

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ALGUNAS HORMONAS Y DROGAS
VETERINARIAS EN CARNE DE BOVINO**

**KATHERINE CHACÓN MADRID
ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011**

**DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ALGUNAS HORMONAS Y DROGAS
VETERINARIAS EN CARNE DE BOVINO**

**KATHERINE CHACÓN MADRID
ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico(a)**

Directores:

ELENA STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

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

2011

Dedicatoria:

***“A las personas que más amo en el mundo,
las que dan sentido a mi existencia
y por quienes son todos mis esfuerzos:
mi mami Rosa, mis hermanas Angie y Stephania,
y mi bebe hermosa, mi sobrina Geraldinne”.***

Katherine Chacón Madrid

Dedicatoria:

A mis abuelos Felipe, Ofelia y Josefina, que en paz descansen y en donde quiera que se encuentren, estoy seguro que comparten la misma felicidad por el logro alcanzado. A mis abuelos Oliverio y Marina, por todas sus enseñanzas de vida, por creer en mí y, entender que con humildad y tenacidad se pueden lograr nuestros sueños.

A mis padres Pablo y Marina por su apoyo durante esta etapa de mi vida, sus consejos de vida y por confiar en la realización de este proyecto. A mis hermanos Felipe, Giovanni, Diana y María, gracias a su apoyo nunca perdí la esperanza de progresar.

A patricia por su apoyo incondicional durante estos últimos años y por creer en mi.

A mis tios Felipe, Jorge, Nelly, Holguer, Oliverio, Gloria, Belly, Ruth, Gonzalo, Socorro, y demás familiares, un sentimiento de gratitud para todos ellos. Y por supuesto, a mi compañera de trabajo de grado Katherine Chacón, quien me enseñó lecciones de vida y que es posible la realización de nuestras metas trabajando en equipo.

Andrés González Suárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque sin su presencia nunca hubiera podido alcanzar esta meta.

A mi mami Rosa, mujer ejemplo de fortaleza, quién con su tenacidad me ha enseñado en la vida a luchar para alcanzar mis metas. A mis abuelos Juan y Rosa, padres maravillosos que con su amor me permitieron soñar con un día cada vez mejor. A mis hermanas Angie y Stephania, y a mi sobrina Geraldinne, quienes dan alegría a mi vida y me motivan cada día con su apoyo a seguir adelante.

A mi familia, que han ayudado en el proceso de aprendizaje por medio de su confianza.

A la Dra. Elena Stashenko y el Dr. Jairo R. Martínez, por su dirección en la ejecución de este proyecto, y su gran vocación docente. A los estudiantes de doctorado William Salgar y Deyanira Caballero, por su colaboración y sus enseñanzas.

Al Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, que suministró el soporte financiero para la realización del proyecto. Al Laboratorio de Bioquímica y todos sus integrantes, por contribuir con el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, Victicor, Alegando, Alejandra, Yulita, Mónica, Ligis, Carlangas, Andresillo; compañeros de trasnochos, rumbas, sufrimientos, y millones de alegrías, gracias porque ustedes saben que han sido una pieza importante en mi vida en estos últimos años.

Gracias a todos los adoro los que han contribuido con este sueño. Dios los siga bendiciendo.

Katherine Chacón Madrid

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora ELENA E. STASHENKO, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por permitirme ser receptor de sus conocimientos y por toda su colaboración en el desarrollo del proyecto. Al Doctor JAIRO RENE MARTINEZ, por sus valiosos aportes en la ejecución del presente trabajo. A los calificadores, Doctores JANETH AIDE PEREA y HERNANDO MONCALEANO por sus sugerencias.

A mi humilde pueblo Colombiano, que con el sudor de su frente contribuyeron de alguna manera en la financiación de mi educación. Al Laboratorio de Cromatografía, por la financiación en la ejecución de este proyecto.

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

A mis otros amigos del laboratorio, Mónica Martínez, Ligia Ochoa Freys Julio, Deiny Leticia, Nelson Galeano, Sandra Cavanzo, y la señorita Yamile Niño.

Al Laboratorio de Bioquímica y todos sus integrantes, entre ellos, Dr. Rodrigo Torres y sra., Víctor Hernández, Mónica Ruiz, Magaly Galvis, Sergio Gómez, por contribuir con el desarrollo de este trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización del presente trabajo, entre ellas Katherine Chacón, Yuly Prada, Sandra Herrera, Mónica Martínez, Mónica Herrera, Alexandra Bautista. Al médico veterinario Jomer Fierro, por los aportes en su campo de acción.

A “monpirri”, “doña mery” y demás vendedores ambulantes de las afueras de la universidad por alimentar cada día nuestros sueños.

Andrés Fernando González Suárez

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	24
1. ESTADO DEL ARTE	27
1.1. CARNE.....	27
1.1.1. Estructura.....	27
1.1.1.1. Tejidos.....	27
1.1.1.2. Cambios postmortem	28
1.1.1.2.1. Rigor mortis.....	28
1.1.1.2.2. Acondicionamiento o maduración.....	28
1.1.2. Composición química.....	29
1.1.2.1. Las carnes.....	29
1.1.2.2. El músculo.....	29
1.2. DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS	30
1.2.1. Definiciones	30
1.2.2. Obtención.....	31
1.2.3. Clasificación.	31
1.2.4. Metabolismo en bovinos.....	33
1.2.5. Residuos.....	33
1.2.5.1. Efectos indeseables en humanos.....	34
1.2.5.2. Niveles permisibles.....	35
1.2.5.2.1. Límite máximo para residuos.....	35
1.2.5.2.2. DL ₅₀	35
1.3. EXTRACCIÓN DE ANALITOS Y ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS ...	35
1.3.1. Proteínas.....	36
1.3.1.1. Precipitación de proteínas.....	36
1.3.1.2. Cuantificación de proteínas.....	38
1.3.1.2.1. Método de Bradford.....	38
1.3.2. Eliminación de lípidos.....	39
1.3.2.1. Extracción líquido-líquido por lotes.....	39
1.3.2.2. Extracción con sonicación.....	40
1.3.3. Limpieza de los extractos: Extracción en fase sólida (SPE).....	41
1.3.4. Análisis instrumental.....	43
1.3.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....	44
1.3.4.2. Cromatografía de gases.....	45
1.3.4.2.1. La derivación química.....	46
1.3.4.2.1.1. Acilación.....	48
1.3.4.2.1.2. Sililación.....	48
1.3.4.2.2. Detectores en el análisis GC de hormonas.....	49
1.3.4.2.2.1. Detector de ionización en llama.....	49
1.3.4.2.2.2. Detector selectivo de masas (MSD).....	50
2. CIENCIOMETRÍA.....	52
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	55
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS	55

3.1.1.	Reactivos y solventes.	55
3.1.2.	Material del laboratorio.	55
3.1.3.	Material de referencia certificado.	56
3.2.	MATERIAL CÁRNICO.	56
3.3.	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS POR HPLC.	57
3.3.1.	Pruebas preliminares para HPLC.	57
3.3.2.	Figuras analíticas de mérito.	58
3.4.	DERIVATIZACIÓN DE HORMONAS.	60
3.4.1.	Pruebas preliminares.	60
3.4.1.1.	Agente derivatizante.	60
3.4.1.2.	Solvente de reacción.	60
3.4.1.3.	Temperatura.	61
3.4.1.4.	Tiempo de reacción.	61
3.4.1.5.	Agitación.	61
3.4.1.6.	Modificador.	61
3.4.1.7.	Solvente de extracción.	61
3.4.2.	Determinación de las condiciones de derivatización.	61
3.4.3.	Formación de los productos acetilados.	62
3.4.3.1.	Evaluación de la relación molar hormona – anhídrido acético.	63
3.4.3.2.	Caracterización del derivado acetilado.	63
3.4.4.	Formación de productos sililados.	64
3.4.4.1.	Evaluación de la relación molar hormona – BSA.	64
3.4.4.2.	Caracterización del derivado sililado.	64
3.4.5.	Comparación y selección del agente derivatizante.	65
3.4.6.	Determinación de la estabilidad de los derivados tipo acetato de las hormonas.	65
3.5.	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE HORMONAS POR CROMATOLOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	66
3.5.1.	Análisis preliminares.	66
3.5.2.	Figuras analíticas de mérito.	67
3.6.	EXTRACCIÓN DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS EN MUESTRAS DE CARNE.	67
3.6.1.	Análisis de la concentración de proteínas con la prueba de Bradford.	68
3.6.1.1.	Variables significativas en la precipitación de proteínas.	69
3.6.2.	Extracción en fase sólida.	70
3.6.2.1.	Pruebas preliminares.	71
3.6.2.2.	Diseño experimental.	71
3.6.3.	Extracción exhaustiva.	72
3.6.4.	Figuras analíticas de mérito.	73
3.6.4.1.	Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.	73
3.6.4.2.	Robustez del método de extracción.	73

3.7. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL.....	73
3.7.1. Determinación:.....	73
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
4.1. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS POR HPLC-DAD.	75
4.1.1. Pruebas preliminares.....	75
4.1.1.1. Selección de la longitud de onda.	75
4.1.1.2. Selección de la fase móvil.....	76
4.1.1.3. Selección de temperatura para la fase móvil.	80
4.1.2. Figuras analíticas de mérito.....	86
4.1.2.1. Determinación del porcentaje de recuperación.	86
4.1.2.2. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método de HPLC.....	86
4.1.2.3. Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación para HPLC.	87
4.1.2.4. Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad para los tiempos de retención y el área en HPLC.	88
4.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVATIZACIÓN DE HORMONAS.....	91
4.2.1. Pruebas preliminares	91
4.2.1.1. Reacción de acetilación	92
4.2.1.2. Reacción de sililación.....	94
4.2.2. Caracterización por espectroscopia de infrarrojo de los derivados obtenidos de la testosterona.	97
4.2.2.1. Derivado Acetilado.....	98
4.2.2.1.1. Evaluación de la relación molar testosterona: anhídrido acético.	101
4.2.2.2. Derivado trimetilsililado.	101
4.2.2.2.1. Evaluación de la relación molar testosterona: BSA.....	103
4.2.3. Caracterización por espectrometría de masas de los derivados obtenidos de la testosterona.....	104
4.2.3.1. Análisis del espectro de masas del acetato de testosterona.....	107
4.2.3.2. Análisis del espectro de masas del derivado trimetilsililado de la testosterona.....	110
4.2.4. Selección del agente derivatizante.....	112
4.2.5. Estabilidad de los acil derivados.....	112
4.3. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	113
4.3.1. Parámetros del método de análisis cromatográfico con detector selectivo de masas.....	113
4.3.2. Figuras analíticas de mérito.....	115
4.3.2.1. Determinación del porcentaje de recuperación.	116
4.3.2.2. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.....	117
4.3.2.3. Determinación de los niveles de detección y cuantificación.....	117

4.3.2.4.	Evaluación de la repetibilidad del método para los tiempos de retención y el área	118
4.3.2.5.	Evaluación de la reproducibilidad del método para los tiempos de retención.	119
4.4.	EXTRACCIÓN DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS EN MUESTRAS DE CARNE	119
4.4.1.	Precipitación de proteínas: análisis de la prueba de Bradford	119
4.4.2.	Extracción en fase sólida: proceso de limpieza	122
4.4.2.1.	Pruebas preliminares.	122
4.4.2.2.	Diseño experimental.	123
4.4.2.2.1.	Análisis de la varianza.	125
4.4.2.2.2.	Mejores condiciones de clean-up:	128
4.4.3.	Extracción exhaustiva.	130
4.4.4.	Figuras analíticas de mérito	131
4.4.4.1.	Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.	131
4.4.4.2.	Robustez de la metodología de extracción.	132
4.5.	APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL	133
4.5.1.	Determinación:	133
5.	CONCLUSIONES	137
6.	RECOMENDACIONES	140
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	141
	BIBLIOGRAFÍA	146
	ANEXOS	151

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas para el desarrollo de la técnica SPE.	43
Figura 2. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia <i>Agilent Technologies 1200 Series</i>	57
Figura 3. Reacción de formación de derivados acetilados.....	62
Figura 4. Reacción de formación de derivados sililados.	64
Figura 5. Cromatógrafo de gases HP-5890A <i>Series II</i> acoplado a un espectrómetro de masas.	66
Figura 6. Diagrama de flujo para la extracción de drogas veterinarias y hormonas simultáneamente.	68
Figura 7. Procedimiento adicional para el análisis instrumental.....	69
Figura 8. Equipo para extracción en fase sólida, <i>Baker Spe-24G (J.T. Baker,</i> <i>Phillipsburg, NJ, EE.UU)</i>	70
Figura 9. Efecto de la variación de agua en la fase móvil, para el análisis isocrático de las drogas veterinarias y hormonas por HPLC.	76
Figura 10. Efecto de la viscosidad del solvente orgánico y la acidez de la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas por HPLC.....	77
Figura 11. Efecto del carácter ácido y un medio amortiguado en la fase móvil, para el análisis de drogas veterinarias y hormonas con HPLC.	78
Figura 12. Efecto del pH de la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas en alta concentración por HPLC.	79
Figura 13. Efecto del pH en la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas de baja concentración por HPLC.....	80
Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la resolución y tiempo de análisis de las hormonas y drogas veterinarias analizadas por HPLC.....	81
Figura 15. Perfil cromatográfico de las drogas veterinarias y hormonas, obtenido mediante HPLC-DAD, en la región de ultravioleta, con una columna apolar Zorbax Eclipse XDB C18.	83
Figura 16. Cromatogramas típicos obtenidos en la columna DB-5MS (60 m), de A. Testosterona sin derivar, B. Acetato de testosterona y C. TMS-Testosterona.....	92
Figura 17. Efecto de la temperatura en la reacción de acetilación de la testosterona.....	93
Figura 18. Efecto del solvente de extracción en la cantidad de derivado acetilado de la testosterona.	94
Figura 19. Efecto del solvente de extracción y temperatura de reacción en el derivado sililado de la testosterona.	95
Figura 20. Espectro de IR de la testosterona.	97
Figura 21. Estructura de un éster.	98
Figura 22. Espectro infrarrojo del acetato de testosterona (sintetizado con una relación molar de 1:50).....	99

Figura 23. Espectro de infrarrojo del acetato de testosterona. Ref. <i>Spectral Database of Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology of Japan</i>	100
Figura 24. Curva de relación molar entre testosterona: anhídrido acético.	101
Figura 25. Espectro IR del TMS-testosterona (obtenido usando relación molar testosterona:BSA 1:100).	103
Figura 26. Curva de relación molar entre testosterona:BSA.....	104
Figura 27. Espectro de masas de la testosterona obtenido de la base de datos <i>Willey</i>	105
Figura 28. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 260 y m/z 273 en el espectro de masas de la testosterona.	105
Figura 29. Ruta de fragmentación para la formación del ion pico de base m/z 124 en el espectro de masas de la testosterona.	106
Figura 30. Ruta de fragmentación para la formación del ion m/z 246 en el espectro de masas de la testosterona.	106
Figura 31. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 165 y m/z 147 en el espectro de masas de la testosterona.	107
Figura 32. Espectro de masas del acetato de testosterona obtenido de la base de datos <i>Willey</i>	108
Figura 33. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 288 y m/z 228 en el espectro de masas del acetato de testosterona.	108
Figura 34. A. Corriente iónica total y B. Espectro de masas del acetato de testosterona obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.....	109
Figura 35. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 270 y m/z 147 en el espectro de masas del acetato de testosterona.	110
Figura 36. Espectro de masas del TMS-Testosterona obtenido de la base de datos <i>Willey</i>	111
Figura 37. A. Corriente iónica total y B. Espectro de masas del derivado TMS-testosterona obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.....	111
Figura 38. Estabilidad de los acetatos preparados a partir de las hormonas.	113
Figura 39. Cromatograma de las hormonas acetiladas con los valores de resolución.	115
Figura 40. Diagramas de Pareto de efectos para las drogas veterinarias y hormonas analizadas.....	127
Figura 41. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de <i>clean.up</i> de la oxitetraciclina.	128
Figura 42. Comparación de los cromatogramas obtenidos mediante las extracciones consecutivas desarrolladas a la misma muestra enriquecida de hormonas y drogas veterinarias analizadas por HPLC.....	130
Figura 43. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda obtenidos a partir de los extractos de muestras de carne provenientes del mercado local de la ciudad de Bucaramanga, analizados por HPLC.....	135

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Análisis cuantitativo en la base de datos <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)</i>	53
Tabla 2. Análisis cuantitativo en la base de datos <i>Scopus</i>	54
Tabla 3. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.	56
Tabla 4. Selección de los parámetros de operación del equipo de cromatografía líquida.....	58
Tabla 5. Variables para la reacción de silylación y acetilación.	63
Tabla 6. Condiciones experimentales para la precipitación de proteínas totales usando solvente orgánico y sulfato de amonio.	70
Tabla 7. Matriz de experimentos 3 ²	72
Tabla 8. Longitud de onda de máxima absorción para cada analito.	75
Tabla 9. Parámetros cromatográficos para el análisis selectivo de drogas veterinarias y hormonas.	82
Tabla 10. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida.....	82
Tabla 11. Tiempo de retención de las drogas veterinarias y hormonas para el método desarrollado por HPLC.	84
Tabla 12. Porcentaje de recuperación de las drogas veterinarias y hormonas con el procedimiento de extracción propuesto a muestras de carne.	86
Tabla 13. Linealidad y sensibilidad del método por cromatografía líquida.	87
Tabla 14. Niveles de detección y cuantificación de drogas veterinarias y hormonas empleando HPLC.	88
Tabla 15. Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.....	89
Tabla 16. Repetibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.	89
Tabla 17. Reproducibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.	90
Tabla 18. Reproducibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.....	90
Tabla 19. Reacciones de derivatización desarrolladas para albendazol y testosterona con variación de algunos parámetros.	96
Tabla 20. Bandas de absorción en el espectro IR, características de los hidroxisteroides.	98
Tabla 21. Iones característicos en el espectro de masas del TMS-testosterona.	112
Tabla 22. Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los derivados de hormonas por HPLC/MSD.	114
Tabla 23. Tiempo de retención de las hormonas acetiladas para el método desarrollado por cromatografía de gases con detector selectivo de masas.	115
Tabla 24. Porcentaje de recuperación de las hormonas derivatizadas con el procedimiento de extracción propuesto para muestras de carne.	116

Tabla 25. Linealidad y sensibilidad del método para hormonas derivatizadas por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas.....	117
Tabla 26. Nivel de detección y cuantificación de las hormonas derivatizadas empleando cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas.	118
Tabla 27 Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC-MS para las hormonas acetiladas.....	118
Tabla 28 Repetibilidad de las áreas en el método desarrollado por GC-MS para hormonas acetiladas.....	118
Tabla 29. Reproducibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC-MS para hormonas acetiladas.	119
Tabla 30. Absorbancia registrada para las diferentes condiciones de extracción de la muestra y su comparación con muestras enriquecidas, medidas a una $\lambda=595$ nm.	121
Tabla 31. Parámetros de operación constantes durante el desarrollo del diseño experimental de SPE.	123
Tabla 32. Medida del error experimental de las drogas veterinarias y hormonas analizadas, para la evaluación del diseño factorial 3^2	124
Tabla 33. Matriz de relaciones de área para el diseño factorial 3^2 de drogas veterinarias y hormonas en SPE.	125
Tabla 34. Condiciones más favorables para el proceso de <i>clean-up</i> de cada una de las drogas veterinarias y hormonas.....	129
Tabla 35. Condiciones más favorables para el proceso de <i>clean-up</i> en la extracción simultánea de un grupo selecto de drogas veterinarias y hormonas en carne.....	129
Tabla 36. Porcentajes de recuperación evaluados por diferentes analistas para estimar la reproducibilidad en el proceso de extracción de las drogas veterinarias y hormonas.....	131
Tabla 37. Estimación de la robustez del proceso de extracción de las drogas veterinarias y hormonas.....	132

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Estructuras, propiedades toxicológicas y fisicoquímicas de las hormonas y drogas veterinarias.....	151
Anexo B. Obtención de hormonas a partir de colesterol. [3,10].....	155
Anexo C. Clasificación farmacológica de drogas veterinarias y hormonas.....	157
Anexo D. Comparación de los métodos más usados para la cuantificación de proteínas. [23,24 y 25].....	158
Anexo E. Comparación de técnicas de análisis de residuos de medicamentos veterinarios.....	160
Anexo F Curvas de calibración para cada una de las drogas veterinarias y hormonas analizados, siguiendo la metodología HPLC-DAD-UV-Vis.....	162
Anexo G. Espectro IR de 17- β -estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos <i>Spectral Database of Organic Compounds, National (SDBS)</i>	165
Anexo H. Espectro IR del acetato de estradiol obtenido experimentalmente	166
Anexo I Espectro IR del TMS-estradiol obtenido experimentalmente.....	167
Anexo J. Espectro de masas del acetato de boldenona obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos <i>Wiley</i>	168
Anexo K. Espectro de masas del acetato de estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos <i>Wiley</i>	169
Anexo L. Espectro de masas del TMS-boldenona obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos <i>Wiley</i>	170
Anexo M. Espectro de masas del TMS-estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos <i>Wiley</i>	171
Anexo N. Curvas de calibración para cada una de las hormonas acetiladas analizadas con la metodología GC-MS.....	172
Anexo O. Resultados, obtenidos por el <i>software</i> estadístico <i>Statgraphics Centurion XVI</i> , de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción en fase sólida de las drogas veterinarias y hormonas.....	173

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AA	Anhídrido acético
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
ALB	Albendazol
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de la varianza)
BLLE	<i>Batch Liquid- liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido por lotes)
BOL	Boldenona
BP	<i>Boiling Point</i> (Punto de ebullición)
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BSA	N,O- <i>bis</i> -Trimetilsililacetamida
BSTFA	N,O- <i>bis</i> -Trimetilsililtrifluoroacetamida
CE	Comunidad Europea
CSVSP	Comité Científico de Medidas Veterinarias para Protección de la Salud Pública
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector por arreglo de diodos)
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
Dec	Temperatura de descomposición
DL₅₀	Dosis Letal media
DMF	Dimetilformamida
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EU	<i>European Union</i> (Unión Europea)
EE.UU	Estados Unidos de Norteamérica
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización <i>electrospray</i>)
EST	17-β-Estradiol
FAO	<i>The Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de Naciones Unidas para Agricultura y Alimentos)

FEN	Fenbendazol
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> (Detector de fluorescencia)
FLU	Flunixin
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina de alta resolución)
ICA	Instituto Colombiano de Agricultura
IDA	Ingesta diaria aceptable
I.m	Intramuscular
I.v	Intravenosa
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
LC/MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida/Espectrometría de masas tándem)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
LMR	Límite máximo de residuo
m/z	Relación masa sobre carga
M⁺	Ion molecular
MP	<i>Melting Point</i> (Punto de fusión)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
MSTFA	N-metil-N- trimetilsililtrifluoroacetamida
NF	No fijado.
NMD	Nivel mínimo de detección
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
ODS	Octadecilsiloxano
OMS	Organización Mundial de la Salud

OTC	Clorhidrato de oxitetraciclina
PAHs	Hidrocarburos poliaromáticos
PVDF	Polivinil dimetilformamida
PM	Peso molecular
ppb	Partes por billón
R²	Coeficiente de determinación
RIA	<i>Radioimmunoassay</i> (Radioinmunoensayo)
RDL	Rango dinámico lineal
SDBS	<i>Spectral Database of Organic Compounds</i> (Base de datos spectral de compuestos orgánicos)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
S	Desviación estándar muestral
Sb	Desviación estándar de la pendiente de la recta
S_{y/x}	Desviación estándar de la recta
TES	Testosterona
TC	Clorhidrato de tetraciclina
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
TLC	Tratado de libre comercio
TMS	Trimetilsililados
t_{RR}	Tiempo de retención relativo
THF	Tetrahidrofurano
UV-VIS	Ultravioleta-visible
v.s.	Vía subcutánea

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ALGUNAS HORMONAS Y DROGAS VETERINARIAS EN CARNE DE BOVINO*

Autores: CHACÓN MADRID, Katherine y GONZÁLEZ SUARÉZ, Andrés Fernando**

Palabras claves: Hormonas, drogas veterinarias, carne de bovino, HPLC, GC/MS.

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, produciendo toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros. Por ello, es necesario monitorear los residuos de drogas veterinarias y hormonas empleando herramientas analíticas confiables tales como cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC/MS). Para cumplir con los requerimientos de consumo; acatando los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por organismos sanitarios internacionales.

En este trabajo de investigación, se implementó la metodología de análisis simultáneo por HPLC-DAD para la separación y cuantificación en matrices cárnicas de las drogas veterinarias: clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, flunixin, albendazol y fenbendazol; y las hormonas: testosterona, boldenona y 17- β - estradiol. Para la confirmación de las hormonas fue necesario derivatizar con anhídrido acético para su análisis por GC-MS. Las técnicas se caracterizaron por su buena reproducibilidad y resolución.

Adicionalmente, se estudió la recuperación de los analitos en las muestras de carne, implementando procesos de extracción que permitieron la precipitación de proteínas, extracción de lípidos. Además de la determinación de las mejores condiciones para el proceso de limpieza de los extractos por extracción en fase sólida (SPE).

Las técnicas desarrolladas se aplicaron para evaluar la presencia de hormonas y drogas veterinarias en muestras de carne adquiridas en el mercado local. Según los resultados, no hay presencia de estos analitos, por encima del nivel mínimo de detección de los sistemas empleados.

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

*Proyecto de grado

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

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF SOME HORMONES AND WASTE OF VETERINARY DRUGS IN BEEF*

Authors: CHACÓN MADRID, Katherine and GONZÁLEZ SUÁREZ, Andrés Fernando **

Keywords: hormones, veterinary drugs, beef, HPLC, GC / MS.

Veterinary drug residues in food of animal origin, products of low quality and are a health risk to consumers, resulting in acute or chronic toxicity, mutagenic and carcinogenic effects, physical developmental disorders, allergic reactions and resistance phenomena bacteria, among others. It is therefore necessary to monitor veterinary drug residues and hormones using reliable analytical tools such as high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) and gas chromatography coupled with mass detector (GC / MS). To meet consumption requirements, adhering to maximum residue limits (MRLs) set by international health agencies.

In this research, the methodology was implemented simultaneous analysis by HPLC-DAD for the separation and quantification in meat matrices of veterinary drugs: oxytetracycline hydrochloride, tetracycline hydrochloride, flunixin, albendazole and fenbendazole, and hormones: testosterone, boldenone and 17- β -estradiol. For confirmation of the hormone was derivatized with acetic anhydride required for analysis by GC-MS. The techniques are characterized by good reproducibility and resolution.

Additionally, we studied the recovery of the analytes in samples of meat, implementing processes that allowed the extraction of protein precipitation, extraction of lipids. In addition to determining the best conditions for the cleaning of the extracts by solid phase extraction (SPE).

The techniques developed were applied to evaluate the presence of hormones and veterinary drugs in meat samples purchased in local markets. Results indicated no presence of these analytes, above the minimum detection level of the systems.

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

* Graduation Project

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

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 empleo de estas sustancias debe estar reglamentado para preservar la salud del consumidor y la calidad final del alimento, debido a que la gran mayoría de estos productos permanecen como residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados. 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, con técnicas instrumentales confiables.

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. Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales regulen con fundamento científico los residuos de medicamentos de uso veterinario potencialmente peligrosos para la salud [1].

Las drogas veterinarias y las hormonas son herramientas importantes para la producción de alimentos cárnicos. Para Colombia como potencial exportador, existe una razón adicional dado que cualquier episodio marcado por la confirmación de alguno de estos residuos en carne, puede provocar la pérdida de confianza por parte de los mercados internacionales [2].

En la actualidad existen planes concretos de exportación de carne y leche bovina hacia los EE.UU., a través del tratado de libre comercio (TLC); Honduras, Nicaragua y Salvador, a través del Merconorte; Chile, Trinidad y Tobago, Rusia, Israel y la Unión Europea (EU). Dentro de las posibilidades de comercialización, para que Colombia alcance estas metas y asegure carne de bovino inocua y sana a sus ciudadanos, debe garantizarse entre otros aspectos, la calidad sanitaria de

los productos pecuarios, incluyendo el cumplimiento de los límites máximos de residuos (LMRs) de medicamentos veterinarios [3, 4]. La EU en su Directiva 96/23/CE tiene prohibido el uso de 17- β -estradiol, progesterona, testosterona, zeranol, acetato de trembolona, melengestrol y sus derivados e.g. boldenona. Además ha regulado un número considerable de otras drogas, tanto en su uso para estimular el crecimiento del animal, como para fines terapéuticos veterinarios [1, 2].

En 1985 se prohibió la producción e importación de carne y productos cárnicos de animales a los que se hubiera tratado con promotores de crecimiento, decisión que entró definitivamente en vigor en 1989, al comprobarse científicamente los efectos causados por residuos de estas sustancias en la carne. A pesar de la antigüedad de las normas internacionales existentes, éstas se comenzaron a adoptar sólo hasta hace poco en Colombia. Debido a la actual situación económica y comercial, se ha iniciado el proceso para prestar atención a esta problemática sanitaria y se han comenzado a tomar nuevas medidas, para conocer la cantidad residual de drogas veterinarias y de otras sustancias en los alimentos de origen animal producidos en el país, con lo cual se pretende lograr mayor competitividad de los productos pecuarios en los mercados internacionales [5].

