

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC-DAD) PARA
LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE DROGAS
VETERINARIAS EN CARNE BOVINA**

LAURA PATRICIA PLATA PAREDES



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC-DAD) PARA
LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE DROGAS
VETERINARIAS EN CARNE BOVINA**

LAURA PATRICIA PLATA PAREDES

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Química**

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

Dedicatoria

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad, sabiduría y amor.

A mis padres, Juan José y Elena, por todo su cariño y amor; son las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi hermano, Juan Javier, por ser esa persona importante en mi vida, que siempre está lista para brindarme todo su apoyo, sabiduría y buenos consejos, gracias por la confianza que siempre me has tenido.

A Carlos Alberto, por tu paciencia, comprensión y apoyo incondicional en cada momento.

A mi tía Esther, a mis primos Juan Pablo, Cesar, Diana María, y demás familiares, un sentimiento de gratitud para todos, quienes de una u otra manera me brindaron apoyo y aliento para continuar con mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena y al Dr. Jairo René, por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

A William Salgar, Deyanira Caballero, por su colaboración, aportes y dedicación en la realización del proyecto.

A Andrés González, por compartir su conocimiento, sus enseñanzas, consejos y dedicación.

A mis amigos del Laboratorio de Cromatografía Gustavo, Giohanna y Jesica que estuvieron guiándome y animándome durante este proceso. A Oscar Morales, por sus consejos y su paciencia, a Corina, Silvia, Yuri, Erika, Eduard, Mayra, Freys, Julián, Marce, Luis y demás compañeros con los que compartí esta grandiosa experiencia.

A mis amigos de carrera Nanna, Jefer, Jorge, Jorgito; Silvia, Aleja, Julieth, Eliza, los bonitos F.C. y con los que compartí risas y tristezas en esta etapa de mi vida, momentos inolvidables que nunca se borrarán de mi memoria.

A mis padres, hermano, mi tía y primos, a los cuales les debo todo lo que soy, a mi novio Carlos, por la paciencia, el apoyo incondicional y alegrar mis días. Gracias por la confianza y la motivación que me brindaron, por contribuir en mi formación como persona, y desarrollo como profesional.

Laura Patricia Plata Paredes

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. ESTADO DEL ARTE	20
1.1 CARNE	20
1.1.1 Estructura	20
1.1.2 Composición química	21
1.2 DROGAS VETERINARIAS	22
1.2.1 Medicamento veterinario	22
1.2.2 Límite máximo de residuo de medicamento veterinario (LMRMV)	22
1.3 GRUPOS Y PROPIEDADES	24
1.3.1 Antibióticos	24
2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	27
2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	27
3. MARCO DE ANTECEDENTES	31
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	37
4.1 MATERIALES Y REACTIVOS	37
4.1.1 Reactivos y solventes	37
4.1.2 Material del laboratorio	38
4.1.3 Materiales QuEChERS	38
4.1.4 Materiales de referencia certificados	39
4.1.5 Material cárnico	39
4.2 ETAPAS DEL PROYECTO	39
4.2.1 Extracción y <i>CLEAN UP</i> de los medicamentos veterinarios	40
4.2.2 Implementación de la metodología de análisis de drogas veterinarias por HPLC-DAD	46
4.2.3 Determinación y cuantificación de los medicamentos veterinarios	47

5. DETERMINACIÓN DE DROGAS VETERINARIAS; TETRACICLINAS Y CLORANFENICOL: ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
5.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO	49
5.1.1 Selección de la fase móvil	49
5.1.2 Selección de la longitud de onda	53
5.1.3 Parámetros de eficiencia de separación	63
6. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC	65
6.1 EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA TIEMPOS DE RETENCIÓN (T_R) Y ÁREAS.	65
6.2 EVALUACIÓN DEL RDL Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	66
6.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN (NMD) Y CUANTIFICACIÓN (NMC).	67
6.4 EXACTITUD DEL MÉTODO	68
6.5 DETERMINACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LA EXTRACCIÓN.	70
7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura y masa molecular del cloranfenicol.	24
Figura 2. Estructuras y propiedades de las tetraciclinas. a. Estructura de la tetraciclina, b. Estructura de la oxitetraciclina.	26
Figura 3. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent Technologies 1200 Series</i> . Imagen tomada por la autora: Laura Patricia Plata, fecha: 02/09/2013. Tomada en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS.	29
Figura 4. Número de publicaciones sobre drogas veterinarias en carne bovina, según años de publicación. a. Fuente: base de datos <i>Web of Science</i> . Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: <i>Topic=(veterinary drug*) AND Topic=(cattle)</i> . b. Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: <i>TITLE-ABS-KEY (ALL (veterinary drug*) AND ALL (cattle))</i> .	32
Figura 5. Número de publicaciones sobre drogas veterinarias en carne bovina, según áreas de aplicación. a. Fuente: base de datos <i>Web of Science</i> . Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: <i>Topic =(veterinary drug*) AND Topic=(cattle)</i> . b. Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: <i>TITLE-ABS-KEY (ALL (veterinary drug*) AND ALL (cattle))</i> .	33
Figura 6. Número de publicaciones sobre el método <i>QuEChERS</i> . Fuente: base de datos <i>Scopus</i> . Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: <i>TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)</i> .	34

Figura 7. Número de registros sobre el método *QuEChERS* en drogas veterinarias, según áreas de aplicación. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*.

35

Figura 8. Número de publicaciones sobre el método *QuEChERS* en drogas veterinarias, según países con publicación. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*.

36

Figura 9. Diagrama general de las etapas del proyecto

40

Figura 10. Procedimiento de homogeneización de la muestra de carne bovina.

41

Figura 11. Cámara de liofilización (Virtis Advantage Plus Freeze Dryers), modelo Advantage ES-53; muestra liofilizada.

41

Figura 12. Equipo para extracción en fase sólida, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Philipsburg, NJ, EE.UU)

44

Figura 13 Procedimiento de extracción *QuEChERS* para drogas veterinarias en muestras de carne bovina.

45

Figura 14. Procedimiento de dispersión y *clean up QuEChERS* para drogas veterinarias en muestras de carne bovina.

46

Figura 15. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*. Imagen tomada por la autora: Laura Patricia Plata Paredes, fecha: 02/09/2013. Tomada en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS.

47

Figura 16. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados utilizando las fases móviles de la Tabla 9, columna *Kinetex C8* de 5 μ m, con dimensiones de 250x4,6 mm, solución *stock* de oxitetraciclina y tetraciclina de 25 mg/kg.

50

Figura 17. Cromatograma obtenido del ensayo realizado utilizando la fase móvil de la Tabla 10, columna *Kinetex C8* de 5 μ m, con dimensiones de 250x4,6 mm, solución *stock* de cloranfenicol de 1000 mg/kg.

51

- Figura 18. Cromatograma obtenido del ensayo realizado utilizando el programa de gradiente de la Tabla 11 fase A: ácido fórmico 0.1% a.c; fase B: 20% isopropanol en ácido fórmico 0.1% a.c, columna *Kinetex* C18 de 2,6 μm , con dimensiones de 100x4,6 mm, solución *stock* de sulfonamidas de 1 mg/kg. 52
- Figura 19. Espectros ultravioleta-visible de a. tetraciclinas, b. cloranfenicol y c. sulfonamidas, obtenidos con el detector de arreglo de diodos en el cromatógrafo HPLC 1200 utilizado para estos análisis. 53
- Figura 20. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1200 Series, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies* G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* G1328B y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B., de una solución de 25 mg/kg de a. oxitetraciclina y b. tetraciclina, en metanol. Columna *Kinetex* C8 [250 m x 4,6 mm x 5 μm]. 55
- Figura 21. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1200 Series, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies* G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* G1328B y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B., de una solución de 1000 mg/kg de cloranfenicol en acetonitrilo. Columna *Kinetex* C8 [250 m x 4,6 mm x 5 μm]. 56
- Figura 22. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1200 Series, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies* G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* G1328B y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B., de una solución de 1 mg/kg de sulfonamidas en acetonitrilo. De derecha a izquierda se ilustran: SQX, SDM, SDX, SMX, SPY y SDZ. Columna *Kinetex* C18 [100 m x 4,6 mm x 2,6 μm]. 57
- Figura 23. Curvas de calibración de a. tetraciclina, b. oxitetraciclina, c. cloranfenicol y sulfonamidas (.d. SDZ, e. SMX, f. SDX, g. SDM, y h. SQX). 59
- Tabla 20. Ecuación de la curva de calibración, coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidas en la determinación de

las familias de antibióticos por separado, a partir de la curva de calibración (0,5 – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cloranfenicol, 25-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclinas y 50 – 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sulfonamidas), por HPLC.

67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sustancias farmacológicamente activas y sus límites máximos como residuos en alimentos de origen animal, destinados al consumo humano	23
Tabla 2. Sustancias farmacológicamente activas prohibidas según resolución N° 37/2010 de la UE ^[3] .	23
Tabla 3. Estructuras y propiedades de las sulfonamidas.	25
Tabla 4. Condiciones cromatográficas reportadas en los métodos referenciados de las principales familias de antibióticos.	30
Tabla 5. Reactivos y solventes utilizados en la implementación del método de drogas veterinarias.	37
Tabla 6. Especificaciones técnicas del material del método <i>QuEChERS</i> .	38
Tabla 7. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.	39
Tabla 8. Rangos de concentraciones utilizadas para el análisis de los antibióticos.	48
Tabla 9. Composiciones de la fase móvil examinadas para la determinación de tetraciclinas	49
Tabla 10. Composición de la fase móvil examinada para la determinación de cloranfenicol	51
Tabla 11. Composición de la fase móvil examinada para la determinación de sulfonamidas.	52
Tabla 12. Longitud de onda seleccionada para la detección de los antibióticos analizados.	54
Tabla 13. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas por HPLC/DAD.	54
Tabla 14. Datos para las curvas de calibración de las tetraciclinas y cloranfenicol.	58

Tabla 15. Datos para las curvas de calibración de las sulfonamidas	58
Tabla 16. Parámetros de eficiencia de la separación para las tetraciclinas.	63
Tabla 17. Parámetros de eficiencia de la separación para las sulfonamidas	64
Tabla 18. Tiempo de retención de los medicamentos veterinarios.	65
Tabla 19. Áreas obtenidas para los medicamentos veterinarios.	66
Tabla 20. Ecuación de la curva de calibración, coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidas en la determinación de las familias de antibióticos por separado, a partir de la curva de calibración (0,5 – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cloranfenicol, 25-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclinas y 50 – 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sulfonamidas), por HPLC.	67
Tabla 21. Niveles mínimos de detección y de cuantificación de los antibióticos estudiados.	68
Tabla 22. Porcentaje de recuperación de los métodos normalizados de cada familia de antibióticos adicionada a dos muestras de carne bovina sin antibióticos	69
Tabla 23. Porcentaje de recuperación del método <i>QuEChERS</i> para cada familia de antibióticos adicionada a dos muestras de carne bovina sin antibióticos.	69
Tabla 24. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de carne bovina enriquecida y extraída por los métodos normalizados.	71
Tabla 25. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de carne enriquecida y extraída por el método <i>QuEChERS</i> .	71

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC-DAD/UV) PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE DROGAS VETERINARIAS EN CARNE BOVINA

AUTOR: PLATA PAREDES, Laura Patricia**

PALABRAS CLAVES: drogas veterinarias, carne bovina, *QuEChERS*, HPLC.

Los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad, y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, originando desordenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas, toxicidad y efectos mutagénicos y carcinogénicos, entre otros. Por ello, la importancia de monitorear los residuos de drogas veterinarias empleando técnicas instrumentales analíticas confiables y rápidas como cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Con el fin de cumplir los requerimientos de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV), establecidos por los entes reguladores nacionales e internacionales.

En este trabajo de investigación, se implementaron metodologías normalizadas específicas para cada familia de medicamentos veterinarios, y método *QuEChERS* para el procedimiento de extracción, la metodología de análisis se realizó por separado cada familia por HPLC-DAD para matrices cárnicas bovinas de las drogas veterinarias: cloranfenicol, tetraciclinas y sulfonamidas.

Las técnicas se caracterizaron por medio de la determinación de las figuras analíticas de mérito de cada metodología: especificidad, exactitud, precisión, nivel mínimo de detección, nivel mínimo de cuantificación, rango dinámico lineal y estabilidad. Según las figuras analíticas de mérito obtenidas, los procedimientos de extracción normalizados presentaron mejores resultados en todos los parámetros, frente a los resultados adquiridos por parte de las extracciones con el método *QuEChERS*; cumpliendo con los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios de los sistemas empleados de regulación.

Los resultados de esta investigación pretenden ser una base para próximos análisis y programas de control de drogas veterinarias en carne bovina.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena Stashenko y Jairo Martínez

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD (HPLC-DAD/UV) FOR THE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN BOVINE MEAT*

AUTHOR: PLATA PAREDES, Laura Patricia**

KEYWORDS: veterinary drugs, beef, *QuEChERS*, HPLC.

Veterinary medicine residues in the food of animal origin generate products of low quality, and constitute a risk for the health of the consumers, originating disorders in the corporal development, allergic reactions, toxicity and mutagenic and carcinogenic effects, among others. For it, the importance of monitoring the residues of veterinary drugs using reliable and rapid technologies instrumental analytical as high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC - DAD). In order to fulfill the requirements of maximum limits of residues of veterinary medicines (LMRMV), set by the regulatory national and international agencies.

In this research, there were implemented normalized specific methodologies for every family of veterinary medicines, and method *QuEChERS* for the procedure of extraction, the methodology of analysis realized separately for each family by HPLC - DAD for beef matrix of the veterinary drugs: chloramphenicol, tetracycline and sulfonamides.

The skills were characterized by means of the determination of the analytical figures of merit for every methodology: specificity, accuracy, precision, minimal level of detection, minimal level of quantification, dynamic linear range and stability. According with obtained results, extraction normalized procedures results were better in each parameter, opposite to the results obtained in extractions with *QuEChERS* method, fulfilling with maximum limits of residues for veterinary medicines of the systems used of regulation.

The result of this research could be a basis for future analysis and control programs for veterinary drugs in beef.

* Graduation Project

** Science Faculty, School of Chemistry, Directors, Elena Stashenko and Jairo Martinez

INTRODUCCIÓN

En la producción de animales de abasto, se utiliza una gran variedad de productos veterinarios con fines terapéuticos, zootécnicos o como promotores del crecimiento. Sin embargo, el uso de estas sustancias debe estar reglamentado para preservar la salud del consumidor y la calidad final del alimento, debido a que la mayoría de estos productos permanecen como residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados ^[1]. El objetivo principal de la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos, es monitorear la presencia del principio activo en su forma original o de sus metabolitos, usando técnicas instrumentales confiables.

Las drogas veterinarias son herramientas importantes para la producción de alimentos cárnicos. Pero el uso incorrecto de medicamentos en el tratamiento de animales da como resultado la contaminación del producto alimenticio, con niveles altos de residuos de medicamentos, lo que genera productos de baja calidad, que constituyen un riesgo para la salud de los consumidores. Estos pueden producir toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, alteraciones en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros. Estos efectos han hecho que organizaciones internacionales regulen los residuos de medicamentos veterinarios potencialmente peligrosos para la salud ^[2].

A nivel internacional, las restricciones del uso de medicamentos veterinarios se implementaron desde 1985, con la prohibición de la producción e importación de carne y productos derivados de animales que no cumplieran con los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios ^[3]. A pesar de la antigüedad de estas prohibiciones, éstas se empezaron a implementar en Colombia desde hace poco. Debido a la situación económica y comercial creciente, se ha prestado

atención a esta problemática sanitaria y se han adoptado medidas para reconocer los niveles residuales de drogas veterinarias y demás sustancias en productos de origen animal producidos en el país; con ello, se intenta lograr mayor competitividad de los productos pecuarios en los mercados internacionales ^[4].

El Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), en su rol como entidad responsable de la vigilancia y control de calidad de los productos de exportación, ha establecido requisitos a los productores de bovinos, ovinos, caprinos y bubalinos, que en caso de exportación deben obedecer estándares internacionales que requieran los países importadores ^[5,6]. En Colombia, no existe una metodología para la determinación simultánea de los residuos de medicamentos más suministrados a los bovinos y su respectiva cuantificación ^[7].

El uso de productos veterinarios juega un rol importante en el control y prevención de las enfermedades de los hatos de ganado. Actualmente, se ha incrementado la oferta de los medicamentos veterinarios que se expenden en los almacenes agro-veterinarios. Esto replantea la necesidad de controlar su uso adecuado en los hatos ganaderos para garantizar la salud animal y pública.

Teniendo en cuenta los Tratados de Libre Comercio (TLC), recientemente firmados por Colombia, el país requiere una mayor internacionalización de su economía en condiciones competitivas con el propósito de fortalecer la comercialización de productos o servicios. Se ha detectado, que el comercio de los productos del sector primario, como son la agricultura, la minería, la ganadería, la silvicultura entre otros, y todos los productos derivados de las anteriores actividades, requiere que se identifiquen y cuantifiquen diferentes elementos, que podrían llegar a afectar la confiabilidad y la calidad del producto. Estos análisis deben ser realizados en productos tanto de importación como de exportación, con resultados confiables y rápidos, con el fin de lograr competitividad a nivel internacional.

Por lo anterior, en el presente proyecto se desarrollaron los métodos analíticos para la determinación de las drogas veterinarias: cloranfenicol, sulfonamidas y tetraciclinas. Se analizaron muestras de carne (músculo) recolectadas aleatoriamente del mercado local, para la determinación de estas sustancias por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 CARNE

La carne es la parte comestible de los animales, proveniente principalmente del ganado bovino, aceptable para el consumo humano; es catalogada como uno de los productos primarios, al igual que la leche y el huevo ^[1].

1.1.1 Estructura

1.1.1.1 Tejidos: Las carnes están formadas básicamente por dos tipos de tejidos: el tejido muscular y el tejido conectivo. Los tejidos óseos y adiposos se consideran formas especializadas de tejido conectivo ^[1].

El tejido muscular representa el 30-40% del peso, *in vivo*, de la res. Este tejido está formado en su mayor parte, por músculos estriados voluntarios, y, en menor cantidad, por músculos lisos involuntarios como son el corazón, el tracto intestinal y glándulas como el hígado y el riñón ^[1]. Mientras que, el tejido conectivo está constituido básicamente por dos tipos de fibras: unas blancas y colaginosas, compuestas principalmente por colágeno, y otras amarillas elásticas, compuestas especialmente por elastina ^[1].

Por otra parte, el tejido adiposo es considerado por algunos, como una forma muy especializada de tejido conectivo. Aparece tarde en el desarrollo del organismo, solamente después de que los nutrientes disponibles exceden las cantidades necesarias para la formación de órganos ^[1]. Los depósitos de grasa cubren órganos, separan músculos y se acumulan vetas dentro de los músculos que mejoran el sabor de la carne y contribuye a configurar su terneza y jugosidad; sirven como tejidos de soporte, elásticos a la presión, aislantes, de relleno, y como

material estructural. Cuando la grasa se presenta como parte constitutiva del músculo, se le denomina grasa intramuscular; cuando se presenta separando músculos, se le denomina grasa intermuscular ^[1].

1.1.2 Composición química

1.1.2.1 Las carnes: Las carnes obtenidas después de la operación de corte de la carcasa o canal animal, están constituidas además del tejido muscular, por cantidades muy variables de grasa intermuscular o “visible”. Según la composición de alimentos colombianos las carnes se dividen según su contenido de grasa en: carne magra (contenido de grasa menor del 14 %); carne semi-gorda (contenido de grasa entre el 14 y 20 %), carne gorda (contenido de grasa entre el 20 y 30 %), carne muy gorda (contenido de grasa superior al 30 %) ^[8]. Los componentes, que presentan mayores variaciones son el agua y la grasa, que muestran entre sí una relación inversa, es decir, las carnes más gordas presentan los niveles más bajos del agua.

1.1.2.2 El músculo: Los componentes mayoritarios son: el agua (75% del músculo) y glucógeno (carbohidrato más abundante del músculo). Las proteínas son los componentes sólidos más importantes y tienen una abundancia del 19% en el músculo y se han clasificado en tres grupos, miofibriales (miosina y actina), sarcoplásmicas (enzimas de la glicólisis y la mioglobina) y proteínas del tejido conectivo (colágeno, elastina y enzimas insolubles (mitocondriales)). Los lípidos son grasa intramuscular, éstos incluyen además de los triglicéridos, otros compuestos como fosfolípidos, ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linoleico, en mayor cantidad) y otras sustancias derivadas solubles en grasa ^[1].

Las carnes son una excelente fuente de vitaminas del complejo B; son fuentes muy pobres de vitamina A, ácido ascórbico y vitaminas D, E y K; contienen una amplia cantidad de enzimas; todos éstos son los componentes minoritarios del músculo ^[1].

1.2 DROGAS VETERINARIAS

1.2.1 Medicamento veterinario. Sustancias que se administran a cualquier especie animal con fines de prevención o tratamiento de las enfermedades o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento ^[9]. Dentro de estas, figuran las destinadas a la producción de alimentos, como los bovinos, ovinos, porcinos, aves, peces y abejas.

1.2.2 Límite máximo de residuo de medicamento veterinario (LMRMV). Concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso fresco) que se permite legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo ^[10].

Este límite se basa en el tipo y la cantidad de residuos considerados como carentes de todo riesgo toxicológico para la salud humana, tal como se expresan en la Ingestión Diaria Admisible (IDA) o sobre la base de una dieta temporal que utiliza un factor de inocuidad adicional. También, tiene en cuenta otros riesgos pertinentes para la salud pública, así como aspectos tecnológicos de la producción de alimentos ^[10].

Varios organismos mundiales han establecido los límites máximos de residuos de algunas sustancias que son implementadas para la prevención y desinfección de alimentos destinados al consumo humano como el ganado, que debe cumplir un LMR en su tejido muscular.

En la **Tabla 1**, se mencionan los límites máximos de residuos de sustancias farmacológicamente activas en el tejido muscular de bovinos; estos datos provienen de entes reguladores como el *Codex Alimentarius*, la (UE) No. 37/2010, y el Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia (Resolución 1382 de 2013) y corresponden a antibióticos y hormonas que hacen parte del alcance de este proyecto.

Tabla 1. Sustancias farmacológicamente activas y sus límites máximos como residuos en alimentos de origen animal, destinados al consumo humano

Antibiótico	Ingestión Diaria Admisible (IDA) (µg/kg peso corporal)*	LMRMV (µg/kg peso corporal)		
		<i>Codex Alimentarius</i> [11]	Ministerio de Salud y Protección Social ^[6]	(UE) N° 37/2010 [4]
Tetraciclinas	0-30	200	200	100
Sulfonamidas	-	-	-	100

*Registros según la JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)

La Unión Europea, en su rol de ente regulador, ha prohibido el uso de un número considerable de sustancias farmacológicamente activas, para las cuales no se ha logrado establecer un límite máximo que sea seguro para el consumidor, incluido el cloranfenicol, que hace parte del alcance de este proyecto ^[3] (véase **Tabla 2**).

Tabla 2. Sustancias farmacológicamente activas prohibidas según resolución N° 37/2010 de la UE ^[3].

Sustancias farmacológicamente activas (prohibidas)
<i>Aristolochia spp.</i> y sus formulaciones
Cloranfenicol
Cloroformo
Clorpromacina
Colchicina
Dapsona

**Sustancias farmacológicamente activas
(prohibidas)**

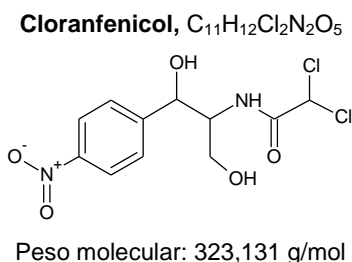
Dimetridazol
Metronidazol
Nitrofuranos (incluida la furazolidona)
Ronidazol

1.3 GRUPOS Y PROPIEDADES

1.3.1 Antibióticos. La clasificación de los antibióticos se basa en la acción de inhibición del microorganismo específico involucrado ^[12]. A continuación, se describen algunas características y/o propiedades de los antibióticos en estudio.

1.3.1.1 Fenicoles: El cloranfenicol fue el primer antibiótico desarrollado. Demuestra un efecto bacteriano dependiente del tiempo y es bacteriostático para la mayoría de bacterias. El cloranfenicol provoca dos formas distintas de toxicidad en los seres humanos, debido a la fracción de *p*-nitro del cloranfenicol, que induce la anemia aplásica ^[12,18] (véase **Figura 1**).

Figura 1. Estructura y masa molecular del cloranfenicol.

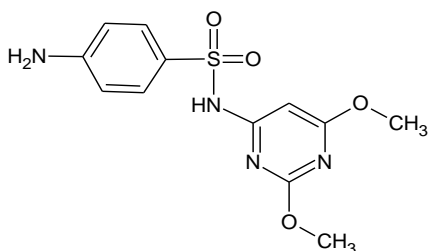


1.3.1.2 Sulfonamidas: Las sulfonamidas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos eficaces para ser empleados sistémicamente para la prevención y cura de infecciones bacterianas en los seres humanos. La clase sulfonamida contiene un gran número de fármacos antibacterianos, incluyendo sulfadiazina, sulfametazina (sulfadimidina), sulfatiazol, sulfametoxazol, y muchos

más. Son relativamente pocas las sulfonamidas que actualmente están aprobadas para su uso en animales productores de alimentos. Esto se atribuye a numerosos factores, incluyendo preocupaciones toxicológicas asociadas con algunas sulfonamidas y la falta de datos contemporáneos para apoyar los usos históricos de otras sulfonamidas^[12,18] (véase **Tabla 3**).

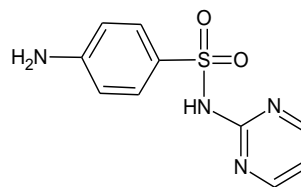
Tabla 3. Estructuras y propiedades de las sulfonamidas.

Sulfadimetoxina, (SDM), C₁₂H₁₄N₄O₄S



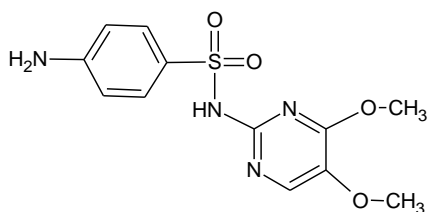
Propiedades: Peso molecular: 310,3 g/mol; CAS: 122-11-2; pKa: HA 6.7; HB⁺ 2.0

Sulfadiazina, (SDZ), C₁₀H₁₀N₄O₂S



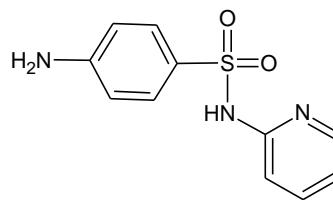
Propiedades: Peso molecular: 250,3 g/mol; CAS: 68-35-9; pKa: 6.5

Sulfadoxina, (SDX), C₁₂H₁₄N₄O₄S



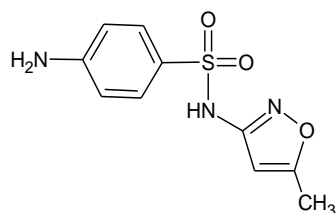
Propiedades: Peso molecular: 310,3 g/mol; CAS: 2447-57-6; pKa: N/A

Sulfapiridina, (SPY), C₁₁H₁₁N₃O₂S₂



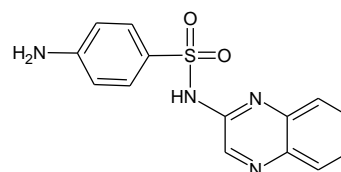
Propiedades: Peso molecular: 249,3 g/mol; CAS: 144-83-9; pKa: HB⁺ 1,0; HB⁺ 2,6; HA 8,4

Sulfametoxazol, (SMX), C₁₀H₁₁N₃O₃S



Propiedades: Peso molecular: 253,2 g/mol; CAS: 723-46-6; pKa: HA⁻ 5.6

Sulfaquinoxalina, (SQX), C₁₄H₁₂N₄O₂S

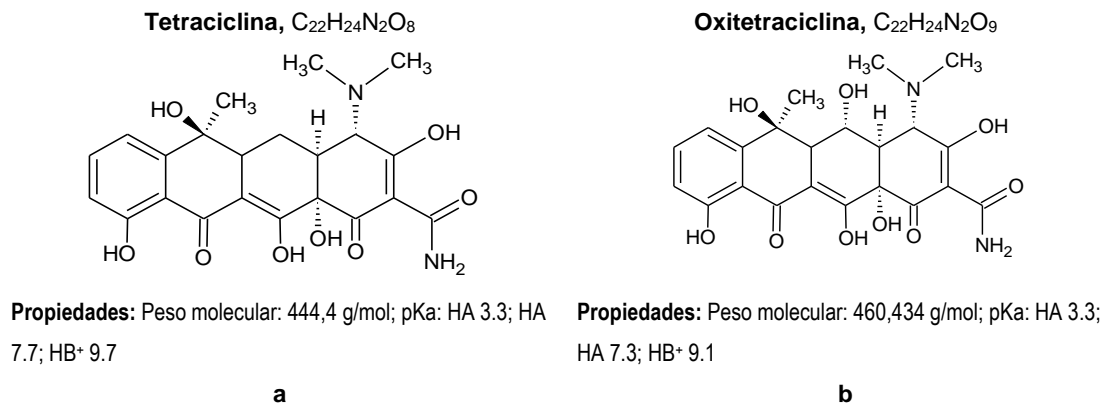


Propiedades: Peso molecular: 300,3 g/mol; CAS: 59-40-5

1.3.1.3 Tetraciclinas: Las tetraciclinas son utilizadas en tratamientos de neumonías, enteritis, conjuntivitis, artritis, metritis, onfalitis, leptospirosis, actinobacilosis, anaplasmosis, mastitis, infecciones en general, para el control de enfermedades infecciosas que afectan a bovinos, ovinos, caprinos y porcinos ^[12].

La administración de tetraciclina causa sobre-crecimiento de organismos no susceptibles de varias especies de animales, puede provocar colitis y diarrea severa. Cuando las tetraciclinas son administradas al final del embarazo o durante el periodo de desarrollo de los dientes puede suceder la decoloración de los dientes en animales jóvenes y en humanos ^[12,18] (véase **Figura 2**).

Figura 2. Estructuras y propiedades de las tetraciclinas. a. Estructura de la tetraciclina, b. Estructura de la oxitetraciclina.



2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

2.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

HPLC es una de las técnicas más empleadas en los laboratorios analíticos, debido a que es una técnica que permite el análisis de una gran variedad de moléculas orgánicas, de altos pesos moleculares y altos puntos de ebullición, a veces termolábiles, que pueden o no ser analizadas por cromatografía en fase gaseosa, o que para ello requieren procesos adicionales como la derivatización.

La fase estacionaria más utilizada está compuesta de sílice a la cual se une el grupo octadecilsiloxano (ODS). Si ésta es menos polar que la fase móvil, la técnica se llama en fase reversa. El orden de elución de los analitos será del más polar al menos polar. La otra modalidad de cromatografía líquida es en fase normal, que consiste en una fase estacionaria más polar que los solventes de elución, ampliamente utilizada en el análisis de hidrocarburos poliaromáticos (PAH), vitaminas liposolubles, entre otros ^[13]. En cuanto a la detección de los analitos, los detectores utilizados en HPLC deben ser dispositivos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (fase móvil) y un sólido (analitos disueltos). Uno de los detectores más utilizado es el DAD UV-Vis. Este tipo de detector mide la absorbancia del analito. Además, posee buena sensibilidad y rango lineal, que permiten detectar analitos en el orden de los nanogramos y en amplio rango de concentraciones. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes; permite trabajar en el rango de longitudes de onda entre 200-600 nm, y obtener tanto el respectivo cromatograma, como el espectro UV-Vis de cada uno de los picos observados en el cromatograma. ^[14].

