



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Estudio preliminar de la determinación y
cuantificación de melamina en leche y fórmulas
lácteas en polvo y líquidas, mediante la técnica
de Electroforesis Capilar.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :

Bianca Rodríguez Moreno

ASESORES:

Dr. VICTOR HUGO ÁBREGO REYES.

M. en C. VICTOR HUGO VÁZQUEZ VALADEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2013



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**

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**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**

Estudio preliminar de la determinación y cuantificación de melamina en leche y fórmulas lácteas en polvo y líquidas, mediante la técnica de Electroforesis Capilar

Que presenta la pasante: **Bianca Rodríguez Moreno**
Con número de cuenta: **40609232-4** 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 23 de Enero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Elia Granados Enríquez	
VOCAL	QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	Dr. Víctor Hugo Ábrego Reyes	
1er SUPLENTE	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
2do SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por formarme como profesionista, a mis maestros que durante mi estancia en esta institución no solo me educaron académicamente sino también me enseñaron a ser un mejor ser humano. Aquí aprendí a tener pasión por tú profesión, fidelidad y orgullo por tú universidad y que la humildad y sencillez no demerita al contrario engrandece el alma.

Quiero agradecer a mis compañeros de la generación 33 de Q.F.B. que también formaron parte de este paso tan importante en mi vida.

Al Dr. Enrique Ángeles Anguiano por darme la oportunidad de pertenecer al equipo de trabajo del Laboratorio de Química Medicinal, a mis asesores Dr. Víctor Hugo Abrego Reyes y al M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez por todo su apoyo pero sobre todo por ofrecerme su amistad y consejos cuando más los necesite.

A mis padres ya que sin ellos simplemente no sería la persona que soy ahora.

A mis hermanas Aura y Carolina ya que de ellas también es esta dicha.

A esa fuerza, energía o ser celestial que me ayudó a tener la determinación y paciencia para finalizar este viaje sin rendirme antes de tiempo.

Y aunque a veces sentía desesperación por querer terminar pronto, también he aprendido que todo tiene su tiempo y el universo es perfecto y sabe cuándo y cómo.

Y por último pero no menos importante al gran amor de mi vida que desde hace más de 8 años ha sido un pilar fundamental en mi vida, Manuel Márquez, te amo.

Dedicatorias.

Esta tesis es la culminación de años de esfuerzos y desvelos pero que al fin rindieron frutos y creo importante dedicarla a las personas más importantes en mi vida.

A mi madre y mejor amiga, Rosario Moreno Mandujano, tu eres, fuiste y serás una de mis más grandes razones de vida, tú me enseñaste a ser luchadora, a no rendirme, a crecerme ante la adversidad y a seguir adelante por más duro que sea el camino, por eso esta tesis también es tuya, mi mamita hermosa y aunque te fuiste antes de poder ver concretado este trabajo eres parte fundamental de él y sé que te sentirías muy orgullosa de mi y aunque daría lo que fuera porque estuvieras este día tan importante conmigo, estoy segura que algún día nos volveremos a encontrar y podremos abrazarnos y platicar de todo igual que antes, lo puedo sentir . . . Te amo y amare siempre mami.

A mi padre Jesús Alberto Rodríguez Guerra, tú y mi mami fueron y son mi mayor ejemplo, gracias por siempre traernos a mis hermanas y a mi comida, vestido y educación, gracias por enseñarme a ser noble, respetuosa y agradecida. Gracias por darme una infancia hermosa y quererme tanto. Hoy este logro que me llena de alegría, que te llene a ti también, ya que sin ti este día jamás hubiera llegado. Y siéntete orgulloso al igual que mi mami ya que sin temor a sonar pretenciosa, formaron y forjaron a una buena mujer. ¡Te amo papi!

A mis hermanas Aura y Carolina, ustedes que vivieron mis noches en vela, mis malos modos, mis malos ratos, el llanto, pero también los buenos momentos, las risas, los juegos, las alegrías. Como no dedicarles este trabajo a quienes fueron mis confidentes. Las quiero y adoro con todo mí ser.

A mi "Sillo" como yo le digo, por ser la luz que ilumina mis momentos de oscuridad, por ser mis alas para volar, pero también mis pies para aterrizar, eres mi balanza. . . podría decirte y describirte de mil maneras, pero ni una tesis me alcanzaría, simplemente eres el amor de mi vida, mi compañero, mi mejor amigo y el hombre con quien quiero pasar el resto de mi vida para aprender y crecer juntos. Te amo CMMB contigo al infinito y más allá. . .

Por último a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Química Medicinal.

Daniel y Rebeca, sigan siendo una linda pareja, Pablo Arturo por su personalidad y cariño, Gaby por ofrecerme su amistad, a Mony por ser tan linda conmigo y apoyarme, a Marijo por que conocí a una amiga como pocas te quiero... a Caro Cervantes y Jazmín Álvarez por tener la paciencia para enseñarme. Y también a Dany Ley, Obed, Rodolfo, Cristian, los Migueles, los Oscars, los Vics jejej a Raúl, Betza... en fin a todos los que en algún momento trabajaron y siguen trabajando en este laboratorio, mantengan el ambiente tan bonito y agradable que se siente, recuerden siempre tratar a los demás como les gustaría que los trataran.

I. Índice general

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	IV
TABLAS.....	V
FIGURAS.....	V
GRAFICOS.....	VI
III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.	1
❖ ¿QUÉ ES LA LECHE?	5
<i>Adulteración de la leche</i>	6
❖ MELAMINA	7
<i>Metabolismo y toxicidad de la melamina</i>	8
Toxicidad aguda.....	11
Toxicidad crónica.....	11
Adulteración de leche por melamina.....	13
❖ ELECTROFORESIS CAPILAR.....	15
<i>Las ventajas del uso de estos capilares son:</i>	15
<i>Componentes instrumentales de un equipo de Electroforesis Capilar</i>	16
Esquemas de los componentes básicos de un Equipo de Electroforesis Capilar.....	1
<i>Principios de separación</i>	18
<i>Flujo electroosmótico</i>	18
<i>Fenómenos que afectan el flujo electroosmótico</i>	20
<i>Tiempo de migración y movilidad aparente</i>	21
Factores que pueden afectar la reproducibilidad en el tiempo de migración.....	22
<i>Introducción de muestra</i>	22
Introducción hidrodinámica.....	22
Introducción electrocinética.....	22
<i>Buffers-Aditivos</i>	23
<i>Sistemas de detección</i>	24
Detección por UV/VIS.....	24
Detección espectrofotométrica con arreglo de diodos. (DAD)	24
<i>Modos de Electroforesis Capilar</i>	24
Electroforesis Capilar de Zona.....	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
❖ MATERIAL.....	30
❖ EQUIPOS.....	30
❖ REACTIVOS.....	30
❖ MUESTRAS.....	30
<i>DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES</i>	31
<i>Preparación de la curva de calibración</i>	32
<i>Preparación de las muestra</i>	32
<i>Análisis de muestras y acondicionamiento del equipo de EC</i>	33
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	34
❖ SELECCIÓN DE BUFFER.....	35

❖	ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRA.....	41
❖	SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TCA.....	47
❖	EVALUACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.	51
✓	<i>Linealidad del sistema:</i>	52
✓	<i>Precisión del sistema</i>	54
✓	<i>Repetibilidad entre días.</i>	56
	ANADEVA para tiempos de migración.	56
	ANADEVA para la relación Área/[MEL].....	58
✓	<i>Reproducibilidad entre días</i>	62
	ANADEVA para tiempo de migración	62
	ANADEVA para la relación Área/ [MEL].....	66
✓	<i>Evaluación exploratoria del recobro</i>	72
✓	<i>Límite de detección (LOD)</i>	73
✓	<i>Límite de cuantificación (LOQ)</i>	73
7.	PERSPECTIVAS.....	77
8.	REFERENCIAS.....	79
9.	ANEXO I ELECTROFEROGRAMAS DE DIVERSAS MUESTRAS DE LECHE.....	I
10.	ANEXO II. FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	VIII

II. Índice de Tablas y Figuras

TABLAS

TABLA 1. PROMEDIO Y RANGO DEL NITRÓGENO TOTAL (NT) Y NNP	9
TABLA 2. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE MELAMINA	32
TABLA 3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LECHE O FÓRMULAS LÁCTEAS LÍQUIDAS O EN POLVO.	33
TABLA 4. CONDICIONES FINALES PARA LA DETERMINACIÓN DE MELAMINA POR EC.	49
TABLA 5. RESUMEN DE LOS PARAMETROS DE CALIBRACIÓN PARA EVALUAR LINEALIDAD.....	53
TABLA 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EVALUAR PRECISIÓN.....	54
TABLA 7. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DE CALIBRACIÓN PARA EVALUAR PRECISIÓN.....	55
TABLA 8. EVALUACIÓN EXPLORATORIA DEL RECOBRO.....	72

FIGURAS

FIGURA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE CRUDA	5
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE MELAMINA.	7
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MELAMINA Y SUS METABOLITOS.	8
FIGURA 4. UNIÓN DE MELAMINA CON ÁCIDOCIANÚRICO.	10
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE LOS CRISTALES DE CIANURATO DE MELAMINA	10
FIGURA 6. HISTOPATOLOGÍA DE RIÑÓN DE GATO Y CORTE HISTOPATOLÓGICO DE RIÑÓN DE RATAS	12
FIGURA 7. MORFOLOGÍA DE RIÑÓN DE RATA Y SECCIONES CONGELADAS DE GATO	13
FIGURA 8. ESQUEMA GENERAL DE UN EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR. FUENTE:	1
FIGURA 9. EQUIPO DE ELECTROFORESIS, CAPILAR BECKMANCOULTER MDQ P/ACE.	18
FIGURA 10. VISTA INTERNA DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR, VIALES Y CAPILAR..	18
FIGURA 11. <u>SUPERFICIE DEL CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA CARGADA NEGATIVAMENTE. B) CATIONES HIDRATADOS ACUMULADOS CERCA DE LA SUPERFICIE, "DOBLE CAPA". C) FLUJO DE LÍQUIDO EN DIRECCIÓN AL POLO NEGATIVO AL APLICAR UN CAMPO ELÉCTRICO.....</u>	19
FIGURA 12. DIFERENCIA ENTRE LA PRESIÓN ELECTROOSMÓTICA Y LA PRESIÓN HIDRODINÁMICA	21
FIGURA 13. ESQUEMA DE LOS SISTEMAS DE INYECCIÓN HIDRODINÁMICOS: A) PRESIÓN, B) VACIO, C) SIFÓN.	23
FIGURA 14. MIGRACIÓN DE ANALITOS EN ECZ.....	25
FIGURA 15. ESCALA DE PREDOMINIO DE MELAMINA EN FUNCIÓN DEL PH.....	35
FIGURA 16. <i>ELECTROFEROGRAMA DE ESTÁNDAR DE MELAMINA., EN BUFFER DE ACETATOS 30MM, PH 4.....</i>	36
FIGURA 17. <i>ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRAS DE LECHE NIDO EN POLVO CON Y SIN MELAMINA EN BUFFER DE ACETATOS 30MM, PH 4.....</i>	36
FIGURA 18. <i>ELECTROFEROGRAMA DE ESTÁNDAR DE MELAMINA, EN BUFFER DE BORATOS 30MM, PH 8.2</i>	37
FIGURA 19. <i>ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRAS DE LECHE NIDO EN POLVO ADICIONADA Y SIN ADICIÓN ESTÁNDAR DE MELAMINA, EN BUFFER DE BORATOS 30MM, PH 8.2.....</i>	38

FIGURA 20. ELECTROFEROGRAMA DE ESTÁNDAR DE MELAMINA., EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM, PH 3.2	39
FIGURA 21. COMPARACIÓN DE ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE NIDO CON ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADOS CON TCA AL 1% 40	
FIGURA 22. ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRAS DE LECHE NIDO EN POLVO ADICIONADA CON MELAMINA Y SIN ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADAS CON SULFATO DE AMONIO 7%	42
FIGURA 23. ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE NIDO EN POLVO ADICIONADA CON MELAMINA Y SIN ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADAS CON MEZCLA DE SOLVENTES ORGÁNICOS (ACETONA-ETANOL, 50-50)	43
FIGURA 24. ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE NIDO EN POLVO CON ADICIÓN DE MELAMINA Y SIN ADICIÓN MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM.PH 3.2, TRATADAS CON ACIDO CLORHÍDRICO CONCENTRADO.	44
FIGURA 25. ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE NIDO EN POLVO,ADICIONADA CON MELAMINA Y SIN ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADO CON UNA MEZCLA DE ACIDO FOSFÓRICO 1M Y TCA 10%	45
FIGURA 26. ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE(NIDO) CONADICIÓN DE MELAMINA Y SIN ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADO CON TCA AL 10%.....	46
FIGURA 27. COMPARACIÓN DE ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE NIDO ADICIONADA CONMELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2, TRATADA CON TCA A DIFERENTES CONCENTRACIONES.	47
FIGURA 28. COMPARACIÓN DE ELECTROFEROGRAMA DE MUESTRA DE LECHE CON MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES, 30MM, 50MM Y 100MM , A PH 3.2, TRATADOS CON TCA AL 1%.....	48
FIGURA 29. ELECTROFEROGRAMAS DE A)ESTÁNDAR DE MELAMINA, B) MUESTRA DE LECHE ADICIONADA CON MELAMINA Y C) MUESTRA DE LECHE SIN ADICIÓN DE MELAMINA, EN BUFFER DE FOSFATOS 100MM PH 3.2 (CORRIDA), CAPILAR DE 56CM, TRATADO CON TCA 1% Y BUFFER DE FOSFATOS 30MM PH 3.2 (MUESTRA).....	50

GRAFICOS

GRÁFICO 1. ÁREA INTEGRADA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELAMINA [PPM]. SE PUEDE OBSERVAR QUE EXISTE UNA RELACIÓN LINEAL ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE MELAMINA Y EL ÁREA OBTENIDA.	53
--	----

III. Índice de abreviaturas

ANADEVA: Análisis de Varianza
CE: Electroforesis capilar
CZE: Electroforesis capilar de zona
CG: Cromatografía de Gases
CCEM; Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
C.V. Coeficiente de variación
DAD: Detector de Arreglo de Diodos.
DDT: Dicloro Diefenil Tricloroetano.
ECEI: Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico.
ECG: Electroforesis Capilar en Gel
ECC: Electro Cromatografía Capilar
EOF: Flujo electroosmótico
FAO; Food and Agriculture Organization
FDA: Food and Drug Administration
FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Ha: Hipótesis alterna
HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
Ho: Hipótesis nula
IC μ_1 : Índice de Confianza de la pendiente
ITC: Isotacoforesis Capilar
Kv: Kilovoltios
LD: Dosis letal
LICONSA: Leche Industrializada Conasupo, S.A. de C.V.
 μ_{ap} : movilidad aparente
 μ_{EOF} : Movilidad del Flujo electroosmótico
(MEL): Concentración de Melamina
NMX: Norma Mexicana
NNP: Nitrógeno no proteico
NOM: Norma Oficial Mexicana.
NP: Nitrógeno proteico
 R^2 : Coeficiente de determinación
OMS: Organización Mundial de la Salud
pH: Potencial de hidrogeno
ppm: partes por millón
PROFECO: Procuraduría Federal del Consumidor
PVDF: Polifluoruro de vinilideno
 S^2 : Varianza
SPE: Extracción de Fase Solida
TCA: Acido tricloroacetico
tm: tiempo de migración
UE: Unión Europea
USP: United States Pharmacopeial
UV/VIS: Ultravioleta/ Visible.

1. Introducción.

En años recientes se ha presentado el fenómeno de la adulteración de leche, con el fin de aparentar un contenido nutrimental acorde con lo que se marca en la regulación para leche 100% pura de vaca y las fórmulas lácteas.

En septiembre de 2008 problemas de salud en miles de niños en China fueron relacionados con la adulteración ilegal de fórmulas lácteas infantiles con la sustancia llamada melamina. Este incidente llamo la atención internacional, aunque no era la primera vez que este compuesto era encontrado en algún alimento. En la primavera del 2007 miles de gatos murieron al consumir alimento para mascota contaminado con melamina. ^(Yan & Zhou, 2009)

Una investigación más detallada reveló que este compuesto no solamente se encontraba en fórmulas lácteas o alimento para mascota, también fue encontrado en harina de trigo, alimento para ganado así como en aves de corral que incluyen pollo, huevo, pescado y cerdos. Tanto la FDA como el gobierno Chino no aprueban la melamina como aditivo alimentario. Sin embargo debido a su estructura rica en nitrógeno, la melamina es añadida deliberadamente, ya que la cantidad de nitrógeno, se calcula para determinar el contenido proteico de un producto. ^(Meng, Shen, Hou, & Wang, 2009)

La Organización Mundial de la Salud informó que la melamina no tiene nada que hacer en los alimentos como la leche y ratificó que hasta el momento la adición de la melamina en los alimentos no es aprobada por la OMS, la FAO ni el Codex Alimentarius, máximo órgano internacional que fija los estándares de calidad de los alimentos.

A partir del escándalo de intoxicación infantil en China por la presencia de melamina en leche, la Unión Europea (UE) establece un límite máximo de 2 mg/kg (ppm) a la importación de productos que contienen leche o productos lácteos originarios o procedentes de la China(UE, 2008). También la UE estableció una dosis máxima diaria tolerable de 0,5 miligramos de melamina por kilo de peso.

La FDA de Estados Unidos (US FDA- U.S. Food and Drug Administration conocido por sus siglas en Inglés) fijó un límite de 2.5 ppm de melamina en productos lácteos para adultos, no estableciendo ningún valor para niños ^(Baker, Brown, & Bruckner, 2008). En China se definió aceptar niveles de melamina de 1 ppm para las fórmulas lácteas infantiles y 2.5 ppm para leche líquida, en polvo y otros productos lácteos.

La melamina y el ácido cianúrico son especialmente tóxicos para el aparato urinario de los humanos y los animales. Un efecto regularmente observado en animales experimentales expuestos a melamina es la formación de cálculos vesicales, y en algunos estudios se observó microcristaluria.

Los datos sobre el incidente registrado en China en 2008 demuestran que las preparaciones para lactantes contaminadas principalmente con melamina pueden provocar formación de cálculos si las concentraciones son suficientes. ^(OMS, 2008).

En 2009 se introdujo la Electroforesis Capilar por Zona (CZE), con Detector de Arreglo de Diodos (DAD), como método para la determinación de melamina en leche líquida, yogurt, leche en polvo y el alimento para pescado. ^(Chen & Yan, 2009), siendo la melamina el analito de interés de este estudio.

La electroforesis es la migración de iones presentes en una disolución por influencia de su campo eléctrico, bajo una relación carga/masa ^(Harris C., 2002).

La Electroforesis Capilar (CE) es una herramienta analítica, una técnica poderosa y relativamente nueva, que presenta una gran resolución en las separaciones, tiene tiempos de análisis cortos y utiliza cargas de concentraciones muy pequeñas.

La Electroforesis Capilar de Zona (CZE) es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y de versatilidad.

La CZE es la forma más simple de CE principalmente por que el capilar es llenado solo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. ^(Castillo R., Revilla V., & Lopez A., 2005)

Actualmente en la industria, la necesidad de resultados rápidos y fiables requiere de nuevos y sofisticados métodos de análisis.

En ámbitos como la industria alimentaria o farmacéutica, se han introducido equipos como HPLC, Cromatografía de Gases(CG), Espectroscopia de Masas, Resonancia Magnética Nuclear, Electroforesis Capilar, entre otros; estos equipos, permiten acortar el tiempo en la generación de resultados, además de procesar un mayor número de muestras con un mismo equipo.

Claro está que estos equipos requieren de mantenimiento, algunos necesitan solventes o gases de elevado costo para el procesamiento de muestras, o bien requieren grandes volúmenes de estos, lo cual puede llegar a ser contaminante para el ambiente

Actualmente los Métodos Oficiales para la cuantificación y determinación de ciertas sustancias tanto en la FEUM como en la USP, fueron desarrollados con las técnicas de Espectrofotometría UV/VIS y HPLC

El presente trabajo pretende colaborar con la introducción de un nuevo método de análisis para la detección de contaminantes alimentarios en este caso, la contaminación de leche y fórmulas lácteas ya sean líquidas o en polvo con melamina, mediante la técnica de Electroforesis Capilar.

2. Generalidades

❖ ¿Qué es la leche?

La leche es la secreción normal de las glándulas mamarias de vacas sanas, siendo un líquido heterogéneo, blanco, de sabor dulce y reacción iónica (pH) cercano a la neutralidad. No debe contener sustancias extrañas a su composición natural, tales como bactericidas, bacteriostáticos, preservativos químicos o biológicos, antibióticos o sustancias tóxicas.

Los componentes de la leche se encuentran en equilibrio, de tal manera que es un alimento de gran valor nutritivo, suministrando proteínas, grasa, lactosa, minerales y algunas vitaminas. La composición general de la leche y las propiedades que tiene cada uno de los elementos que la constituyen se indica en el siguiente cuadro: ^(Vázquez, 2007)

Componente	Porcentaje Promedio
Agua	90.5
Lactosa	4.9
Lípidos (fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, carotenos)	3.5
Proteínas (Caseínas, Globulinas, albuminas, componentes nitrogenados no proteicos)	3.4
Sales Minerales	0.9

Figura 1. Composición química de la leche cruda

La (NOM-243-SSA1, 2010).establece las definiciones para leche y fórmula láctea:

Leche: Secreción natural de las glándulas mamarias de vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro.

Fórmula láctea: Es el producto elaborado a partir de ingredientes propios de la leche, tales como caseína, grasa, lacto sueros y agua para consumo humano. En cantidades de conformidad con lo que establece la norma de denominación comercial correspondiente.

La diferencia entre una formula láctea y leche entera es el contenido de proteínas, para ser considerado leche el producto debe contener un mínimo de 30g/l de proteínas, de lo contrario se le denomina formula láctea. ^(Profeco, 2004)

Adulteración de la leche

Los elevados costos de producción en la leche así como el incremento de algunas materias primas para la elaboración de leche de consumo humano han llevado a algunos productores y empresas lecheras a adulterar este producto.

Según la **NOM-155-SCFI-2003** **adulteración se define como:**

“Cuando la naturaleza o composición de la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, no corresponda a aquellas con las que se denomine, etiquete, anuncie, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones establecidas en esta norma oficial mexicana, o cuando la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, hayan sido objeto de tratamiento que disimule su alteración o encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas” ^(NOM-155-SCFI, 2003)

La leche puede ser adulterada voluntaria o involuntariamente, en esencia la adulteración se puede definir como algo que se agrega a la leche y que produce cambios en el volumen y/o composición química.

1. Adulteración con agua

Una de las prácticas fraudulentas más comunes en la producción e industria de la leche es la adición de agua con el objeto de aumentar el volumen.

2. Adulteración con azúcar (sacarosa)

Puesto que el glúcido predominante de la leche es la lactosa, la presencia de sacarosa en la muestra analizada será proveniente de la adulteración, que al igual que los cloruros, se añaden con el fin de enmascarar la adulteración por agua

3. Adulteración con antibióticos

Otro medio de adulterar la leche son los antibióticos. Las plantas lecheras exigen leche sin antibióticos ya que al ser transformados en queso o yogurt, estos no permiten la maduración adecuada y por lo tanto no es posible obtener un producto de buena calidad.

4. Adulteración con sustancias químicas.

Al añadirles el productor o empresa pretende enmascarar alguna deficiencia ya sea en proteínas, minerales, vitaminas e incluso grasas para así cumplir con las normas establecidas en cada país. (Chavez A., 2008)

Los contaminantes químicos más frecuentemente detectados son: insecticidas (DDT, aldrin, dieldrin, heptacloro), fungicidas, gerbicidas, higienizantes (yodo, cloro, peróxido de hidrogeno, amonios, cuaternarios) el grupo de antibióticos (penicilina, estreptomina, cloro tetraciclinas), en el presente trabajo se estudió a la melamina como adulterante en leche.

La adulteración pretende obtener mayores rendimientos del producto final, como la consecuente ganancia económica.

❖ Melamina

La melamina es una sustancia química industrial tóxica, usada en la fabricación de resinas, plásticos o pegamentos. (Valerio, 2008)

Fue sintetizada por primera vez por el científico alemán Justus von Liebig en 1834. Es una base orgánica que presenta una fórmula química $C_3H_6N_6$ y se conoce con el nombre 1, 3,5 -triazina -2, 4,6-triamina. Es un polvo blanco cristalino y es soluble ligeramente en agua. Presenta propiedades de retardar el fuego, debido a su liberación de nitrógeno gaseoso cuando es quemado o carbonizado; el nitrógeno representa el 66% de su masa total. (Escobar, Faure, & Sosa, 2010)

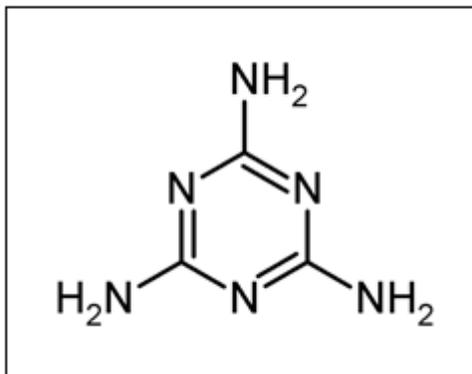


Figura 2. Estructura de la molécula de melamina. (Fuente: <http://www.cuencarural.com/lecheria/49889-adulteracion-de-la-leche-en-polvo-caso-de-la-melamina/>)

Inicialmente la producción de melamina ocurre cuando la cianamida de calcio es convertida en una dicianidiamida y esta es calentada por encima del punto de fusión, sin embargo en la actualidad se emplea la urea para la producción de melamina.

Este último proceso ocurre en dos pasos, una primera reacción endotérmica donde la urea se descompone para formar el ácido cianúrico (HCNO) más amoníaco. En la segunda etapa ocurre la polimerización del ácido cianúrico para formar la melamina y la liberación de dióxido de carbono, este proceso es exotérmico.



