivada del perhidrofenantraceno, con distintas variaciones en sus sustituyentes, los cuales les aportan distintas características fisicoquímicas. En su forma libre son sustancias anfotéricas cristalinas de baja solubilidad, que forman cristales ácidos y básicos. (Bryskier, 2005).

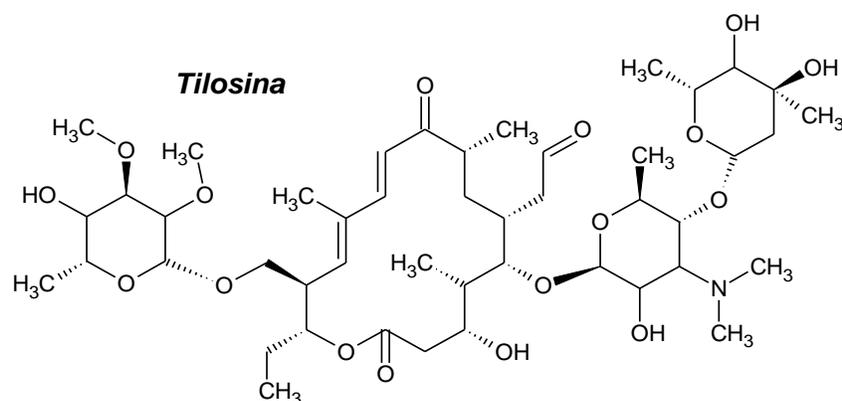


Usualmente están disponibles como clorhidratos, característica que les proporciona una mayor solubilidad, la cual se ve influenciada por la polaridad de los distintos grupos funcionales presentes en su estructura (como los grupos hidroxilo). Los aspectos farmacológicos son también dependientes de los sustituyentes presentes en estos fármacos, **(Katzung, 2010)**.

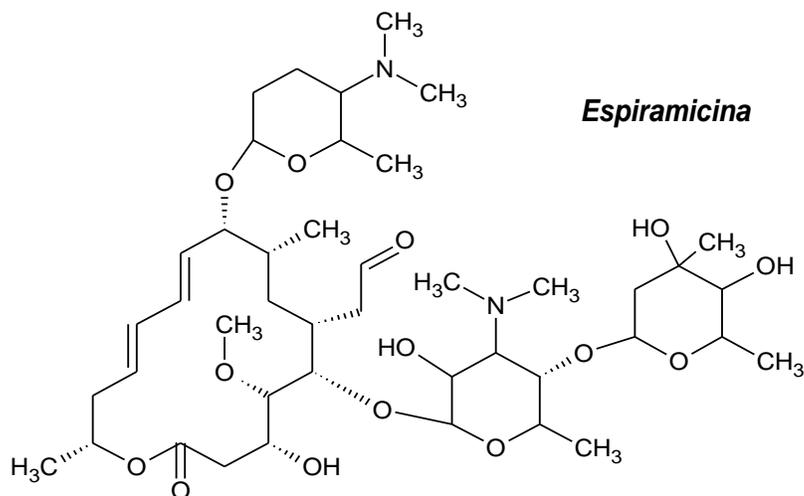
### 2.1.3 Macrólidos

Son antibióticos macrocíclicos caracterizados por el anillo de lactona que contiene de 12 a 16 miembros, al cual se le unen deoxiazúcares o aminoácidos; también poseen una cantidad mínima de dobles enlaces. Estas moléculas presentan carácter hidrofóbico, **(Katzung, 2010)**, y no son productos de origen natural, más bien son obtenidos por vía sintética usando como precursor la eritromicina A.

Los macrólidos actúan en blancos intrabacteriales uniéndose a ribosomas bacterianos para inhibir la síntesis de proteínas, por tal motivo actúan como bacteriostáticos. Son muy efectivos contra bacterias gram positivas y son usados para el tratamiento de una gran cantidad de infecciones, **(Vera-Candioti, 2010)**.



**Figura 7. Macrólidos comúnmente administrados al ganado bovino**



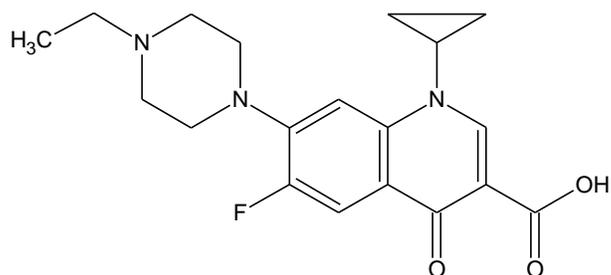
**Figura 7. Macrólidos comúnmente administrados al ganado bovino (Continuación)**

#### 2.1.4 Enrofloxacin

Pertenece a un grupo de antimicrobianos llamado quinolonas, que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un nitrógeno (N) en su conformación; son relativamente recientes, siendo ampliamente utilizados para combatir infecciones en humanos y animales. Técnicamente estos compuestos no son antibióticos debido a que no derivan de organismos vivos.

Cuentan con diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor; estos compuestos han derivado desde el ácido nalidíxico hasta quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas, **(Bryskier, 2005)**. La estructura química se basa en el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleina y sus mayores ventajas se deben a la incorporación de un átomo de flúor en posición seis y del grupo piperazínico heterocíclico en la siete, que aumentan su actividad antimicrobiana. En general las quinolonas son anfotéricas con baja solubilidad a pH neutro, **(Kennedy, 1998)**.

Son antibióticos bactericidas de amplio espectro que actúan inhibiendo la ADN-girasa, enzima que cataliza el súper enrollamiento del ADN cromosómico asegurando una adecuada división celular, **(Bryskier 2005; Kennedy, 1998)**.



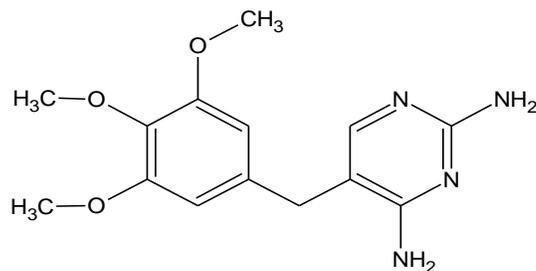
*Figura 8. Molécula de Enrofloxacin*

### 2.1.5 Trimetoprim

Se define como una 2-4-diaminopiridina, al inicio de su implementación como tratamiento era empleado a dosis consideradas como tóxicas, sin embargo, posteriormente se observó que se pueden obtener efectos farmacológicos de carácter sinérgico al ser administrado en conjunto con las sulfamidas, por lo que es comúnmente clasificado dentro de este grupo, **(Pereira 2005)**.

La acción sobre el crecimiento bacteriano está caracterizada por la inhibición de la síntesis de ácido fólico. Debido a esto, se produce un efecto bacteriostático en los microorganismos, aunque a su vez es clasificado como antibiótico de amplio espectro, **(Florez, 2004)**.

Es ampliamente usado no solo en bovinos, sino también en caprinos. Comúnmente se administra como tratamiento de enfermedades de vías respiratorias y otras como la mastitis.



*Figura 9. Configuración molecular de Trimetoprim*

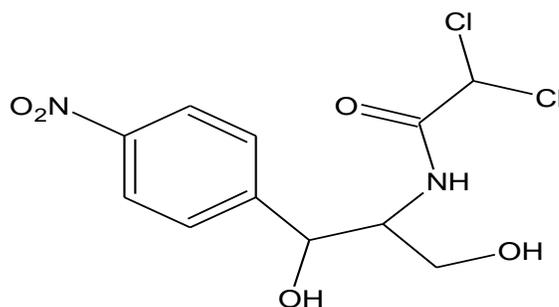


### 2.1.6 Cloranfenicol

Fenicoles o anfenicoles son las formas en que se conoce a la familia de antibióticos a la que pertenece el cloranfenicol y el tianfenicol. El primer compuesto fue aislado principalmente del *Streptomyces venezuelae* y posteriormente fue sintetizado, (Bryskier, 2005).

La molécula de cloranfenicol en su forma neutra es ligeramente soluble en agua, compuesta de tres unidades funcionales: el grupo nitro en posición para en el anillo bencénico, el grupo dicloroacetilo y un alcohol primario en el carbono tres de la cadena propanediol, (Bryskier, 2005).

Actúa fijándose a los ribosomas bacterianos impidiendo así la síntesis de proteínas, acción que puede también afectar a las células eucariotas, lo que justifica la alta toxicidad que presenta hacia el hospedero, (Florez, 2004). Se ha reportado que el uso de este antibiótico ya no resulta común a pesar de ser de amplio espectro, debido a ser posible causa de anemia aplásica en humanos y animales. Su uso actualmente es muy limitado a infecciones específicas como las oculares, (Vera-Candicioti, 2010; Kennedy 1998).



*Figura 10. Molécula de Cloranfenicol*

## 2.2 Propiedades fisicoquímicas de los fármacos de importancia en este proyecto

En la siguiente tabla se muestran los datos de Fórmula, Masa molecular, pka y Solubilidad, de los 14 antibióticos de importancia en el proyecto.

**Tabla 8. Propiedades de los diferentes antibióticos a analizar en el proyecto**

Antibiótico	Fórmula	Masa molecular <sup>A</sup> (g/mol)	pKa's <sup>A</sup>	Solubilidad en agua <sup>B</sup> (a 25°C)
<b>Penicilina G</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	334.4	2.75	Soluble
<b>Ampicilina</b>	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	349.41	2.53, 6.95	Moderadamente soluble
<b>Amoxicilina</b>	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	365.41	2.67, 7.11	Soluble
<b>Dicloxacilina</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	470.33	2.67	Soluble
<b>Oxacilina</b>	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	401.44	2.72	Soluble
<b>Cefalexina</b>	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	347.39	5.3, 7.3	Soluble
<b>Tetraciclina</b>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	444.44	3.33, 7.78, 9.6	Soluble
<b>Oxitetraciclina</b>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	460.44	3.33, 7.33, 9.1	Soluble
<b>Clortetraciclina</b>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	478.89	3.33, 7.44, 9.27	Soluble
<b>Enrofloxacin</b>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	3916.11	2.74, 7.11*	Soluble en Metanol**
<b>Tilosina</b>	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	3916.11	7.1	Soluble
<b>Espiramicina</b>	C <sub>43</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	843.05	8.2	Soluble en Metanol**
<b>Trimetoprim</b>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	290.32	6.6	Soluble en Metanol**
<b>Cloranfenicol</b>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	323.13	11.05, 13.41*	Soluble en Metanol y otros solventes orgánicos**

A) Bryskier, 2005; B) Index Merck.

\*Los pKa's marcados fueron obtenidos del software ACD/LABS® (pka dB 3.5), el resto son valores experimentales citados de artículos y referencias bibliográficas.

\*\*Presentan solubilidades bajas en agua.





---

### 3. ELECTROFORESIS CAPILAR

#### 3.1 Antecedentes históricos

La electroforesis es una técnica utilizada para separar moléculas, permitiendo identificarlas y cuantificarlas. El principio de esta técnica, basado en el desplazamiento de sustancias cargadas bajo un cambio eléctrico fue mencionado por Reuss en 1809, quien expuso el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena (dióxido de silicio), en medio acuoso dentro de un recipiente de vidrio. Al insertar dos electrodos de una batería en una mezcla de agua – arena y pasar corriente sucedió un enturbiamiento próximo al polo positivo, debido a la carga negativa de las partículas de arena, demostrando su polarización. Siete años más tarde se pudo observar el transporte de agua a través de un capilar polarizado negativamente al aplicar un campo eléctrico.

Si bien la electroforesis clásica representa una opción viable como técnica preparativa, como técnica analítica resulta en tiempos extensos, además de que la eficiencia del análisis se ve comprometida debido a la generación del calor, limitando el voltaje a utilizar ( $< 900$  V) al aplicar energía al sistema. Lo anterior se pudo contrarrestar implementando el uso de geles anti-convectivos, aunque seguía siendo una técnica poco cuantitativa y difícilmente automatizable.

Para el año 1967, se introduce el uso de capilares de diámetro pequeño para disipar el calor, pasando de aplicar potenciales de 5 a 10 voltios a 30 kilovoltios sin que haya sobrecalentamiento, disminuyendo de forma considerable los tiempos de análisis con una alta resolución en las señales obtenidas, además de que no se generan gradientes de temperatura, **(Landers, 1997)**.

Ya para la década de los 80's, se introduce la adición de surfactantes en el electrolito soporte para hacer posible la formación de micelas y con ello la separación de moléculas neutras, dando lugar a la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (MEKC).



En la **Figura 11** se muestran algunos antecedentes históricos de suma importancia para el desarrollo de lo que hoy llamamos Electroforesis Capilar (EC).

**1897**

- Kohlrausch deriva su ecuación de migración iónica en una solución de electrolitos
- Se busca la disipación del calor utilizando papel y geles de poliacrilamida en electroforesis tradicional.

**1899**

- Hardy descubre el punto isoeléctrico proponiendo el nombre de *cataforesis* a lo que hoy llamamos *Enfoque Isoeléctrico*.

**1909**

- Michaelis sugiere el nombre que recibe la técnica (electroforesis).

**1937**

- Arne Tiselius perfecciona un instrumento para realizar Electroforesis Capilar de Zona.

**1963 y 1964**

- Konstantinov y Oshukova, así como Evereast utilizan capilares y la medición de absorción UV obteniendo espectros característicos de la separación.

**1967**

- Hjerten introduce el empleo de capilares milimétricos los que eran rotados a través de su sección longitudinal para evitar el efecto de convección.

**1979**

- Virtanen y Mikkers desarrollan separaciones en capilares de 200  $\mu\text{m}$  diámetro.

**1980**

- Jorgenson y Lukacs empleando técnicas más avanzadas desarrollan capilares de 75  $\mu\text{m}$ .

**1984**

- Terabe y colaboradores desarrollan la Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética.

**Figura 11. Antecedentes históricos de la Electroforesis capilar**



## 3.2 Definición y principios de la técnica

Si bien el término electroforesis está definido como el desplazamiento de especies cargadas en un sistema por acción de un campo eléctrico, (**Settle, 1997**), la separación electroforética es posible debido a la dependencia que guarda la velocidad de migración con la carga y masa de las especies, dando lugar a una migración diferenciada.

Para los años sesenta, se ampliaron los campos de aplicación de la técnica al surgir la EC, teniendo las siguientes ventajas sobre el modo convencional:

- Mayor resolución y eficiencia de separación
- Menor tiempo de análisis
- Inyección de pequeñas cantidades de muestra (nL)
- Resultados más reproducibles
- Automatización del método

En EC los analitos son transportados a través de un tubo capilar (lleno de solución búfer), por efecto de una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos. El detector se ubica en un extremo del capilar, cerca del compartimiento catódico y la señal obtenida (electroferograma), es el registro de la propiedad medida en función del tiempo.

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+), a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre las especies cargadas y las fuerzas de fricción con el medio. Cabe mencionar que se mantiene una corriente que varía muy poco a lo largo del capilar, debido a que los electrodos están sumergidos en depósitos de búfer y lo que se mantiene constante es la diferencia de potencial entre éstos.



### 3.2.1 Movilidad electroforética, movilidad aparente y velocidad de migración

La movilidad electroforética de un analito depende en gran parte de las características propias de éste (carga, tamaño), así como del medio (concentración, temperatura y viscosidad). En consecuencia, moléculas de gran carga, menor radio iónico y baja concentración, tendrán mayor movilidad, tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{q}{6 \pi r \eta}$$

Donde:  $\mu$  = Movilidad electroforética  
 $Q$  = Carga del analito  
 $\eta$  = Viscosidad del medio  
 $r$  = Radio del ión solvatado (radio de stocks)

Sin embargo, bajo la influencia del flujo electroosmótico (concepto que se explicará más adelante), la movilidad electroforética se ve modificada, dando lugar a la movilidad aparente, la cual se puede determinar mediante la ecuación:

$$\mu_a = \frac{1}{t_{FEO}} \pm \frac{lL}{t_A V}$$

Donde:  $\mu_a$  = Movilidad aparente  
 $V$  = Voltaje aplicado  
 $l$  = Longitud efectiva del capilar (long. al detector)  
 $L$  = Longitud total del capilar  
 $t_A$  = Tiempo de migración del analito  
 $t_{FEO}$  = Tiempo de migración del FEO

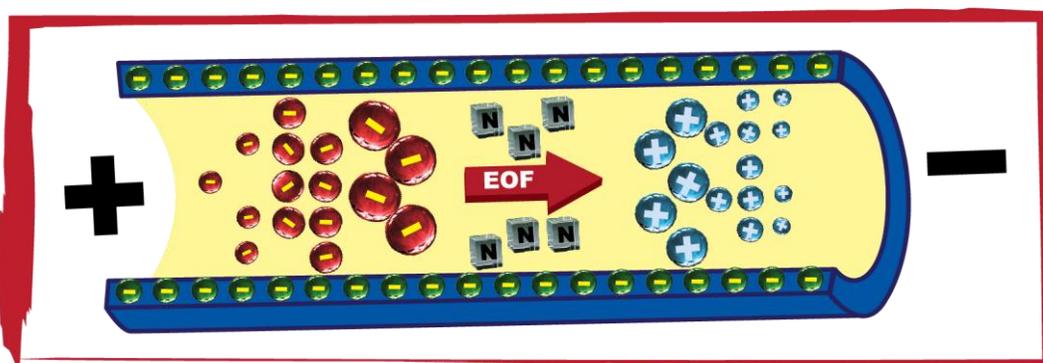


Como ya se sabe, la separación de una mezcla de analitos por electroforesis se da por la diferencia de velocidad de migración bajo un campo eléctrico, la cual responde a la siguiente ecuación:

$$v = \mu E$$

Donde:  $v$  = Velocidad del analito  
 $\mu$  = Movilidad electroforética  
 $E$  = Campo eléctrico

En la **Figura 12**, se muestra el proceso electroforético, enfatizando el orden de elución de las especies ionizadas, según su carga y tamaño.



*Figura 12. Esquema general de la separación electroforética de una mezcla de aniones, cationes y moléculas neutras.*

### 3.2.1.1 Factores que afectan la velocidad de migración

En una separación electroforética, se deben cuidar ciertos factores y seleccionar cuidadosamente ciertas variables, ya que modifican la velocidad de migración de los analitos, (Frazier, 2000). En la **Tabla 9** se exponen algunas causas y la forma en que varían la velocidad de migración de una molécula sometida a EC.



**Tabla 9. Factores que afectan la velocidad de migración de los iones en electroforesis capilar**

<b>Factor</b>	<b>Condición</b>	<b>Causa</b>	<b>Resultado</b>
<b>Naturaleza del analito</b>	Carga	Depende del pH del medio	A mayor carga, mayor velocidad de migración
	Tamaño	Fricción ejercida por el medio	A mayor carga, menor velocidad de migración
	Forma	Fricción ejercida por el medio	Diferente interacción con el medio, lo cual varía la velocidad
<b>Medio soporte</b>	Electroósmosis	Carga producida entre la pared del capilar y búfer	Flujo del disolvente con perfil plano
	Adsorción	Acumulación de moléculas del analito en la pared del capilar	Menor velocidad, deformación de picos y menor resolución
<b>Electrolito soporte</b>	Composición	Determina el pH y algunas veces puede interactuar con los analitos formando complejos.	Las moléculas se ionizan o permanecen neutras. Mediante la formación de complejos podemos modificar la selectividad.
	Concentración	Determina la fuerza iónica y con ello la corriente	A mayor fuerza iónica, menor velocidad
	pH	Determina la ionización del analito	La velocidad depende de la carga neta
<b>Campo eléctrico</b>	Intensidad de corriente	Está influida por la fuerza iónica, el largo y el diámetro interno del capilar, además del voltaje	A mayor corriente por aumento en la fuerza iónica, mayor tiempo de migración y menor velocidad.
	Voltaje	Influye en la corriente	A mayor voltaje, mayor velocidad de migración
	Resistencia	Se incrementa cuando la longitud del capilar aumenta, el DI del capilar, la concentración del búfer, temperatura del medio disminuyen	A mayor resistencia, menor velocidad de migración



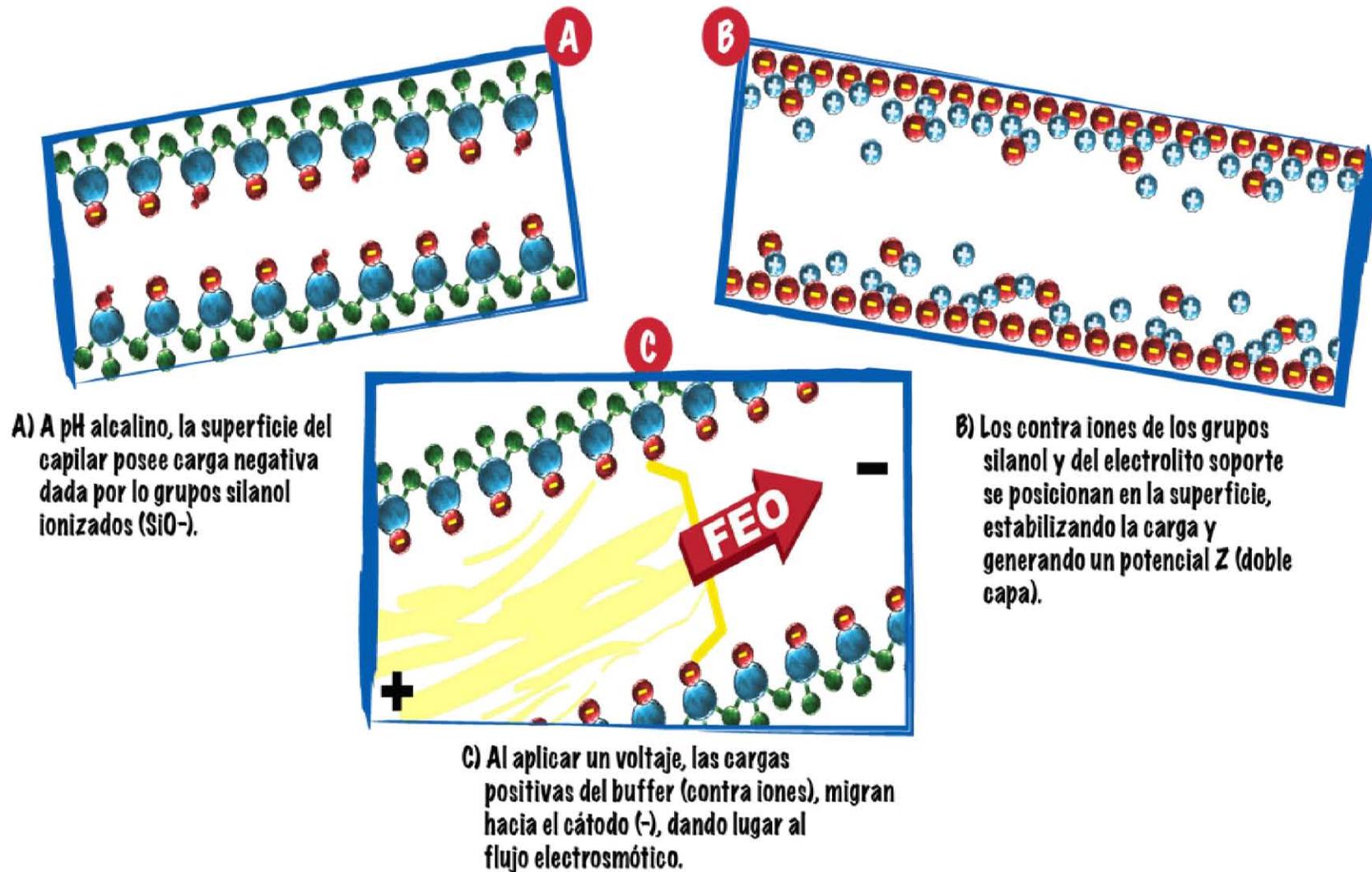
### 3.2.2 Flujo electroosmótico (FEO)

Este flujo surge como consecuencia de la interacción entre el electrolito soporte con la superficie cargada del capilar al aplicar un campo eléctrico. A un pH mayor a cuatro, las paredes del capilar adquieren predominantemente carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol ( $\text{SiOH}/\text{SiO}^-$ ), lo cual genera una doble capa con las contraiones de carga positiva, ubicada entre la solución y la pared del capilar. Al aplicar una diferencia de potencial eléctrico, los contra iones (+) migran hacia el cátodo arrastrando disolvente con ellos debido a su esfera de solvatación, dando lugar al FEO.