Respecto al nivel de residuos de insumos pecuarios, el Instituto Colombiano de Agricultura (ICA) en sus resoluciones ha establecido que en caso de exportación se deben cumplir los estándares internacionales que el país importador exija y, a nivel local, no nombra ninguna metodología para el registro, control y seguimiento de los medicamentos empleados en ganadería [6, 7]. Por ende, en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander se aprovecharon los recursos tecnológicos disponibles para implementar el método de análisis. Se conoce, además, que en la actualidad existen laboratorios nacionales e internacionales que suministran un gran número de estos fármacos a través de su

libre comercialización. En muchos casos éstos son suministrados indiscriminadamente con fines económicos o, en su defecto, sin registro de control. Por ello, se debe prestar especial atención a la distribución de la droga veterinaria y sus metabolitos en el cuerpo del animal. Luego, es necesario identificar y cuantificar los niveles de residuos de drogas veterinarias con las herramientas analíticas, y de esta manera poder cumplir con los requerimientos de consumo, acatando los LMRs establecidos por los organismos sanitarios internacionales.

Los residuos de las hormonas, drogas veterinarias y sus metabolitos pueden ser estimados mediante dos tipos de métodos: *screening* y confirmatorios. Los métodos de *screening* tales como microbiológicos, inmunoensayos (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas = ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), son ensayos presuntivos que tienen como objetivo registrar la presencia de una o varias drogas en una muestra sospechosa. Sin embargo, presentan un amplio rango - y no específico-, de sensibilidad y especificidad. Por otra parte, los métodos de análisis rutinarios para la confirmación de estos residuos son: HPLC y cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas (GC-MS). A diferencia de los métodos de *screening*, éstos poseen elevada capacidad de cuantificación, especificidad, sensibilidad y, sobre todo, de identificación espectral [8].

Por lo anterior, en el presente proyecto se desarrollaron los métodos analíticos para la determinación de las hormonas: testosterona, 17- β -estradiol y boldenona por GC/MS con previa derivatización. Por su parte, estas hormonas, junto con las drogas veterinarias: albendazol, fenbendazol, clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina y flunixin, se analizaron simultáneamente usando HPLC con un detector de arreglo de diodos (DAD). Se evaluó el contenido de estas sustancias en muestras aleatorias de carne (músculo) provenientes del mercado local, con la metodología de extracción propuesta.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. CARNE

La carne es la parte comestible de los animales, principalmente proveniente del ganado bovino, aceptable para el consumo humano; catalogada como uno de los productos primarios, al igual que la leche y el huevo. Es el aspecto “*postmortem*” de los músculos del cuerpo del animal (bovino), junto con el tejido conectivo que los une y los rodea, los huesos, y la grasa intra e intermuscular [9].

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.

✓ Tejido muscular: El 30-40% del peso, en vivo, de la res está constituido por tejido muscular. 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.

✓ Tejido conectivo: El tejido conectivo está constituido básicamente por dos tipos de fibras: unas blancas y colaginosas compuestas principalmente por colágeno, y otras amarillas elásticas compuestas principalmente por elastina.

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 [9].

1.1.1.2. Cambios postmortem

1.1.1.2.1. Rigor mortis.

Inmediatamente después del sacrificio comienza el endurecimiento gradual de los músculos, que en el animal vivo eran blandos y flexibles. Con la muerte se interrumpe la circulación sanguínea a través del músculo, razón por la cual se inicia una serie de cambios en los tejidos. Al interrumpirse la circulación, cesa el suministro de oxígeno, y el metabolismo del glucógeno comienza a llevarse a cabo bajo condiciones anaeróbicas; es decir, cesa el proceso de respiración que da como resultado CO_2 , H_2O y adenosina trifosfato (ATP), y comienza la glicólisis que conduce a la formación de ácido láctico. Dicho proceso lleva entre sus consecuencias, dos de especial importancia: la acumulación de ácido láctico y la disminución paulatina de la concentración de ATP [9].

1.1.1.2.2. Acondicionamiento o maduración

La serie de cambios que ocurren durante el almacenamiento, de los cuales los dominantes en las primeras etapas son los que conducen al rigor, se conoce como acondicionamiento o maduración, y tiene como consecuencia el ablandamiento de la carne y el desarrollo de sabor y aroma [9].

Se ha establecido que los cambios más importantes durante el acondicionamiento ocurren en las proteínas, que sufren desnaturalización y posteriormente hidrólisis, y en menor escala en los lípidos, que presentan tendencia a la hidrólisis y posteriormente enranciamiento de los ácidos grasos libres. Debido a los bajos valores de pH alcanzados en el rigor, se presenta la desnaturalización de algunas proteínas, principalmente las del sarcoplasma; el colágeno, la elastina y las proteínas miofibrilares son desnaturalizadas en muy bajas proporciones [9].

La desnaturalización de la mioglobina, proteína sarcoplásmica que constituye el pigmento más importante de las carnes, acelera la oxidación de su hierro al estado

férrico con lo cual el pigmento pasa del color rojo a su forma carmelita. La manifestación postmortem más importante de la desnaturalización de las proteínas, en lo que atañe a la calidad de la carne, es la pérdida de la capacidad para retener agua, que incide directamente en la pérdida de jugosidad; el punto de mínima capacidad de retención de las principales proteínas del músculo es el pH 5.4-5.5 (punto isoeléctrico) [9].

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 [9]. Los componentes que presentan mayores variaciones son el agua y la grasa, que muestran entre sí una relación inversa; las carnes más gordas presentan los niveles más bajos para el contenido de agua [9].

1.1.2.2. El músculo.

Los componentes mayoritarios, son el agua (75 %) y el glucógeno, carbohidrato más abundante del músculo vivo. Las proteínas son los componentes sólidos más importantes y abundantes (19%) en el músculo y se han clasificado en tres grupos, miofibrilares (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.

Las sustancias solubles no proteicas nitrogenadas son la creatina y monofosfato de inosina, que dan las características de sabor y aroma de las carnes, y minerales (potasio, fósforo, sodio, magnesio, calcio, zinc y otros en trazas) [9].

Las carnes son una excelente fuente de vitamina complejo B; son fuentes muy pobres de vitamina A, ácido ascórbico y vitaminas D, E y K; y contienen una amplia cantidad de enzimas; todos éstos son los componentes minoritarios del músculo [9].

1.2. DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS

Las estructuras, propiedades toxicológicas y fisicoquímicas de las hormonas y drogas veterinarias que se analizaron se muestran en el **Anexo A** [10, 11, 12]. Éstas fueron elegidas tras un sondeo de los productos más comercializados en la región, por las casas veterinarias, y teniendo en cuenta la normatividad internacional en cuanto a las restricciones en el uso de estas hormonas y drogas veterinarias para la producción bovina y sus residuos de ellos en la carne.

1.2.1. Definiciones

Las sustancias farmacológicas o biológicamente activas de origen animal, vegetal o mineral, sea natural, sintético, semisintético o biotecnológico que se utilice para el diagnóstico, control o tratamiento de las enfermedades de los animales reciben el nombre de drogas veterinarias [5, 13, 14, 15].

Análogamente, toda droga o principio activo o mezcla de éstos, con o sin adición de sustancias auxiliares, presentada bajo una forma farmacéutica, en empaques o envases, rotulados, lista para su distribución y uso, empleado con fines de diagnóstico, prevención, control o tratamiento de las enfermedades de los animales, se denomina medicamento. Los principios activos son aquellos compuestos que ejercen la acción farmacológica. El compendio de drogas veterinarias, aprobadas oficialmente, empleadas en producción bovina con la finalidad del tratamiento o prevención de enfermedades, se llama fármacos [13, 14, 15].

Las hormonas, según su procedencia, pueden ser endógenas o exógenas. Las primeras, son sustancias segregadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas, como también por células epiteliales e intersticiales, con el fin de afectar la función de otras células (tejidos diana) [16, 17].

Se entiende por anabólicos a sustancias capaces de incrementar la retención de nitrógeno aumentando la acumulación de proteínas en los animales (FAO/OMS, Roma 1975). También existen otras sustancias promotoras del crecimiento, pero que al actuar por otros mecanismos no pueden considerarse anabólicos. Los resultados del empleo de un anabólico, por su eficiencia en los procesos de engorde y el crecimiento, tienen respaldo en experiencias demostrativas y en la práctica diaria. Muchos trabajos realizados en la década de los 80 mostraron en qué porcentaje la proteína del alimento se convierte en elemento constitutivo del organismo y cómo este porcentaje se incrementa con un implante anabolizante [2].

1.2.2. Obtención

Los principales tejidos de síntesis de las hormonas esteroideas son la corteza adrenal, ovario y testículos y, en menor medida, piel, hígado y riñón. Éstas tienen como sustrato de partida el colesterol, que sufre una serie de reacciones químicas que dan lugar a la formación de estradiol, progesterona y testosterona (**Anexo B**). A escala industrial la testosterona se sintetiza en cantidades casi ilimitadas y, a partir de ésta, la boldenona es obtenida vía enzimática; por un mecanismo que no se conoce perfectamente. La gran mayoría de drogas veterinarias provienen de síntesis orgánica a nivel industrial y otras obtenidas en medios de cultivo [3, 10].

1.2.3. Clasificación.

En la clasificación farmacológica de las drogas y las hormonas suministradas al ganado vacuno, mostrada en el **Anexo C**, se encuentran dos grupos grandes de

compuestos caracterizados por sus efectos anabólicos o farmacéuticos; dentro de los cuales se sub-clasifican las sustancias según sus propiedades o efectos [1, 2, 7,9,15,18].

La magnitud de la respuesta fisiológica depende además de la especie, el sexo, la composición de la ración, la vía de administración y la frecuencia, y por supuesto del tipo de sustancia utilizada. Los promotores del crecimiento pueden agruparse desde un punto de vista bioquímico como: naturales, xenobióticos no estilbenos, estilbenos, hormonas de crecimiento y compuestos afines y beta agonistas. Los compuestos naturales son hormonas generadas por el mismo organismo, cuya dosis para su función anabólica es significativamente menor que los niveles permanentes de la hormona en su función normal en el animal. Por lo tanto, la adición por vía de la ingesta de músculo implantado, es insignificante respecto de cualquier variación diaria en la fisiología en el ser humano; ellas son testosterona, estradiol y progesterona. Para el control de sus residuos en los animales, se establece un rango de valores, dentro de los niveles fisiológicos normales de animales no implantados [19, 20].

El LMR se establece por debajo del nivel de su actividad hormonal. La acción de las hormonas xenobióticas, como la de los esteroides naturales, se relaciona con el metabolismo protéico favoreciendo el crecimiento y la multiplicación celular. Aplicados en grados de concentración mayores que los necesarios para su acción hormonal, favorecen la aparición de células atípicas en mayor número en que normalmente se producen en el organismo. En estos casos es necesaria la aplicación de un LMR que esté en relación con la ingesta diaria aceptable (IDA), que es la cantidad que puede comer diariamente un ser humano sin riesgo de ningún tipo de síntoma [20].

Los compuestos más representativos de las hormonas exógenas son los anabólicos; éstos son sustancias androgénicas, que provocan un aumento en la

retención de nitrógeno, calcio, fósforo, sodio, potasio y cloro, e incrementan el peso corporal. Los compuestos androgénicos están relacionados químicamente con la testosterona, principal hormona masculinizante. Todos los anabólicos tienen como efectos secundarios condiciones masculinizantes [20].

1.2.4. Metabolismo en bovinos

Cuando se administra un medicamento veterinario a un animal, éste llega a la sangre, se distribuye por los tejidos en mayor o menor proporción de acuerdo con sus características fisicoquímicas y las de los tejidos que la reciben. Luego, se metaboliza principalmente a nivel del hígado o el riñón, para posteriormente ser eliminado (orina y heces). De acuerdo con su cinética de eliminación, un medicamento se podrá encontrar en concentraciones detectables en tejidos como el músculo e hígado, entre otros. La cantidad detectada, en primer lugar, depende del tiempo de retiro de los medicamentos veterinarios suministrados al animal vivo [10].

Existe una gran variedad de problemas fisiológicos y factores técnicos que pueden influir en la disposición de la droga en el cuerpo del animal y la formación de metabolitos, y por ende en su detección. Estados fisiológicos como la edad, dieta, el sexo o enfermedades pueden alterar la absorción, disposición y eliminación de las drogas. Más aún, formulaciones farmacéuticas pueden diferir en la biodisposición de los ingredientes activos. Todos estos factores pueden demorar la excreción de la droga y contribuir con la aparición de residuos imprevisibles que excedan los LMRs [10, 20].

1.2.5. Residuos.

Los principios activos y sus productos de degradación (metabolitos), presentes en los tejidos o en otros productos o subproductos alimenticios de origen animal, originados por tratamiento previo de los animales con sustancias químicas

(medicamentos, aditivos, biocidas/ plaguicidas), o bien por la presencia de estos compuestos en el medio ambiente o hábitat de los animales. De acuerdo con la naturaleza química de los residuos, se clasifican así: sustancia madre no modificada, metabolitos variados libres o conjugados y formas asociadas covalentemente a macromoléculas [21].

Los residuos para análisis son extraídos de tejidos o fluidos biológicos utilizando medios básicos o ácidos acuosos, disolventes orgánicos y/o hidrólisis con enzimas *e.g.* sulfatasa o glucoronidasa. Las condiciones de extracción deben ser tales que no se destruyan los compuestos de interés [21].

1.2.5.1. Efectos indeseables en humanos.

Las principales afecciones por los residuos de medicamentos veterinarios pueden clasificarse en dos grupos a saber: (1) efectos directos (hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, hemotoxicidad, ototoxicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad, *etc*), y (2) los indirectos (alergeno, resistencia bacteriana, alteración flora humana en el colon) [1].

La E.U. ha primado la protección sanitaria, aunque en cumplimiento de las exigencias internacionales la Comisión solicitó al Comité Científico de Medidas Veterinarias para Protección de la Salud Pública (CSVSP) que evaluara científicamente la medida y en este sentido, confirmó su dictamen de que la administración de hormonas de crecimiento al ganado puede generar riesgos para la salud de los consumidores. Estadísticas recientes demuestran que la hormona natural 17- β -estradiol debe ser considerada totalmente cancerígena, ya que tiene efectos en la formación y activación de tumores. Teniendo en cuenta ésto, la Comisión ha considerado improcedente levantar la prohibición de utilización de hormonas de crecimiento en la producción de carne de vacuno [1, 3].

1.2.5.2. Niveles permisibles

1.2.5.2.1. Límite máximo para residuos.

Es la 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 la Comisión del *Codex Alimentarius* recomienda que se permita legalmente o se reconozca como admisible dentro o en la superficie de un alimento que forma parte de la dieta habitual para una persona con un peso promedio de 60 kg [11].

1.2.5.2.2. DL₅₀

El DL₅₀ es la dosis letal para el 50% de una muestra analizada o población. Es la expresión más frecuente para valorar la potencia de los tóxicos. Para predecir la enfermedad o la muerte en un individuo son necesarias otras expresiones de la dosis, e.g., dosis máxima no tóxica, dosis máxima tolerada, dosis letal aproximada [22].

1.3. EXTRACCIÓN DE ANALITOS Y ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS

Las etapas básicas para la determinación de drogas veterinarias y hormonas en carnes son: muestreo, extracción del analito, limpieza, identificación, y cuantificación. En la etapa de muestreo la matriz a evaluar, debe ser representativa y la misma debe ser correctamente procesada. Mientras que en el análisis debe cumplirse con las siguientes condiciones: la extracción debe ser completa; la limpieza debe ser efectiva; la resolución cromatográfica debe ser adecuada; la determinación cuantitativa debe responder a la sensibilidad del detector y el método debe ser reproducible.

La separación de las drogas veterinarias y hormonas de la carne de bovino, así como la eliminación de interferencias, se debe realizar por una técnica compatible con el método de análisis instrumental utilizado. Por lo tanto hay que considerar

las propiedades de la matriz, los tipos de compuestos a analizar, los niveles de concentración de los analitos en la muestra y las consideraciones cualitativas y cuantitativas de los resultados que se obtendrán, para la elección adecuada del tratamiento de preparación de la muestra [19, 21].

Una vez mencionadas las etapas de preparación y análisis de las muestras cárnicas, se procede a la explicación detallada de cada uno, de tal forma que se siga una ruta clara para la determinación de drogas veterinarias y hormonas en carne de bovino.

1.3.1. Proteínas.

Conociendo que las proteínas son uno de los componentes sólidos más importantes y abundantes (19%) en el músculo y que los residuos de drogas veterinarias y hormonas pueden encontrarse conjugados en la carne de bovino con estas macromoléculas, se buscaron las condiciones de extracción que no destruyeran los compuestos de interés y que las separara de las sustancias que interferían, como las proteínas [9].

1.3.1.1. Precipitación de proteínas.

Todos los niveles estructurales de una proteína dependen de un conjunto de interacciones químicas. La conformación final refleja un equilibrio de estas fuerzas: interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van de Waals y los entrecruzamientos covalentes (uniones disulfuro) [23, 24, 25].

La conformación de una proteína nativa (funcional) es parcialmente estable. Cambios en el ambiente que la rodea pueden inducir modificaciones estructurales con pérdida de la función. Una pérdida de la estructura tridimensional suficiente para causar pérdida de la función se llama desnaturalización. Se forma un conjunto de cadenas polipeptídicas con distinto grado de plegamiento. La

desnaturalización no significa que siempre se obtenga la cadena polipeptídica totalmente desplegada. Los productos de desnaturalización en solución se agregan físicamente y según las condiciones de pH y fuerza iónica, precipitan [23 - 25].

La solubilidad de las proteínas es la resultante de dos fuerzas que se oponen, la atracción de moléculas de solvente por las moléculas de proteínas promueve su permanencia en solución, en cambio la atracción de moléculas de proteínas entre sí tiende a evitar su disolución; es decir, las proteínas tienden a ser solubles cuando tienen una carga neta (a valores de pH por encima o por debajo de sus puntos isoeléctricos). En cambio si se mezclan macromoléculas cargadas positiva y negativamente, la atracción electrostática hace que tiendan a asociarse unas con otras [23 - 25].

El objetivo de elegir un paso de purificación desnaturalizante es crear las condiciones bajo las cuales las proteínas se desnaturalicen y precipiten. Para ello tres aspectos son de gran importancia:

- ✓ La temperatura: Muchas proteínas se desnaturalizan por calor, que afecta las interacciones débiles como enlaces de hidrógeno. El cambio es abrupto, la pérdida de la estructura en una parte de la proteína desestabiliza el resto.
- ✓ El pH: cerca su punto isoeléctrico las proteínas tiendan a desnaturalizarse. Los pH extremos causan desnaturalización porque áreas de la molécula proteica adquieren cargas, causando repulsión; otras áreas pierden cargas, que estaban involucradas en mantener la estructura.
- ✓ Solventes orgánicos: Los solventes orgánicos miscibles con el agua como el etanol o acetona producen una variedad de efectos que, combinados, permiten la precipitación de proteínas. El principal efecto es la reducción del poder de solvatación del agua que puede ser explicado en términos de una reducción de su constante dieléctrica. La estructura ordenada del agua alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos es desplazada por el solvente. La agregación de las

moléculas proteicas se debe a las fuerzas electrostáticas y dipolares. La desnaturalización por solventes se debe a que las moléculas del solvente interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de las proteínas. Este proceso se ve favorecido a temperaturas superiores a 0 °C [23 - 25].

1.3.1.2. Cuantificación de proteínas.

En general, no hay un método completamente satisfactorio para medir la concentración de proteínas en una muestra. La elección del método depende de la naturaleza de la proteína, de los otros componentes de la muestra problema, de la rapidez y sensibilidad deseadas.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz ultravioleta (UV), b) para la formación de derivados químicos, o c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. En la **Anexo D**, se muestran algunos de los métodos utilizados para la cuantificación de proteínas con sus ventajas y desventajas más comunes [23 - 25].

1.3.1.2.1. Método de Bradford.

Se basa en la unión de un colorante, *Comassie Blue G-250* (también *Serva Blue*) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas: una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el del colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

El máximo de absorbancia del colorante azul de *Coomassie* en solución ácida varía de 495 a 595 nm tras añadir proteína debido a la estabilización de la forma aniónica del mismo por interacciones hidrofobias e iónicas. El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra [23].

1.3.2. Eliminación de lípidos.

Otro de los componentes mayoritarios del músculo que pueden estar unidos a los analitos y que son otra de las interferencias a eliminar para el análisis de las drogas veterinarias y hormonas en carne de bovino, son los lípidos que son grasa intramuscular, los cuales 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 [9].

Los métodos de extracción se emplean para lograr la separación de los analitos de la matriz, y efectuar una concentración de ellos antes de su análisis. La extracción con solventes se selecciona por la eficiencia, es decir, la afinidad del compuesto a extraer con el solvente de extracción, proporción de fases, número de extracciones a realizar. En esta extracción, los compuestos de interés se recuperan del volumen de la muestra y el solvente se puede remover del extracto sin afectar la composición de la muestra [26].

Algunas de las técnicas utilizadas para la extracción de lípidos son: extracción líquido-líquido por lotes (BLLE) y extracción con sonicación.

1.3.2.1. Extracción líquido-líquido por lotes.

La extracción líquido-líquido es una técnica útil en el análisis de matrices acuosas de carácter ambiental. Su principio se basa en la distribución o reparto de un analito entre una fase acuosa y el solvente de extracción, el cual en su mayoría de veces es de baja polaridad, como *n*-hexano, cloroformo o diclorometano. El cociente entre la concentración del analito en la fase orgánica y su concentración en la fase acuosa, se conoce con el nombre de coeficiente de partición; el cual depende del tipo de solvente orgánico elegido, la temperatura, el pH de la muestra y la cantidad de materia orgánica, entre otros factores. Por esta razón se hace necesario establecer los valores de estos parámetros durante la aplicación de esta

técnica, para lograr obtener buenos porcentajes de recuperación y reproducibilidad.

En la técnica de extracción líquido-líquido por lotes se utiliza un embudo de separación en el cual se coloca la muestra a un pH adecuado, según la naturaleza de los analitos, seguido de la adición de volúmenes determinados de solvente. La mezcla se agita y se retira la fase orgánica que contiene el analito, operación que puede ser repetida varias veces; los extractos son unidos, concentrados y analizados [27].

1.3.2.2. Extracción con sonicación.

Es un método que usa frecuencias ultrasónicas para romper o separar los analitos de los componentes de la matriz. Las ondas acústicas operan entre 400-600 W en el solvente que contiene la matriz. El mismo contenedor de la muestra también se sumerge en un baño de agua para la transmisión de la onda. La sonicación es rápida y efectiva para ciertas situaciones porque las cavidades aumentan la temperatura en una superficie particular creando un calentamiento localizado [28].

Los efectos de la temperatura relacionados con las fuerzas vibratorias permiten que el tiempo de las extracciones sea en minutos. A pesar de la rapidez de la extracción, la precisión y la reproducibilidad tienden a ser pobres. Este método proporciona un contacto más eficaz entre el sólido y el solvente, resultando en una mayor recuperación de los analitos. El tratamiento por inmersión en un baño sónico es usado para materiales granulares gruesos. El calentamiento que se puede tener en el baño sónico puede ser conveniente para aumentar la velocidad con la cual se alcanza la extracción [28].

1.3.3. Limpieza de los extractos: Extracción en fase sólida (SPE).

Es el método de extracción y *clean-up* usado ampliamente en el área de biomédica y ambiental, especialmente para el análisis de trazas. Este proceso es simple y rápido, involucra varios mecanismos de separación: adsorción, afinidad e intercambio iónico. La técnica se usa para contaminantes de baja, mediana y alta polaridad, dependiendo del sorbente utilizado [29 - 31].

Dos principales ventajas caracterizan esta técnica: la utilización de pequeñas cantidades de solvente y la operación rápida. Como consecuencia de la primera se utiliza poco material de vidrio, mientras que debido a la segunda, se hace posible que un gran número de extracciones se lleven a cabo en corto tiempo. Volúmenes grandes de muestra pueden ser manejados, usando pequeñas cantidades de solvente y fase sólida para la elución de los analitos. Dependiendo del rendimiento total de la muestra y de los compuestos a ser analizados, la extracción puede ser realizada tanto en cartuchos como en discos de membrana [29 - 31].

Los contaminantes orgánicos en la muestra son adsorbidos en la superficie sólida, de la cual ellos son eluidos por un solvente seleccionado apropiadamente, de acuerdo con la polaridad de los analitos.

Las etapas seguidas para SPE son las siguientes:

✓ Acondicionamiento del cartucho: mediante la adición de uno o dos volúmenes de solventes, correspondiente al de la columna, empleando tres solventes de diferente polaridad (por ejemplo, hexano, acetonitrilo, metanol) en forma secuencial, para preparar el material adsorbente de la columna y asegurar la retención reproducible de los compuestos de interés. El primer solvente que se adiciona corresponde a la polaridad de la columna, para eliminar posibles interferencias; seguido por uno o dos solventes de diferente polaridad,

asegurándose que el último solvente tenga igual polaridad en el que se encuentra la muestra.

- ✓ Adición de la muestra: ésta se aplica sobre el cartucho y corre a través de él con ayuda de vacío, manteniendo una velocidad de flujo constante de 1-10 mL/min para lograr buenos rendimientos.
- ✓ Lavado de la columna: el lavado se hace con un solvente cuya polaridad sea diferente a la de los analitos. Elimina interferencias de la columna retenidas durante la aplicación de la muestra. Además es necesario secar la columna, si es posible con flujo de nitrógeno, antes de la elución de la muestra.
- ✓ Elución de los analitos: los analitos son eluidos de la columna utilizando para ello 2-10 volúmenes del solvente apropiado, es decir, aquel que tenga la misma polaridad de los analitos [29 - 31].

Los extractos de muestra se deben concentrar mediante la evaporación del solvente. En la **Figura 1** se muestra el procedimiento, en el cual los compuestos de interés se retienen y las impurezas pasan a través del cartucho.

La selección del material adsorbente se basa en la polaridad de los contaminantes a ser analizados. Los adsorbentes hidrofóbicos retienen analitos no polares y permiten que las sustancias polares pasen a través de la columna y los adsorbentes hidrofílicos realizan el proceso contrario [29 - 31].

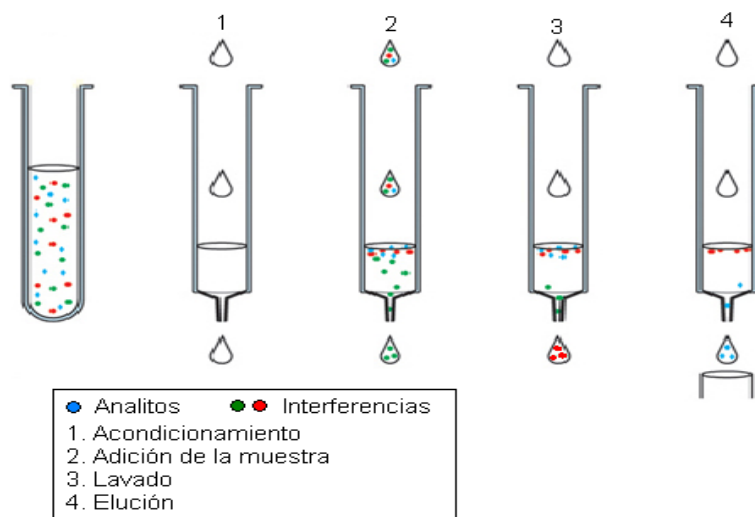


Figura 1. Etapas para el desarrollo de la técnica SPE.

1.3.4. Análisis instrumental.

El análisis de residuos en tejidos animales tiene como característica una matriz altamente compleja. La extracción y la detección de sustancias presentes en concentraciones en el orden de ng/g o ng/ml (1:1.000.000.000), o inclusive menores, debe realizarse con alta selectividad. Además, el continuo desarrollo de compuestos o formulaciones nuevas, o nuevas restricciones en el uso de anabólicos, nacional e internacionalmente, obliga a la búsqueda continua de nuevos métodos de análisis.

Las metodologías más difundidas son técnicas de cromatografía líquida y cromatografía de gases con detección por espectroscopia de masas, o técnicas inmunológicas como ELISA y radioinmunoensayo (RIA). Las primeras requieren equipamiento de muy alta complejidad y, por lo tanto, son técnicas caras. Las técnicas inmunológicas son más accesibles, pero sus características de especificidad, en especial los falsos positivos que producen por reacción cruzada con el anticuerpo, los condicionan como método de monitoreo y no de confirmación [32, 33].

Para cierto número de medicamentos veterinarios, se ha desarrollado una serie de métodos de preparación de muestra (extracción líquido-líquido, LLE, extracción en fase sólida, SPE) y análisis cromatográfico de diferentes matrices tales como músculo de bovino, tejidos de pescado, cordero, conejo y pollo. Los más relevantes comprenden determinaciones mediante HPLC con detectores UV, detector de fluorescencia (FLD), ionización *electrospray* - espectrometría de masas (ESI-MS). La principal desventaja es que para cada grupo de medicamentos veterinarios el método de preparación de muestra es diferente y es muy costosa la implementación de LC con MSⁿ; se requiere gran cantidad de solventes. En el **Anexo E**, se referencian las diferentes técnicas utilizadas en el análisis “*screening*” de residuos de drogas veterinarias y hormonas en alimentos de origen animal, de las cuales, la más idónea y asequible para este trabajo es HPLC [5, 32, 33].

1.3.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución.

HPLC es una de las técnicas más empleadas en los laboratorios analíticos, que permite el análisis de una gran variedad de moléculas orgánicas, de altos pesos moleculares y puntos de ebullición, a veces termolábiles, que no pueden ser analizados por cromatografía en fase gaseosa o que para ello requiere de 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 (PAHs), vitaminas liposolubles, e.g. [26, 34, 35].

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 utilizados es de 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 350 - 700 nm, y obtener tanto el respectivo cromatograma, como el espectro UV-Vis de cada uno de los picos observados en el cromatograma [34, 36].

Acetonitrilo, metanol, agua, son los solventes por excelencia más usados en cromatografía líquida como fase móvil, entre otros como tetrahidrofurano (THF). La separación de una mezcla de sustancias de diferente pK se logra mediante alguna de estas fases móviles o combinaciones de éstas [34]. Si el método cromatográfico emplea uno o más solventes cuya composición se mantiene constante durante el tiempo de análisis, se denomina una corrida isocrática. Por el contrario, el método de elución con gradiente se obtiene al modificar en algún instante de la corrida dicha mezcla de solventes. Análogamente a la cromatografía de gases, en donde la temperatura es fundamental para 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 aplican para aumentar la resolución del equipo [34, 36, 37].