Reacción general para la producción de melamina

Durante la síntesis química pueden ocurrir diferentes productos intermedios como son ácido cianúrico, ammeline y ammellida (Figura 3), estos metabolitos también puede aparecer por la degradación microbiológica de la melamina. (Ehling & Tefera, 2007)

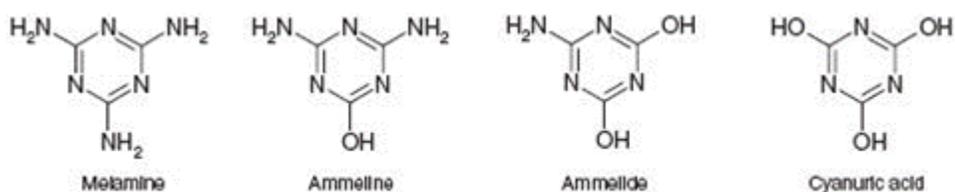


Figura 3. Estructura química de la melamina y sus metabolitos. (Fuente: *Revista de Salud Animal*. Vol. 32 No. 1 (2010): 22-31)

Metabolismo y toxicidad de la melamina.

La melamina no es metabolizada por los animales y es excretada en más del 90% en la orina dentro de las 24 horas. Estudios realizados en animales muestran que la melamina tiene un rango de vida media entre 2.7 y 4.04 h cuando es administrada por vía oral o endovenosa.

(Hau AK, 2009)

Un estudio farmacocinético de una aplicación intravenosa de la melamina (6.13 mg/kg) en puercos destetados mostró un aclaramiento de 0.11 ± 0.01 L/h/kg y un volumen de distribución de 0.61 ± 0.04 L/kg, mientras en el modelo de rata el valor de la vida media de la melamina fue 1.5 veces menor y el volumen de distribución 3 veces mayor, estas diferencias se atribuyen a la velocidad de filtración glomerular.

Otro estudio farmacocinético en cerdos estimó que el intervalo de retiro de la carne fue de 19.2 a 20.9 hrs. cuando fueron expuestos a una dosis única de melamina de 3.0 y 5.12 mg/kg, mientras un estudio de dosis repetida durante dos veces al día por un tiempo de 7 días mostró un intervalo de 20.1 a 21.3 h. Los intervalos de retiro fueron fundamentados por la determinación directa de la melamina en el tejido del riñón con un nivel de seguridad de 50 ppb. (Buur, Baynes, & Riviere, 2008)

Un estudio controlado en vacas Holstein en lactación se le suministró en la dieta 17 g de melamina por día, apareciendo en la leche 8 horas después de la primera ingestión alcanzando su máxima excreción a las 56 horas, donde el porcentaje de melamina en la leche osciló entre 1.7 y 2% con respecto a la cantidad consumida diariamente. Una vez retirado el alimento contaminado se mantuvo los niveles detectables de melamina en la leche hasta 152 h.

Estos resultados son de gran importancia porque hasta el momento se pensaba que la presencia de melamina se debía solo a problemas de adulteración directa de la leche. (Cruywagen, Stander, & Adonis, 2009)

Cuando existe adulteración por melamina los niveles de nitrógeno en leche se incrementan lo que falsea los resultados en proteína bruta, Esto se debe en primer lugar al bajo nivel de excreción y en segundo lugar al efecto dilución por el nivel producción de leche.

Esta adulteración implica la modificación de las fracciones nitrogenadas naturales de la leche; la fracción nitrogenada de la leche está compuesta por dos grandes grupos: las proteínas (95%), siendo las caseínas la fracción más representativa y el nitrógeno no proteico (5%), siendo la urea la de mayor importancia relativa. El nitrógeno no proteico (NNP) engloba a aquellos componentes de la leche que permanecen en disolución tras la precipitación de las proteínas lácteas cuando se adiciona ácido tricloro acético al 12%.

Taverna, Páez, et al., indican que el NNP representa en promedio el 5% del nitrógeno total (NT) de la leche y que el rango normal de variación se ubica entre 4 y 8 %

Variable	Valor (g/100ml)	Rango
NT	0,566	0,482-0,770
NNP	0,031	0,023-0,042

Tabla 1. Promedio y rango del Nitrógeno total (NT) y NNP en leche según diversos autores. Fuentes: EckhardSchlimme y Wolfgang Buchheim (2002). La leche y sus componentes; Taverna y Coulon (2000). La calidad de la leche y de los quesos.

Actualmente se utiliza en método de Kjeldahl-Gunning para estimar el contenido proteico en productos alimentarios, el fundamento de esta reacción se basa en la transformación de las distintas formas de Nitrógeno presente en la muestra a forma amoniacal NH_4^+ , mediante una digestión ácida y en caliente en presencia de un catalizador. El NH_4^+ es posteriormente neutralizado a NH_3 mediante una base fuerte en exceso, y destilado por la acción del vapor. El amoniaco liberado es recogido en forma de NH_4^+ mediante burbujeo del destilado en una disolución de ácido bórico que se valora posteriormente con una solución de ácido clorhídrico diluida de concentración conocida. (NMX-F-068-S-1980)

También se ha reportado la presencia de melamina en alimentos debido a la transformación metabólica del plaguicida ciromazina dentro del cuerpo, un estudio en gallina ponedoras donde se suministró el plaguicida ciromazina en la dieta a una concentración de 5ppm, se encontró residuos de melamina y ciromazina en carne y huevo a una concentración de 0.25 ppm. ^(Escobar et al., 2010)

La ingestión de melamina puede provocar daños en el sistema reproductor, en la vejiga o en formación de cálculos renales. Esto último ocurre cuando la melamina se combina con el ácido cianúrico formando el cianurato de melamina un producto insoluble que obstruye las vías urinarias impidiendo la correcta eliminación de la orina, por otra parte el flujo sanguíneo dentro del riñón también se afecta.

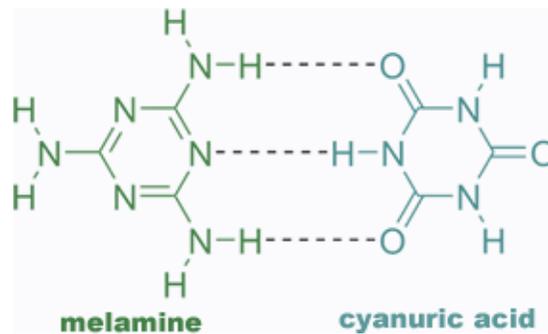


Figura 4. Unión de melamina con ácidocianúrico. (Henderson, 2008)

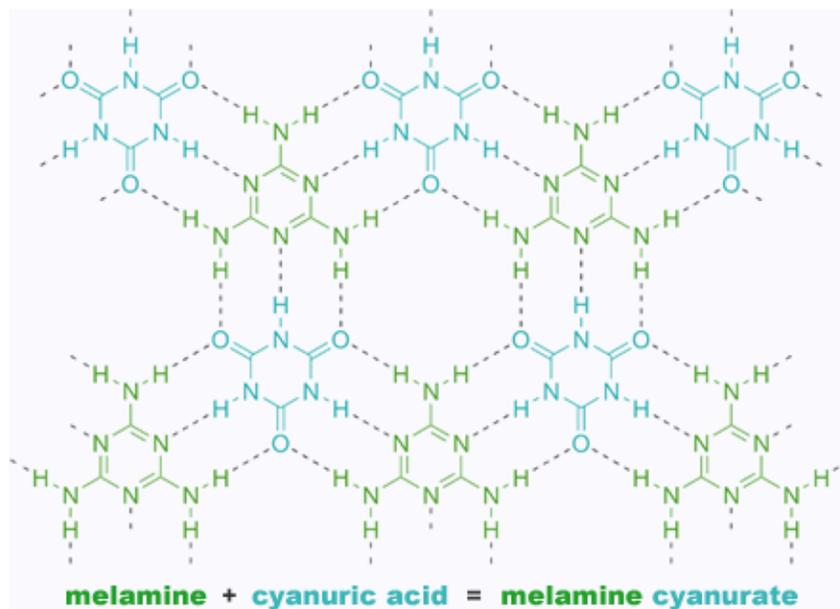


Figura 5. Estructura de los cristales de cianurato de melamina (Henderson, 2008)

Toxicidad aguda

Reportes de publicaciones informan que el valor más bajo de LD50 por vía oral en ratas es de 3161 mg./kg. Estudios toxicológicos realizados con el cianurato de melamina en ratas y ratones sugieren que presenta mayor toxicidad que cuando se analiza la melamina o el ácido cianúrico solos (la LD50 del cianurato de melamina vía oral en rata fue de 4.1g. /kg., para la misma especie pero evaluando melamina y ácido cianúrico, las LD50 fueron 6 y 7.7 g. /kg. respectivamente) (Lab, 2005). Un estudio realizado para evaluar la toxicidad de la melamina y el ácido cianúrico y su combinación en gatos, corroboran que esta última es la responsable de los daños renales agudos en gatos. (Puscher & Poppenga, 2007)

Toxicidad crónica

La ingestión de melamina además de los daños antes mencionados puede desarrollar cáncer de vejiga.

Un estudio realizado en perros donde se suministró melamina al 3% mezclado con el alimento durante un año (1200 mg./kg./día) provocó los siguientes cambios: disminución de la gravedad específica de la orina, poliuria, presencia de cristales de melamina, proteína y sangre oculta. (EPA, 2002)

Otro estudio controlado en ratas durante dos años expuestas a una dieta alta de melamina (4500 ppm. 263 mg./kg./día), encontraron asociaciones con un aumento de cálculos renales y un incremento de la incidencia de tumores en la vejiga de ratas hembras (USFDA, 2007).

En diversos protocolos toxicológicos donde se evalúa la toxicidad de la melamina y sus metabolitos en distintas especies corroboran el efecto sinérgico entre ellos. Un estudio en ratas muestra que la mezcla de melamina, ammelina, ammelida y ácido cianúrico (400/40/40/40 mg./kg.) y de melamina y ácido cianúrico (400/400 mg/kg) presentan mayor toxicidad que los elementos independientes. (Dobson, Mottlagh, & Quijano, 2008)

Los principales hallazgos anatómicos son: riñones edematosos con un incremento de su peso y presencia de precipitado de color amarillo en los túbulos.

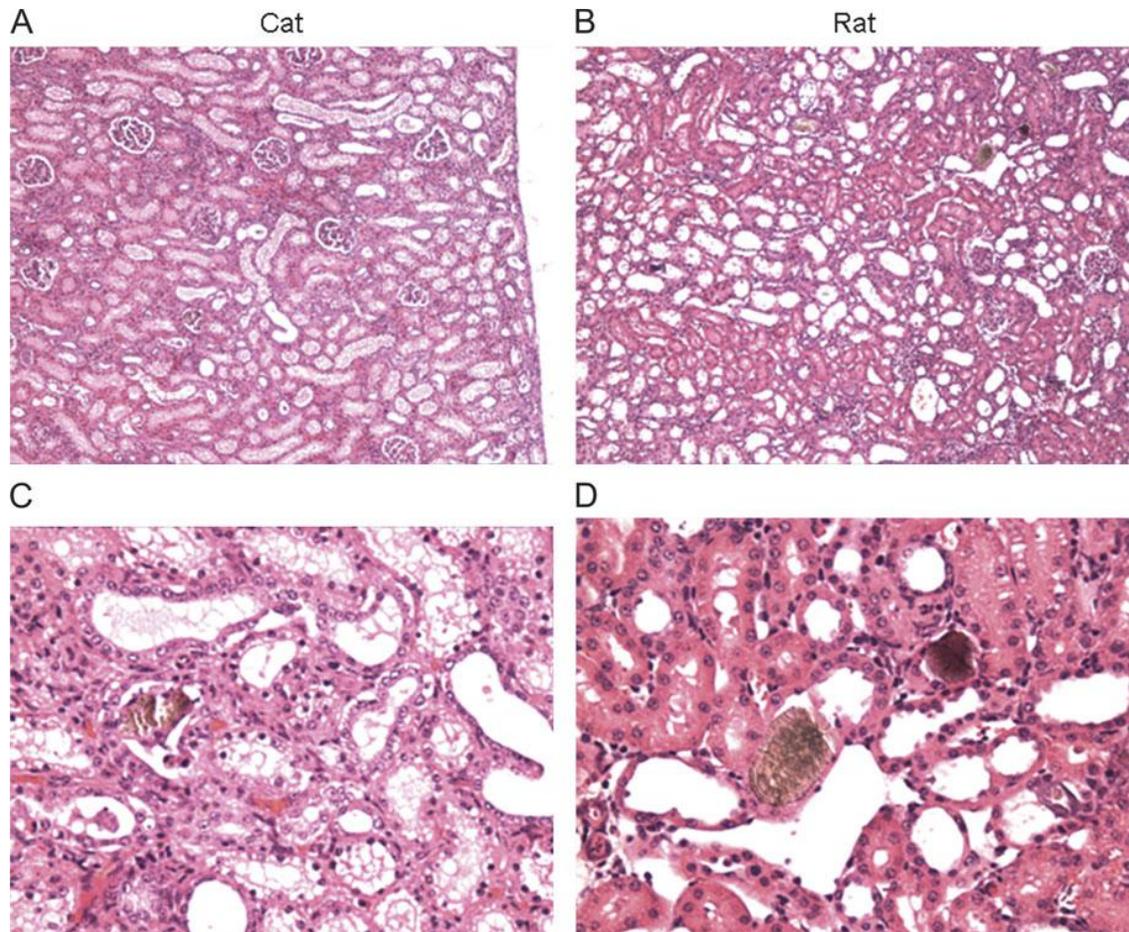


Figura 6. Histopatología de riñón de gato (A y C), después de morir por consumo de alimento contaminado con melamina. (B y D) corte histopatológico de riñón de ratas con una mezcla de ácidocianurico y melamina. (C Y D), ampliación de la imagen de las muestras. Se aprecia en ambas imágenes dilatación tubular y precipitación de los cristales de cianurato de melamina. Fuente: (Dobson, Motlagh, & Quijano, 2008)

En histopatología de secciones congeladas se observa la presencia de cristales en la fracción larga de los túbulos renales particularmente en la medula, mientras en secciones fijadas con formalina aparece dilatación tubular extensiva.

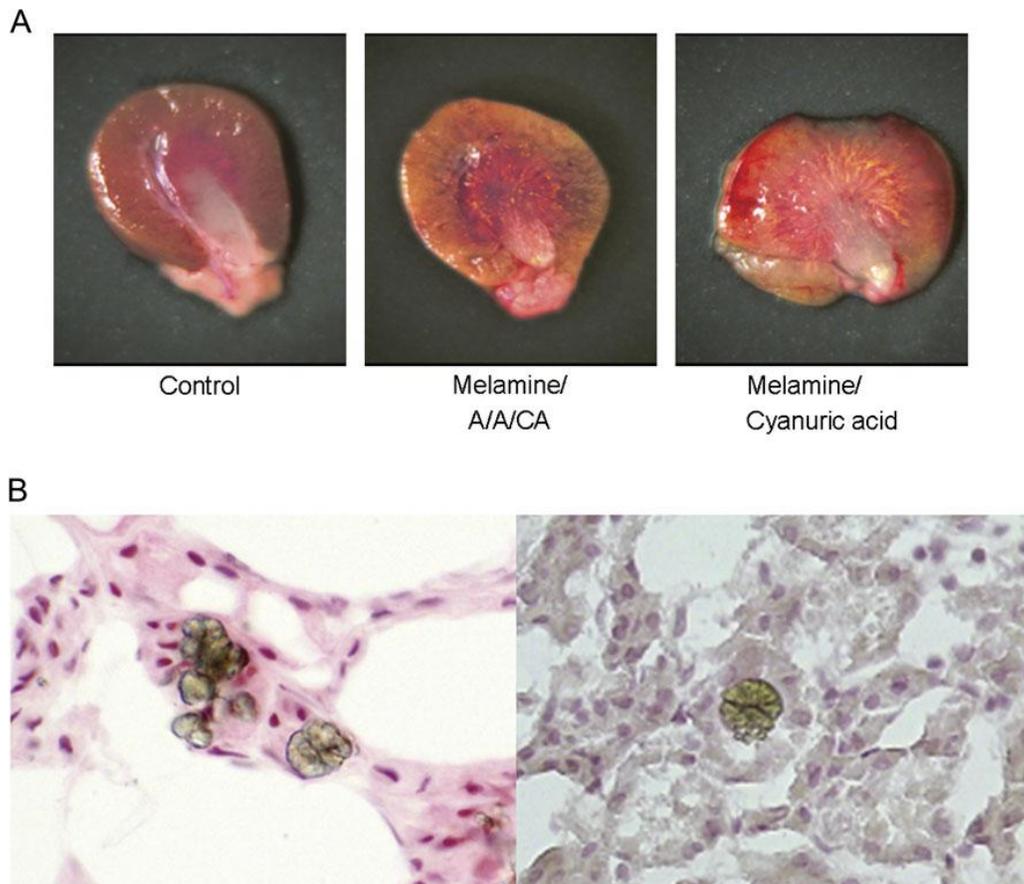


Figura 7. (A) Morfología de riñón de rata después de tratamiento con mezcla de triazinas (centro) y de melamina con ácido cianurico (derecha). Se observa numerosos precipitados de color amarillo-café, sobre todo hacia la medula del riñón (B) Secciones congeladas de gato (izquierda) y rata (derecha), demostrando la presencia de cristales dentro de los túbulos. *Fuente:* (Dobson, Motlagh, & Quijano, 2008)

Adulteración de leche por melamina

En el 2008 varias compañías en China se vieron implicadas en un escándalo que involucraba leche y fórmulas infantiles, que habían sido adulteradas con melamina, provocando, cálculos renales y falla renal, afectando especialmente a niños pequeños. Alrededor de 300,000 personas se enfermaron, 12, 800 fueron internadas y se reportaron la muerte de 4 niños. (Černova, Razmislevičienė, & Padarauskas, 2009)

Este número de afectados llevo al gobierno de China a declarar que la epidemia se debía a la contaminación de leche con esta sustancia, por lo cual implemento una política para detectar cálculos renales en niños, la epidemia además incluía la falla renal y muerte de animales que fueron expuestos a alimentos contaminados con la ya mencionada melamina.

Por esta razón el gobierno chino empezó con una investigación para determinar si existía relación entre los pacientes infantiles con daño renal y el consumo de estas leches y fórmulas lácteas contaminadas, esta investigación fue realizada por la: *Peking University First Hospital* y el *Research Center of Clinical Epidemiology, Peking University Third Hospital*, la investigación consistió en practicar una serie de cuestionarios a los padres de niños menores de 36 meses que habían sido previamente ubicados como posibles afectados por la ingestión de estas fórmulas y que presentaban sintomatología característica de daño renal. Además se realizaron uroanálisis, pruebas de función renal y hepática, pruebas urinarias con marcadores bioquímicos y ultrasonido. Este estudio clasificó las fórmulas lácteas infantiles como: alto contenido de melamina (>500 ppm), moderado contenido de melamina (<150 ppm), y no melamina (0 ppm).

Los resultados obtenidos de manera general fueron: de 589 niños evaluados, 421 ingirieron fórmulas contaminadas, 50 desarrollaron cálculos renales, 112 se sospechaban de cálculos, de los niños afectados con cálculos renales el 5.9% tuvieron hematuria y 2.9% leucocituria.

Por lo que el estudio concluyó que la exposición prematura a fórmulas lácteas contaminadas con melamina estaba relacionada con la aparición de cálculos renales, y los niños afectados presentaban todos los síntomas de urolitiasis.

Este estudio fue publicado en la revista: **The New England Journal of Medicine**.

Después de lo sucedido instituciones como la FDA y la OMS fijaron los límites permitidos, la FDA publicó en sus guías que tanto para melamina como sus análogos el límite permitido es de 2.5mg/kg., mientras que la OMS establece en el 2008 cantidades de 1mg/kg, en ese mismo año las autoridades de China establecieron que límite para fórmulas infantiles sea también de 1mg/kg y de 2.5 para cualquier otro producto lácteo. ^(Yun-Kai et al., 2011)

Esto llevó a la necesidad de desarrollar nuevos métodos de análisis para la melamina. Estos incluyen cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC en sus siglas en inglés); CG o HPLC acoplada a un espectrómetro de masa, electroforesis capilar e inmunoensayos entre otros. ^(WHO/HSE-FOS, 2008).

Si bien la espectroscopia de masas es una excelente herramienta para la identificación molecular, esta es mucho más costosa que la espectroscopia de UV, además que requiere un tratamiento previo con Extracción en Fase Sólida (SPE), lo que encarece el estudio.

En estudios recientes, Liu & Todd, 2012, se dice la melamina puede ser separada utilizando CE, un método eficiente y con costo beneficio, para moléculas pequeñas que presenta muchas ventajas, incluyendo el mínimo consumo de muestra y reactivos y además una rápida separación. Según esta investigación, el análisis de melamina contenida en leche o en otro tipo de matrices es relativamente sencillo ya que muchas veces no requiere de una extracción de fase sólida (EFS).

Sin embargo si el método es acoplado con un detector de UV común, la sensibilidad y reproducibilidad pueden convertirse en un problema.

Generalmente los métodos aplicados para la determinación de melamina están basados en la precipitación de proteínas con ácido acético, ácido tricloroacético o ácido trifluoroacético, seguido de ultra centrifugación y del análisis directo del sobrenadante mediante Electroforesis Capilar de Zona.

El métodos de ECZ para determinar melanina está basado en la migración y separación de esta molécula en un campo electroforético, un buffer de acetatos es usado como medio de soporte electrolítico y la longitud de onda que se utiliza se encuentra entre los 205 y 208 nm. ^(Lumex, 2008)

❖ Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante. Esta técnica de separación fue desarrollada, en primer lugar por el químico sueco Arne Tiselius, quien durante la década de los años treinta la aplico en el estudio de las proteínas séricas, el cual le valió el Premio Nobel en 1948.

La electroforesis se ha aplicado a un conjunto de analitos difíciles de separar tales como aniones, cationes inorgánicos, aminoácidos, fármacos, vitaminas, carbohidratos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras especies.

Una de las ventajas de la electroforesis es su capacidad de separar macromoléculas de interés en el área de investigación biotecnológica, biológica y bioquímica. ^(Skoog & Holler, 2001)

La electroforesis convencional ha sido y sigue siendo de gran utilidad; sin embargo este tipo de separación electroforética es laboriosa, lenta y difícil de automatizar.

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o de iones cargados eléctricamente apareció en 1967, más adelante en 1980 se emplearon técnicas más avanzadas en la obtención de capilares de sílice fundida. ^(Castagnino, 2000)

Las ventajas del uso de estos capilares son:

- Los capilares son de materiales con propiedades anticonvectivas, por lo que no es necesario la utilización de gel como medio de soporte
- Se pueden aplicar altos voltajes, por tanto, se consigue una reducción del tiempo de análisis y aumento de la eficiencia y resolución.
- El uso de capilares con un pequeño diámetro interno, así como su longitud 10 a 200µm y de 40 a 100cm respectivamente, han permitido el incremento del potencial aplicado de 5-10 voltios hasta 30,000 voltios, ya que el uso de capilares mejora en mucho la disipación de calor.
- Se tiene la posibilidad de realizar detección de con una interface en línea con detectores espectrofotométricos, espectroscópicos, fluorescentes, electroquímicos.
- Provee separaciones muy eficientes en micro volúmenes de disolución de muestra (0.1-10 nL.) sin necesidad de un sistema de bombeo a alta presión ^(Skoog et al., 2001)

Componentes instrumentales de un equipo de Electroforesis Capilar

- El **capilar** que debe disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inerte, así como ionizable, transparentes al UV-VIS, flexibles, robustos y económicos, siendo los de sílice fundida los que mejor cumplen con estas condiciones y por ello son los ampliamente utilizados. Estos capilares son recubiertos en su parte externa por una película de poliamidas, para protegerlos de los daños mecánicos y para aumentar su flexibilidad.
- Los electrodos de platino (ánodo y cátodo)
- Una fuente de poder de alto voltaje, capaz de generar hasta 30 Kv, manejo de polaridad positiva y negativa, así como un controlador de corrientes hasta 300 μ A.
- Bandejas de muestra y soluciones amortiguadoras. (Buffer)
- Viales los cuales pueden ofrecer varias capacidades de volumen. En ellos se introducen los extremos de los capilares, para llenar a este con el medio electroforético, así también son introducidos los electrodos, negativo (cátodo) y positivo (ánodo), los cuales están conectados a la fuente de poder.
- Sistema de introducción de muestra puede ser hidrodinámica (presión), o electrocinética.
- Sistema de detección, permite detectar y cuantificar los diferentes componentes de la muestra previamente separados. Pueden estar por fuera o en uno de los extremos, o bien en línea es decir en el capilar.
- Sistema de registro o procesamiento. Software permite introducir instrucciones, variar parámetros del sistema, interpretar las señales del detector en forma de electroferogramas y realizar cálculos. (Fernandez & Segura, 2005); (Vargas, 2007).

Esquemas de los componentes básicos de un Equipo de Electroforesis Capilar.

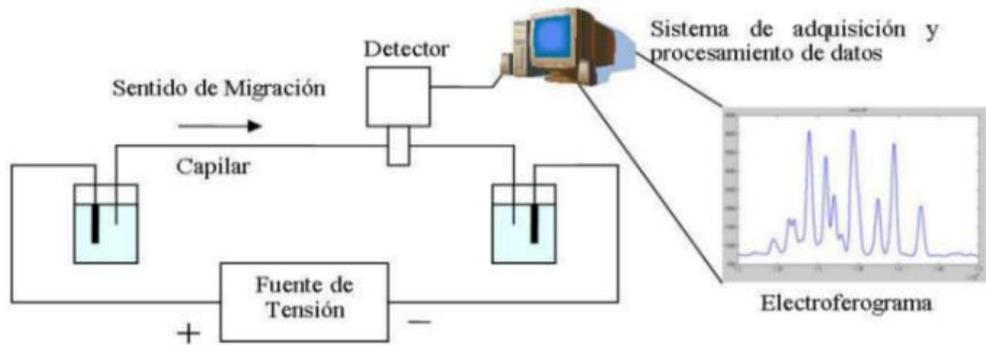


Figura 10. Esquema general de un equipo de Electroforesis Capilar. Fuente:

<http://www.inq.ula.ve/patrones.electroforesis/Electroforis%20Capilar/SISTEMA%20DE%20ELECTROFORESIS%20CAPILAR.htm>, fecha de consulta 15/10/2012



Figura 9. Vista interna del Equipo de Electroforesis Capilar, viales y capilar. Fuente: <http://www.chem.sc.edu/faculty/morgan/lab.html>.

Fecha de consulta: 19/10/2012.



Figura 8. Equipo de Electroforesis, Capilar BeckmanCoulter MDQ P/ACE

Fuente: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=BR-9515A1.pdf>. Fecha de consulta: 19/10/2012.