Así, las especies catiónicas migran hacia el cátodo, las especies aniónicas tratan de migrar hacia el ánodo, pero a alto pH son arrastradas por el FEO y las neutras se desplazan con el FEO sin importar que no tengan carga, haciendo posible la separación. Sin embargo, la velocidad de migración de los iones se verá modificada según la magnitud del FEO, pudiendo aumentar la de los cationes y disminuir la de los aniones con respecto a la obtenida en ausencia de dicha corriente.

Cabe mencionar que los contra iones catiónicos, se localizan en la superficie del capilar estabilizando su carga, formando la doble capa con un potencial que lo caracteriza, llamado potencial zeta, (**Heiger, 1997**). En la **Figura 3**, se expone el proceso de formación del FEO en un capilar de sílice fundida.

El potencial zeta depende de la carga en la superficie de la pared del capilar y del grosor de la doble capa. A pH alcalino, la ionización y en consecuencia la carga en la superficie de la pared es mayor, aumentando el potencial zeta, por otro lado, al incrementar la fuerza iónica (concentración del búfer), decrece el grosor de la doble capa, disminuyendo el potencial zeta.



*Figura 13. Desarrollo del FEO en un capilar de sílice*



### 3.3 Instrumento

Para optimizar la separación de los analitos de interés, existen diversas modalidades que pueden ser desarrolladas utilizando el mismo instrumento, cuya composición se puede decir que ha tomado los elementos esenciales de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), (**Fernández, 2005**).

El sistema de EC consiste de las siguientes partes:

- **Depósitos para el electrolito soporte.-** En ellos se introducen los extremos del capilar para que este se llene del electrolito soporte, así como los electrodos.
- **Capilar.-** Es de sílice fundida, está recubierto en el exterior de poliamida, la cual lo hace flexible y tiene la función de puente de contacto entre el cátodo y el ánodo cerrando el circuito eléctrico.
- **Un par de electrodos de platino.-** Están conectados a la fuente de poder que proporciona la energía para que se dé la separación.
- **Fuente de poder.-** Desarrolla la diferencia de potencial necesaria para la separación (voltajes de 1 – 30 kV).
- **Detector.-** Una vez que los componentes de la muestra fueron separados por electroforesis, permite revelarlos y cuantificarlos. Se pueden clasificar de la siguiente manera en función de la técnica que hacen uso:
  - *Ópticos:* Absorción UV-Vis, fluorescencia, quimioluminiscencia, índice de refracción, etc.
  - *Electroquímicos:* conductimetría, potenciometría y amperometría.
  - *Otros:* Espectrometría de masas y radiométricos.
- **Sistema de enfriamiento.-** Disipa el exceso de calor producido en el capilar.
- **Sistema de adquisición de datos.-** Presenta los datos obtenidos del análisis (electroferograma).

(**Castillo, 2005; Fernández, 2005**).

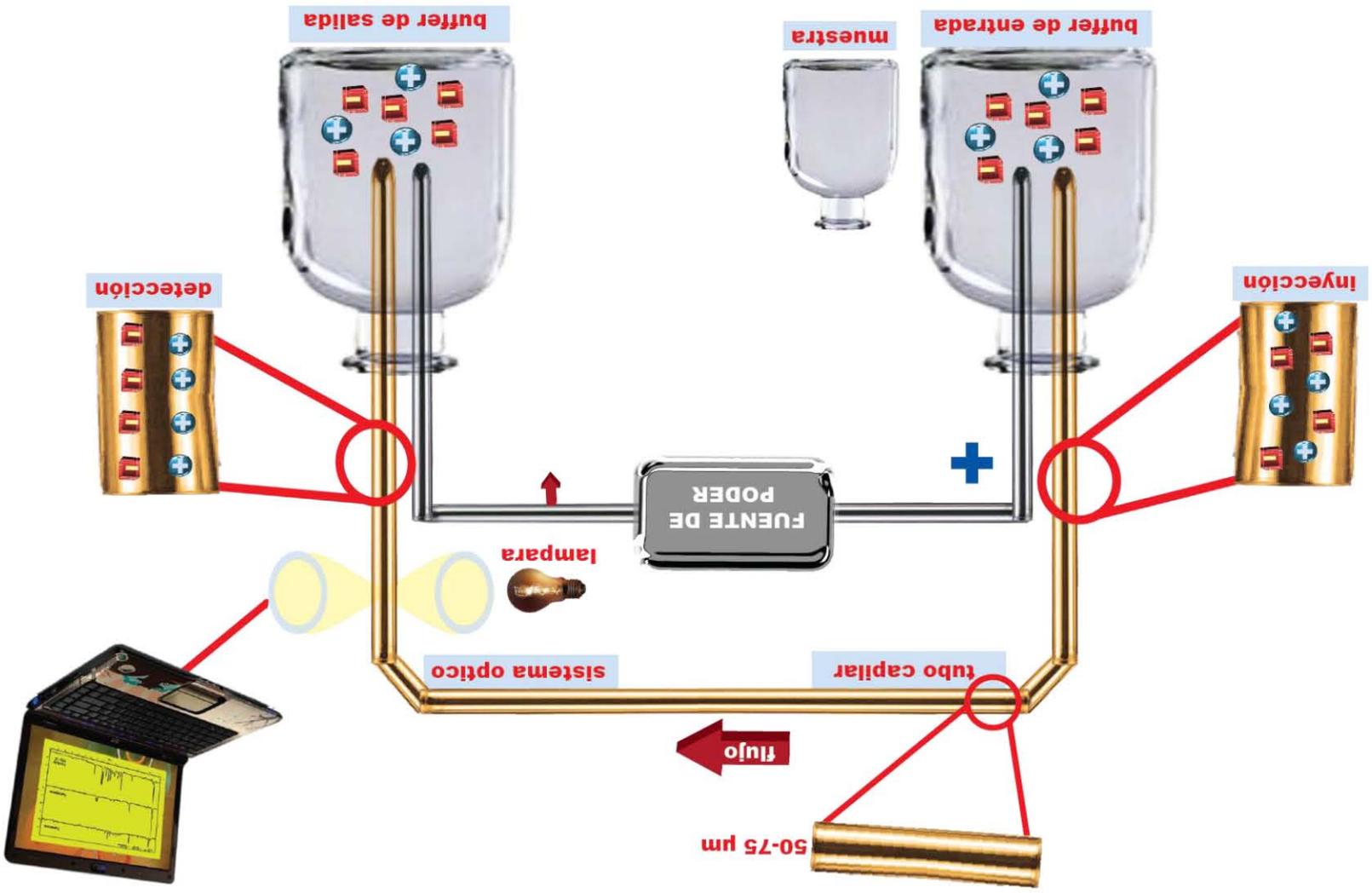


Figura 14. Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar



### 3.3.1 Detector

La detección de los componentes de la muestra es una parte de suma importancia para la EC, ya que, si bien el uso de capilares de diámetro minúsculo favorece la eficiencia, representa un problema sustancial en cuanto a la sensibilidad de los sistemas ópticos, **(Chankvetadze, 1997)**.

El detector UV-Vis es el más común entre los equipos de electroforesis capilar, debido a su bajo costo, así como la simple y versátil detección. Se utiliza casi universalmente en separaciones de componentes orgánicos y adicionalmente, puede utilizarse para iones inorgánicos en el modo de detección indirecta.

Para que el volumen de detección se mantenga dentro del orden de magnitud de nL o inferior, la detección se lleva a cabo en columna. Para ello se elimina el recubrimiento protector de poliimida de unos milímetros de la parte externa del capilar, dejando expuesta la sílice fundida y haciendo ésta de celda (ventana) de detección, **(Skoog, 2002)**.

Los detectores UV-Vis generalmente son de arreglo de diodos, los cuales permiten monitorear a más de una longitud de onda simultáneamente; incluso es posible obtener un espectro de absorción mientras se analiza la muestra, permitiendo identificar analitos desconocidos. Tal como se define en la ley de Beer, la absorbancia en este rango es directamente proporcional a la concentración de la molécula. Sin embargo, la absorbancia no depende solamente de la concentración, sino también de la absorptividad molar del analito.

### 3.3.2 Inyección de la muestra

Aunque existe también la inyección electrocinética, en la cual se aplica un campo eléctrico para provocar la migración de moléculas ionizadas al interior del tubo, la inyección hidrodinámica permite que entren al capilar todas la partículas (ionizadas o neutras), para



ser separadas y detectadas por el equipo. Este tipo de inyección se lleva a cabo forzando la introducción de la muestra al capilar provocando vacío en el vial con o sin búfer.

Dependiendo del tipo de análisis que se vaya a realizar, se elige el modo de inyección, de tal forma que sea reproducible, controlando que el volumen no sea, ni muy grande que provoque ensanchamiento de los picos, ni tan pequeño que el equipo no lo pueda detectar a concentraciones diluidas.

### 3.4 Modos de separación por EC

Como se ha revisado, la EC tiene grandes ventajas sobre otras técnicas por su corto tiempo de análisis, el uso de diminutas cantidades de muestra y por el ahorro económico que representa en cuanto a reactivos y disolventes, sin embargo, una de las más importantes radica en la versatilidad de metodologías, las cuales se pueden modificar simplemente alterando la composición del búfer utilizando el mismo equipo.

En la **Tabla 10**, se exponen las diferentes modalidades de la EC, haciendo un breve resumen del fundamento de cada una de ellas.

Cabe mencionar que la ECZ y CCEM son las metodologías más utilizadas, cuya diferencia radica en que la ECZ basa la separación únicamente en la movilidad de los analitos según la fuerza con que son atraídos a los electrodos, sin embargo en CCEM, que se utiliza para la separación de compuestos neutros, la adición de surfactantes que forman micelas que interaccionan de forma selectiva con los analitos provocando que tengan una movilidad diferente, lográndose así la separación.

#### 3.4.1 Electroforesis capilar de zona

Es una técnica simple en la cual se llena el capilar con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades, (**Castillo, 2005**). Dicha resolución es posible debido a la separación diferenciada de las especies al aplicar una



---

diferencia de potencial eléctrico, teniendo influencia del FEO, el cual será lo suficientemente elevado para arrastrar todas las especies al detector, que está del lado del electrodo negativo.

En caso de que se tenga una polaridad normal, las especies catiónicas además de ser atraídas hacia el cátodo, son llevadas con el FEO que va en la misma dirección, aumentando su velocidad de migración; lo contrario sucede con las especies aniónicas, las cuales son atraídas en dirección contraria al FEO, disminuyendo su velocidad de migración.



**Tabla 10. Tipos de electroforesis capilar**

<b>Modo</b>	<b>Acrónimo</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Analitos</b>	<b>Ventajas</b>
<b>Electroforesis capilar de zona</b>	CZE ECZ	La movilidad diferencial la da el analito en el búfer, en zonas discretas a diferentes velocidades	Iones pequeños, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas	Técnica más común
<b>Cromatografía capilar electrocinética micelar</b>	MEKC CCEM	El reparto de los analitos se da entre los compuestos neutros y las micelas en solución homogénea, generando movilidades diferenciales.	Moléculas pequeñas, péptidos, Oligonucleótidos	Separación de moléculas neutras
<b>Electroforesis capilar en gel</b>	CGE ECG	La separación se basa las diferencias de tamaño y forma de las moléculas, utilizando geles porosos	Péptidos, proteínas, oligonucleótidos, DNA	Separación de macromoléculas eliminando los efectos del calor de Joule
<b>Enfoque isoeléctrico capilar</b>	CIEF EIC	La separación se basa en las diferencias en su punto isoeléctrico	Péptidos, proteínas	Separación de moléculas zwitteriónicas
<b>Isotacoforesis capilar</b>	CITP IC	Migración entre búferes de diferente naturaleza, basándose en las propias movilidades de los analitos	Iones pequeños, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas	El tiempo de recorrido en el capilar es independiente de la velocidad
<b>Electrocromatografía capilar</b>	CEC ECC	Separación basada en la movilidad en una solución libre y retención cromatográfica	Moléculas neutras y cargadas	Separación de moléculas por combinación de técnicas



Por ende, el orden de elusión es el siguiente:

1. Cationes
2. Especies neutras
3. Aniones

La desventaja de esta modalidad es que no hay selectividad para especies neutras, las cuales migran juntas a la velocidad del FEO y dado que no son atraídos por ningún electrodo, no hay separación entre ellas, además de que se requiere que la relación carga – masa sea diferente entre todos los analitos.

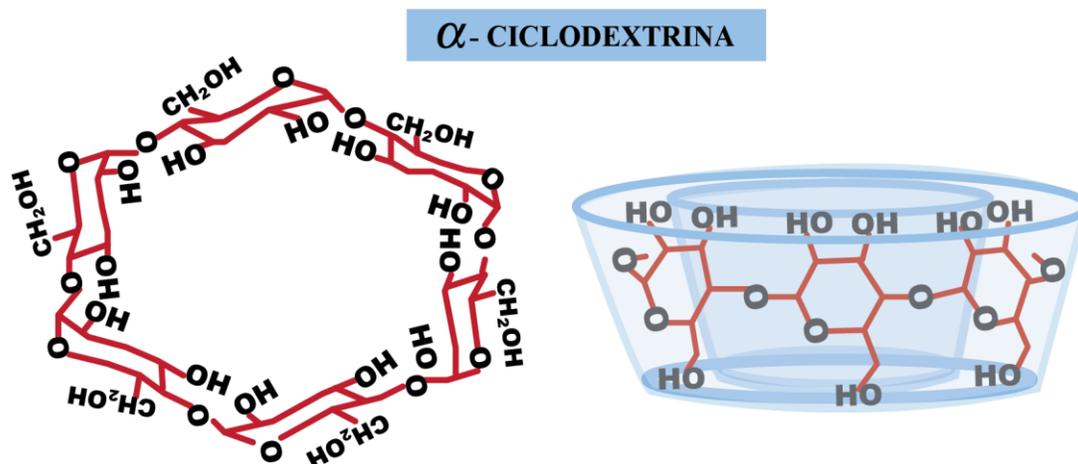
#### 3.4.1.1 Uso de ciclodextrinas (CD) como aditivos

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos neutros, obtenidos por escisión enzimática del almidón. Al tratarlo con glicosiltransferasas, éste es hidrolizado formando una mezcla de oligosacáridos de seis hasta 13 unidades de glucosa. Ha sido posible separar por precipitación selectiva CD's con seis, siete, ocho y hasta nueve unidades de glucosa.

Usualmente son nombradas con abreviaciones tomadas del alfabeto griego:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -CD para indicar el número de unidades de glucosa; seis, siete, ocho y nueve unidades respectivamente. Su estructura es similar a la de un cono truncado con una cavidad relativamente hidrofóbica y exterior hidrofílico. En la **Figura 15** se observa la estructura de la  $\alpha$  – CD. El hidroxil primario (6 – hidroxil) y el secundario (2 y 3 – hidroxil), están localizados en las aberturas de las CD, en la más pequeña y en la más grande respectivamente. La estructura rígida viene del puente de hidrógeno intramolecular entre los grupos 2-hidroxil y 3-hidroxil de unidades de glucosa adyacente, (**Dodziuk, 2006**).

Estos oligosacáridos macrocíclicos se han usado para diferentes propósitos, por ejemplo mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos que son relativamente solubles en agua, como aditivos en comida, tabacos, etc. Recientemente, también se utilizan

en química analítica para mejorar la selectividad de la separación de diferentes clases de componentes, (Castillo, 2005).



*Figura 15. Estructura tridimensional de la  $\alpha$ -ciclodextrina*

En cuanto a las CD  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , al incrementar el número de unidades de glucosa, incrementa su diámetro interno y externo pero la profundidad es la misma. La profundidad puede cambiar por modificación de los grupos hidroxilo primarios y/o secundarios.

Debido a que son componentes neutros, al utilizarlas como aditivos no influyen en la conductividad y tampoco migran al ser utilizados en EC.

### 3.5 Aplicaciones

Para estos tiempos la EC se ha difundido rápidamente, entre otras cosas, por las ventajas económicas que representa sobre la Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), además de que los sistemas acoplados se están haciendo más comunes en los laboratorios, por tanto, el acceso a un instrumento es más sencillo que en la década de los 90's. Si a esto se le suma que existen diversas modalidades de esta técnica micro analítica, veremos que las aplicaciones han incrementado, haciendo posible la separación, identificación y cuantificación de analitos que no se habían resuelto por otros métodos.



*Tabla 11. Usos y aplicaciones de electroforesis capilar*

<b>Área de aplicación</b>	<b>Análisis comúnmente realizados</b>
<b>Industria farmacéutica</b>	Caracterización de materias primas
	Principio activo
	Excipientes
	Pruebas de disolución
<b>Medicina</b>	Monitoreo de fluidos biológicos
	Sangre, suero, plasma
	Orina
	Líquido ceforraquídeo
<b>Criminalística</b>	Estudios de medicina legal
	Explosivos
	Drogas y sus metabolitos
	Contenido gástrico (post mortem)
<b>Industria alimentaria</b>	Análisis de materia prima
	Colorantes
	Vitaminas
	Adulterantes
<b>Investigaciones bioquímicas</b>	Aplicaciones micropreparativas
	Purificación de péptidos
	Composición de aminoácidos
	Actividad enzimática



---

## **II. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



---

## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Material

Para garantizar que las soluciones estuvieran libres de sólidos, todas se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectadas en el equipo. Se utilizaron micropipetas de 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ , Finnpiquette. Los experimentos se realizaron con un capilar de sílice fundida de diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$  de diámetro externo.

### 4.2 Equipos

Para el desarrollo y optimización del método analítico, se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, con detector de arreglo de diodos y software Karat 3.2, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA). Además, se utilizaron para la implementación del método y preparación de soluciones, Centrifuga Allegra™ 21 centrifuge, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA); Evaporador Turbo Vap LV, Caliper Life Science (Hopkinton, MA., USA); Potenciómetro, Hanna Instruments (Padua, Italia); Balanza analítica, Boeco, (Alemania); Sonicador Transsonic 570, Elma (USA); Vórtex, Thermolyne/Barnstead (Iowa, USA); Desionizador Milli – Q (Millipore, MA., USA); Parrilla eléctrica con agitador magnético, Cimarec 2, Thermolyne (USA).

### 4.3 Reactivos

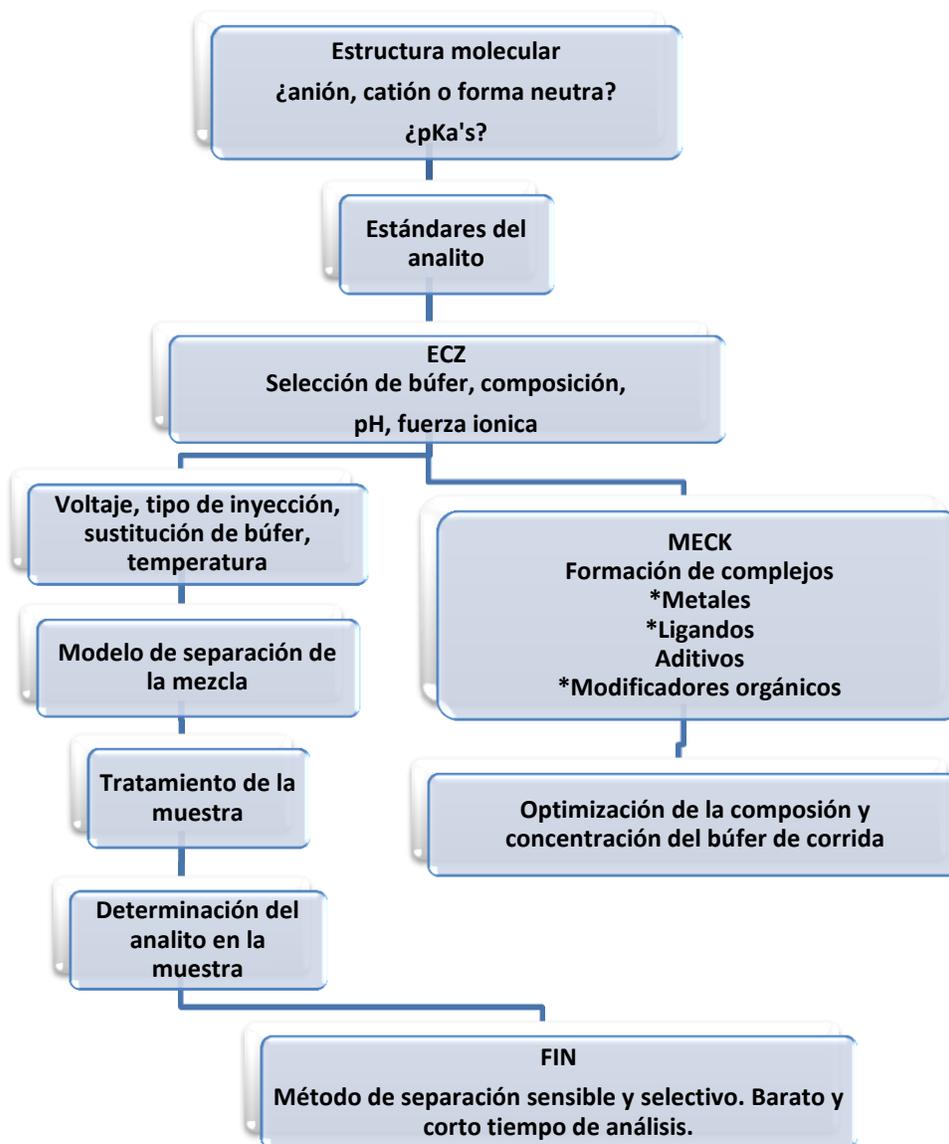
Amoxicilina, Trihidrato de Ampicilina, Hidrato de Cefalexina, Cefepime, Cefprozil, Cloranfenicol, Clorhidrato de Clortetraciclina, Diclorhidrato de Dicloxacilina sal de sodio monohidratada, Hiclato de Doxiciclina, Enrofloxacina, Espiramicina, Oxacilina sal de sodio, Corhidrato de Oxitetraciclina, Penicilina G sal de sodio, Clorhidrato de Tetraciclina, Tartrato de Tilosina, Trimetoprim, Clorhidrato de Vancomicina, Tetraborato de sodio, Metanol, Ácido clorhídrico (HCl) e Hidróxido de sodio (NaOH) de JT Baker (Phillipsburg NJ, USA);  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD), hidroxipropil  $\alpha$ -ciclodextrina (HP  $\alpha$ -CD),



Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y Ácido tricloroacético ( $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); nitrógeno comprimido de Praxair (México).