Los solventes por excelencia más usados en cromatografía líquida, como fase móvil, son acetonitrilo, metanol, agua, tetrahidrofurano (THF), entre otros. La separación de una mezcla de sustancias de diferente pK se logra mediante alguna de estas fases móviles o sus combinaciones. Si el método cromatográfico emplea uno o más solventes cuya composición de la mezcla se mantiene constante durante el tiempo de análisis, se denomina una operación isocrática. Por el contrario, al modificar en algún instante de la operación dicha mezcla de solventes, el método es una elución con gradiente. Análogamente, a la cromatografía de gases, en donde la temperatura determina la separación en columnas apolares, la variación de la composición de la fase móvil durante el desarrollo del método, es uno de los parámetros que se aplica para aumentar la resolución del equipo.

Para el análisis cromatográfico se empleó un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (véase **Figura 3**), que consta de un desgasificador *Agilent Technologies* G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* G1328B y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B. Se utilizó el software *Agilent Chemstation* LC para el procesamiento de los datos. La columna empleada en la implementación de la identificación y cuantificación de los analitos, fueron *Kinetex* C8 de 5 μm , con dimensiones de 250x4,6 mm y la *Kinetex* C18 de 2,6 μm , con dimensiones de 100x4,6 mm.

Figura 3. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*. Imagen tomada por la autora: Laura Patricia Plata, fecha: 02/09/2013. Tomada en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS.



Condiciones cromatográficas

La selección de los parámetros cromatográficos fase móvil y longitud de onda, para las diferentes familias, se llevó a cabo mediante un barrido en el rango de 200 a 600 nm, según datos establecidos en las normativas de las principales familias de antibióticos reportadas en la **Tabla 4**. Su longitud de onda de trabajo en cromatografía líquida fue la que presentó mayor absorbancia. La elección de la fase móvil se realizó mediante pruebas, partiendo de los métodos de las principales familias de antibióticos (véase **Tabla 4**). Se utilizó una temperatura de 25 a 70 °C, según parámetros reportados en cada procedimiento de detección, flujo de 0,3 – 1,2 mL/min y un volumen de inyección de 10 a 60 μ L.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas reportadas en los métodos referenciados de las principales familias de antibióticos.

Analito	Fase móvil	λ [nm] Absorbancia
Cloranfenicol	Agua & Acetonitrilo	278
Tetraciclinas	Metanol : ACN:0,01M ácido oxálico en agua (15:20:65)	350
Sulfonamidas	Fase A: 0,1% ácido fórmico Fase B: 20% Isopropanol en 0,1% ácido fórmico	260

3. MARCO DE ANTECEDENTES

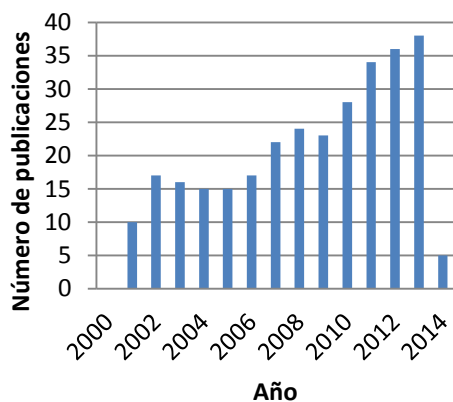
Con la finalidad de conocer la actividad científica sobre el análisis de residuos de drogas veterinarias en la carne de bovino, se realizó el análisis cuantitativo, usando algunas bases de datos disponibles en la Universidad Industrial de Santander, *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0.)* y *Scopus*.

Los artículos encontrados en la búsqueda y de importancia para la investigación son: *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review* ^[15]; *Liquid Chromatography for the Rapid Screening of Growth Promoters Residues in meat* ^[16]; *New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products* ^[17]. Las metodologías desarrolladas en estos trabajos de investigación se refieren al análisis de drogas veterinarias en grupos de familias, según su clasificación farmacológica, e.g., antibióticos. Por ende, el método a desarrollar en el presente trabajo de investigación aportará un avance en el análisis simultáneo de las sustancias más comercializadas en Bucaramanga, Santander (cloranfenicol y tetraciclinas), para ofrecer un respaldo técnico a los organismos de control nacionales en eventuales exportaciones del producto cárnico y, garantizar la seguridad alimentaria a los ciudadanos.

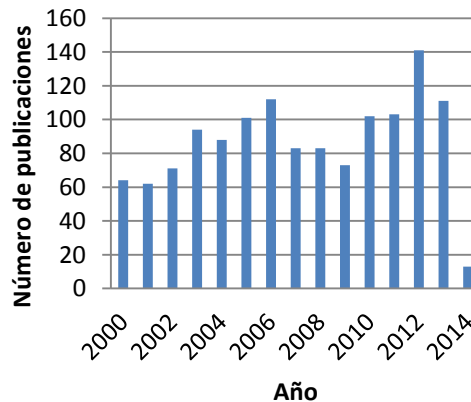
Para el análisis cuantitativo de drogas veterinarias en carne bovina, se utilizó la ecuación de búsqueda: *Topic=(veterinary drug*) AND Topic=(cattle)*., para la *Web of Science*, y *TITLE-ABS-KEY (ALL (veterinary drug*) AND ALL (meat cattle))*, para la *Scopus*.(véanse **Figuras 4 y 5**).

En las **Figuras 4 y 5**, se muestra la relación de publicaciones sobre drogas veterinarias en carne bovina en los últimos catorce años. La tendencia observada muestra el avance significativo de la pesquisa en el área, lo que evidencia el creciente interés por investigar lo relacionado con drogas veterinarias en productos de origen animal para consumo. Se encontró, que 2013 fue el año en que más se publicó sobre esta temática. EE.UU., Alemania y Canadá, son los países, donde se han realizado más estudios sobre el efecto de drogas veterinarias en el crecimiento y desarrollo de microorganismos y bacterias en diferentes familias promotoras de enfermedades en ganado bovino, especialmente, en las áreas de veterinaria, química agricultura y ciencias biológicas. Esto confirma la necesidad de impulsar los estudios sobre este tema en Colombia.

Figura 4. Número de publicaciones sobre drogas veterinarias en carne bovina, según años de publicación. a. Fuente: base de datos *Web of Science*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *Topic=(veterinary drug*) AND Topic=(cattle)*. b. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (ALL (veterinary drug*) AND ALL (cattle))*.

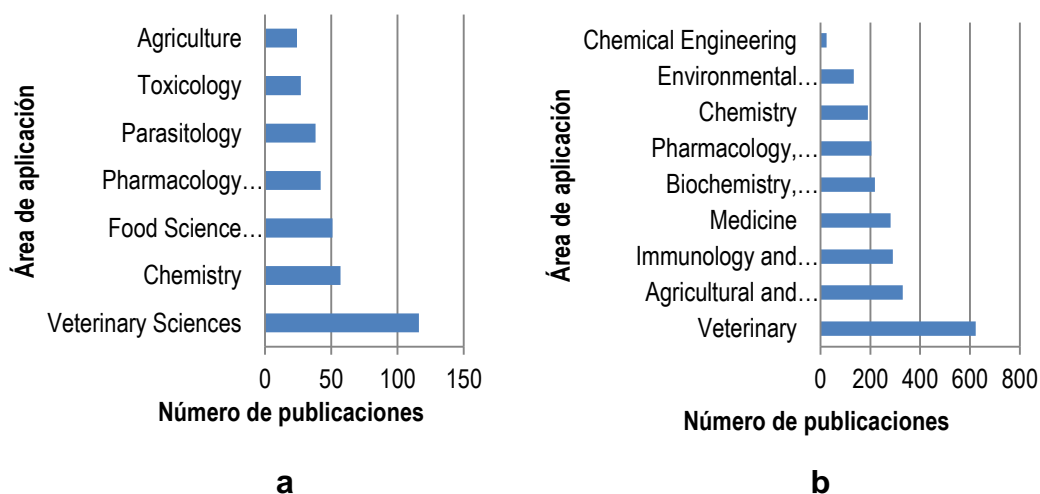


a



b

Figura 5. Número de publicaciones sobre drogas veterinarias en carne bovina, según áreas de aplicación. a. Fuente: base de datos *Web of Science*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *Topic =(veterinary drug*) AND Topic=(cattle)*. b. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (ALL (veterinary drug*) AND ALL (cattle))*.



Con el propósito de conocer la actividad de implementación del método *QuEChERS*^[21] sobre el análisis de residuos de drogas veterinarias en la carne de bovino, se realizó el análisis cuantitativo, usando la base de datos disponible en la Universidad Industrial de Santander, *Scopus*; se utilizó la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*, cuyos resultados se plasman en las **Figuras 6, 7 y 8**.

En las **Figuras 6, 7 y 8**, se muestra la relación de publicaciones sobre la implementación de la metodología *QuEChERS* en los últimos trece años. La tendencia observada muestra el avance significativo de la pesquisa en el área, lo que evidencia el creciente interés en implementar métodos rápidos y confiables en la extracción y limpieza de muestras, para su posterior análisis. Se encontraron, que en los años 2012 y 2013 son donde más se realizaron publicaciones sobre

esta temática. España, Brasil y Estados Unidos, son los países, donde se han realizado más estudios sobre la implementación y desarrollo de métodos *QuEChERS* para la extracción y limpieza de drogas veterinarias, especialmente, en las áreas de química, bioquímica, genética, agricultura y ciencias biológicas. Esto confirma la necesidad de impulsar los estudios sobre este tema en Colombia.

Figura 6. Número de publicaciones sobre el método *QuEChERS*. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*.

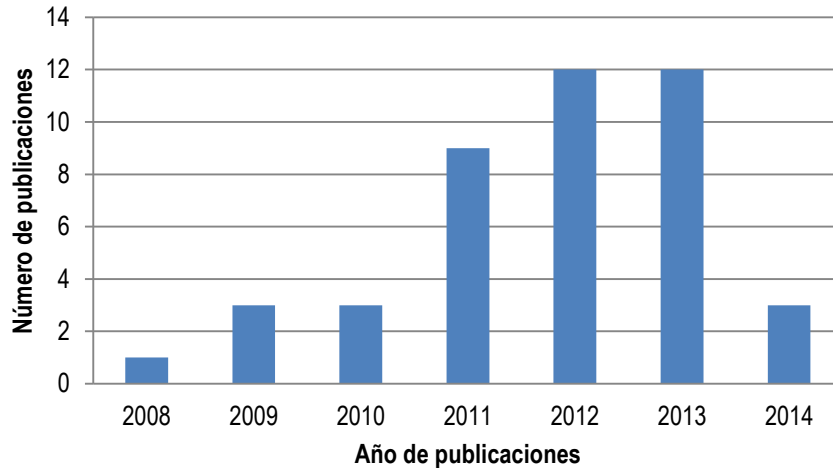


Figura 7. Número de registros sobre el método *QuEChERS* en drogas veterinarias, según áreas de aplicación. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*.

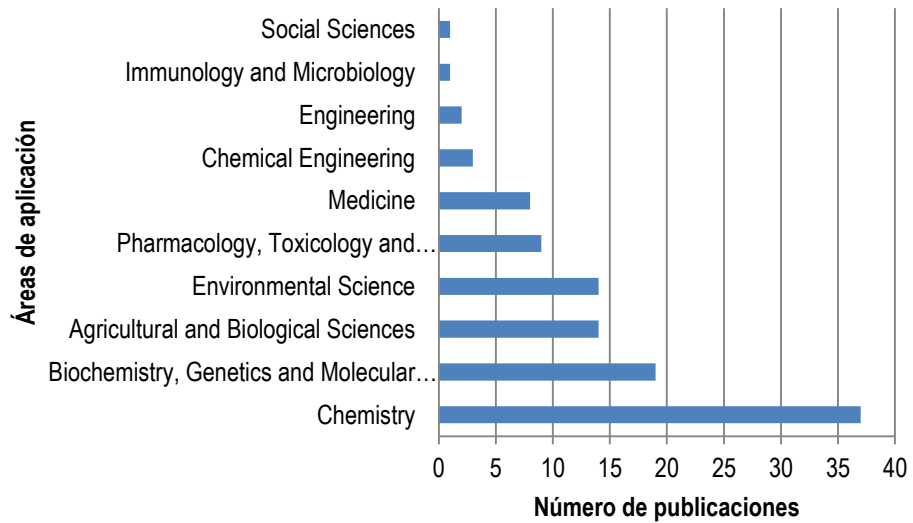
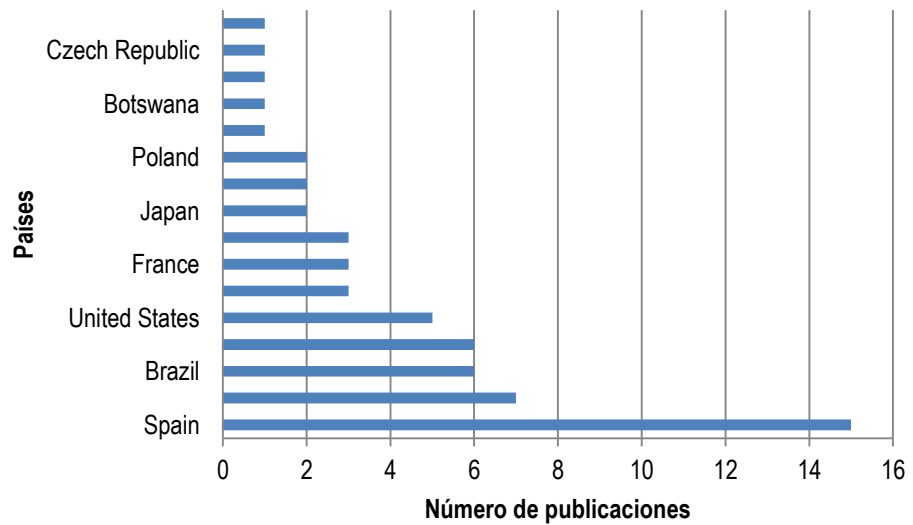


Figura 8. Número de publicaciones sobre el método *QuEChERS* en drogas veterinarias, según países con publicación. Fuente: base de datos *Scopus*. Periodo de observación: de 2000-2014. Fecha de consulta: 26/05/2014. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (QuEChERS) AND TITLE-ABS-KEY (drug veterinary)*.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

4.1.1 Reactivos y solventes. Los reactivos que se emplearon, agrupados según su proveedor, aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 5. Reactivos y solventes utilizados en la implementación del método de drogas veterinarias.