Principios de separación.

La separación electroforética está basada en las diferencias de movilidad de los analitos, en presencia de un campo eléctrico. La velocidad del analito cuando ningún flujo electroosmótico está presente, puede ser dada por la siguiente ecuación:

$$v = \mu E$$

Donde v = la velocidad del analito

μ = La movilidad electroforética

E = campo eléctrico

El campo eléctrico es solo una función de la aplicación de voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm), mientras que la movilidad electroforética depende de la especie iónica, tamaño, de la carga, temperatura, de la concentración y naturaleza del analito. La siguiente ecuación explica el movimiento de las partículas en función de las variables mencionadas anteriormente. (Castillo R. et al., 2005)

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

Donde μ = La movilidad electroforética.

q = carga del analito

r = radio molecular

η = viscosidad de la solución.

Flujo electroosmótico

Además de las moléculas cargadas, dentro del capilar, también se desplaza el buffer o tampón, bajo la influencia de un campo eléctrico, a este fenómeno se le conoce como flujo electroosmótico (EOF). Al trabajar con polaridad positiva de manera que el polo positivo o ánodo se ubica hacia el extremo donde es inyectada la muestra, el EOF se mueve del polo positivo hacia el negativo es decir que el tampón se mueve del vial de entrada a través del capilar hacia el detector y hacia el vial de salida. (Baker D. R., 1995)

La pared del capilar está constituida por un entramado del grupo silanol Si-OH con un pKa que se encuentra alrededor de 5. Esto hace que al trabajar con soluciones amortiguadoras básicas se encuentre cargada negativamente con el grupo silanoato Si-O⁻ y que los H⁺ o cargas libres positivas que se encuentran en la solución se sitúen cerca de las cargas negativas de la pared formando una doble capa. Al aplicar una diferencia de potencial las cargas libres positivas y negativas se moverán hacia polos contrarios. Como las cargas negativas de la pared no pueden moverse, existe un flujo resultante de cargas positivas hacia el polo negativo (cátodo).

Los cationes como del H^+ se encuentran solvatados con moléculas de agua, esto hace que el desplazamiento sea de igual manera en todo el seno de la solución tampón, creando el flujo electrosmótico. ^(Oliveres, 2001)

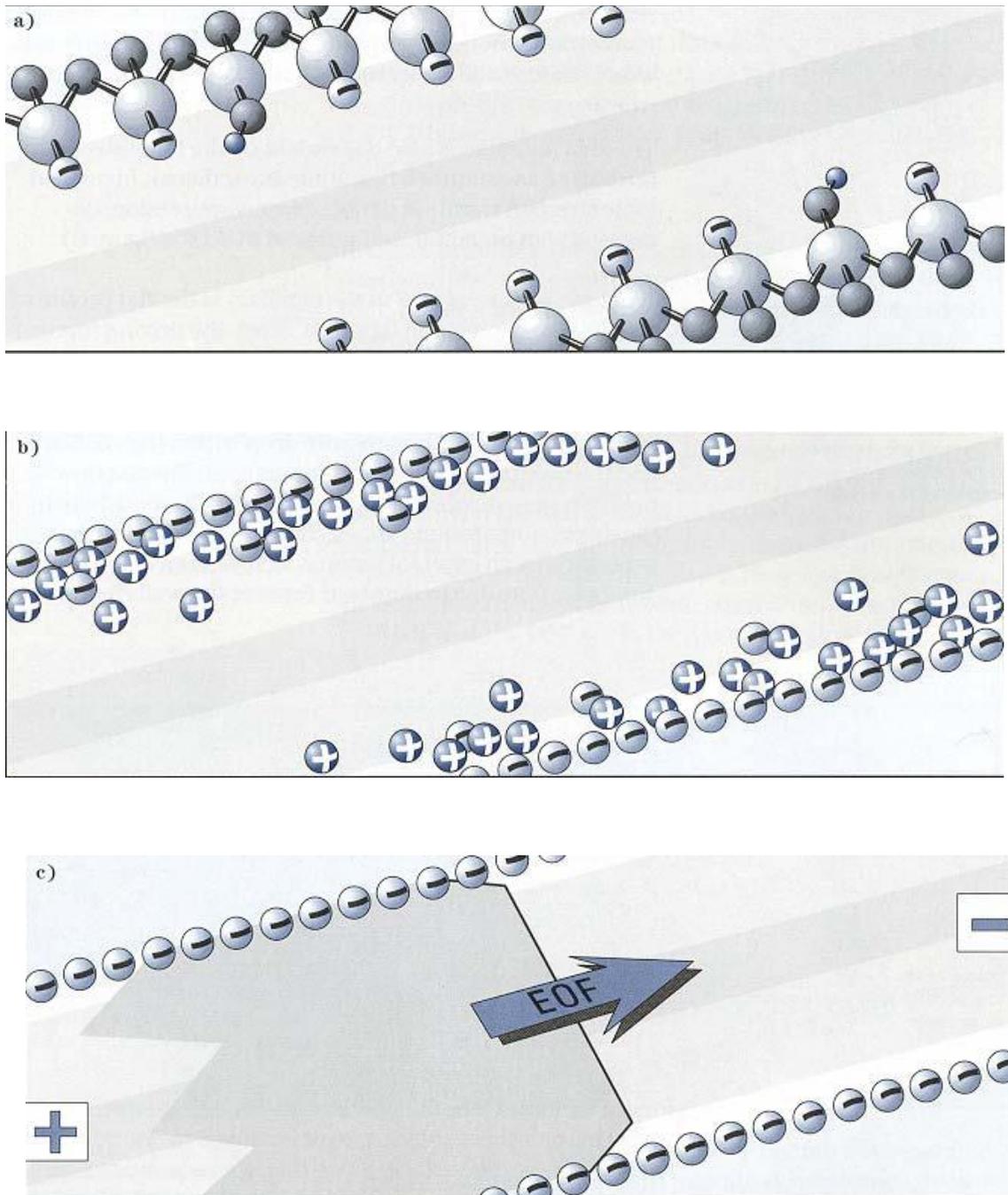


Figura 11. a) Superficie del capilar de sílice fundida cargada negativamente. b) Cationes hidratados acumulados cerca de la superficie, "doble capa". c) Flujo de líquido en dirección al polo negativo al aplicar un campo eléctrico. Fuente: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/78/3/cap14.pdf>. Fecha de consulta: 22/10/2012.

Los contraiones (mayormente cationes) los cuales se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de la carga, forman la ya mencionada doble capa, creando un potencial muy cerrado a la pared. Este potencial se origina entre la pared del capilar y los contraiones, también o solución amortiguadora y es denominado potencial zeta, que está dado por la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon}$$

Donde η = viscosidad del medio

ϵ = constante dieléctrica

μ_{eo} = movilidad del flujo electroosmótico.

Mientras que la velocidad lineal del flujo electroosmótico está dada por la ecuación:

$$\eta_{eo} = \frac{\epsilon E \zeta}{4 \pi \eta}$$

El potencial zeta es determinado esencialmente por la carga de la superficie de la pared del capilar. Esta carga depende fuertemente del pH por lo que la magnitud del EOF varía en función de esta variante. Por lo que a pH alcalino se encontrara ionizado el grupo silanol, teniendo como consecuencia un potencial zeta alto, a valores bajos de pH hay una menor superficie ionizada y un potencial zeta menor. (Heiger N., 1997)

Fenómenos que afectan el flujo electroosmótico

- Campo electrico,
- pH del Buffer (pH bajo, disminuye el EOF y pH alta, aumenta el EOF)
- Fuerza Iónica o concentración del buffer (Al aumentar la concentración del Buffer, disminuye el Potencial Zeta y EOF).
- Temperatura (Cambia la viscosidad)
- Modificadores orgánicos (Cambian el Potencial Zeta y la Viscosidad)
- Surfactantes.
- Recubrimientos covalentes.
- Polímeros hidrofílicos neutros.

Una característica única del EOF es que presenta un perfil de distribución plano, el cual se desvía pocos nanómetros de la pared, de manera que proporciona la misma velocidad a todos los solutos, sea cual sea su posición en la columna. Debido a este hecho el EOF no contribuye al ensanchamiento de bandas por difusión longitudinal como lo hace el perfil parabólico del HPLC, cuando el líquido se impulsa por presión hidrostática. ^(Oliveres, 2001)

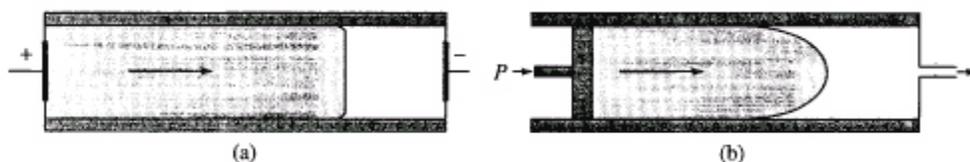


Figura 12. Diferencia entre la presión electroosmótica (a) y la presión hidrodinámica (b).
Fuente: http://mazingar.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-14/skoog/30b.html. Fecha de consulta: 22/10/2012.

Tiempo de migración y movilidad aparente

Tiempo de migración= t_m , es el tiempo que toma al soluto moverse desde el comienzo del capilar hasta la ventana del detector y está dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración.

En presencia del EOF la movilidad media es llamada movilidad aparente μ_a . La movilidad efectiva μ_e es la movilidad del analito independiente de las condiciones experimentales y puede ser calculada de la movilidad aparente midiendo independientemente el EOF, usando un marcador neutro que se mueve a una velocidad igual al EOF

La longitud efectiva es la distancia entre el punto de introducción de la muestra y el punto de detección. Para la detección espectrofotométrica sobre el capilar, esta longitud es típicamente de 5-10 cm más corta a la longitud total. ^(Ingelse, 1997)

El t_m y otros parámetros nos permiten calcular la movilidad aparente (μ_a).

$$\mu_a = \frac{1}{tE} = \frac{L}{tV}$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{eo} \text{ (cm}^2\text{seg}^{-1}\text{V}^{-1}\text{)}$$

V= voltaje aplicado

l= longitud total del capilar al detector (cm)

L=longitud total del capilar (cm)

t= tiempo de migración (seg)

E= campo eléctrico (V/cm)

Factores que pueden afectar la reproducibilidad en el tiempo de migración.

- *Cambios en la Temperatura- puede provocar cambios en la viscosidad del buffer por lo tanto alteran al EOF.*
- *Cambios en la composición del buffer, por evaporación o por cambios de pH debido a la electrolisis.*
- *Bajo nivel de buffer en el vial*
- *Variaciones de voltaje.*

Introducción de muestra

La introducción cuantitativa de las muestras se puede lograr por diversos métodos; los dos más utilizados son la introducción hidrodinámica y electrocinética.

Introducción hidrodinámica

Se lleva a cabo mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, este es un sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener resultados reproducibles.

Existen tres maneras de inyección hidrodinámica:

- ✓ Presión
- ✓ Vacío.
- ✓ Sifón (ya no se utiliza por su baja reproducibilidad)

Con la introducción hidrodinámica, la cantidad de muestra es independiente de la matriz de la muestra.

Introducción electrocinética.

Se realiza mediante electro migración de los iones presentes en la muestra al aplicarse el campo eléctrico, por lo que el Flujo electroosmotico es un factor que afecta esta modalidad de introducción.

La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje, lo que provoca que los iones de la muestra (cationes y aniones) migren selectivamente al interior del capilar.

Con este tipo de introducción se tiene la ventaja de ser selectivos, pero al introducir solo un tipo de ión, se modifica la composición de la muestra lo que impide volver a ser utilizada con fines de cuantificación. (Valverde, 2001).

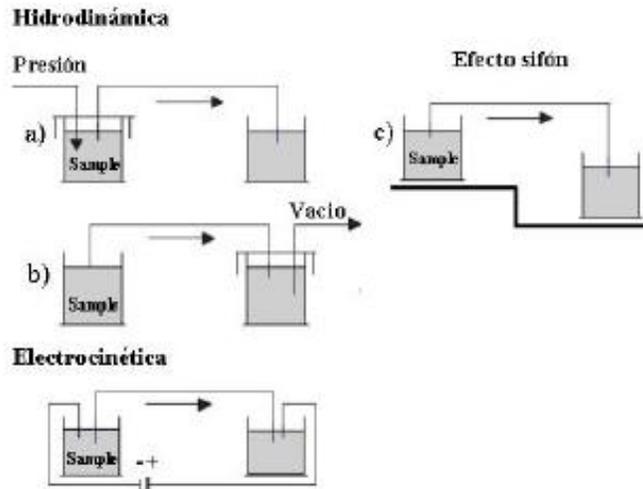


Figura 13. Esquema de los sistemas de inyección hidrodinámicos: a) presión, b) vacío, c) sifón. Esquema del sistema de inyección electrocinético. Fuente: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3141/ivm02de14.pdf?sequence=2>.

Fecha de consulta: 26/10/2012.

Buffers-Aditivos

La sensibilidad de EOF al pH requiere el uso de un buffer que pueda mantener un pH constante. Los sistemas efectivos de buffer tienen un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pK_a (RELAQ, 1996).

Un Buffer para uso de CZE debe poseer las siguientes características:

- Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección
- Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente

Tipos de Buffers:

- Químicos
 - Citrato, intervalo de pH (2,08 - 5,74)
 - Acetato, intervalo de pH (3,76 - 5,76)
 - Fosfato, intervalo de pH (1,14 - 3,14 / 6,20 - 8,20)
 - Borato, intervalo de pH (8,14 - 10,14)
- Biológicos
 - MES2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid.
 - ACESN-(2-Acetamido)-2-aminoethane sulfonic acid
 - PIPES piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
 - HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
 - Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Sistemas de detección.

La detección en EC es un reto ya que las dimensiones del capilar son pequeñas y el volumen de inyección es del orden de nano litros, por lo que se debe procurar que la muestra sea de concentración pequeña, para no producir cambios de gradiente o de potencial.

Algunos ejemplos de detectores son:

- Espectrofotométricos: UV/VIS (arreglo de diodos), Fluorescencia.
- Electroquímicos: conductimétricos, amperométricos, potenciométricos.
- Espectrométricos: Espectrómetro de Masas.
- Sistemas acoplados: Plasma-Masas, Electroaspersión-Espectrometría de Absorción Atómica (Castillo R. M., et al, 2005)

Detección por UV/VIS.

La absorción ultravioleta-visible (UV/VIS) es la más usada como medio de detección de EC; debido a su naturaleza casi universal, ya que los capilares de sílice permiten la detección por debajo de los 200 nm o por arriba del espectro visible (325-800nm). La alta eficiencia es debida en parte por la detección en línea que ofrece, pues la ventana óptica es *per se* una parte del capilar, evitándose así zonas de ensanchamiento debido al EOF.

Detección espectrofotométrica con arreglo de diodos. (DAD)

El DAD (en inglés, Diode Array Detection), es una alternativa a la detección individual o múltiple, consiste en un sistema con un lente acromático, un foco de luz en el capilar, donde el rayo de luz es dispersado por una reja de difracción. Un DAD tiene numerosos diodos, cada uno para medir los picos estrechos del espectro. (Castillo R. et al., 2005)

Modos de Electroforesis Capilar.

La separación en electroforesis capilar se llevan a cabo de distintas maneras o modalidades, originalmente estas variaciones fueron empleadas para la electroforesis convencional y posteriormente fueron adaptadas a la electroforesis capilar. (Skoog et al., 2001).

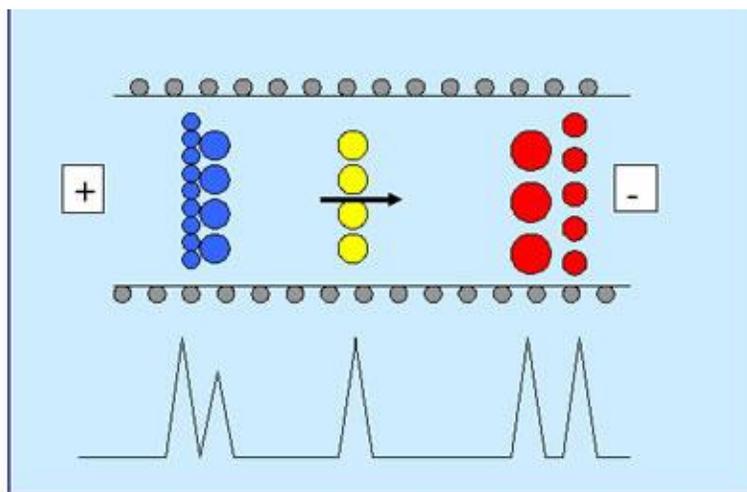
- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ)
- Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM)
- Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI)
- Isotacoforesis Capilar. (ITC)
- Electroforesis Capilar en Gel. (ECG)
- Electro cromatografía Capilar. (ECC)

En el la presente investigación, se trabajo con la modalidad de Electroforesis Capilar de Zona, a continuación se explican brevemente algunos aspectos importantes de éste modo de separación

Electroforesis Capilar de Zona

Este tipo de Electroforesis es por mucho la más utilizada como modo se separación, debido a la simplicidad de operación y versatilidad.

La ECZ se la forma más simple de Electroforesis Capilar, ya que le capilar solo es llenado con el electrolito soporte o buffer de corrida y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades, la separación de mezclas con analitos aniónico y catiónicos es posible debido a la Fuerza del EOF, en este tipo de electroforesis los analitos neutros no migran por sí solos pero se eluyen por la presencia del EOF.



Esquema de la migración diferencial de analitos en la CZE

- analito cargado positivamente
- analito neutro
- analito cargado negativamente

Figura 14. Migración de analitos en ECZ. Fuente: <http://www.santafe-conicet.gov.ar/servicios/comunica/electroforesis.htm>. Fecha de consulta: 24/10/2012.

Cuando se tiene Flujo Electroosmótico a un pH entre 4-12) y la polaridad positiva (de ánodo a cátodo), las especies cargada positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor a la del EOF.

Los analitos cargados negativamente se mueven en sentido contrario y en contra del EOF sin embargo son arrastrados por este último lo que resulta en un movimiento lento. La velocidad de los analitos puede modificarse al controlar el pH, la viscosidad o concentración del buffer o con cambios de voltaje como se mencionó anteriormente. (Rivera Vega, 1996)

A pH bajo se disminuye en EOF, es prácticamente nulo, por lo que la movilidad del analito se debe a la carga que posee al momento del análisis, esta puede variar dependiendo el medio en el que se encuentre inmerso. (Baker D. R., 1995)

Este es el caso, la melanina es una base débil, neutral en un rango de pH de 6 a 13, el catión $C_3N_3H^+(NH_2)_3$, se presenta en un rango de pH entre 1 y 4. (Meng et al., 2009)

3. Objetivos

Objetivo general.

- Desarrollar un método analítico alternativo, para la determinación y cuantificación de melamina, como contaminante en leche y fórmulas lácteas líquidas y en polvo, mediante la técnica de electroforesis capilar

Objetivos particulares

- Desarrollar un método analítico que permita demostrar la presencia de melamina como contaminante en leche y fórmulas lácteas líquidas y en polvo, sin la necesidad de realizar preconcentración en línea y sin la utilización de técnicas de extracción de fase sólida o líquida, obteniendo así un método económico, fácil y rápido.
- Identificar las variables críticas en el tratamiento de la muestra para eliminar las posibles interferencias en el análisis.
- Evaluar el desempeño del método analítico, mediante los parámetros de precisión (repetibilidad y reproducibilidad y linealidad del sistema, límite de cuantificación, límite de detección y especificidad, así como un estudio exploratorio del recobro.

4. Materiales y métodos

❖ Material

Curva de calibración:

- Matraz aforado de 250 ml
- 2 matraces aforados de 100 ml
- 6 matraces aforados de 10ml
- 3 vasos de precipitados de 100ml
- Agitador magnético
- Barras magnéticas
- Filtro en línea de 47mm de policarbonato

Preparación de muestra:

- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado de 50ml
- 1 Micro pipeta de volumen ajustable de 10 a 100µL (Science Med, Pipettor single channel)

- Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ Beckman Coulter.
- Ultrasonico LC30H Elma.
- Potenciometro Beckman Coulter φ310.
- Balanza analítica Mettler Toledo AT 200

❖ Reactivos

- Fosfato monobásico de sodio NaH_2PO_4 No. CAS.89140-32-9
- Ácido fosfórico H_3PO_4 No. CAS. 7664-38-2
- Hidróxido de sodio NaOH No. CAS 1310-73-2
- Ácido tricloroacético CCl_3COOH , No CAS76-03-9
- Estándar de melamina. 99% No CAS 108-78-1

- Membranas de Nylon de 0.45 µm, diámetro de 47mm.
- 1 Micro pipeta de volumen ajustable de 10 a 100µL
- 1 Micro pipeta de volumen ajustable de 100 a 1000µL.
- Viales para electroforesis capilar de 2 ml
- Viales de muestra para electroforesis capilar de 500µL.
- Pipetas Pasteur
- 1 Micro pipeta de volumen ajustable de 100 a 1000µL. (Science Med, Pipettor single channel)
- Tubos eppendorf.
- Vasos de precipitado de 50 ml.
- Acrodiscos Millipore Millex-HV de PVDF de 0.45 µm.

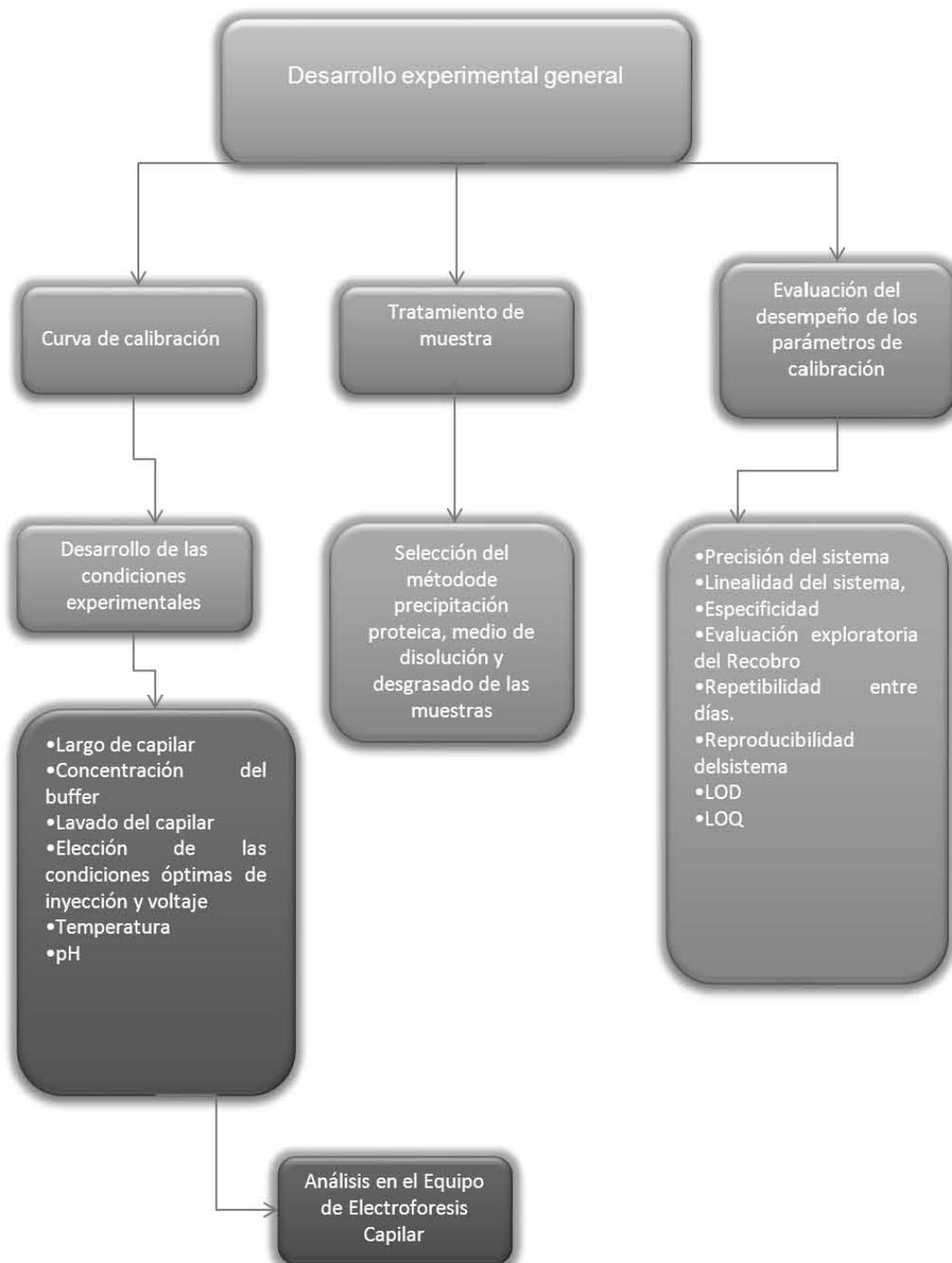
❖ Equipos

- Centrifuga de velocidad variable Eppendorf, refrigerada (hasta 14,000rpm).
- Baño María
- Vortex
- Cloroformo. CH_3Cl No CAS 67-66-3

❖ Muestras

- Fórmulas lácteas en polvo y líquida (Enfagrow, Enfamil, Hartz fórmula para cachorros)
- Leche en polvo (Nido, Nutrileche)
- Leche líquida (Nidal, Alpura, San Marcos, Santa Clara, Sello Rojo)

Diagrama general de actividades



Preparación de la curva de calibración

- Se preparó una solución stock de melamina a 250 ppm.
- Los sistemas de la curva de calibración se encuentran entre 0.5 ppm y 7.5 ppm.
- Cada sistema contiene, además del volumen necesario de melamina para cada concentración, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) y llevar a un aforo de 10 mL. con buffer de NaH_2PO_4 , 30mM., pH 3.2, por lo cual los sistemas quedan representados en la siguiente tabla:

Concentración (ppm)	$\mu\text{L.}$ de estándar de melamina 250 ppm	Volumen de TCA 1%	Volumen de aforo con buffer 30mM NaH_2PO_4 , (mL.)	Volumen de cloroformo (mL.)
0.5	20	1	10	1
0.75	30	1	10	1
1.0	40	1	10	1
2.5	100	1	10	1
5.0	200	1	10	1
7.5	300	1	10	1

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración de melamina

- Se tomó 1.5 mL. de cada sistema y se vierte en los viales para electroforesis capilar y se procede con la corrida para cada concentración por triplicado o sextuplicado según se requiera

Nota: el buffer de fosfatos 100m.M (corrida), se debe cambiar de los viales cada tres corridas, para evitar cambios en la fuerza iónica de este, debidos al tiempo o bien por migración de iones, lo que cambiaría su composición y concentración.