#### 4.4 Estrategia general para el desarrollo de un método electroforético

Para el desarrollo del método electroforético (analítico), se tomó como base la estrategia descrita en la **Figura 16**, la cual da un panorama general para la búsqueda de las condiciones óptimas de separación.



*Figura 16. Estrategia para el desarrollo del método analítico*



#### 4.4.1 Preacondicionamiento del capilar

Una vez que se montó el capilar nuevo en el cartucho, se acondicionó siguiendo el procedimiento de la Tabla 12, teniendo como objetivo, la activación de los grupos silanol, así como equilibrar las paredes del capilar con el búfer de soporte para asegurar la repetibilidad de nuestros experimentos.

**Tabla 12. Procedimiento de acondicionamiento de capilar nuevo**

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H <sub>2</sub> O desionizada	2 min	30 psi	25 °C
NaOH (0.1 N)	2 min	30 psi	25°C
NaOH (0.1 N)	40 min	30 psi	40°C
NaOH (0.1 N)	2 min	30 psi	25°C
H <sub>2</sub> O desionizada	2 min	30 psi	25 °C
Búfer de soporte	10 min	30 psi	25°C

#### 4.4.2 Lavado del capilar

Por otro lado, se realizó el lavado del capilar al inicio y término de cada sesión experimental de acuerdo a la **Tabla 13**, con el fin de eliminar cualquier residuo de la muestra que pudiera adsorberse y causar variaciones en el flujo o incluso tapan el tubo.

**Tabla 13. Procedimiento de lavado del capilar al inicio de cada sesión**

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
H <sub>2</sub> O desionizada	2 min	30 psi	25 °C
NaOH (0.1 N)	10 min	30 psi	25°C
H <sub>2</sub> O desionizada	2 min	30 psi	25 °C
Búfer de soporte	10 min	30 psi	25°C



---

### 4.4.3 Preparación de soluciones

#### 4.4.3.1 Búfer soporte (Tetraboratos 100 mM, pH 8)

Se prepararon 200 ml de búfer de soporte a 100 mM, pesando los miligramos necesarios de tetraborato de sodio en un vaso de precipitados. Se adicionó H<sub>2</sub>O desionizada y se colocó en una parrilla con agitación hasta disolución total. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para llevar a pH 8, adicionando HCl concentrado y NaOH, (en caso de ser necesario). Se transfirió a un matraz volumétrico y se llevó a la marca de aforo.

#### 4.4.3.2 Mezcla de estándares acuosos, (Sol. A)

Se prepararon 25 mL de una mezcla de antibióticos solubles en agua a 500 ppm, pesando los miligramos necesarios de los estándares siguientes: Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina, Cloranfenicol, Clortetraciclina, Dicloxacilina, Oxacilina, Oxitetraciclina, Penicilina G, Tetraciclina y Tilosina. Se solubilizaron en H<sub>2</sub>O desionizada.

#### 4.4.3.3 Mezcla de estándares metanólicos, (Sol. B)

Se prepararon 10 mL de una mezcla de antibióticos solubles en metanol a 2000 ppm, pesando los miligramos necesarios de los estándares siguientes: Enrofloxacina, Espiramicina y Trimetoprim. Se solubilizaron en metanol grado HPLC.

#### 4.4.3.4 Estándar interno (EI)

Se prepararon 10 mL de solución de Cefprozil a 2000 ppm, pesando los miligramos necesarios del estándar. Se solubilizó en H<sub>2</sub>O desionizada.

#### 4.4.3.5 Mezcla de analitos estándar

Se realizó una mezcla tomando con micropipeta 1000 µL de Sol. A, 250 µL de Sol. B y 250 µL de agua desionizada, homogenizando en vórtex.



#### 4.4.3.6 Mezcla de estándares con EI (para muestra adicionada)

Se realizó una mezcla tomando con micropipeta 1000  $\mu\text{L}$  de Sol. A, 250  $\mu\text{L}$  de Sol. B y 250  $\mu\text{L}$  de EI, homogenizando en vórtex.

#### 4.4.4 Tratamiento de la muestra

##### 4.4.4.1 Obtención de suero de leche entera de vaca

Se vertió una muestra de 10 mL de leche bronca de vaca<sup>1</sup> en tubos de centrifuga y se le adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 2 M (TCA). Se centrifugó a 10,000 rpm/15 min y se extrajo el suero con ayuda de una pipeta pasteur.

##### 4.4.4.2 Preconcentración por tratamiento térmico

El suero extraído en el paso anterior, se depositó en un vaso de precipitados y se colocó en una parrilla eléctrica, con agitación, a temperatura constante (dependiendo del experimento), hasta llevar a sequedad. Se reconstituyó con 1.5 mL de agua desionizada y se sonicó hasta solubilización. La mezcla anterior se vertió en un tubo Eppendorf y se centrifugó durante 5 min en microcentrifuga.

##### 4.4.4.3 Extracción líquido - líquido

El suero obtenido de acuerdo al apartado **4.4.4.1**, se vertió en un embudo de separación y se adicionaron 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; se agitó durante tres minutos. Se separaron las fases y se llevaron a sequedad a 45 °C y 5 psi, utilizando un evaporador; las fases acuosa y orgánica se reconstituyeron con 1.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y 1.5 mL de metanol al 13% respectivamente, sonicando para asegurar solubilización.

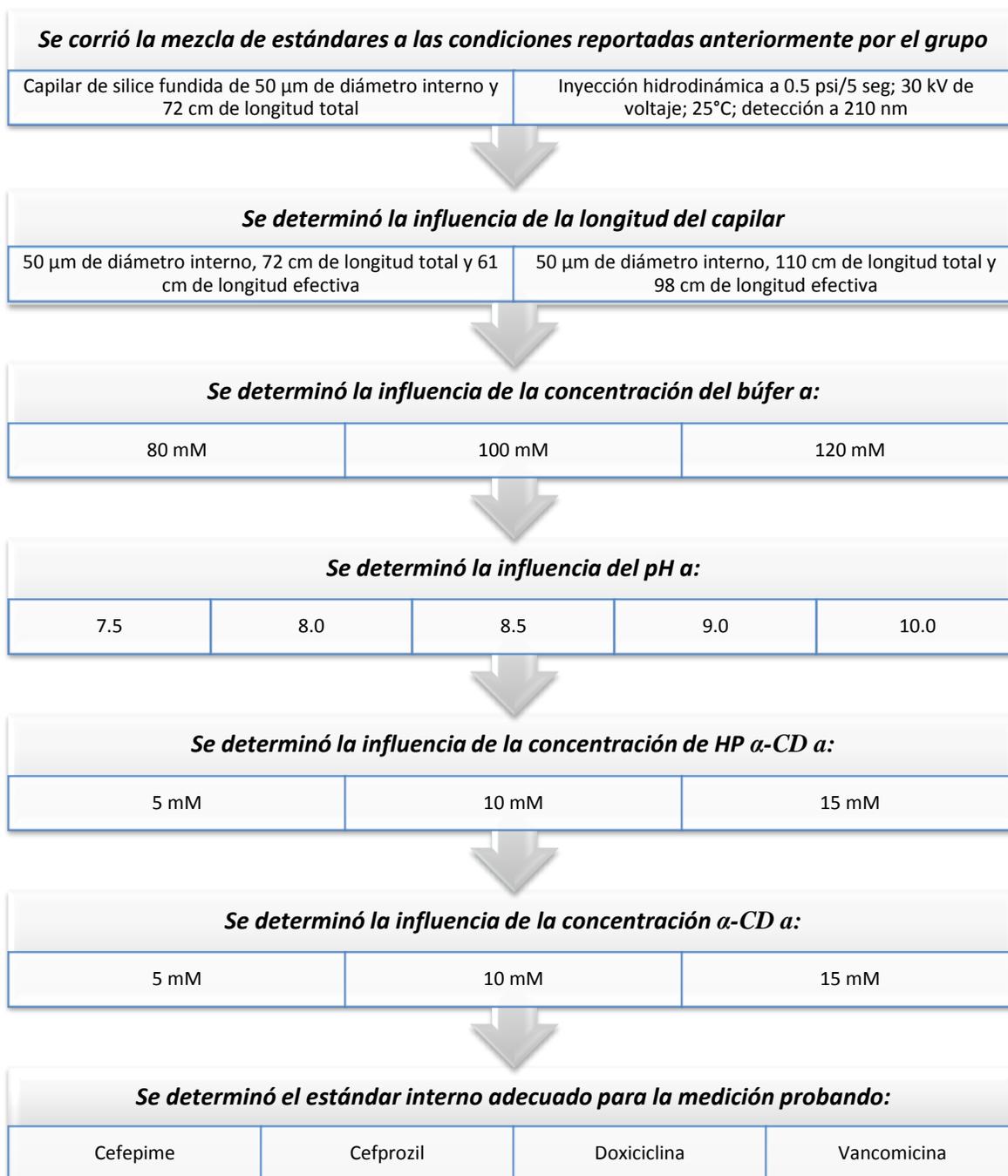
**Nota:** Las muestras analizadas fueron adicionadas con 1.5 mL de la mezcla con estándares del apartado **4.4.2.6**.

<sup>1</sup>Muestras tomadas de distintos establos, recolectadas con maquinaria especializada por personal capacitado.



#### 4.4.5 Desarrollo del proceso electroforético

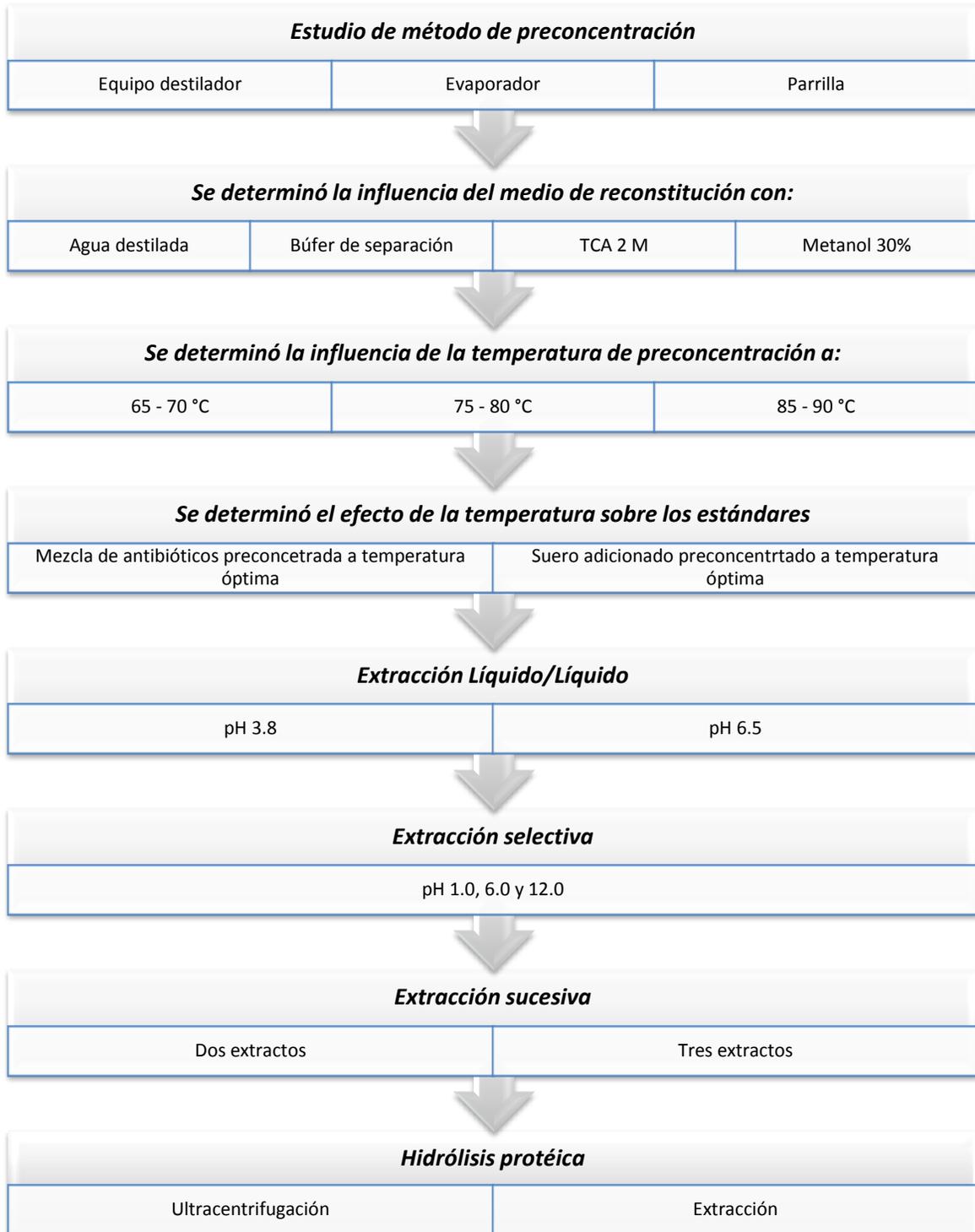
Durante el desarrollo del método analítico se realizaron los experimentos mostrados en la **Figura 17**, para determinar las condiciones óptimas de separación e identificación de los 14 antibióticos.



**Figura 17. Condiciones estudiadas para el desarrollo y optimización del método analítico**



Por otro lado, para el desarrollo del método de preconcentración de la muestra, se realizaron los experimentos expuestos en la **Figura 18**.



**Figura 18. Condiciones estudiadas para el desarrollo y optimización del método de preconcentración**



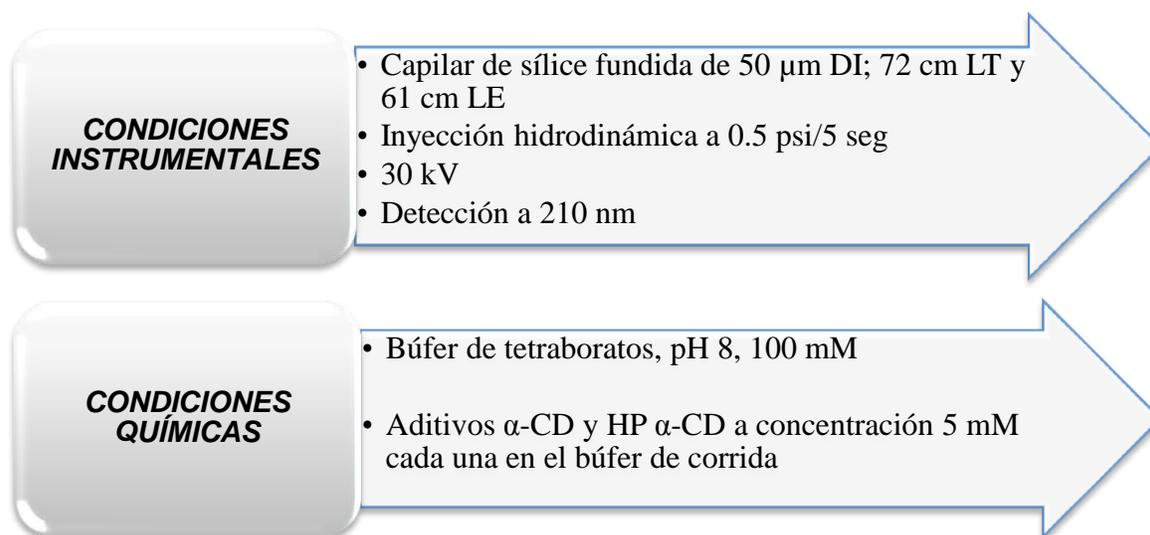
---

### **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 5. Optimización del método para la separación de 14 antibióticos

La separación por electroforesis capilar está basada en la relación carga/masa de las moléculas en cuestión, más que en su tamaño o forma en sí. Por lo anterior, existen diversos factores directamente relacionados con el medio que son determinantes de la carga neta del analito.

Para dar inicio a este proyecto, se partieron de las condiciones instrumentales y analíticas reportadas con anterioridad por Castillo y Vargas (**Figura 19**), permitiéndonos analizar la influencia de ciertas variables que son determinantes en la movilidad de un analito y así mejorar de forma sustancial el método.



*Figura 19. Condiciones iniciales del método de separación*

Al tratar de realizar la corrida a las condiciones reportadas en la **Figura 19**, se observó una corriente muy alta (la cual depende tanto de la alta concentración del búfer, como de la longitud y diámetro interno del capilar). Lo anterior provoca un incremento en el calor de Joule, que si no se disipa a la misma velocidad con que se produce, da lugar a un aumento en la temperatura dentro del circuito, (**Morante, 2007**), teniendo consecuencias que hacen poco reproducible el método, por lo cual se canceló la lectura.



Algunas de las formas para disminuir la corriente del experimento son las siguientes:

- Menor voltaje aplicado
- Menor diámetro interno del capilar
- Mayor longitud del capilar
- Menor fuerza iónica del búfer
- Mayor viscosidad del medio

Por lo anterior, se probó disminuyendo el voltaje aplicado a 25 kV para realizar la lectura de la mezcla de estándares, lo cual redujo muy poco la corriente teniendo el mismo efecto que en la condición anterior.

Aun cuando el voltaje sea disminuido para aminorar la corriente, con esto disminuye también la resolución, impidiendo la separación de nuestros analitos. Es así como se comenzó a modificar variables para optimizar el método.

## 5.1 Estudio de las condiciones instrumentales

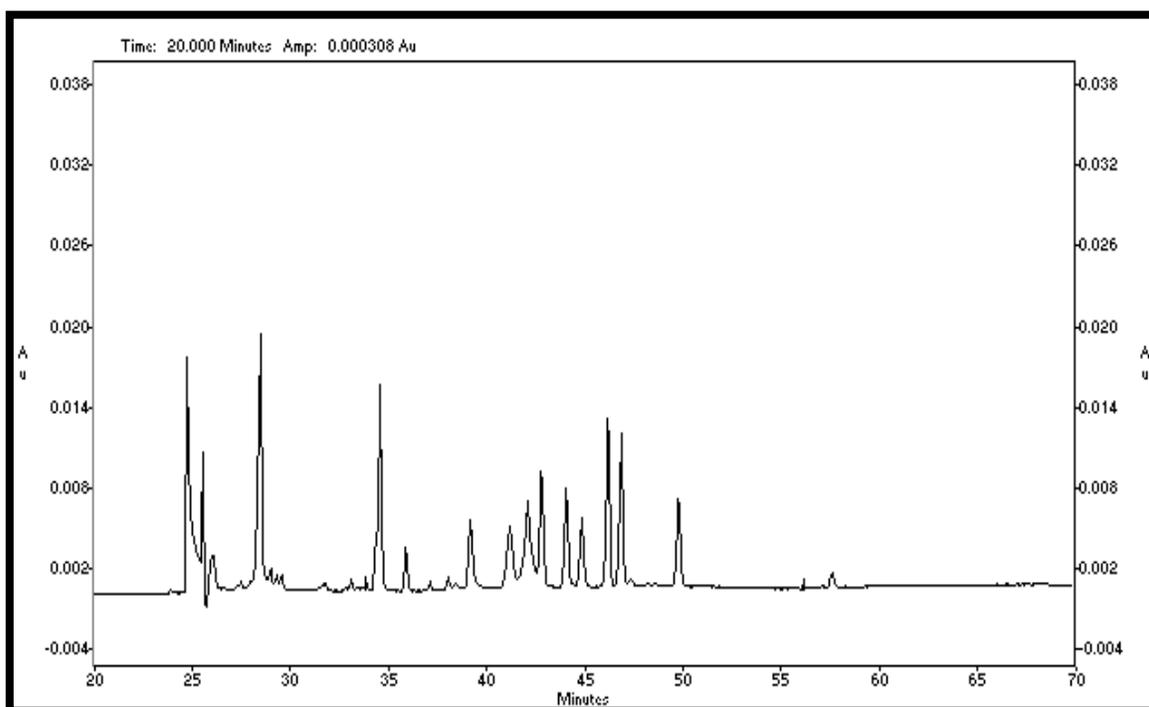
En este experimento se decidió conservar el modo de inyección previo (hidrodinámica), ya que de acuerdo a la literatura representa grandes ventajas en cuanto a la reproducibilidad al poder controlar el tiempo y la presión de inyección, (Castillo, 2005). Por otro lado, el volumen de muestra que se introdujo al capilar fue controlado por la poca variación en la viscosidad del electrolito soporte, debido a que la temperatura del medio se mantuvo en todos los análisis a 25°C.

De acuerdo al análisis molecular y de los espectros de absorción de los antibióticos a separar (realizado por el grupo con anterioridad), se decidió conservar la longitud de onda de análisis para detectar los analitos (210 nm).