Proveedor	Reactivo
<i>Fisher Scientific (New Jersey)</i>	Diclorometano grado reactivo
	Agua HPLC
	Metanol HPLC
	Acetonitrilo HPLC
	Acetato de etilo HPLC
	Metanol grado reactivo
Merck (Darmstand, Alemania)	Ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidratado (EDTA)
	Fosfato dibásico
	Ácido cítrico monohidratado grado reactivo
	Ácido oxálico dihidratado grado reactivo
	Hexano grado reactivo
	Ácido clorhídrico
	Hexano grado reactivo

4.1.2 Material del laboratorio. Se emplearon los siguientes materiales de laboratorio: balanza analítica AG 285 mettler Toledo, centrífuga HSCEN-204, rotor de 12 puestos para tubos de 15 mL, rotor de 4 puestos para tubos de 50 mL, vortex-Genie 2T Timed Mixer (models SI-T236 through SI- T296), plancha de calentamiento D91126/MR HEI-ESTÁNDAR de Heidolph (Schwabach, Alemania), embudo Büchner, estufa secadora PL-325 *Fisher Scientific*, cronómetro digital Cassio, potenciómetro MPC227 Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza), pipetas volumétricas 1, 2, 5, 10 mL, balones aforados de 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 mL, vasos de precipitado de 25, 50, 100, 600 mL, micropipetas 0,5-10, 2-20, 20-200, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micropipetas marca Brand, tubos cónicos falcón de polipropileno de 15 y 50 mL, tubos cónicos de polipropileno de 1 mL de Brand (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtros de membrana en polivinil dimetilformamida (PVDF) de 0,45 μ m de Millipore (Sao Paulo, Brasil), microjeringa para inyección de 60 μ L de Agilent Technologies (Melbourne, Australia), Cartuchos ODS de J.T. Baker (México D.F., México), equipo de extracción en fase sólida (*SPE*), bomba de vacío.

4.1.3 Materiales QuEChERS. En la Tabla 6 se muestran las especificaciones de los materiales empleados en el método *QuEChERS*.

Tabla 6. Especificaciones técnicas del material del método *QuEChERS*.

Producto	Referencia	Número de lote	Proveedor
Homogeneizadores cerámicos de 15 mL	5982-9312	0006190665	
Tubos de dispersión de 15 mL para drogas veterinarias	5982-4956	0006195230	
Tubos de extracción <i>QuEChERS</i> para drogas veterinarias	5982-0032	6154818-01 6159065-13 6159065-06	<i>Agilent Technologies</i>
Tubos de dispersión <i>SPE</i> para drogas veterinarias en alimentos	5982-4950	0006198881	

4.1.4 Materiales de referencia certificados. En la Tabla 7 se muestran las especificaciones de las sustancias empleadas como referencia en el desarrollo del proyecto.

Tabla 7. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.

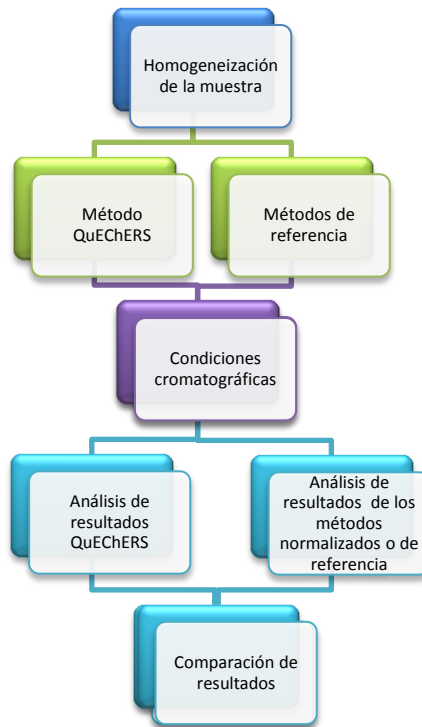
Grupos	Sustancia	Pureza	Número de lote	Proveedor
Fenicoles	Cloranfenicol	(99%)	20609	Dr. Ehrenstorfer
Tetraciclinas	Clorhidrato de tetraciclina	(99%)	10614	Dr. Ehrenstorfer
	Clorhidrato de oxitetraciclina	(99%)	00817	
Sulfonamidas	Sulfadiazina, (SDZ)	(99%)	00818	Dr. Ehrenstorfer
	Sulfadimetoxina, (SDM)	(99%)	20106	
	Sulfametoxazol, (SMX)	(99%)	01118	
	Sulfadoxina, (SDX)	(99%)	20608	
	Sulfapiridina, (SPY)	(99%)	10121	
	Sulfaquinoxalina, (SQX)	(98%)	823600	

4.1.5 Material cárnico. La muestra de carne se identificó como músculo (anca de pierna); se tomaron 150 muestras aleatorias de los diferentes centros de distribución del mercado de la ciudad de Bucaramanga. Se realizaron los procedimientos de extracción y los respectivos cálculos estadísticos apropiados promediando cada familia de resultados.

4.2 ETAPAS DEL PROYECTO

A continuación se presenta en la **Figura 9** el diagrama de actividades del proyecto. Para la implementación de la metodología fue necesario seleccionar el método de extracción y limpieza más adecuado y selectivo, determinar las figuras analíticas de mérito, y finalmente aplicarlo a muestras de carnes bovinas adquiridas en mercados locales.

Figura 9. Diagrama general de las etapas del proyecto



4.2.1 Extracción y *CLEAN UP* de los medicamentos veterinarios. Para la implementación de la metodología de extracción y *clean up* de drogas veterinarias cloranfenicol, tetraciclinas y sulfonamidas, se aplicaron los métodos referenciados para cada grupo de medicamentos, se calcularon las figuras de mérito para cada procedimiento de extracción, y se compararon resultados frente al método *QuEChERS* específico para drogas veterinarias. El procedimiento de extracción se realizó en material húmedo y en material liofilizado.

Para el procedimiento de liofilización se tomó la muestra de carne y se llevó previamente homogeneizada, al equipo de liofilización (véase **Figura 10**), durante 44 horas; se seleccionó este tiempo de liofilizado por eliminar la mayor cantidad de agua contenida en el tejido. Realizando comparaciones de peso de la muestra antes y después del proceso de liofilización, se observó una eliminación de hasta el 70 % de agua contenida en el tejido animal (véanse **Figuras 10 y 11**).

Figura 10. Procedimiento de homogeneización de la muestra de carne bovina.



Figura 11. Cámara de liofilización (Virtis Advantage Plus Freeze Dryers), modelo Advantage ES-53; muestra liofilizada.



Cámara de liofilización (*Virtis Advantage Plus Freeze Dryers*), modelo *Advantage ES-53*.

Posteriormente, se realizaron estudios del porcentaje de recuperación de los analitos de interés a cada uno de los materiales cárnicos (húmedos y liofilizados); mediante el enriquecimiento de soluciones patrón de concentración conocida. Se seleccionó el material húmedo como la mejor forma de homogeneización de la muestra, mediante la comparación de los porcentajes de recuperación. Seguidamente, se evaluaron las figuras analíticas de mérito utilizando el material húmedo.

4.2.1.1 Extracción del cloranfenicol: El tejido de estudio se mantuvo congelado hasta el día del análisis, es necesario realizar la etapa de extracción y el procedimiento de *clean up* en el mismo día.

Se colocó en un tubo de centrifuga (50 mL) el tejido húmedo ($5,00 \pm 0,05$ g) o liofilizado ($1,50 \pm 0,05$ g). Una muestra de tejido blanco se enriqueció adicionando 200 μ L de solución stock de cloranfenicol (20 μ g/L). Posteriormente, se adicionó acetato de etilo (10 mL), seguido de agitación con el equipo vortex por 10 minutos. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la capa superior de acetato de etilo a un tubo limpio de centrifuga. El procedimiento de extracción se repitió con 5 mL más de acetato de etilo.

Los extractos fueron concentrados con nitrógeno a 45 °C. El residuo se disolvió en hexano: diclorometano (1:1, 1 mL), mediante agitación con mezclador vortex. Seguidamente, se adicionó agua (1 mL) y se llevó a centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. Se transfirió la capa superior a un vial de 1,5 mL, para su posterior inyección en el equipo de HPLC.

4.2.1.2 Extracción de las sulfonamidas: El tejido de estudio se mantuvo congelado hasta el día del análisis; es necesario realizar la etapa de extracción y el procedimiento de *clean up* en el mismo día.

Se colocó tejido (ca. $2,5 \pm 0,1$ g) en un tubo de centrífuga (50 mL). Se adicionó solución de estándar interno (100 μ L; 2,5 ppm) a toda la muestra, lo cual equivale a enriquecer a 0,1 ppm.

El procedimiento de extracción se realizó adicionando acetato de etilo (6 mL) y agitando (vortex) por 2 minutos. Posteriormente, se llevó a centrifugación por 5 minutos a 2500 rpm. El acetato de etilo se filtró, a través de una columna de filtración de flujo rápido; se recolectó el filtrado en un tubo de centrifuga limpio de 15 mL. Se adicionó HCl (1 mL; 3,2 M), mediante agitación de 30 segundos y centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, la extracción se llevó a pH ácido y se retiraron los residuos de acetato de etilo; para esto, se procedió a adicionar

hexano (5 mL) y realizar agitación (vortex) por 30 segundos, y centrifugación por 5 minutos.

Se retiró el hexano sobrenadante; seguidamente, se adicionó solución de acetato de sodio (2 mL; 3,5 M); junto con acetato de etilo (3 mL); a la mezcla se le realizó vortex por 30 segundos y centrifugación por 5 minutos.

El sobrenadante de acetato de etilo se transfirió a un tubo de centrifuga limpio; este se sometió a corriente de nitrógeno, en un baño de 40 ± 5 °C, para llevar a sequedad el residuo. Se adicionó metanol (100 µL) al residuo, disolviéndolo, mediante agitación con vortex a alta velocidad.

El extracto fue diluido, por adición de la fase móvil A (Ácido fórmico 0,1M:Isopropanol (80:20),400 µL); nuevamente se realizó vortex a alta velocidad para mezclarlos; posteriormente, se llevó a centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un vial LC para su posterior inyección.

4.2.1.3 Extracción de las tetraciclinas por el método AOAC 995.09: El tejido de estudio se mantuvo congelado hasta el día del análisis; es necesario realizar la etapa de extracción y el procedimiento de *clean up* en el mismo día.

Se colocó en un tubo de centrifuga (50mL) tejido húmedo ($5,00 \pm 0,05$ g) o liofilizado ($1,50 \pm 0,05$ g). Una muestra de tejido blanco se enriqueció con solución stock combinada de las tetraciclinas (100 µL; 25 ppm). Posteriormente, se adicionó a cada tubo de centrifuga solución McIlvaine – buffer-EDTA (20 mL), se mezcló con homogeneizador durante 30 segundos. Seguidamente, se enjuagaron dos veces los tubos con solución McIlvaine – buffer-EDTA (2 mL).

Se tapó cada tubo y agitaron durante 10 minutos a alta velocidad con la ayuda del agitador orbital. Inmediatamente, se llevó a centrifugación a 2500 g por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de centrifuga limpio (50 mL); procurando no transferir nada de tejido. Se realizó este procedimiento con 20 y 10 mL más de solución McIlvaine – buffer-EDTA; se recogieron las tres extracciones en el tubo de centrifuga limpio.

Posteriormente, se filtró a presión reducida el extracto, seguido del procedimiento de *clean up*, por la técnica de extracción en fase sólida (SPE), (véase **Figura 12**); se adicionaron a cada cartucho metanol (20 mL) y agua tipo I (20 mL). Se adicionó el extracto al cartucho y se hicieron eluir las tetraciclinas con solución de ácido oxálico metanólico (6 mL).

Figura 12. Equipo para extracción en fase sólida, Baker Spe-24G (J.T. Baker, Philipsburg, NJ, EE.UU)



Utilizando un balón aforado (10 mL), se diluyó el extracto con agua HPLC, y se tomó una alícuota de 1 mL para la inyección en el equipo de HPLC.

4.2.1.4 Método QuEChERS para extracción y limpieza de drogas veterinarias:

Se colocaron en sus respectivos tubos de extracción las muestras de tejido húmedo (15 g). Se realizaron controles por enriquecimiento como se reporta en los procedimientos normalizados para cada medicamento. Seguidamente, se

adicionaron dos homogeneizadores a cada tubo, junto con las sales de sulfato de magnesio y cloruro de calcio. Se agitó fuertemente con ayuda del equipo vortex durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 5000 g.

Se transfirió sobrenadante (8 mL) al tubo de dispersión (véase **Tabla 6**), seguido de agitación por 30 s y centrifugación a 5000 g por 10 minutos. Se tomó una alícuota del líquido sobrenadante y se llevó a un vial de 1,5 mL para realizar el análisis en el equipo HPLC, (véanse **Figuras 13 y 14**).

Figura 13 Procedimiento de extracción *QuEChERS* para drogas veterinarias en muestras de carne bovina.



Homogeneización



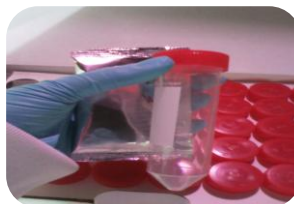
Pesado de la muestra



Adición solvente



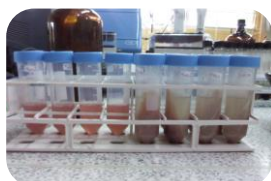
Agitación fuerte



Adición de sales



Agitación fuerte



Conservación



Centrifugación

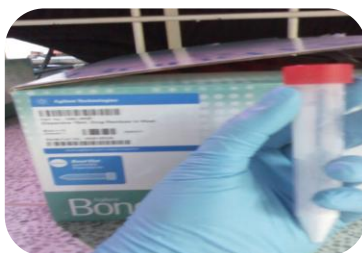


Separación de fases

Figura 14. Procedimiento de dispersión y *clean up* QuEChERS para drogas veterinarias en muestras de carne bovina.



Extracción de la fase solvente



Dispersión



Agitación fuerte



Centrifugación



Separación de fases



Inyección

4.2.2 Implementación de la metodología de análisis de drogas veterinarias por HPLC-DAD. Para el análisis cromatográfico se empleó un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (véase Figura 15), que consta de un desgasificador *Agilent Technologies* G1322A, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies* G1354A, un inyector manual *Agilent Technologies* G1328B y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B. El software *Agilent Chemstation* LC fue utilizado para el procesamiento de los datos. Las columnas empleadas en la implementación de la identificación y cuantificación de los analitos, fueron la *Kinetex* C8 de 5 μm , con dimensiones de 250x4,6 mm y la *Kinetex* C18 de 2,6 μm , con dimensiones de 100x4,6 mm.

Figura 15. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*. Imagen tomada por la autora: Laura Patricia Plata Paredes, fecha: 02/09/2013. Tomada en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS.



4.2.3 Determinación y cuantificación de los medicamentos veterinarios

4.2.3.1 Determinación: Se realizó por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes a cada uno de los medicamentos de referencia, con los tiempos de retención de los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos de la muestra, bajo las mismas condiciones.

4.2.3.2 Cuantificación: Se construyeron las curvas de calibración para cada uno de los medicamentos de referencia en determinado rango de concentraciones (véase **Tabla 8**), teniendo en cuenta el factor de respuesta del equipo y su linealidad. De esta forma se construyó un modelo matemático (regresión lineal) mediante el cual se pudieron calcular las concentraciones.

Tabla 8. Rangos de concentraciones utilizadas para el análisis de los antibióticos.