Preparación de las muestra

Muestras de leche o fórmulas lácteas en polvo

- En un vaso de precipitados de 50mL., se pesó un gramo de la muestra, al cual se le añadieron 9 ml de buffer de NaH_2PO_4 , 30mM, pH 3.2, hasta su disolución.
- Posteriormente agregó 1mL. de TCA al 1%, y se mezcló con ayuda de un agitador magnético, para ayudar a la precipitación proteica se recurrió a la desnaturalización térmica a 82°C por 2 minutos en baño maría, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Finalmente añadir 1mL.de cloroformo y agitar por 1 minuto en vortex, con el fin de eliminar la grasa presente en el producto.
- Este preparado se dejó reposar de 10 a 15 minutos y la fase acuosa fue llevada a centrifugación, a 12,000 rpm por 5 minutos y temperatura de 25°C
- Para las muestras líquidas el procedimiento es similar, cambian los volúmenes de muestra y de buffer, los cuales son 2ml. y 7ml. respectivamente, se respetan las mismas cantidades de TCA y de cloroformo, así como los procesos de agitación y centrifugación.

Muestra	Peso o volumen de muestra	ml. de TCA 1%	Volumen de buffer 30mMNaH ₂ PO ₄ (ml.)
Polvo	1gr.	1	9
Líquida	2 mL.	1	7

Tabla 3. Preparación de muestras de leche o fórmulas lácteas líquidas o en polvo.

- El sobrenadante fue filtrado en acrodiscos de 0.45µm. Recolectado en los viales de muestra del equipo de electroforesis e inyectados directamente en el equipo.

Análisis de muestras y acondicionamiento del equipo de EC

Para el análisis tanto de las muestras así como de la curva de calibración se utilizó un equipo de Electroforesis Capilar (EC) con arreglo de Diodos, en su modalidad de Electroforesis Capilar de Zona (CZE). El equipo fue controlado mediante el software32 KaratVersión 5.0.

- Se realizó el barrido espectrofotométrico en un intervalo de 190 a 600nm, fijando dos longitudes de onda (λ) a 208 y 234nm., siendo la λ optima en 208nm.
- El capilar que se utilizó fue de sílice fundida, con un diámetro interior de 75µm. y un diámetro exterior de 362µm. y una longitud total de 56 cm. y teniendo una longitud al detector (efectiva) de 46 cm.(Polymicro Technologies)
- El capilar nuevo se acondicionó introduciendo NaOH por 30 minutos, agua desionizada por 30 minutos y buffer de NaH₂PO₄100 mM. por 30 minutos, mediante un flujo de presión de 20psi.
- Para asegurar la reproducibilidad, el capilar es lavado con buffer 100 mM. por 3 minutos y 2 minutos con agua desionizada antes de cada corrida.
- Al finalizar el análisis, el capilar debe lavarse con NaOH por 5 min y 15 minutos con agua desionizada, para eliminar cualquier residuo.

5. Resultados y Análisis.

❖ Selección de Buffer

Se probaron tres tipos de buffers en diferentes valores de pH, para analizar el comportamiento electroforético y selectividad de la molécula dependiendo del pH, ya que se trata de una molécula de naturaleza básica, con un valor de pKa de 5, que a pH ácido se encuentra cargada positivamente. El equipo en el que se trabajó posee una fuente de poder de polaridad positiva, donde la migración de las partículas se da de ánodo a cátodo, por lo que al trabajar a pH 4 o menor la movilidad de la partícula incrementa, viajando a través del capilar con mayor rapidez.

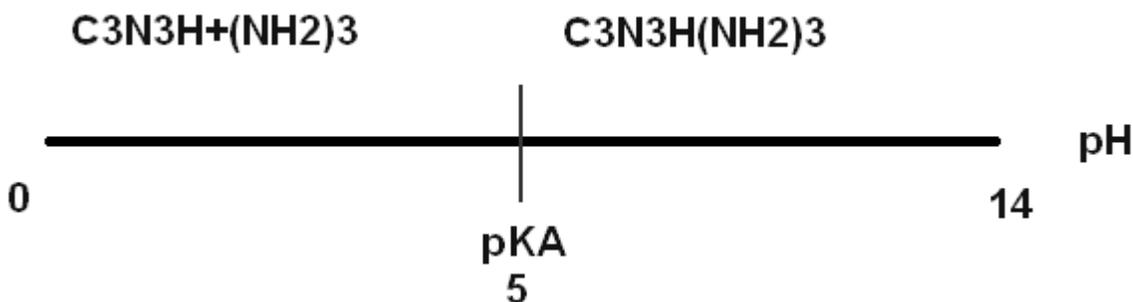


Figura 15. Escala de predominio de melamina en función del pH.

Se utilizó un capilar de 30 cm. para la realización de los análisis de buffer.

Los buffer utilizados fueron:

Acetatos-pH: 4, 30mM.

Boratos-pH: 8.2, 30mM.

Fosfatos-pH: 3.2, 30mM. 50mM. y 100mM.

Se realizó un análisis exploratorio donde la concentración del buffer fue de 30mM., primero se realizó en análisis con estándar de melamina y cada uno de los buffers para averiguar su comportamiento electroforético.

Posteriormente se realizó el mismo ensayo con muestras de leche.

En las siguientes figuras se muestran los electroferogramas pertenecientes al análisis realizado para el buffer de acetatos 30 mM., donde se puede apreciar una señal correspondiente a la melamina en el minuto 1.163 para el estándar ^(Figura No.16) y 1.208 para las muestras de leche con y sin adición del estándar de melamina ^(Figura No. 17.)

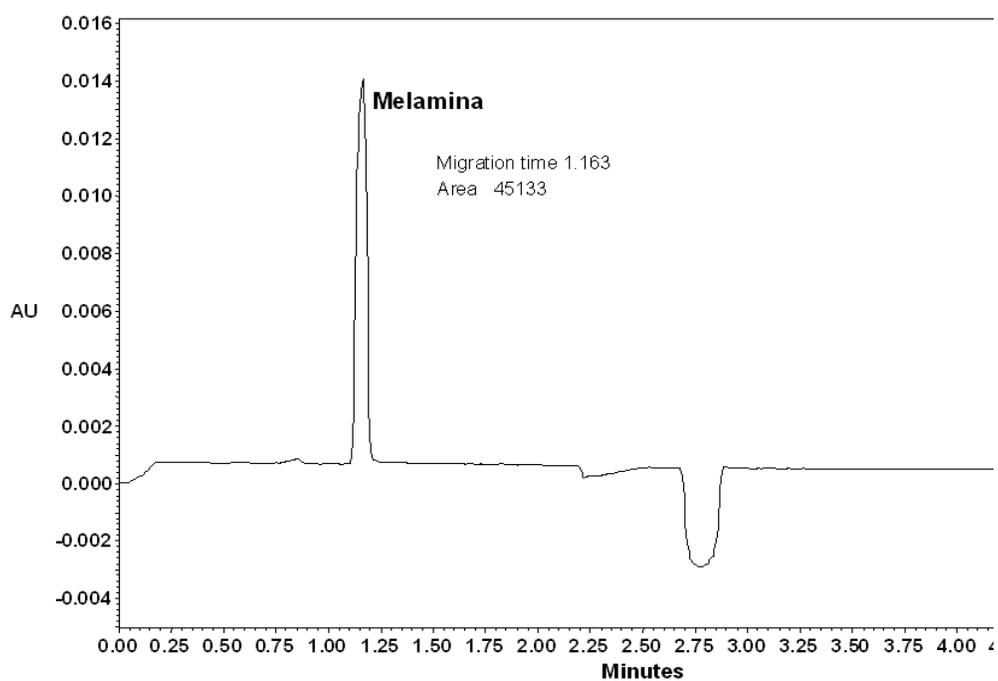


Figura 16..Electroferograma de estándar de melamina., en buffer de acetatos 30mM, pH 4

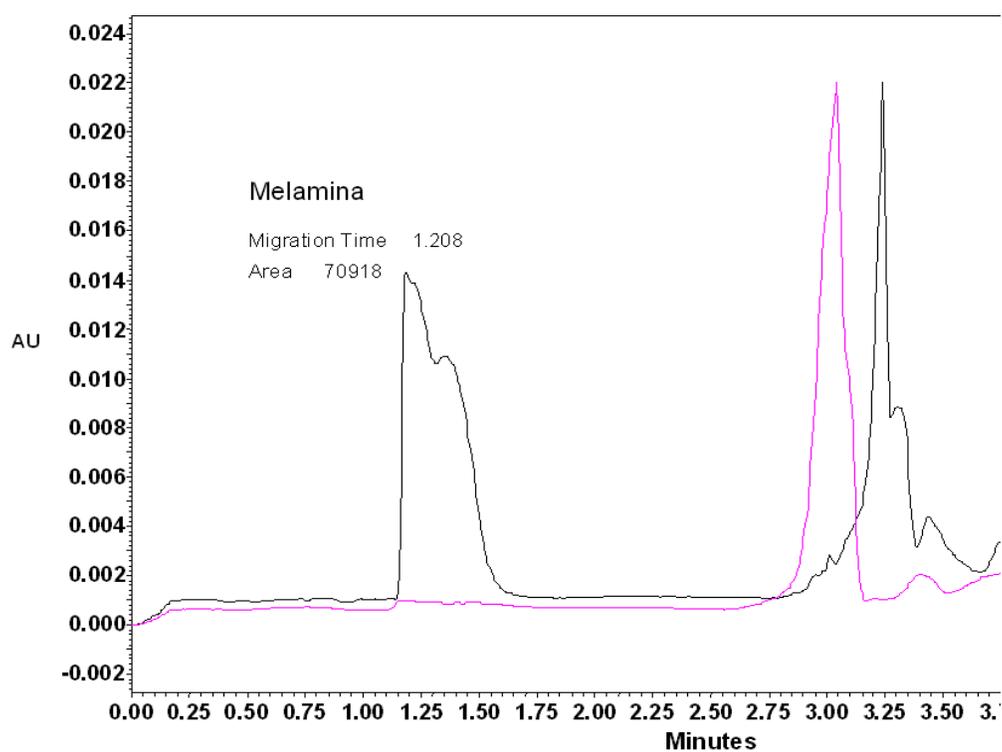


Figura 17.Electroferograma de muestras de leche Nido en polvo con y sin melamina en buffer de acetatos 30mM, pH 4, en color negro se muestra el trazo de la muestra de leche añadida con estándar de melamina y en color rosa se muestra el trazo para la muestra de leche sin adición de estándar de melamina

Se decidió trabajar a pH básico con buffer de boratos para observar el comportamiento electroforético de esta molécula de naturaleza básica en un medio alcalino ya que en el artículo reportado por **Meng, Shen, Hou, & Wang, en 2009** se trabajó a pH de 8.2, en el análisis realizado para este trabajo se observó la señal del estándar de melamina alrededor del minuto 3.0, (Figura No. 18), presentando una gran anchura de pico, así mismo el área es numéricamente alta por lo que se pudieran estar ocultando otros componentes, siendo la separación no selectiva ni eficaz, descartándose el análisis con este buffer, aun así se realizó el análisis para las muestra de leche como se muestra en la Figura No. 19, donde se aprecian otras señales, se presumen sean proteínas del suero lácteo, ya que estas son de naturaleza básica por lo que se pudieron apreciar en el electroferograma.

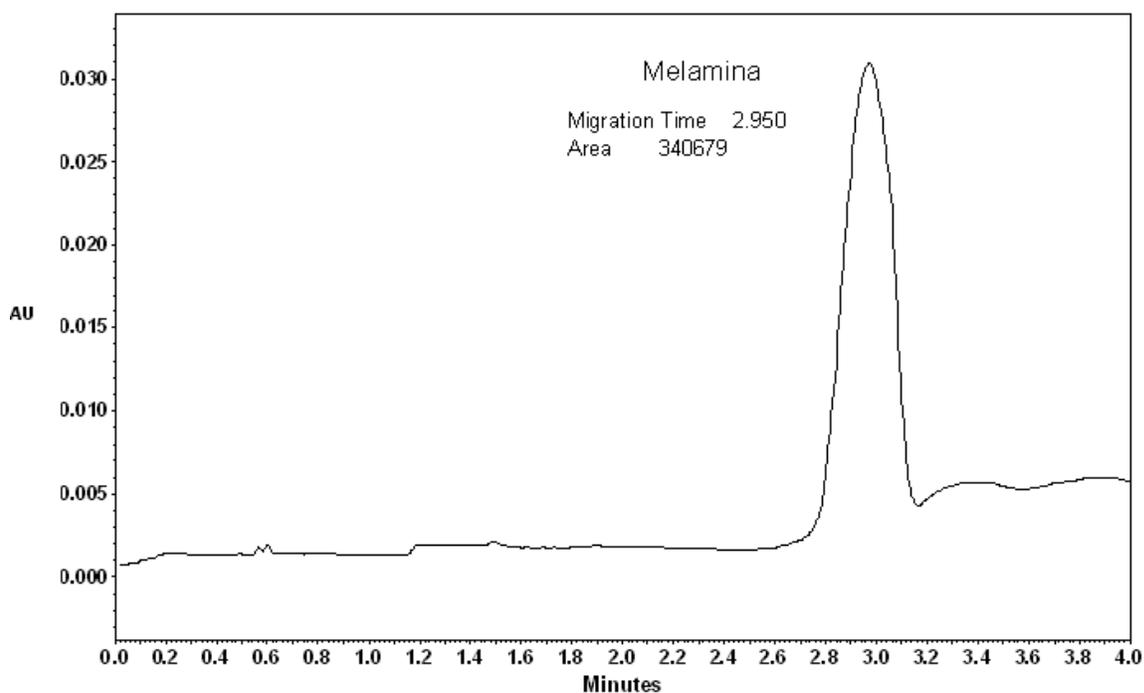


Figura 18. Electroferograma de estándar de melamina, en buffer de boratos 30mM, pH 8.2

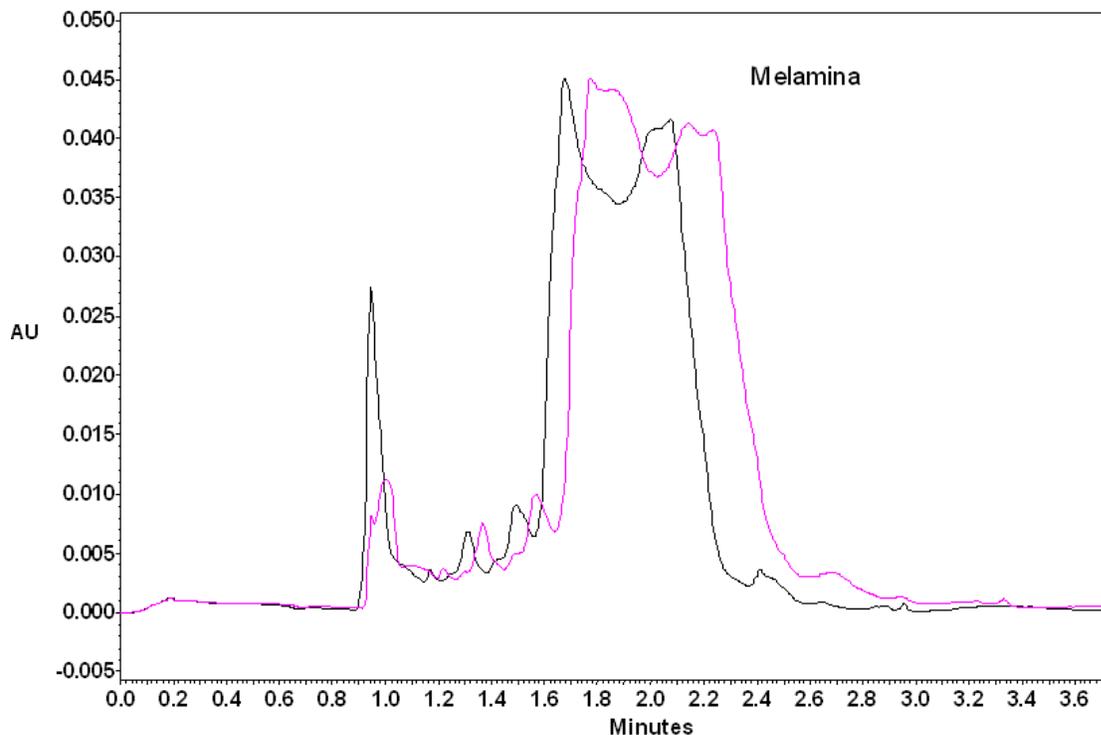


Figura 19. Electroferograma de muestras de leche NIDO en polvo adicionada con estándar de melamina en color negro y sinadición estándar de melamina en color rosa, en buffer de boratos 30mM, pH 8.2.

En los artículos publicados por **Chen et al., 2009** y **Yan et al., 2009**, se describe una metodología en la cual se trabaja a un pH ácido de 3.2 por debajo del pH de 4.0 del buffer de acetatos^(Figura No .16) en el cual no se observó una buena separación de la melamina en las muestras de leche, en la Figura No. 20 se aprecia el electroferograma correspondiente al estándar de melamina en buffer de fosfatos 30mM a pH 3.2, mostrando señal en el minuto 1.975.

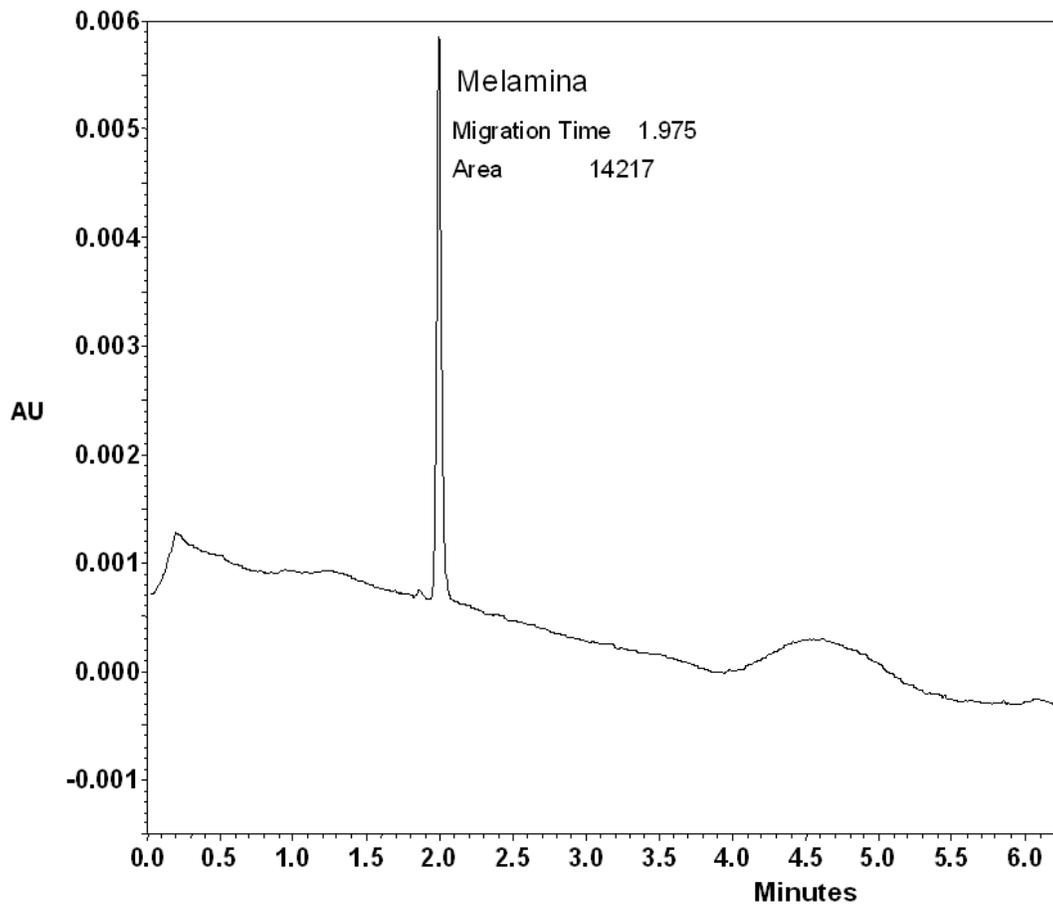


Figura 20. Electroferograma de estándar de melamina., en buffer de fosfatos 30mM, pH 3., donde se muestra un pico definido.

Se decidió aumentar el largo del capilar de 30cm a 50cm ya que cabría la posibilidad de no estar separando de manera eficiente todos los componentes de la muestra, en el supuesto que para el estándar no representaba mayor problema ya que solo era la molécula disuelta en buffer, pero la muestra al poseer una matriz tan compleja esto podría representar un problema analítico, por lo anterior se optó por aumentar el largo del capilar aunque esto significara que los tiempos de migración se recorrieran a casi 6 min. Pero se aseguró la total separación de los analitos de la muestra Figura No. 21.

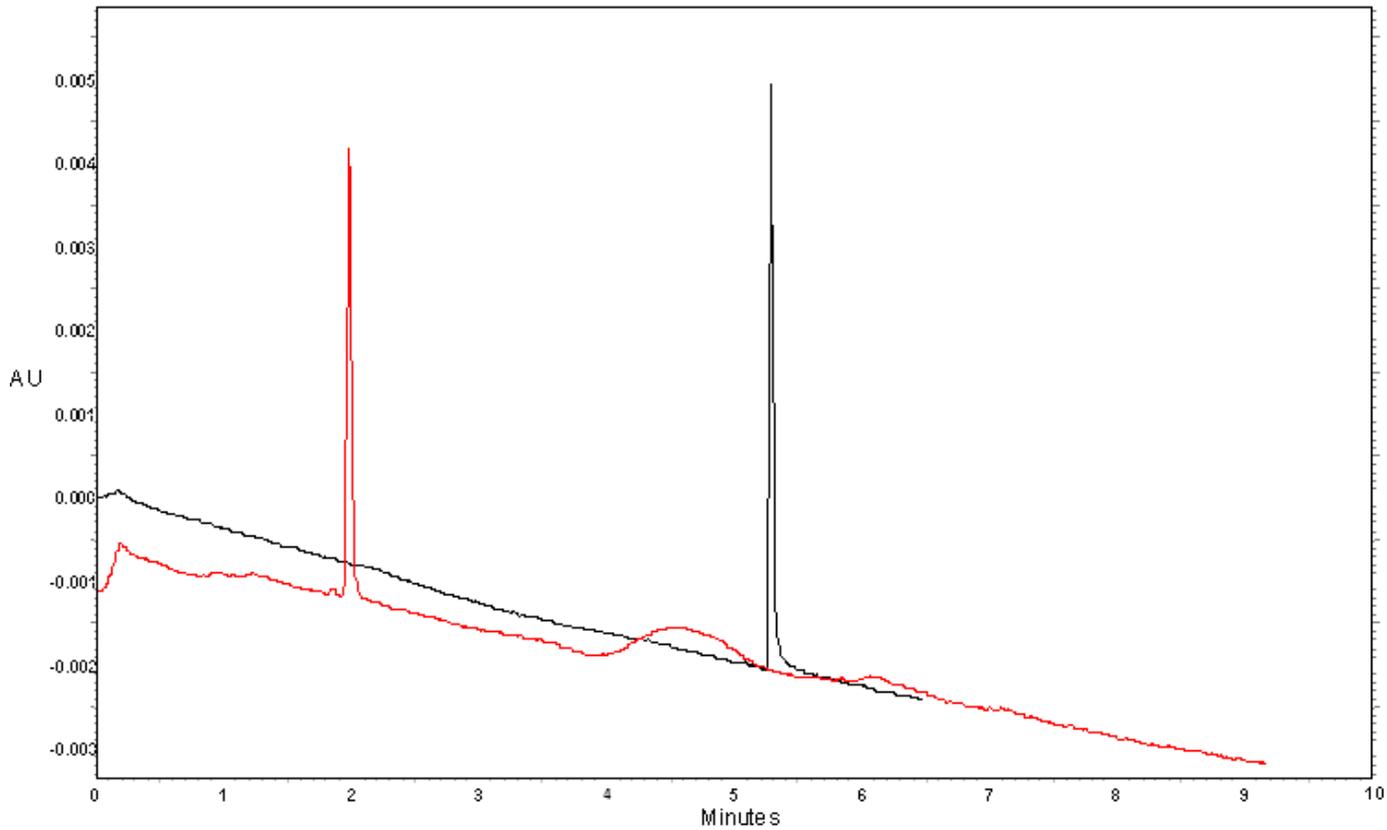


Figura 21. Comparación de electroferograma de muestra de leche NIDO con adición de melamina, en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, tratados con TCA al 1% pero longitudes de capilares diferentes 30 cm (rojo) y 50 (negro) cm. Donde en el trazo de color negro se observa una mejor línea base.

❖ Acondicionamiento de muestra.

Como se mencionó anteriormente la leche es una matriz muy compleja, ya que posee varios tipos de proteínas, así como vitaminas y minerales, la precipitación de la caseína que representa aproximadamente el 85 % de las proteínas totales de la leche no representa mayor dificultad ya que al bajar el pH se llega al punto isoeléctrico para la precipitación de esta proteína (pH de 4.6), produciéndose así la desnaturalización de la mayoría de la proteínas, pero no para las proteínas del lacto suero conformadas por las lacto globulinas y las lacto albúminas, que son proteínas solubles, por lo que se recurren a otros métodos de desnaturalización como lo es la desnaturalización térmica o por concentración de sales o con solventes orgánicos.^(Vázquez, 2007)

Se realizaron diferentes pruebas para determinar el mejor método para la desnaturalización de proteínas y también para observar si los métodos de precipitación no interferían en la señal producida por el estándar de melamina. Se decidió realizar ensayos en muestras de leche líquida sin adición de melamina y leche líquida con la adición de melamina; cabe mencionar que para este ensayo la leche utilizada es la misma para todos los casos y el experimento se realizó el mismo día. Se probaron cuatro tipos de desnaturalización:

- 1) Por concentración de sales, en este caso, sulfato de amonio al 7%
- 2) Con solventes orgánicos, mezcla de acetona y etanol 50-50
- 3) Hidrólisis proteica con ácidos: HCl concentrado, H_3PO_4 5 M. y ácido tricloroacético (TCA).
- 4) Hidrólisis térmica: 82°C por 2 minutos, en baño maría.