### 5.1.1 Influencia de la longitud del capilar

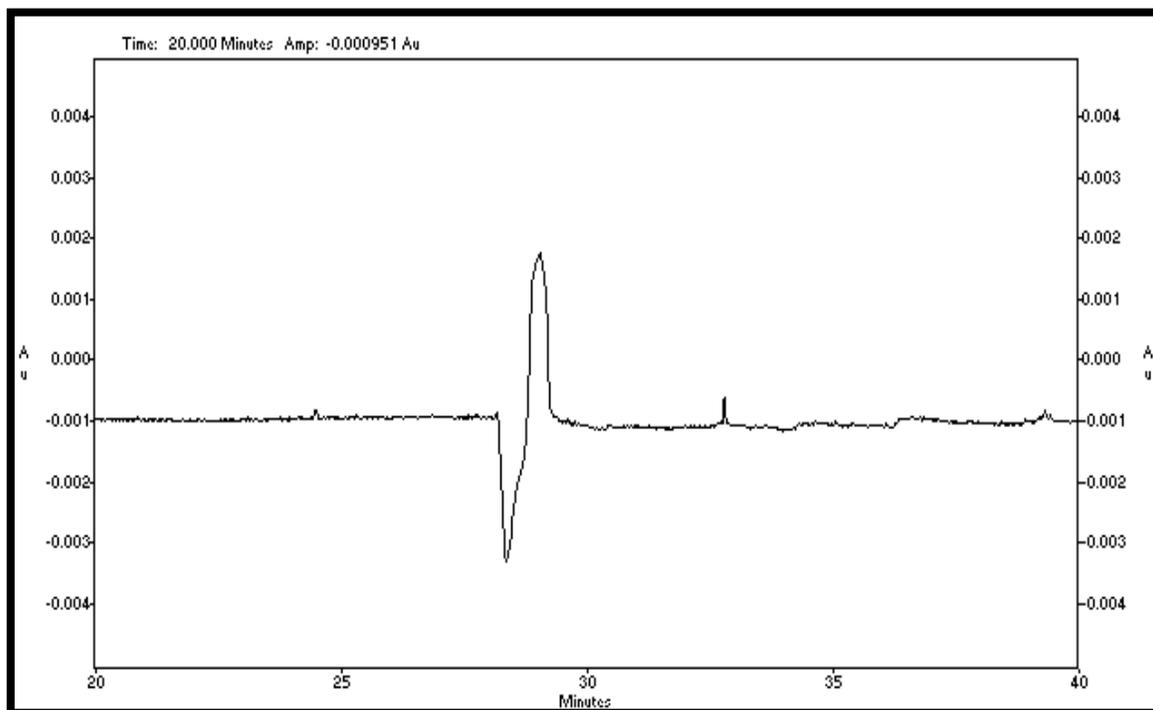
Para disminuir la corriente dentro del capilar y hacer posible la separación de la mezcla de estándares de forma reproducible, se optó por usar un capilar de longitud efectiva mayor que fue de 107 cm y longitud total igual a 117 cm, lo cual separó los analitos con una resolución notable, (**Figura 20**). Sin embargo, el tiempo de análisis también aumentó de forma considerable con respecto a la investigación tomada como referencia, ya que al decrecer la intensidad de corriente, la velocidad de migración también lo hace, retardando el paso de los analitos por el detector. Dado que en la corrida se pueden distinguir 13 señales, se continuó realizando pruebas para mejorar la resolución con este capilar.



**Figura 20.** Electroferograma de la mezcla de analitos estándar separada con búfer de boratos 100 mM, pH 8; 5 mM  $\alpha$ -CD y 5 mM de HP  $\alpha$ -CD; 30 kV, detectándose a 210 nm; capilar de 107 cm de LE.



En la **Figura 21**, se observa la señal de un marcador neutro (metanol), bajo las condiciones de la **Figura 20**. Debido a la señal que se observó, podemos aseverar que los picos con  $t_R < 27$  min, son de naturaleza catiónica y con  $t_R > 27$  min, aniónica.



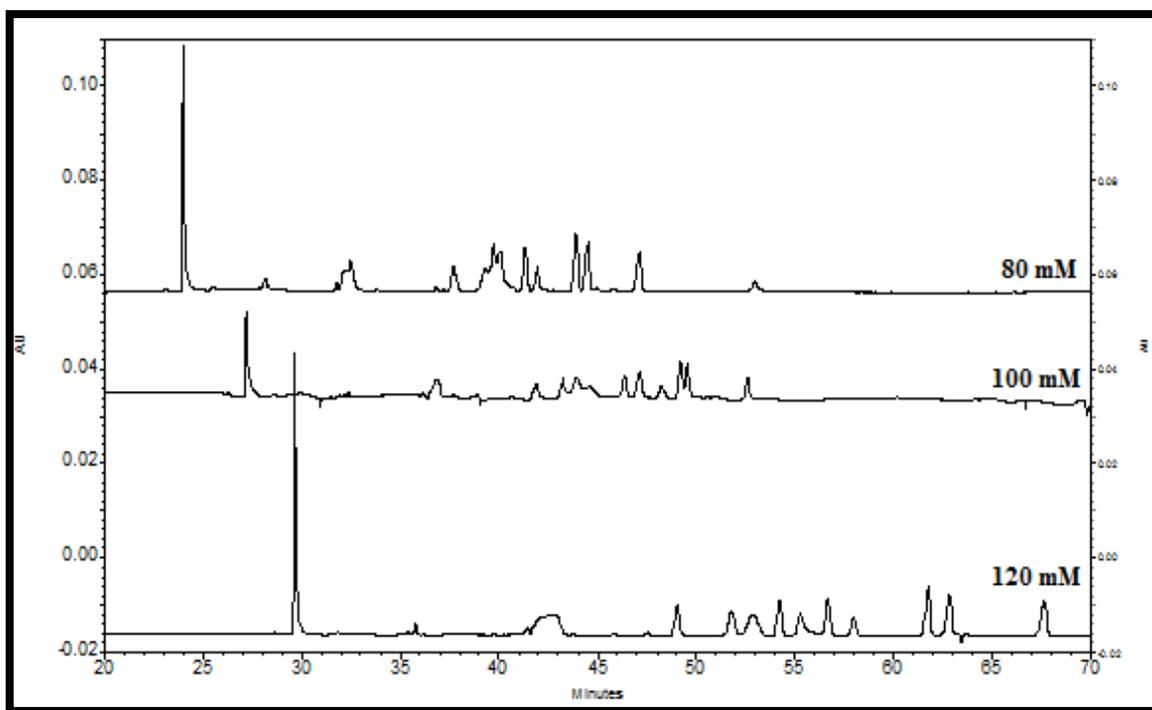
*Figura 21. Respuesta de una molécula neutra (metanol), a las condiciones de la Figura No. 20.*

## 5.2 Estudio de las condiciones de la técnica

Una vez que se mejoró la resolución de las señales al utilizar un capilar más largo, se consideró la posibilidad de mejorar la separación al variar otros parámetros directamente relacionados con el medio, modificando la interacción con los analitos, ya sea por cambios en la intensidad de corriente, en la carga de las moléculas o en la viscosidad del medio y complejos formados con los aditivos.

### 5.2.1 Influencia de la fuerza iónica del búfer

Se probó la optimización del método al cambiar la fuerza iónica del búfer, haciendo uso de concentraciones en un rango de 80 a 120 mM. Ya que una fuerza iónica pequeña reduce la corriente global, la producción de calor es menor pero la difusión y pérdida de resolución aumentan, (Castillo, 2005). Lo anterior queda evidenciado en la **Figura 22**, que expone la influencia de la concentración del búfer en la separación de la mezcla de antibióticos.



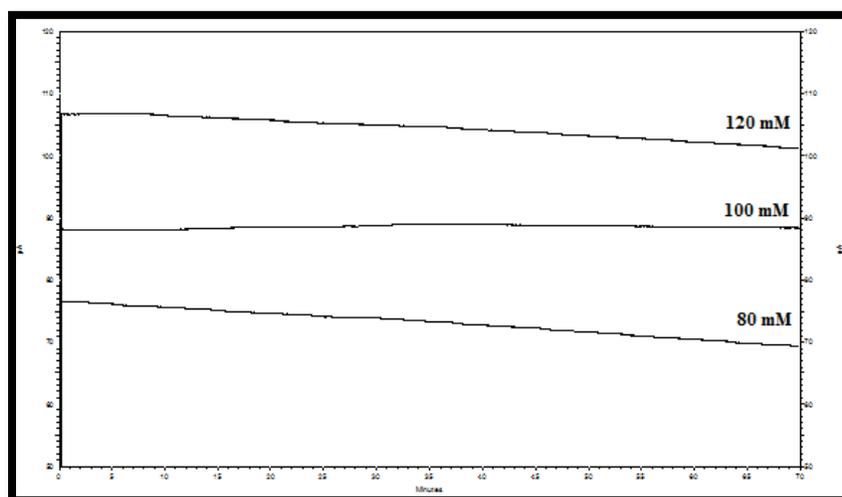
**Figura 22.** *Electroferograma de la influencia de la concentración del búfer en la separación de los antibióticos. Condiciones como en la Figura 20, excepto la concentración del búfer.*

A una concentración de 80 mM, disminuye la resolución pues la resistencia de las moléculas al flujo decrece; a pesar de que el tiempo de análisis es menor, no es posible identificar todos los analitos ya que aparentemente coeluyen. Con el búfer de 120 mM, la resolución es mayor, pero los picos sufren dispersión por el incremento del calor dentro del



capilar, haciéndose menos eficientes; aunque la resolución en los picos es mayor (algunos con respuestas muy bajas), se descartó la concentración de 120 mM, pues se encuentra cerca de la concentración de saturación (solubilidad) de los boratos que es de 2.56 g/100 mL, observándose frecuentemente sal precipitada en el electrolito soporte y haciendo poco práctica su preparación y uso. Dado que el búfer separación es de boratos, es muy probable que también éste formando interacciones (complejos) con algunos de los analitos de nuestro estudio (clortetraciclina), ya que es bien sabido que los boratos forman complejos con dioles.

En la **Figura 23**, se expone claramente que la relación entre la fuerza iónica y la corriente dentro del capilar es proporcional, ya que a mayor concentración, la corriente aumenta y debido a que los analitos se encuentran, en su mayoría, en forma aniónica, el tiempo de análisis aumenta. También por este motivo, se descartó la concentración de 120 mM pues el tiempo de análisis aumenta alrededor de 15 minutos, haciendo menos práctico el método.



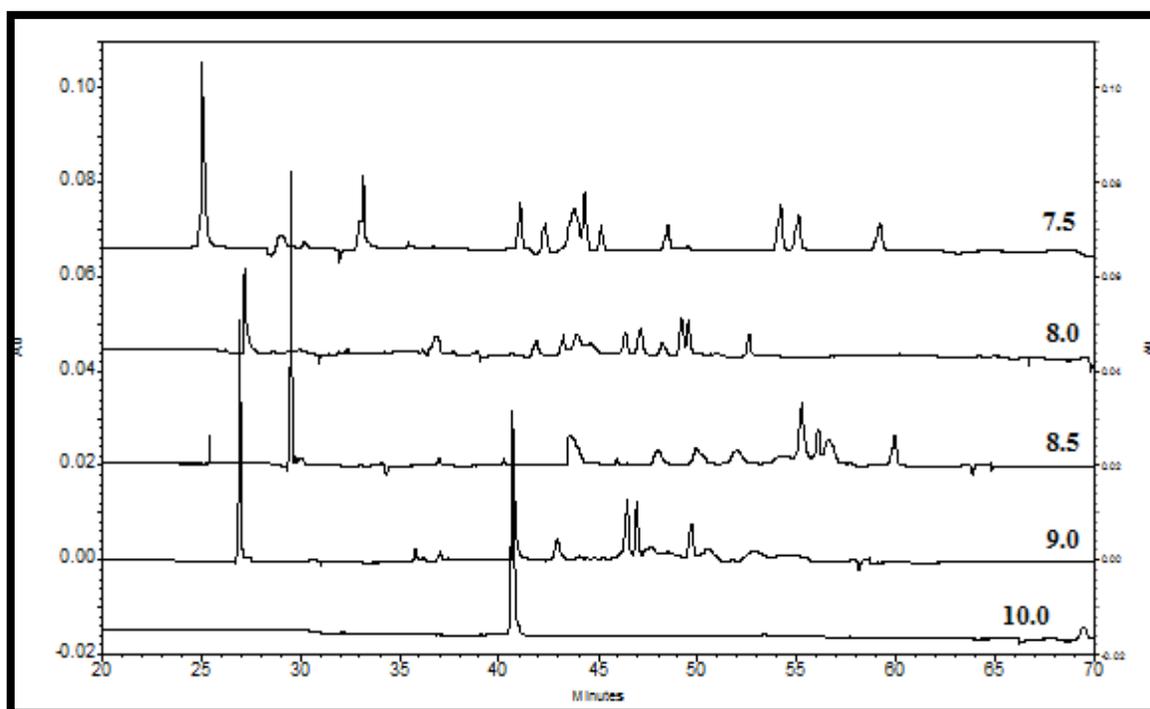
*Figura 23. Corrientes obtenidas en las corridas de la Figura 22.*

### 5.2.2 Influencia del pH del búfer

Como sabemos, los analitos en nuestro sistema se separan de acuerdo a la relación carga/masa que generan diferencias de movilidad entre ellos, esto hace que el pH sea una

condición de suma importancia en la separación, ya que de su valor depende la carga de las moléculas y por lo tanto su velocidad de migración. Debido a que los pKa's de los antibióticos son muy variados, se realizaron pruebas de la influencia de pH, partiendo de las condiciones de la **Figura 20**.

En la **Figura 24**, se puede observar que la mayor resolución se obtiene a pH 8.0, posiblemente debido a que a este pH la carga negativa de nuestros analitos es mayor y son atraídos con más fuerza hacia el ánodo. Con lo anterior, la movilidad negativa de las moléculas se opone al máximo al FEO obtenido a pH alcalinos, alentando la movilidad total y permitiendo una mejor separación. En el caso de pH igual a 7.5 y 8.5, los picos se observan dispersos e irregulares, lo cual no favorece al experimento. A un pH de 9.0, aparentemente el FEO arrastra más rápidamente a los analitos y las señales se detectan a un tiempo menor, pero con una baja resolución. Contrario a lo que sucede a pH 10.0, donde el tiempo de retención se extiende demasiado.



**Figura 24.** Electroferograma de influencia del pH del búfer en la separación de los antibióticos. Condiciones como en la Figura 20, excepto el pH.



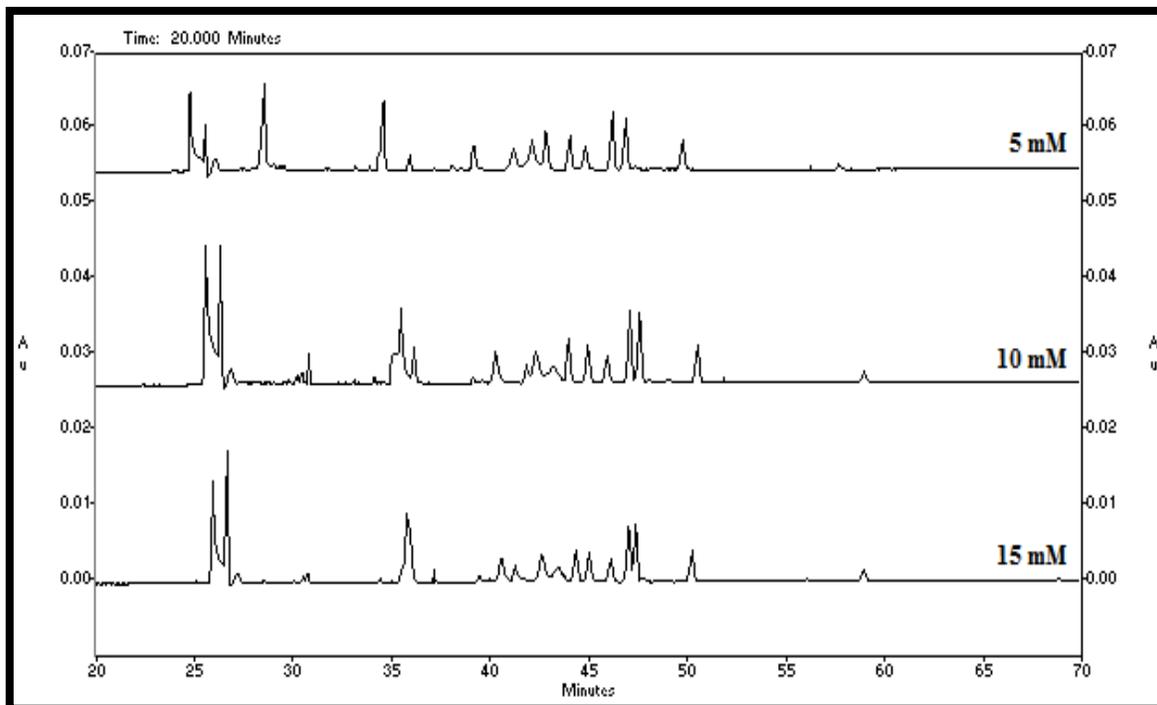
Es importante recalcar que al cambiar el pH se puede afectar el orden de elusión de los antibióticos, ya que de acuerdo a sus valores de pKa es posible que cambie la carga y por lo tanto su movilidad neta.

### 5.2.3 Influencia de la concentración de aditivos (HP $\alpha$ -CD y $\alpha$ -CD)

Las ciclodextrinas son polisacáridos macrocíclicos neutros que tienen forma de cono hueco, las cuales permiten la formación de complejos de inclusión, (**Dodziuk, 2006**). Al adicionarlas en el búfer, las cavidades de las CD no están vacías, sino que contienen de dos a ocho moléculas de agua, las cuales al momento de la separación, son sustituidas, formando complejos de inclusión con las moléculas a separar, (**Castagnino, 1999**). Con ello, los analitos interactúan de forma diferenciada con el interior hidrofóbico o con el exterior hidrofílico de la ciclodextrina, dependiendo del tamaño de la cavidad y de la afinidad con ella, incrementando en cierta medida la selectividad. Gracias a estas propiedades, es posible separar moléculas de estructura similar.

Con la finalidad de lograr una separación más selectiva dada por la interacción con un grupo hidroxipropilo, y debido a que éste aditivo mejora la separación en las señales que eluyen al final de la corrida (**Castillo, 2010**), se estudió la influencia de la concentración de HP  $\alpha$ -CD. Reproduciendo nosotros estos experimentos en seguida:

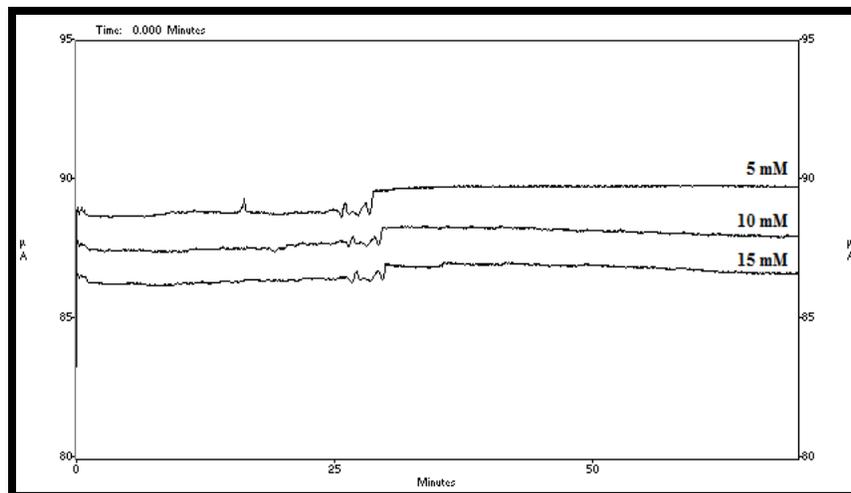
En la **Figura 25**, se muestran las corridas a diferentes concentraciones del aditivo mencionado; al incrementar la concentración de HP  $\alpha$ -CD, aumenta la resolución de las señales, pues existe una interacción diferenciada entre los analitos y el ligando. A concentración 15 mM, podemos observar que las señales obtenidas a los 48 minutos aproximadamente, pierden ligeramente su resolución con respecto a 10 mM, sin embargo, al  $t_{\mu}$  de aproximadamente 42 minutos, se resuelve una señal más, debido a los complejos resultantes entre la CD y los antibióticos, dando un total de 15 picos, por lo cual se estableció esta condición como óptima para el análisis.



**Figura 25.** Electroferograma de la influencia de la concentración de HP  $\alpha$ -CD en la separación de los antibióticos. Condiciones como en la Figura 20, concentración de HP  $\alpha$ -CD variable.

Aun cuando existe esta unión CD-analito, que puede ser por enlaces de tipo Van Deer Waals o puente de hidrógeno, lo importante para el estudio no es la fuerza con la que interaccionan, sino el aumento en las diferencias de movilidad entre los 14 analitos creada por los complejos, con respecto a la movilidad que presentan los antibióticos sin los aditivos.

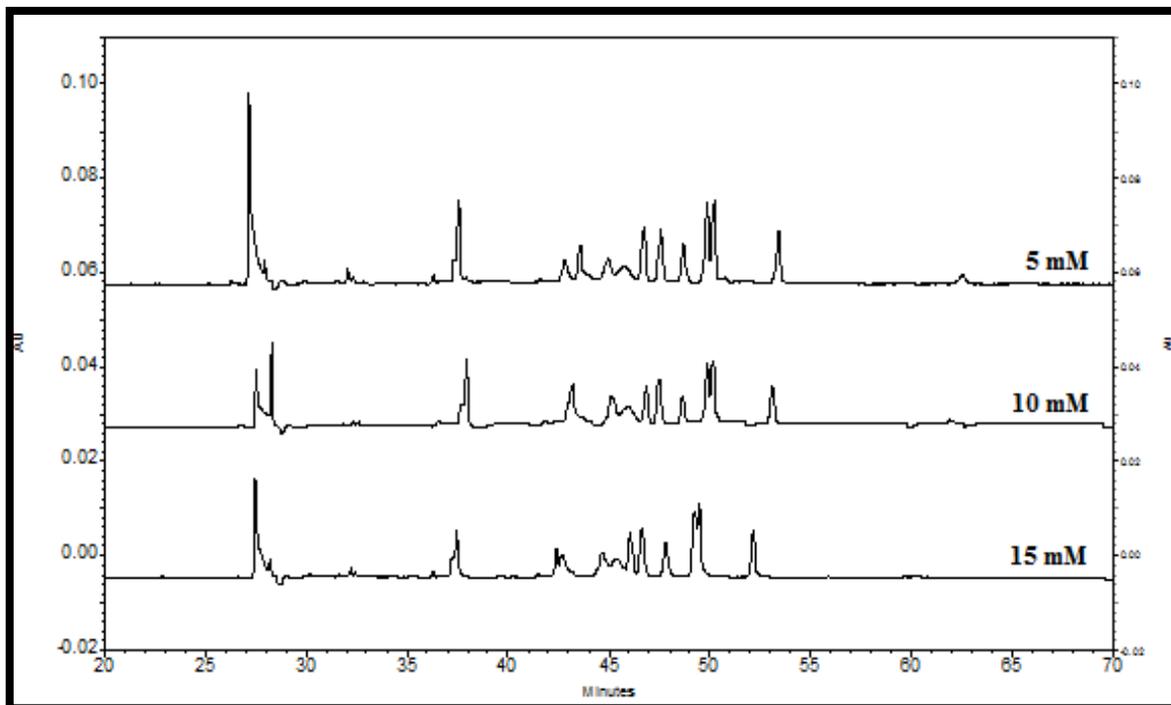
La leve pérdida de resolución después de los 44 minutos, puede deberse a que la viscosidad del medio aumenta a mayor concentración del aditivo, haciendo mayor la fuerza de fricción entre los complejos de inclusión y el FEO, lo cual dificulta la separación de éstos analitos. En la **Figura 26**, se comprueba lo anterior, ya que a una concentración mayor de la CD, la corriente disminuye, evidenciando el aumento en la viscosidad del medio.