Antibiótico	Concentración, µg/kg
Cloranfenicol	0,5 - 5
Tetraciclinas	25 - 1000
Sulfonamidas	50 - 200

5. DETERMINACIÓN DE DROGAS VETERINARIAS; TETRACICLINAS Y CLORANFENICOL: ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

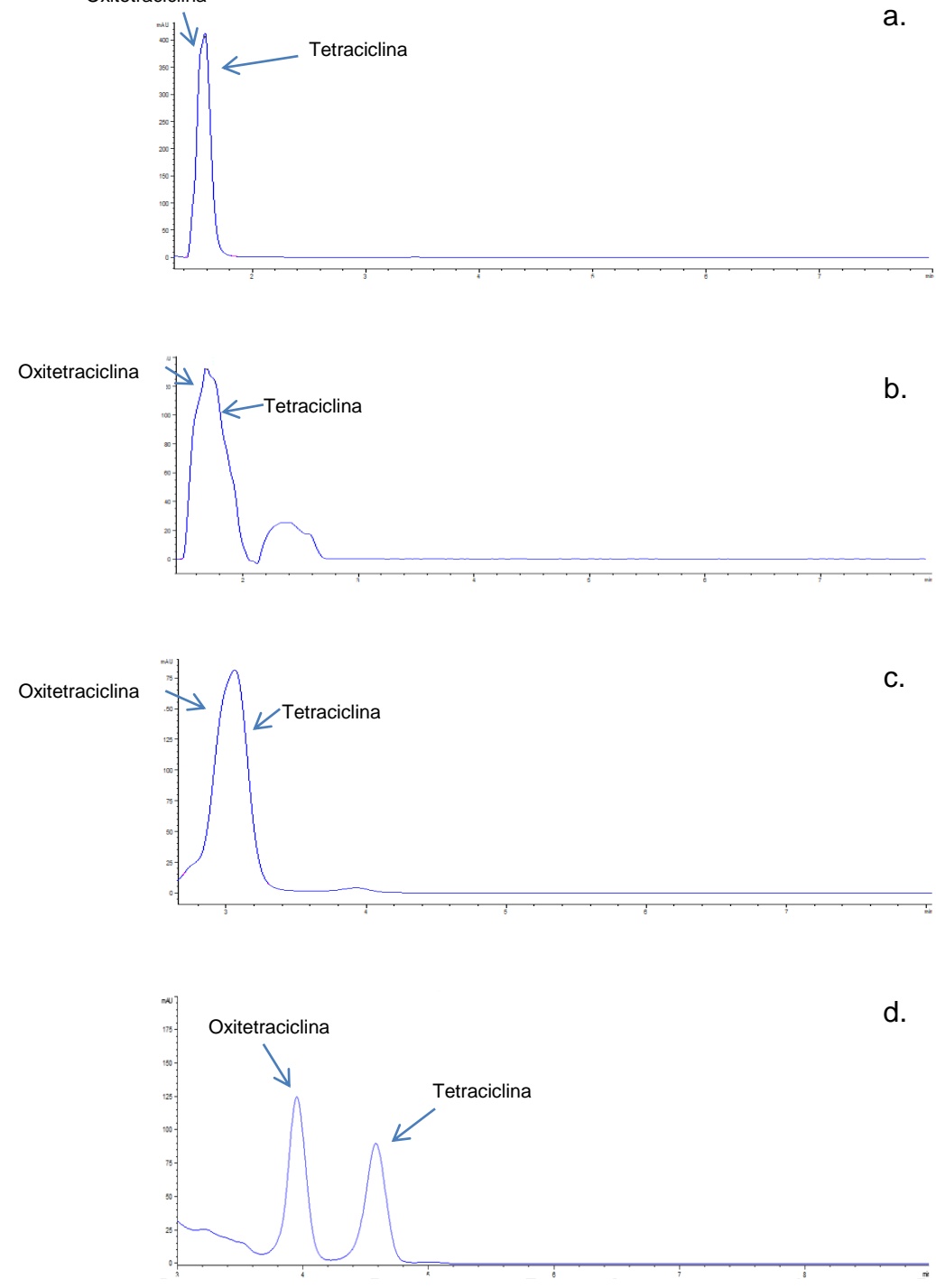
Para el análisis de tetraciclinas, sulfonamidas y cloranfenicol, se evaluaron por separado las condiciones cromatográficas indicadas en cada método referenciado: composición de la fase móvil (véanse **Tablas 9-11**).

5.1.1 Selección de la fase móvil. La fase móvil se seleccionó con base en la comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos al variar su composición. Las **Tablas 9 a 11** presentan las composiciones ensayadas para analizar tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas, respectivamente.

Tabla 9. Composiciones de la fase móvil examinadas para la determinación de tetraciclinas

Ensayo	Fase móvil
a.	Condiciones cromatográficas reportadas en la norma de referencia; 60:30:10; 0,01M ácido oxálico a.c.: ACN: Metanol ^[19] .
b.	70:20:10; 0,01M ácido oxálico a.c.: ACN: Metanol.
c.	65:15:20; 0,01M ácido oxálico a.c.: ACN: Metanol.
d.	65:20:15; 0,01M ácido oxálico a.c.: ACN: Metanol.

Figura 16. Cromatogramas obtenidos de los ensayos realizados utilizando las fases móviles de la Tabla 9, columna *Kinetex C8* de 5 μm , con dimensiones de 250x4,6 mm, solución *stock* de oxitetraciclina y tetraciclina de 2⁻ " "

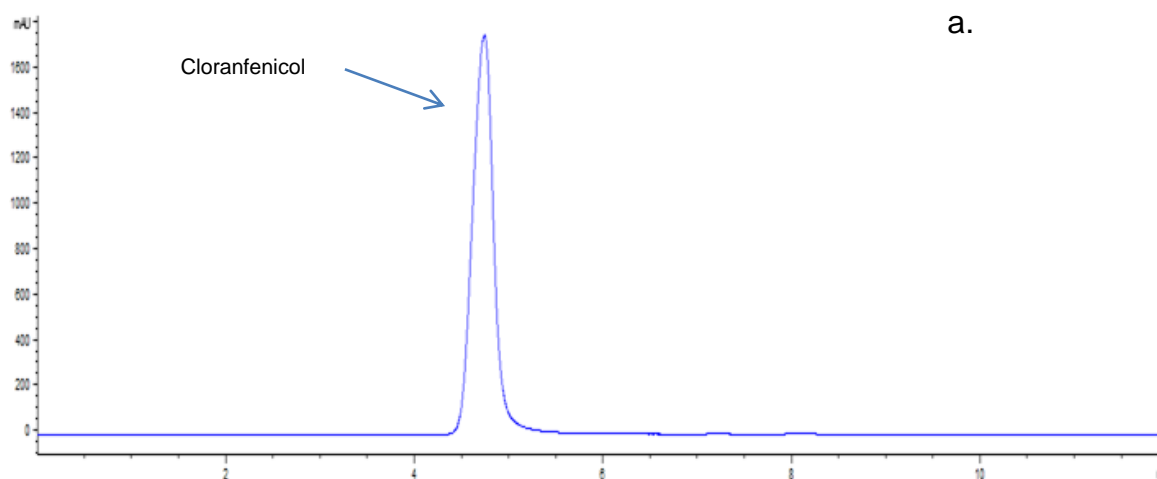


En la **Figura 16** se observan los cromatogramas correspondientes a la separación de oxitetraciclina y tetraciclina con las fases móviles indicadas en la **Tabla 9**. Se observa que en el cromatograma **d.** la separación de oxitetraciclina y tetraciclina está bien definida y separada una señal de la otra.

Tabla 10. Composición de la fase móvil examinada para la determinación de cloranfenicol

Ensayo	Fase móvil
a.	90:10; ACN:agua.

Figura 17. Cromatograma obtenido del ensayo realizado utilizando la fase móvil de la Tabla 10, columna *Kinetex C8* de 5 μm , con dimensiones de 250x4,6 mm, solución *stock* de cloranfenicol de 1000 mg/kg.



En la **Figura 17** se observa un pico simétrico, con tiempo de retención de 4,762 minutos. Este pico se halla dentro de lo establecido en las condiciones reportadas en la norma referenciada, y se observa una relación de señal/ruido muy baja comparada con el compuesto de interés, lo que permite la determinación y cuantificación del analito.

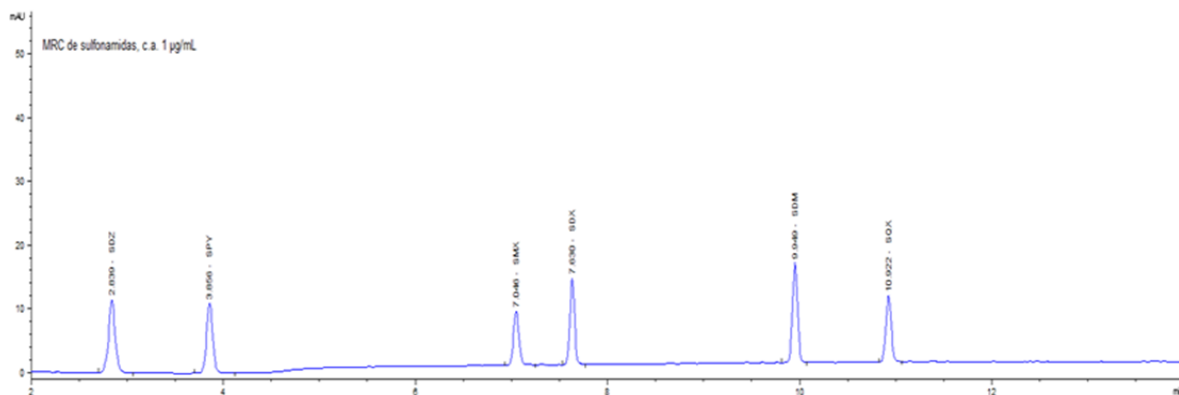
En la **Tabla 11**, se describe el método cromatográfico adecuado para la determinación y cuantificación de las sulfonamidas, donde se establecen las variaciones de los porcentajes de las composiciones de las fases móviles, **fase A**, ácido fórmico al 0,1%; **fase B**, isopropanol al 20 % en ácido fórmico al 0,1 %.

Tabla 11. Composición de la fase móvil examinada para la determinación de sulfonamidas.

t, min	Fase A, %	Fase B, %
0	90	10
2	90	10
12	10	90
17	90	10
20	90	10

Al emplear el gradiente de composición de la fase móvil reportado en la **Tabla 11**, se obtuvo la separación de las sulfonamidas, según se ilustra en la **Figura 18**.

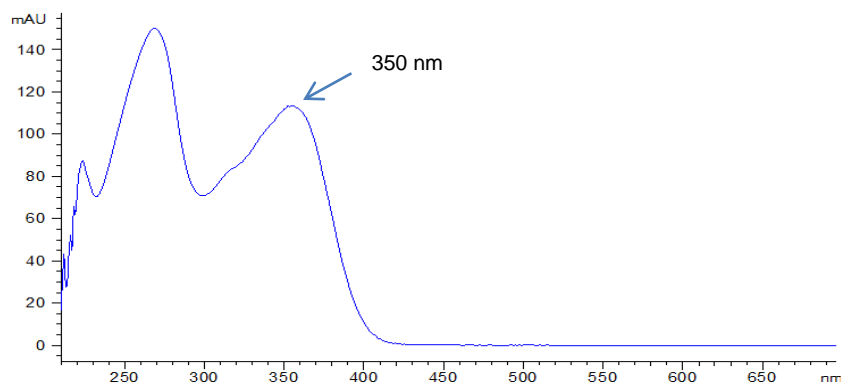
Figura 18. Cromatograma obtenido del ensayo realizado utilizando el programa de gradiente de la Tabla 11 fase A: ácido fórmico 0.1% a.c; fase B: 20% isopropanol en ácido fórmico 0.1% a.c, columna *Kinetex C18* de 2,6 μ m, con dimensiones de 100x4,6 mm, solución *stock* de sulfonamidas de 1 mg/kg.



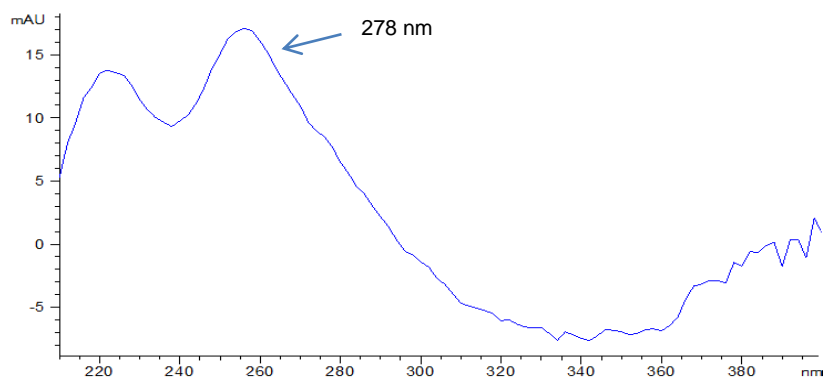
5.1.2 Selección de la longitud de onda. La **Figura 19** presenta los espectros de absorción ultravioleta-visible (200 – 600 nm) de los analitos bajo estudio. En cada espectro se indica la longitud de onda de máxima absorción que se seleccionó para la detección de cada grupo de analitos (véase **Tabla 12**).

Figura 19. Espectros ultravioleta-visible de a. tetraciclinas, b. cloranfenicol y c. sulfonamidas, obtenidos con el detector de arreglo de diodos en el cromatógrafo HPLC 1200 utilizado para estos análisis.

a.



b.



260 nm

c.

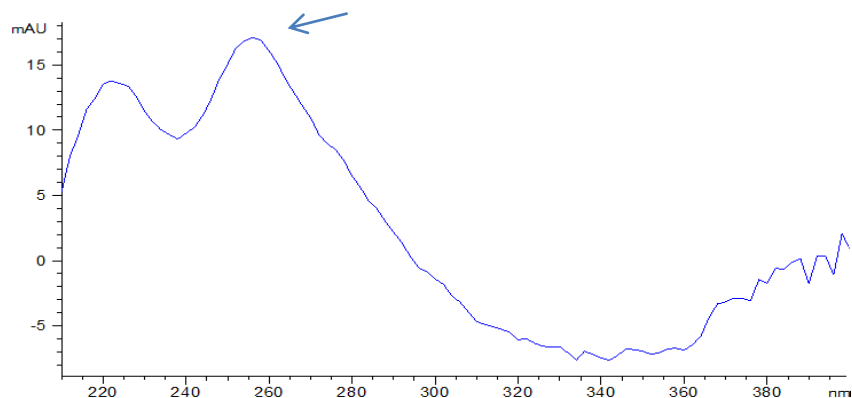


Tabla 12. Longitud de onda seleccionada para la detección de los antibióticos analizados.

Antibióticos	Longitud de onda de máxima absorción, nm
Tetraciclinas	350
Cloranfenicol	278
Sulfonamidas	260

En la **Tabla 13** se presentan los parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas.

Tabla 13. Parámetros cromatográficos empleados en el presente trabajo para el análisis de tetraciclinas, cloranfenicol y sulfonamidas por HPLC/DAD.

Antibióticos		Tetraciclinas	Cloranfenicol	Sulfonamidas
Parámetros	Flujo	1,2 mL/min	0,6 mL/min	1 mL/min
	Fase móvil	65:20:15; 0,01M ácido oxálico _{a.c.} ACN: Metanol.	90:10; ACN: agua	Véase Tabla 11
	Temperatura	25 °C	25 °C	60 °C
	Volumen de inyección	60 µL	60 µL	20 µL
	Especificaciones			

Antibióticos	Tetraciclinas	Cloranfenicol	Sulfonamidas
Columna	Kinetex C8 de 5 μm , 100 A°, (250x4,6 mm)		Kinetex C18 de 2,6 μm , (100x4,6 mm)

En las **Figuras 20 – 22**, se presentan los cromatogramas obtenidos de las familias de antibióticos, al implementar los métodos cromatográficos específicos para cada antibiótico. Se observa, buena resolución entre los antibióticos tetraciclinas y sulfonamidas y un tiempo experimental aceptable de aproximadamente 15 minutos, para cada familia de medicamentos.

Figura 20. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies G1322A*, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies G1328B* y un detector de arreglo de diodos (DAD) *G1315B*., de una solución de 25 mg/kg de a. oxitetraciclina y b.tetraciclina, en metanol. Columna Kinetex C8 [250 m x 4,6 mm x 5 μm].