Para el sulfato de amonio se observó precipitación de proteínas, por lo la fase acuosa que se llevó a centrifugación era de un color amarillo traslucido, que al terminó de este se tornó amarillo transparente. También se observó una variación en la corriente de 90 μA . a 50 μA . al ser analizado el sobrenadante por CE, y como se puede apreciar en el electroferograma de la Figura No. 22 realmente no hay una diferencia entre las señales mostradas, lo que nos lleva a pensar que debido a la alta concentración de sales y participación de iones sulfato y amonio, posiblemente se haya llevado a cabo una precipitación ya que no se observa en ningún momento de la corrida alguna diferencia en los electroferogramas.

Cambios bruscos de corriente hablan de inestabilidad en la muestra o modificaciones en la fuerza iónica del medio, esta última debe ser contante durante todo el análisis para obtener tiempos de migración reproducibles.^(Rivera Vega, 1996)

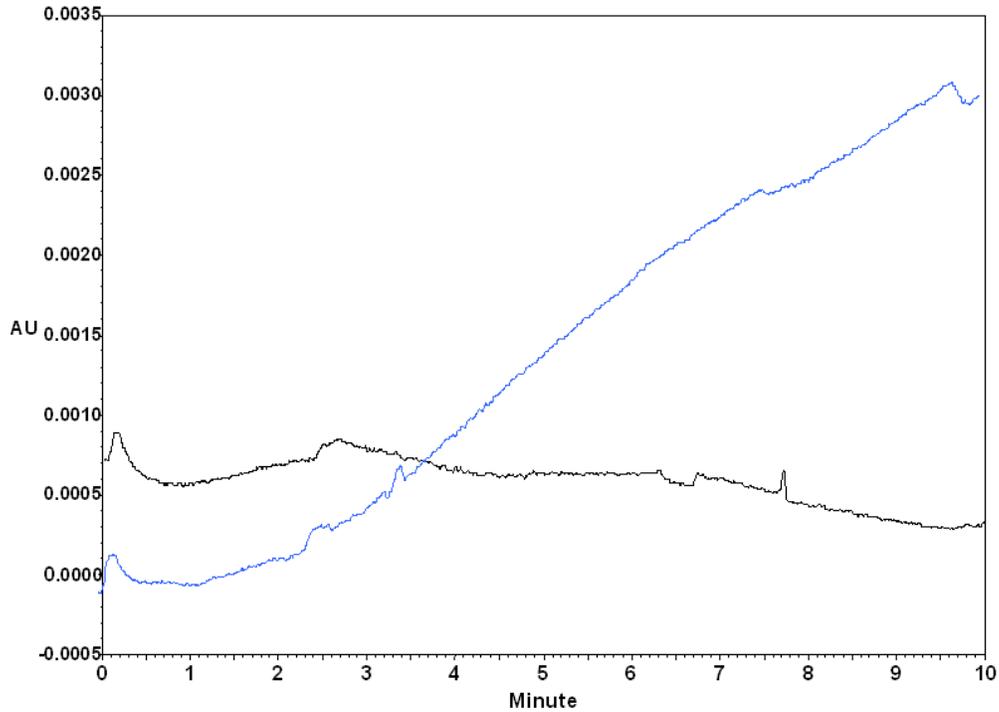


Figura 22. Electroferograma de muestras de leche NIDO en polvo adicionada con melamina (negro) y sin adición de melamina (azul), en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, tratadas con sulfato de amonio 7%

Para la mezcla de solventes orgánico, no se observó precipitación alguna, aun así se llevó a centrifugación, solo una parte de la muestra se precipito, el sobrenadante se filtró e inyectó directamente en el equipo, pero el electroferograma al igual que los mostrados anteriormente no muestran señales significativas .La acetona y el etanol son solventes orgánicos que no le confieren ninguna acidez, al medio, por lo que la molécula de melamina se encuentra neutra, y al pH de 3.2 de trabajo el EOF se encuentra disminuido como lo menciona Baker D. R., 1995, pp. 365., por lo que la molecula necesitaria mayor tiempo de analisis, lo que corresponde con lo visto en la figura No. 23, tambien se observaron, cambios en la corriente entre 90 y 40 μ A., haciendo inestable y poco confiable el análisis.

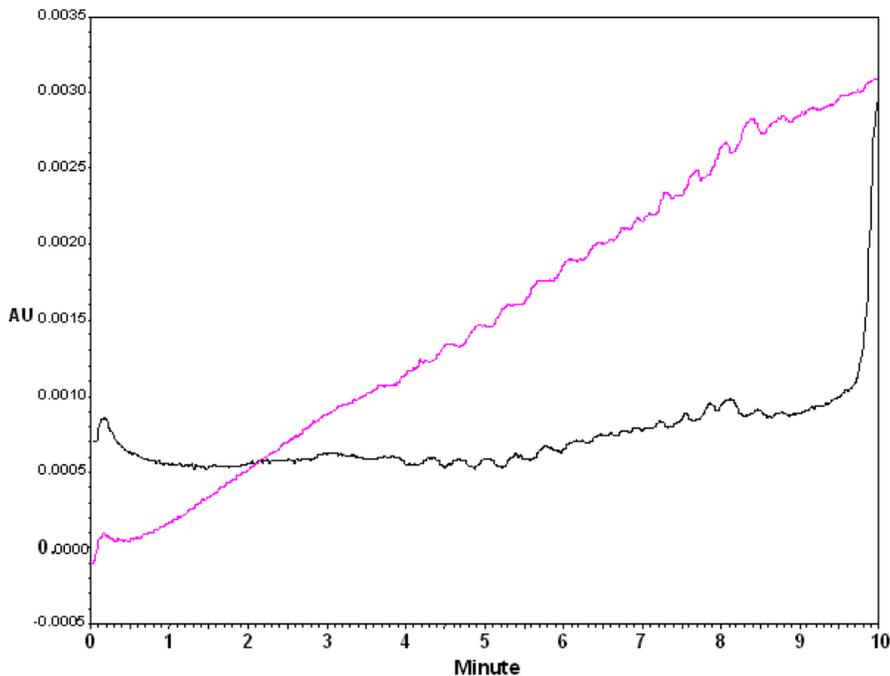


Figura 23. Electroferograma de muestra de leche NIDO en polvo adicionada con melamina (negro) y sin adición de melamina (rosa), en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, tratadas con mezcla de solventes orgánicos (Acetona-Etanol, 50-50)

Con los ácidos se observó una precipitación de proteínas casi inmediata, más aún para el HCl, en el electroferograma de la Figura No. 24 se observa que la muestra sin adición de melamina existe una señal en el minuto 1.6 que pudiera tratarse de alguna proteína soluble y que la cantidad de ácido añadida no fuera lo suficiente para provocar su desnaturalización, ya que algunas proteínas sobretodo del lacto suero necesitan de temperatura para poder ser precipitadas. (Martínez V. & Palacios. F., 2010)

En esta misma, (Figura No. 24) con adición de melamina donde podemos apreciar que no se distingue señal alguna, lo que nos llevó a pensar en la presencia de la melamina. En la figura solo se observó una señal en el minuto 1.4, pero igualmente pudiera tratarse de la misma proteína. El HCl es un ácido fuerte puede modificar las propiedades electrónicas de la molécula, protonando el grupo amino, formando una amida, que al estar protonada, no tiene estabilidad de resonancia, produciendo una inestabilidad inductiva de la carga positiva (Mc Murry, 1995), modificando completamente la estructura de la molécula por lo cual a las condiciones establecidas, el detector no recibió señal alguna de esta molécula. La estabilidad de la corriente empezó en 30 μ A y decayó a 15 μ A, es importante mencionar que la corriente generada es un parámetro que nos indica indirectamente la reproducibilidad de un sistema electroforético. (Castillo et al., 2005)

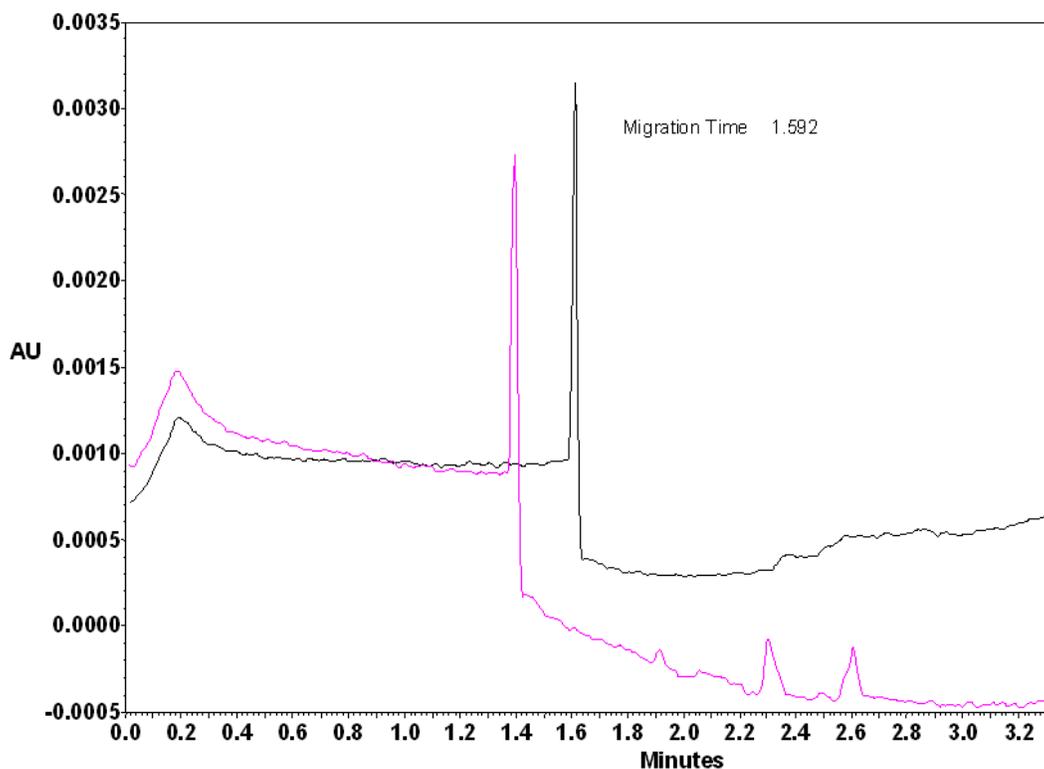


Figura 24. Electroferograma de muestra de leche NIDO en polvo con adición de melamina (negro) y sin adición melamina (rosa), en buffer de Fosfatos 30mM. pH 3.2, tratadas con ácido clorhídrico concentrado.

El ácido fosfórico es un ácido débil pKa 2.12, mientras que el TCA es un ácido carboxílico con fuerza equiparable al de algunos ácidos minerales, los ácidos tenían una concentración de 1 M. y 0.6 M., respectivamente. Siendo el ácido fosfórico un ácido triprótico, ^(Christen, 1997) tendría la capacidad de donar sus tres protones al medio, protonando las tres aminas de la estructura, provocando el un fenómeno similar al que se presentó con el ácido clorhídrico pero al tener una menor concentración este fenómeno se vio disminuido por lo que se observó una señal electroforética entre los minutos 6 y 7 ^{(Figura No. 25).}

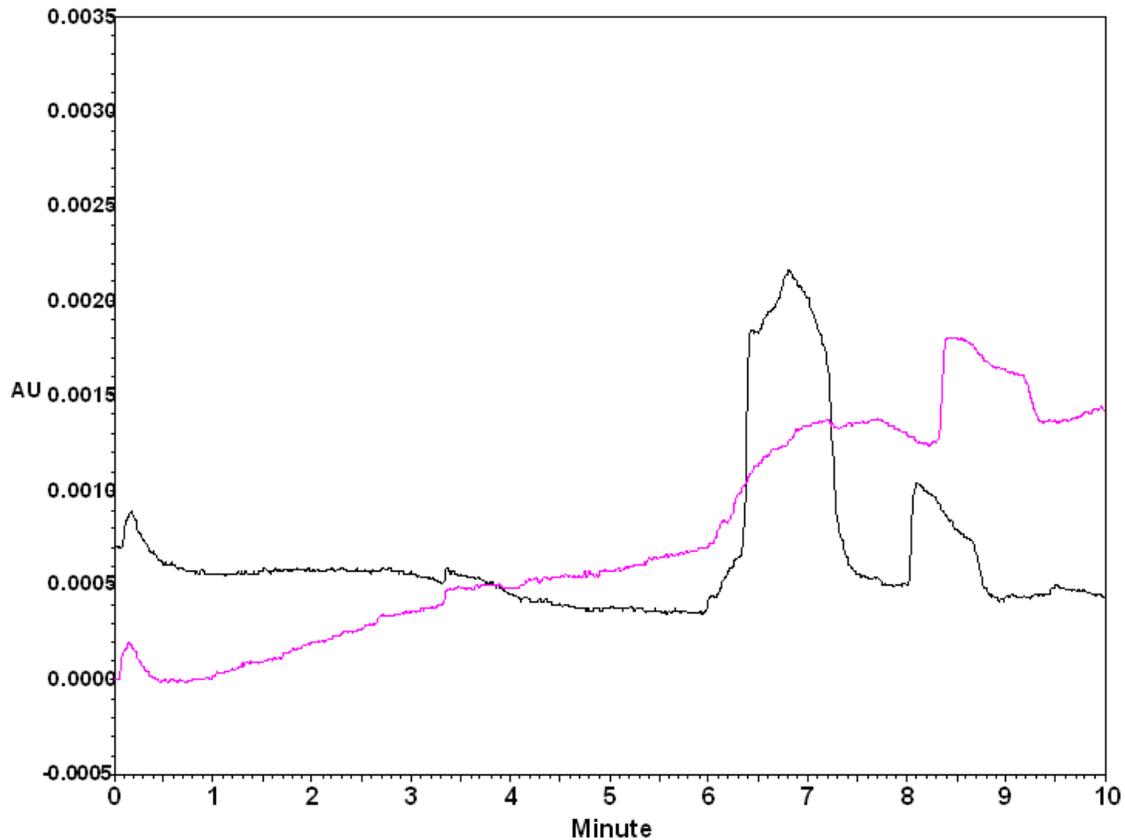


Figura 25. Electroferograma de muestra de leche NIDO en polvo, adicionada con melamina (negro) y sin adición de melamina (rosa), en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, Tratado con una mezcla de ácido fosfórico 1M y TCA 10%

Teniendo en cuenta lo reportado por **Meng, et al., en 2009; Yan et al., en 2009 y Yun et al., en 2011**, se trabajó únicamente con TCA, para la desnaturalización de proteínas. Se realizó un experimento trabajando a una concentración del 10% de TCA, el cual mostró una mejor respuesta analítica, tanto para muestra con adición de melamina, trazo en color negro, como para la muestra sin adición de melamina, trazo en color rosa, donde no hubo un cambio en los tiempos de migración y la corriente se mantuvo estable sin cambios de voltaje. Incluso en la Figura No. 26, se observó una señal para la muestra de leche sin adición de melamina (rosa) en el tiempo que aparece la melamina (negro) en la muestra con adición.

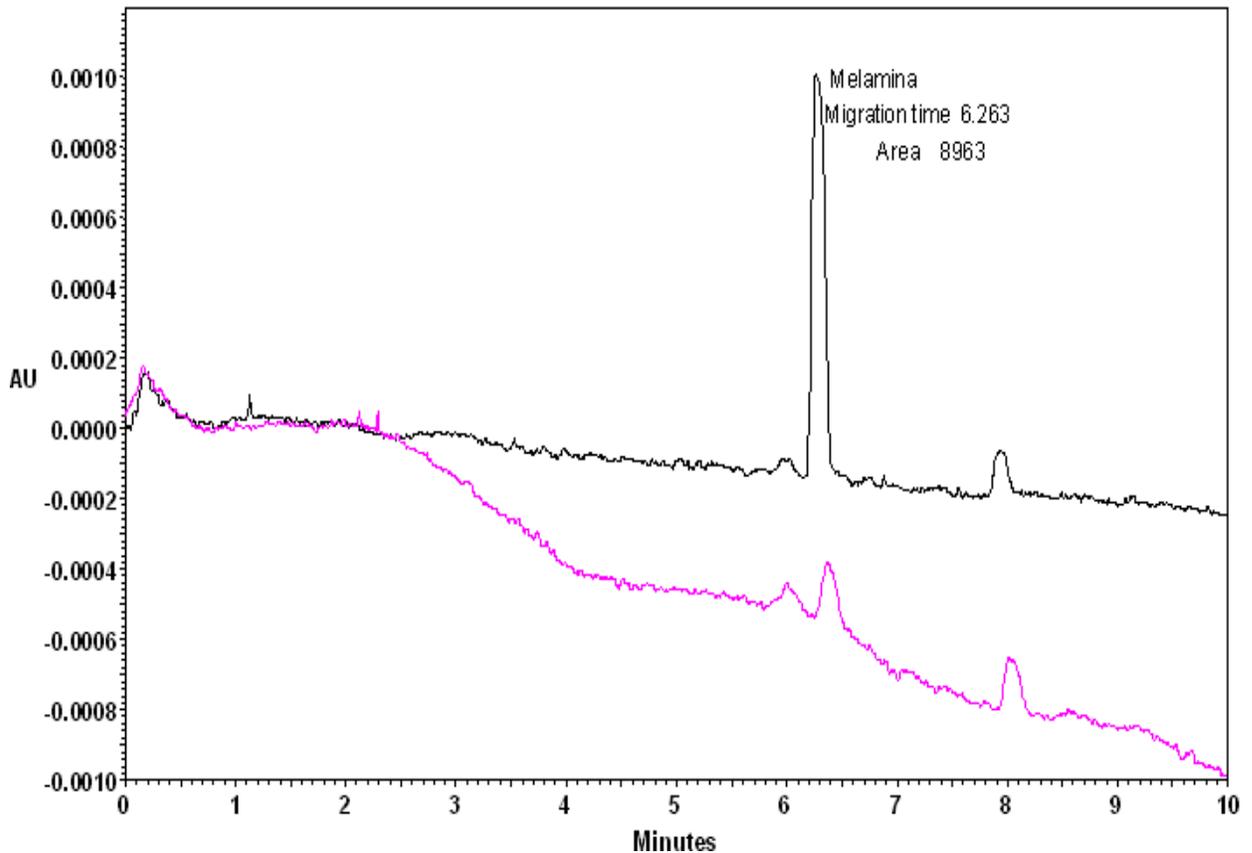


Figura 26. Electroferograma de muestra de leche (NIDO) con adición de melamina (negro) y sin adición de melamina (rosa), en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, Tratado con TCA al 10%. se observa que la respuesta se debe única y exclusivamente a la adición de melamina.

Es preciso mencionar que a todas la muestras se les sometió a tratamiento térmico con baño maría para favorecer la precipitación de las proteínas del lacto suero, las cuales precipitan con tratamiento térmico.

Al termino del procesamiento de las muestras, se centrifugaron como se mencionó en el procesamiento de muestra y al obtener los sobrenadantes se inyectaron directamente en el equipo para su análisis, siendo el TCA e hidrólisis térmica los que produjeron una mayor precipitación y sin alteración de la corriente eléctrica durante el análisis, por lo que se creyó conveniente combinarlas, obteniéndose así la preparación de muestra ya mencionada.

❖ Selección de la Concentración de TCA

Una vez elegido el buffer adecuado y el método de desnaturalización de proteínas apropiado para este experimento, se realizaron los análisis de muestras de leche tanto líquidas como en polvo para observar su respuesta y se utilizó una concentración de TCA de 10% como lo indica. (Yan et al., 2009). Pero se observó que los picos electroforéticos eran muy anchos, por lo que se decidió experimentar con diferentes concentraciones de TCA, corriendo muestras de leche adicionadas con melamina a diferentes concentraciones de TCA (1%, 5% y 10%) con el fin de conocer la variación en la respuesta analítica, si bien se observó una mayor velocidad de precipitación con TCA al 10% y al 5%, el TCA 1% ofrecía también precipitación, que se hacía más evidente con el paso del tiempo, alrededor de 15 minutos. En la figura No. 27 se aprecia un ensanchamiento del pico y una pérdida de la altura del mismo para la concentración de TCA al 10%, trazo azul, mientras que para las concentraciones de 5%, trazo rojo y 1%, trazo negro, iban incrementando la altura y reduciendo el ancho de pico, siendo el electroferograma de TCA al 1% donde obtuvo un pico con mejores propiedades electroforéticas (forma y tamaño). Se sabe el área se relaciona directamente con la concentración del analito, (Heiger N., 1997) por lo que se decidió trabajar a esta concentración de TCA, ya que se obtendrían mejores resultados para la cuantificación y recobro del analito en las curvas de calibración.

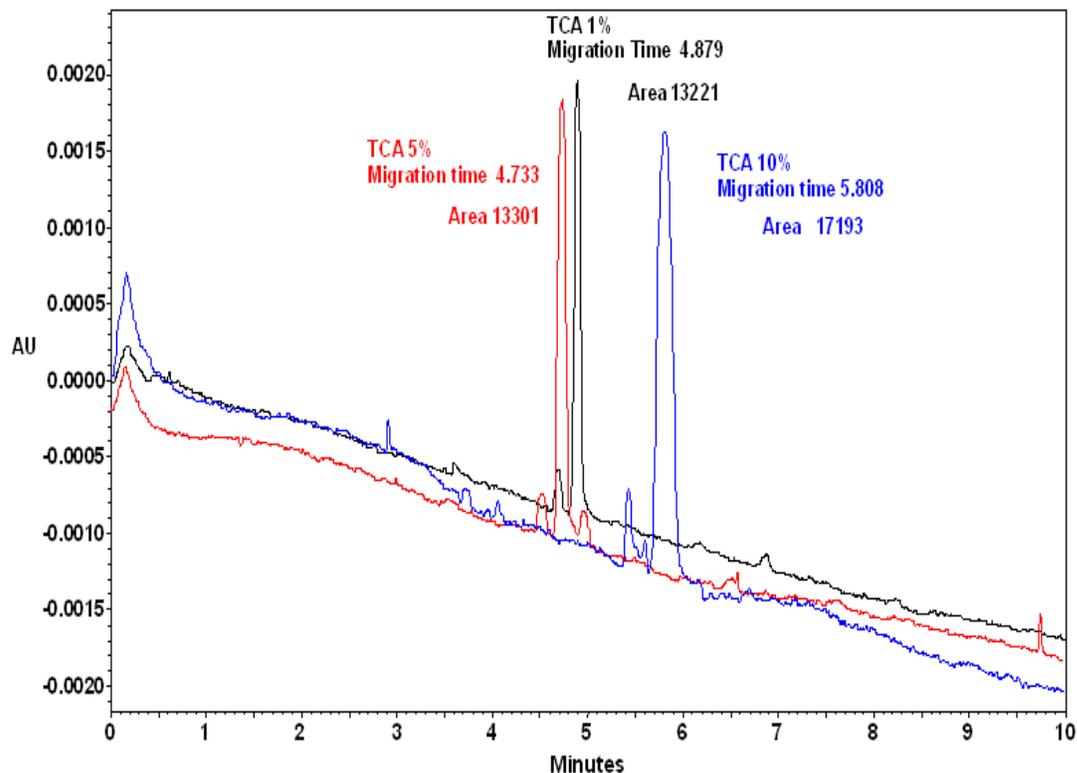


Figura27. Comparación de electroferograma de muestra de leche NIDO adicionada con melamina, en buffer de Fosfatos 30mM pH 3.2, tratada con TCA a diferentes concentraciones 10 % (azul), 5 % (rojo) y 1 % (negro), es aquí donde se escoge la concentración del buffer a 100mM por aumentar el área de pico y el porcentaje de área, además de mostrar un mejor pico electroforético.

Al realizar los experimentos con muestras de leche adicionadas con melamina se decidió realizar corridas a diferentes concentraciones de buffer, 30mM, 50 mM y 100 mM, si bien una elevada fuerza iónica incrementa la intensidad de la corriente y por ende la producción de calor, una fuerza iónica baja produce difusión de los picos y pérdida de resolución en los mismos. (Castillo et al., pp 28-29, 2005).

En el siguiente electroferograma (Figura No. 28.) se muestra este fenómeno.

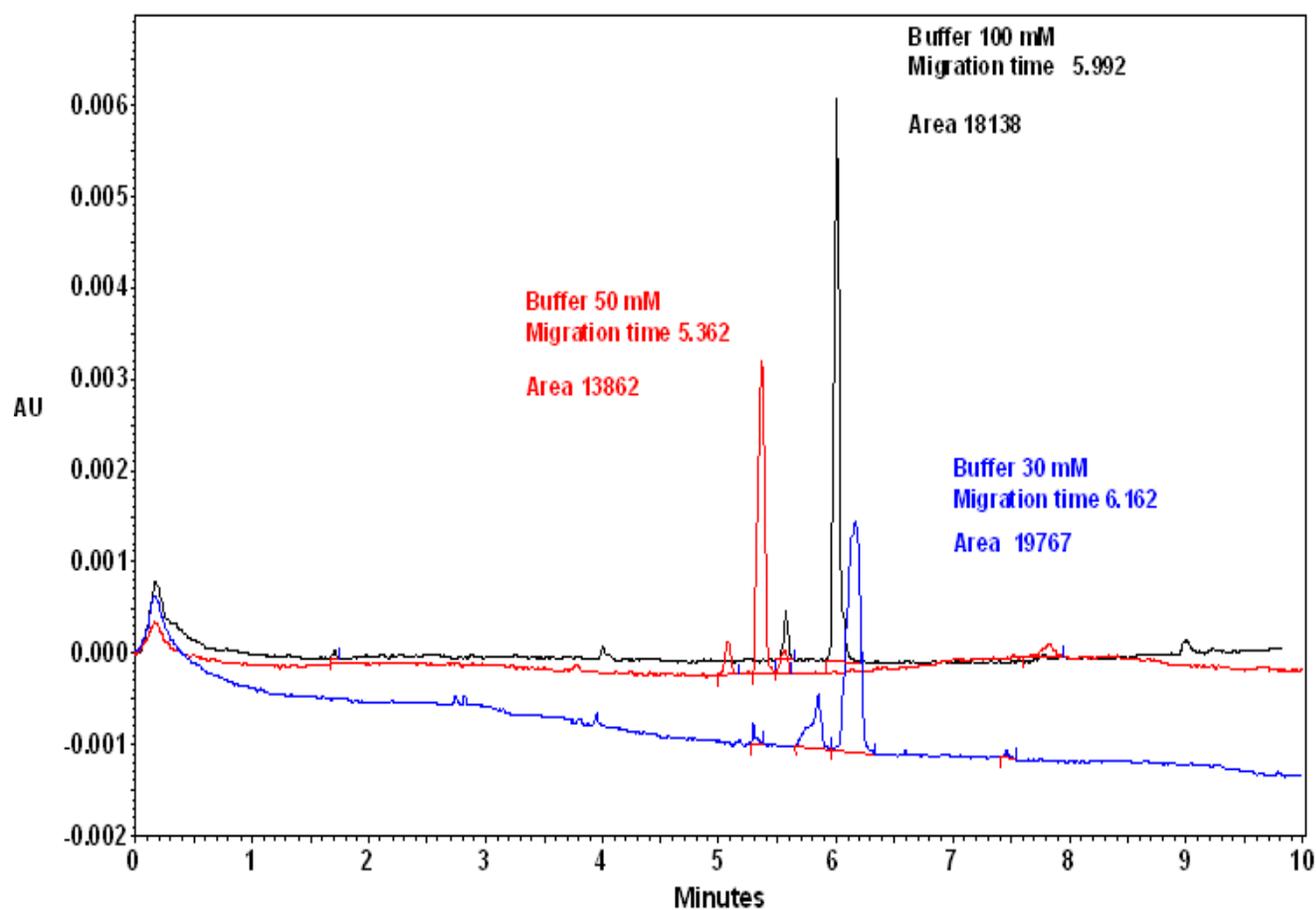


Figura 28..Comparación de electroferograma de muestra de leche con melamina, en buffer de Fosfatos a diferentes concentraciones, 30mM (azul), 50mM (rojo) y 100mM (negro), a pH 3.2, tratados con TCA al 1%.