**Figura 26.** *Corrientes obtenidas de la separación de antibióticos a las condiciones de la Figura 20; concentración de HP  $\alpha$ -CD variable.*

Finalmente, con el objetivo de mejorar la resolución en las señales, se realizaron pruebas sobre la influencia de la concentración de  $\alpha$  - CD, siguiendo el principio de la variable anterior. Aunque en este caso el diámetro de la cavidad del polisacárido es el mismo que para la HP  $\alpha$ -CD, la interacción con el analito es diferente, debido a que no está sustituido.

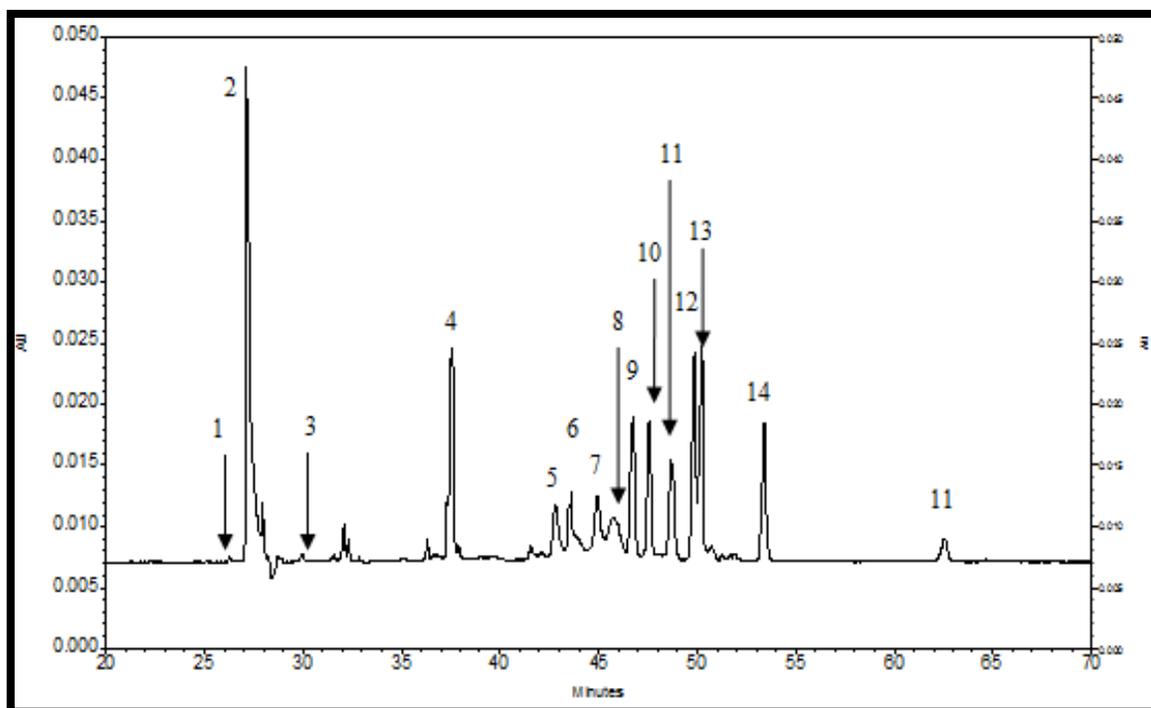
En la **Figura 27**, se muestra que con el incremento en la concentración de la  $\alpha$ -CD, no hay mejoría en la resolución, al contrario, las señales se juntan hasta quedar casi traslapadas. Del mismo modo que el experimento anterior, al incrementar la concentración del aditivo, crece la viscosidad y con esto la corriente disminuye, dificultando la separación de los complejos. Por tanto, se conservó como óptima la concentración de 5 mM.



**Figura 27. Electroferograma de la influencia de la concentración de  $\alpha$ -CD en la separación de los antibióticos. Condiciones como en la Figura 20, concentración de  $\alpha$ -CD variable.**

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas del experimento, se corrieron los analitos estándar de manera individual para su identificación. En la **Figura 28**, se puede observar el electroferograma de la separación de antibióticos a las condiciones seleccionadas como óptimas y de acuerdo al electroferograma **Anexo 2**, el orden de elusión fue el siguiente: 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, 14) penicilina G.

Aunque entre algunas señales la resolución no es muy grande, bajo este método será posible identificar los antibióticos contenidos en una muestra de leche que sea tratada adecuadamente, pudiéndolo aplicar al monitoreo de la presencia de antibióticos en leches comerciales.



**Figura 28.** Electroferograma de la mezcla de antibióticos separada con búfer de boratos 100 mM, pH 8; 5 mM  $\alpha$ -CD y 15 mM de HP  $\alpha$ -CD; 30 kV, detectándose a 210 nm; capilar de 107 cm de LE.

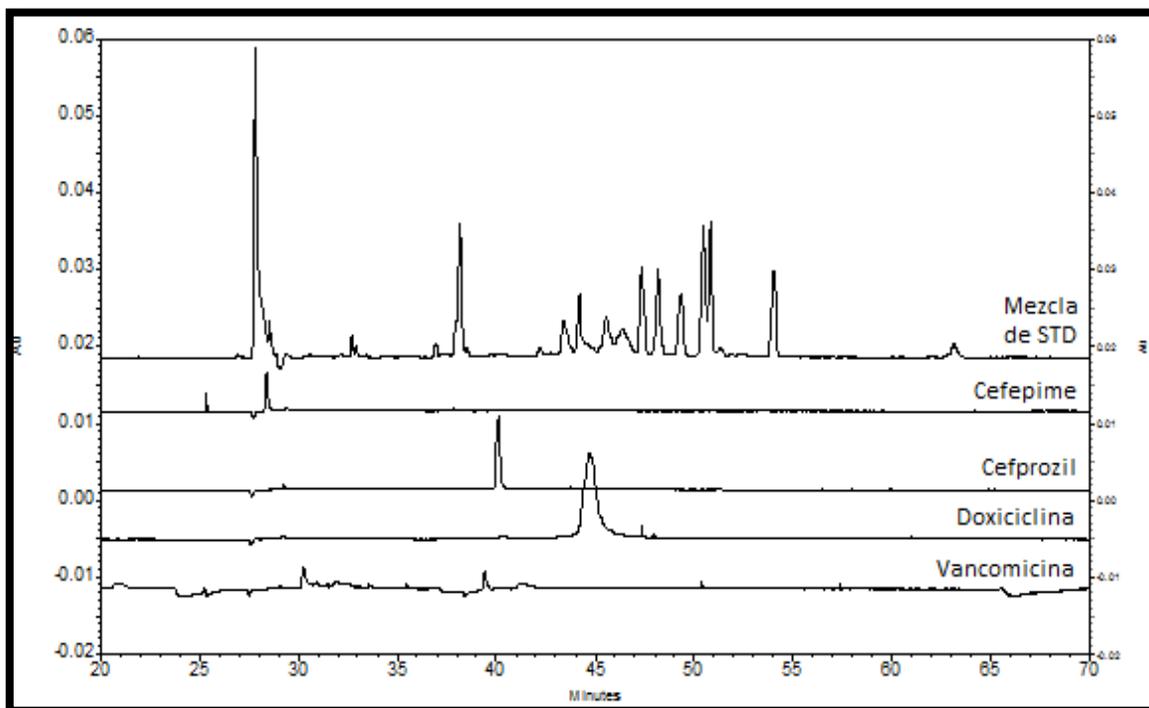
### 5.3 Búsqueda de un estándar interno (EI)

Para realizar la determinación de los antibióticos, se contempló el uso de un EI, con el objetivo de minimizar la variabilidad en las áreas, debido a diferencias de viscosidad de las distintas leches por analizar así como al pretratamiento al que serán sometidas. Para que una sustancia sea utilizada como EI debe dar una señal que se encuentre dentro de los tiempos de elución de los analitos, pero sin traslaparse con las señales, además de que su estructura, en lo que cabe, debe parecerse a nuestros analitos y nunca estar contenida en la matriz, (Skoog, 2008).

Por lo anterior se probaron cuatro antibióticos (Cefepime, Cefprozil, Doxiciclina y Vancomicina), que no son usados comúnmente en el tratamiento de infecciones del ganado y son similares en estructura a los analitos de interés. En la **Figura 29**, se muestran las

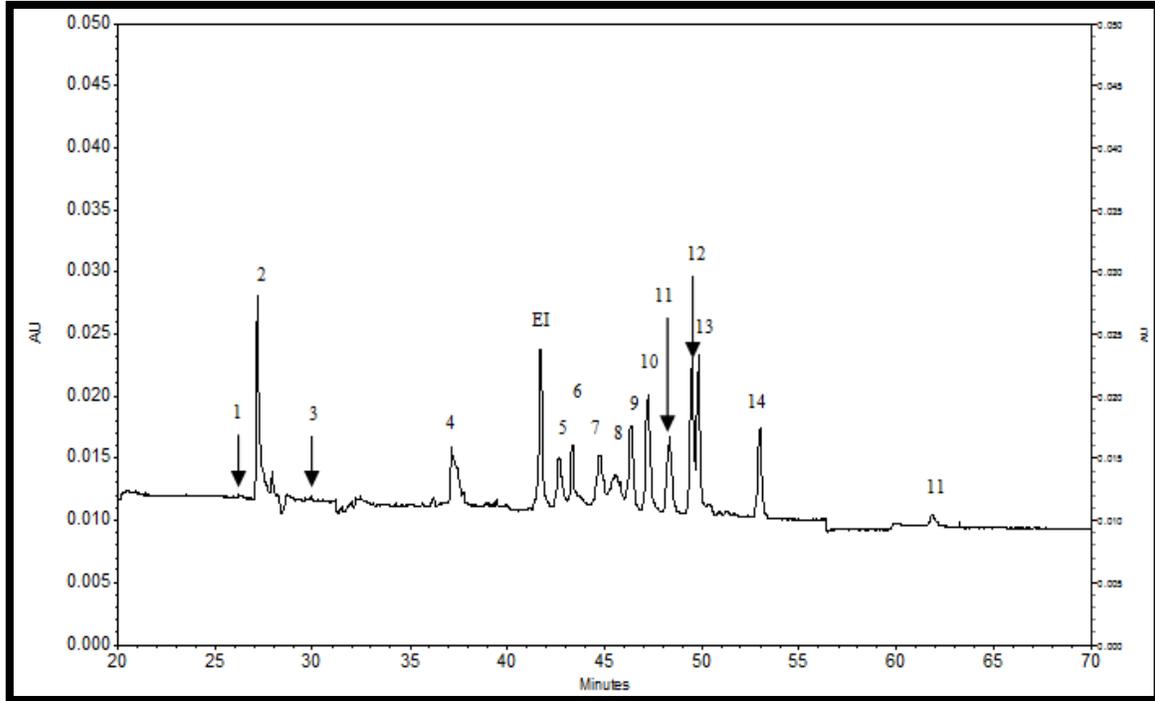


señales de las sustancias probadas como EI a las condiciones determinadas como óptimas en el experimento anterior.



*Figura 29. Electroferograma de la mezcla de antibióticos y moléculas probadas como posibles EI. Condiciones como en la Figura 28.*

Podemos ver que a las condiciones establecidas, únicamente el Cefprozil (de la familia de las cefalosporinas), está aislado, sin interferir con otras señales. Para comprobarlo, se realizó una mezcla de los analitos con el EI, cuya señal es rastreable, tal como se muestra en la **Figura 30**.



**Figura 30. Electroferograma de la mezcla de antibióticos con EI, donde**  
**1) Espiramicina, 2) Trimetoprim, 3) Tilosina, 4) Enrofloxacina, 5) Tetraciclina,**  
**6) Cloranfenicol, 7) Clortetraciclina, 8) Oxitetraciclina, 9) Amoxicilina, 10) Cefalexina,**  
**11) Ampicilina, 12) Dicloxacilina, 13) Oxacilina, 14) Penicilina G, EI) Cefprozil.**  
**Condiciones como en la Figura 28.**



---

## 6. Pretratamiento de la muestra de leche entera de vaca

Una vez definidas las condiciones óptimas de separación de los 14 antibióticos, se procedió con la búsqueda del método de pretratamiento de la muestra, para convertirla a una forma adecuada para el análisis. La leche, que es la matriz en que se enfoca el trabajo, es muy compleja ya que está constituida por una amplia variedad compuestos.

### 6.1 Eliminación de proteínas

Para iniciar con el tratamiento de la muestra, es necesario su estudio y comprensión, con el fin de determinar el constituyente o fracción en la cual se pudiesen encontrar los fármacos que se ha fijado rastrear. Basándose en sus características, aspectos farmacológicos, forma farmacéutica y vía de administración, es posible suponer que parte de estas moléculas se encontrarán de forma libre en la fracción acuosa de la matriz (la cual es casi un 74% de su totalidad).

Como se sabe, las vías de administración de antibióticos en los bovinos son variadas, sin embargo, la contaminación de leche por dichas moléculas (principalmente en forma libre), es más común en los casos de mastitis, siendo las vías intramuscular e intramamaria las de mayor incidencia. Es así que la fase en la cual se realizó el estudio es el suero lácteo, el cual es un derivado de la leche obtenido tras la eliminación de proteínas y materia grasa, (**Shlimme, 2002**). Al descartar el mayor número de dichos componentes, es posible obtener la fase acuosa de la muestra, disminuyendo los interferentes de la matriz sobre la detección de los analitos; esto puede llevarse a cabo por distintas metodologías.

Para la eliminación de la mayor parte de las proteínas presentes en la leche, es necesaria la acidificación de la muestra; este cambio en el medio provoca modificaciones estructurales sobre las biomoléculas (principalmente en caseínas y algunas seroproteínas), las cuales comienzan a desnaturalizarse a pH de 4.6 o aproximado, derivando en su precipitación, (**Tompson, 2009**). Este cambio de acidez se puede efectuar con distintos compuestos, como los ácidos acético, tricloroacético, clorhídrico, perclórico, láctico,



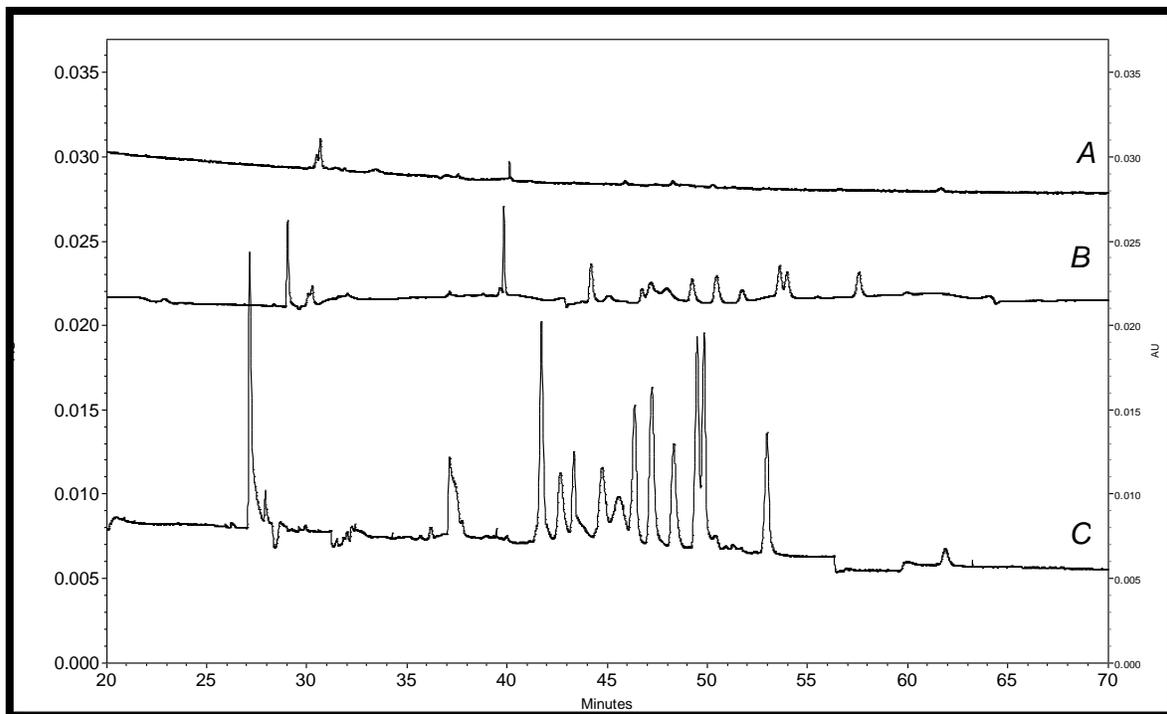
---

sulfúrico y algunos solventes orgánicos como el acetonitrilo, entre otros, (**Castillo, 2010; Vera-Candiotti, 2010**). En este estudio, la obtención del suero empleado se realizó precipitando las caseínas con ácido tricloroacético de concentración 2 M, que al combinarse con una centrifugación da lugar a la formación de tres fases en el contenedor: la fase superior correspondiente a las grasas, fase media al suero e inferior a las proteínas. Dicha técnica de separación se basa en la diferencia de masa y forma de las partículas presentes en una mezcla, al ser sometidas a una gravedad modificada por la acción de una fuerza centrífuga, (**Buitrago, 2004**).

La grasa se eliminó al enfriar la leche al congelador y ya solidificada se retiró de la muestra. Una vez establecidas las condiciones de eliminación de proteínas, se aplicó en pequeñas cantidades de leche comercial, lográndose retirar una gran cantidad de ellas que quedan como precipitado en el tubo después de la centrifugación. Con el suero obtenido, se evidenció el comportamiento de la matriz en ausencia y presencia de los analitos, sometiéndola a las condiciones de la **Figura 28**.

En la **Figura 31 (A)**, se observa el comportamiento del suero sin adición de antibióticos, donde se evidencian sólo un par de señales particulares que son aportadas por este. Con ello, podemos decir que la metodología de extracción de suero, podría tener efectos favorables para el trabajo debido a que no hay presencia de interferentes relevantes. En la corrida **(B)**, se aprecia también el electroferograma correspondiente al suero adicionado con la mezcla de STD, donde los picos detectados son atribuidos a los antibióticos presentes en la muestra. Finalmente en el electroferograma **(C)** se corrió la mezcla de estándares, observándose por comparación con las señales en leche que hay un recobro bajo en las muestras de suero adicionado, debido al pretratamiento de la muestra.

Una vez conocido el comportamiento de la matriz al interactuar con los analitos, se observaron señales de tamaño reducido, por lo que se consideró la implementación de un procedimiento de preconcentración sobre la muestra, para poder así, tanto aumentar el tamaño de las señales visibles como evidenciar las que no es posible apreciar.



**Figura 31.** Estudio del comportamiento del suero recién extraído: A) sin adición de ATB, B) adicionado con STD, C) mezcla de STD estándares (sistema optimizado). Condiciones como en la Figura 28.

## 6.2 Metodología de preconcentración

Tomando en cuenta la metodología y equipo disponible, se pensó en una forma simple de llevar a cabo la preconcentración basada en la eliminación del agua, que como se sabe, es el componente mayoritario de la leche. Lo anterior dio lugar a la evaporación, que es dependiente de la temperatura así como de la presión del medio en que se encuentre. A condiciones normales, este fenómeno ocurre de forma lenta, por tanto es que aumentando la temperatura ligeramente, es posible acelerar el proceso de cambio de fase del líquido sin llegar al punto de ebullición.

Se comenzó con la metodología de preconcentración, haciendo uso de algunos equipos disponibles en el laboratorio, como fueron la parrilla eléctrica, un evaporador por flujo de nitrógeno y un equipo “parcial” de destilación. Tomando en cuenta el hecho de que



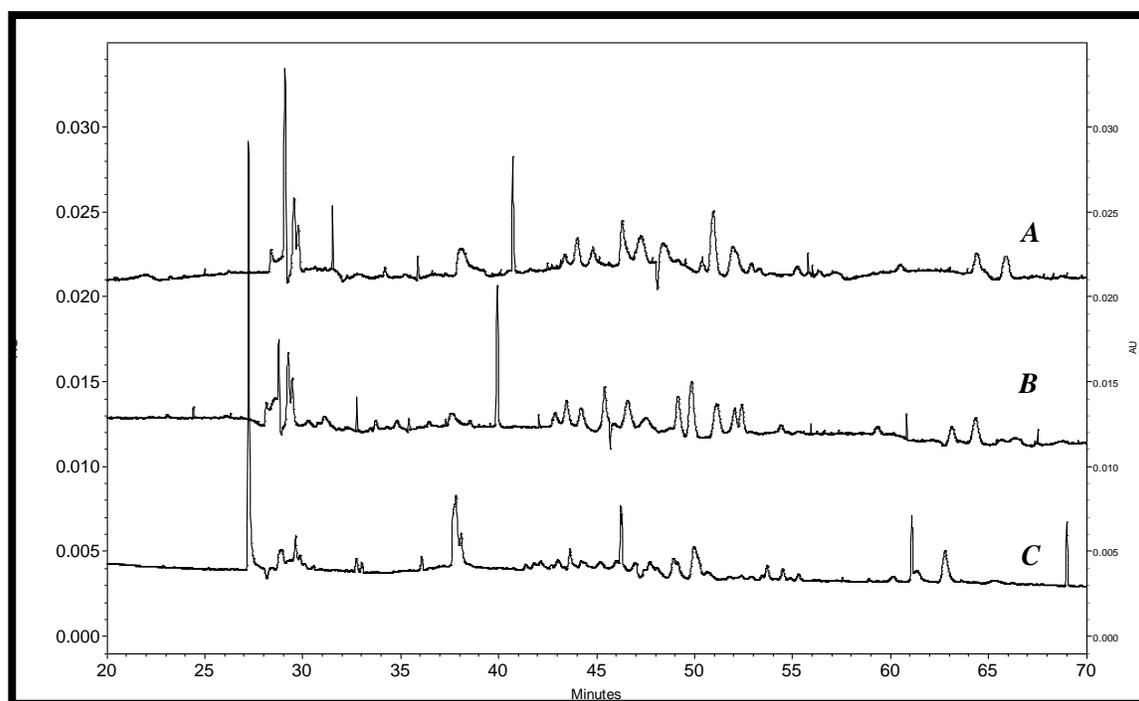
no existen reportes certeros sobre la degradación de los antibióticos por acción de la temperatura, se discriminó este efecto, sin embargo, se evitó llevarlos a niveles elevados de temperatura durante el proceso.