1.3.4.2. Cromatografía de gases.

Es una técnica analítica que tiene como función separar e identificar las sustancias de mezclas complejas. Los compuestos eluyen de la columna cromatográfica según interacción con la fase estacionaria, que basa su poder de resolución en

propiedades como el peso molecular, la volatilidad, polaridad y estabilidad a la temperatura de analitos [34, 35, 37, 38, 39].

La detección consiste en el registro de una serie de picos cromatográficos que aparecen según la relación área-tiempo de retención, donde el área del pico es proporcional a la cantidad presente del analito y el tiempo de retención corresponde al tiempo transcurrido desde la inyección hasta la obtención del máximo del pico del compuesto de interés. La relación de los tiempos de retención de un compuesto con respecto al de un estándar, analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas, se denomina tiempo de retención relativo (t_{RR}), el cual se utiliza como parámetro para la identificación de un compuesto problema [34, 35, 37, 38, 39].

La cromatografía de gases utiliza un gas inerte como fase móvil (helio en la mayoría de aplicaciones), una gran variedad de columnas y detectores. Entre los más utilizados en el análisis biológico se encuentran: el detector de ionización en llama (FID) y el detector selectivo de masas (MSD) [34, 35, 37, 38, 39].

Se han logrado detectar algunas hormonas por esta técnica mediante la transformación de las moléculas originales a derivados metil y trimetilsilil. La derivatización incrementa la masa molecular de la sustancia de partida, pero disminuye su temperatura de ebullición. Por ende se desfavorece la descomposición térmica. Sin embargo, el tiempo de preparación de la muestra se incrementa e introduce más incertidumbre al análisis cuantitativo [19, 20, 32, 33].

1.3.4.2.1. La derivación química.

Lograr el análisis de las hormonas y analitos que por una o varias razones no presentan una volatilidad adecuada, ha merecido el estudio y desarrollo de la GC produciendo nuevos conceptos tanto en técnicas cromatográficas como en el desarrollo de material y equipo cromatográfico.

En muchos compuestos de interés biomédico y ambiental, las interacciones intermoleculares, resultado de fuerzas de dispersión o polares causadas por la presencia de grupos voluminosos o polares asociados a la sustancia, son los responsables tanto de la baja volatilidad, como de otros fenómenos tales como su inestabilidad térmica, que hacen casi imposible su análisis directo por GC [40, 41, 42].

Para mejorar la estabilidad térmica de estos compuestos se lleva a cabo su derivación química que surge como una técnica para superar tales inconvenientes. Por medio de una síntesis, a nivel de micro-escala, se obtienen derivados más volátiles y térmicamente estables. En muchos casos, las reacciones de derivación se realizan para convertir grupos funcionales protónicos en grupos no polares [39, 40, 41].

El proceso de derivación con frecuencia permite obtener picos más simétricos en GC, minimizando las interacciones excesivas con la fase estacionaria que conducen a una adsorción irreversible y la formación de picos asimétricos o su desaparición. Así mismo, la derivación surge como una herramienta para aumentar la detectabilidad de un compuesto por medio de la introducción de grupos orgánicos específicos hacia un detector particular, que ofrece una respuesta sensible y selectiva [38 - 42].

El criterio de selección de un agente derivatizante típico tiene dos rutas: la ruta orgánica que controla la volatilidad y proporciona la respuesta particular al detector selectivo; y la ruta reactiva que proporciona la medida por la cual la cadena orgánica es atacada por el sustrato. La elección del grupo reactivo controla el rango de aplicación y selectividad del agente para diferentes grupos funcionales y la velocidad de la reacción [39, 40].

El peso molecular alto de los compuestos esteroideos (hormonas) y la presencia de grupos polares en sus moléculas, las cuales, a su vez, con frecuencia no son estables bajo temperaturas altas, hacen que su análisis GC directo sea difícil y, a veces, imposible. A continuación se describirán los procedimientos de acilación y sililación recomendados para la derivación de hormonas antes de su análisis GC.

1.3.4.2.1.1. Acilación.

Esta derivación se usa en GC para aminas, fenoles, tioles y sustancias que contienen varios de estos grupos funcionales. La formación de los derivados acilo permite eliminar propiedades desfavorables de los grupos mencionados. Los derivados son menos polares que las sustancias originales y, con el reemplazo del hidrógeno activo por el grupo acilo, su tendencia a formar puentes de hidrógeno desaparece aumentando su volatilidad, de modo que los compuestos iniciales no volátiles o térmicamente inestables puedan ser analizados por GC [39 - 42].

La preparación de estos derivados consiste en la reacción de un exceso de agente acilante (usualmente el anhídrido del ácido correspondiente) en piridina, THF o cualquier otro solvente capaz de sujetar el ácido producido. La temperatura y tiempo de reacción dependen de las propiedades del sustrato y la reactividad del agente usado, y tienen influencia sustancial en el producto de reacción al igual que la cantidad y tipo de solvente [39 - 42].

1.3.4.2.1.2. Sililación.

Los agentes derivantes más versátiles y universalmente aplicados para moléculas polares que contienen grupos funcionales protónicos, son los compuestos alquilsililo, que pueden generar derivados éteres o ésteres alquilsililados [39 - 42].

Los agentes derivantes más comunes son los trimetilsililados (TMS), que se usan para impartir más estabilidad y mejorar las características de separación, aumentan la sensibilidad cuando se usan con detectores selectivos y proporcionan

espectros de masas que contienen gran información estructural. [38]. Un agente relativamente suave es el hexametildisiloxano (HMDS) usado para la sililación de grupos hidroxilos. Agentes fuertes tales como N, O-*bis*-trimetilsililacetamida (BSA), N,O-*bis*-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) y, N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), se usan para la sililación de grupos menos reactivos y de grupos estéricos [37, 38].

La velocidad de reacción de sililación se ve afectada por factores estéricos, el uso de un catalizador, la elección del solvente y la temperatura de reacción. Solventes polares tales como piridina, dimetilformamida (DMF), acetonitrilo, dioxano o THF promueven la reacción. El aumento de la temperatura de reacción mejora la solubilidad del analito y la velocidad de reacción. La piridina u otro solvente con una gran capacidad de solvatación (acetonitrilo, DMF) se usan como solventes en las reacciones de sililación [37, 38].

1.3.4.2.2. Detectores en el análisis GC de hormonas.

1.3.4.2.2.1. Detector de ionización en llama.

El FID es uno de los detectores universales usado para la gran mayoría de los compuestos orgánicos, tiene alta sensibilidad y estabilidad, bajo volumen muerto y respuesta lineal sobre un rango de concentraciones muy amplio; es de simple operación y apto para el uso prolongado [39].

El principio de funcionamiento del detector consiste en la medición de los iones generados por combustión de los compuestos orgánicos en una llama de hidrógeno y aire, a medida que ellos emergen de la columna. El gas *carrier* de la columna puede ser hidrógeno, o helio. El electrodo colector es cilíndrico y se coloca por encima de la llama y la corriente iónica se mide entre el colector y el tipo *jet* que alberga la columna [43].

Para prevenir la recombinación de los iones, se selecciona un potencial en la región de saturación, donde el incremento del potencial tiene un efecto relativamente pequeño sobre la corriente iónica. La señal de la corriente se pasa a un amplificador, el cual tendrá un rango lineal igual al del detector mismo y su valor se almacena en la memoria con el perfil GC o cromatograma [44].

1.3.4.2.2. Detector selectivo de masas (MSD).

La espectroscopia de masas ha llegado a ser una herramienta invaluable para la identificación de hormonas separadas por GC. El principio de la técnica consiste en la ionización de las moléculas orgánicas en fase vapor, con electrones, para formar iones cargados positivamente, los cuales pueden fragmentarse, por diferentes rutas, para dar fragmentos iónicos más pequeños. Estos iones son propulsados a través de un campo magnético o electrostático, y separados de acuerdo con su relación masa carga (m/z), ellos son colectados en secuencia a medida que la relación aumenta, la corriente iónica se amplifica para obtener finalmente un espectro de masas característico de cada molécula [43].

El pico más abundante, llamado pico base, está dado por un valor arbitrario de intensidad 100 y las intensidades de todos los otros iones se normalizan a éste. El ion de la molécula de origen se denomina ion molecular (M^+). Con instrumentos de baja resolución, los picos aparecen en números de unidades de masa nominal, pero usando alta resolución, las masas de los iones individuales pueden medirse con suficiente exactitud como para determinar la fórmula molecular elemental de cada uno [45].

En el desarrollo del presente trabajo de investigación se implementó la técnica de determinación de las drogas veterinarias y hormonas en carne de bovino, utilizando HPLC-DAD como técnica *screening* y GC-MSD como técnica confirmatoria para las hormonas derivadas. Fue necesaria la utilización de SPE

como técnica de limpieza de extractos, y la búsqueda de las condiciones de extracción simultánea de las 5 drogas veterinarias (flunixin, clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, albendazol y fenbendazol); y las 3 hormonas (testosterona, boldenona y 17- β -estradiol) que se escogieron para analizar debido a su gran uso en la zona de los Santanderes.

2. CIENCIOMETRÍA

Con la finalidad de conocer la actividad científica sobre el análisis de residuos de drogas veterinarias y hormonas en la carne de bovino, se aprovechó el análisis cuantitativo, usando las bases de datos que dispone la Universidad Industrial de Santander, *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0.)* y *Scopus*; cuyos resultados se plasman en las **Tablas 1** y **2**, respectivamente. Se analizaron los datos por autores, por países, así como la evolución de la cantidad de publicaciones en los últimos años y las áreas de interés, junto con las fuentes bibliográficas que más han reportado artículos y, el número de patentes; en el mes agosto del presente año. Estos datos muestran que Brasil y Argentina son los únicos países suramericanos que han publicado sobre el efecto de drogas veterinarias en el crecimiento y desarrollo de microorganismos y bacterias en diferentes familias promotoras de enfermedades en ganado bovino; sin embargo, en ninguna de esas publicaciones analizan los residuos de drogas veterinarias y hormonas en la carne; esto confirma la necesidad de impulsar los estudios sobre este tema en Colombia.

En las **Tablas 1** y **2**, se mencionan las ecuaciones de búsqueda que proporcionaron los artículos que guiaron el desarrollo de los experimentos del presente trabajo, para la implementación del método analítico de interés, tanto para la preparación de las muestras como para el análisis instrumental.

Los artículos encontrados en la búsqueda y de importancia para la investigación fueron: *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review* [32], *Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat* [19], *New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products* [3], *Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for*

detection [5], *Optimization of the chromatographic conditions for the determination of hormones by gas chromatography with mass spectrometry detection* [42], *Ultratrace detection of a wide range of anabolic steroids in by gas chromatography coupled to mass spectrometry* [21]. Las metodologías desarrolladas en estos trabajos de investigación se refieren al análisis de drogas veterinarias y hormonas por separado. Por ejemplo, el análisis de drogas veterinarias, generalmente se realiza por grupos según su clasificación farmacológica, antibióticos, e.g., y las hormonas se analizan a parte de las drogas veterinarias.

Tabla 1. Análisis cuantitativo en la base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)*.

(Nº de registros)	WEB OF SCIENCE			
	1 (72)	2 (6)	3 (123)	4 (25)
AÑO	2007 (14)	2007 (3)	2007 (21)	2006 (6)
	2005 (11)	2006 (2)	2002 (17)	2007 (6)
AUTOR	Chunh, ER (4)	De Brabander (2)	Cuthbert, R (4)	Castellaril, M (2)
	Meyer, HHD (4)	Le Bizec, B (2)	Gehring, R (4)	Garcia-Regueiro(2)
PAÍS	EE.UU. (13)	Bélgica (3)	EE.UU. (25)	Inglaterra (4)
	Francia (12)	Francia (2)	Inglaterra (22)	España (4)
	Brasil (4)	España (1)	Argentina (4)	Bélgica (3)
FUENTE DE PUBLICACIÓN	<i>Asian-Australasian journal of animal sciences.</i> (5)	<i>Analytica chimica acta</i> (2)	<i>Journal of veterinaty pharmacology and therapeutics</i> (7)	<i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> (3)
	<i>Meat science.</i> (5)	<i>Chromatographia</i> (1)	<i>Veterinary parasitology</i> (7)	<i>Preventive veterinary</i> (3)
ÁREA	<i>Agriculture, dairy & animal science</i> (37)	<i>Journal chromatography A</i> (1)	<i>Veterinary sciences</i> (50)	<i>Chemistry, analytical</i> (11)
	Genetics & heredity (9)	<i>Chemistry analytical</i> (4)	<i>Pharmacology & pharmacy</i> (24)	<i>Veterinary sciences</i> (10)
Fecha de búsqueda: 9 de Agosto de 2010				
1. <i>Topic=(hormone*) AND Topic=(meat of cattle) Timespan=All Years.</i>				
2. <i>Topic=(residue of hormone*) AND Topic=(determination) AND Topic=(meat) Timespan=All Years.</i>				
3. <i>Topic=(veterinary drug*) AND Topic=(cattle) Timespan=All Years.</i>				
4. <i>Topic=(veterinary drug*) AND Topic=(analysis) AND Topic=(cattle) Timespan=2001-2008.</i>				

El método desarrollado en el presente trabajo de investigación aporta un avance en el análisis simultáneo de las sustancias más comercializadas en Bucaramanga, Santander (albendazol, fenbendazol, clorhidrato de tetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, flunixin; testosterona, boldenona y 17- β -estradiol), y de esta manera ofrecer un respaldo técnico a los organismos de control nacionales en eventuales exportaciones del producto cárnico y, garantizar la seguridad alimentaria a los ciudadanos.

Tabla 2. Análisis cuantitativo en la base de datos *Scopus*

(Nº de registros)	SCOPUS			
	1 (1890)	2 (221)	3 (1993)	4 (1341)
AÑO	2007 (236)	2007 (35)	2007 (25)	2007 (190)
AUTOR	2006 (191) Hocquette (23)	2006 (21) Le Bizec, B. (14)	2001 (18) Meyer, HHD (9)	2006 (188) Zhao, S. (16)
PATENTES	Meyer, HHD (20) 4188	Meyer, HHD (13) 964	Brambilla G (7) 1716	White, D.G. (15) 1245
FUENTE DE PUBLICACIÓN	<i>Journal of Animal Science</i> (242) <i>Asian Australasian Journal of Animal Sciences</i> (53)	<i>Analytica Chimica Acta</i> (23) <i>Food Additives and Contaminants</i> (10)	<i>Journal of Animal Science</i> (12) <i>Analytica Chimica Acta</i> (8)	<i>Journal of Food Protection</i> (60) <i>Journal of Animal Science</i> (49)
ÁREA	<i>Agricultural and Biological Sciences</i> (1150) <i>Veterinary</i> (471)	<i>Chemistry</i> (104) <i>Agricultural and Biological Sciences</i> (68)	<i>Agricultural and Biological Sciences</i> (66) <i>Chemistry</i> (47)	<i>Agricultural and Biological Sciences</i> (517) <i>Immunology and Microbiology</i> (375)

Fecha de búsqueda 9 de Agosto de 2010

1. (ALL (hormone*) AND ALL (meat of cattle)).
2. ALL (residue*, hormone) AND ALL (determination, meat of cattle)).
3. (ALL (veterinary drug*) AND ALL (meat of cattle)).
4. (ALL (analysis, veterinary drug*) AND ALL (meat of cattle)).

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1. Reactivos y solventes.

Se emplearon los siguientes reactivos: diclorometano de J.T. Baker (México D.F., México), ácido clorhídrico 37% de Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), Hidróxido de sodio de Merck (Darmstand, Alemania), ácido fosfórico 85% Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), ácido fórmico 99% de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), agua HPLC de J.T. Baker (México D.F., México), n-Hexano de Merck (Darmstand, Alemania), metanol HPLC de J.T. Baker (México D.F., México), metanol de J.T. Baker (México D.F., México), Piridina de J.T. Baker (México D.F., México), Trifluoruro de boro en metanol de Merck (Darmstand, Alemania), Acetonitrilo HPLC Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), Acetonitrilo pestanal Riedel de Haen de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), Éter de petróleo suprasolv de Merck (Darmstand, Alemania), Etanol absoluto de J.T. Baker (México D.F., México), Anhídrido acético de J.T. Baker (México D.F., México), éter etílico de J.T. Baker (México D.F., México) N,O-Bis (trimetilsilil)-acetamida de Sigma Aldrich (Buchs, Suiza), N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida de Sigma-aldrich (Buchs, Suiza).

3.1.2. Material del laboratorio.

Se emplearon los siguientes materiales de laboratorio: Balanza analítica AG 285 *mettler Toledo*, centrífuga *CompactII Clay Adams*, rotaevaporador R-200/205 *Buchi Rotavapor*, *shaker* L002051 IKA*MS 3 *basic* (Wilmington, EE.UU), plancha de calentamiento D91126/MR HEI-ESTÁNDAR de *Heidolph* (Schwabach, Alemania), estufa secadora PL-325 *Fisher Scientific*, baño de agua recirculatorio CFT-25 *Cole-palmer* (Illinois, EE.UU), cronómetro digital Casio, baño ultrasónico LC-20H de *Ultrasonic* (Darmstadt, Alemania), potenciómetro MPC227 *Mettler Toledo* (Schwerzenbach, Suiza), pipetas volumétricas 1, 2, 5, 10 mL, balones

aforados de 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250 mL , vasos de precipitado de 25, 50,100, 600 mL, embudos de decantación, tubos de ensayo de *Scott* (Texas, EE.UU), micropipetas 2-20, 25-250, 100-1000 μ L, puntas plásticas para micropipetas, tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL de *Brand* (Wertheim, Alemania), jeringas plásticas, filtros de membrana en polivinil dimetilformamida (PVDF) de 0.45 μ m de *Millipore* (Sao Pablo, Brasil), microjeringa para inyección de 50 μ L de *Agilent Technologies* (Melbourne, Australia), Cartuchos ODS de J.T. Baker (México D.F., México).

3.1.3. Material de referencia certificado

En la **Tabla 3** se muestran las especificaciones de las sustancias empleadas como referencia en el desarrollo del proyecto.

Tabla 3. Especificaciones técnicas del material de referencia certificado.

Sustancia	Pureza, %	Número de lote	Proveedor
Albendazol	99	087K1078	Sigma-Aldrich
Fenbendazol	>99	044K0813	Sigma-Aldrich
Clorhidrato de tetraciclina	98	10097316	Alfa Aesar
Clorhidrato de oxitetraciclina	97	127K0757	Sigma-Aldrich
Flunixin	99.9	8112X	Fluka
Testosterona	>99	1384236	Fluka
17-β-estradiol	97	91K8804	Sigma-Aldrich
Boldenona	99	5080X	Riedel de Haen

3.2. MATERIAL CÁRNICO

La muestra de carne se identificó como músculo, en la región: “anca de pierna”, se tomaron muestras aleatoriamente en los diferentes centros de distribución del mercado en la ciudad de Bucaramanga.

3.3. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS POR HPLC

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 (**Figura 2**), 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, equipado con una columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm x 5 μm). El software *Agilent Chemstation* LC fue utilizado para el procesamiento de los datos.



Figura 2. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Agilent Technologies* 1200 Series.

3.3.1. Pruebas preliminares para HPLC.

El análisis simultáneo de las drogas veterinarias albendazol, fenbendazol, clorhidrato de tetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, flunixin; y las hormonas, testosterona, boldenona y 17- β -estradiol, se desarrolló con la exploración de

diferentes condiciones, tales como la composición de la fase móvil, temperatura del solvente y longitud de onda (**Tabla 4**).

Tabla 4. Selección de los parámetros de operación del equipo de cromatografía líquida

Longitud de onda

Se realizó un barrido en el rango de 200-600 nm, tomando los espectros ultravioleta de cada uno de los analitos, cuya longitud de onda de trabajo en cromatografía líquida fue en la cual se presentó la mayor absorbancia.

Fase móvil

Diferentes fases móviles fueron probadas, *i.e.* Metanol: Agua, Acetonitrilo: Agua, Metanol: Agua: Ácido acético, Acetonitrilo: Agua: Ácido acético, Acetonitrilo: Agua: Ácido ortofosfórico, Acetonitrilo: Buffer fosfato, Acetonitrilo: Agua: Ácido fórmico, utilizando una temperatura de 35 °C y un flujo de 1 mL/min.

Temperatura de la fase móvil

Se trabajaron tres temperaturas, 25, 30 y 35 °C, con la finalidad de establecer el efecto sobre los tiempos, orden de elución y resolución de los analitos, y la presión en la columna.

3.3.2. Figuras analíticas de mérito.

De acuerdo con las buenas prácticas del laboratorio se determinaron las siguientes figuras de mérito, para lo cual se desarrolló una curva de calibración por el método de estándar externo.

➤ **Solución *stock*:** Se preparó 1 mL de solución *stock* de: albendazol, fenbendazol, clorhidrato de tetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, flunixin, testosterona, boldenona, 17- β -estradiol en metanol grado HPLC de 1000 ppm de cada una de las sustancias.

- Soluciones de trabajo: Se calcularon los volúmenes necesarios de solución *stock* para preparar soluciones de 1 mL cuyas concentraciones son: 25, 50, 100, 150, 200, 220, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950, 1000, 1300, 1500, 1800, 2000 y 2500 partes por billón (ppb).
- Repetibilidad y reproducibilidad del método para tiempos de retención (t_R) y áreas. Los coeficientes de variación para el área y tiempo de retención permitieron evaluar la repetibilidad del método, esto se hizo en un punto de la curva de calibración. La reproducibilidad fue medida a través de la determinación de los coeficientes de variación para el área y tiempo de retención de la inyección de una misma solución *stock* por analistas diferentes.
- Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. La linealidad y sensibilidad del método se evaluaron empleando la curva de calibración realizada en el rango de 25-2500 ppb. La linealidad se evaluó en el rango de concentraciones en el cual la respuesta del detector a los analitos posee un comportamiento lineal, este valor se reportó como el cuadrado del coeficiente de varianza. La pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95% permitió establecer la sensibilidad.
- Determinación de los niveles de detección y cuantificación. Usando las curvas de calibración individuales obtenidas del procesador de datos se calculó $S_{y/x}$, para el nivel de detección se tomó tres veces este valor, y para el nivel de cuantificación como el doble del nivel de detección, es decir, seis veces el valor $S_{y/x}$.
- La exactitud expresada como el porcentaje de recuperación, para esto se adquirió una muestra de carne libre de hormonas y drogas veterinarias, cuyo ejemplar fue un tejido muscular de cabro (*post mortem*) silvestre, criado en el cañón del Chicamocha (Sur de Santander). Esta muestra se enriqueció con una

solución *stock* de concentración conocida y se le aplicó el procedimiento de extracción, y se analizó el extracto por el método cromatográfico desarrollado por HPLC.

3.4. DERIVATIZACIÓN DE HORMONAS.

El análisis de testosterona, boldenona y 17- β -estradiol requirió una etapa adicional; derivación, con el fin de mejorar su estabilidad térmica y aumentar su volatilidad. Por esta razón se realizaron pruebas preliminares con el fin de encontrar la mejor opción de derivación.

Con respecto a las drogas veterinarias no existe reporte de análisis por cromatografía de gases con previo proceso de derivatización, sin embargo, el albendazol es una de las sustancias tipo carbamato más accesible a las modificaciones químicas estructurales, por ello se aplicaron las metodologías propuestas a esta sustancia.

3.4.1. Pruebas preliminares.

3.4.1.1. Agente derivatizante.

Debido a la gran cantidad de agentes derivatizantes se probaron aquellos que tenían más probabilidad de formar derivados con sustratos tipo esteroide, tales como: MSTFA, BSTFA, BSA, Anhídrido acético, Anhídrido trifluoroacético (TFAA), y $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$.

3.4.1.2. Solvente de reacción.

De acuerdo con el agente derivatizante se empleó piridina, etanol, trifluoroetanol (TFE) y acetonitrilo como solventes de reacción.

3.4.1.3. Temperatura.

La temperatura ambiente se encuentra recomendada para la reacción de acilación, sin embargo, se trabajó a una temperatura diferente (50 °C), y la temperatura de las reacciones restantes se varió de acuerdo con reportes de la literatura (60, 80 y 100 °C).

3.4.1.4. Tiempo de reacción.

La formación de derivados trimetilsililados (TMS) es frecuente realizarla en 60 minutos de reacción. La reacción de acilación toma alrededor de 12 horas de reacción en la oscuridad, sin embargo se probó un tiempo de reacción de 24 horas.

3.4.1.5. Agitación.

Las reacciones de sililación y acilación se probaron con y sin agitación.

3.4.1.6. Modificador.

El acetato de sodio, cloruro de amonio y de sodio han sido reportados en reacciones de sililación como potenciales coadyudantes en la formación de derivados TMS.

3.4.1.7. Solvente de extracción.

El *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo e isoctano fueron empleados en algunas reacciones para establecer por medio del área del pico cromatográfico (GC-FID) del derivado, el solvente con mayor capacidad de extracción de la mezcla de reacción.

3.4.2. Determinación de las condiciones de derivatización.

De acuerdo con las pruebas preliminares se determinaron las variables más críticas para el desarrollo de la reacción de derivatización en el análisis de

hormonas por GC-MS, de este modo se desarrollaron experimentos para la reacción de acetilación y sililación (**Tabla 5**), de acuerdo con las variables de mayor influencia en cada proceso.

3.4.3. Formación de los productos acetilados.

El procedimiento para la obtención de los acetatos de las hormonas (**Figura 3**) se basó en el proceso de alcoholisis, donde el anhídrido acético reacciona con un alcohol para formar el respectivo éster y ácido acético. Se usó la piridina que actúa simultáneamente como agente capaz de disolver las hormonas, de catalizar la reacción y porque neutraliza el ácido generado en la reacción. Esta reacción se efectuó a temperatura ambiente, en la oscuridad por 12 horas. Posterior a este tiempo, se adicionó agua para precipitar el acetato y solubilizar la piridina en exceso, la solución se calentó a 50 °C por 5 minutos y se enfrió por el mismo lapso de tiempo a 4 °C. La extracción del derivado se hizo con las condiciones encontradas en los ensayos de variación de las condiciones más críticas.

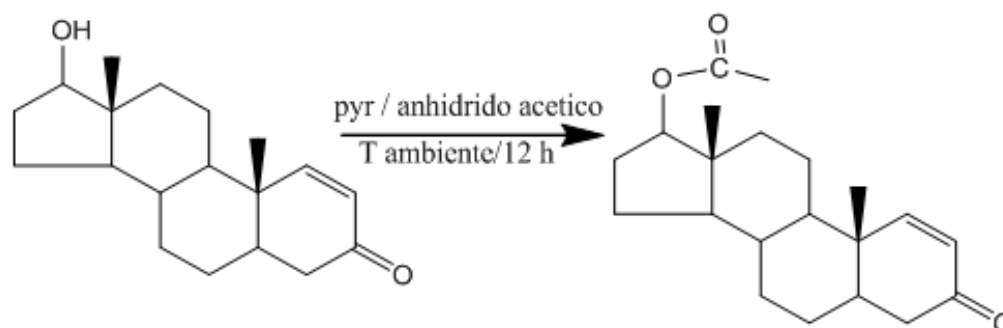


Figura 3. Reacción de formación de derivados acetilados.

Tabla 5. Variables para la reacción de sililación y acetilación.

Acetilación	
Solvente extracción	Diclorometano Hexano Hexano:Acetona (1:1)
Sililación	
Solvente de extracción	Diclorometano Hexano:Acetona (1:1)
Temperatura de reacción (°C)	60 80 100

3.4.3.1. Evaluación de la relación molar hormona – anhídrido acético.

Para asegurar que toda la cantidad de hormona reaccionara con anhídrido acético (AA) se adicionó un exceso de agente derivatizante. Se preparó el derivado acetilado de la hormona en relaciones molares de hormona: agente derivatizante de 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:3000.

3.4.3.2. Caracterización del derivado acetilado.

✓ Espectroscopía infrarojo. El espectro infrarojo se utilizó como herramienta para determinar la identidad de los grupos funcionales de las hormonas acetiladas y confirmar la relación molar adecuada de trabajo. Se utilizó un espectrofotómetro de infrarojo Avatar 360 FT-IR, Nicolet.

✓ Espectrometría de masas. Como técnica confirmatoria y para conocer el tiempo de elución de los acetatos de testosterona, 17- β -estradiol y boldenona, utilizando el cromatógrafo de gases mencionado, acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent Technologies 5973*), con temperatura de la cámara de ionización de 230 °C y la energía de los electrones bombardeantes de 70 eV, el

anализador cuadrupolar, operado en el modo de barrido completo, *full scan*, cambiando de radiofrecuencia en el intervalo de masas de m/z 40-550.

3.4.4. Formación de productos sililados.

El procedimiento para la obtención de los derivados TMS de las hormonas (**Figura 4**) se realizó de acuerdo con las condiciones encontradas en los ensayos de variación de las condiciones más críticas. La piridina actuó como disolvente de las hormonas y catalizador de la reacción. En esta reacción se adicionó BSA a la mezcla y se efectuó a la temperatura encontrada durante una hora con agitación continua. Luego de este tiempo se realizó el proceso de extracción.

3.4.4.1. Evaluación de la relación molar hormona – BSA.

Para asegurar que toda la cantidad de hormona reaccionara con el BSA se adicionó un exceso de agente derivatizante. Se preparó el TMS-hormona en relaciones molares de hormona: agente derivatizante de 1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:2000 y 1:3000.