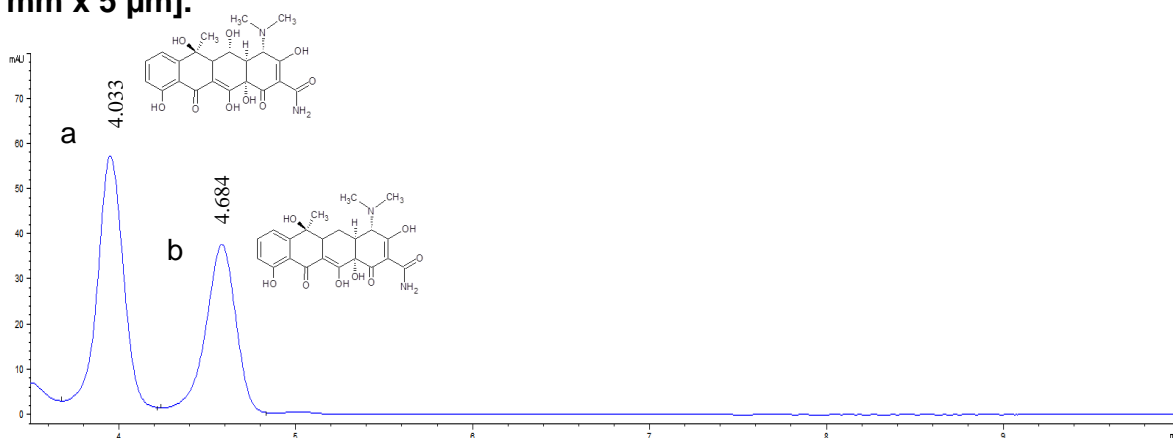


Figura 21. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies G1322A*, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies G1328B* y un detector de arreglo de diodos (DAD) G1315B., de una solución de 1000 mg/kg de cloranfenicol en acetonitrilo. Columna Kinetex C8 [250 m x 4,6 mm x 5 µm].

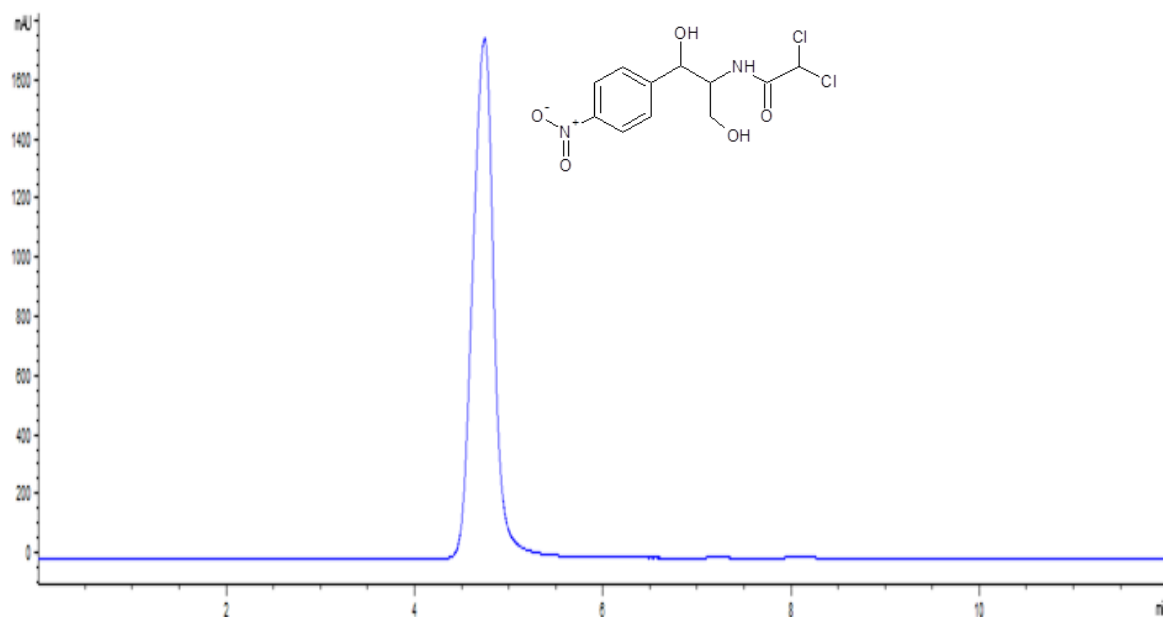
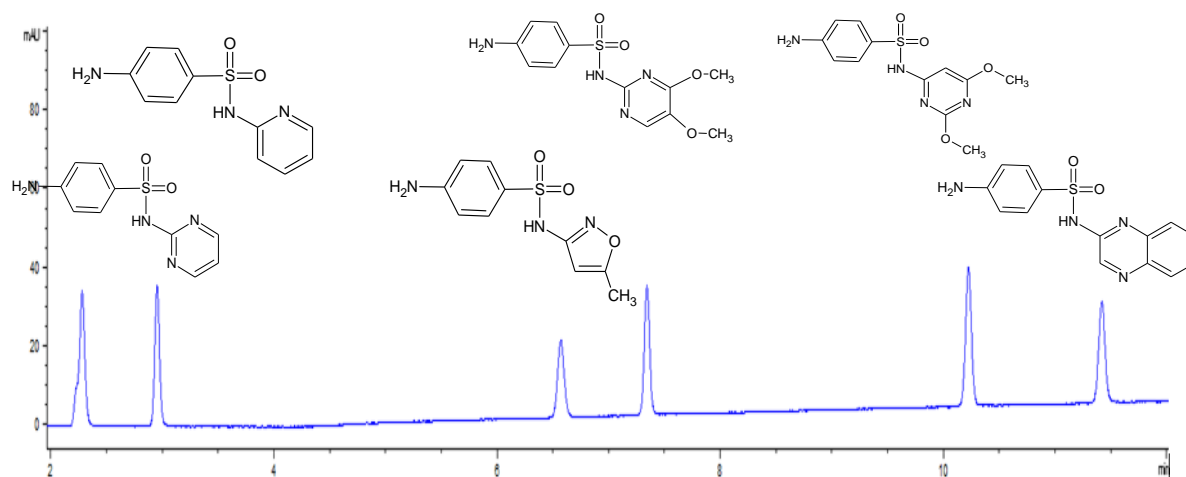


Figura 22. Cromatograma obtenido en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies 1200 Series*, dotado de un desgasificador *Agilent Technologies G1322A*, una bomba cuaternaria *Agilent Technologies G1354A*, un inyector manual *Agilent Technologies G1328B* y un detector de arreglo de diodos (DAD) *G1315B.*, de una solución de 1 mg/kg de sulfonamidas en acetonitrilo. De derecha a izquierda se ilustran: SQX, SDM, SDX, SMX, SPY y SDZ. Columna Kinetex C18 [100 m x 4,6 mm x 2,6 μ m].



En las **Tablas 14 y 15**, se muestran los datos de concentración y área de respuesta, correspondientes a las curvas de calibración realizadas para cada familia de antibióticos.

Para la familia de las tetraciclinas se tomó un rango de concentración de 25- 1000 μ g/L, el cual está constituido por ocho puntos (concentraciones) realizados en solución, con el fin de obtener un amplio rango de verificación y estudio.

Para la familia del cloranfenicol, la curva de calibración se construyó con cinco puntos (concentraciones), en un rango de 0,5 – 5 μ g/L en solución; estos niveles de concentración fueron los más bajos en estudio, debido a su estructura, otorgando una absorbancia alta en el equipo.

Las curvas de calibración para la familia de sulfonamidas, se construyeron con tres puntos (concentraciones), en el rango de 0,05- 0,20 µg/mL en muestra.

Tabla 14. Datos para las curvas de calibración de las tetraciclinas y cloranfenicol.

Oxitetraciclina		Tetraciclina		Cloranfenicol	
Concentración (µg/L) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta	Concentración (µg/L) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta	Concentración (µg/L) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta
25	5,8±0,3	25	4,4±0,3	0,5	1,81457±0,3
50	8,4±0,3	50	6,6±0,3	1	2,32031±0,3
75	9,11±0,3	75	8,26±0,3	3	3,80840±0,3
100	10,1±0,3	100	9,9±0,3	4	4,33455±0,3
250	38,15±0,3	250	35,47±0,3	5	5,15493±0,3
500	77,85±0,3	500	72,57±0,3		
750	117,55±0,3	750	109,67±0,3		
1000	157,25±0,3	1000	146,77±0,3		

Tabla15. Datos para las curvas de calibración de las sulfonamidas

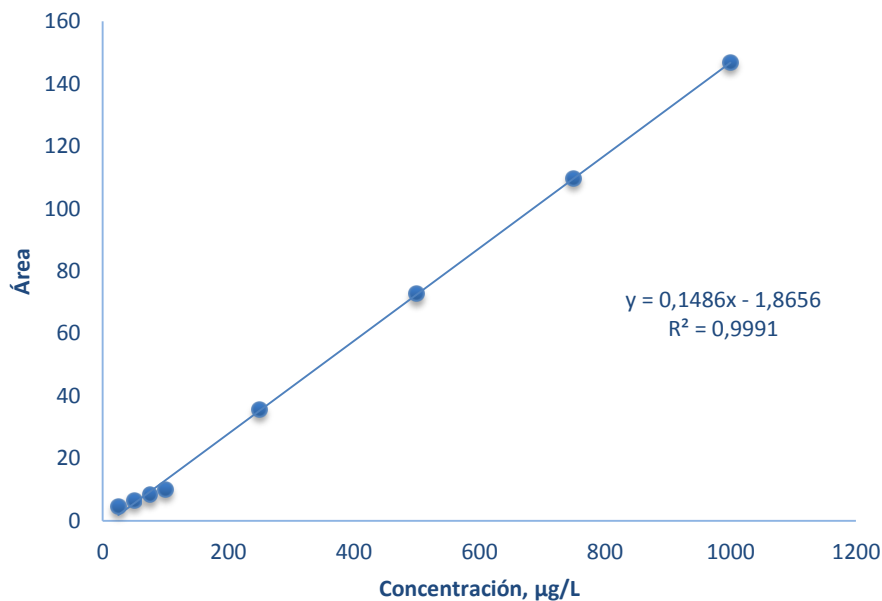
SDZ		SMX		SDX	
Concentración (µg/mL) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta	Concentración (µg/mL) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta	Concentración (µg/mL) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta
0,05	9,1±0,3	0,05	2,75±0,3	0,05	5,3±0,3
0,1	16,5±0,3	0,1	4,6±0,3	0,1	10,4±0,3
0,2	34,05±0,3	0,2	9,95±0,3	0,2	22,75±0,3

SDM		SQX	
Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de las soluciones de calibración	Áreas de respuesta
0,05	$5,9 \pm 0,3$	0,05	$2,25 \pm 0,3$
0,1	$12,25 \pm 0,3$	0,1	$5,1 \pm 0,3$
0,2	$25,95 \pm 0,3$	0,2	$10,55 \pm 0,3$

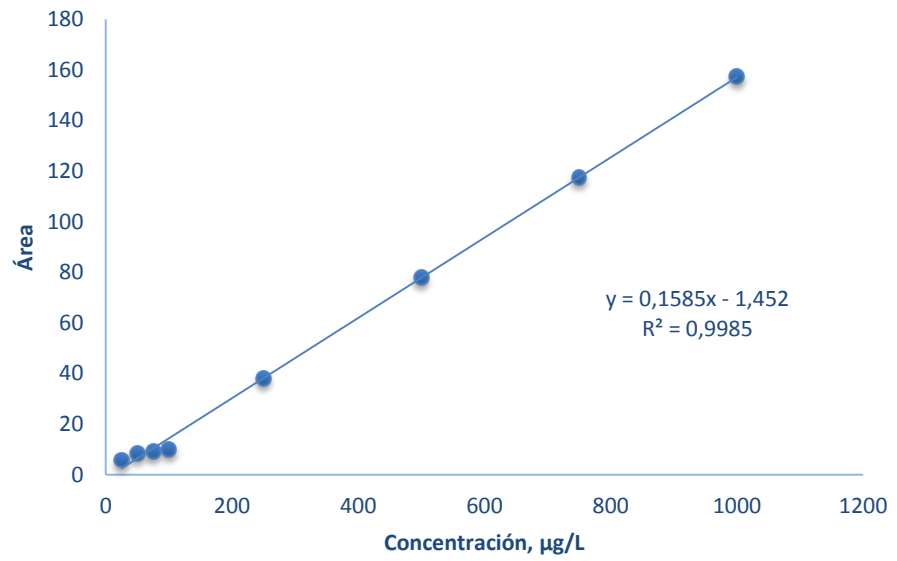
En la **Figura 23**, se ilustran las curvas de calibración de los antibióticos estudiados, construidas con los datos reportados en las **Tablas 14** y **15**, respectivamente. Se puede observar la linealidad de las curvas de calibración de cada antibiótico, por medio de la determinación del coeficiente de determinación (R^2).

Figura 23. Curvas de calibración de a. tetraciclina, b. oxitetraciclina, c. cloranfenicol y sulfonamidas (.d. SDZ, e. SMX, f. SDX, g. SDM, y h. SQX).