La sustracción del agua se llevó al máximo (procurando llevar a sequedad), quedando un concentrado de aspecto sólido que va de tonos blancos a pardos, debido a que las proteínas séricas resistentes a la acidificación se desnaturalizan con el calor, por tanto se insolubilizan y precipitan, (**Shlimme, 2002**). Se puede detectar este fenómeno al observar partículas suspendidas en el suero durante el proceso de calentamiento.

En la **Figura 32**, es posible observar el comportamiento de las muestras de suero adicionado con antibióticos, sometidas a tratamiento térmico, cuyas señales incrementan en comparación con el electroferograma del suero adicionado sin preconcentración evidenciado en la **Figura 31 (B)**. Por lo anterior, se puede decir que el proceso para aumentar la respuesta del analito tiene efectos favorables, sin embargo las alturas de las señales aún no son comparables con las de la corrida de la **Figura 30**, a pesar de estar adicionadas con la misma concentración de STD. La corrida (**C**), correspondiente al equipo “rotavapor”, no aporta resultados alentadores ya que no se puede controlar de forma efectiva la temperatura empleada. Se pueden advertir algunas señales, aunque no están bien definidas como en las otras dos metodologías.

Por otro lado, el equipo evaporador resulta útil debido a la automatización, teniendo como inconveniente que la máxima eliminación de agua concluye después de un periodo muy largo de exposición de la muestra (aproximadamente 20 min/mL), haciendo poco práctico el experimento. Otro hecho a considerar en el empleo de este equipo, es que no se logra llevar a sequedad total, sin embargo presenta la ventaja de poder controlar la temperatura de manera precisa. Las señales apreciadas en la corrida (**A**) se observan mejor que las del tratamiento con destilador, encontrando picos más separados, sin embargo, no así en comparación con resultados obtenidos con el uso de la parrilla.

El tratamiento en parrilla resultó ser una opción viable ya que se observan picos mejor separados y definidos en comparación con las otras dos metodologías de tratamiento, basado en las evidencias presentes en el electroferograma (**B**). La forma de preconcentrar es relativamente rápida llevando a sequedad total, además aporta datos alentadores debido a que es evidente el aumento en tamaño de la mayoría de las señales, así como la mejoría en la eficiencia de los picos, sin embargo, es necesario optimizar el método de preconcentración para identificar las señales a una concentración alrededor de los límites expuestos en la **Tabla 7**.



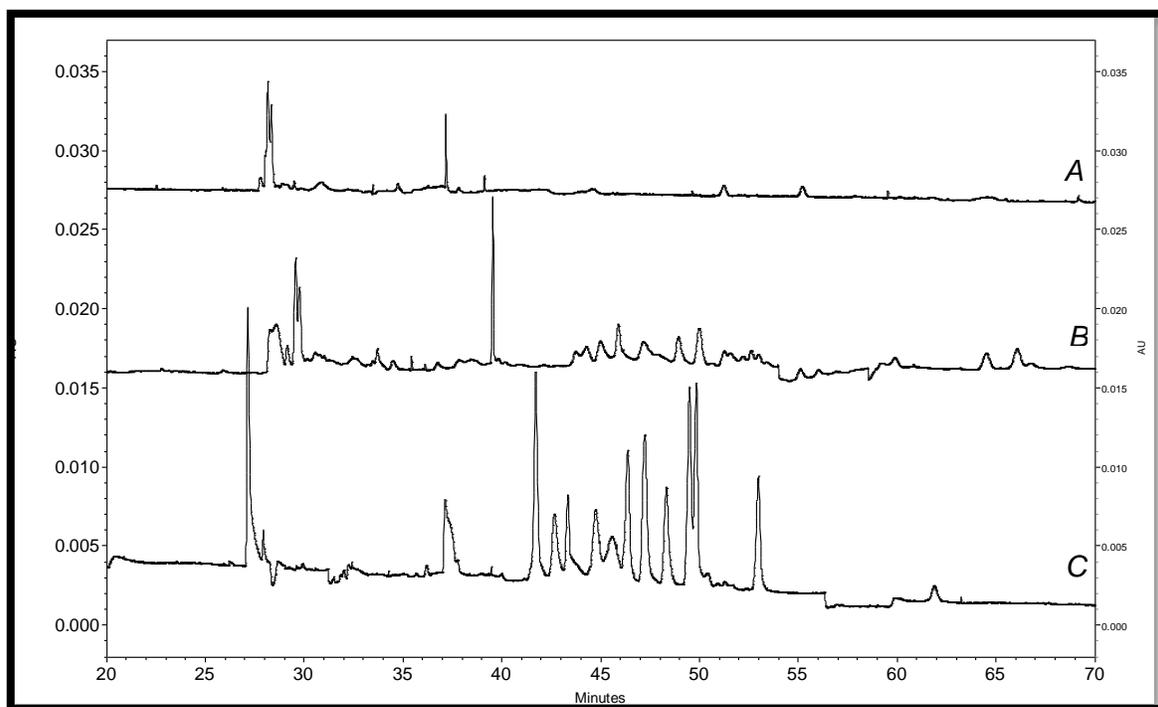
**Figura 32.** *Electroferogramas de suero lácteo adicionado con ATB sometido a pretratamiento en diferentes equipos: A) Evaporador y B) Parrilla, C) Rotavapor (destilador).*

### 6.2.1 Interacción analito-matriz bajo condiciones de preconcentración

Una vez establecida como óptima la metodología de preconcentración por parrilla, se realizó el análisis del comportamiento que presenta el suero sin antibióticos, así como la muestra adicionada con los STD bajo estas condiciones. Se contrastaron dichas corridas

con los electroferogramas correspondientes a la muestra sin preconcentración, con el fin de definir de mejor forma las señales correspondientes a los antibióticos y tratar de descartar las propias de la muestra.

En la **Figura 33 (A)** correspondiente al suero preconcentrado, se pueden apreciar señales similares a las observadas en el electroferograma de la **Figura 31 (A)**, cuyas tendencias de salida son semejantes principalmente entre los 30 y 40 minutos. Basándose en el aumento significativo del tamaño de los picos, se puede decir que la concentración de las moléculas aumenta posterior al tratamiento.



**Figura 33. Estudio del comportamiento de la muestra bajo pretratamiento, señales:**  
**A) suero preconcentrado, b) Suero adicionado con STD preconcentrado, c) Mezcla de STD. Mismas condiciones de separación a la figura 30.**

En la corrida **(B)** se aprecian señales debidas a los antibióticos adicionados en el suero preconcentrado, cuya tendencia de elución es similar a la **Figura 31 (B)**. Tras someter la muestra a tratamiento, los picos incrementan haciéndose detectables algunos que



no se apreciaban, cumpliendo con el objetivo de aumentar la concentración. La separación de los analitos es buena, sin embargo no guarda mucha correspondencia con la referencia (C) (lectura de la mezcla de STD), ya que difieren en gran medida las alturas, aun cuando la concentración de analitos en ambas muestras es igual.

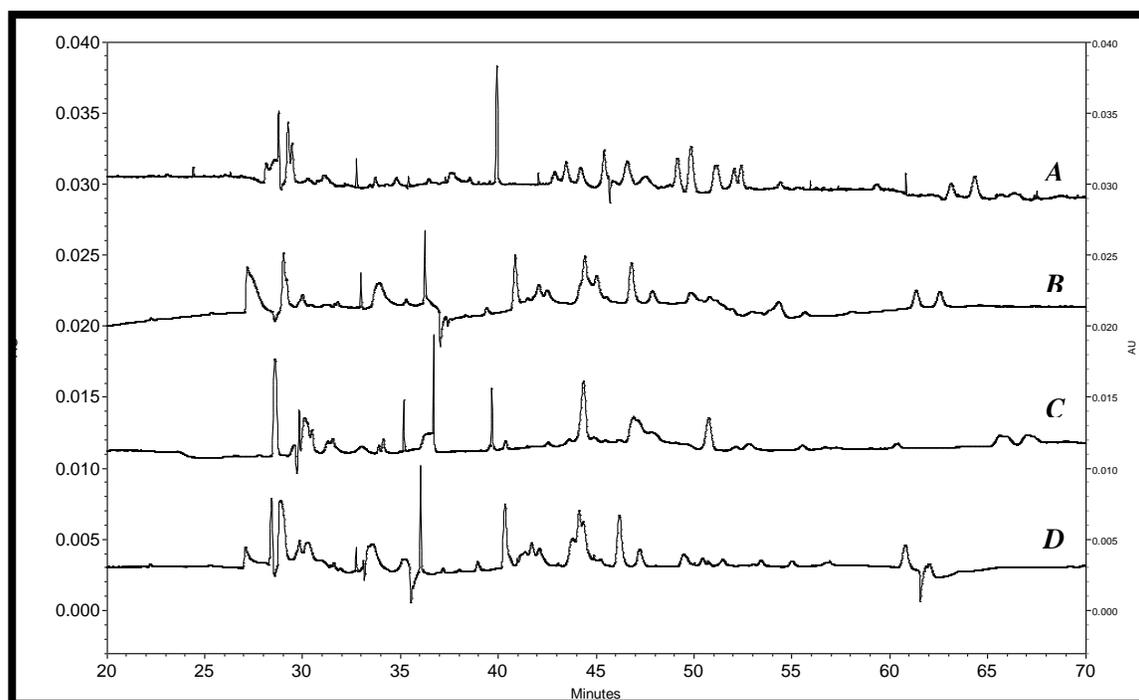
Observado este comportamiento, se estableció que a pesar de que el tratamiento de preconcentración muestra una mejoría en las señales, aún existe alguna condición en la metodología que impide detectar la concentración real de analitos adicionada a las muestras. Por ello, se comenzó con el estudio de variables que pudieran derivar en la mejoría del experimento, para así obtener lecturas más afines a la **Figura 30**, tales como el medio de reconstitución del concentrado y la temperatura a la que se lleva a cabo la preconcentración.

### 6.2.2 Medio de reconstitución

El medio en el cual se reconstituye la muestra una vez que se llevó a sequedad, es un parámetro de gran relevancia en la detección del analito de interés por EC, ya que de no estar en solución no es detectable; la solubilidad de cada una de las moléculas de interés para este experimento es diferente entre sí (**Index Merck**), dependiendo de sus características químicas.

En la **Figura 34**, se puede apreciar el comportamiento de los medios de reconstitución con los que se trabajó. En el caso del uso del búfer de separación (B), se observan algunas señales de tamaño considerable, no obstante el ensanchamiento que presentan sugiere que están coeluyendo, lo cual no es favorable para su identificación. Se puede advertir una disminución en los tiempos de salida con respecto al electroferograma de referencia (**Figura 30**), por el contrario, en la prueba con TCA 2M (C), se observa un retraso en el tiempo de elución, que no es favorable a las condiciones electroforéticas establecidas.

Al usar como medio de reconstitución el metanol al 30%, se esperaba mejorar la altura de las señales debido a que algunos de los analitos tienen mejor solubilidad en este solvente, mejorando la apreciación de las señales. En el electroferograma correspondiente a esta prueba (**D**), se puede observar una posible coelución de los picos, basados en que no hay una buena resolución entre las señales, impidiendo distinción entre ellas lo que hace que se descarte como opción a ser empleada.



**Figura 34. Influencia del medio de reconstitución. Suero adicionado con STD, reconstituidos en distintos medios. A) Agua, B) Búfer de separación, C) TCA 2M, D) Metanol 30%. Condiciones de separación iguales a la figura 30.**

El agua (**A**) que es el medio de reconstitución empleado hasta el momento, resultó ser el que aporta mejores resultados, ya que se observan picos con buena resolución permitiendo su identificación; lo anterior indica que la solubilidad es mejor, puesto que la mayoría de las señales apreciadas presentan concordancia en la tendencia de salida con el electroferograma de referencia. A pesar de que las corridas (**B**), (**C**) y (**D**) tienen una tendencia similar entre sí y se obtiene mejoría en las respuestas con respecto a (**A**), no es



posible identificar todos los analitos, quedando el agua como la mejor opción de reconstitución.

Una vez establecido el medio de reconstitución a emplear, es preciso iniciar con el análisis de la temperatura como parámetro que pudiese ser de relevancia para detectar a los analitos.

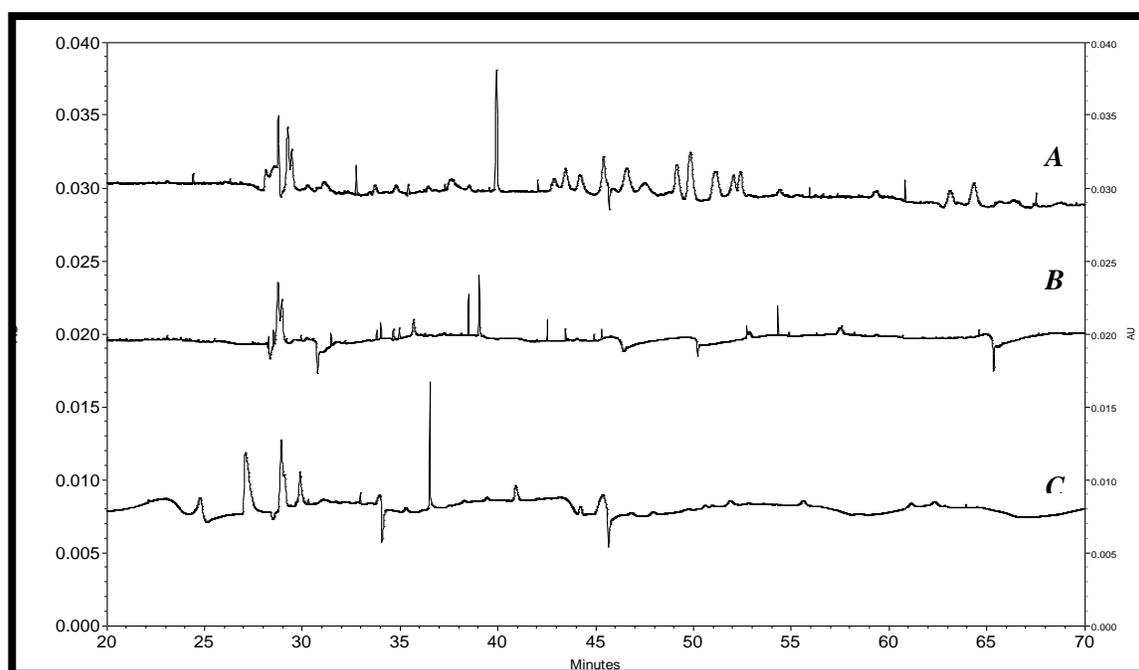
### 6.2.3 Efecto de la temperatura sobre el proceso de preconcentración

Otra condición que se analizó para determinar su importancia en la metodología, fue la temperatura de preconcentración. Sin embargo la experimentación imposibilitó someter la muestra a temperaturas muy elevadas, debido a complicaciones que se pueden observar en el proceso, como la proyección del líquido, provocando una posible pérdida de analitos.

Se planteó someter tres muestras a distintas temperaturas de preconcentración menores al punto de ebullición, para poder así observar bajo distintas condiciones de calentamiento, si el comportamiento de las señales correspondientes a los antibióticos, presenta variaciones significativas. Debido a que el tratamiento en parrilla sufre de ligeras fluctuaciones en la temperatura durante su desarrollo, fue necesario plantear las pruebas en distintos intervalos de temperatura: **65-70 °C**, **75-80 °C** y **85-90 °C**.

En la **Figura 35**, se aprecian las muestras sometidas a los tres rangos de temperatura establecidos, evidenciando que en la corrida (**A**), hay un mayor número de señales en comparación con el electroferograma (**B**), donde solo algunos picos se observan, y los demás son imperceptibles descartando este intervalo de temperaturas para realizar la preconcentración. Por otro lado en el intervalo de **85-90 °C** (**C**), se aprecian respuestas principalmente entre los 25 y 40 minutos de separación, donde aun cuando existe un aumento significativo en las alturas y resolución de estas señales, no es así con el resto de los presuntos antibióticos, estableciendo así al primer intervalo de temperatura como el adecuado.

En la corrida (A) existe un mayor número de señales en comparación con el electroferograma de la **Figura 33 (B)**, correspondiente al suero adicionado con STD preconcentrado cuyas condiciones son similares. Finalmente, el hecho de que haya menor número de señales en los electroferogramas (B) y (C) con respecto a (A), sugiere que los fármacos, en efecto, sufren algún tipo de alteración con la temperatura, recordando que no se han reportado datos significativos y tampoco valores sobre la termoestabilidad de los antibióticos sometidos a cierto grado de calentamiento. Los únicos datos hallados en las referencias, son alusivos al proceso de pasteurización que implican tiempos cortos de exposición de la leche, por ejemplo la Penicilina, Clortetraciclina y Oxitetraciclina que a temperaturas de 100 °C llegan a degradarse 50, 66 y 90% respectivamente, (**Margariños, 2010 y Kennedy, 1998**).



**Figura 35. Influencia de temperatura de preconcentración. Señales obtenidas bajo diferentes rangos de temperatura. A) 65-70 °C, b) 75-80 °C, c) 85-90 °C. Condiciones de separación conocidas.**

Con estos datos es posible fijar que en el rango de entre **65-70 °C**, los antibióticos exhiben buenas señales, semejantes al electroferograma de referencia. Dado que las pruebas



realizadas para optimizar la técnica de preconcentración por vía térmica no muestran mejoras sustanciales sobre las señales, se considero otra opción para dar tratamiento a la muestra con el fin de concentrar la cantidad de STD adicionados a la muestra y mejorar su detección.

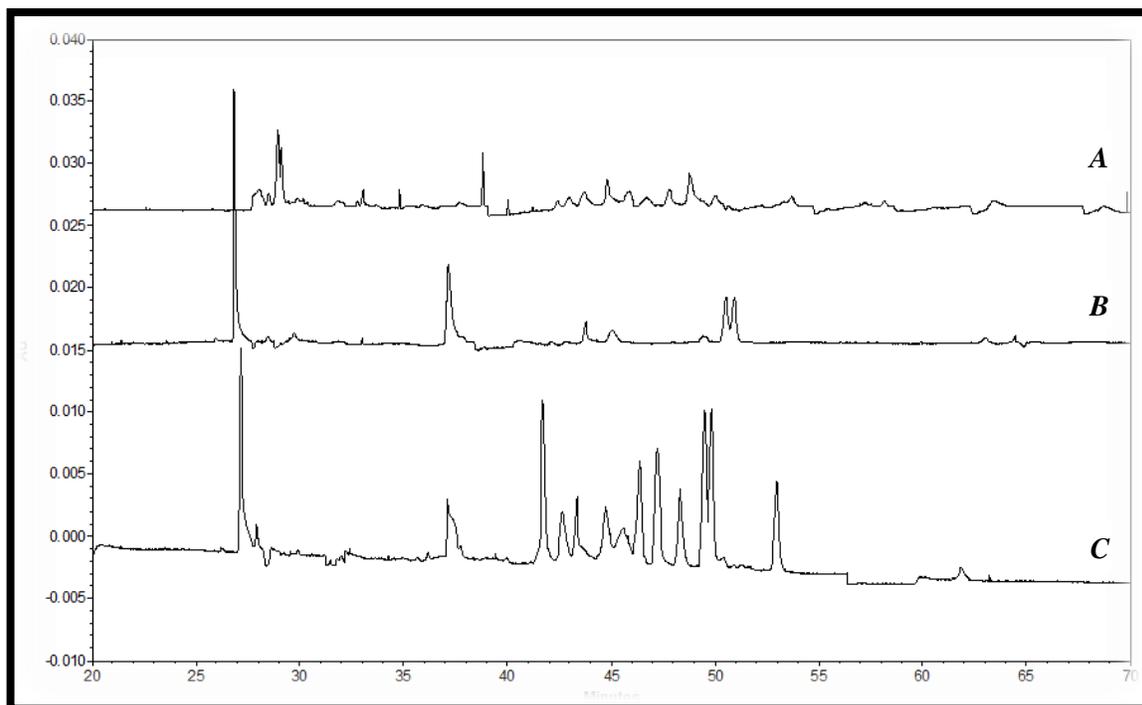
### 6.3 Extracción Líquido/Líquido

Como se sabe, la extracción líquido/líquido (solventes), es una técnica de tratamiento de muestras, caracterizada por la remoción y separación de sustancias presentes en mezclas, cuyo fundamento está dado por la transferencia de soluto entre solventes de distinta polaridad, puestos en contacto entre sí. El traslado de las moléculas entre fases, es un proceso distinguido principalmente por la solubilidad y naturaleza química, es por ello que dicha técnica es usada también como una forma de tratamiento y concentración de muestras analíticas.

Con el objetivo de llevar los analitos a un solvente con bajo punto de fusión y evitar su degradación por acción de la temperatura, se experimentó con esta técnica de extracción, para transferir las moléculas de interés a la fase orgánica. Ya que el suero está compuesto por agua, se realizaron pruebas demostrativas de extracción, empleando como solvente orgánico al diclorometano (**Vera-Candicioni, 2010**), para observar el comportamiento de la muestra tras su obtención y adición con STD.

En la **Figura 36**, se representa el comportamiento de los analitos presentes en el suero tras su extracción diclorometano, a pH 3.8, que es el pH al que se encuentra la muestra después de su acidificación. Algunos antibióticos se reparten entre las dos fases, apreciando más señales en la fase acuosa (**A**), indicando que a dichas condiciones la mayor parte de las moléculas son afines a ella. Por otra parte, en la fase orgánica (**B**) se detecta una cantidad menor de analitos, algunos de ellos presentan parecido en tendencia de salida con las señales del electroferograma (**C**). Dado que la mayoría de los analitos presentan afinidad al solvente polar, se puede inferir que los STD están en forma ionizada.

Las extracciones al igual que las separaciones electroforéticas dependen del pH del medio, debido a la adopción de carga por parte de los analitos, lo que es determinante para el reparto soluto/solvente, observándose mayor distribución de los iones cargados por las fases polares y las moléculas neutras por los solventes orgánicos.