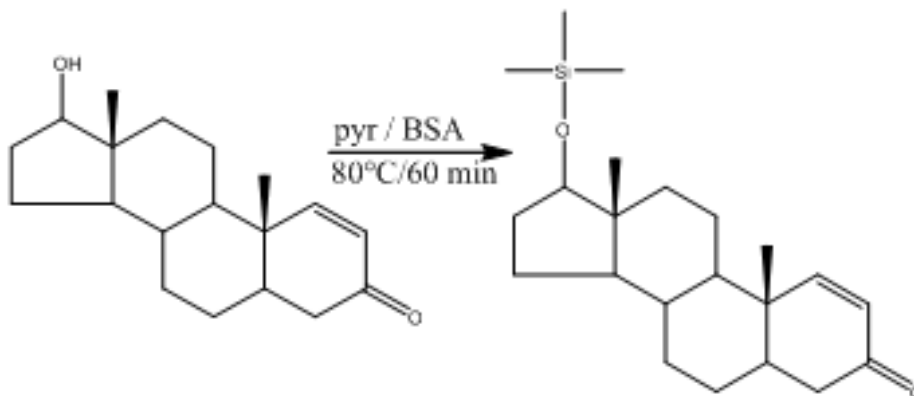


Figura 4. Reacción de formación de derivados sililados.

3.4.4.2. Caracterización del derivado sililado.

✓ Espectroscopía infrarojo. El espectro infrarojo se utilizó como herramienta para determinar la identidad de los grupos funcionales de las hormonas sililadas y

confirmar la relación molar adecuada de trabajo. Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo *Avatar 360 FT-IR, Nicolet*.

✓ Espectrometría de masas. Como técnica confirmatoria y para conocer el tiempo de elución de los TMS derivados de testosterona, 17- β -estradiol y boldenona, utilizando el cromatógrafo de gases mencionado, acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent Technologies 5973*), con temperatura de la cámara de ionización de 230 °C y la energía de los electrones bombardeantes de 70 eV, el analizador cuadrupolar, operado en el modo de barrido completo, *full scan*, cambiando de radiofrecuencia en el intervalo de masas de m/z 40-550.

3.4.5. Comparación y selección del agente derivatizante.

Después de obtener los derivados acetilado y trimetilsililado de las hormonas, y comparar los costos, manejo y facilidad de adquisición de los reactivos, facilidad de formación del derivado y cantidad de agente derivatizante requerido, se seleccionó el agente derivatizante conveniente, el cual se utilizó luego para la implementación y desarrollo del presente proyecto.

3.4.6. Determinación de la estabilidad de los derivados tipo acetato de las hormonas.

Para determinar la estabilidad de los derivados tipo acetato de las hormonas analizadas por GC-MS, se prepararon los derivados tomando 100 μ L de una solución *stock* de 1000 ppm de testosterona, 17- β -estradiol y boldenona y se derivatizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la **sección 3.4.3.**; seguidamente se inyectaron en el equipo GC-MS bajo las mismas condiciones, en diferentes días; para determinar la variación de las áreas de cada uno de los derivados.

3.5. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE HORMONAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se empleó un cromatógrafo de gases HP-5890A *Series II* (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA); con puertos de inyección *split/splitless* (inyección automática, HP 7683 *Series Injector*). Se utilizó un sistema de datos MS *ChemStation Rev.* (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA). **Figura 5.**



Figura 5. Cromatógrafo de gases HP-5890A *Series II* acoplado a un espectrómetro de masas.

3.5.1. Análisis preliminares.

Se trabajaron diferentes condiciones de operación del equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas. Se probaron diferentes rampas de calentamiento con el objetivo de resolver las tres hormonas derivadas y a su vez que tuvieran un tiempo de análisis corto.

3.5.2. Figuras analíticas de mérito.

Las figuras de mérito para cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas, se determinaron del mismo modo en que se procedió para la técnica HPLC-DAD (**sección 3.3.**).

3.6. EXTRACCIÓN DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS EN MUESTRAS DE CARNE.

En la **Figura 6**, se muestra el procedimiento de extracción para el análisis simultáneo de drogas veterinarias y hormonas por la técnica de HPLC y, las hormonas mediante GC-MS, previo proceso de derivación.

Las fracciones provenientes del paso de la muestra por el cartucho de SPE y la fracción de elución se mezclaron y mediante un proceso de concentración se llevaron a un volumen de 10 mL. De acuerdo con el equipo instrumental de análisis la **Figura 7**, muestra el procedimiento adicional al extracto obtenido por SPE.

La matriz objeto; carne, es una mezcla compleja de diversas familias químicas, entre estos encontramos los carbohidratos, las proteínas, las grasas y las vitaminas liposolubles, que en nuestro caso no solo representan potenciales interferencias, sino acortan la vida media de las columnas cromatográficas y sus accesorios. Por esta razón se hizo indispensable desarrollar pruebas para estimar la cantidad de proteínas residuales en el extracto. Además, se desarrolló un diseño experimental en la extracción en fase sólida, debido a que la limpieza de un extracto debe ser suficientemente selectiva con los analitos.

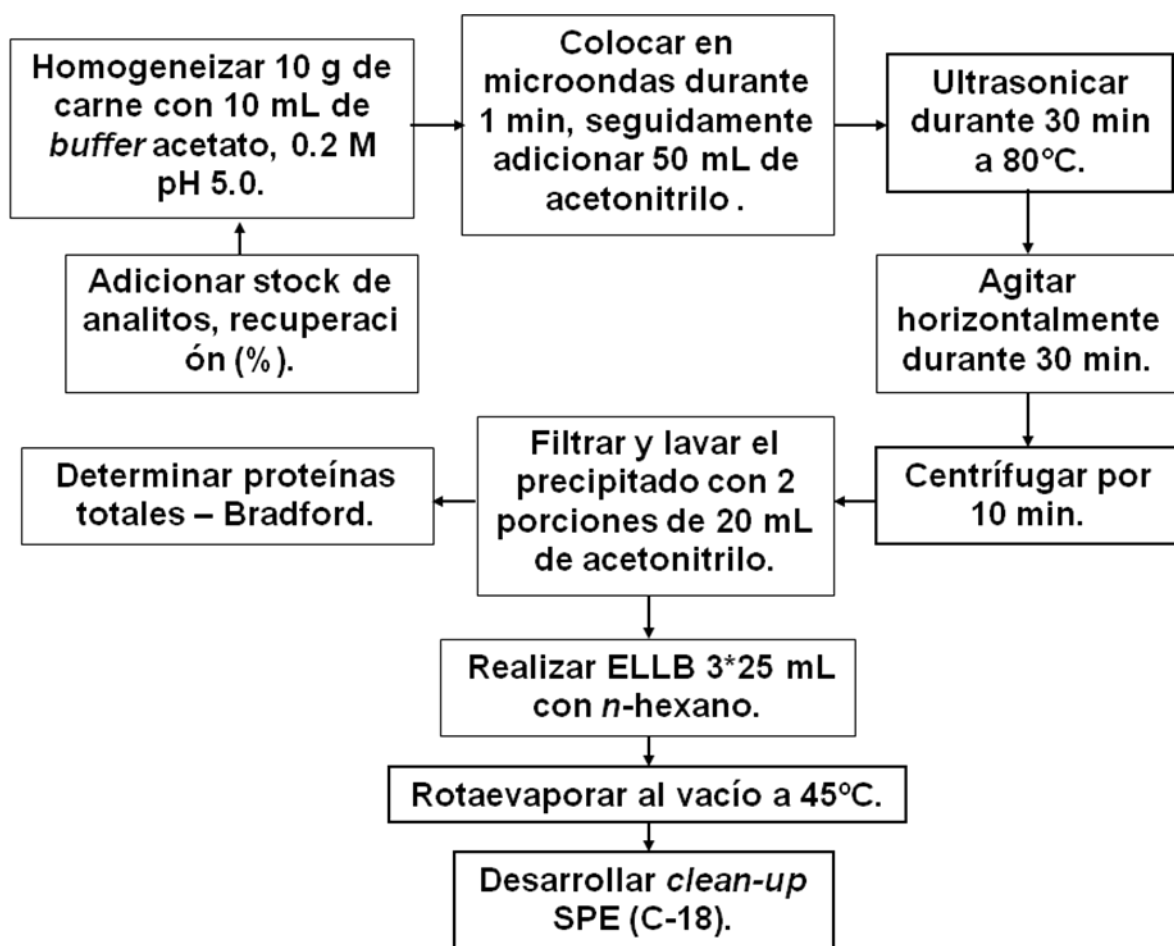


Figura 6. Diagrama de flujo para la extracción de drogas veterinarias y hormonas simultáneamente.

3.6.1. Análisis de la concentración de proteínas con la prueba de Bradford.

La prueba de Bradford es una técnica colorimétrica, cuyo principio de medición es la absorbancia debida a la formación de un complejo colorimétrico entre el reactivo azul de *Comassie* y la cantidad de proteínas presente, la respuesta del complejo a 595 nm es directamente proporcional a la cantidad de proteínas.

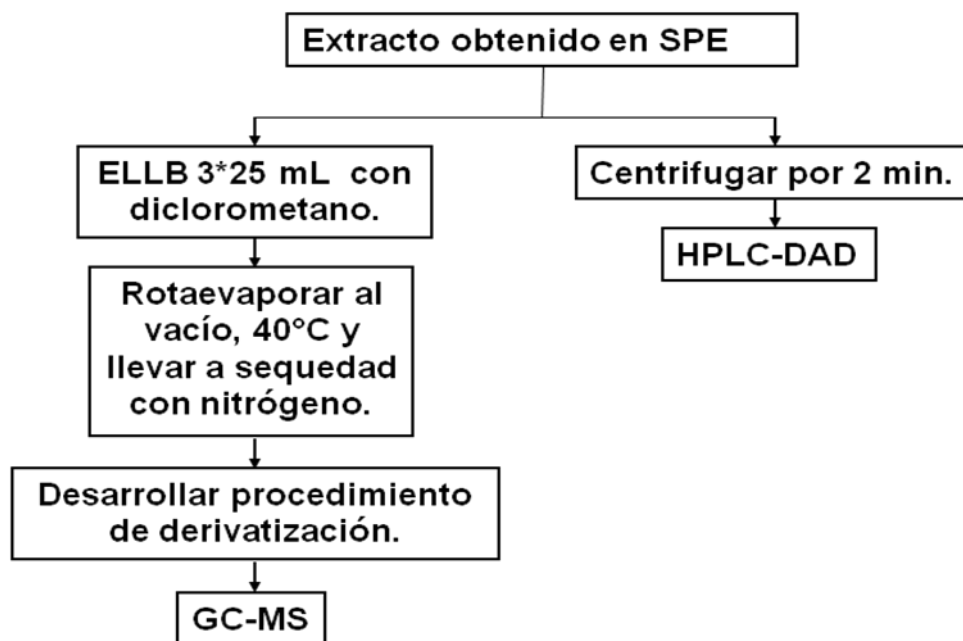


Figura 7. Procedimiento adicional para el análisis instrumental.

3.6.1.1. Variables significativas en la precipitación de proteínas.

Los solventes orgánicos empleados para la extracción de las drogas veterinarias y hormonas fueron metanol y acetonitrilo, que adicionalmente son ampliamente usados como agentes de precipitación de proteínas, sin embargo, la mezcla de estos solventes orgánicos con sulfato de amonio, es una combinación recomendada en la precipitación de todo tipo de proteínas [26]. En la **Tabla 11**, se muestran los experimentos desarrollados, considerando el tiempo de ultrasonido y agitación horizontal.

El procedimiento aplicado a cada uno de los extractos obtenidos de acuerdo con las condiciones de extracción mencionadas en la **Tabla 6**; se hizo tomando 2,5 mL de reactivo de *Bradford*, adicionándole 50 μ L del extracto de la muestra, con un tiempo de reacción de 10 minutos, y posterior lectura de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV-VIS.

Tabla 6. Condiciones experimentales para la precipitación de proteínas totales usando solvente orgánico y sulfato de amonio.

	Condiciones de extracción
	Metanol + sulfato de amonio, 15 min sonicación, 10 min centrifugación y 10 min <i>shaker</i> .
Muestra real	Acetonitrilo + sulfato de amonio, 15 min sonicación; 10 min centrifugación y 10 min <i>shaker</i> .
Muestra real enriquecida desde el inicio del procedimiento	Acetonitrilo + sulfato de amonio, 30 min sonicación, 10 min centrifugación y 20 min <i>shaker</i> .
Muestra real enriquecida luego de precipitación de proteínas	

3.6.2. Extracción en fase sólida.

Las columnas empleadas en la extracción en fase sólida (1000 mg fase octadecilo C₁₈ y 6 mL de volumen) fueron adquiridas de *J.T. Baker* (Phillipsburg, NJ, EE.UU), al igual que el procesador de columnas *Baker Spe-24G*, mostrado en la **Figura 8**.



Figura 8. Equipo para extracción en fase sólida, *Baker Spe-24G* (*J.T. Baker*, Phillipsburg, NJ, EE.UU).

3.6.2.1. Pruebas preliminares.

Para esta técnica se evaluó el pH de la muestra y el solvente de elución, trabajando bajo el siguiente procedimiento:

- ✓ Acondicionamiento: Considerando las características polares del extracto a limpiar por SPE, se adicionaron volúmenes de solventes correspondientes al de la columna (6 mL) de *n*-hexano, acetonitrilo y metanol adicionados respectivamente en orden creciente de polaridad, para el acondicionamiento del cartucho de octadecilsiloxano, para preparar este material absorbente y asegurar la retención reproducible de los compuestos de interés.
- ✓ Volumen de la muestra: Se empleó un volumen de muestra de 5 mL de una solución *stock* preparada en metanol de 5 ppm, valor recomendado para cartuchos de 1000 mg de relleno.
- ✓ Lavado del cartucho: Las drogas veterinarias y hormonas son insolubles en *n*-hexano, solvente empleado en esta etapa del proceso, para eliminación de interferencias de la matriz; se trabajó con 6 mL de este solvente. Seguidamente se dejaron secar los cartuchos.
- ✓ Solvente de elución: Debido a las diferentes características fisicoquímicas de los analitos se probaron metanol, *buffer* acetato y acetonitrilo adicionando cantidades de 6 mL, para recuperar la mayor cantidad de analitos que interactúan con la fase estacionaria del cartucho. El extracto obtenido fue concentrado a 10 mL y se almacenó bajo refrigeración para su posterior análisis cromatográfico.
- ✓ Flujo: Se probó un flujo de 1 y 2 gotas por segundo.

3.6.2.2. Diseño experimental.

Con la revisión bibliográfica y las pruebas preliminares se determinaron las variables más críticas durante el proceso de limpieza de SPE de los extractos cárnicos para el análisis de drogas veterinarias y hormonas, de este modo se desarrolló un diseño experimental 3^2 (**Tabla 7**), cuyas variables fueron el pH del

extracto de la muestra (A) y la mezcla binaria de solventes para la elución (B), cada una con tres niveles (-1,0,1).

Tabla 7. Matriz de experimentos 3^2 .

Experimento	A	B	A	B
1	-1	-1	5	Metanol- solución 2:1 metanol- <i>buffer</i> acetato 50 mM, pH=5.0.
2	0	-1	6	
3	1	-1	9	
4	-1	0	5	Acetonitrilo- solución 2:1 acetonitrilo- <i>buffer</i> acetato 50 mM, pH=5.0.
5	0	0	6	
6	1	0	9	
7	-1	1	5	Metanol- 1:1 metanol- acetato de etilo.
8	0	1	6	
9	1	1	9	

Para evaluar la eficiencia y reproducibilidad de la técnica, se trabajó con muestras enriquecidas de los patrones de hormonas y drogas veterinarias, al igual que un blanco; se realizaron réplicas en el punto medio del diseño de experimentos. Se compararon las áreas de los extractos obtenidos con las de la solución *stock* no sometida al proceso de *clean-up*.

3.6.3. Extracción exhaustiva.

Para determinar el número de veces necesarias para extraer la mayor cantidad de drogas veterinarias y hormonas de las muestras de carne antes del análisis por HPLC-DAD; se aplicó varias veces a una misma muestra de carne el procedimiento descrito en las **Figuras 6 y 7**, hasta que los analitos se encontraran en concentraciones por debajo del nivel de detección del equipo cromatográfico.

3.6.4. Figuras analíticas de mérito.

3.6.4.1. Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

El procedimiento de extracción se desarrolló por triplicado por dos analistas a una muestra de carne enriquecida con drogas veterinarias y hormonas, para comparar los coeficientes de variación de los porcentajes recuperación de cada analista y, de esta forma hallar la reproducibilidad del método de extracción.

3.6.4.2. Robustez del método de extracción.

En el procedimiento de extracción previo al análisis de las drogas veterinarias y hormonas por cromatografía líquida, una de las etapas contempla la extracción de grasas con *n*-hexano, debido a que cerca del 15% de una muestra de carne se compone de ácidos grasos (saturados e insaturados), triglicéridos, colesterol, y algunos fosfolípidos. Para verificar la robustez del método se sustituyó *n*-hexano por dietiléter y se compararon los coeficientes de variación de los porcentajes recuperación de cada analista.

3.7. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL

Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo, de cuatro muestras comerciales de carne vendidas en el mercado de la ciudad de Bucaramanga.

3.7.1. Determinación:

Se realizó el proceso de extracción descrito anteriormente, realizando cada una de las extracciones por duplicado, la determinación se realizó comparando los t_R con cada una de las drogas veterinarias y hormonas de referencia, con los picos observados en los cromatogramas obtenidos de los extractos de las matrices cárnicas, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas; esto para el proceso de HPLC-DAD.

Para el análisis de las hormonas por GC-MS, a los extractos analizados por HPLC-DAD se les realizó una extracción posterior y fueron sometidas al proceso de derivatización bajo las condiciones encontradas, y se analizaron los espectros de masas de los picos que tenían el mismo t_R de los patrones de hormonas derivadas.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS POR HPLC-DAD.

4.1.1. Pruebas preliminares.

En el análisis simultáneo de las drogas veterinarias albendazol (ALB), fenbendazol (FEB), clorhidrato de tetraciclina (TC), clorhidrato de oxitetraciclina (OTC), flunixin (FLU); y las hormonas, testosterona (TES), boldenona (BOL) y 17- β -estradiol (EST), se exploraron diferentes condiciones de operación del equipo, con las cuales se encontraron la composición de la fase móvil, temperatura del solvente y la longitud de onda.

4.1.1.1. Selección de la longitud de onda.

En el barrido de longitud de onda en el rango de 200-600 nm, tomando los espectros ultravioleta de cada uno de los analitos, se encontraron cuatro longitudes de onda para el análisis simultáneo por cromatografía líquida, las cuales fueron 230, 247, 270 y 280 nm (**Tabla 8**).

Tabla 8. Longitud de onda de máxima absorción para cada analito.

No.	Sustancia	λ , nm
1	Clorhidrato de oxitetraciclina	270
2	Clorhidrato de tetraciclina	
3	Albendazol	230
4	Fenbendazol	
5	Flunixin	280
6	17- β -estradiol	
7	Boldenona	247
8	Testosterona	

4.1.1.2. Selección de la fase móvil.

Diferentes fases móviles fueron probadas, *i.e.* metanol: agua, acetonitrilo: agua, metanol: agua: ácido acético, acetonitrilo: agua: ácido acético, utilizando una temperatura de 35 °C y un flujo de 1 mL/min.

En la **Figura 9**, se muestra el perfil obtenido mediante la corrida isocrática de la mezcla agua–metanol en diferentes proporciones. Un efecto directo del incremento en la cantidad de metanol en la composición de la fase móvil se reflejó en la sensibilidad del detector y en la disminución del tiempo de análisis cromatografico. Sin embargo, la resolución entre compuestos como albendazol y 17- β -estradiol está por debajo de 1.5. Por su parte la relación agua, 35%: metanol, 65%, permite la resolución de los compuestos que eluyen por encima de 5 minutos, aunque las TC y OTC poseen una respuesta muy baja, como ocurre en los demás cromatogramas con el incremento del porcentaje de agua.

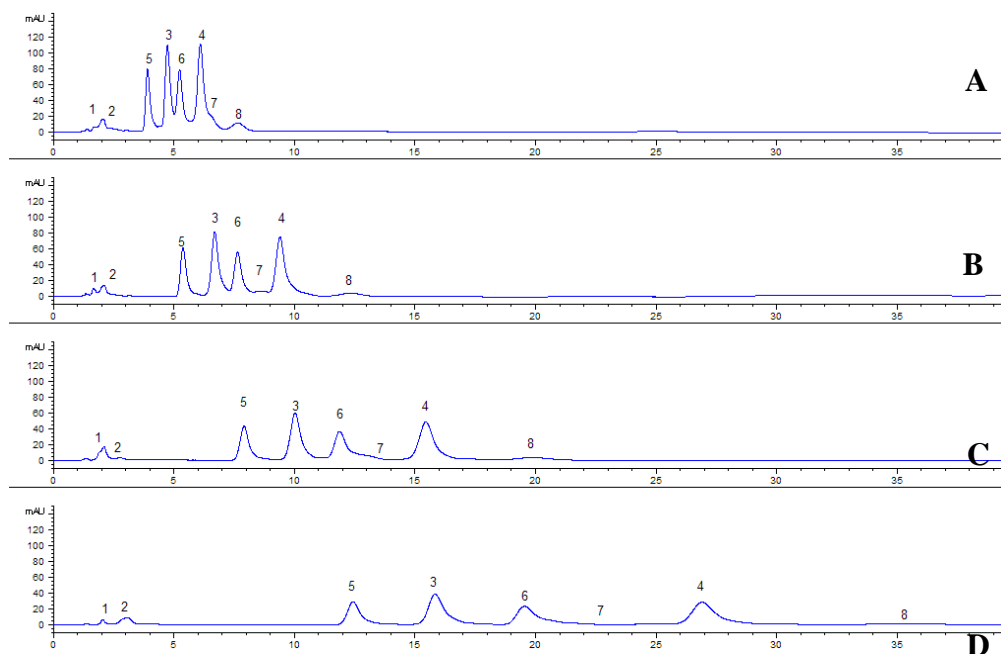


Figura 9. Efecto de la variación de agua en la fase móvil, para el análisis isocrático de las drogas veterinarias y hormonas por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas, analizadas isocráticamente por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. Fase móvil: **A.** Agua, 30%: metanol, 70%, **B.** Agua, 35%: metanol, 65%, **C.** Agua, 40%: metanol, 60%, **D.** Agua, 45%: metanol, 55%.

El análisis de drogas veterinarias y hormonas por cromatografía líquida se realiza en niveles de concentración del orden de ppb. Por ello se requirió el uso de agentes modificadores de la fase móvil con gradiente, tales como sustancias ácidas o sales inorgánicas como se muestra en las **Figuras 10 y 11.**

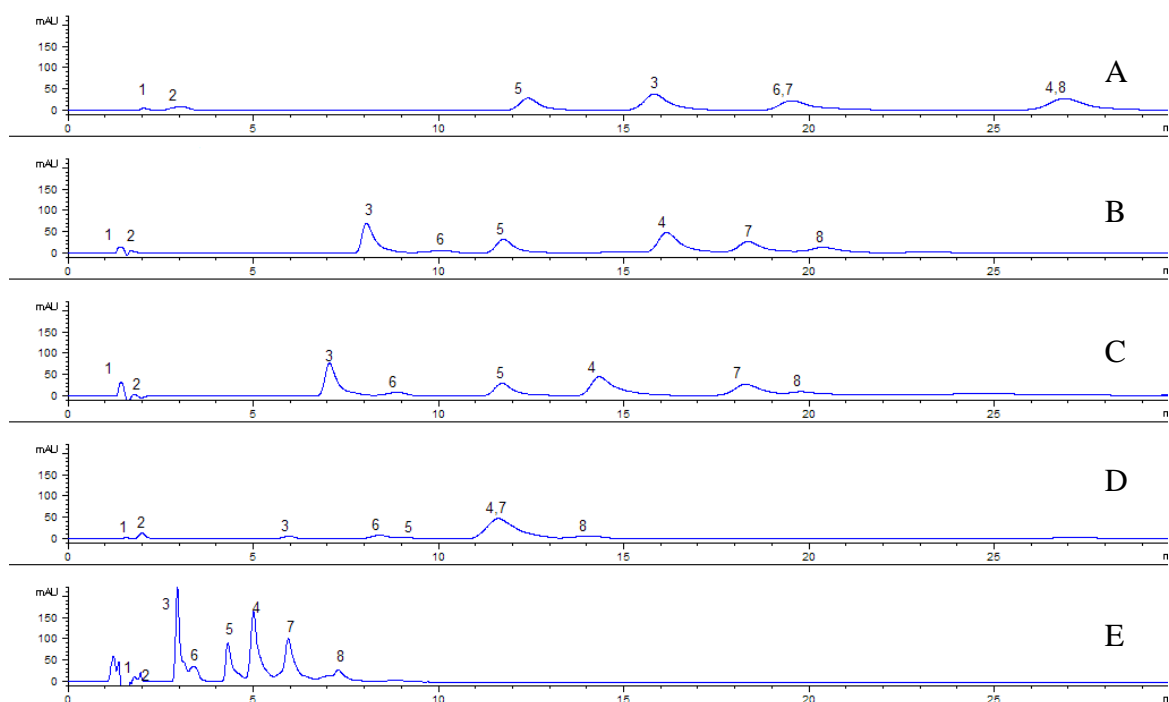


Figura 10. Efecto de la viscosidad del solvente orgánico y la acidez de la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. Fase móvil: **A.** Agua:metanol, **B.** Agua:ácido acético (100:0.1):metanol, **C.** Agua:ácido acético (100:0.2):metanol **D.** Agua:acetonitrilo, **E.** Agua:ácido acético (100:0.2):acetonitrilo.

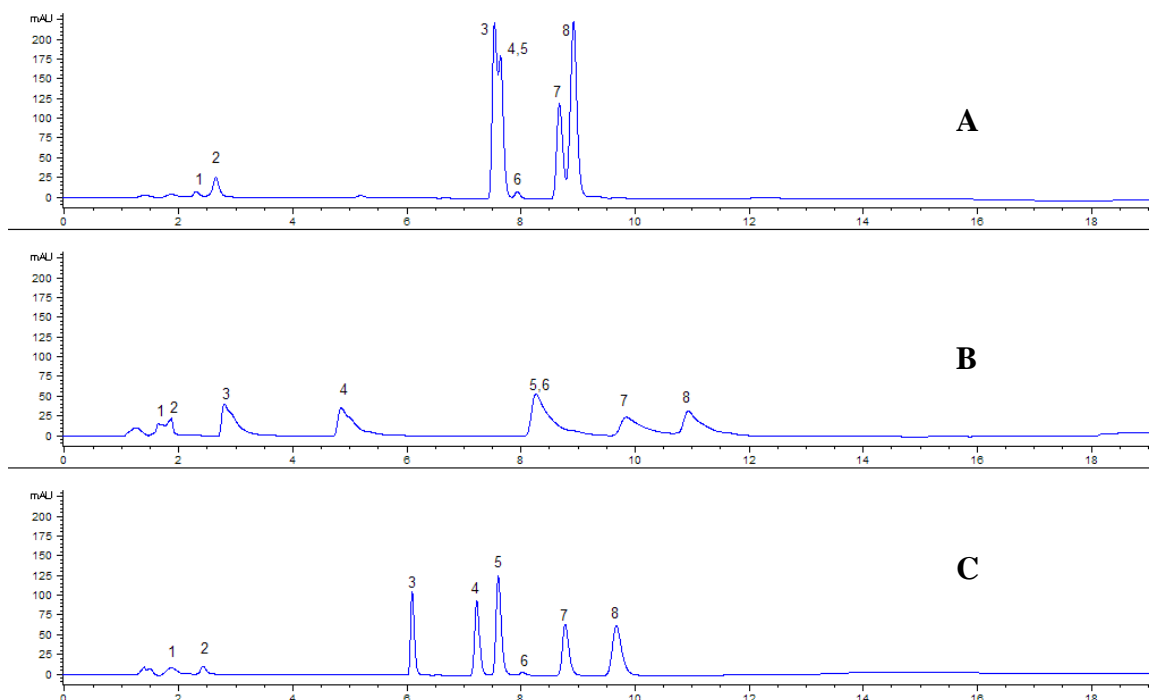


Figura 11. Efecto del carácter ácido y un medio amortiguado en la fase móvil, para el análisis de drogas veterinarias y hormonas con HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. Fase móvil: **A.** Buffer fosfato 25 mM pH. 6.50: acetonitrilo, **B.** Agua: ácido ortofosfórico (100:0.2): acetonitrilo, **C.** Agua: ácido fórmico (100:0.2): acetonitrilo.

La fase móvil que permitió los mejores resultados de separación fue agua acidulada con ácido fórmico al 0,2% y acetonitrilo. Con esta información se estudió el efecto del pH en la fase móvil seleccionada.