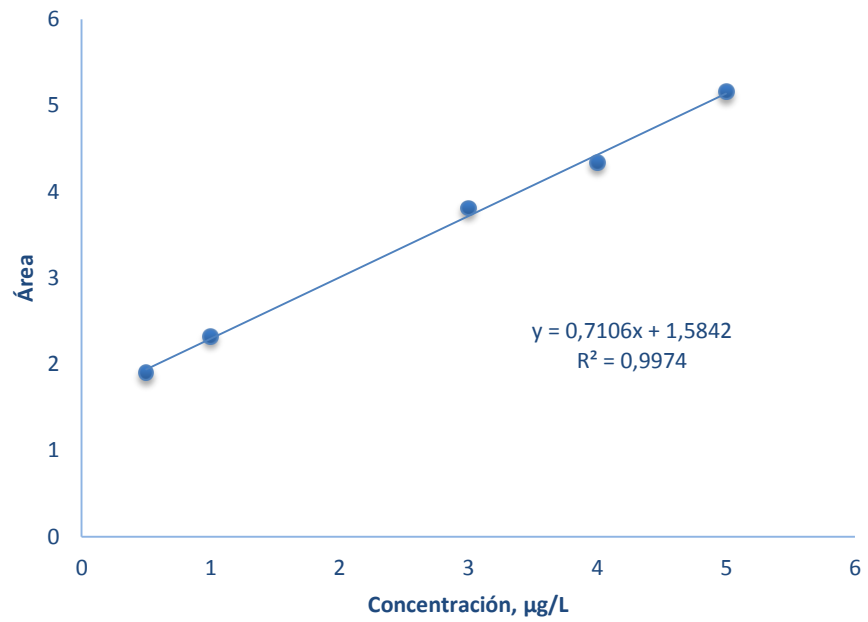
a. TETRACICLINA



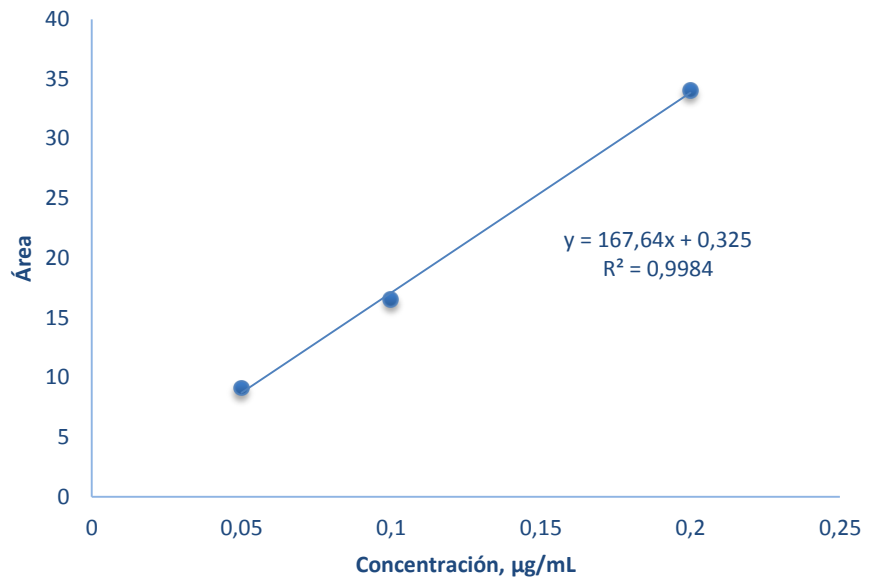
b. OXITETRACICLINA



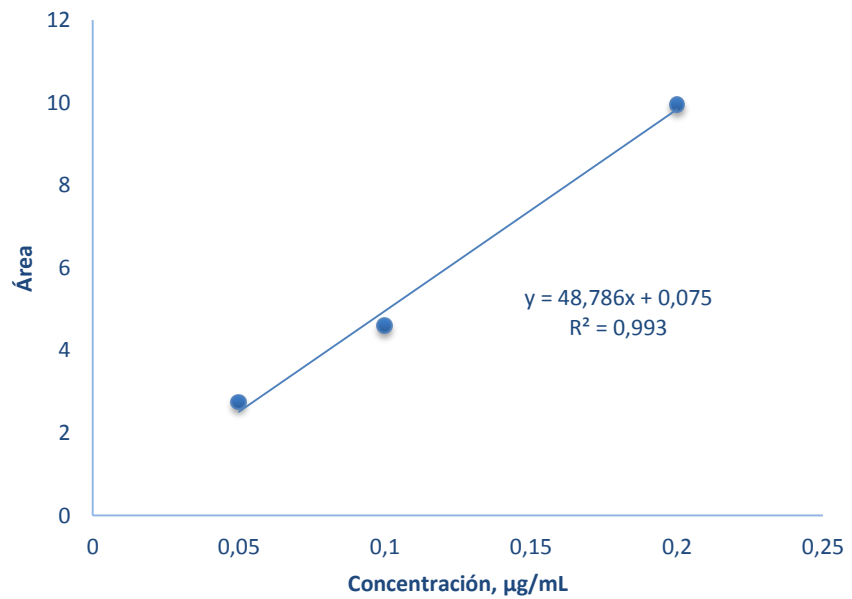
c. CLORANFENICOL



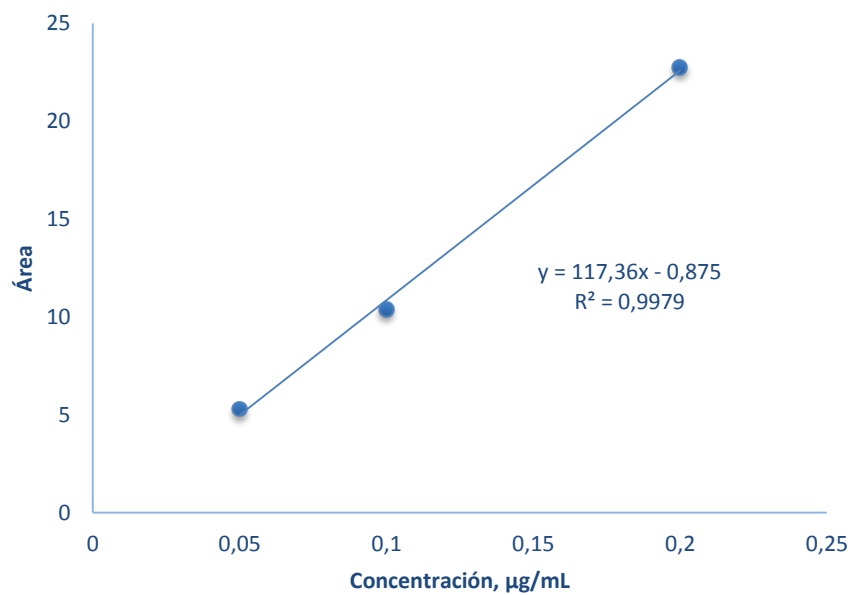
d. SULFONAMIDA (SDZ)



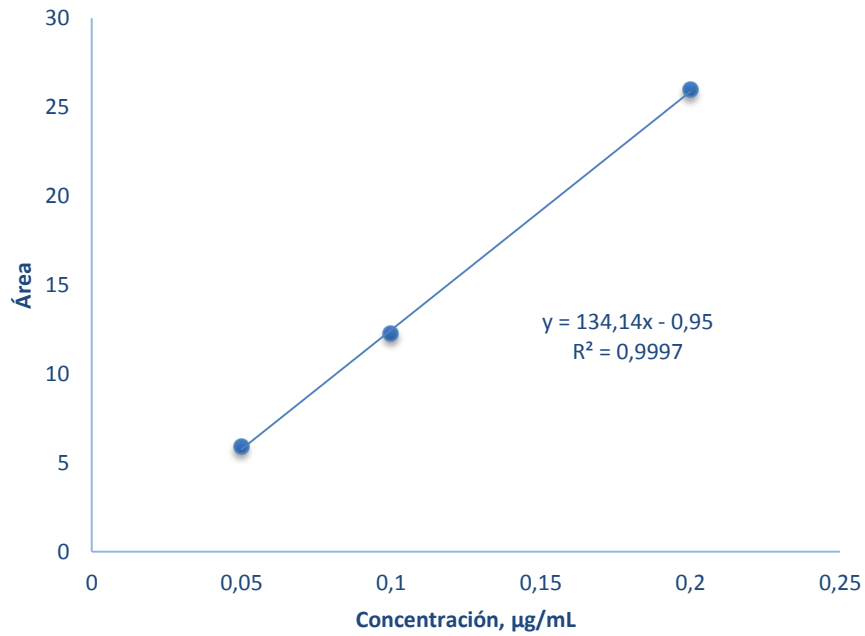
e. SULFONAMIDA (SMX)



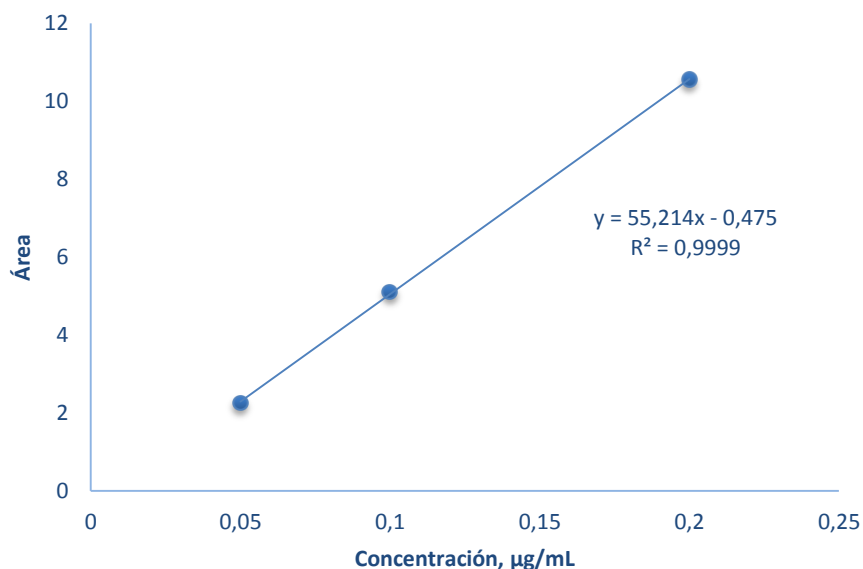
f. SULFONAMIDA (SDX)



g. SULFONAMIDA (SDM)



h. SULFONAMIDA (SQX)



5.1.3 Parámetros de eficiencia de separación. En las **Tablas 16 y 17**, se reportan los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica de la familia de tetraciclinas y sulfonamidas, determinados bajo las condiciones de operación establecidas y calculadas.

Como el valor de la resolución es mayor de 1,5, se deduce; que se obtuvieron picos bien resueltos.

Tabla 16. Parámetros de eficiencia de la separación para las tetraciclinas.

Antibióticos	t _R , min	W _b , min	N*	R _s *
Oxitetraciclina	4,033	0,1866	7474,0	-
Tetraciclina	4,684	0,1844	10323,6	3,51

* N: Número de platos teóricos; R_s: Resolución.

Tabla 17. Parámetros de eficiencia de la separación para las sulfonamidas

Antibióticos	t _R , min	W _b , min	N*	R _s *
SDZ	2,82	0,072	24544	-
SPY	3,82	0,071	10323.6	14
SMX	7,16	0,063	206664,0	50
SDX	7,75	0,054	329561,0	10
SDM	10,11	0,058	486145,5	42
SQX	11,11	0,062	513765,2	17

* N: Número de platos teóricos; R_s: Resolución.

6. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA HPLC

6.1 EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA TIEMPOS DE RETENCIÓN (t_R) Y ÁREAS.

Se inyectó cinco veces cada familia de antibióticos por separado; es decir, una mezcla de tetraciclinas (oxitetraciclina y tetraciclina), (3 μ L, 75 μ g/kg), cloranfenicol (1 μ L, 1 mg/kg) y las sulfonamidas (300 μ g/kg), para determinar la repetibilidad del método. Los resultados de la evaluación de la repetibilidad de t_R y áreas de los picos cromatográficos, se registraron en las **Tablas 18 y 19**, respectivamente.

La repetibilidad se expresó como los coeficientes de variación del método cromatográfico, en lo que respecta a los tiempos de retención y las áreas corregidas de cada uno de los medicamentos veterinarios, cuyos valores se encuentran acordes con las buenas prácticas de laboratorio (BPL), al no superar 0,5 % y el 8,0 %, para t_R y área respectiva, exceptuando el antibiótico SQX, con un coeficiente de variación del 10,2 % de área.

Tabla 18. Tiempo de retención de los medicamentos veterinarios.

Antibióticos	t_R , min					S	X	CV, %
	1	2	3	4	5			
Oxitetraciclina	4,033	4,035	4,033	4,029	4,035	0,002	4,033	0,061
Tetraciclina	4,684	4,685	4,666	4,703	4,677	0,013	4,68	0,288
Cloranfenicol	4,762	4,712	4,711	4,764	4,723	0,026	4,73	0,560
SDZ	2,864	2,834	2,843	2,859	-	0,014	2,85	0,5
SMX	7,074	7,040	7,070	7,062	-	0,015	7,06	0,2
SDX	7,651	7,631	7,650	7,645	-	0,009	7,644	0,1
SDM	9,957	9,934	9,974	9,960	-	0,017	9,95	0,2
SQX	10,919	10,912	10,943	10,927	-	0,013	10,92	0,1

Tabla 19. Áreas obtenidas para los medicamentos veterinarios.

Antibióticos	[] µg/kg*	Áreas (mAU*s)					S	X	CV, %
		1	2	3	4	5			
Oxitetraciclina	75	8,1	8,7	8,9	8,8	8,9	0,3346640	8,6	3,855
Tetraciclina	75	7,1	7,5	7,4	7,7	7,1	0,2607681	7,3	3,543
Cloranfenicol	1000	62	61,9	61,4	62,3	63,5	0,7854935	62,2	1,262
SDZ		20,2	19,4	19,3	18,2	-	0,822	19,0	4,3
SMX		12,8	13,3	13,9	11,6	-	0,976	13,0	7,6
SDX	300	16,9	16,8	18,3	15,5	-	1,144	17	6,8
SDM		19,3	19,4	21,5	17,7	-	1,559	19	8,0
SQX		15,5	16,1	17,3	13,5	-	1,587	16	10,2

*concentración

6.2 EVALUACIÓN DEL RDL Y DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.

El RDL y la sensibilidad se determinaron con base en los datos obtenidos de las curvas de calibración, para cada familia de antibióticos analizados (véase **Figura 23**). En la **Tabla 20**, se muestra para cada antibiótico, la ecuación de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que mide el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado (0,5 – 20 µg/kg, cloranfenicol, 25-1000 µg/kg tetraciclinas y sulfonamidas 50 – 200 µg/kg); la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f), y la desviación estándar de la pendiente (evaluando, el área de respuesta), miden la sensibilidad del método, la cual a las condiciones trabajadas, es buena debido a que sus pendientes se encuentran entre 0,1486 – 167,64. Las curvas de calibración para cada uno de los antibióticos se encuentran en la **Figura 23**.

Tabla 20. Ecuación de la curva de calibración, coeficiente de determinación, R^2 , pendiente y desviación estándar de la pendiente, obtenidas en la determinación de las familias de antibióticos por separado, a partir de la curva de calibración (0,5 – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cloranfenicol, 25-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclinas y 50 – 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sulfonamidas), por HPLC.

Antibiótico	Ecuación	R^2	R_f
Oxitetraciclina	$y = 0,1585x - 1,452$	0,998	0,1585
Tetraciclina	$y = 0,1486x - 1,8656$	0,999	0,1486
Cloranfenicol	$y = 0,7106x + 1,5842$	0,997	0,7106
SDZ	$y=167,64x+0,325$	0,998	167,64
SMX	$y=48,786x+0,075$	0,993	48,786
SDX	$y=117,36x+0,875$	0,998	117,36
SDM	$y=134,14x-0,95$	0,999	134,14
SQX	$y=55,214x-0,475$	0,999	55,214

R_f : Pendiente

En la **Tabla 20**, se observa que el coeficiente de determinación R^2 se encuentra entre 0,996 – 0,999, para las curvas de calibración obtenidas en los rangos evaluados, lo que indica un buen ajuste de los parámetros. Por tanto, el RDL del método implementado fue de 0,5 – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para la familia del cloranfenicol y 25-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las tetraciclinas. La sensibilidad del método se determinó como la pendiente de la curva de calibración.

6.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÍNIMOS DE DETECCIÓN (NMD) Y CUANTIFICACIÓN (NMC).

En este caso se desarrolló el cálculo por medio del método estadístico. En donde el nivel mínimo de detección (NMD) corresponde a la señal del blanco, más tres veces la desviación estándar del blanco y, el nivel mínimo de cuantificación (NMC) es tres veces el NMD ^[29]. En la **Tabla 21** se observan los valores de NMD y NMC para cada uno de los antibióticos estudiados.

Los límites máximos de residuos establecidos por el Codex Alimentarius, Ministerio de Salud y Protección Social y (UE) N° 37/2010 para la carne bovina, en microgramos por kilogramo de muestra, se extrapolaron a la cantidad de muestra cárnica utilizada en cada procedimiento de extracción y volumen de aforo final del extracto para su respectivo análisis por la técnica HPLC-DAD, valores que se encuentran por encima de los NMD del método cromatográfico: 1-38 µg/kg, para los medicamentos veterinarios seleccionados.

Tabla 21. Niveles mínimos de detección y de cuantificación de los antibióticos estudiados.

Antibióticos	NMC, µg/L	NMC, µg/kg	NMD, µg/kg	Codex Alimentarius	Ministerio de Salud y Protección Social	(UE) N° 37/2010
Oxitetraciclina	28	55	28	200	200	200
Tetraciclina	38	75	38	200	200	200
Cloranfenicol	7	1	1		Prohibido	
Sulfadiazina	74	15	7			100
Sulfapiridina	77	15	8			100
Sulfametoxazol	99	20	10			100
Sulfadoxina	63	13	6		No reportado	100
Sulfadimetoxina	54	11	5			100
Sulfaquinoxalina	82	16	8			100

6.4 EXACTITUD DEL MÉTODO

Teniendo las condiciones del método de extracción de cada familia de antibióticos, se realizó la evaluación del porcentaje de recuperación, tetraciclinas (100 µL, 25 mg/kg), cloranfenicol (200 µL, 20 µg/kg) y sulfonamidas (100 µL; 2,5 mg/kg). Se realizó el procedimiento de extracción de cada familia de antibióticos por separado y el procedimiento de extracción por el método *QuEChERS* en dos muestras de carne bovina libres de antibióticos y enriquecidas con antibióticos con las

concentraciones determinadas para cada familia; los resultados obtenidos se reportan en las **Tablas 22 y 23**.