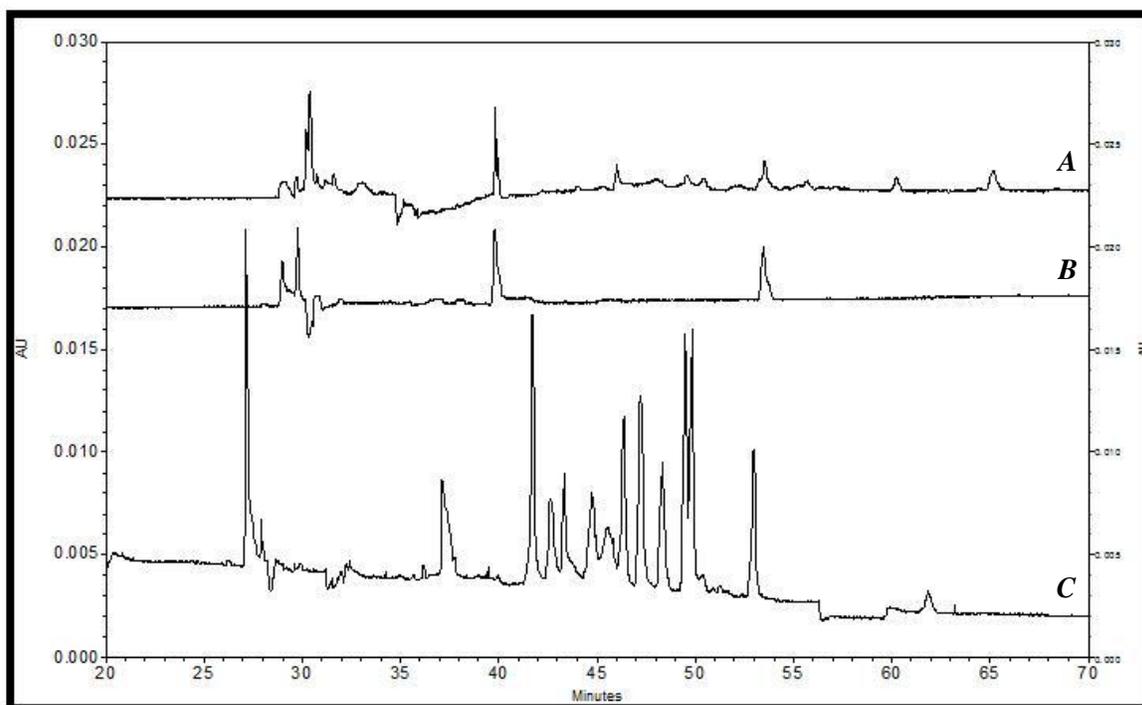


**Figura 36. Comportamiento de suero adicionado con estándares en la extracción a pH 3.8, con Diclorometano. A) Fase Acuosa, B) Fase Orgánica, C) Sistema de referencia.**

*Separación bajo condiciones conocidas.*

Para favorecer la transferencia de los analitos a la fase orgánica, se realizó una segunda extracción a pH 6.5, ya que aparentemente bajo esta condición las moléculas estarán neutras, (Castillo, 2010). Los resultados de la **Figura 37**, exponen diferencias notorias en comparación con la extracción a menor pH, donde el suero (**A**) tiene disminución de señales, lo que haría suponer que los antibióticos restantes se transfirieron al diclorometano (**B**), sin embargo las señales son menos que en la figura anterior, lo que resulta contrastante a lo esperado.

Es importante mencionar que no se realizó la identificación de señales, debido a que solo se observó el comportamiento de los STD en general, bajo las condiciones de extracción en el suero adicionado.



**Figura 37. Estándares adicionados al suero, extracción a pH 6.5, con Diclorometano**

**A) Fase Acuosa, B) Fase Orgánica, C) Sistema de referencia.**

**Condiciones electroforéticas como en la Figura 30 (aprox. 166 ppm).**

### 6.3.1 Extracción Selectiva

Esta técnica consiste en realizar extracciones modificando las condiciones que intervienen en la separación como pH, solvente, temperatura etc., de tal manera que se fomente el reparto de uno o varios analitos de manera específica. Comúnmente se emplea en separación de materiales y compuestos orgánicos así como metales residuales en diversas matrices.

Se realizaron diagramas de zonas de predominio de las moléculas involucradas en el estudio (**Anexo 3**), con el fin de comprender el resultado de las pruebas anteriores y



predecir las condiciones óptimas planteando una estrategia para mejorar la extracción. En la **Tabla 14** se aprecian los resultados obtenidos de los diagramas de zonas de predominio, donde se especifican las especies moleculares de los analitos con distintas condiciones de acidez que se consideraron para la extracción selectiva.

**Tabla 15. Especies químicas a diferentes valores de pH**

Antibióticos	pH					
	1.0	3.8	6.0	6.5	8.0	12.0
Amoxicilina	+	N	N	N	-	--
Ampicilina	+	N	N	N	-	-
Penicilina G	N	-	-	-	-	-
Oxacilina	N	-	-	-	-	--
Dicloxacilina	N	-	-	-	-	--
Cefalexina	+	N	N	N	-	--
Tetraciclina	+	+	N	N	-/--	--
Clortetraciclina	+	+	N	N	-/--	----
Oxitetraciclina	+	+	N	N	-	---
Enrofloxacina	+	N	N	N	-	-
Trimetoprim	+	+	+	+	N	N
Cloranfenicol	N	N	N	N	N	-
Tilosina	+	+	+	+	N	N
Espiramicina	+	++	++	++	+	N
Cefprozil	N	N	N/-	N	-	--

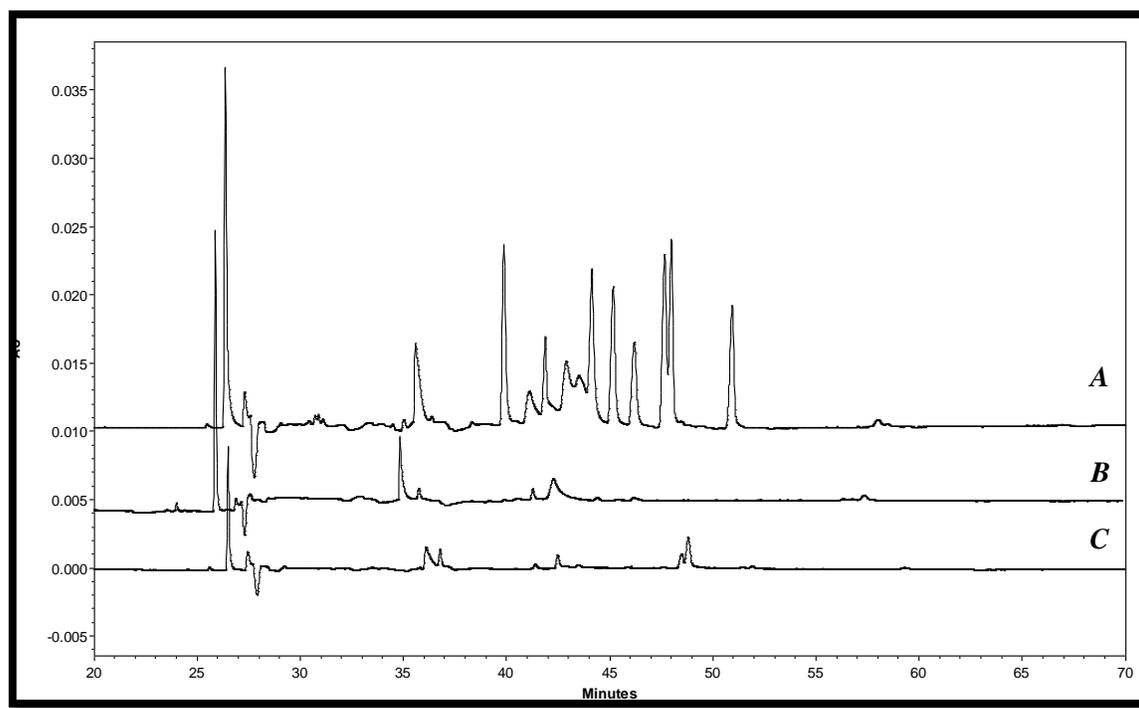
\*Análisis realizado con valores de pKa obtenidos con software ACD/LABS pKa calculador.

Las condiciones de pH establecidas son las siguientes:

- a) pH: 1.0, 6.0, 12.0; de acuerdo a los valores de pKa y con ayuda de los diagramas de zona de predominio, se determinó que a éstos pH's se extraerían todos los analitos a la fase orgánica.

b) pH 3.8, 6.0 12.0; esta condición se determinó considerando que al pH de la primera extracción hubo una transferencia favorable de analitos a la fase orgánica.

Se pueden apreciar en la **Figura 38** los electroferogramas de extracciones selectivas comparados con una mezcla de estándares (**A**); en el caso de la primer prueba, realizada con pH 1.0, 6.0, 12.0 (**B**), se aprecia que la cantidad de analitos obtenidos difieren a lo esperado (ver **Tabla 15**).



**Figura 38.** *Extracción selectiva a distintas condiciones de pH, A) STD de referencia, B) Extracción con pH 1.0, 6.1, 12.0, C) Extracción con pH 3.0, 6.0, 12.0. Condiciones electroforéticas conocidas.*

Ya que las señales que se aprecian son pocas, aunque la tendencia en la elución es similar a la referencia, no son todas las señales que se esperaba encontrar, lo que indica que no es posible la extracción de todos los analitos empleando estas condiciones. Por otra parte, en el caso de la corrida (**C**), se observa una ligera mejoría de algunas señales, las cuales son similares a la referencia (**A**). Comparando estos resultados se determinó que, a pesar de que el análisis molecular realizado sugirió que al cambiar los valores de pH a 6.0 y



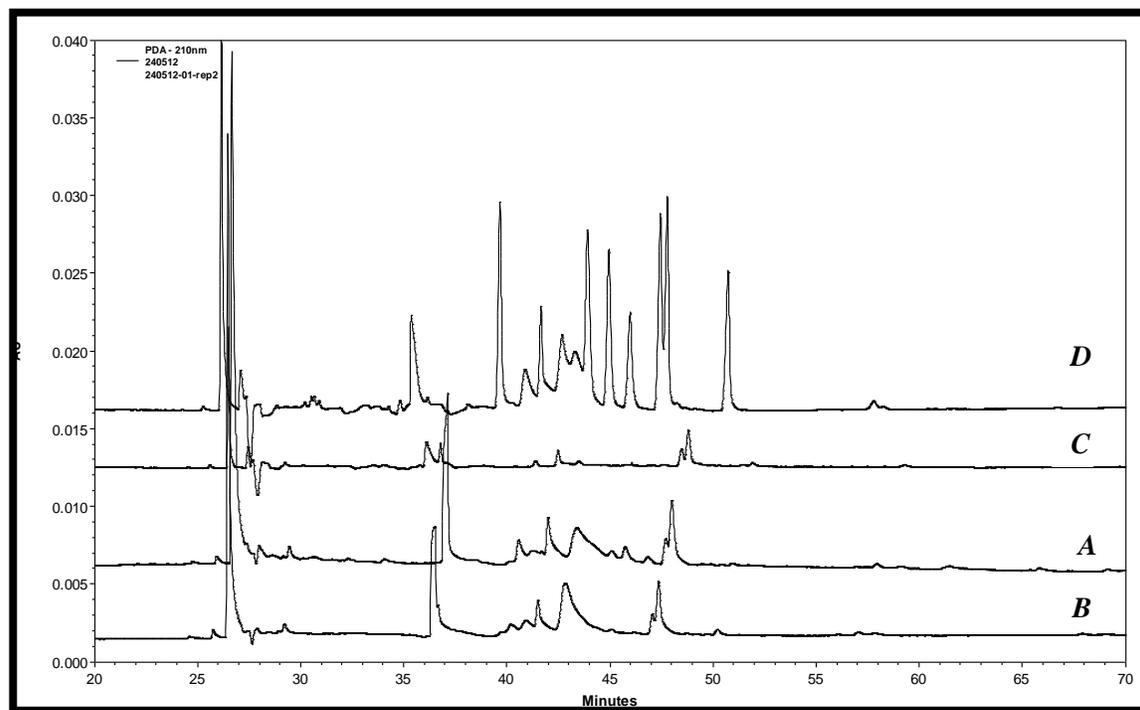
12.0 se extraerían todos los analitos, no hubo ese efecto, posiblemente por la sensibilidad de las moléculas a los cambios de pH. Por ello, se seleccionó como condición óptima la extracción a las condiciones iniciales (pH 3.8).

### 6.3.2 Extracción sucesiva

Dado que los resultados obtenidos son contrarios a lo previsto en los diagramas de zona de predominio, es relevante mencionar que el empleo de este tipo de herramientas, ayuda al planteamiento de supuestos que pueden ser contrarrestados experimentalmente. El número de veces que se realice una extracción es determinante en la cantidad de analito que se recupere, esto se conoce como extracciones sucesivas.

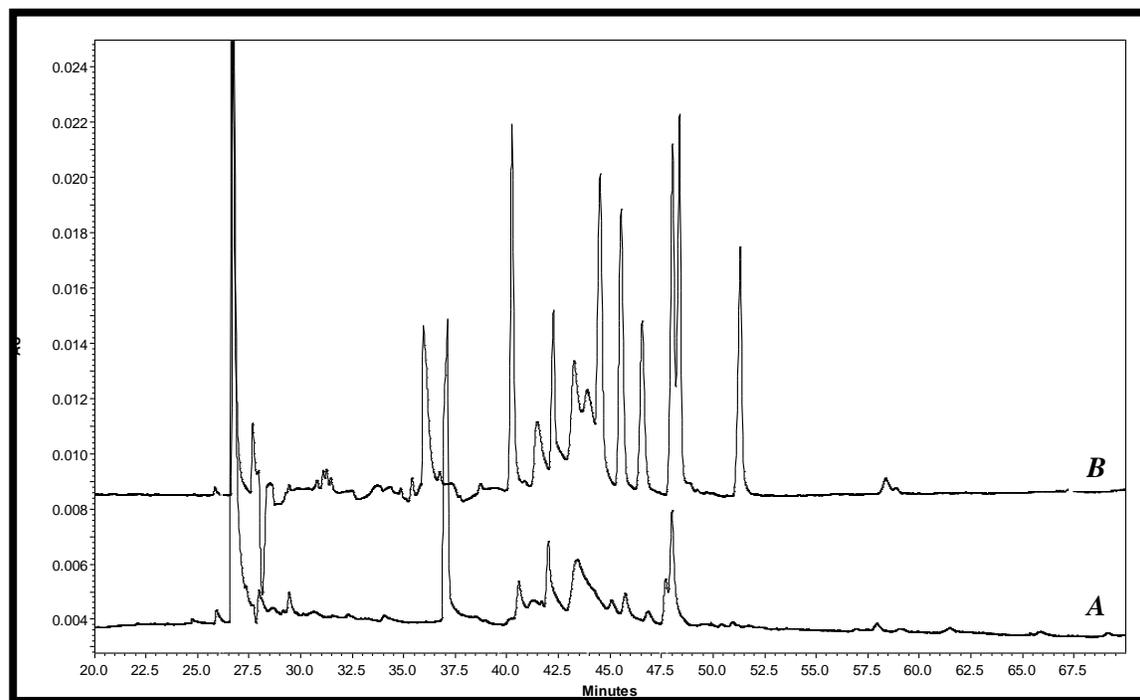
En la **Figura 39** se exponen los electroferogramas realizando dos (**A**) y tres (**B**) extracciones, donde las señal de los analitos separados de la matriz incrementan en altura, apreciándose mejores resultados, sin embargo, debido a que no hay una mejoría significativa entre las alturas de ambas corridas, se seleccionó dos extracciones como condición óptima, haciendo más práctico el método de tratamiento. En el gráfico se comparan también las respuestas obtenidas por extracción selectiva con pH 3.8, 6.0, 12.0 (**C**), reforzando el hecho de que llevar a pH neutro y alcalino no resulta útil para nuestros fines.

En la **Figura 40** se muestran los resultados a las condiciones de extracción determinadas como las mejores para nuestro objetivo experimental, sin embargo se continuó realizando pruebas de preconcentración de la muestra para poder analizar todos los antibióticos para los cuales está desarrollado nuestro método.



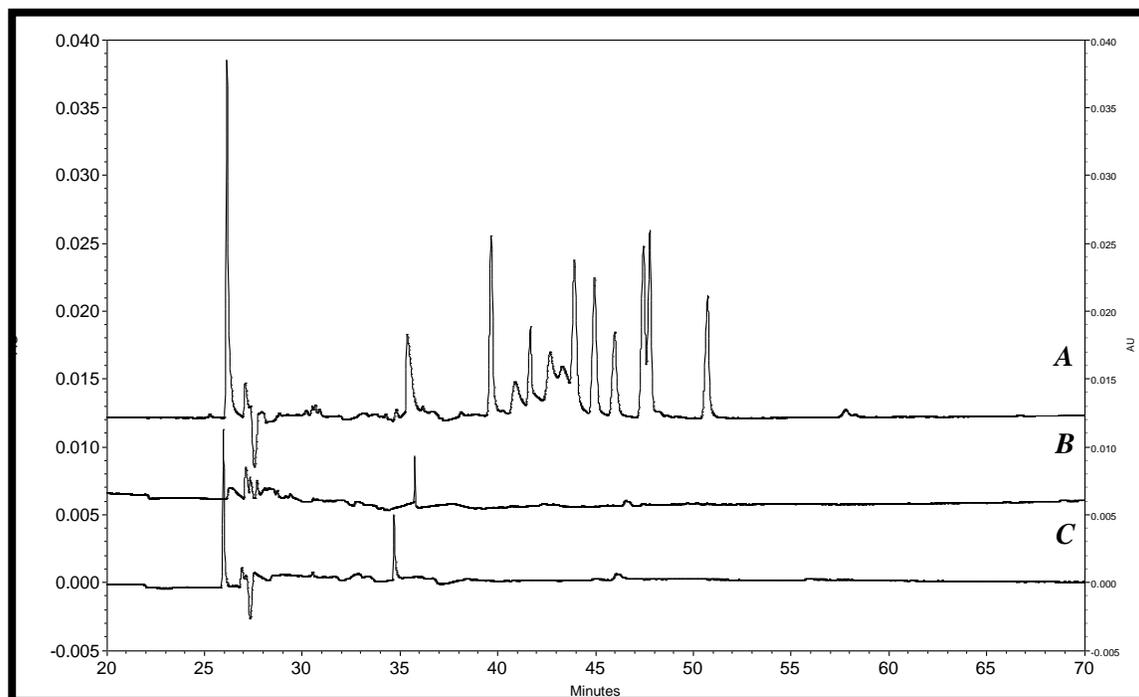
**Figura 39. Electroferogramas con distinto número de extracciones: A) Dos extracciones, B) Tres extracciones; comparadas con C) Extracción selectiva pH 3.8, 6.0, 12 D) Mezcla de STD.**

Se realizaron una serie de pruebas que consistieron en someter a estrés ácido-alcalino a la leche, con el fin de favorecer la desnaturalización y eliminación de las proteínas presentes en ella, lo anterior para descartar la posible unión fármaco-proteína que pudiese derivar en la eliminación de una fracción de los analitos con la precipitación. Las seroproteínas como lactoglobulinas y albúminas podrían dar origen a esta interacción, que podría influir en el tratamiento de muestra, así como en la detección de los analitos.



**Figura 40.** A) Extracción por duplicado con diclorometano a pH 3.8, B) Mezcla de STD.  
Condiciones electroforéticas como en la Figura 30.

La desnaturalización de proteínas modificando de forma drástica las condiciones de pH, puede producir ruptura (hidrólisis) de dichas biomoléculas, derivando en la formación de polipéptidos. En la **Figura 41** se muestra el comportamiento que presenta la leche tras el tratamiento mencionado, empleando como complemento una ultracentrifugación (**B**), que consiste en realizar una filtración a través de un tamaño de poro del orden de kilodaltons, favorecida por la fuerza centrífuga a elevadas velocidades. Se empleó dicho proceso para asegurar la obtención de suero libre de péptidos. El resultado obtenido evidencia solo un par de señales, lo que indica que esta metodología no favorece el cumplimiento del objetivo.



**Figura 41. Hidrolisis protéica y ultracentrifugación empleadas como procedimiento comparativo y complementario de la extracción líquido/líquido. A) STD referencia, B) Ultra centrifugación (3kD), C) Extracción con Diclorometano (pH 3.8)**

En la corrida (C), se realizó una extracción sucesiva a pH 3.8 tras la hidrólisis ácida-alcalina, para determinar si la extracción complementada con esta técnica podría mejorar los resultados ya observados. Es posible observar la presencia de dos señales de manera clara. Los resultados obtenidos de estas pruebas no evidencian un mayor número de señales, por lo que se descarta este tratamiento como parte de la metodología de preconcentración.



---

#### **IV. CONCLUSIONES Y REFERENCIAS**



## 7. Conclusiones

Se desarrolló exitosamente un método para el monitoreo de los 14 antibióticos más utilizados en bovinos, los cuales pueden estar presentes como contaminantes en leche, empleando la técnica de electroforesis capilar. Dicho método podrá ser aplicado en el análisis rutinario de la calidad de ésta y contribuirá con una metodología única y económica, cuya futura implementación facilitará el control toxicológico y beneficiará a la industria de los lácteos y sus fermentados, una vez que se determinen las condiciones óptimas de tratamiento de muestra.

Experimentalmente se observó que las siguientes variables tienen influencia sobre el método de la siguiente manera:

<i>Variable</i>	<i>Influencia</i>
<i>Longitud del capilar</i>	Al incrementar la longitud, disminuye la corriente, mejora la resolución y aumenta el tiempo de análisis.
<i>pH</i>	Debido a que los analitos de interés son de diferentes familias, no es posible determinar una tendencia en el cambio de esta variable. Solo podemos decir que experimentalmente a pH 8 todos los antibióticos son aniones, excepto trimetoprim.
<i>Concentración del búfer</i>	A mayor fuerza iónica, la corriente aumenta y la doble capa del capilar se comprime, retrasando la salida de los analitos debido a la disminución del FEO.
<i>Concentración de aditivos</i>	A mayor concentración, mayor viscosidad y menor corriente. En el caso de: HP $\alpha$ -CD, mejor resolución. $\alpha$ -CD, menor resolución. Existe una variación en la formación de complejos de inclusión.

Las condiciones seleccionadas como ideales, debido a que disminuyeron el tiempo de análisis y optimizaron la resolución entre las señales de los analitos fueron las siguientes:

*Búfer de boratos pH 8, 100 mM, con la adición de  $\alpha$ -CD 5 mM y HP  $\alpha$ -CD 15 mM; 30 kV de voltaje aplicado, con detección UV a 210 nm; capilar de 117 cm de LT.*



Se seleccionó al Cefprozil como estándar interno, debido a que es una molécula de estructura similar a los analitos y no interfiere con sus señales, ya que no se administra a bovinos; esto para minimizar la variabilidad de los resultados en la determinación de antibióticos.

Se desarrolló un método de pretratamiento de la muestra de leche de vaca desnaturalizando las proteínas con Ácido tricloroacético y separando los componentes principales de esta matriz por efecto de una fuerza centrífuga, obteniendo la parte acuosa (suero) para su análisis; con ello se disminuyeron las señales interferentes en la determinación de antibióticos como contaminantes, comprobando la selectividad.