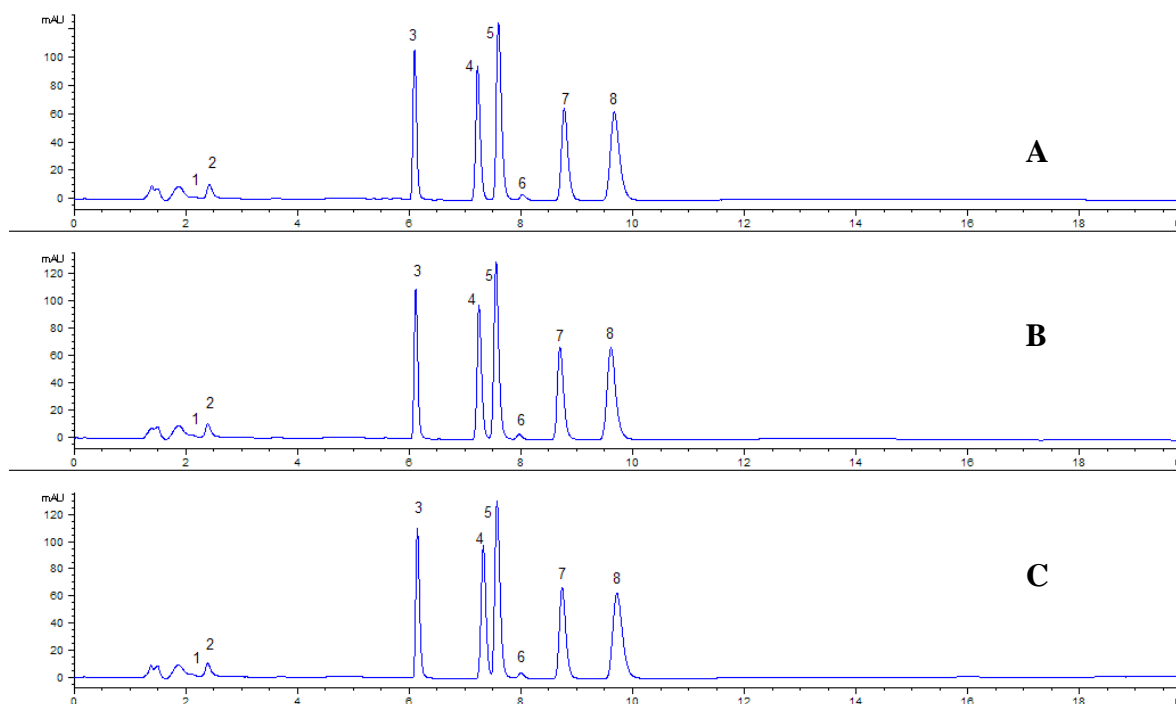


Figura 12. Efecto del pH de la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas en alta concentración por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas de alta concentración, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18 empleando como fase móvil: Agua: ácido fórmico (100:0.2): acetonitrilo, con variación del pH. **A.** pH=3.33, **B.** pH=3.37, **C.** pH=3.47.

El pH de la solución de ácido fórmico 0,2% en agua, no altera de manera significativa, la resolución y sensibilidad del método para las drogas veterinarias y hormonas en altas concentraciones, de acuerdo con los cromatogramas mostrados en la **Figura 12**. Sin embargo, en concentraciones cercanas al límite máximo de residuos de cada una de estas sustancias, se aprecia que la condición favorable de análisis cromatográfico es un pH de 3.33 para el agua acidulada con ácido fórmico, debido a que en los cromatogramas B y C de la **Figura 13**, se presentó el fenómeno de la coelución para el clorhidrato de oxitetraciclina con su

homólogo clorhidrato de tetraciclina y así mismo, fenbendazol con la hormona boldenona.

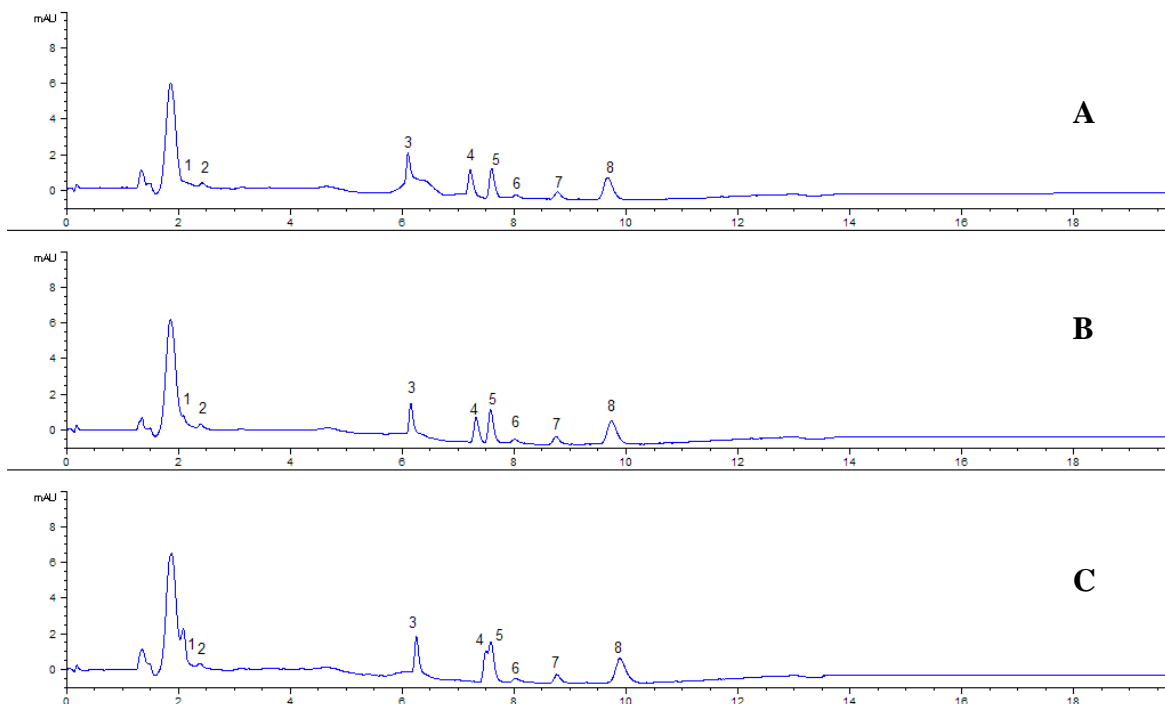


Figura 13. Efecto del pH en la fase móvil, en el análisis de drogas veterinarias y hormonas de baja concentración por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas de baja concentración, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18 empleando como fase móvil: Agua: ácido fórmico (100:0.2): acetonitrilo, con variación del pH. **A.** pH=3.33, **B.** pH=3.37, **C.** pH=3.47.

4.1.1.3. Selección de temperatura para la fase móvil.

La temperatura del termostato se manejó en tres niveles, 25, 30 y 35 °C, como se muestra en la **Figura 14**. El efecto inmediato de un aumento en la temperatura de la fase móvil es la disminución del tiempo de análisis de los ocho compuestos; sin embargo, la resolución y forma se mantuvieron constantes; razón por la cual se desarrolló el método a una temperatura nominal de 35 °C.

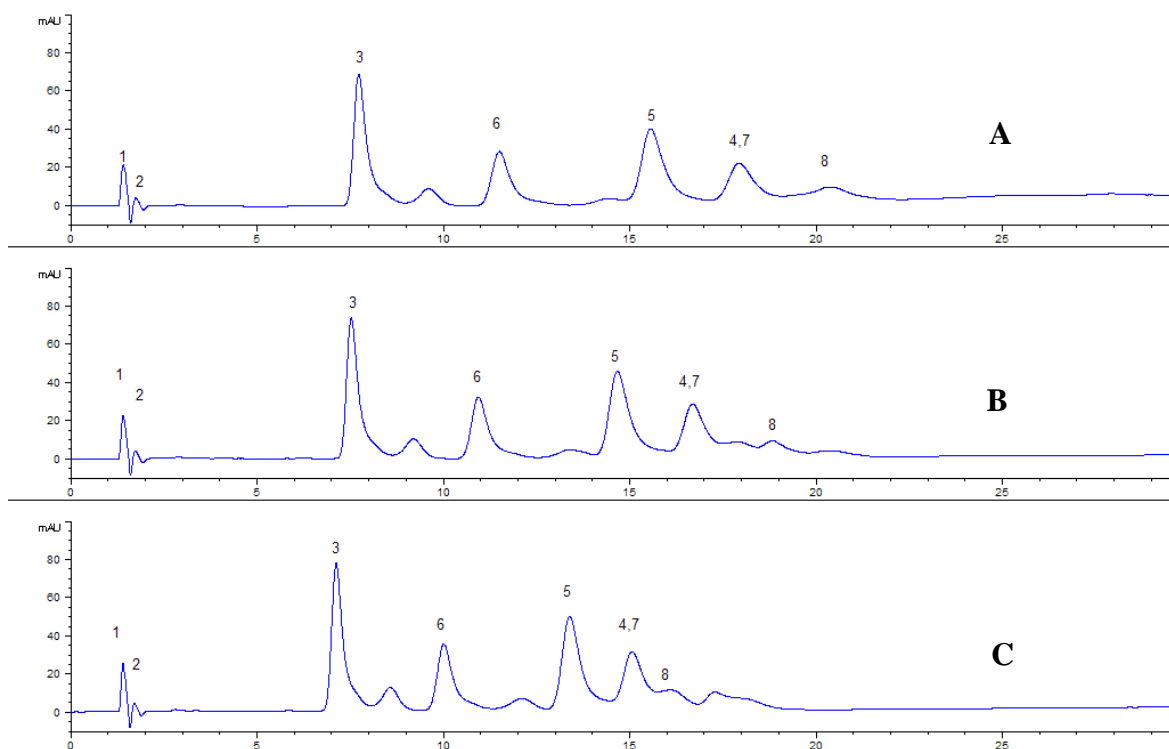


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la resolución y tiempo de análisis de las hormonas y drogas veterinarias analizadas por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. Fase móvil: Agua: ácido fórmico (100:0.2): acetonitrilo. **A.** 25 °C, **B.** 30 °C, **C.** 35 °C.

La viscosidad de la fase móvil es una de las principales razones de selectividad de una mezcla de solventes. Sin embargo, a la bomba cuaternaria del equipo de cromatografía líquida, puede extenderse su tiempo de vida, con el uso de una temperatura favorable que disminuya la viscosidad de la mezcla de solventes empleada en el método de análisis.

Con base en las diferentes pruebas preliminares desarrolladas para la implementación del método por cromatografía líquida para el análisis de drogas veterinarias y hormonas, se encontraron las mejores condiciones de operación que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Parámetros cromatográficos para el análisis selectivo de drogas veterinarias y hormonas.

Parámetro	Especificaciones
Solvente	Ácido fórmico 0.2% : acetonitrilo: metanol
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

La adecuada separación se logró con el gradiente propuesto en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Gradiente de elución del método por cromatografía líquida

Tiempo, (min)	Ácido fórmico (100:0.2), %	Metanol, %	Acetonitrilo, %
0	74	5	21
2	74	5	21
3	50	0	50
6	50	0	50
10	80	0	20
12	74	5	21
20	74	5	21

En la **Figura 15**, se muestra el perfil cromatográfico de una mezcla de patrones de referencia certificados de clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, albendazol, fenbendazol, flunixin, boldenona, testosterona y 17-β-estradiol, obtenido bajo las condiciones especificadas en las **Tablas 9 y 10**.

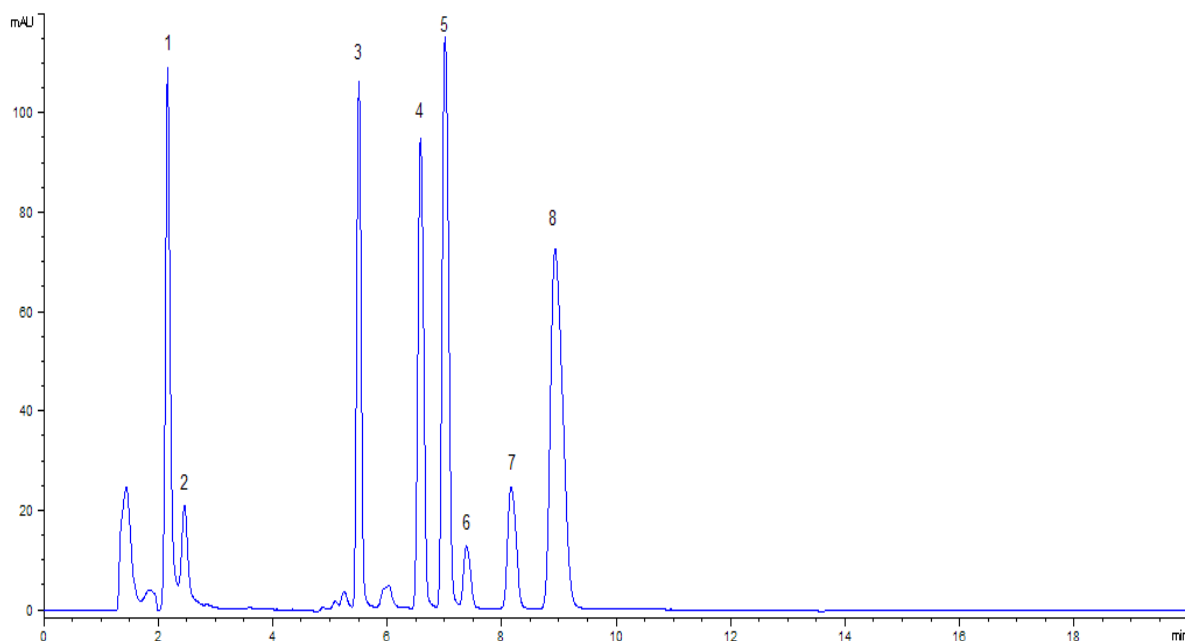


Figura 15. Perfil cromatográfico de las drogas veterinarias y hormonas, obtenido mediante HPLC-DAD, en la región de ultravioleta, con una columna apolar Zorbax Eclipse XDB C18.

Cromatograma típico de drogas veterinarias y hormonas, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18 empleando agua: ácido fórmico (100:0.2): acetonitrilo: metanol; con un flujo de 1 mL/min y temperatura de 35 °C y el gradiente seleccionado.

Para la metodología implementada, los valores de resolución fueron calculados, encontrándose en el rango de 4-39, que están acorde con las buenas prácticas de laboratorio (BPL), es decir, hasta un 5% de resolución. Cada una de las drogas veterinarias y hormonas fue inyectada para determinar el tiempo de retención **(Ver Tabla 11)**.

Tabla 11. Tiempo de retención de las drogas veterinarias y hormonas para el método desarrollado por HPLC.

N°	Sustancia	t _R , (min) ± S
1	Clorhidrato de oxitetraciclina	2,182 ± 0,002
2	Clorhidrato de tetraciclina	2,410 ± 0,001
3	Albendazol	6,091 ± 0,002
4	Fenbendazol	7,223 ± 0,001
5	Boldenona	7,585 ± 0,001
6	17-β-estradiol	8,013 ± 0,002
7	Testosterona	8,758 ± 0,001
8	Flunixin	9,663 ± 0,001

n=5

El tiempo de retención de una sustancia en cromatografía líquida de alta eficiencia está directamente relacionado con la estructura química del compuesto y éste a su vez, con dos factores primordiales: la afinidad con el relleno de la fase estacionaria y la fase móvil.

La fase reversa, está directamente implicada en la mayoría de aplicaciones por HPLC. Las sustancias con la menor constante de distribución son aquellas que tienen un carácter polar mayor que el resto de analitos.

La adecuada separación entre los dos compuestos utilizados como antihelmínticos, albendazol y fenbendazol, es quizás una de las pruebas más contundentes, del carácter hidrofóbico de las sustancias. En el caso del fenbendazol en su estructura tipo indol (**Anexo A**), posee un átomo de azufre directamente enlazado, el cual a su vez es portador de un grupo fenilo, que le confiere un carácter más apolar que su homólogo albendazol. La cadena alifática tipo propilo que contiene el albendazol, no solamente le otorga menos carácter hidrofóbico, sino que la posibilidad de interacción espacial es potencialmente

reducida por el menor volumen que ocupan este tipo de ramificaciones alifáticas, de ahí que, el fenbendazol eluya posterior al albendazol.

Las tetraciclinas, tienen el orden de elución: clorhidrato de oxitetraciclina y tetraciclina. Debido a su fuerte carácter hidrofílico, poseen un tiempo de retención bastante corto, con respecto a las demás sustancias analizadas en el presente proyecto; gracias a que en su estructura poseen 4 y 5 grupos hidroxilos, uno de ellos tipo fenólico. Su separación se logró, a pesar de la gran similitud en las estructuras bases, mediante la variación de la cantidad de agua acidulada al comienzo del gradiente del método cromatográfico. Se aprovecha que el clorhidrato de oxitetraciclina posee en su estructura un grupo hidroxilo más que su homólogo, clorhidrato de tetraciclina; el cual le da mayor solubilidad en la fase móvil y por lo tanto un tiempo menor de permanencia en la fase estacionaria.

Las hormonas, en general, son sustancias con estructura tipo esteroide que poseen un carácter más hidrofóbico que las drogas veterinarias, específicamente los antibióticos, tipo OTC y TC. boldenona, 17- β -estradiol y testosterona, poseen insaturaciones en orden decreciente. La retención de una sustancia no sólo depende del carácter hidrofóbico, es necesario considerar factores como las insaturaciones, que pueden aumentar el número de interacciones con las cadenas poliméricas de octadesilsiloxano (ODS) y por ende, aumentar el tiempo de permanencia en la columna cromatográfica. El 17- β -estradiol, es una de las hormonas que posee un grupo hidroxilo tipo fenólico. El medio ácido correspondiente a la fase móvil, inhibe la formación del ión fenóxido, por ello su elución es más rápida que la testosterona, pero posterior a la boldenona, debido a que uno de los eslabones del heterociclo está más insaturado que su hormona homóloga, la boldenona.

4.1.2. Figuras analíticas de mérito.

4.1.2.1. Determinación del porcentaje de recuperación.

A la muestra blanco, cabro silvestre (criado en el cañón del Chicamocha), se le adicionó una alícuota de una solución *stock* de drogas veterinarias y hormonas de concentración conocida y se desarrolló el procedimiento de extracción propuesto en el proyecto para el análisis simultáneo de estos analitos. El porcentaje de recuperación de cada una de las drogas veterinarias y hormonas estuvo entre 72 – 98 % (**Tabla 12**), acorde con lo recomendado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de las drogas veterinarias y hormonas con el procedimiento de extracción propuesto a muestras de carne.

Sustancia	Recuperación, %
Clorhidrato de oxitetraciclina	96
Clorhidrato de tetraciclina	85
Albendazol	74
Fenbendazol	72
Boldenona	98
17- β -estradiol	98
Testosterona	96
Flunixin	93

4.1.2.2. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método de HPLC.

Por medio de la curva de calibración se establecieron los parámetros referentes a la respuesta individual de cada analito y su comportamiento en orden creciente de concentración (**Tabla 13**).

El método por cromatografía líquida para el análisis de drogas veterinarias y hormonas es aplicable en el nivel de concentraciones de 25-2500 ppb. La linealidad del método tiene el comportamiento adecuado (0,9952 – 0,9986). La

sensibilidad del método en las condiciones trabajadas, es alta debido a que sus pendientes se encuentran entre 0,00356 - 0,0707 y, la incertidumbre en las mediciones realizadas para cada analito no supera 0.001 mAU*s*L/ng. Las curvas de calibración para cada uno de los analitos se encuentran en el **Anexo F**.

Tabla 13. Linealidad y sensibilidad del método por cromatografía líquida.

Sustancia	Ecuación	R ²	Sb	RDL, ppb
Clorhidrato de oxitetraciclina	Y=0,0088X	0,9952	0,0002	150-2500
Clorhidrato de tetraciclina	Y=0,01407X-0,0968	0,9978	0,0002	50-2500
Albendazol	Y=0,0672X-2,2663	0,9984	0,0009	50-700
	Y=0,072x-6,348	0,997	0,001	800-2500
Fenbendazol	Y=0,0707X	0,9979	0,0008	50-2500
Boldenona	Y=0,03947X	0,9978	0,0003	25-2500
17-β-estradiol	Y=0,00356X	0,9955	0,0001	200-2500
Testosterona	Y=0,0393X-0,2472	0,9976	0,0005	100-2500
Flunixin	Y=0,0235X-0,9418	0,9986	0,0002	150-2500

4.1.2.3. Determinación de los niveles mínimos de detección y cuantificación para HPLC.

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 [45]. En la **Tabla 14** se observan los valores de NMD y NMC para cada una de las drogas veterinarias y hormonas.

Los límites máximos de residuos establecidos por el *Codex Alimentarius* para la carne, en microgramos por kilogramo de muestra, se extrapolaron a la cantidad de muestra cárnica utilizada (10 g) y volumen de aforo final del extracto para su respectivo análisis por la técnica HPLC-DAD (10 mL), valores que se encuentran por encima de los NMD del método cromatográfico: 27,81 - 148,07 ppb, para las

drogas veterinarias seleccionadas; excepto para clorhidrato de oxitetraciclina y flunixin.

Tabla 14. Niveles de detección y cuantificación de drogas veterinarias y hormonas empleando HPLC.

Sustancia	NMD, ppb	LMR, ppb*	NMC, ppb
Clorhidrato de oxitetraciclina	148,07	200	296,15
Clorhidrato de tetraciclina	36,37	200	72,74
Albendazol	27,81	100	55,62
Fenbendazol	61,77	100	123,53
Boldenona	34,43	NF	68,86
17-β-estradiol	108,67	NF	217,35
Testosterona	68,90	NF	137,81
Flunixin	82,72	20	165,43

* Límites máximos de residuos establecidos por el CODEX ALIMENTARIUS para la carne. NF: No fijado.

4.1.2.4. Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad para los tiempos de retención y el área en HPLC.

Se escogió un punto de la curva de calibración cuya concentración fue de 1 ppm y se inyectaron 20 μ L cinco veces, utilizando un inyector manual. Con ésto se estimó la repetibilidad. Los resultados para la calificación del método, en cuanto a tiempos de retención y áreas, se observan en las **Tablas 15 y 16** 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 una de las drogas veterinarias y hormonas, cuyos valores se encuentran acordes con las BPL, al no superar el 0.07% y el 7.3%, para t_R y área respectivamente.

Tabla 15. Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	t _R promedio, min	S	CV, %
Clorhidrato de oxitetraciclina	2,145	0,002	0,07
Clorhidrato de tetraciclina	2,427	0,001	0,05
Albendazol	5,479	0,002	0,03
Fenbendazol	6,541	0,001	0,01
Boldenona	6,958	0	0
17-β-estradiol	7,373	0,003	0,04
Testosterona	8,122	0,002	0,02
Flunixin	9,217	0,002	0,02
n=5			

Tabla 16. Repetibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	Área promedio, mAU*s	S	CV, %
Clorhidrato de oxitetraciclina	8,3	0,2	1,8
Clorhidrato de tetraciclina	13,7	0,2	1,1
Albendazol	65,0	2,7	4,2
Fenbendazol	70,4	1,5	2,1
Boldenona	38,6	0,8	2,1
17-β-estradiol	3,6	0,3	7,3
Testosterona	38,4	1,6	4,1
Flunixin	23,1	1,0	4,5
n=5			

Los coeficientes de variación del método cromatográfico se usaron para la determinación de la reproducibilidad, referidos a los tiempos de retención y las áreas corregidas de cada una de las drogas veterinarias y hormonas, empleando una solución *stock* de 1 ppm de los analitos, inyectada seis veces por dos analistas, datos que se encuentran en las **Tablas 17 y 18**, cuyos valores están

dentro de los rangos permitidos por las BPL e indicando que el método es reproducible, ya que no superan el 0.4% y el 2%, para t_R y área respectivamente.

Tabla 17. Reproducibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	< t_R >	< t_R >	S	C.V, %
	Analista A, min	Analista K, min		
Clorhidrato de oxitetraciclina	2,145	2,156	0,008	0,4
Clorhidrato de tetraciclina	2,43	2,44	0,01	0,4
Albendazol	5,479	5,485	0,004	0,1
Fenbendazol	6,541	6,543	0,001	0,0
Boldenona	6,958	6,952	0,004	0,1
17- β -estradiol	7,373	7,367	0,004	0,1
Testosterona	8,122	8,115	0,005	0,1
Flunixin	9,22	9,19	0,02	0,2

n=5

Tabla 18. Reproducibilidad de áreas en el método desarrollado por HPLC para drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	<Área>	<Área>	S	C.V, %
	Analista A, mAU*s	Analista K, mAU*s		
Clorhidrato de oxitetraciclina	8,27	8,33	0,05	0,6
Clorhidrato de tetraciclina	13,73	13,87	0,09	0,7
Albendazol	65,0	64,3	0,4	0,7
Fenbendazol	70,4	71,0	0,4	0,6
Boldenona	38,6	39,4	0,6	1,4
17- β -estradiol	3,60	3,50	0,07	2,0
Testosterona	38,4	38,8	0,3	0,7
Flunixin	23,1	22,7	0,3	1,3

n=5

4.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE DERIVATIZACIÓN DE HORMONAS.

En la **Tabla 19** se muestran diferentes alternativas de transformación de las hormonas de partida que se probaron en este proyecto. Las drogas veterinarias fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cada una por separada con una concentración de 100 ppm y el respectivo blanco. En este caso, no se obtuvo ninguna información satisfactoria que permitiera el análisis de clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, albendazol, fenbendazol y flunixin por esta técnica cromatográfica.

En la **Figura 16**, se muestra la comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de una solución preparada en metanol de la hormona testosterona, el derivado acetilado y sililado de la misma, analizados bajo las mismas condiciones usando GC/FID. Se observa, claramente que fue necesario derivatizar para aumentar la volatilidad de los analitos y con ello mejorar la sensibilidad del análisis y la resolución del pico cromatográfico.

4.2.1. Pruebas preliminares

Las pruebas preliminares en el proceso de derivatización se realizaron con la hormona testosterona, debido a que se contaba con poca cantidad de boldenona y 17- β -estradiol para aplicar la metodología desarrollada. Sin embargo, las estructuras tipo esteroide son comunes en estas tres hormonas, por ende se presenta la misma tendencia de transformación química.

Existe una diversidad de procesos de derivatización para hormonas, que consisten en la sustitución de un átomo de hidrógeno lábil por un fragmento más apolar, lo que normalmente resulta en una disminución en la temperatura de ebullición del compuesto.

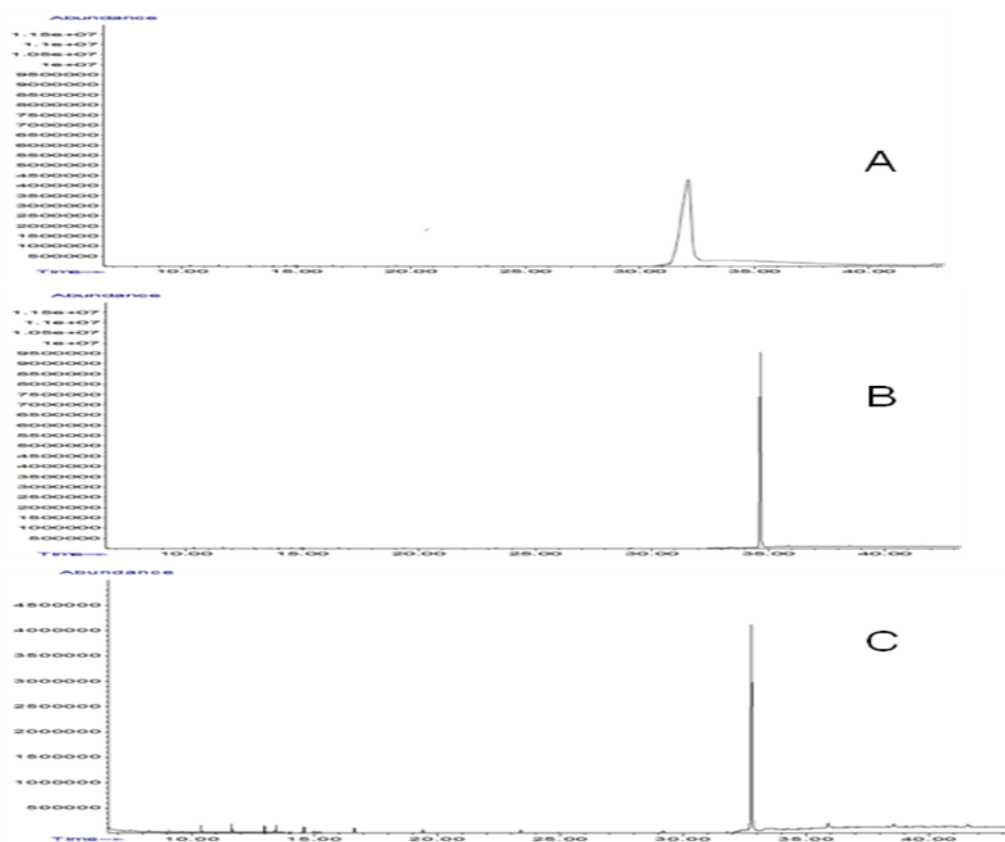


Figura 16. Cromatogramas típicos obtenidos en la columna DB-5MS (60 m), de A. Testosterona sin derivar, B. Acetato de testosterona y C. TMS-Testosterona.

4.2.1.1. Reacción de acetilación

En la reacción de acetilación la temperatura fue una de las variables que se modificaron para mejorar este proceso de derivación, encontrándose que al desarrollar la reacción por encima de la temperatura ambiente, el proceso es desfavorable comparado con la reacción a temperatura ambiente; resultados que se observan en la **Figura 17**, donde se evidencia que el área del derivado acetilado de la testosterona fue mayor trabajando a una temperatura ambiente que cuando se derivatizó a 50 °C. En esta etapa se utilizó la relación molar 1:50, solvente de extracción *n*-hexano y un tiempo de reacción de 12 horas.

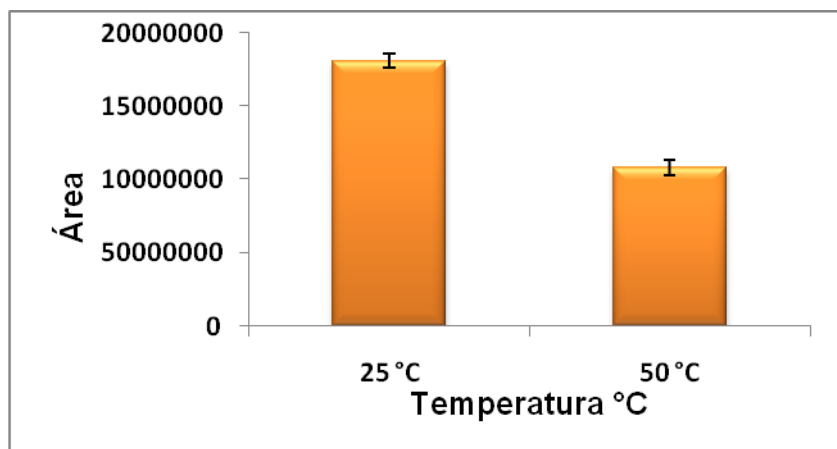


Figura 17. Efecto de la temperatura en la reacción de acetilación de la testosterona.