Tabla 22. Porcentaje de recuperación de los métodos normalizados de cada familia de antibióticos adicionada a dos muestras de carne bovina sin antibióticos

Antibióticos	Áreas (mAU*s)					Porcentaje de recuperación Promedio, %	
	Carne bovina libre de antibióticos	CTRMRC*	recuperada				
			Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio		
Oxitetraciclina	0	38,2	52,2	56,4	54,3	142	±4,0
Tetraciclina	0	35,5	50,2	50,1	50,15	141	±3,0
Cloranfenicol	0	4,4	2,1	2,0	2,05	47	±2,0
SDZ	0	16,5	15,4	15,1	15,5	93	±3,0
SMX	0	4,6	4,3	4,1	4,15	90	±3,0
SDX	0	10,4	10,1	10,7	10,4	100	±3,0
SDM	0	12,25	11,1	11,3	11,3	91	±3,0
SQX	0	5,1	4	4,1	4,05	79	±3,0
SPY	0	14,3	15,2	15,3	15,25	107	±3,0

*CTRMRC: Control de Material de Referencia; solución de comparación.

Tabla 23. Porcentaje de recuperación del método *QuEChERS* para cada familia de antibióticos adicionada a dos muestras de carne bovina sin antibióticos.

Antibióticos	Áreas (mAU*s)					Porcentaje de recuperación Promedio, %	
	Carne bovina libre de antibióticos	CTRMRC*	recuperada				
			Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio		
Oxitetraciclina	0	38,15	-	-	-	-	-
Tetraciclina	0	35,47	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	0	4,4	3,1	3,0	3,05	69	±2,0
SDZ	0	19,4	-	-	-	-	-

Antibióticos	Áreas (mAU*s)					Porcentaje de recuperación Promedio, %	
	Carne bovina libre de antibióticos	CTRMRC*	recuperada				
			Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio		
SMX	0	12,2	-	-	-	-	-
SDX	0	16,3	16,8	16,5	16,65	102	±4,0
SDM	0	18,8	15,1	15,3	15,2	80	±4,0
SQX	0	14,2	11,7	12	11,85	83	±4,0
SPY	0	14,3	5,74	5,92	5,83	41	±4,0

*CTRMRC: Control de Material de Referencia; solución de comparación.

El método *QuEChERS* específico para drogas veterinarias, no produjo un extracto de tetraciclinas en el que se pudiera detectar concentración alguna de estos antibióticos. Para la familia de las sulfonamidas, en el caso de SDZ y SMX, no se lograron cuantificar debido a interferencia detectadas provenientes del método de extracción que coelúan con estos antibióticos.

6.5 DETERMINACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LA EXTRACCIÓN.

Para calcular la reproducibilidad de cada extracción, se realizó un duplicado de una muestra de carne bovina enriquecida con cada antibiótico bajo estudio por separado. La reproducibilidad fue evaluada como el coeficiente de variación (**Tablas 24 y 25**)

Tabla 24. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de carne bovina enriquecida y extraída por los métodos normalizados.

Antibiótico	Porcentaje de recuperación, %		— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2			
Oxitetraciclina	142	137	137	4	3
Tetraciclina	141	135	135	4	3
Cloranfenicol	47	49	48	1,4	2,9
SDZ	93	99	96	4,2	4,4
SMX	90	97	93,5	5	5,2
SDX	100	102	101	1,4	1,4
SDM	91	98	94,5	5	5,2
SQX	79	83	81	2,8	3,4
SPY	107	99	103	5,6	5,5

Tabla 25. Reproducibilidad de la extracción para el análisis de una muestra de carne enriquecida y extraída por el método *QuEChERS*.

Antibiótico	Porcentaje de recuperación, %		— X	S	CV, %
	Medida 1	Medida 2			
Oxitetraciclina	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	69	67	68	1,4	2
SDZ	-	-	-	-	-
SMX	-	-	-	-	-
SDX	102	97	99,5	3,5	3,5
SDM	80	76	78	2,8	3,6
SQX	83	75	79	5,6	7,1
SPY	41	37	39	2,8	7,3

7. CONCLUSIONES

El método normalizado para la extracción de antibióticos, presentó porcentajes de recuperación entre el 47-142%; con el método *QuEChERS*, para la determinación de las tetraciclinas, no se logró extraer una concentración detectable por el método cromatográfico.

En la extracción de la familia de sulfonamidas mediante el método *QuEChERS*, sólo se pudieron resolver tres (3) de los cinco (5) antibióticos pertenecientes, debido a la coelución de interferencias provenientes de los materiales y reactivos empleados en este método.

Los resultados obtenidos para la determinación de los niveles mínimos de cuantificación y detección de los métodos de extracción y cuantificación, son menores comparados con los reportados en los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios, según los entes, *Codex Alimentarius*, Unión Europea y Ministerio de Salud y Protección Social.

Se observó que los métodos de extracción normalizados para cada una de las familias de medicamentos veterinarios, presentaron mayores porcentajes de recuperación y mejores resultados (figuras de mérito), que los obtenidos en el estudio con el método *QuEChERS*.

El método analítico implementado de los procedimientos referenciados, acata las medidas establecidas por las buenas prácticas de laboratorio, BPL, con respecto a las repetibilidades de los tiempos de retención (C.V, 0 – 0,5 %), las áreas cromatográficas (C.V, 1,2 – 10,2 %), la obtención de coeficientes de determinación ($R^2 > 0.99$) y una exactitud expresada como el porcentaje de recuperación (47 – 142 %) para el método de calibración externa para HPLC-DAD. Con esto se

garantizó la realización reproducible del análisis cualitativo y cuantitativo de los medicamentos veterinarios contenidos en las soluciones patrón bajo estudio.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios mediante la variación de solventes apropiados para la implementación de los *QuEChERS*, en los cuales se tenga presente, la polaridad, pH y demás características de los analitos de interés, con el fin de lograr una extracción buena y detectable por el método cromatográfico.

Realizar los procedimientos de extracción y *clean up* de los antibióticos en muestras de carne bovina en el mismo día de determinación y análisis; para obtener resultados confiables.

Proteger muestras, patrones y soluciones de trabajo, de la incidencia de la luz UV; debido a la fotosensibilidad de los analitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. CHACÓN, K, M., GONZÁLEZ, A, F., Determinación de residuos de algunas hormonas y drogas veterinarias en carne de bovino, Bucaramanga, 2011. Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

[2]. ELLIN, M., Veterinary drug residues in processed meats-potential health risk: A review of the scientific literature. Food Research Institute Briefings: University of Wisconsin, Madison, 2006 [Sitio en Internet]. Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrgRes.pdf. Acceso: 04 de agosto de 2013.

[3]. REGLAMENTO (UE) Nº 37/2010 DE LA COMISIÓN, de 22 de diciembre de 2009. Diario Oficial de la Unión Europea. Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/residuos_medicamentos_veterinarios.shtml. Acceso: 27 de agosto de 2013.

[4]. REIG, M., TOLDRÁ, F., Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, Meat Science, 78 (2008), p.p. 60 – 67.

[5]. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 2004. Resolución 322/2004 del 24 febrero por la cual se adiciona un parágrafo a la resolución 889 de abril 10 de 2003 [Sitio en Internet]. Disponible en: www.ica.gov.co/getattachment/0b6851f0-587c-44b9-a953-3295a13ae981/322.aspx Acceso: 20 agosto 2013.

[6]. LOZANO, M., ARIAS, D., Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama actual en Colombia, Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 21 (2008), p.p. 121-135.

[7]. Apuesta Exportadora Agropecuaria. Ganado bovino – carne [Sitio en Internet] Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/Apuesta%20Exportadora/005Ganado%20Bovino.pdf>. Acceso: 04 de agosto 2013.

[8]. KAIRUZ, L., Introducción al estudio de la composición de los alimentos. 1ª edición. Ed. Guadalupe Ltda., Bogotá, 2002, p. 27.

[9]. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). La prevención de los residuos de medicamentos veterinarios es responsabilidad de todos. Bogotá, DC, noviembre de 2000.

[10]. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución Número 00001382 de mayo 2 de 2013. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Normatividad/Resoluci%C3%B3n%201382%20de%202013.pdf> . Acceso: 27 de agosto de 2013.

[11]. Codex Alimentarius, International Food Standards, Codex Veterinary Drug Residue in Food Online Database. Updated up to the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission (2012). [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/standards/veterinary-drugs-mrls/en/>. Acceso: 27 de agosto de 2013.

[12]. WANG, J.; MACNEIL, J.; and KAY, F, J. Chemical analysis of antibiotic residues in food. A John Wiley & Sons, INC., Publication. 2012. p.p. 8 – 45.

- [13]. MARASHIELLO, C., DÍAZ, I. and GARCÍA, J.A., J. High Resol. Chromatogr., (1996), p.p. 165 – 168.
- [14]. ARDREY, R.E. Liquid chromatography–mass spectrometry. University of Huddersfield, Huddersfield, Wiley, New York, (2003), p.p.200-240.
- [15]. STOLKER, A., BRINKMAN, U., Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals, Journal of Chromatography A, 1067 (2005), p.p. 15 – 53.
- [16]. REIG, M., and TOLDRÁ, F., Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat, Food Analytical Methods, 1 (2008), p.p. 2–9.
- [17]. VAN EECKHOUT, N., VAN PETEGHEM, C., HELBO, V., New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products, The Analyst, 123 (1998), p.p. 2423–2427.
- [18]. Fssaí. Manual of methods of analysis of food, antibiotics and hormone residues. Food safety and standards authority of India ministry of health and Family Welfare. Government of India, New Delhi, (2012).
- [19]. AOAC Official Methods of Analysis, (2005), 995.09, Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues.
- [20]. Panreac. An ITW Company. Analytical Reagents & Fine Chemicals. Panreac lanza los tubos QuEChERS. Disponible en: <http://www.panreac.es/es/noticias/notas-de-prensa/160-quechers>. Acceso: 04 de septiembre de 2013.

[21]. Agilent Technologies, página web: <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/Sample-Preparation/QuEChERS/Pages/default.aspx>. Acceso: 25 de agosto de 2013.

[22]. NAKAJIMA, T., NAGANO, C., SASAMOTO, T., HAYASHI, H., KANDA, M., KANAI, S., TAKEBA, K., MATSUSHIMA, Y., and TAKANO, I. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS, *Food Hyg. Saf.Sci.* Vol. 53, No. 5 (2012), p.p. 243-253.

[23]. REZENDE, D.R., FILHO, N.F., and ROCHA, G.L. Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in liquid milk, milk powder and bovine muscle by LC-MS/MS, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29 (4), (2012), p.p. 559-570.

[24]. TOLDRÁ, F., and REIG, M., Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006), p.p. 482– 489.

[25]. BRIAN, S. *Infrared Spectral Interpretation*. CRC Press, New York, (1999), p.p. 75 – 124.

[26]. *Orphaned*, Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos. Disponible en: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=es&Expert=1916, Acceso: 04 de septiembre de 2013.

[27]. Quantitation and Confirmation of Sulfonamides by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS), CLG-SUL4.02, USFDA method of 04/22/2013.

[28]. CHRISTIE W, Gas Chromatography and Lipids, Ed. The Oily press Ltda.
Dundee, 1^a Edition, 1989, p 303

BIBLIOGRAFÍA

Agilent Technologies, página web: <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/Sample-Preparation/QuEChERS/Pages/default.aspx>. Acceso: 25 de agosto de 2013.

AOAC Official Methods of Analysis, (2005), 995.09, Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues.

Apuesta Exportadora Agropecuaria. Ganado bovino – carne [Sitio en Internet] Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/Apuesta%20Exportadora/005Ganado%20Bovino.pdf>. Acceso: 04 de agosto 2013.

ARDREY, R.E. Liquid chromatography–mass spectrometry. University of Huddersfield, Huddersfield, Wiley, New York, (2003), p.p.200-240.

BRIAN, S. Infrared Spectral Interpretation. CRC Press, New York, (1999), p.p. 75 – 124.

CHACÓN, K, M., GONZÁLEZ, A, F., Determinación de residuos de algunas hormonas y drogas veterinarias en carne de bovino, Bucaramanga, 2011. Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

CHRISTIE W, Gas Chromatography and Lipids, Ed. The Oily press Ltda. Dundee, 1ª Edition, 1989, p 303

Codex Alimentarius, International Food Standards, Codex Veterinary Drug Residue in Food Online Database. Updated up to the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission (2012). [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/standards/veterinary-drugs-mrls/en/>. Acceso: 27 de agosto de 2013.

ELLIN, M., Veterinary drug residues in processed meats-potential health risk: A review of the scientific literature. Food Research Institute Briefings: University of Wisconsin, Madison, 2006 [Sitio en Internet]. Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrgRes.pdf. Acceso: 04 de agosto de 2013.

Fssaí. Manual of methods of analysis of food, antibiotics and hormone residues. Food safety and standards authority of India ministry of health and Family Welfare. Government of India, New Delhi, (2012).

KAIRUZ, L., Introducción al estudio de la composición de los alimentos. 1^a edición. Ed. Guadalupe Ltda., Bogotá, 2002, p. 27.

LOZANO, M., ARIAS, D., Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama actual en Colombia, Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 21 (2008), p.p. 121-135.

MARASHIELLO, C., DÍAZ, I. and GARCÍA, J.A., J. High Resol. Chromatogr., (1996), p.p. 165 – 168.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 2004. Resolución 322/2004 del 24 febrero por la cual se adiciona un parágrafo a la resolución 889 de abril 10 de 2003 [Sitio en Internet]. Disponible en:

www.ica.gov.co/getattachment/0b6851f0-587c-44b9-a953-3295a13ae981/322.aspx Acceso: 20 agosto 2013.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). La prevención de los residuos de medicamentos veterinarios es responsabilidad de todos. Bogotá, DC, noviembre de 2000.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución Número 00001382 de mayo 2 de 2013. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Normatividad/Resoluci%C3%B3n%201382%20de%202013.pdf> . Acceso: 27 de agosto de 2013.

NAKAJIMA, T., NAGANO, C., SASAMOTO, T., HAYASHI, H., KANDA, M., KANAI, S., TAKEBA, K., MATSUSHIMA, Y., and TAKANO, I. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS, *Food Hyg. Saf.Sci.* Vol. 53, No. 5 (2012), p.p. 243-253.

Orphaned, Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos. Disponible en: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Ing=es&Expert=1916, Acceso: 04 de septiembre de 2013.

Panreac. An ITW Company. Analytical Reagents & Fine Chemicals. Panreac lanza los tubos QuEChERS. Disponible en: <http://www.panreac.es/es/noticias/notas-de-prensa/160-quechers>. Acceso: 04 de septiembre de 2013.

Quantitation and Confirmation of Sulfonamides by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS), CLG-SUL4.02, USFDA method of 04/22/2013.

REGLAMENTO (UE) N° 37/2010 DE LA COMISIÓN, de 22 de diciembre de 2009. Diario Oficial de la Unión Europea. Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/residuos_medicamentos_veterinarios.shtml. Acceso: 27 de agosto de 2013.

REIG, M., and TOLDRÁ, F., Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat, *Food Analytical Methods*, 1 (2008), p.p. 2–9.

REIG, M., TOLDRÁ, F., Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, *Meat Science*, 78 (2008), p.p. 60 – 67.

REZENDE, D.R., FILHO, N.F., and ROCHA, G.L. Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in liquid milk, milk powder and bovine muscle by LC-MS/MS, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29 (4), (2012), p.p. 559-570.

STOLKER, A., BRINKMAN, U., Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals, *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005), p.p. 15 – 53.

TOLDRÁ, F., and REIG, M., Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006), p.p. 482– 489.

VAN EECKHOUT, N., VAN PETEGHEM, C., HELBO, V., New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products, *The Analyst*, 123 (1998), p.p. 2423–2427.

WANG, J.; MACNEIL, J.; and KAY, F, J. Chemical analysis of antibiotic residues in food. A John Wiley & Sons, INC., Publication. 2012. p.p. 8 – 45.