Estos experimentos nos dieron como resultado las condiciones finales de experimentación las cuales fueron:

Buffer de Fosfatos 100mM (corrida)pH	3.2
Buffer de Fosfatos 30mM (muestra)pH	3.2
Polaridad	Normal
Voltaje	25 Kv
Inyección	Hidrodinámica 0.5 psi, 5seg.
Tiempo de separación	10 min
Capilar	Sílice

Tabla 4. Condiciones finales para la determinación de melamina por EC.

Las condiciones para el tratamiento de muestra y de estándar están reportadas en el apartado “**Materiales y Métodos**” del presente trabajo.

Estas condiciones de trabajo nos llevaron al resultado mostrado en la Figura No. 29.

Esta figura también nos sirve para demostrar **la especificidad del método**, ya que la respuesta se debe únicamente al analito, en esta figura se observan tres electroferogramas, en negro el estándar de melamina, en color rosa la muestra sin adición de melamina y en azul la muestra de leche adicionada con melamina, lo cual confirma que la respuesta analítica de interés es únicamente debida a la melamina.

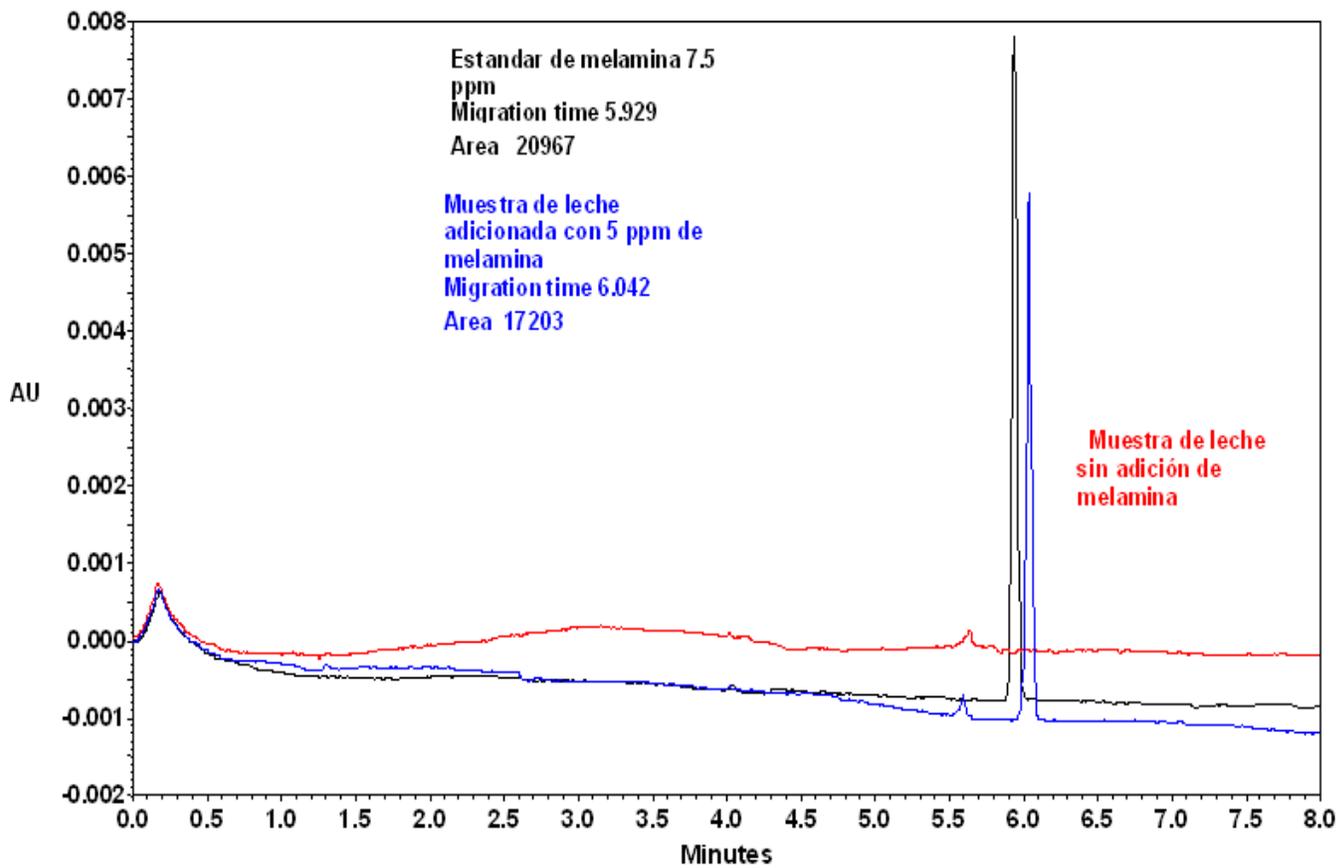


Figura 29. Electroferogramas de a) estándar de melamina, b) muestra de leche adicionada con melamina y c) muestra de leche sin adición de melamina, en buffer de fosfatos 100mM pH 3.2 (corrida), capilar de 56cm, tratado con TCA 1% y buffer de fosfatos 30mM pH 3.2 (muestra). Se muestran las condiciones finales del tratamiento de muestra, que resultaron en un electroferograma con buenas propiedades electroforéticas (tamaño y forma)

❖ **Evaluación de algunos parámetros de desempeño.**

La guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, presenta una tabla sobre los parámetros a evaluar según sea la aplicación analítica del método.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LIMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SÍ	SÍ	SÍ	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SÍ	SÍ	NO	NO
ESPECIFICIDAD	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SÍ	SÍ	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SÍ	SÍ	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA	SÍ	SÍ	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SÍ	NO
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SÍ	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

*Se pueden evaluar según lo requiera el método analítico.

Para el presente trabajo se evaluarán los siguientes parámetros:

- Precisión del sistema
- Linealidad del sistema,
- Especificidad(**discutido previamente**)
- Evaluación exploratoria del Recobro
- Repetibilidad entre días.
- Reproducibilidad del sistema
- LOD
- LOQ

Todos referidos a la Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.

✓ **Linealidad del sistema:**

Preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución o por pesadas independientes. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.

Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs respuesta analítica.

Calcular b_1 , b_0 , r^2 , $IC(\beta_1)$.

El intervalo está en función del propósito del método y se expresa como % de la concentración de la solución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra.

Criterios de aceptación:

$r_2 \geq 0.98$

$IC(\beta_1)$, no debe incluir el cero

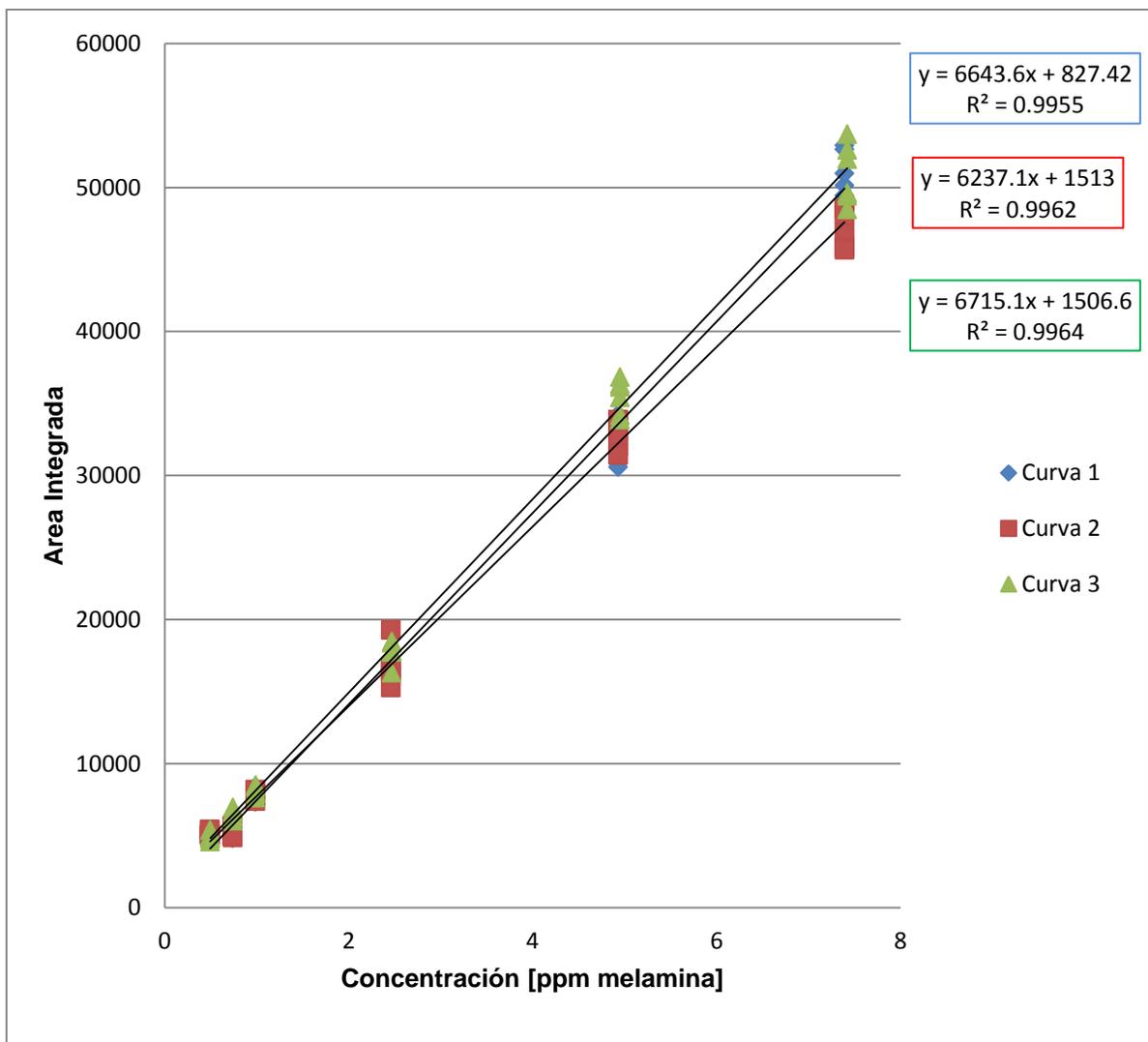


Gráfico 1. Área integrada en función de la concentración de melamina [ppm]. Se puede observar que existe una relación lineal entre la concentración de melamina y el área obtenida.

Curva	Ecuación	r^2	IC(β_1)	Resultado
1	$y = 6643.6x + 827.42$	0.9955	6798.626, 6488.573	Se acepta
2	$y = 6237.1x + 1513$	0.9962	7016.591, 5467.609	Se acepta
3	$y = 6715.1x + 1506.6$	0.9964	6967.311, 5331.274	Se acepta

Tabla 5. Resumen de los parámetros de calibración para evaluar linealidad

✓ **Precisión del sistema**

La precisión de un método analítico describe la cercanía entre las mediciones individuales de un analito. Se recomienda preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia, se representa con los puntos superiores, intermedios e inferiores de las curvas de calibración.

Criterios de aceptación.

$C.V. \leq 1.5\%$ para métodos físico-químicos

$C.V. \leq 3\%$ para métodos biológicos.

Sistema	[MEL ppm]	tm	Sistema	[MEL ppm]	Área	Sistema	[MEL ppm]	Área/[MEL]
1	7.39	6.129	1	7.39	50153	1	7.39	6786.60352
1	7.39	6.183	1	7.39	50987	1	7.39	6899.45873
1	7.39	6.037	1	7.39	49753	1	7.39	6732.47632
1	7.39	5.996	1	7.39	52933	1	7.39	7162.78755
1	7.39	5.975	1	7.39	52645	1	7.39	7123.81597
1	7.39	5.967	1	7.39	49454	1	7.39	6692.01624
	Promedio	6.04783		Promedio	50987.5		Promedio	6899.5264
	σ	0.08888		Σ	1490.25		σ	201.65814
	C.V.	1.46966		C.V.	2.92278		C.V.	2.9227823
Sistema	[MEL ppm]	tm	Sistema	[MEL ppm]	Área	Sistema	[MEL ppm]	Área/[MEL]
3	2.46	6.15	3	2.46	17270	3	2.46	7020.3252
3	2.46	6.058	3	2.46	16313	3	2.46	6631.30081
3	2.46	5.983	3	2.46	16248	3	2.46	6604.87805
3	2.46	5.933	3	2.46	17039	3	2.46	6926.42276
3	2.46	6.054	3	2.46	16208	3	2.46	6588.61789
3	2.46	6.1	3	2.46	16743	3	2.46	6806.09756
	Promedio	6.04633		Promedio	16636.8		Promedio	6762.9404
	σ	0.07833		Σ	450.304		σ	183.05026
	C.V.	1.29548		C.V.	2.70667		C.V.	2.7066668
Sistema	[MEL ppm]	tm	Sistema	[MEL ppm]	Área	Sistema	[MEL ppm]	Área/[MEL]
6	0.493	5.958	6	0.493	5029	6	0.493	10200.8114
6	0.493	6.058	6	0.493	4918	6	0.493	9975.65923
6	0.493	5.954	6	0.493	4966	6	0.493	10073.0223
6	0.493	6.071	6	0.493	4944	6	0.493	10028.3976
6	0.493	6.046	6	0.493	4909	6	0.493	9957.40365
6	0.493	5.95	6	0.493	4859	6	0.493	9855.98377
	Promedio	6.00617		Promedio	4937.5		Promedio	10015.213
	σ	0.05775		Σ	57.5873		σ	116.80999
	C.V.	0.96144		C.V.	1.16633		C.V.	1.1663256

Tabla 6. Análisis estadístico para evaluar precisión.

En los siguientes cuadros se presenta un resumen de los parámetros estadísticos que se evaluaron para la precisión del sistema.

Tiempo de migración

Sistema	[MEL ppm]	σ	C.V.	Resultado
1	7.39	0.08888	1.46966	Se acepta
2	2.46	0.07833	1.29548	Se acepta
3	0.493	0.05775	0.96144	Se acepta

Área

Sistema	[MEL ppm]	σ	C.V.	Resultado
1	7.39	1490.25	2.92278	Se acepta
2	2.46	2.70667	2.70667	Se acepta
3	0.493	57.5873	1.16633	Se acepta

Área/[MEL]

Sistema	[MEL ppm]	σ	C.V.	Resultado
1	7.39	201.65814	2.9227823	Se acepta
2	2.46	183.05026	2.7066668	Se acepta
3	0.493	116.80999	1.1663256	Se acepta

Tabla 7. Resumen de los parámetros de calibración para evaluar precisión.

✓ **Repetibilidad entre días.**

ANADEVA para tiempos de migración.

	<i>Día 1</i>	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 2</i>
Sistema	[MEL]	Tm	[MEL]	Tm
1	7.39	6.129	7.42	6.196
1	7.39	6.183	7.42	6.121
1	7.39	6.037	7.42	6.113
1	7.39	5.996	7.42	6.088
1	7.39	5.975	7.42	6.183
1	7.39	5.967	7.42	6.083
Promedio	6.04783333			6.13066667
Σ	0.08888288			0.04796943
C.V.	1.46966487			0.78245054

Análisis de Varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
<i>Día 1</i>	6	36.287	6.047833333	0.007900167		
<i>Día 2</i>	6	36.784	6.130666667	0.002301067		
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Días	0.02058408	1	0.020584083	4.035606	0.072309	4.964602701
Dentro de los grupos	0.05100616	10	0.005100617			
Total	0.07159025	11				

- 1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$
- 2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$
- 3) No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.
- 4) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza H_0 : no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 1, con un 95% de confianza, por lo tanto los tiempos de migración son repetibles

	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2
Sistema	[MEL]	tm	[MEL]	tm
3	2.46	6.15	2.47	6.175
3	2.46	6.058	2.47	6.1
3	2.46	5.983	2.47	6.171
3	2.46	5.933	2.47	6.088
3	2.46	6.054	2.47	6.063
3	2.46	6.1	2.47	6.133
Promedio	6.046333333		6.121666667	
σ	0.07832922		0.045719434	
C.V.	1.295482988		0.746846189	

Análisis de Varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	6	36.278	6.046333333	0.006135467
Día 2	6	36.73	6.121666667	0.002090267

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Días	0.01702533	1	0.01702533	4.139529	0.06927191	4.96460270
Dentro de los grupos	0.04112866	10	0.00411286			
Total	0.058154	11				

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza H_0 : no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 3, con un 95% de confianza, por lo tanto los tiempos de migración son repetibles

	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2
Sistema	[MEL]	Tm	tm	[MEL]
6	0.493	5.958	6.106	0.495
6	0.493	6.058	6.1	0.495
6	0.493	5.954	6.104	0.495
6	0.493	6.071	6.05	0.495
6	0.493	6.046	6.104	0.495
6	0.493	5.95	5.983	0.495
Promedio	6.00616667		6.0745	
σ	0.05774571		0.04971016	
C.V.	0.9614403		0.818341591	

Análisis de Varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día1	6	36.037	6.006166667	0.003334567
Día2	6	36.447	6.0745	0.0024711

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.014008333	1	0.014008333	4.8257	0.0527296	4.96460270
Dentro de los grupos	0.029028333	10	0.002902833	4	02	1
Total	0.043036667	11				

- 1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$
- 2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$
No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.
- 3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza H_0 : no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 6, con un 95% de confianza, por lo tanto los tiempos de migración son repetibles

Los resultados anteriores nos describen el comportamiento que tiene el sistema en días diferentes, es así que con los datos obtenidos, se dice que los tiempos de migración son repetibles entre días, ya que no existe evidencia para suponer que exista una variación significativa entre las varianzas, esto se puede aseverar con un 95 % de confianza según lo planteado por las Pruebas de Hipótesis.

Se realizó el mismo estudio para la Relación entre área y concentración: Área/ [MEL]

✓ **Repetibilidad entre días**

ANADEVA para la relación Área/[MEL]

Sistema	Día 1 [MEL]	Día 1 Área/[MEL]	Día 2 [MEL]	Día 2 Área/[MEL]
1	7.39	6786.603518	7.42	6760.666667
1	7.39	6899.458728	7.42	6929.466667
1	7.39	6732.476319	7.42	7014.133333
1	7.39	7162.787551	7.42	6590
1	7.39	7123.815968	7.42	6616.666667
1	7.39	6692.016238	7.42	6597.866667
Promedio		6899.52639		6751.46667
Σ		201.658138		183.628921
C.V.		2.92278232		2.71983747

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	6	41397.15832	6899.526387	40666.00442
Día 2	6	40508.8	6751.466667	33719.58044

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Días	65765.0423	1	65765.04236	1.768	0.21313626	4.964602701
Entre grupos	371927.924	10	37192.79243		1	
Total	437692.966	11				

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza H_0 : no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 1, con un 95% de confianza, por lo tanto la relación **Área/[MEL]**, es repetible

	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2
Sistema	[MEL]	Área/[MEL]	[MEL]	Área/[MEL]
3	2.46	7020.325203	2.47	7359.2
3	2.46	6631.300813	2.47	7120.8
3	2.46	6604.878049	2.47	7391.6
3	2.46	6926.422764	2.47	6930
3	2.46	6995.121951	2.47	7105.2
3	2.46	6806.097561	2.47	7104.4
	Promedio	6830.691057		7168.533333
	σ	180.8402678		175.1646844
	C.V.	2.647466652		2.443521935

Análisis de Varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	6	40984.14634	6830.691057	32703.20246
Día 2	6	43011.2	7168.533333	30682.66667

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	342412.2112	1	342412.2112	10.80	0.00819210	4.964602701
Dentro de los grupos	316929.3456	10	31692.93456			
Total	659341.5568	11				

- 1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$
- 2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$
No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.
- 3) $\alpha=0.05\%$ $\sigma=0.95\%$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas para los resultados obtenidos entre días de la relación **Área/[MEL]**, para el sistema 3, para lo cual se realizó una prueba de F para evaluar las diferencias entre las varianzas.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Día 1	Día 2
Media	6830.691057	7168.533333
Varianza	32703.20246	30682.66667
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	1.065852679	
P(F<=f) una cola	0.472955914	
Valor crítico para F (una cola)	5.050329058	

- 1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$
- 2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$
No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.
- 3) $\alpha=0.05\%$ $\sigma=0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza Ho: no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 3, con un 95% de confianza, por lo tanto la relación **Área/[MEL]**, es repetible

	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2
Sistema	[MEL]	Área/[MEL]	[MEL]	Área/[MEL]
6	0.493	10200.81136	0.495	10024.24242
6	0.493	9975.659229	0.495	9876.767677
6	0.493	10073.02231	0.495	9886.868687
6	0.493	10028.39757	0.495	9779.79798
6	0.493	9957.403651	0.495	10298.9899
6	0.493	9855.983773	0.495	9876.767677
	Promedio	10015.213		9957.239057
	σ	116.80999		184.7548106
	C.V.	1.16632557		1.855482323

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	6	60091.27789	10015.21298	13644.57373
Día 2	6	59743.43434	9957.239057	34134.34003

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	10082.92777	1	10082.92777	0.422	0.5305472	4.964602701
Dentro de los grupos	238894.5688	10	23889.45688		0	
Total	248977.4966	11				

1) $H_0: S^2_1 = S^2_2$

2) $H_a: S^2_1 \neq S^2_2$

No se rechaza Ho si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\% \quad \sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza Ho: no hay diferencias significativas entre las varianzas debidas al día, para el sistema 6, con un 95% de confianza, por lo tanto la relación **Área/[MEL]**, es repetible

Reproducibilidad del sistema.

Para evaluar la reproducibilidad del sistema se realizó un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, donde evaluó la interacción entre analistas y entre días.