Con la temperatura de reacción escogida, se evaluaron los solventes de extracción seleccionados de acuerdo con las características químicas del derivado (*n*-hexano, diclorometano y hexano:acetona, 1:1). En la **Figura 18** se muestran las áreas del derivado preparado bajo las mismas condiciones de reacción y análisis cromatográfico, con variación en los solventes de extracción; encontrándose que *n*-hexano fue el que permitió obtener mayor cantidad del derivado de la hormona. Con respecto al tiempo de reacción, con 12 y 24 horas se obtuvieron las mismas cantidades del derivado.

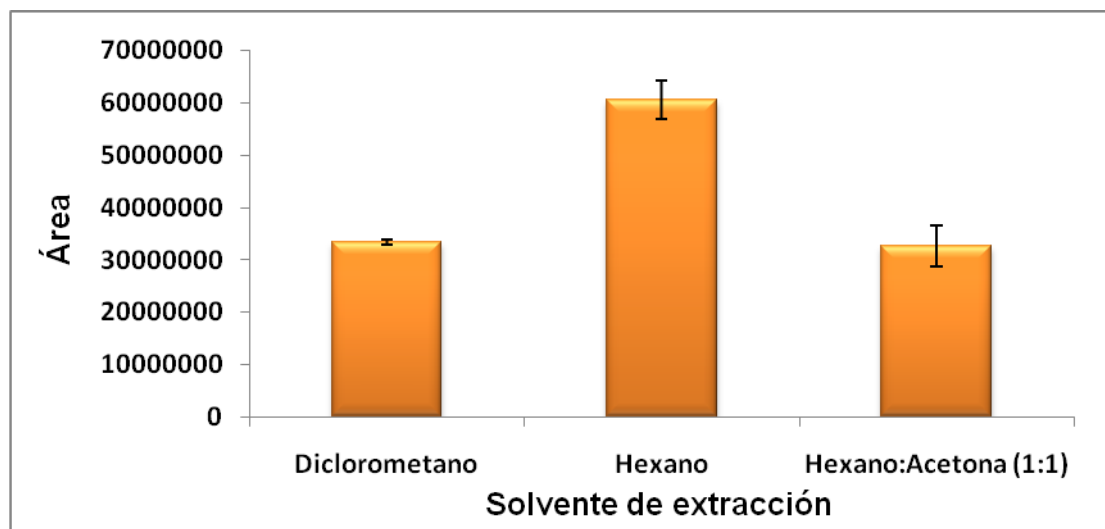


Figura 18. Efecto del solvente de extracción en la cantidad de derivado acetilado de la testosterona.

4.2.1.2. Reacción de sililación

Reacciones características de derivación como la formación de metil-ésteres y trifluoroacetil derivados, no fueron favorables. Sin embargo, la reacción de formación de productos trimetilsililados (TMS) fue viable, empleando condiciones básicas de reacción, a 80 °C, durante una hora y extrayendo el derivado con diclorometano.

En la **Figura 19** se muestran las áreas que se obtuvieron al variar la temperatura de reacción: 60, 80 y 100 °C, y el solvente de extracción del derivado sililado de la testosterona: *n*-hexano y diclorometano. Datos que permitieron seleccionar las condiciones de reacción. Los valores de temperaturas utilizados se escogieron basándonos en estudios previos de hormonas, y los solventes se seleccionaron teniendo en cuenta las propiedades químicas del derivado [17, 22,31].

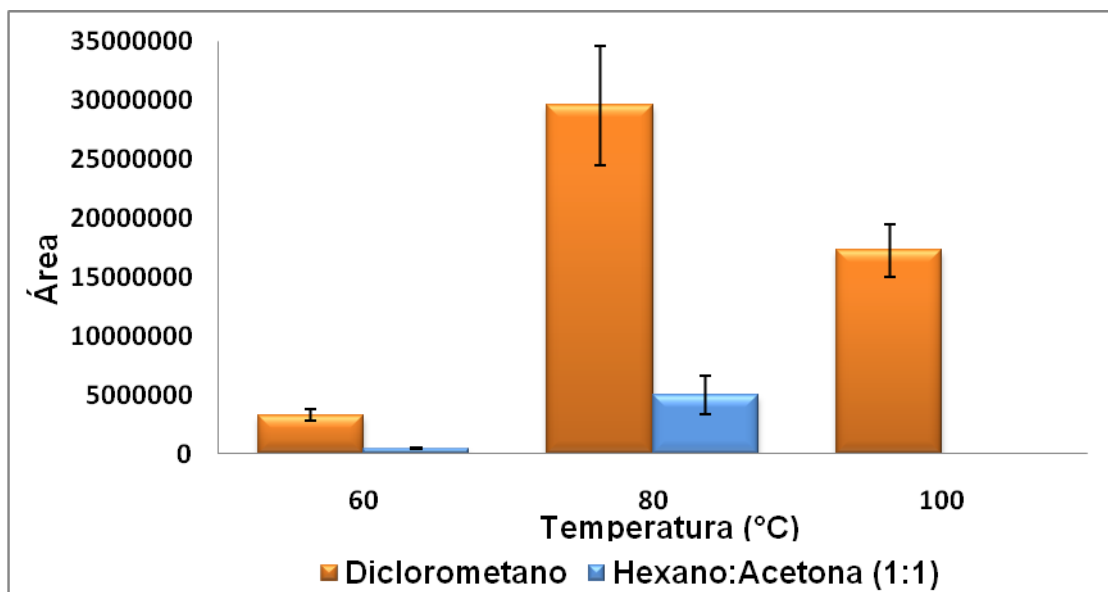


Figura 19. Efecto del solvente de extracción y temperatura de reacción en el derivado sililado de la testosterona.

Por su parte, el uso de agentes modificadores inorgánicos, había sido indicado en este tipo de reacciones, con el fin de debilitar la fuerza de enlace de hidrógenos más lábiles. Sin embargo, los resultados en repetidas ocasiones fueron negativos.

Tabla 19. Reacciones de derivatización desarrolladas para albendazol y testosterona con variación de algunos parámetros.

Agente derivatizante	Solvente de Reacción	T (°C)	Tiempo (horas)	Agitación	Modificador	Solvente de Extracción	Reacción	
							ALB	TES
Anhídrido acético	Piridina	26	12	NO	NO	n-Hexano	X	+
Anhídrido acético	Piridina	26	12	NO	NO	n-Hexano Diclorometano	X	+
Anhídrido acético	Piridina	26	24	NO	NO	n-Hexano Diclorometano	X	+
Anhídrido acético	Piridina	50	1	SI	NO	n-Hexano Diclorometano	X	X
Anhídrido acético	Piridina	50	12	SI	NO	n-Hexano Diclorometano	X	X
BSTFA/TMCS	Etanol	80	1	SI	NO	Ninguno	X	+
BSTFA	Piridina	80	1	SI	NO	Ninguno	X	x
MSTFA	Piridina	80	1	SI	NO	n-Hexano Diclorometano	X	+
MSTFA	Piridina	80	1	SI	NO	n-Hexano	X	+
MSTFA	Etanol	80	1	SI	Acetato de sodio	n-Hexano Diclorometano	X	X
MSTFA	Etanol Acetonitrilo	80	1	SI	Cloruro de amonio/ Acetato de sodio	n-Hexano	X	X
BSA	Piridina	80	1	SI	NO	Diclorometano n-Hexano	X	+
TFAA	TFE	80	1	NO	NO	Acetato de Etilo	x	X
BF ₃ /CH ₃ OH	---	80	0,75	SI	Sln NaCl 30 %	Isoctano	x	X

4.2.2. Caracterización por espectroscopia de infrarrojo de los derivados obtenidos de la testosterona.

La espectroscopia de infrarrojo (IR), fue una herramienta muy útil en la caracterización de los derivados de testosterona obtenidos en el estudio realizado, debido a que permitió confirmar la presencia de grupos funcionales en la estructura, y por ende, la caracterización de los derivados que se obtuvieron de la testosterona. En la **Figura 20** se presenta el espectro infrarrojo de la testosterona utilizada durante el desarrollo del proyecto, mientras que el espectro IR del estradiol se muestra en el **Anexo G**.

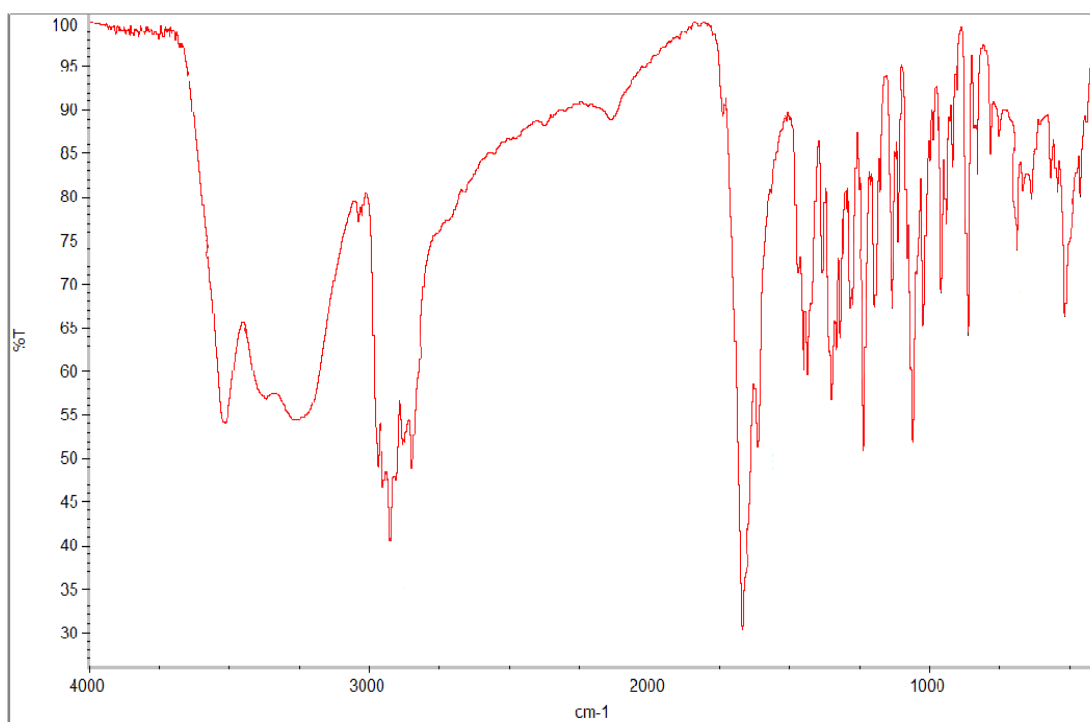


Figura 20. Espectro de IR de la testosterona.

La testosterona es un 17-hidroxiesteroide (tipo β). Las regiones de absorción que caracterizan los hidroxiesteroides se reportan en la **Tabla 20**, cuyas bandas se observan en el espectro IR obtenido de la testosterona empleada en el estudio [46, 47].

Tabla 20. Bandas de absorción en el espectro IR, características de los hidroxiesteroides.

Enlace	Región de absorción, cm^{-1}	Características de vibración
O-H	1410-1260	Encogimiento O-H
C-O	1150-1040	Alargamiento C-O
C-OH	1150-1040	Alargamiento C-O
-OH	3600-3200	H enlazado
=CH ₂ , -CH ₃	2960 - 2850	Alargamiento C-H
-CH ₃	1390-1370	Deformación simétrica, -CH ₃
=CH ₂ , -CH ₃	1470-1430	Deformación =CH
R ₂ C=CHR	850-790	

4.2.2.1. Derivado Acetilado.

El acetato que se obtuvo por reacción de la testosterona con anhídrido acético, se cataloga como un éster. Los ésteres (**Figura 21**) pueden ser derivados de ácidos carboxílicos, desde que éstos se obtengan por reacción de un ácido carboxílico y un alcohol.

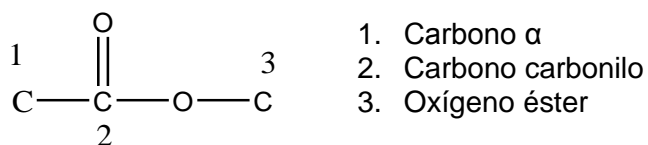


Figura 21. Estructura de un éster.

El átomo de oxígeno involucrado en el enlace sencillo C-O en un éster es llamado oxígeno éster y tiene dos átomos de carbono unidos a él. El átomo de carbono unido directamente al carbonilo en un éster, es llamado carbono α . En la **Figura 22** se presenta el espectro infrarrojo del acetato de testosterona, mientras que espectro IR del acetato de estradiol se encuentra en el **Anexo H**. Todos los ésteres proporcionan tres bandas fuertes de absorción que aparecen aproximadamente en $1750-1735 \text{ cm}^{-1}$; $1240-1200 \text{ cm}^{-1}$ y $1200-1100 \text{ cm}^{-1}$ como se puede observar en esta figura. Este patrón

de bandas diagnóstico para los ésteres es llamado “la regla de tres para ésteres”. La primera banda de absorción es debida al alargamiento C=O del grupo éster. La segunda, se refiere a la banda ocasionada por el alargamiento asimétrico de los enlaces C-C y C-O unidos al carbono carbonilo y es llamado el alargamiento “C-O-C”. La tercera de estas bandas corresponde a la vibración entre el oxígeno éster y los carbonos cercanos en la cadena hidrocarbonada unida a él. En esta vibración, los enlaces O-C y C-O son alargamientos asimétricos. Esta vibración es llamada el alargamiento “O-C-C”. La vibración intensa de alargamiento C=O ocurre a frecuencias más altas que en el caso de las cetonas normales [42, 46, 47].

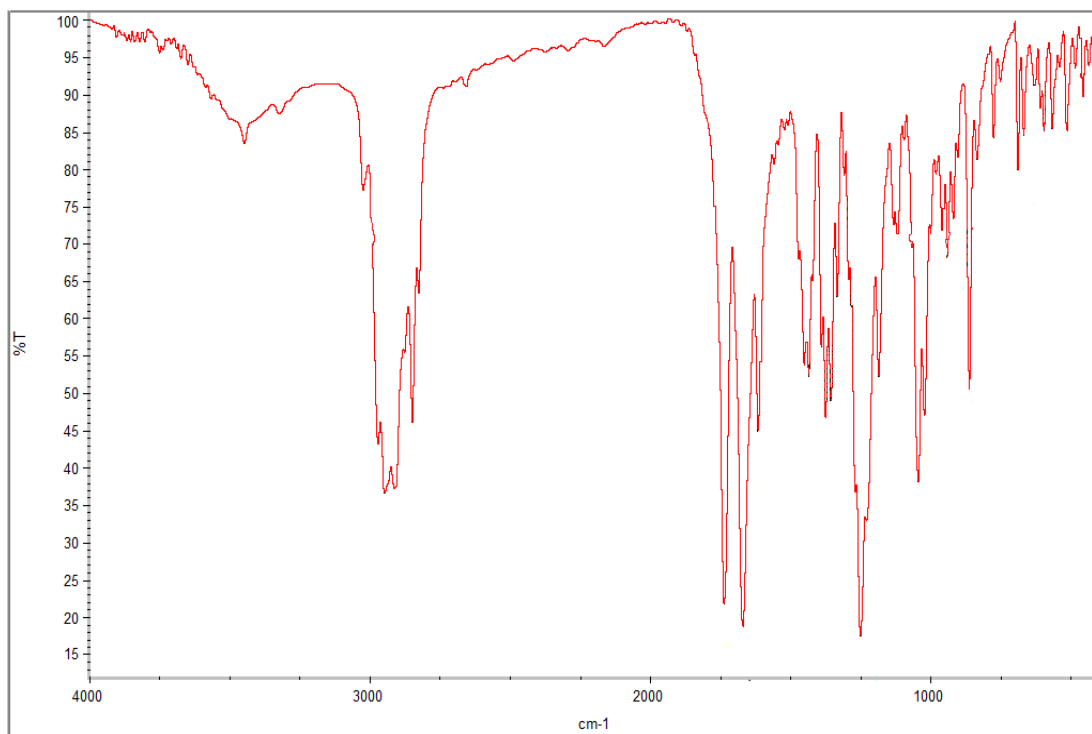


Figura 22. Espectro infrarrojo del acetato de testosterona (sintetizado con una relación molar de 1:50).

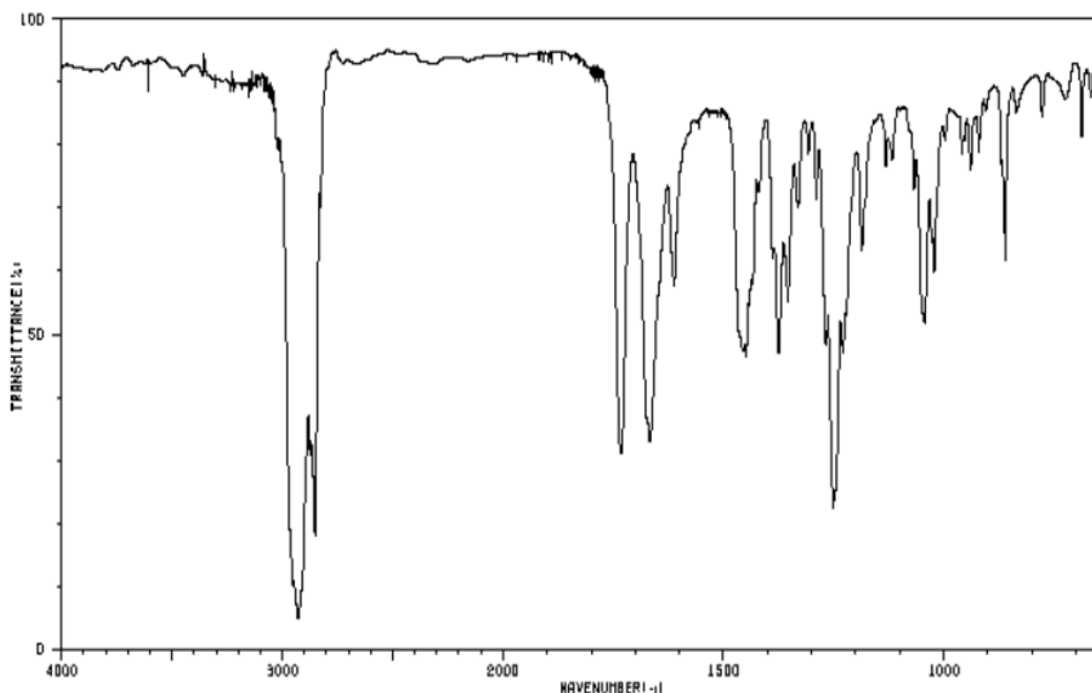


Figura 23. Espectro de infrarrojo del acetato de testosterona. Ref. *Spectral Database of Organic Compounds, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology of Japan.*

En la **Figura 22** se observa la ausencia de bandas de absorción en las regiones $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, $1360\text{-}1355\text{ cm}^{-1}$ y $1385\text{-}1365\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a las intensidades ocasionadas por la absorción producida debido a el H enlazado al hidroxilo acetilado de la hormona; al de los anhídridos acíclicos y cíclicos, respectivamente. De esta manera, el acetato de testosterona obtenido con la relación molar analito:anhídrido acético 1:50 no posee residuos del agente derivatizante y, por tanto, dicha relación molar (1:50) fue seleccionada para la preparación de los respectivos derivados tipo acetato en la realización del presente proyecto. El espectro obtenido del acetato de testosterona se comparó con un espectro de la base de datos SDDBS (*Spectral Database of Organic Compounds*) (**Ver Figura 23**) [46, 47].

4.2.2.1.1. Evaluación de la relación molar testosterona: anhídrido acético.

Con la finalidad de determinar la relación molar apropiada entre el analito y el agente derivatizante se desarrolló una curva de relación molar; para esto, se probaron diferentes relaciones estequiométricas analito:agente derivatizante 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:3000, manteniendo la relación del agente derivante: solvente siempre 1:1. Posteriormente el derivado se analizó por GC-MS. En la **Figura 24**, se observa que la relación molar 1:50 permitió la conversión de la mayor cantidad de analito a su respectivo derivado, ya que comparando su área bajo las mismas condiciones cromatograficas; ésta fue mucho mayor que las arrojadas por los otros derivados obtenidos con las diferentes relaciones molares. Por ende se seleccionó esta relación molar para preparar el acetato de testosterona y usarlo en el desarrollo de la parte experimental del presente estudio.

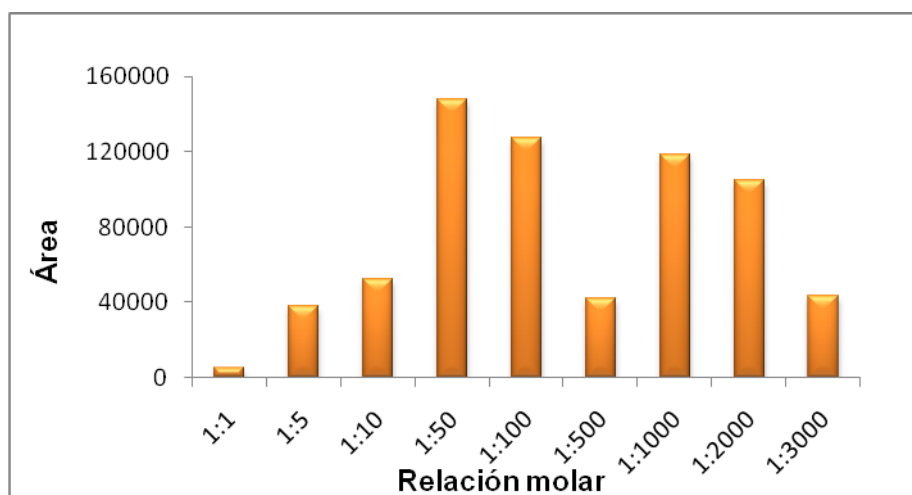


Figura 24. Curva de relación molar entre testosterona: anhídrido acético.

4.2.2.2. Derivado trimetilsililado.

La conformación de enlaces medianamente polares entre átomos de silicio (Si) y átomos de carbono y oxígeno, muestran bandas de absorción en la región IR. Las vibraciones de alargamiento del -OH del grupo Si-OH absorben en la misma región de los alcoholes, aproximadamente entre 3700

– 3200 cm^{-1} , y en el rango de $830 - 1110\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las bandas fuertes Si-O. Estas últimas se aprecian en el espectro IR del TMS-testosterona obtenido (**Figura 25**), y en el espectro IR del TMS-estradiol (**Anexo I**).

Las vibraciones para el enlace Si-H, que incluyen el alargamiento Si-H (2200 cm^{-1}) y el encogimiento Si-H ($800-950\text{ cm}^{-1}$), no se registran en el espectro IR del TMS-Testosterona. Mientras que las vibraciones de los enlaces Si-O-C y Si-C se registran en las regiones de absorción $1110-1000\text{ cm}^{-1}$ y $850-650\text{ cm}^{-1}$, respectivamente [43]. En la **Figura 25**, se observa la ausencia de la banda de absorción en la región $1690-1640\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la intensidad debida al grupo $=\text{C}=\text{N}-$ presente en la estructura del agente derivatizante BSA. Por ende, el TMS-Testosterona preparado con la relación molar analito:BSA (1:100) no tiene residuos detectables del agente derivatizante y, por tanto, esta relación molar (1:100) fue escogida para preparar los derivados partiendo de los respectivos esteroides, en la realización de este trabajo de investigación [46, 47].

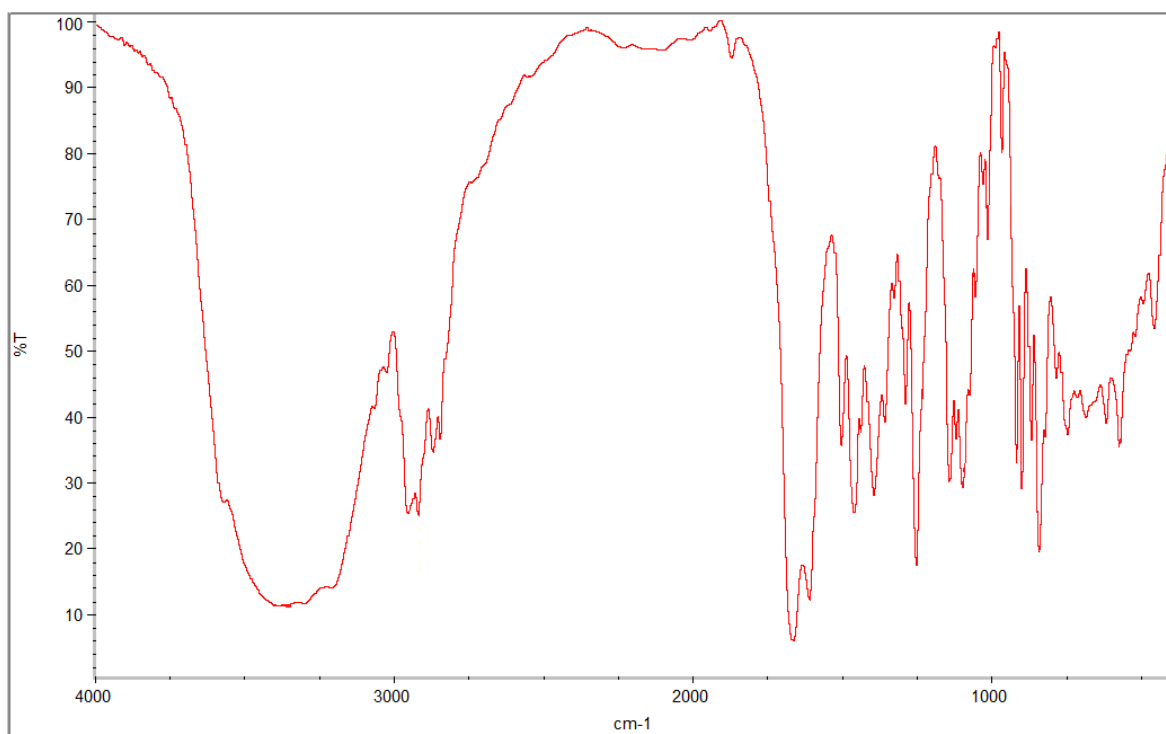


Figura 25. Espectro IR del TMS-testosterona (obtenido usando relación molar testosterona:BSA 1:100).

4.2.2.2.1. Evaluación de la relación molar testosterona: BSA.

En la determinación de la relación estequiométrica de analito: agente derivantizante, se ensayaron las relaciones estequiométricas 1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:2000 y 1:3000, y posteriormente el derivado se analizó por GC-MS. En la **Figura 26**, se observa que la relación molar 1:100 permite convertir la mayor cantidad de analito a su respectivo derivado. Por ende se seleccionó ésta relación para preparar el derivado TMS-testosterona y usarlo en el desarrollo de la parte experimental del presente estudio.

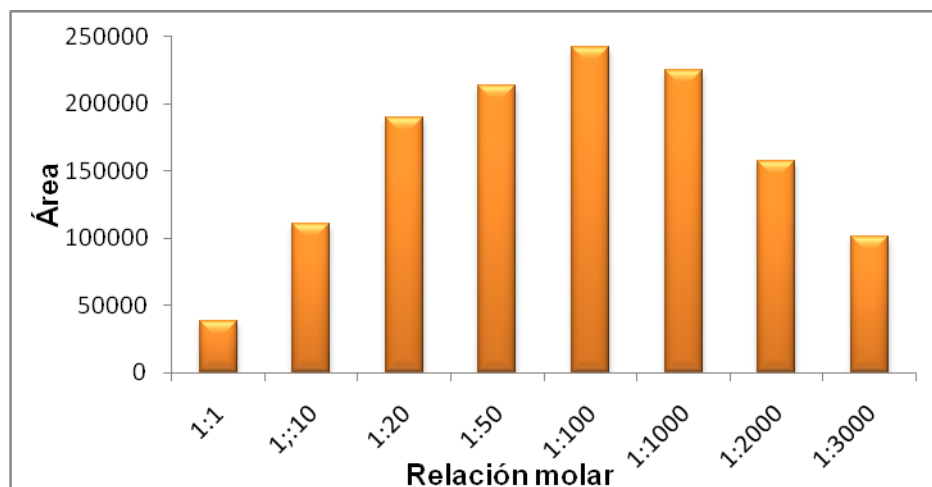


Figura 26. Curva de relación molar entre testosterona:BSA.

4.2.3. Caracterización por espectrometría de masas de los derivados obtenidos de la testosterona.

La espectrometría de masas MS, específicamente, combinada con la cromatografía en fase gaseosa es una de las técnicas analíticas más útiles en la identificación y elucidación de la estructura de los esteroides.

La fragmentación de la testosterona conduce a la formación de un importante número de picos diagnóstico (**Figura 27**), entre los cuales se destacan fragmentos que se forman a través de la pérdida de un radical metilo a partir del ión molecular con m/z 288, cuyo resultado es el ion de m/z 273, como también, la ruptura simultánea de dos enlaces alílicos debido a la reacción tipo Retro Diels-Alder (RDA), dando como resultado el ión m/z 260 (**Figura 28**) [46, 47].