Se probaron tres técnicas de concentración de la leche pretratada de vaca, las cuales fueron eliminación de agua por acción de la temperatura, extracción líquido/líquido con solventes e hidrólisis proteica con ultracentrifugación, con el fin de detectar los antibióticos en dicha muestra en las concentraciones reportadas por las normas internacionales, sin embargo al comparar las corridas de las muestras pretratadas de leche (adicionadas con antibióticos), con las de la mezcla de estándares, se observaron alturas diferentes a pesar de estar presentes en la misma concentración, lo que sugiere que la cantidad recuperada no es el total de la adicionada.

Por lo anterior, en la segunda fase del experimento correspondiente a la implementación, se deberá continuar realizando pruebas con el fin de desarrollar una técnica de concentración de la muestra, que no sólo permita la identificación de los antibióticos de interés, sino también su cuantificación en concentraciones reportadas por las normas internacionales; cabe resaltar que el método desarrollado es capaz de monitorear la presencia de los 14 antibióticos más utilizados en bovinos en leche de vaca, hasta ahora en altas concentraciones (aprox. 50 ppm), lo cual puede ayudar a demostrar que el producto es seguro para el consumidor y para las industrias de fermentación que requieren esta información para realizar debidamente sus productos de fermentación.



---

## Perspectivas

Debido a que aún no se ha logrado concentrar la muestra pretratada, de tal forma que se puedan cuantificar los analitos a las concentraciones reportadas por la normatividad internacional (EEC-1999), se está probando el método de liofilización para lograrlo, ya que se piensa que no habrá degradación de los analitos por acción de la temperatura, así como también observaremos la influencia de la posible interacción fármaco-proteína, la cual se debe romper para evitar pérdidas en la obtención de suero por precipitación de dichas biomoléculas.

Mediante la técnica de liofilización, se congela la muestra para posteriormente ser introducida a una cámara de vacío; con ello se eliminará el agua por sublimación y se reconstituirá en un volumen pequeño de agua, suficiente para alcanzar los límites reportados en las normas internacionales.

Una vez logrado el objetivo de la concentración de la muestra, se realizarán las curvas correspondientes, para posteriormente cuantificar los antibióticos más utilizados en la industria ganadera para el tratamiento de mastitis en muestras de leche de establo y comercial, cuya presencia disminuye la calidad de este producto tan importante para la dieta de los seres humanos.

Debido a que la técnica tradicional usada en México (NOM-184), sólo nos indica la presencia o ausencia de antibióticos, además de que para lograr el resultado se ocupan varios días (incubación), el método desarrollado resulta un aporte muy valioso para la determinación específica y cuantitativa de los antibióticos comúnmente usados en bovinos para el tratamiento de mastitis. Este podría ser utilizado de modo confirmatorio, una vez que se hayan realizado las pruebas rápidas de determinación cualitativa, para reportar la concentración de antibióticos como contaminantes en leche.

Finalmente, estos resultados completarán los datos del experimento para ser publicado en un Journal Internacional.



---

## 8. Referencias

- 1) R. Bergoglio, “Antibióticos”, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 1993.
- 2) A. Bryskier, “Antimicrobial agents: antibacterials and fungicals”, 2010.
- 3) J. Flórez, “Farmacología humana”, Editorial Masson, México, 2004.
- 4) C. Alais, “Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera”, Editorial Continental, España, 1971.
- 5) E. Schlime, W. Buchheim, “La leche y sus componentes; propiedades químicas y físicas”, Editorial Acribia, España, 2002.
- 6) A. Thompson, M Boland, H Singh, “Milk proteins: from expression to food”, Editorial Elsevier, USA, 2009.
- 7) H. Magariños. “Producción higiénica de da leche cruda”, Editorial Producción y servicios incorporados S.A., Guatemala, 2011.
- 8) P. Walstra, J Wouters, “Diary science and technology”, 2<sup>a</sup> edición, Editorial Taylor & Francis, USA, 2006.
- 9) P. Walstra, R. Jenness, “Química y física lactológica”, Editorial Acribia, España, 1987.
- 10) G. Mazza, “Alimentos funcionales; aspectos bioquímicos y de procesado”, Editorial Acribia, España. 2000.
- 11) J. Zubeldia, M. Baeza, I. Jáuregui, C. Senent, “Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA”, Editorial Fundación BBVA, España, 2012, pp. 291 – 296, pp. 355-356.
- 12) G. Lunn, “Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis”, Editorial Jonn Wiley & Sons, INC, Canadá, 2000.
- 13) H. Dodziuk, “Cyclodextrins and their complexes”, Editorial Wiley – UCH, Alemania, 2006.
- 14) R. Frazier, “Capillary electrophoresis for food analysis. Method development”, Editorial Royal Society at chemistry, Gran Bretaña, 2000.
- 15) J. Godfrey, “Liquid – liquid extraction equipment”, Editorial John Wiley & sons, England, 1994.
- 16) V. Seija, R. Vignoli, “Temas de bacteriología y virología médica”, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay, 2008.



- 17) S. Morante, "Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica", Editorial Dykinson, España, 2007.
- 18) A. Fernández, "Electroforesis capilar; aproximación según la técnica de detección", Editorial Universidad de Granada, España, 2005.
- 19) B. Chankvetadze, "Capillary electrophoresis in chiral analysis", Editorial John Wiley & Sons, Inglaterra, 1997.
- 20) D. Baker, "Capillary electrophoresis", Editorial John Wiley & Sons, USA, 1995.
- 21) D. Skoog, "Principles of instrumental analysis", 6a edición, Editorial Thomson, USA, 2007.
- 22) R. Kirk, "Composición y análisis de alimentos de Pearson", Editorial Patria, México, 2009.
- 23) F. Fifield, "Principles and practice of analytical chemistry", 5a edición, Editorial Blackwell Science, USA, 2003.
- 24) F. Shenck, P. Callery, "Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk", *Journal of chromatography A*, 812 (1998), pp. 99-109.
- 25) T. Rinken, H. Riik, "Determination of antibiotics residues and their interaction in milk with lactate biosensor", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 66, (2006), pp. 13- 21.
- 26) L. Vera-Candioti, A.C. Olivieri, H. Goicoechea, "Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis", *Talanta* 82, 2010, pp. 213- 221.
- 27) K. Kishida, "Simplified extraction of tetracycline antibiotics from milk using a centrifugal ultrafiltration device", *Food chemistry* 126, 2011, pp. 687-690.
- 28) L. Kantini, M. Farré, D. Barceló, "Analytical methodologies for the detection of B-lactam antibiotics in milk and feed samples", *Trends in analytical chemistry*, 28, 2009.
- 29) M. A. Garcia-Mayor, R.M. Garcinuño, "Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk", *Journal of chromatography A*. 1122, 2006, pp. 76-83.
- 30) S.M. Andrew, K.M. Moyes, A.A. Borm, "Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy", *Veterinary Microbiology*, 134, 2009, pp. 150-156.



- 31) D.G. Kennedy, R.J. McCracken, "Use of liquid Chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk", *Journal of Chromatography A*, 812, 1998, pp. 77-98.
- 32) S. Santos, M. Henriques, A. Duarte, V. Esteves, "Development and application of a capillary electrophoresis base method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples", *Talanta*, 71, 2007, pp. 731-737.
- 33) A.L. Cinquina, F. Longo, "Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle". *Journal of Chromatography A*, 987, 2003, pp. 227-233.
- 34) W. Moats, J. Romanowski, "Multiresidue determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up", *Journal of Chromatography A*, 812, 1998, pp. 237-247.
- 35) S. Riediker, A. Rytz, "Cold-temperature stability of five  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk and milk extracts prepares for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis", *Journal of Chromatography A*, 1054, 2004, pp. 359-363.
- 36) F. Schenck, P. Callery, "Chromatography methods of analysis of antibiotics in milk", *Journal of Chromatography A*, 812, 1998, pp. 99-109.
- 37) A. Ramírez, R. Gutierrez, G. Diaz, C. Gonzalez, N. Perez, S. Vega, M. Noa, "High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk", *Journal of Chromatography B*, 784, 2003, pp. 315-322.
- 38) M. Yamani, L. Al-Kurdi, M. Haddadin, R. Robinson, "A simple test for the detection of antibiotics and other chemical residues in ex-farm milk", *Food Control*, 10, 1999, pp. 35-39.
- 39) Su, N. Liu, M. Zhu, B. Ning, M. Liu, Z. Yang, X. Pan, Z. Gao, "Simultaneous detection of five antibiotics in milk by high-throughput suspension array technology", *Talanta*, 85, 2011, pp. 1160-1165.
- 40) S. Andrew, K. Moyes, A. Borm, L. Fox, K. Leslie, J. Hogan, S. Oliver, Y. Shukken, W. Owens, C. Norman, "Factors associated with the risk of antibiotic residues and



- 
- intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy” , *Veterinary Microbiology*, 134, 2009, pp. 150-156.
- 41) H. Tian, “Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Chemosphere*, 83, 2011, pp. 349-355.
- 42) Y. Li, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, “Capillary zone electrophoresis of minocycline”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 1996, pp. 1095-1099.
- 43) X. Zhou, D. Xing, D. Zhu, Y. Tang, L. Jia, “Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of Enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk”, *Talanta*, 75, 2008, pp. 1300-1306.
- 44) H. Chung, J. Lee, Y. Chung, K. Lee, “Analysis of Sulfonamide and Quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography”, *Food Chemistry*, 113, 2009, pp. 297-301.
- 45) J. Block, M. Merchiers, L. Mortier, A. Braekman, W. Ooghe, R. Van Renterghem, “Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods”, *International Dairy Journal*, 13, 2003, pp. 87-94.
- 46) D. Dalgleish, “Bovine milk protein properties and the manufacturing quality of milk”, *Livestock Production Science*, 35, 1992, pp. 75-93.
- 47) V. Raikos, “Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review”, *Food Hydrocolloids*, 24, 2010, pp. 259-565.
- 48) C. Rodriguez del Angel, D. Dalgleish, “Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder”, *Food Research International*, 39, 2006, pp. 472-479.



---

## V. ANEXOS



---

## Anexo 1. Importancia económica de la leche en México

En México y el mundo la leche es de gran importancia debido a su gran impacto económico y alimenticio. Entre sus principales funciones se encuentra proporcionar al humano los nutrientes necesarios para un desarrollo óptimo (carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales), principalmente en los infantes, además de ser necesaria para una dieta saludable en el resto de la población.

El consumo de leche recomendado por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), es de 188 L/persona, sin embargo en México el consumo actual es de aproximadamente 124 L/persona, principalmente por la actual alza de costos en insumos de la canasta básica, los malos hábitos alimenticios y posiblemente por la insuficiencia de producción en el país.

A pesar de que México tiene una buena producción, es uno de los principales importadores de leche y sus derivados, en esto recae la importancia económica con respecto al comercio exterior.

### *Principales regiones productoras.*

En el país existen distintas zonas en las cuales la producción de leche es mayor, llamadas cuencas lecheras. El ganado destinado a la producción de este alimento, se encuentra distribuido en las siguientes zonas y estados:

- Comarca lagunera (Coahuila y Durango).
- Los Altos (Jalisco).
- Delicias y Cuauhtémoc (Chihuahua).
- Zumpango y Jilotepec (Edo. Méx).
- Tizayuca (Hidalgo).
- San Luis Potosí.
- Colón y Villa de Márquez (Querétaro).
- Puebla.
- Guanajuato.
- Oaxaca.
- Tlaxcala.
- Veracruz.



En la **Tabla A** se puede observar que para el mes de agosto del año 2011, las mayores cifras obtenidas de leche de las entidades productoras del país provienen de, Jalisco, Coahuila y Durango los que en conjunto, producen la cuarta parte del líquido.

**Tabla A. Principales productores de leche en el país**

<i>Región o Estado*</i>	<i>Producción (L)</i>
<i>Coahuila</i>	851,658
<i>Jalisco</i>	1,285,070
<i>Chihuahua</i>	610,780
<i>Durango</i>	655,137
<i>Guanajuato</i>	533,124
<i>Veracruz</i>	472,984
<i>Puebla</i>	270,198
<i>Edo. Mex.</i>	303,465
<i>Chiapas</i>	258,708
<i>Aguascalientes</i>	247,918
<b>TOTAL*</b>	<b>5,489,042</b>

\*Fuente SAGARPA

La producción de leche en México ha tenido un crecimiento en los últimos años del 10.3%, lo que hace que en términos monetarios esta actividad sea equivalente al 22% del valor total del sector pecuario (CANILEC).



*Figura A. Producción de Litros de leche por año en México*

En la **Figura A** es posible apreciar la tendencia desde el año 1990 hasta el 2010, cuyo crecimiento evidencia la necesidad de implementar planes gubernamentales para seguir impulsando este sector, en aspectos tecnológicos y de mejoras para proporcionar producto de mejor calidad.

#### ***Costos, problemas de producción y consumo de leche.***

El costo de la leche ha incrementado desde el 2010 debido a la inflación, así como a la implementación de la tecnología en las principales empresas dedicadas a este ramo. En México, la mayor parte de la leche que se produce es vendida por las empresas Lala® y Alpura®, dejando de lado a los pequeños y medianos productores, cuyos recursos son insuficientes para hacer la difusión de productos que el mercado demanda. Este hecho tiene a un poco más de 150,000 empresas ganaderas al borde de la quiebra, pues no obtienen ganancias que hagan sustentable su participación en el mercado. Por ello se requiere de la participación del gobierno en la promoción de dicha industria.



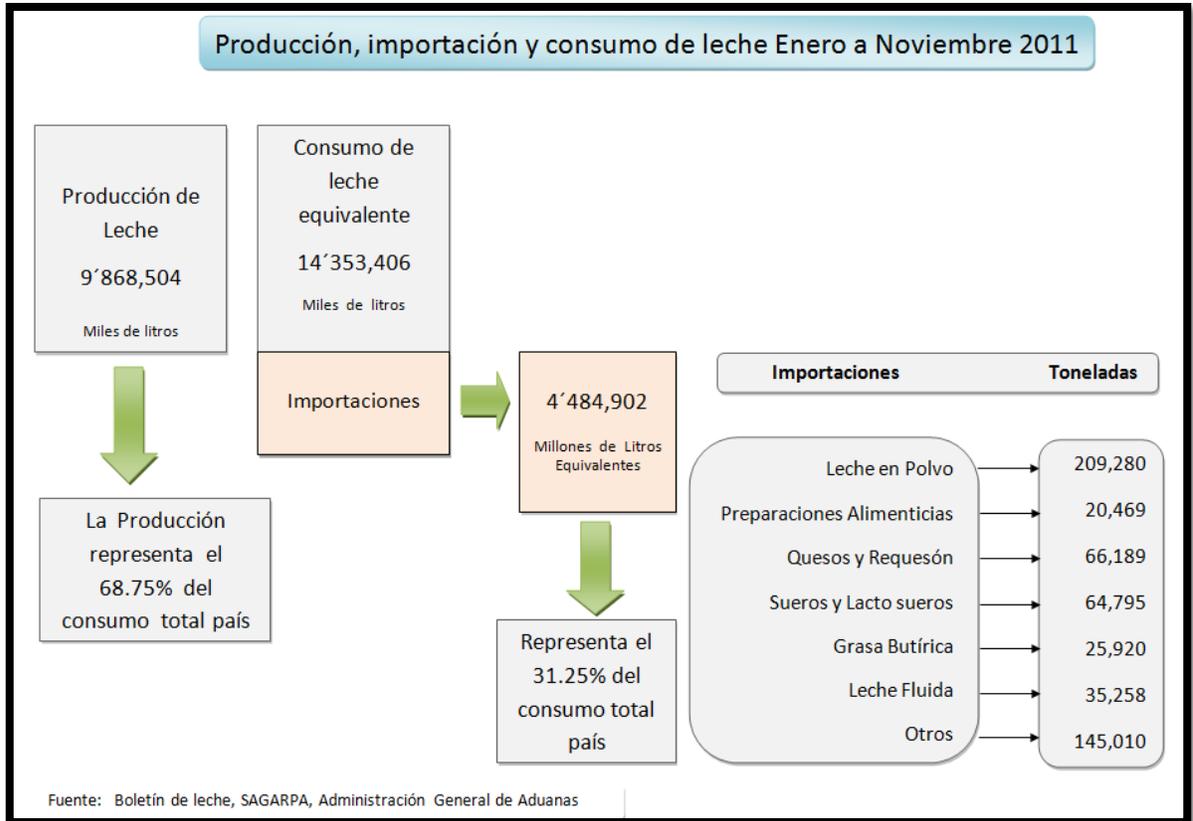
---

El precio de la leche a nivel rural es fluctuante, pero considerablemente bajo con respecto a la distribuida de marca comercial. En la última década el costo ha ido en promedio desde 3.19 hasta -11.3 pesos actualmente en en 2012, sin embargo, la población opta por productos que garanticen su calidad, por lo cual las empresas de renombre se ven cada vez más forzadas a mejorar el producto sin sacrificar el costo.

Aunque existe un alto porcentaje de importación de leche (principalmente en polvo), cabe mencionar que la producción nacional se destinaba principalmente a la elaboración de productos más competitivos y las importaciones sólo complementaban la demanda de abasto nacional (CANILEC), hecho que se ha ido revirtiendo en los últimos años. Por lo anterior, es momento de que tanto los productores, como las grandes industrias incrementen su producción, para así poder satisfacer las necesidades internas.

Es necesario optimizar el método de obtención para evitar, en la medida de lo posible las contaminaciones, que pueden derivar en pérdidas económicas, de producto y de la calidad. También para ello, día con día se requiere mejorar los métodos de análisis, para que desde el ganado, materias primas y producto terminado cumpla con las demandas del consumidor y la producción nacional represente una prioridad sobre las importaciones.

Finalmente cabe mencionar, que el país ha comenzado a despuntar en la exportación de algunos productos como son los quesos y yogurt, producción en la cual es de suma importancia el control microbiológico y por tanto el control de restos de antibióticos provenientes del tratamiento veterinario al ganado, para asegurar una buena calidad del producto final. En la **Figura B** se muestra un esquema proporcionado por la CANILEC que indica el comportamiento del sector ganadero, en donde se demuestra la insuficiencia de la producción nacional, así como los productos que se abarcan.

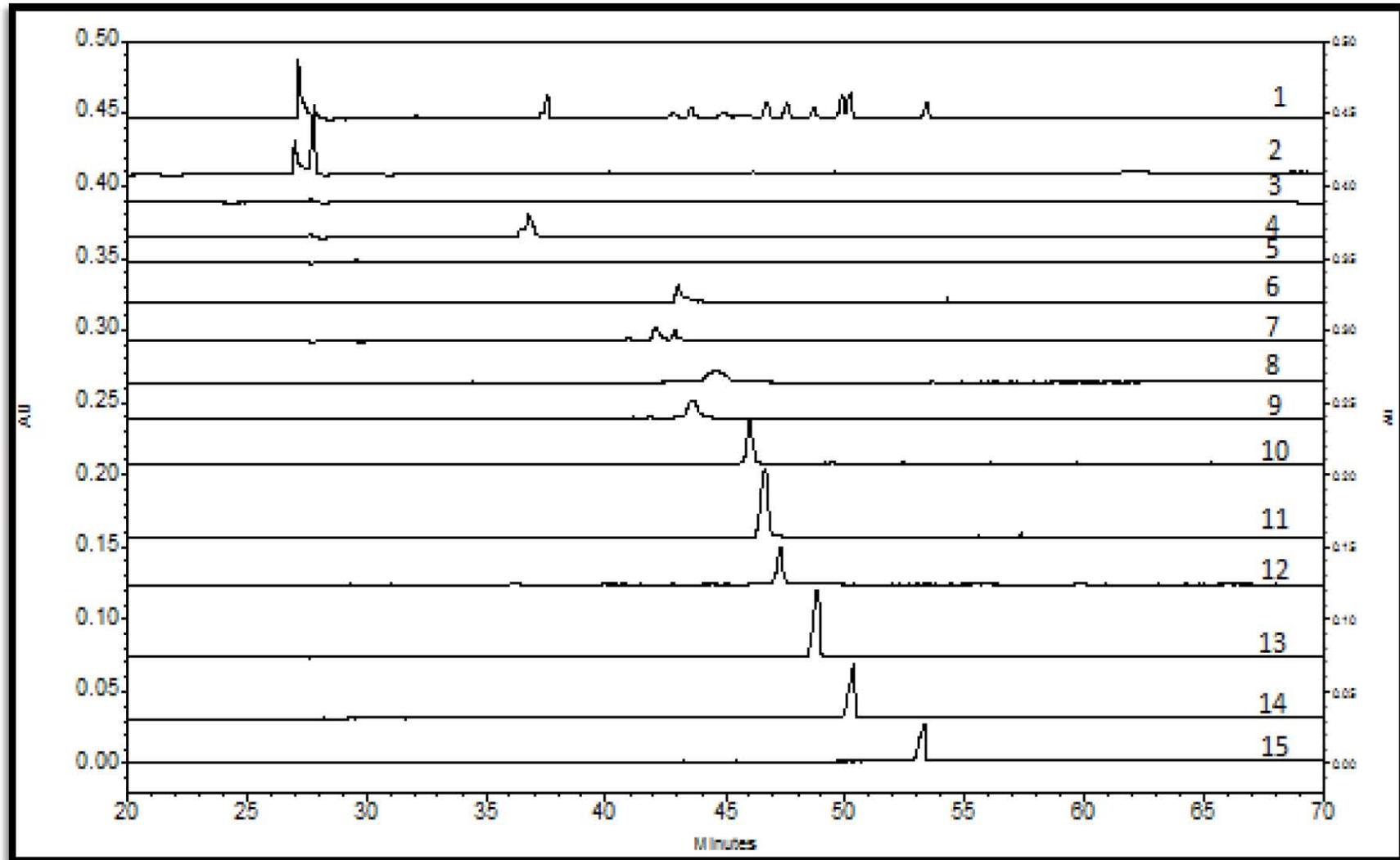


*Figura B. Producción, importación y consumo de leche, año 2011.*



---

**Anexo 2. Electroferograma de corridas de identificación de antibióticos individualmente. Condiciones como en la Figura 30.**



Anexo 2. Electroferograma de corridas de identificación de antibióticos individualmente. Condiciones como en la Figura 30.



---

*Relación de corridas de identificación de antibióticos individualmente, representadas en el Anexo 2. Condiciones como en la Figura 30.*

1. Mezcla de STD
2. Trimetoprim
3. Espiramicina
4. Enrofloxacina
5. Tilosina
6. Cloranfenicol
7. Tetraciclina
8. Oxitetraciclina
9. Clortetraciclina
10. Amoxicilina
11. Cefalexina
12. Ampicilina
13. Dicloxacilina
14. Oxacilina
15. Penicilina



---

---

**Anexo 3. Diagramas de zonas de predominio de los antibióticos de interés  
para el proyecto**