✓ *Reproducibilidad entre días*

ANAEVA para tiempo de migración

Sistema1

	tmDía 1	tmDía 2		tmDía 1	tmDía 2
Analista 1	6.129	6.196	Analista 2	6.129	6.179
	6.183	6.121		6.183	6.054
	6.037	6.113		6.037	6.046
	5.996	6.088		5.996	6.096
	5.975	6.183		5.975	6.017
	5.967	6.083		5.967	5.925

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Día 1	Día 2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	36.287	36.784	73.071
Promedio	6.047833333	6.130666667	6.08925
Varianza	0.007900167	0.002301067	0.006508205
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	36.287	36.317	72.604
Promedio	6.047833333	6.052833333	6.050333333
Varianza	0.007900167	0.007090967	0.00682097
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	72.574	73.101	
Promedio	6.047833333	6.09175	
Varianza	0.00718197	0.005921295	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	0.00908704	1	0.009087042	1.44282	0.24371523	4.351243478
Días	0.01157204	1	0.011572042	1.83738	0.19036839	4.351243478
Interacción	0.00908704	1	0.009087042	1.44282	0.24371523	4.351243478
Error	0.12596183	20	0.006298092			
Total	0.15570795	23				

- 1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$
- 2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$
No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.
- 3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Por lo tanto se no se rechaza H_0 : no hay diferencias significativas para las varianzas debidas al día, analista y la interacción entre ellas para el sistema 1 con un 95% de confianza, por lo tanto el tiempo de migración es reproducible

Sistema 3

	tmDía 1	tmDía 2		tmDía 1	tmDía 2
Analista 1	6.15	6.175	Analista 2	6.108	5.983
	6.058	6.1		6.017	5.846
	5.983	6.171		5.946	6.037
	5.933	6.088		5.867	6.042
	6.054	6.063		6.063	5.954
	6.1	6.133		5.971	5.846

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Día 1	Día 2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	36.278	36.73	73.008
Promedio	6.046333333	6.121666667	6.084
Varianza	0.006135467	0.002090267	0.005286727
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	35.972	35.708	71.68
Promedio	5.995333333	5.951333333	5.973333333
Varianza	0.007447467	0.007751867	0.007436788
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	72.25	72.438	
Promedio	6.020833333	6.0365	
Varianza	0.006883424	0.012386455	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	0.0734826	1	0.073482667	12.54769	0.002044717	4.351243478
Días	0.0014726	1	0.001472667	0.251468	0.621518067	4.351243478
Interacción	0.0213606	1	0.021360667	3.647488	0.070601928	4.351243478
Error	0.1171253	20	0.005856267			
Total	0.2134413	23				

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas en los tiempos de migración para los resultados obtenidos entre analistas del sistema 3, para lo cual se realizó una prueba de F, con el fin de evaluar las diferencias entre las varianzas de los analistas.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Media	6.12166667	5.95133333
Varianza	0.00209027	0.00775187
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	3.70855393	
P(F<=f) una cola	0.08832108	
Valor crítico para F (una cola)	5.05032906	

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95$

No se rechaza H_0 , ya que no existen diferencias significativas entre las varianzas debidas al analista para el sistema 3, con un 95 % de confianza y que las diferencias establecida anteriormente por la ANADEVA no se debe a los analistas, por lo tanto el tiempo de migración es reproducible

Sistema 6

	tmDía 1	tmDía 2		tmDía 1	tmDía 2
Analista 1	5.958	6.106	Analista 2	5.996	6.017
	6.058	6.1		6.046	5.954
	5.954	6.104		6.021	6.042
	6.071	6.05		6.007	6.025
	6.046	6.104		6.063	6.067
	5.95	5.983		6.05	5.958

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Día 1	Día 2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	36.037	36.447	72.484
Promedio	6.006166667	6.0745	6.040333333
Varianza	0.003334567	0.0024711	0.003912424
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	36.183	36.063	72.246
Promedio	6.0305	6.0105	6.0205
Varianza	0.0007019	0.0020771	0.001372273
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	72.22	72.51	
Promedio	6.018333333	6.0425	
Varianza	0.001996242	0.003184455	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	0.00236016	1	0.002360167	1.099	0.30683711	4.351243478
Días	0.0035041	1	0.003504167	1.632	0.21595524	4.351243478
Interacción	0.0117041	1	0.011704167	5.453	0.03006037	4.351243478
Error	0.0429233	20	0.002146167			

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas en los tiempos de migración para los resultados obtenidos de la interacción de analista/día para el sistema 6, para lo cual se realizó una prueba de F con el fin de evaluar las diferencias entre las varianzas de dicha interacción

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Interacción1	Interacción2
Media	6.0425	6.018333333
Varianza	0.00318445	0.00199624
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1.59522436	
P(F<=f) una cola	0.22549715	
Valor crítico para F (una cola)	2.81793047	

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha = 0.05$ $\sigma = 0.95$

No se rechaza H_0 , ya que no existen diferencias significativas entre las varianzas debidas a la interacción Analista /día, del sistema 6, con un 95 % de confianza y que las diferencias establecida anteriormente por la ANADEVa no se debe a la interacción entre días y analistas, por lo tanto el tiempo de migración es reproducible

✓ **Reproducibilidad**

ANADEVa para la relación Área/ [MEL]

Sistema 1

	A/[MEL]D1	A/[MEL]D2		A/[MEL]D1	A/[MEL]D2
Analista 1	6786.60352	6760.66667	Analista 2	7525.93583	6897.72727
	6899.45873	6929.46667		6841.04278	7137.83422
	6732.47632	7014.13333		7000.53476	6698.39572
	7162.78755	6590		7264.57219	7122.45989
	7123.81597	6616.66667		7179.0107	7023.39572
	6692.01624	6597.86667		6626.87166	6911.22995

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	A/[MEL] D1	A/[MEL] D2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	41397.15832	40508.8	81905.95832
Promedio	6899.526387	6751.466667	6825.496527
Varianza	40666.00442	33719.58044	39790.2697
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	42437.96791	41791.04278	84229.0107
Promedio	7072.994652	6965.173797	7019.084225
Varianza	102234.9796	27313.96916	62056.43221
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	83835.12624	82299.84278	
Promedio	6986.26052	6858.320232	
Varianza	73161.69429	40198.17822	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	224857.18	1	224857.1803	4.410379	0.04860879	4.351243478
Días	98212.303	1	98212.30373	1.926349	0.18042761	4.351243478
Interacción	2428.7493	1	2428.749352	0.047637	0.82943745	4.351243478
Dentro del grupo	1019672.6	20	50983.63339			
Total	1345170.9	23				

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha=0.05\%$ $\sigma=0.95$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas en la relación **Área/ [MEL]** para los resultados obtenidos entre analistas del sistema 3, para lo cual se realizó una prueba de F, con el fin de evaluar las diferencias entre las varianzas de los analistas.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Analista 1	Analista 2
Media	6899.52639	7072.99465
Varianza	40666.0044	102234.98
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	2.51401585	
P(F<=f) una cola	0.16725982	
Valor crítico para F (una cola)	5.05032906	

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha=0.05\%$ $\sigma=0.95$

No se rechaza H_0 , ya que no existen diferencias significativas entre las varianzas debidas al analista del sistema 1, con un 95 % de confianza y que las diferencias establecida anteriormente por la ANADEVA no se debe a los analistas, por lo tanto la relación **Área/ [MEL]**, es reproducible

Sistema 3

	A/[MEL] D1	A/[MEL] D2		A/[MEL] D1	A/[MEL] D2
Analista 1	7020.3252	7359.2	Analista 2	8338.15261	8314.05622
	6631.30081	7120.8		8563.85542	7954.61847
	6604.87805	7391.6		8347.79116	8514.45783
	6926.42276	6930		7942.57028	8631.3253
	6995.12195	7105.2		8520.88353	8189.15663
	6806.09756	7104.4		8718.07229	7838.55422

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	A/[MEL] D1	A/[MEL] D2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	40984.14634	43011.2	83995.34634
Promedio	6830.691057	7168.533333	6999.612195
Varianza	32703.20246	30682.66667	59940.14153
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	50431.3253	49442.16867	99873.49398
Promedio	8405.220884	8240.361446	8322.791165
Varianza	71652.13464	95826.5028	83539.00817
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	91415.47164	92453.36867	
Promedio	7617.95597	7704.44739	
Varianza	723564.4737	370817.4868	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	10504815.51	1	10504815.5	182.0083	1.67147E-11	4.351243478
Días	44884.59371	1	44884.5937	0.777678	0.38832801	4.351243478
Interacción	379063.5201	1	379063.520	6.567722	0.01856024	4.351243478
Dentro del grupo	1154322.533	20	57716.1266			
Total	12083086.16	23				

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas en la relación **Área/[MEL]** para los resultados obtenidos entre analistas, y la interacción analista/día, del sistema 3, para lo cual se realizó una prueba de F, con el fin de evaluar las diferencias entre las varianzas

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Analista 2	Analista 1
Media	8240.36145	7168.53333
Varianza	95826.5028	30682.6667
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	3.1231478	
P(F<=f) una cola	0.11847537	
Valor crítico para F (una cola)	5.05032906	

Prueba F para varianzas de dos muestras

	Interacción 1	Interacción2
Media	7617.95597	7704.44739
Varianza	723564.4737	370817.487
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1.951268479	
P(F<=f) una cola	0.141397603	
Valor crítico para F (una cola)	2.81793047	

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha = 0.05$ $\sigma = 0.95$

No se rechaza H_0 , ya que no existen diferencias significativas entre las varianzas debidas al analista y la interacción del sistema 3, con un 95 % de confianza y que las diferencias establecida anteriormente por la ANADEVa no se debe a los analistas ni a la interacción entre ellos, por lo tanto la relación **Área/ [MEL]**, es reproducible

Sistema 6

	A/[MEL] D1	A/[MEL] D2		A/[MEL] D1	A/[MEL] D2
Analista 1	10200.8114	10024.2424	Analista 2	11064.257	10977.9116
	9975.65923	9876.76768		11329.3173	10708.8353
	10073.0223	9886.86869		11028.1124	11365.4618
	10028.3976	9779.79798		11104.4177	11220.8835
	9957.40365	10298.9899		11718.8755	11106.4257
	9855.98377	9876.76768		11224.8996	10973.8956

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	A/[MEL] D1	A/[MEL] D2	Total
Analista 1			
Cuenta	6	6	12
Suma	60091.27789	59743.43434	119834.7122
Promedio	10015.21298	9957.239057	9986.226019
Varianza	13644.57373	34134.34003	22634.31787
Analista 2			
Cuenta	6	6	12
Suma	67469.87952	66353.41365	133823.2932
Promedio	11244.97992	11058.90228	11151.9411
Varianza	66308.60793	51761.53073	63111.39654
Total			
Cuenta	12	12	
Suma	127561.1574	126096.848	
Promedio	10630.09645	10508.07067	
Varianza	448795.0976	370042.2632	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	8153349.86	1	8153349.862	196.6450	8.27668E-12	4.351243478
Días	89341.7520	1	89341.75207	2.154772	0.157679179	4.351243478
Interacción	24615.8443	1	24615.84439	0.593692	0.450001489	4.351243478
Dentro del grupo	829245.262	20	41462.2631			

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

3) $\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95\%$

Se acepta H_a : Existen diferencias significativas en la relación **Área/ [MEL]** para los resultados obtenidos entre analistas del sistema 6, para lo cual se realizó una prueba de F, con el fin de evaluar las diferencias entre las varianzas de los analistas.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Media	10015.213	11244.9799
Varianza	13644.5737	66308.6079
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	4.85970535	
P(F<=f) una cola	0.05381514	
Valor crítico para F (una cola)	5.05032906	

1) $H_0: S_1^2 = S_2^2$

2) $H_a: S_1^2 \neq S_2^2$

No se rechaza H_0 si $F_{cal} < F_{crit}$.

$\alpha = 0.05\%$ $\sigma = 0.95$

No se rechaza H_0 , ya que no existen diferencias significativas entre las varianzas debidas al analista del sistema 6, con un 95 % de confianza y que las diferencias establecida anteriormente por la ANADEVa no se debe a los analistas, por lo tanto la relación **Área/ [MEL]**, es reproducible

✓ Evaluación exploratoria del recobro

Placebo adicionado	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% recobro		
Enfagrow					
1	5.23	5.04	96.37	Promedio	104.27
2	5.23	5.77	110.33	σ	7.16017999
3	5.23	5.55	106.12	C.V	6.86694524
Hartz					
1	5.23	5.92	113.19	Promedio	109.85
2	5.23	5.57	106.50	σ	4.73207215
				C.V	4.30787421
Nidal*					
1	5.27	9	170.78	Promedio	150.92
2	5.27	7.68	145.73	σ	17.8421944
3	5.27	7.18	136.24	C.V	11.8225102
Nido*					
1	5.27	6.25	118.60	Promedio	118.34
2	5.27	6.27	118.98	σ	0.79000607
3	5.27	6.19	117.46	C.V	0.66755724
San Marcos					
1	5.27	5.16	97.91	Promedio	96.71
2	5.27	5.12	97.15	σ	1.47390009
3	5.27	5.01	95.07	C.V	1.52402619
Enfamil					
1	5.23	5.55	106.12	Promedio	108.70
2	5.23	5.82	111.28	σ	3.65045566
				C.V	3.35829078
Nutrileche					
1	5.27	6.08	115.37	Promedio	107.50
2	5.27	5.25	99.62	σ	11.1365964
				C.V	10.3600817

Tabla 8. Evaluación exploratoria del recobro

Nota: * en los Electroferogramas sin adición de melamina se aprecia una señal en el tm esperado para la melamina lo que sugiere que la muestra probablemente se encuentre contaminada con melamina. Estos Electroferogramas se presentan en los anexos

✓ **Límite de detección (LOD)**

LOD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión:

Metodología.- Se aplica tanto a métodos instrumentales como no instrumentales.

Preparar 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos, etc.) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas limite, ya sea por dilución o pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas.

Calcular b_1 , r^2 , $S_{y/x}$, IC (β_1).

Calcular el límite de detección:

$$LOD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1 = 0.57 \mu\text{g/ml}$$

✓ **Límite de cuantificación (LOQ)**

LOQ con base en la curva de calibración en la desviación estándar de regresión:

Metodología.- Se aplica tanto a métodos instrumentales como no instrumentales.

Preparar 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos, etc.) a valores menores o que incluya la especificación de la prueba de impurezas limite, ya sea por dilución o pesada independiente del analito. Medir las respuestas analíticas.

Calcular b_1 , r^2 , $S_{y/x}$, IC (β_1).

Calcular el límite de cuantificación:

$$LOQ = (10 \times S_{y/x}) / b_1 = 1.74 \mu\text{g/ml}$$

El sistema es lineal en un rango de concentración entre 0.5 y 7.5 ppm. Ya que posee un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y los IC de la pendiente no incluyen el 0.

En base a los resultados anteriores (C.V < 3%) y análisis de ANADEVAs los tiempos de migración del sistema son repetibles y reproducibles. (García, Soberón, & Cortés, 2002)

Se evaluó la precisión del sistema entre días y analistas para la relación entre el área y la concentración, demostrando estadísticamente ser repetible y reproducible, las diferencias entre varianzas evaluadas en el ANADEVAs se analizaron con la prueba de F, donde se comparan estas últimas (Miller & Miller, pp. 53-59, 2002), la prueba de F nos dice que las diferencias debidas a los analistas, a los días o la interacción entre ellos no son significativas, con un 95% de confianza.

Estas variaciones pueden deberse a un sin número de razones, tales como los errores propios del analista, errores aleatorios. Errores en la calibración de los instrumentos para pesar, así como los instrumentos volumétricos, errores sistemáticos, pero estos son errores que pudieran mantenerse constantes, evitando así su influencia en el resultado.^(Miller et al., pp. 3-5 2002). Es preciso señalar que durante la experimentación el equipo de electroforesis capilar recibió mantenimiento técnico, donde se nos comentó que el equipo tenía una falla en la bomba de presión, también se cambió el bloque de interface, el cual provee de la energía necesaria para alcanzar el voltaje que requiere el equipo durante las corridas.

Esta falla en la bomba de presión pudo afectar la inyección de la muestra, esto también repercutiendo en los lavados que se realizan durante una corrida, alterando las áreas obtenidas, se sabe la presión junto con la dimensión del capilar es la que nos determina el volumen que se está inyectando en la muestra,^(Castillo R. et al., 2005) por lo que una falla o mal funcionamiento de esta bomba pudiera afectar la cantidad inyectada en cada corrida, lo que llevo a un cambio en las áreas obtenidas

6. Conclusiones

- Se desarrolló un método alternativo, capaz de determinar y cuantificar la presencia de melamina en leche y fórmulas lácteas líquidas y en polvo, donde se obtuvo un sistema lineal, haciendo posible la cuantificación de melamina en dichas muestras mediante interpolación.
- Se logró reducir el número de reactivos y de pasos a seguir para el tratamiento de la muestra, ya que para este método no se requirió reconcentración alguna de la muestra, ni la utilización de técnicas de extracción en fase sólida o líquida, haciendo el análisis mucho más rápido, sencillo y económico.
- Se identificaron las variables críticas para el tratamiento de la muestra como: desnaturalización de proteínas mediante pH y temperatura, fuerza iónica y longitud de capilar, logrando obtener al final un tratamiento de muestra efectivo, así como las condiciones finales de análisis.
- Se evaluó el desempeño de algunos parámetros de calibración como linealidad del sistema, siendo lineal.
- Se demostró la precisión del sistema para tiempos de migración así como para las áreas y la relación entre áreas y concentración con un C.V $< al 3\%$, por lo que el sistema es repetible y reproducible.
- El área y la concentración demostraron tener una relación según lo establecido en la pruebas de hipótesis, habiendo algunas diferencias entre las varianzas, las cuales al realizar las pruebas de F se demostró que estas diferencias no eran significativas con un 95% de confianza y que estas variaciones no eran debidas ni a los analistas, ni a los días, ni a la interacción entre ellos.
- Se demostró que el método es específico ya que la respuesta analítica se debe únicamente a la melamina añadida a las muestras.

7. Perspectivas

- Seguir la evaluación de los parámetros de desempeño faltantes para poder realizar la validación del método (linealidad, exactitud, precisión, adecuabilidad y robustez del método)
- Extrapolar esta metodología para la evaluación de diversos productos alimenticios tales como cereales, enlatados, alimentos para mascota o cualquier otro producto de consumo humano y animal susceptibles a ser adulterados con melamina.
- Con el tratamiento que se plantea para la muestra, estudiar la posibilidad de determinar otros contaminantes que sean solubles en el suero.
- Tratar de implementar este método en las industrias alimentarias y lácteas ya que se trata de un método económico, que requiere de un mínimo de reactivos, es poco contaminante al no utilizar solventes orgánicos y el tiempo de análisis es relativamente corto en comparación con otras técnicas (HPLC)

8. Referencias

1. Baker, D. R. (1995). *Capillary Electrophoresis*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
2. Baker, S., Brown, C. A., & Bruckner, J. V. (July de 2008). *U.S Food And Drug Administration*. Recuperado el 09 de Mayo de 2012, de External Peer Review of the FDA/CFSAN Draft Report Interim Safety and Risk Assessment of Melamine and its Analogues in Food for Humans (October 3, 2008) and Update (November 28, 2008): <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Melamine/ucm174165.htm>
3. Baynes, R. E., & Smith, G. (2008). Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1196-200.
4. Buur, J. L., Baynes, R. E., & Riviere, J. (2008). Estimating meat withdrawal times in pigs exposed to melamine contaminated feed using a physiologically based pharmacokinetic model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51, 324-31.
5. Castagnino, J. M. (2000). *Electroforesis Capilar*.
6. Castillo R., M., Revilla V., A. L., & Lopez A., R. (2005). "*Fundamentos de electroforesis Capilar*" (1ª ed.). Cuautitlán Izcalli: UNAM, FES Cuautitlán.
7. Černova, Ž., Razmislevičienė, I., & Padarauskas, A. (2009). Determination of melamine in milk powder by capillary electrophoresis. *Chemija*, 20(4), 231-235.
8. Chavez A., J. P. (23 de Junio de 2008). Implementacion de la documentación de la buenas practicas de manufactura y establecimiento de los manuales de procedimientos de las pruebas fisico quimicas en la planta de enfriamiento. *Trabajo de grado para optar al titulo de Microbiologia Industrial*. Bogota D.C., Colombia: Universidad de.
9. Chen, Z., & Yan, X. (17 de 09 de 2009). Simultaneous Determination of Melamina and 5-Hydroxymethylfurfural in Milk by Capillary Electrophoresis with Diode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8742-8747.
10. Christen, H. R. (1997). *Fundamentos de quimica general e inorganica*. Mexico: Reverte.
11. Cruywagen, C. W., Stander, M. A., & Adonis, M. (2009). Hot topic: pathway confirmed for the transmission of melamine from feed to cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2046-50.
12. Dobson, R. L., Motlagh, S., & Quijano, M. (2008). Identificación and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*, 106(1), 251-262.
13. Ehling, S., & Tefera, S. (2007). High-performance liquid. *Food Additives & Contaminants*, 24(12), 1319-25.
14. EPA. (08 de 2002). *United States Enviromental Protection Agency*. Recuperado el 09 de 2012, de <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/pdfs/1023.pdf>
15. Escobar, A., Faure, R., & Sosa, D. (2010). MELAMINA. UN PROBLEMA POTENCIAL PARA LA SALUD ANIMAL Y HUMANA COMO ADULTERANTE EN LOS ALIMENTOS CON ÉNFASIS EN LA LECHE. *Revista Salud Animal*, 32(1), 22-31.
16. Fernandez, G. A., & Segura, C. A. (2005). *lectroforesis capilar: aproximacion segun la tecnica de deteccion*. Barcelona: Universidad de Granada.
17. García, M. A., Soberón, E., & Cortés, M. (2002). *Métodos analíticos. Guia de Validación*. México: Colegio Nacional de Quimicos Farmaceuticos Biologos.
18. Guan, N., & Fan, Q. (2009). Melamine-Contaminated Powdered Formula and Urolithiasis. 1067-1074.
19. Harris C., D. (2002). "*Análisis químico cuantitativo*" (2ª ed.). Barcelona, España: Reverté.
20. Hau AK, K. T. (2009). Melamine toxicity and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 20(2), 245-50.

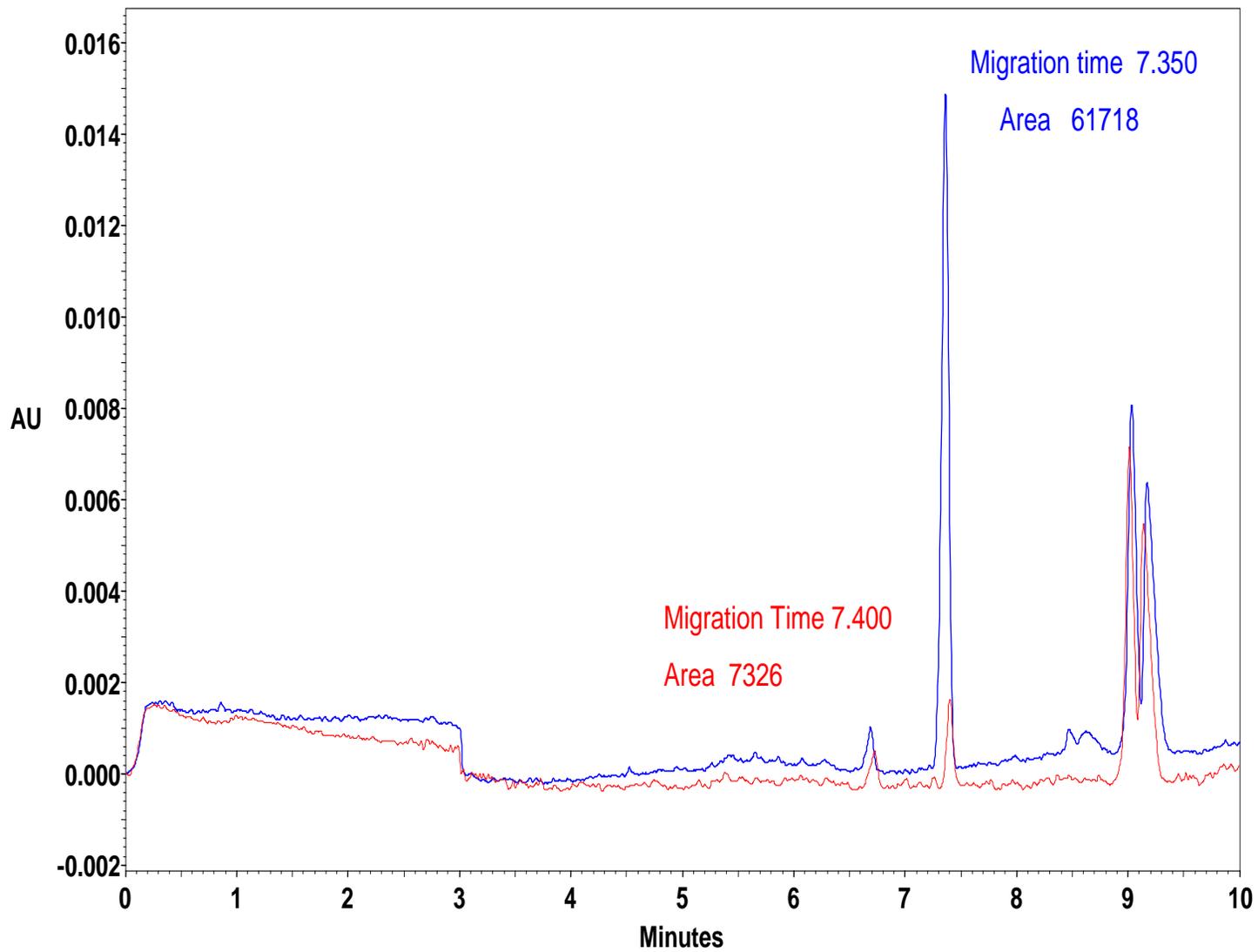
21. Heiger N., D. (1997). *High performance Capillary Electrophoresis*. Francia: Hewlet Packard.
22. Henderson, J. (4 de Diciembre de 2008). *The Health Culture*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2012, de <http://www.thehealthculture.com/2008/12/melamine-update/>
23. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*, 1-13.
24. Ingelse, B. A. (1997). *Chiral separations using capillary electrophoresis*. Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven.
25. Lab, S. (10 de 09 de 2005). *Material Safety Data Sheet*. Recuperado el 16 de 08 de 2012, de <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924600>
26. Liu, Y., & Todd, E. E. (30 de Mayo de 2012). Recent developments in the detection of melamine. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE*, 13(7), 525-532.
27. Lumex, L. (2008). *Express melamine determination in milk and milk products by CAPEL capillary electrophoresis system*.
28. Martínez V. , G., & Palacios. F., J. (2010). Composición de leche de vacas Criollo, Guzerat y sus cruza. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.*, 311-324.
29. Mc Murry, J. (1995). *Organic Chemistry*. USA: Brooks Cole Publishing.
30. Meng, L., Shen, G., Hou, X., & Wang, L. (28 de 07 de 2009). Determination of Melamine in Food by SPE and CZE with UV Detection. *Chromatographia*, 70(5/6), 991-994.
31. Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Madrid: Pearson Education.
32. Mongay Fernandez, C. (2005). *Quimiometría*. Valencia: PUV.
33. NOM-155-SCFI. (11 de Agosto de 2003). Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Mexico.
34. NOM-243-SSA1. (17 de Septiembre de 2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo. Mexico: Diario Oficial.
35. Oliveres, C. (2001). *Fundamentos de Electroforesis Capilar*. Reverte.
36. OMS. (1-4 de Diciembre de 2008). *Reunión de expertos para revisar la toxicología de la melamina y el ácido cianúrico. En colaboración con la FAO. Respaldado por Health Canada*. Recuperado el 25 de Abril de 2012, de http://www.who.int/foodsafety/fs_management/conclusions_recommendations_sp.pdf
37. Profeco. (Diciembre de 2004). *Profeco*. Recuperado el 29 de Junio de 2012, de http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_04/leche_dic04.pdf
38. Puscher, B., & Poppenga, R. H. (2007). Assessment of Melamine and Cyanuric Acid Toxicity in Cats. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 616-624.
39. RELAQ. (1996). *Red Latinoamericana de Química*. Recuperado el 14 de 10 de 2012, de <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/cze.htm>
40. Rivera Vega, M. P. (1996). *Electroforesis Capilar una nueva herramienta para la Química Analítica*. Mexico: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
41. Skoog, D. A., & Holler, J. F. (2001). *Principios de Analisis instrumental* (Quinta ed.).
42. Taverna, M., Páez, R., & Costabel, L. (s.f.). *Cuenca Rural*. Recuperado el 28 de 08 de 2012, de <http://www.cuencarural.com/lecheria/49889-aduteracion-de-la-leche-en-polvo-caso-de-la-melamina/>
43. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM); . (Mayo de 2001). *Lab Compliance*. Recuperado el 18 de Junio de 2012, de Lab Compliance:

<http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>

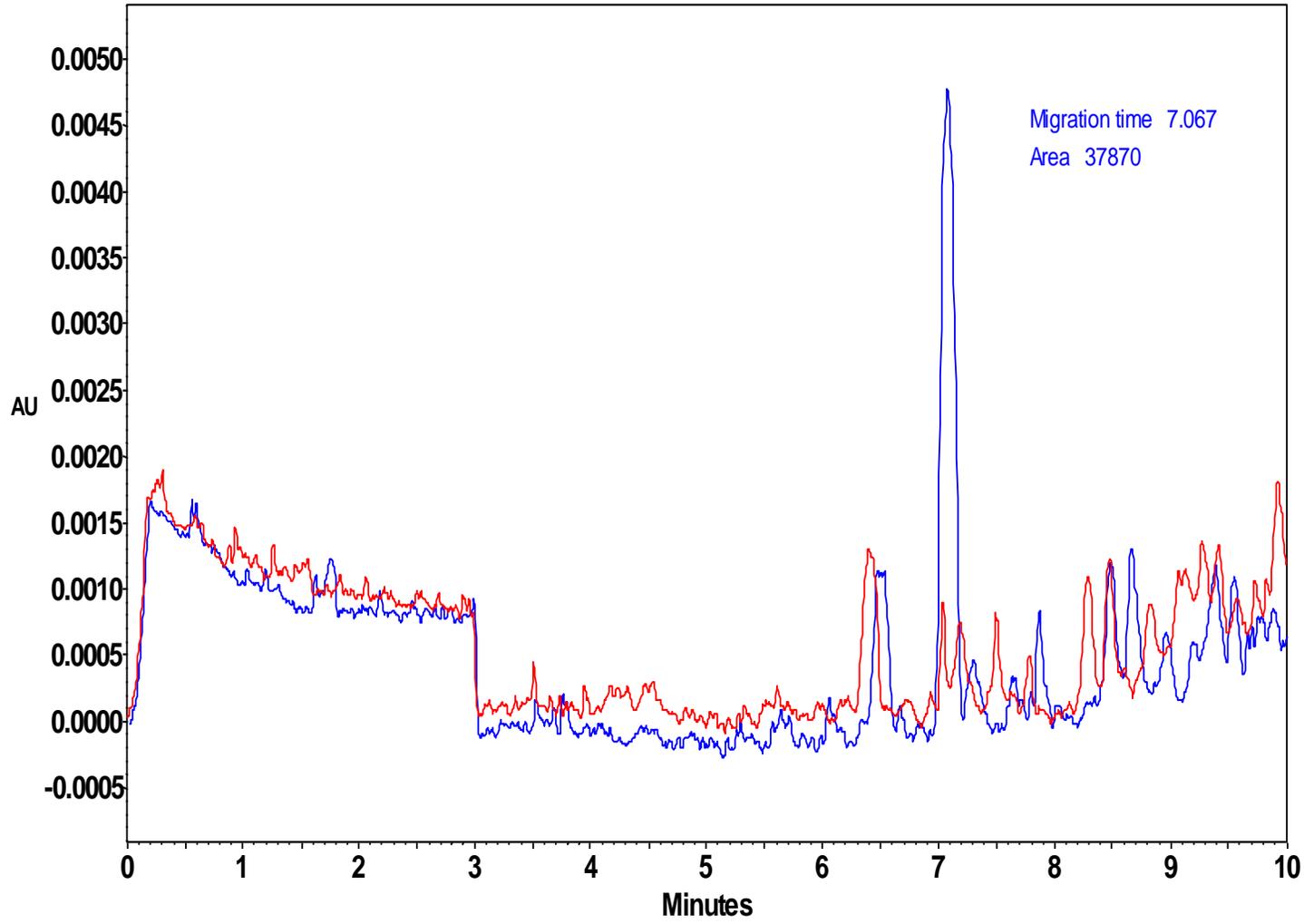
44. UE. (2008). *DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 26 de septiembre de 2008 por la que se establecen las condiciones particulares de importación de productos que contienen leche o productos lácteos originarios o procedentes de China*. Union Europea: Diario Oficial de la Union Europea.
45. Universidad de Oviedo, A. E. (2008). *micrux technologies*. Recuperado el 13 de 03 de 2012, de micrux technologies: <http://www.micruxfluidic.com/es/tecnologia.html>
46. USFDA. (25 de Mayo de 2007). *U. S. Food and Drug Administration*. Recuperado el 15 de 09 de 2012, de <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Melamine/ucm164658.htm>
47. Valerio, M. (30 de septiembre de 2008). *elmundo.essalud*. Recuperado el 24 de Mayo de 2012, de <http://www.elmundo.es/elmundosalud/2008/09/30/medicina/1222775518.html>
48. Valverde, M. I. (2001). *DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR*. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona.
49. Vargas, G. (2007). *Teoría y aplicaciones de la electroforesis capilar*. Cuautitlan: UNAM.
50. Vázquez, Q. M. (06 de Junio de 2007). *Liconsa*. Recuperado el 28 de Junio de 2012, de <http://www.liconsa.gob.mx/innovaportal/file/1344/1/man-nor-cont-cal-lec-cruda-hist.pdf>
51. Velázquez Sánchez , A. M. (2007). *Diseño asistido por computadora, síntesis y actividad antihipertensiva de derivados morfolínicos de fenol*. . México: Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas. UNAM.
52. WHO/HSE-FOS. (30 de Octubre de 2008). *WHO.INT*. Recuperado el 15 de Mayo de 2012, de Melamine: Comments on analytical methods: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Melamine_methods_comments.pdf
53. Yan, N., & Zhou, L. (21 de 01 de 2009). Determination of Melamine in Dairy Products, Fish Feed and Fish by Capillary Zone Electrophoresis with Diode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 807-811.
54. Yun-Kai, L., & Yue-Na, S. (30 de septiembre de 2011). A simple and high-throughput method of ultrasonic extraction-capillary electrophoresis for determination of melamine in milk. *Analytical Methods*, 3, 2557-2561.

9. Anexo I Electroferogramas de diversas muestras de leche

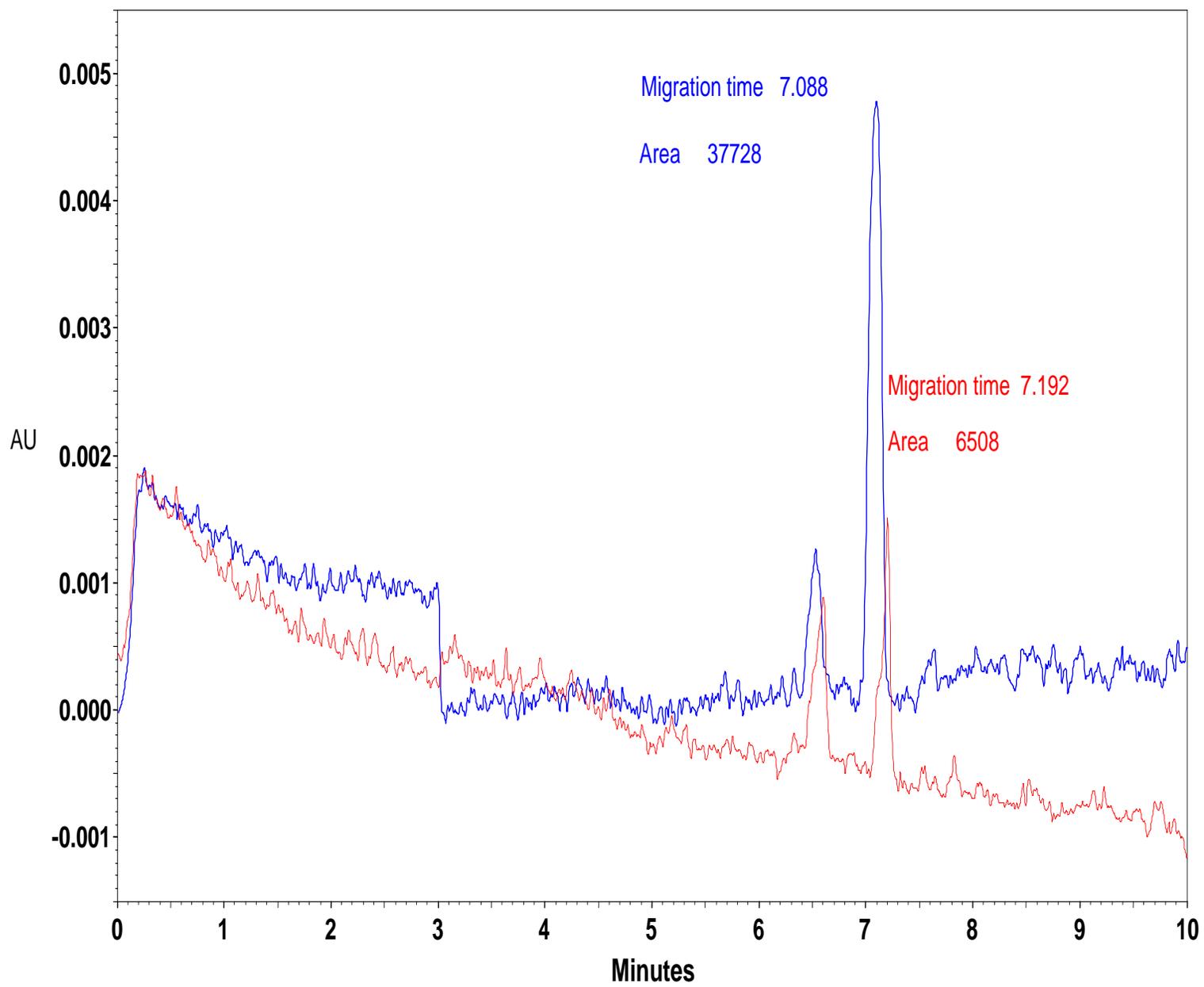
Nidal 5 ppm



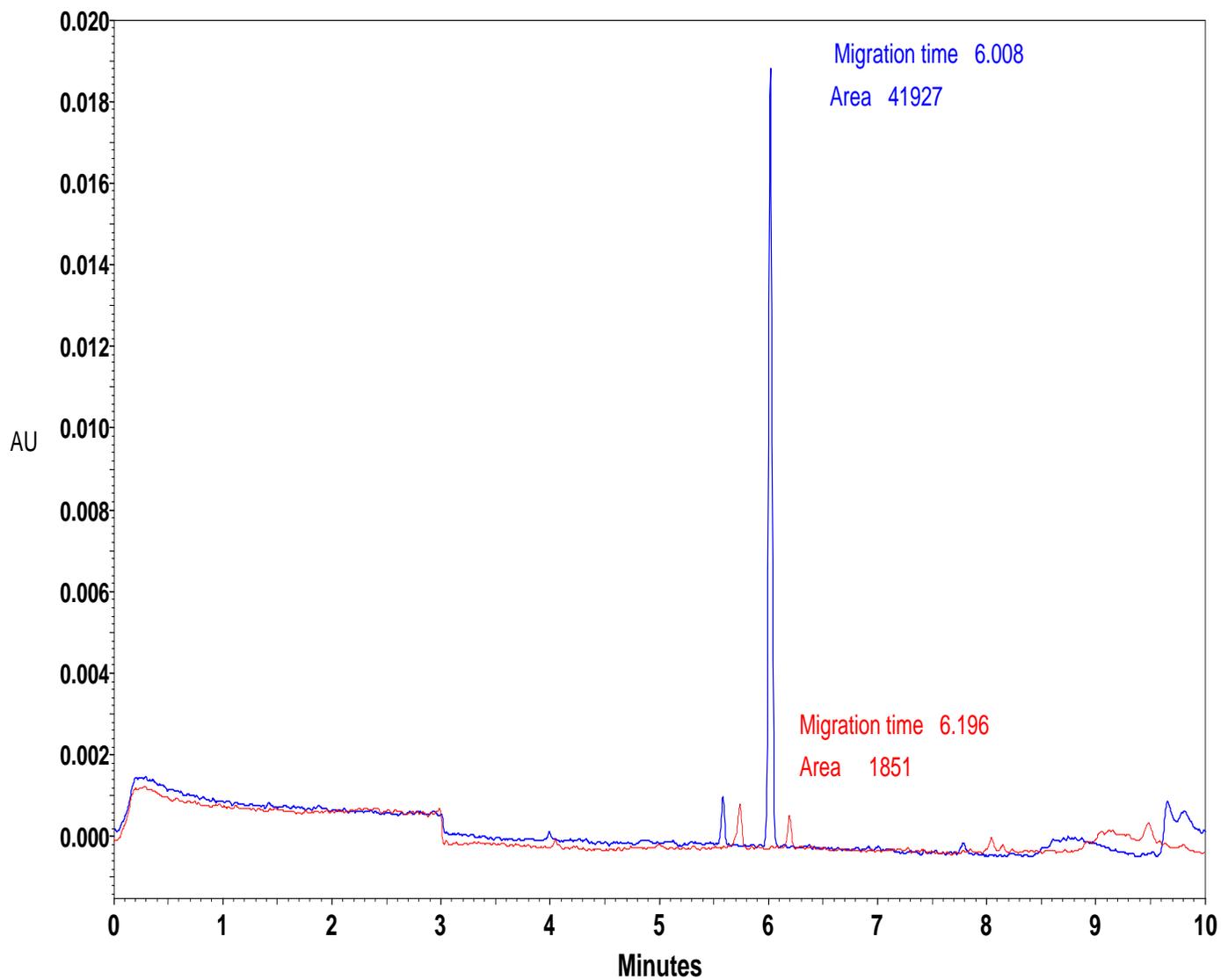
Leche para perro Hartz



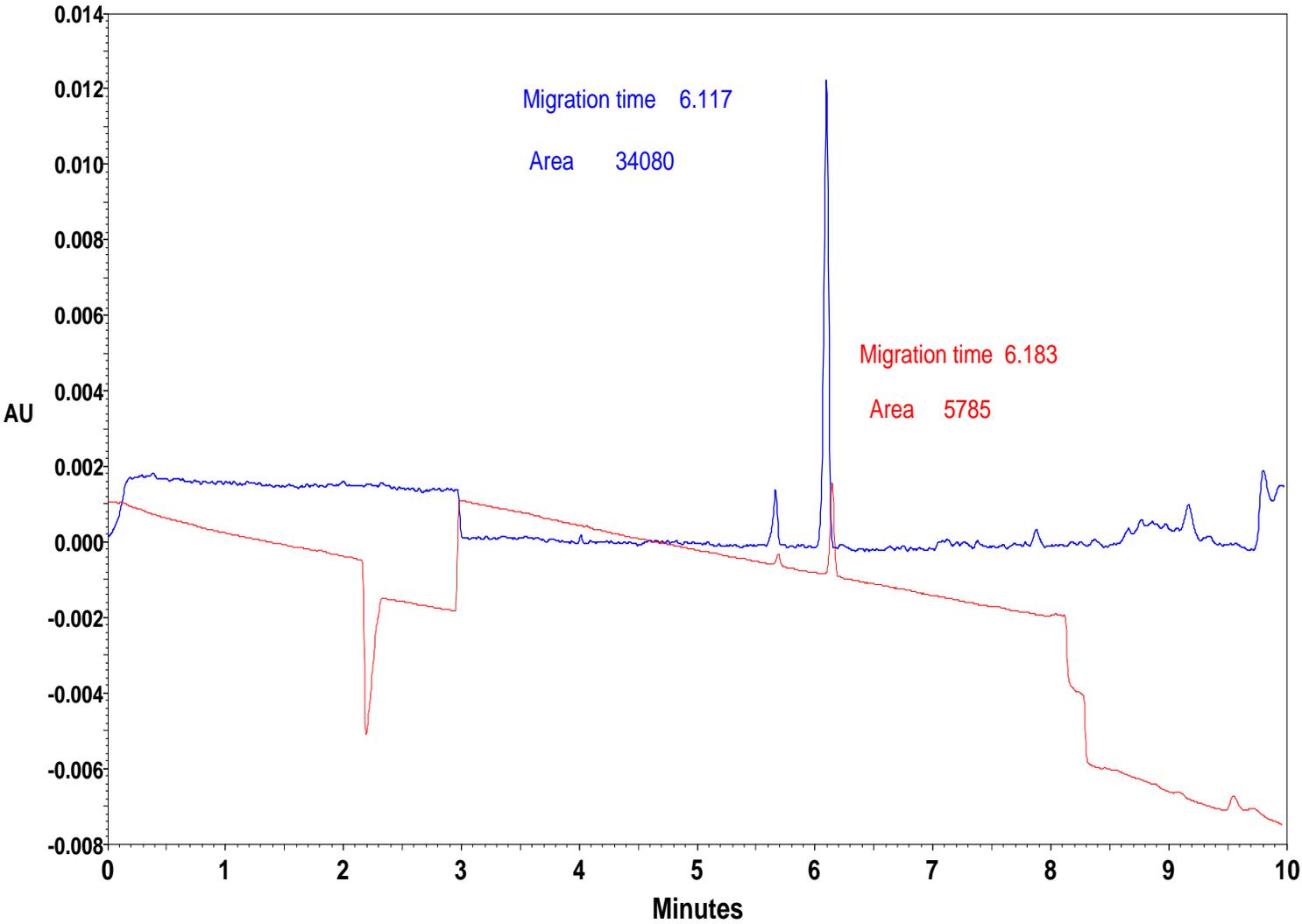
Enfamil 5ppm



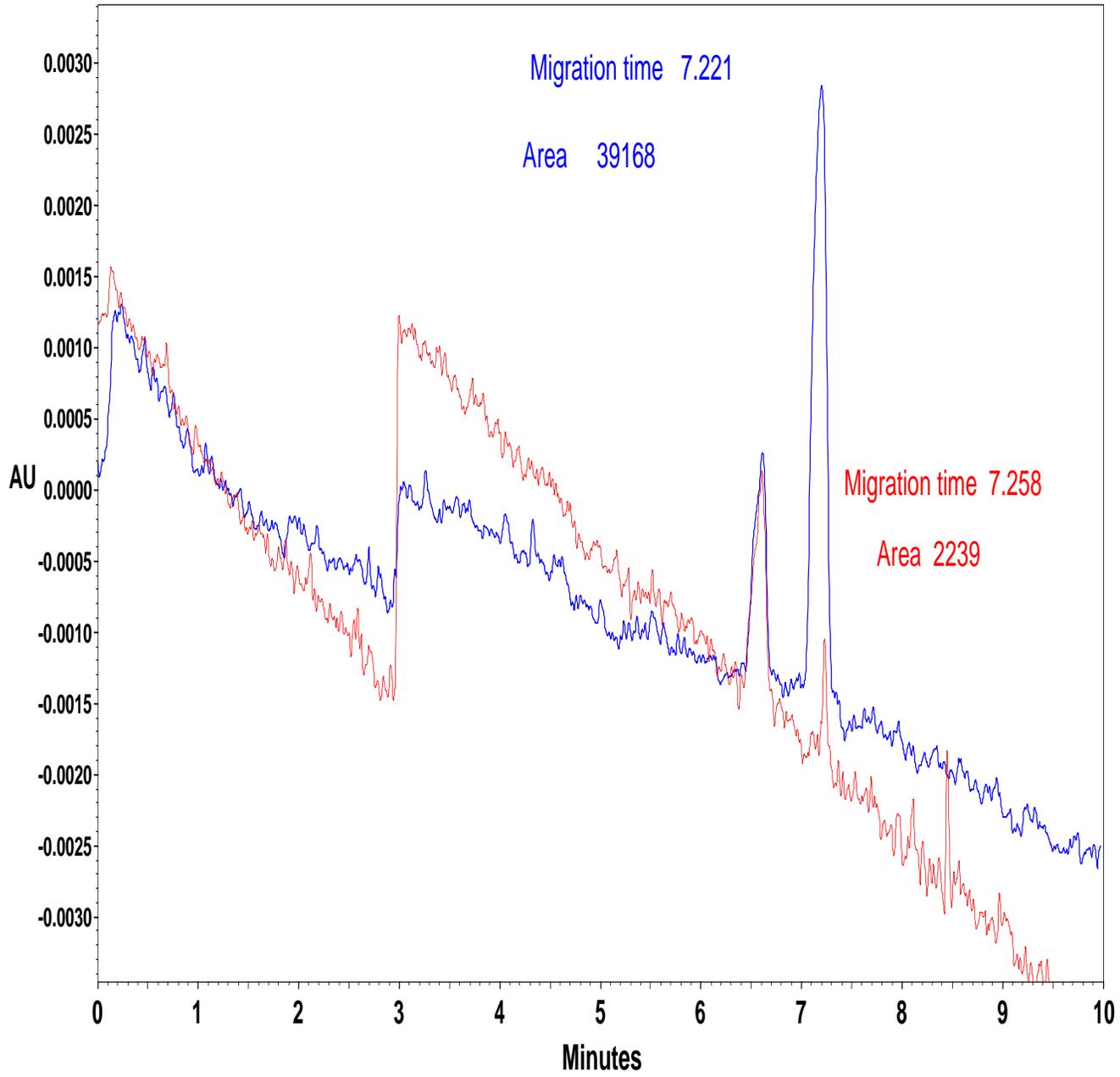
Leche sello rojo



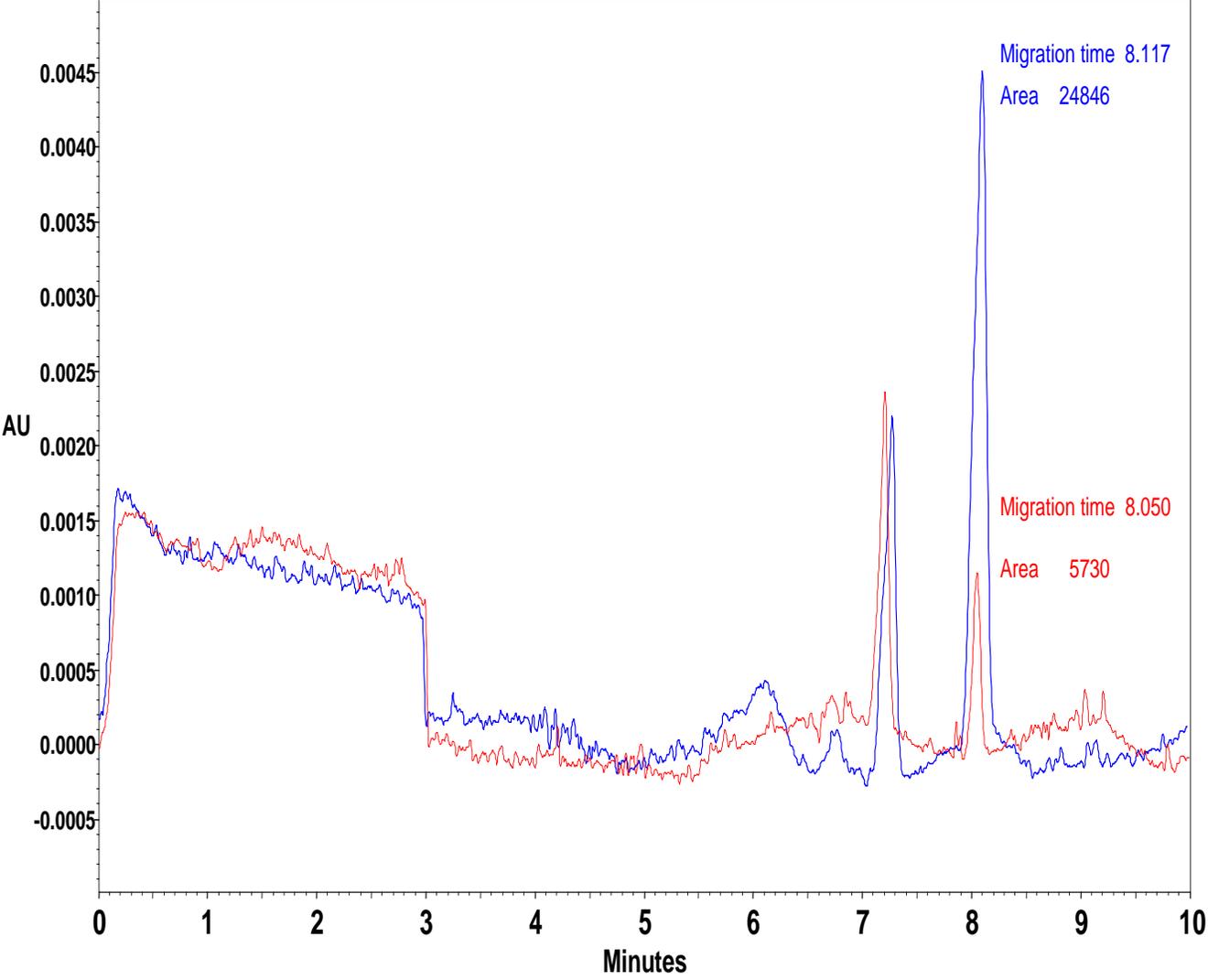
Leche nido en polvo



Enfagrow



Nutrileche en polvo



10. ANEXO II. Fórmulas para cálculo de parámetros estadísticos

FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA PRECISIÓN DEL SISTEMA.

A) FÓRMULAS:

Media Aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \frac{\sqrt{n(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}{n(n-1)}$$

Coefficiente de variación

$$C.V = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO:

Tabular los resultados

Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.

Calcular \bar{y} y S

Calcular el CV

ANEXO 2. FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

A) FÓRMULAS:

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n - 2}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2 \cdot n \sum y^2 - (\sum y)^2}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC \beta_1 = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S b_1$$

$$S b_1 = S_{y/x} \frac{1}{\sqrt{x^2 - \frac{x^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \frac{y^2 - b_1 xy - b_0 y}{n-2}$$

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO:

Tabular los resultados

Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$, y determinar n.

Calcular b_1 , b_0 , r^2

Calcular el $S_{y/x}$ y $S b_1$

Determinar $t_{0.975, n-2}$, tablas de t de student y calcular $IC(\beta_1)$

Anexo 3 FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

A) FÓRMULAS:

Media Aritmética

$$y = \frac{y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \frac{\sqrt{n(y^2 - y)^2}}{n(n-1)}$$

Coficiente de variación

$$C.V = \frac{S}{y} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = y \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{n}$$

n = número de recobros.

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO:

Tabular los resultados

Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.

Calcular \hat{y} y S

Calcular el CV

Determinar $IC(\mu)$ $t_{0.975, n-1}$, tablas de t de student y calcular $IC(\mu)$

Anexo 4 FÓRMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.

CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA

A) FÓRMULAS:

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n - 2}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2 \cdot \frac{\sum y^2 - (\sum y)^2}{n}}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC \beta_1 = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC \beta_0 = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

Media aritmética

$$x_{med} = \frac{\sum x}{n}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} = \frac{1}{n} + \frac{x_{med}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Coefficiente de variación de regresión

$$y_{med} = \frac{\sum y}{n}$$

$$C.V._{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y_{med}} * 100$$

Media aritmética

$$y_{med} = \frac{\sum y}{n}$$