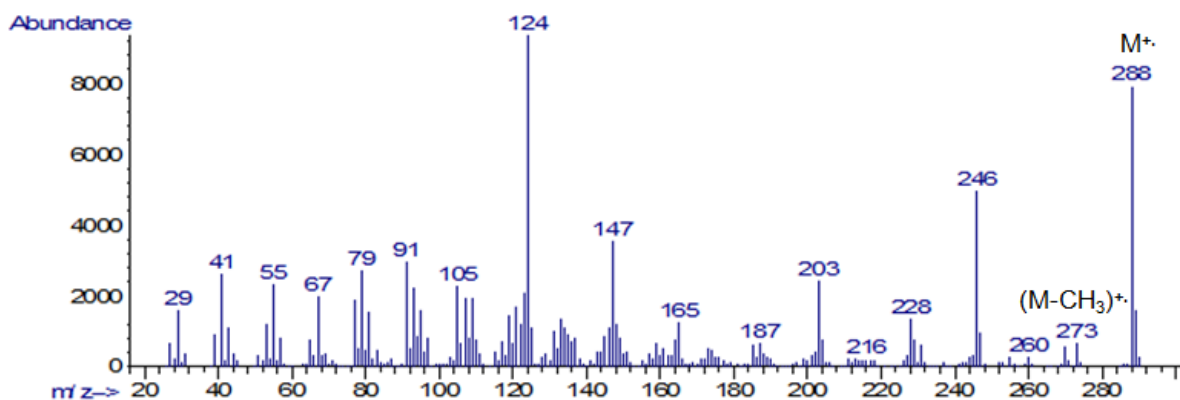


Figura 27. Espectro de masas de la testosterona obtenido de la base de datos *Willey*.

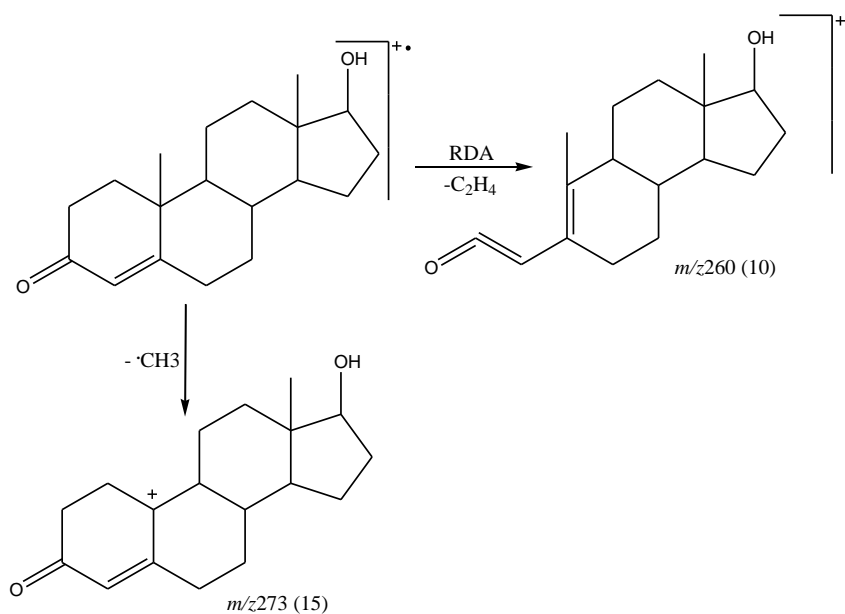


Figura 28. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 260 y m/z 273 en el espectro de masas de la testosterona.

El ión pico de base se produce por ruptura alílica del ión molecular entre las posiciones 9 y 10 de la estructura tipo esteroide, un reordenamiento permite eliminar una molécula neutra $C_9H_{12}O$ y, dar origen al catión-radical m/z 152 cuya eliminación de una olefina da origen al ión pico de base m/z 124. La ruta de fragmentación se muestra en la **Figura 29** [46, 47].

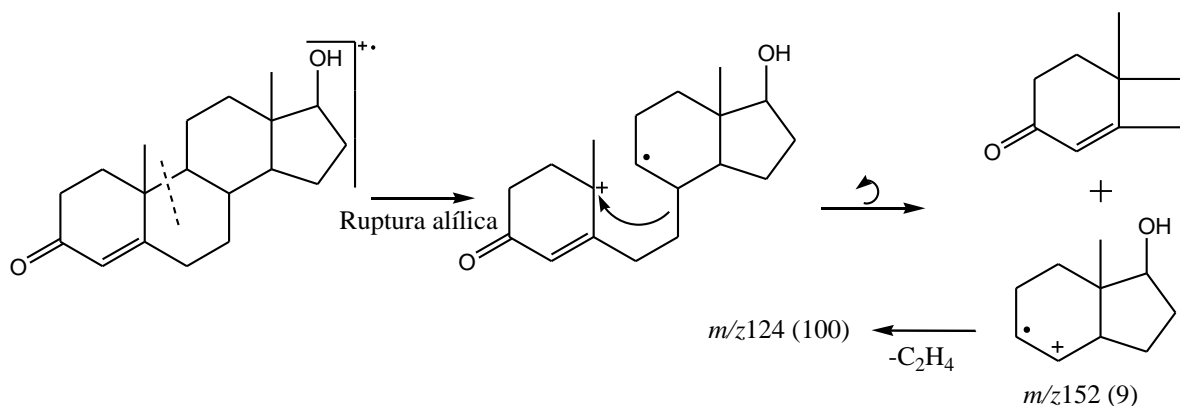


Figura 29. Ruta de fragmentación para la formación del ion pico de base m/z 124 en el espectro de masas de la testosterona.

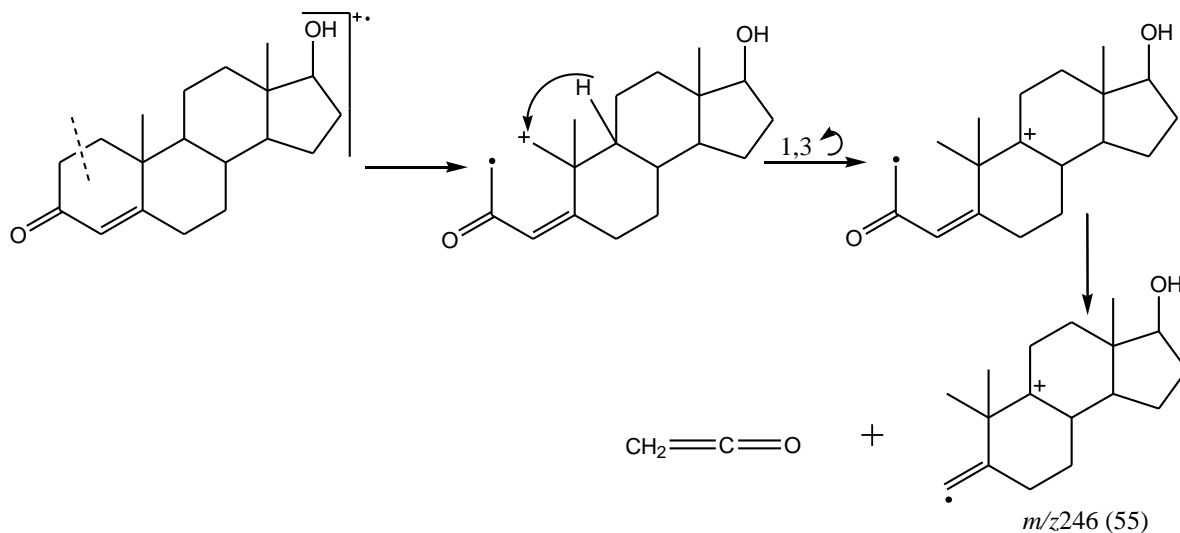


Figura 30. Ruta de fragmentación para la formación del ion m/z 246 en el espectro de masas de la testosterona.

La formación del ion m/z 246 puede atribuirse a la ruptura beta con respecto al grupo carbonilo presente en la molécula de testosterona, con posterior transposición 1,3 de hidrógeno y la eliminación de una molécula neutra de fórmula C_2H_2O que genera el catión-radical m/z 246. La ruta de fragmentación se muestra en la **Figura 30** [46, 47].

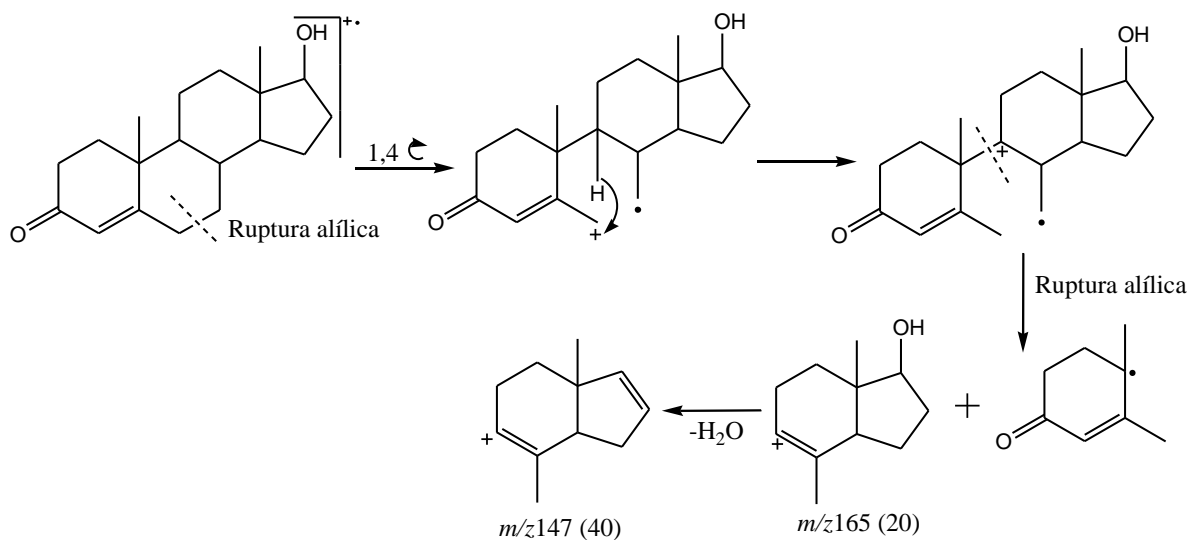


Figura 31. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 165 y m/z 147 en el espectro de masas de la testosterona.

El ion de m/z 165 y su producto de deshidratación (m/z 147) se generan por la ruptura alílica entre las posiciones 4 y 5 de la estructura tipo esteroide, con posterior transposición de hidrógeno 1,4, la especie generada sufre otra ruptura alílica entre las posiciones 9 y 10. La ruta de fragmentación propuesta se presenta en la **Figura 31**.

4.2.3.1. Análisis del espectro de masas del acetato de testosterona. El derivado obtenido con el procedimiento de acetilación se analizó por GC-MS. En la **Figura 32**. Se muestra el espectro de masas del acetato de testosterona tomado de la base de datos *Willey*; mientras que los espectros de masas sacados de la misma base de datos de los acetatos de boldenona y 17- β -estradiol mostrados en el **Anexo J**, sirvieron como referencia para comparar los espectros de masas obtenidos experimentalmente mostrados en la **Figura 33**, para el acetato de testosterona y en el **Anexo K**, para las otras dos hormonas.

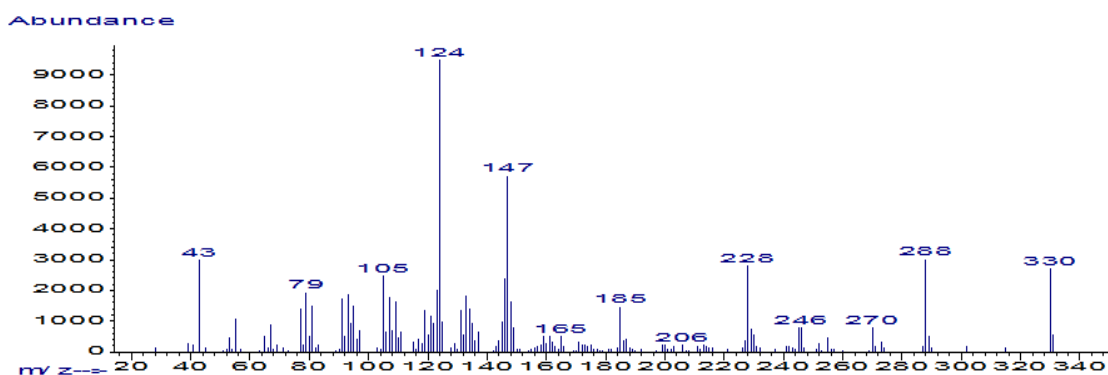


Figura 32. Espectro de masas del acetato de testosterona obtenido de la base de datos *Willey*.

En el espectro de masas del acetato de testosterona se observan un pico de m/z 330 (31) correspondiente al ion molecular; y los picos típicos de los fragmentos correspondientes a $(M-CH_3COOH)^+$ con m/z 270, el ion m/z 255 $(M-CH_3COOH-CH_3)^+$, y el ion m/z 43 $(CH_3CO)^+$; que confirman la presencia del grupo acetato (CH_3COO) en la molécula, y por tanto la formación del derivado de la hormona [46, 47].

El ion con m/z 288 corresponde a la eliminación de una molécula neutra de fórmula C_2H_2O dando origen a la especie catión-radical de la testosterona como se muestra en la **Figura 34**.

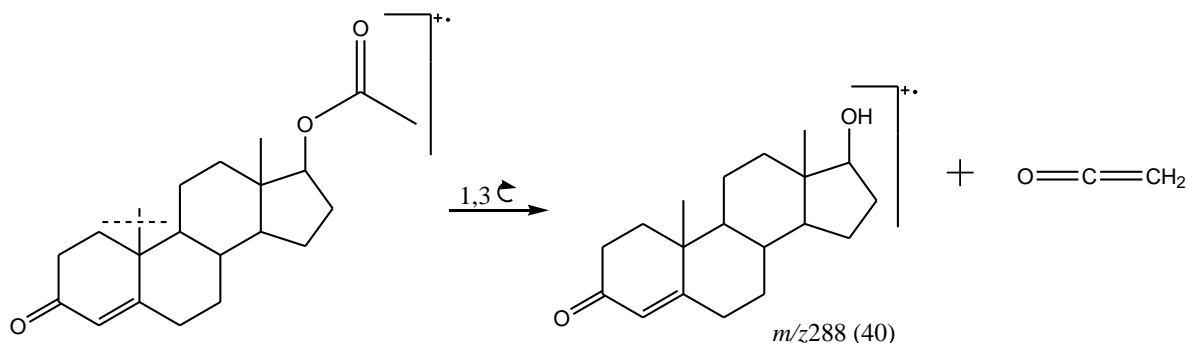


Figura 33. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 288 y m/z 228 en el espectro de masas del acetato de testosterona.

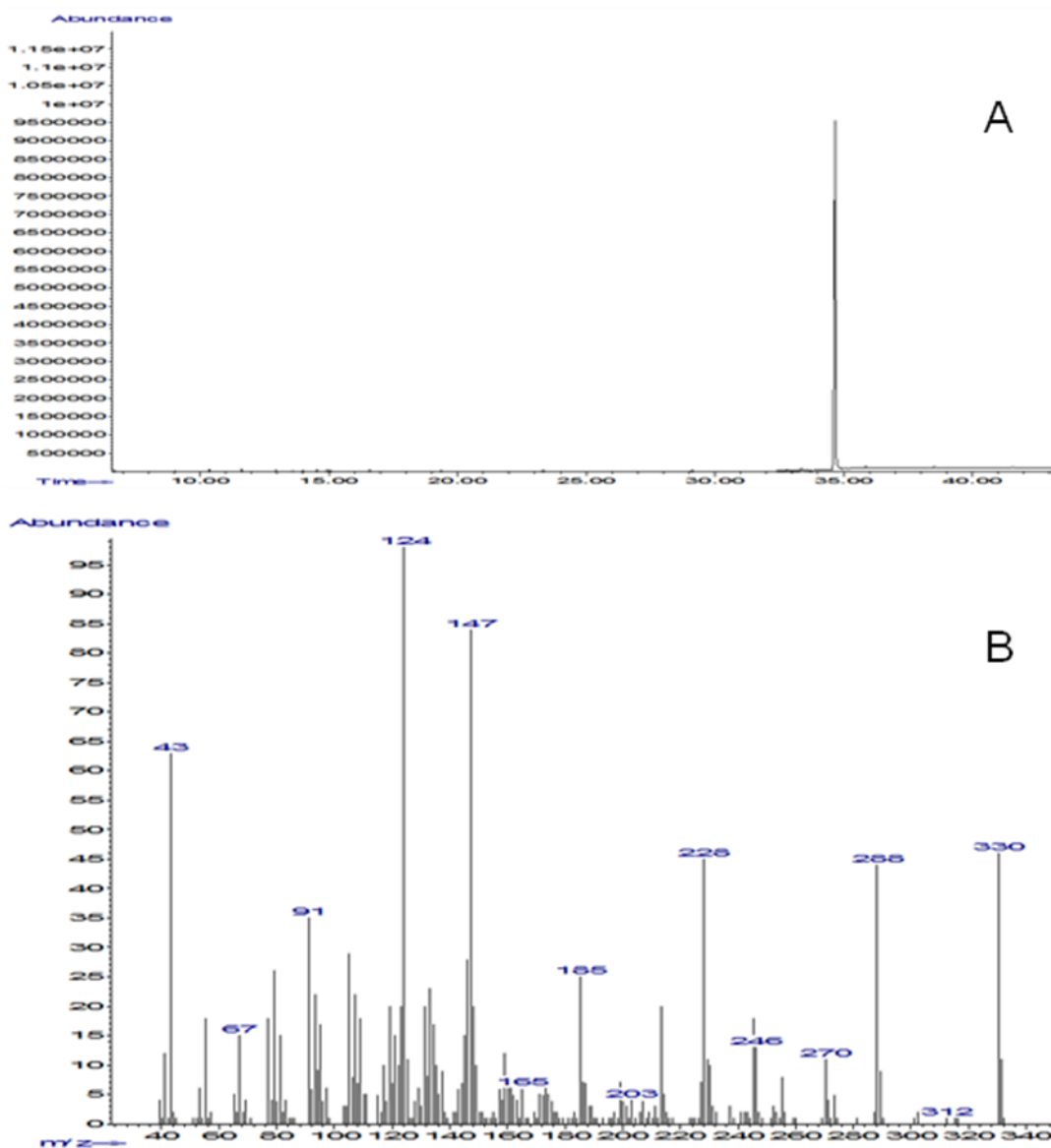


Figura 34. A. Corriente iónica total y **B.** Espectro de masas del acetato de testosterona obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.

Los iones característicos m/z 165 (15), m/z 270 (20), m/z 246 (21) y el ion pico de base m/z 124 resultan por las rutas de fragmentación mostradas para la testosterona en la **sección 4.2.3**. Mientras que el ión m/z 43 (38) corresponde al catión de estructura molecular CH_3CO^+ .

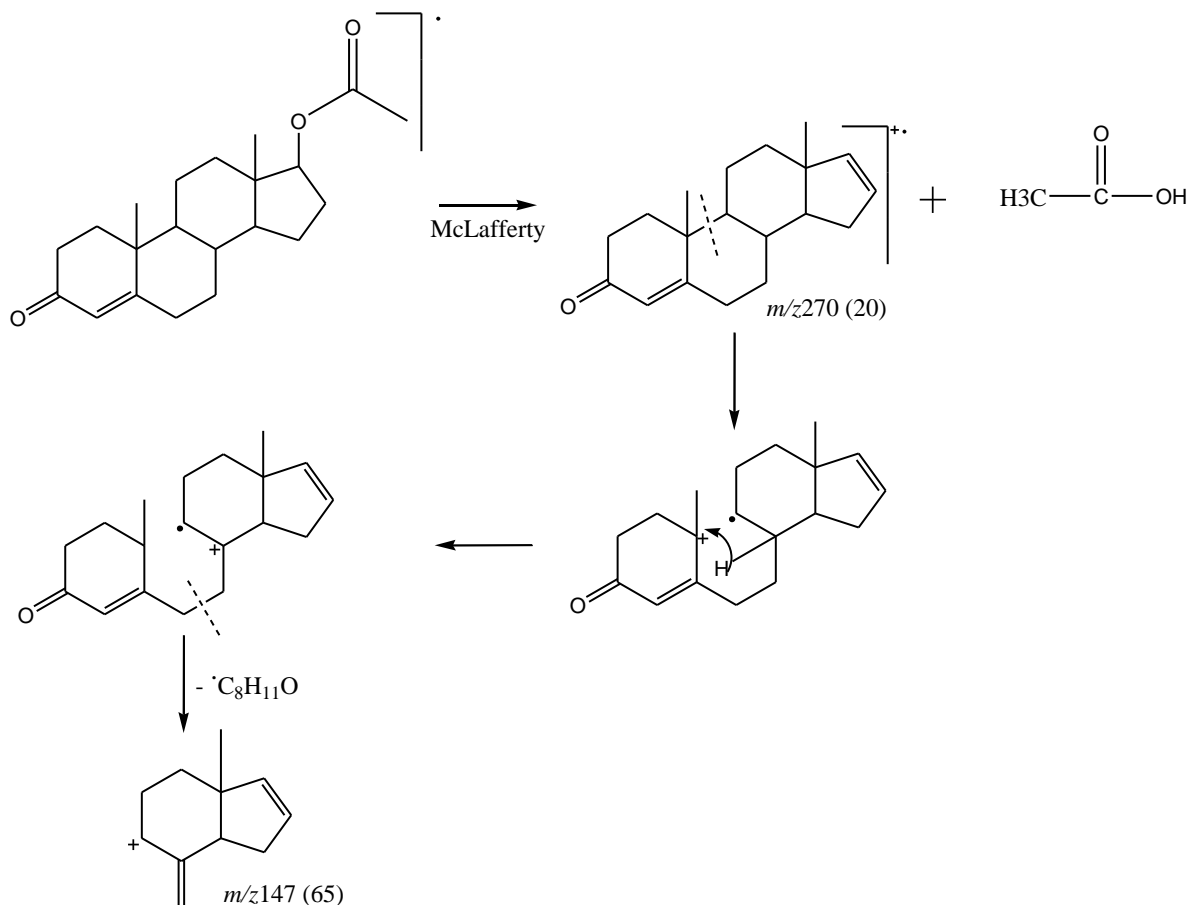


Figura 35. Ruta de fragmentación para la formación de los iones m/z 270 y m/z 147 en el espectro de masas del acetato de testosterona.

4.2.3.2. Análisis del espectro de masas del derivado trimetilsililado de la testosterona.

El derivado obtenido con el procedimiento de sililación se analizó por GC-MS. En la **Figura 36**. Se muestra el espectro de masas del TMS- testosterona tomado de la base de datos *Willey*; mientras que los espectros de masas sacados de la misma base de datos de los acetatos de boldenona y 17- β -estradiol mostrados en el **Anexo L**, sirvieron como referencia para comparar los espectros de masas obtenidos experimentalmente mostrados en la **Figura 37**, para el TMS-testosterona y en el **Anexo M**, para las otras dos hormonas [42].

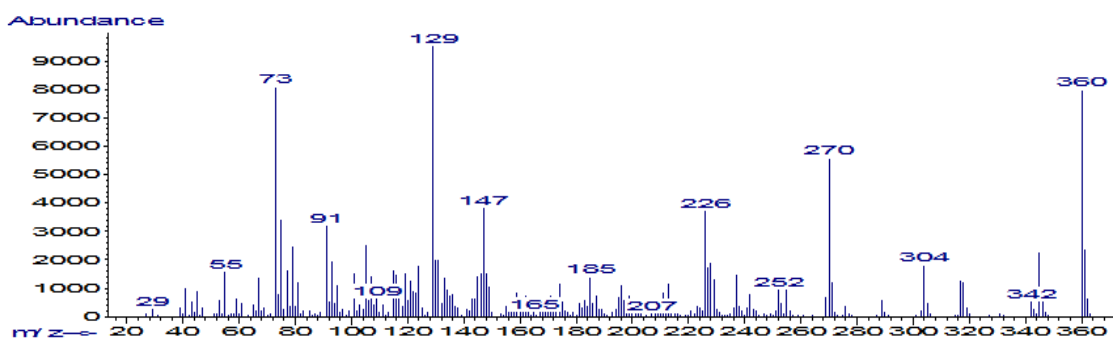


Figura 36. Espectro de masas del TMS-Testosterona obtenido de la base de datos *Willey*.

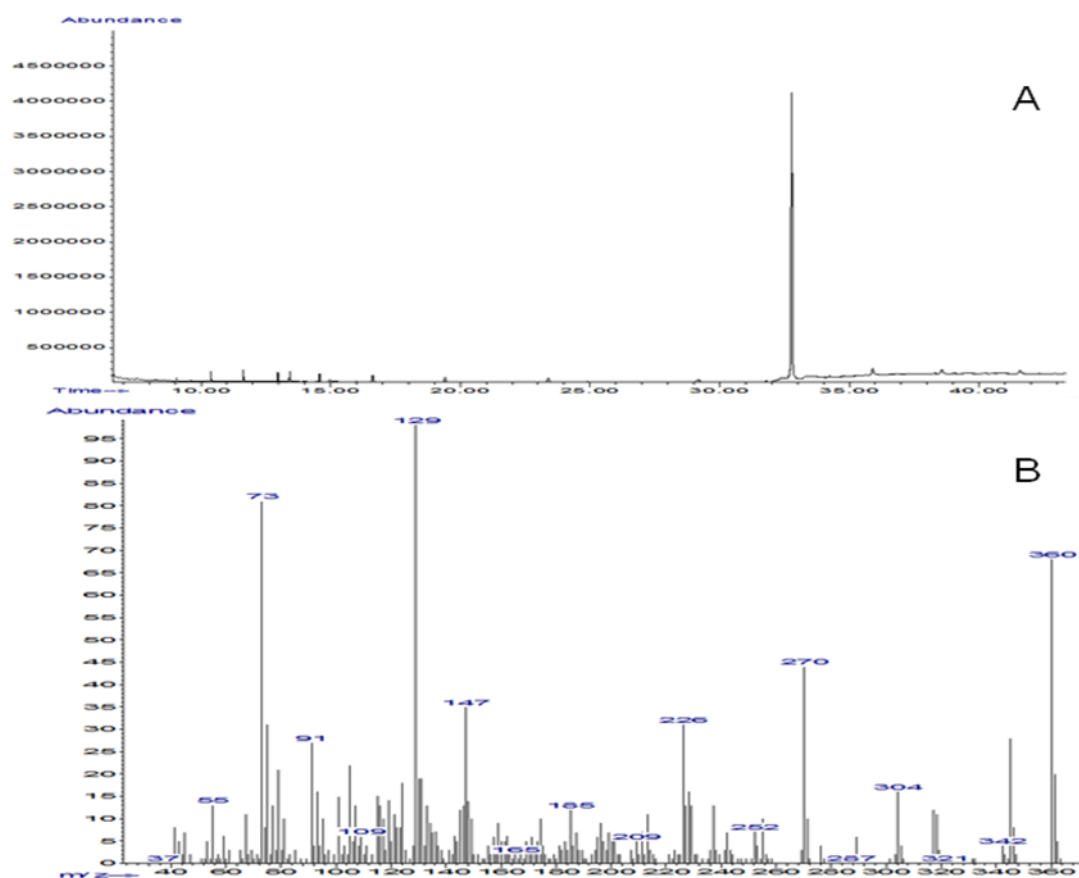


Figura 37. A. Corriente iónica total y **B.** Espectro de masas del derivado TMS-testosterona obtenido experimentalmente. Impacto de electrones, 70 eV.

En la **Tabla 21** se reportan los iones característicos del espectro de masas del derivado TMS de la testosterona, en donde iones diagnóstico con m/z

270, m/z 129 y m/z 73, confirman la presencia del grupo trimetilsilil, que el espectro infrarrojo ya había evidenciado.

Tabla 21. Iones característicos en el espectro de masas del TMS-testosterona.

Fragmento	m/z (Intensidad)
Ion molecular, M^+	360 (67)
$(M-TMSOH)^+$	270 (44)
$(-TMSOH-C_3H_4)^+$	129 (100)
$(M-Si(CH_3)_2CH_2-C_8H_{11}O)^+$	165 (12)
$(M-Si(CH_3)_2CH_2-C_8H_{11}O-H_2O)^+$	147 (38)
$-Si(CH_3)_3^+$	73 (85)

4.2.4. Selección del agente derivatizante.

Después de una cantidad apreciable de ensayos, se seleccionó el anhídrido acético como agente derivatizante para la realización del presente estudio, porque éste es más económico (12.616 pesos/mL de BSA Vs 581 pesos/mL de AA), de más fácil manejo, consecución, y es menos volátil que el BSA. El BSA requiere en su almacenamiento la atmósfera seca, completamente libre de agua, lo que en las condiciones ambientales del país es difícil y, en caso de lograrlo, implica una alta inversión. Además la reacción de acetilación con anhídrido acético se realiza a condiciones más fáciles de mantener, e.g. temperatura ambiente, que permite una reacción más reproducible. Sin embargo, en la determinación de la relación molar necesaria para que todo el analito reaccionara, se estableció, que el anhídrido acético se requiere en mayor cantidad por gramo de hormona a derivatizar, pero su bajo costo disminuye el valor en la preparación del derivado.

4.2.5. Estabilidad de los acetil derivados.

Para determinar la estabilidad de los derivados tipo acetato de las hormonas analizadas por GC-MS, se prepararon los derivados tomando 100 μ L de una solución *stock* de 1000 ppm de testosterona, 17- β -estradiol y boldenona, y se

derivatizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la **sección 4.2.1.1.**; seguidamente se inyectaron en el equipo GC-MS bajo las mismas condiciones, en diferentes días para determinar la variación de las áreas de cada uno de los derivados. En la **Figura 38**, se muestra el comportamiento obtenido para cada uno de los analitos, encontrándose un cambio significativo en las áreas con respecto al tiempo transcurrido desde el momento de su preparación y posterior análisis cromatográfico.

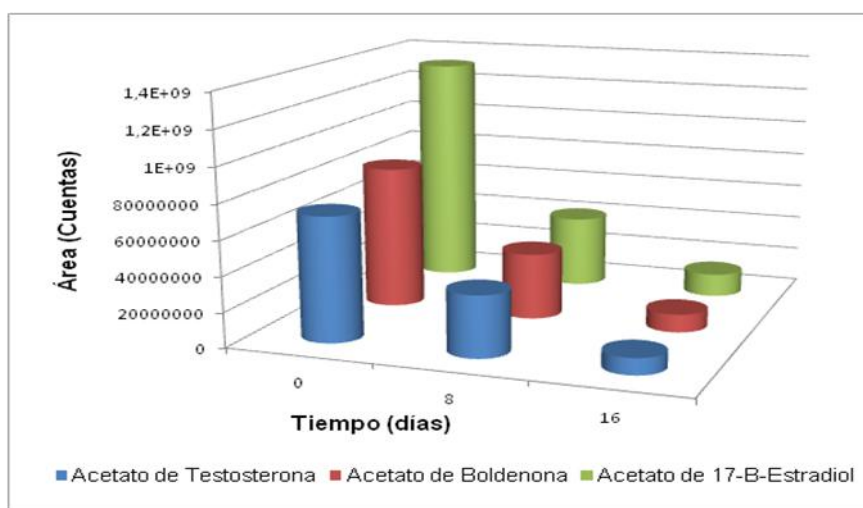


Figura 38. Estabilidad de los acetatos preparados a partir de las hormonas.

4.3. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

4.3.1. Parámetros del método de análisis cromatográfico con detector selectivo de masas.

En la **Tabla 22** se describen los parámetros de operación utilizados para el cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas *series 5973* de *Agilent Technologies*. Que facilitó la determinación simultánea de las hormonas (derivatizadas) con una resolución aceptable, como se muestra en la **Figura 39**. El proceso de derivación de las drogas veterinarias fue desfavorable, razón por la cual no se analizaron estos compuestos debido a

que su respuesta no fue satisfactoria por esta técnica cromatográfica, es decir, no se registraron señales cromatográficas.

Tabla 22. Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los derivados de hormonas por HRGC/MSD.

Parámetro Cromatográfico	Descripción
-Columna cromatográfica	Columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de DB-5MS de 60 m x 0,25 mm (d.i.) x 0.25 µm.
-Temperatura del Detector	280 °C.
-Temperatura del Inyector	250 °C.
-Temperatura del Horno	
Temperatura inicial	100 °C.
Programación	15 °C/min hasta 250 °C (20 min) @ 15 °C/min hasta 300 °C (10 min).
-Gas de arrastre (<i>carrier gas</i>)	Helio.
Modo	Flujo constante, 1 mL/min.
-Gas auxiliar (<i>make up gas</i>)	N ₂ .
Flujo volumétrico	30 mL/min.
-Presión del gas de arrastre	23.87 psi.
-Flujo total	24.6 mL/min.
-Modo de Inyección	<i>Split</i> , 1:5.
Temperatura de la cámara de inyección	185 °C.
Temperatura de la línea de transferencia	260 °C.
Energía de los electrones bombardeantes	70 eV.

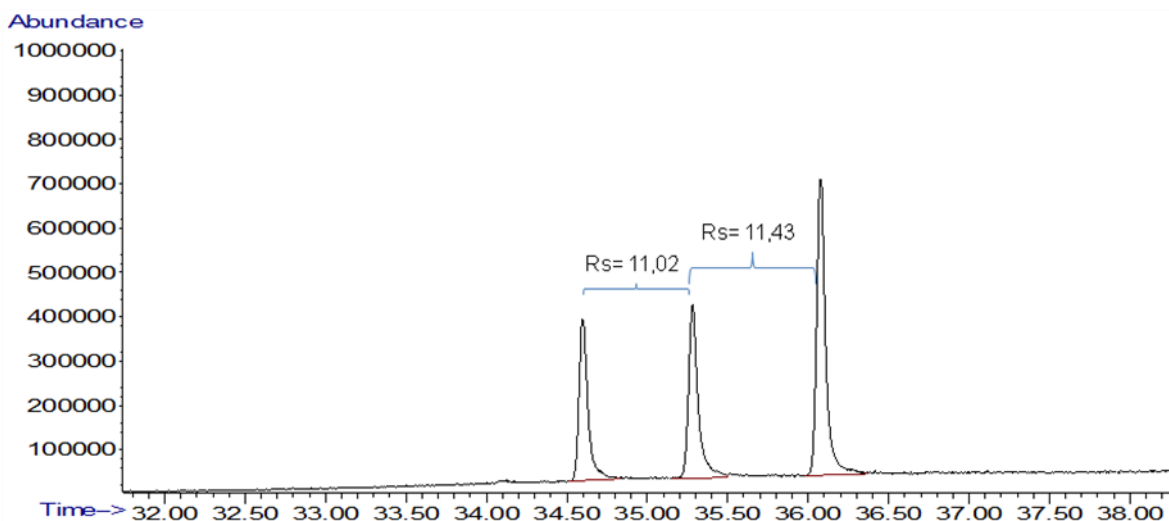


Figura 39. Cromatograma de las hormonas acetiladas con los valores de resolución.

Para la metodología implementada los valores de resolución fueron calculados, encontrándose en el rango de 11,02-11,43, que está acorde con las buenas prácticas de laboratorio (BPL), es decir, mayor de 1,5.

4.3.2. Figuras analíticas de mérito.

Cada hormona derivatizada fue inyectada por quintuplicado para determinar el tiempo de retención y su desviación estándar. **Tabla 23.**

Tabla 23. Tiempo de retención de las hormonas acetiladas para el método desarrollado por cromatografía de gases con detector selectivo de masas.

Sustancia	t_R , min \pm s
Acetato de testosterona	34,65 \pm 0,03
Acetato de boldenona	35,36 \pm 0,02
Acetato de 17- β -estradiol	36,13 \pm 0,02

n=5

El tiempo de retención de una sustancia en cromatografía de gases empleando una columna apolar, es directamente dependiente de la temperatura de ebullición de un compuesto, la conformación estructural y la

interacción con la columna en menor grado. Las sustancias termoestables con menor temperatura de ebullición se retienen menos en la columna, que aquellas de mayor peso molecular en una serie homóloga, e.g. en el caso de las hormonas testosterona, 17- β -estradiol y boldenona, fue necesario realizar un proceso de derivatización para modificar estructuralmente las sustancias y hacerlas aptas para un mejor análisis por esta técnica; ya que las hormonas derivatizadas, en general, son sustancias con estructura tipo esteroide sililada o acetilada que poseen un carácter más apolar que sus congéneres de partida.

4.3.2.1. Determinación del porcentaje de recuperación.

A la muestra blanco, cabro silvestre (criado en el cañón del Chicamocha), se le adicionó una alícuota de una solución *stock* de drogas veterinarias y hormonas de concentración conocida, y se desarrolló el procedimiento de extracción propuesto en el proyecto para el análisis simultáneo de estos analitos (**Sección 3.6.**). Para el análisis por esta técnica se desarrolló el procedimiento de acetilación al extracto seco proveniente de la carne (**Sección 3.4.3.**). El porcentaje de recuperación de cada una de las hormonas posterior a la etapa adicional de derivatización estuvo entre 85-93% (**Tabla 24**), acorde con lo recomendado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

Tabla 24. Porcentaje de recuperación de las hormonas derivatizadas con el procedimiento de extracción propuesto para muestras de carne.

Sustancia acetilada	Recuperación, %
Acetato de testosterona	90
Acetato de boldenona	85
Acetato de 17- β -estradiol	93

4.3.2.2. Evaluación de la linealidad y sensibilidad del método.

Por medio de la curva de calibración se establecieron los parámetros referentes a la respuesta individual de cada analito y su comportamiento en orden creciente de concentración (**Tabla 25**).

Tabla 25. Linealidad y sensibilidad del método para hormonas derivatizadas por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas.

Sustancia	Ecuación	R ²	Sb	RDL, ppb
Acetato de testosterona	Y=850X-143010	0,9923	28	600-4000
Acetato de boldenona	Y=897X-335688	0,9903	34	600-4000
Acetato de 17-β-estradiol	Y=1540X-292090	0,9932	48	600-4000

El método por cromatografía de gases para el análisis de hormonas es aplicable en el nivel de concentraciones de 0,6-4 ppm. La linealidad del método tiene el comportamiento adecuado ($R^2 = 0,9903 - 0,9932$). La sensibilidad del método cromatográfico es alta debido a que sus pendientes se encuentran entre 850 – 1540 y, la incertidumbre en las mediciones realizadas para cada analito no superan 48 mAU*s*L/ng. Las curvas de calibración para cada uno de los derivados acetilados de las hormonas se encuentran en el **Anexo N**.

4.3.2.3. Determinación de los niveles de detección y cuantificación.

En este caso se desarrolló el cálculo mediante el método estadístico. En el cual el nivel mínimo de detección (NMD) corresponde a la señal del blanco, más tres veces la desviación estándar del blanco. Mientras que el nivel mínimo de cuantificación (NMC) es tres veces el NMD [45]. Así en la **Tabla 26** se observan los valores de los NMD y NMC para cada una de los acetatos de las hormonas.

Tabla 26. Nivel de detección y cuantificación de las hormonas derivatizadas empleando cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas.

Sustancia	NMD, ppb	NMC, ppb
Acetato de testosterona	343	687
Acetato de boldenona	385	771
Acetato de 17- β -estradiol	322	643

4.3.2.4. Evaluación de la repetibilidad del método para los tiempos de retención y el área

Se escogió un punto de la curva de calibración cuya concentración fue de 1500 ppb y se inyectaron 2 μ L por quintuplicado. Con esto se estimó la repetibilidad del método, por medio de los coeficientes de variación de las áreas y tiempos de retención; datos que se observan en las **Tablas 27 y 28** respectivamente.

Tabla 27 Repetibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC-MS para las hormonas acetiladas.

Sustancia	t_R promedio, min	s	CV, %
Acetato de testosterona	34,65	0,03	0,08
Acetato de boldenona	35,36	0,02	0,06
Acetato de 17- β -estradiol	36,13	0,02	0,07

n=5

Tabla 28 Repetibilidad de las áreas en el método desarrollado por GC-MS para hormonas acetiladas.

Sustancia	Área promedio, mAU*s	s	CV, %
Acetato de testosterona	959971	37410	3,9
Acetato de boldenona	941282	66451	7,1
Acetato de 17- β -estradiol	1860005	110581	5,9

n=5

La repetibilidad se expresó como los coeficientes de variación del método cromatográfico, en lo que respecta a los tiempos de retención y las áreas de cada uno de los derivados acetilados de las hormonas, cuyos valores se encuentran acordes con las BPL; los valores para estos parámetros cromatográficos no superan el 0,08% y el 7,1%, para t_R y área respectivamente.

4.3.2.5. Evaluación de la reproducibilidad del método para los tiempos de retención.

La reproducibilidad del método de GC-MS se determinó mediante la medición de los coeficientes de variación de los tiempos de retención de las hormonas derivatizadas inyectadas por quintuplicado en días diferentes. En la **Tabla 29**, se muestran los resultados obtenidos, cuyos coeficientes de variación no superan un 0,06%, indicando con ello una buena reproducibilidad en el método de análisis cromatográfico descrito.

Tabla 29. Reproducibilidad de los tiempos de retención en el método desarrollado por GC-MS para hormonas acetiladas.

Sustancia	< t_R >	< t_R >	< t_R >	S	C.V, %
	Día A, min	Día B, min	Día C, min		
Acetato de testosterona	34,67	35,37	36,14	0,02	0,06
Acetato de boldenona	34,684	35,365	36,159	0,008	0,02
Acetato de 17- β -estradiol	34,644	35,352	36,150	0,008	0,02

n=5

4.4. EXTRACCIÓN DE DROGAS VETERINARIAS Y HORMONAS EN MUESTRAS DE CARNE

4.4.1. Precipitación de proteínas: análisis de la prueba de Bradford.

Las proteínas pueden ser analizadas por HPLC-DAD, mediante columnas adecuadas para tal fin, es decir, una fase estacionaria acorde con las características fisicoquímicas de estas sustancias. Sin embargo, en las columnas de fase reversa para el análisis ambiental se recomienda que el

contenido proteico en los extractos analizados sea en niveles bajos o inclusive nulos; además las proteínas podrían haber sido una interferencia para el análisis de las hormonas y drogas veterinarias; y también fue necesario su eliminación del extracto para cuidar la vida de la columna de cromatografía de gases debido a las características fisicoquímicas de las proteínas.

En la **Tabla 30** se muestran las diferentes pruebas realizadas para la precipitación de proteínas en el extracto, obtenido con el procedimiento de extracción propuesto en el proyecto para el análisis simultáneo de drogas veterinarias y hormonas (**Sección 3.6.1.**); condiciones que fueron analizadas por medio de la medición de la concentración de proteínas en el extracto a través de la prueba de *Bradford*.

Tabla 30. Absorbancia registrada para las diferentes condiciones de extracción de la muestra y su comparación con muestras enriquecidas, medidas a una $\lambda=595$ nm.

	Condiciones de extracción	Absorbancia
Muestra real enriquecida luego de precipitación de proteínas	Metanol + 4 g sulfato de amonio, 15 min en ultrasonido (80 °C), 10 min centrifugación y 10 min agitación horizontal.	0,03 ± 0.02
	Acetonitrilo + 4 g sulfato de amonio, 15 min en ultrasonido (80 °C); 10 min centrifugación y 10 min agitación horizontal.	0.008 ± 0.001
Muestra real enriquecida desde el inicio del procedimiento	Acetonitrilo + 1 g sulfato de amonio, 30 min en ultrasonido (80 °C); 10 min centrifugación y 20 min agitación horizontal.	0.014 ± 0.003
Muestra real enriquecida luego de precipitación de proteínas		0.0020 ± 0.001
n=5		

Empleando el método estandarizado de *Bradford* para la cuantificación de proteínas del Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Industrial de Santander, se encontró que las muestras reales analizadas en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 595 nm, poseen absorbancias bajas, lo que indica una menor cantidad de proteínas en el extracto. Se realizó el proceso de extracción con acetonitrilo, que cumple también la función de agente precipitante; se usó 1 gramo de sulfato de amonio, como coadyudante. Se emplearon 30 minutos de ultrasonido a una temperatura de 80°C, para la liberación de los analitos de la matriz y aumentar su solubilidad, al igual que para precipitar las proteínas por calentamiento (desnaturalización). Esto fue seguido por 10 minutos de centrifugación y 20 minutos en el agitador horizontal, que permitieron una mejor distribución entre el precipitado y el sobrenadante.

Al comparar las alternativas de precipitación es evidente la menor cantidad de proteínas en el extracto obtenido mediante el uso de acetonitrilo como agente de precipitación; pero al disminuir la cantidad de sulfato de amonio y duplicar el tiempo de agitación horizontal y ultrasonificación, se observó una menor absorbancia, que indicó un incremento en la precipitación de proteínas, y una disminución en la precipitación de sal en posteriores procesos de concentración que interferían en la extracción y análisis de las muestras.

Las muestras enriquecidas antes del proceso de cuantificación de proteínas en el extracto, mostraron un incremento en la absorbancia comparadas con las muestras no enriquecidas, indicando que los analitos debido a sus estructuras químicas absorbieron pequeñas cantidades a esta longitud de onda. Resultado corroborado con el análisis de blancos enriquecidos y no enriquecidos, ya que los primeros arrojaron una absorbancia mayor que los no enriquecidos, analizados bajo las mismas condiciones.

4.4.2. Extracción en fase sólida: proceso de limpieza.

4.4.2.1. Pruebas preliminares.

Considerando las características polares del extracto a limpiar por SPE, en la **Tabla 31** se muestran los parámetros de operación del equipo que se mantuvieron constantes en el diseño experimental.

Tabla 31. Parámetros de operación constantes durante el desarrollo del diseño experimental de SPE.

Parámetro	Condición	Observaciones
Acondicionamiento	1) 6 mL de <i>n</i> -hexano. 2) 6 mL de acetonitrilo. 3) 6 mL de metanol.	No se deja secar el cartucho entre la adición de cada solvente y posterior a la adición del último de la serie.
Volumen de la muestra	5 mL.	No dejar secar el cartucho.
Lavado del cartucho	6 mL <i>n</i> -hexano.	Dejar secar el cartucho.
Flujo	1 a 2 gotas por segundo.	

4.4.2.2. Diseño experimental.

El tratamiento de los datos del diseño experimental, consiste en determinar cuáles efectos son significativos; esto requiere comparar el tamaño de cada efecto con la variación causada por el error experimental, el cual se midió con el tetraplicado del punto central [48, 49]. En la **Tabla 32**, se observa que los valores de los CV, que se utilizaron para medir dicha variación, se encontraron entre 0.7 - 2.7%.

La variable respuesta empleada para realizar el diseño experimental fue la relación entre el área reportada por el equipo de cromatografía líquida de los extractos obtenidos mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE), con el área arrojada por una solución *stock* de igual concentración de los analitos en los extractos (2.5 ppm) inyectada directamente, sin aplicar el procedimiento de SPE.

Tabla 32. Medida del error experimental de las drogas veterinarias y hormonas analizadas, para la evaluación del diseño factorial 3².

Sustancia	Punto medio del diseño experimental, relación de áreas				<Relación de áreas>	s *10 ⁻⁴	CV, %
	1	2	3	4			
Clorhidrato de oxitetraciclina	0,311	0,308	0,313	0,310	0,311	0,04	0,7
Clorhidrato de tetraciclina	0,124	0,125	0,128	0,128	0,127	0,04	1,6
Albendazol	0,63	0,66	0,65	0,63	0,64	1	2,1
Fenbendazol	0,62	0,64	0,64	0,61	0,63	1	2,4
Boldenona	0,64	0,67	0,67	0,65	0,66	4	2,6
17-β-Estradiol	0,69	0,69	0,72	0,71	0,71	1	2,0
Testosterona	0,59	0,62	0,60	0,59	0,60	1	2,3
Flunixin	0,74	0,77	0,77	0,73	0,75	4	2,7

El diseño de experimento se implementó en esta etapa del procedimiento de extracción debido a que es una de las más críticas, puesto que la pérdida de analitos es más probable durante el proceso de *clean-up* de los extractos. Los resultados obtenidos del diseño 3² se muestran en la **Tabla 33**.

A= pH (5- 6- 9) : (-1, 0, 1).

B= -1 Metanol / solución 2:1 metanol-*buffer* acetato 50 mM, pH=5.0.

0 Acetonitrilo / solución 2:1 acetonitrilo-*buffer* acetato 50 mM, pH=5.0.

1 Metanol / solución 1:1 metanol- acetato de etilo.

Tabla 33. Matriz de relaciones de área para el diseño factorial 3² de drogas veterinarias y hormonas en SPE.

A	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	0	0	0
B	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
OTC	0.81	0.92	1.00	0.63	0.31	0.49	0.66	0.32	0.78	0.31	0.31	0.31
TC	0.82	0.85	1.04	0.70	0.12	0.45	0.62	0.22	0.69	0.13	0.13	0.13
ALB	0.61	0.64	0.62	0.63	0.63	0.61	0.71	0.79	0.60	0.66	0.65	0.63
FEN	0.60	0.63	0.61	0.61	0.62	0.60	0.70	0.77	0.62	0.64	0.64	0.61
BOL	0.64	0.65	0.69	0.66	0.64	0.69	0.79	0.79	0.72	0.67	0.67	0.65
EST	0.62	0.63	0.68	0.66	0.69	0.69	0.78	0.78	0.70	0.69	0.72	0.71
TES	0.57	0.61	0.63	0.59	0.59	0.61	0.70	0.71	0.64	0.62	0.60	0.59
FLU	0.61	0.75	0.70	0.63	0.74	0.68	0.73	0.88	0.72	0.77	0.77	0.73

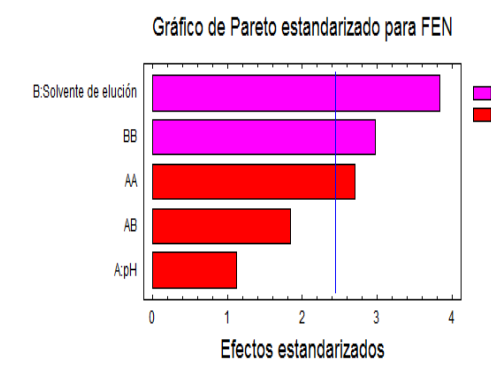
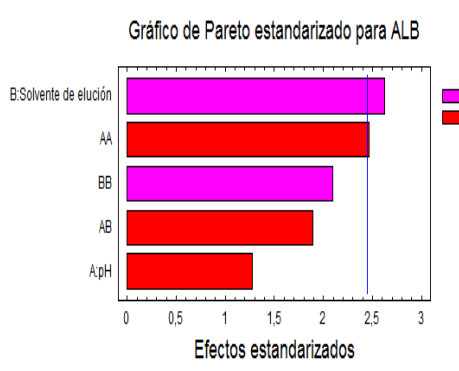
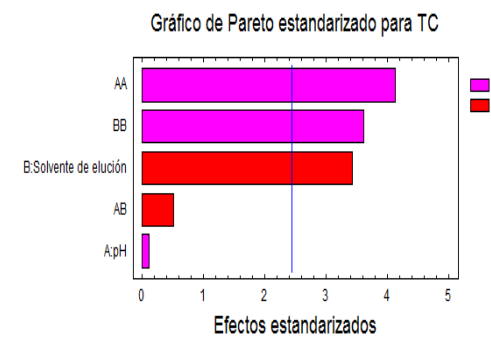
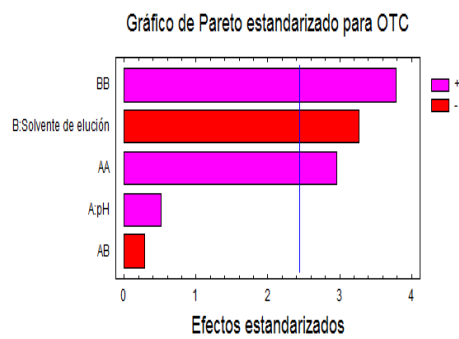
4.4.2.2.1. Análisis de la varianza.

Los resultados del diseño experimental se analizaron utilizando la metodología de ANOVA con ayuda del *software* estadístico *Statgraphics Centurion XVI*. Con este diseño se pueden estudiar 5 efectos: dos principales y tres interacciones dobles para cada uno de los analitos, lo cual resulta en la tarea de analizar 8 diseños experimentales.

El ANOVA, para la variable de respuesta, medida como relación de área cromatográfica se encuentra en el **Anexo Ñ**, en donde se resume el análisis estadístico realizado para el diseño experimental. Para cada factor se muestran dos términos: la *Razón-F* que mide la contribución de cada factor en la variación de la respuesta y *el Valor-P*, el cual es una medida de la significancia estadística de cada uno de estos valores [48,49]; de manera que para este estudio los factores considerados como significativos en el proceso

de *clean-up*, son aquellos que presentan un valor $p < 0,05$ que es el Valor de probabilidad o nivel de confianza del 95%.

Analizando la tabla del **Anexo Ñ** y los diagramas de Pareto de la **Figura 40**, se puede observar el factor más significativo para el proceso de *clean-up* de las drogas veterinarias y hormonas: el solvente de extracción (B) para todos los analitos; y las interacciones de segundo orden significativas para cada analito -AB- (datos resaltados en la tabla del **Anexo Ñ**). Además se puede establecer que el pH (A) no resultó significativo para ninguno de las sustancias en estudio. Sin embargo, la importancia de este factor fue indispensable debido a la naturaleza de la matriz trabajada y a la combinación de este factor con el solvente de extracción (interacción AB).



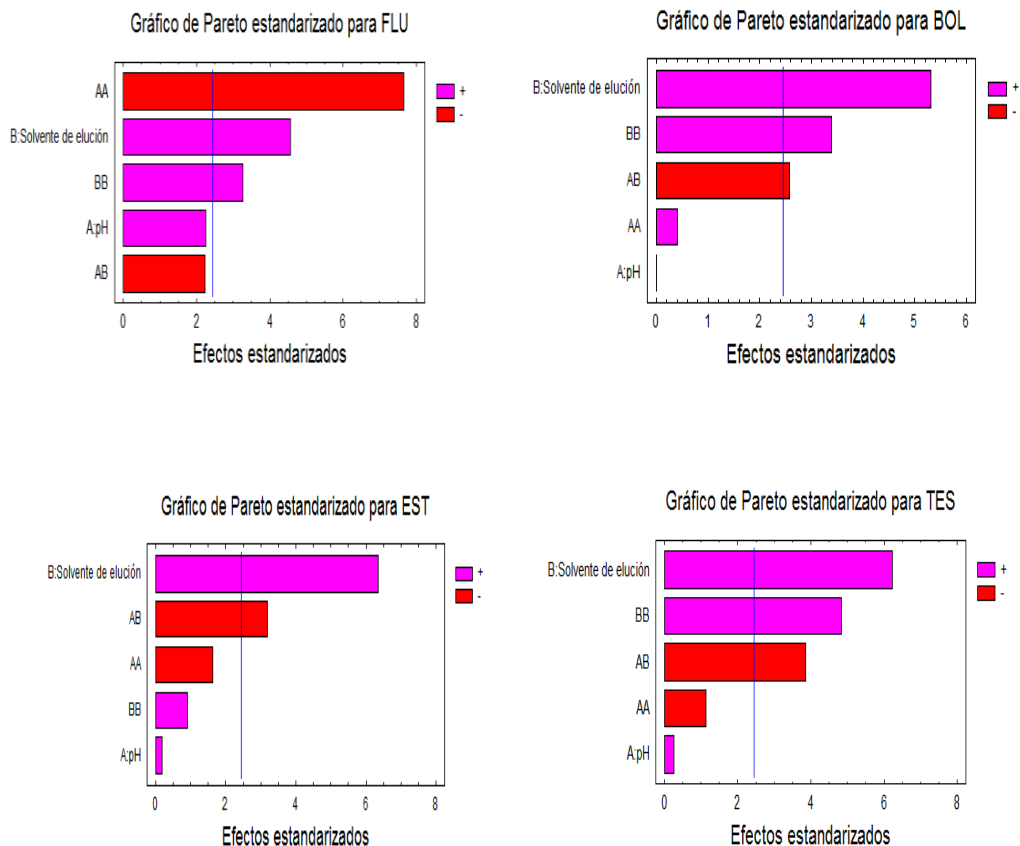


Figura 40. Diagramas de Pareto de efectos para las drogas veterinarias y hormonas analizadas

Cuando la respuesta de un factor depende drásticamente del nivel de otro factor, esta interacción puede ser interpretada gráficamente (**Figura 41**), e.g., en el caso de la OTC, se encontró que las mejores condiciones de extracción son un pH de 9, y como solvente de extracción: metanol/ solución 2:1 metanol: *buffer* acetato, 50 mM pH 5.0.

Al unir las condiciones encontradas por medio de las gráficas de interacciones y los efectos principales del ANOVA, se determinaron los niveles de cada factor que permitieron un proceso de *clean-up* de extractos cárnicos, con menor pérdida de analitos.

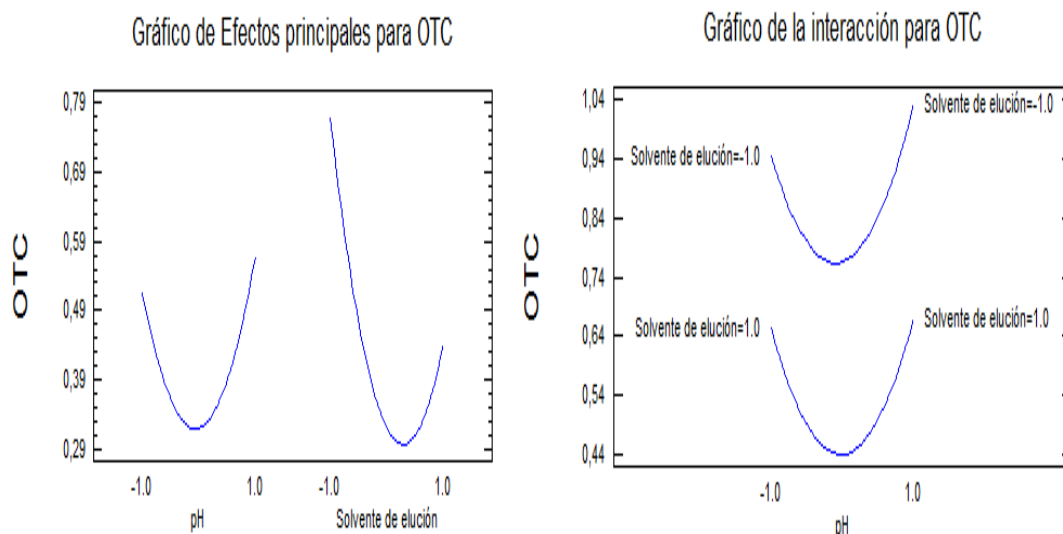


Figura 41. Efectos principales y de interacción de cada uno de los factores, en el proceso de *clean-up* de la oxitetraciclina.

4.4.2.2.2. Mejores condiciones de *clean-up*:

Para el análisis simultáneo de drogas veterinarias y hormonas es necesario que durante el proceso de *clean-up* de los extractos, se presente la menor pérdida de los analitos. Sin embargo, no es posible trabajar en el punto óptimo para cada uno de los compuestos de interés (**Tabla 34**), debido a que los analitos de interés de este proyecto poseen diferencias en sus propiedades químicas.

Sin embargo, es posible trabajar bajo condiciones que permitan extraer la mayoría de los compuestos, y para este grupo de drogas veterinarias y hormonas las mejores condiciones para recuperar la mayor cantidad de todos los analitos en el *clean-up* se indican en la **Tabla 35**.

Las condiciones del proceso de *clean-up* empleadas en el desarrollo del proyecto, corresponden a las mejores condiciones arrojadas por el diseño factorial 3^2 para las OTC y TC; debido a que la sensibilidad del método para éstas, son las más bajas dentro del grupo de sustancias seleccionadas, además, la respuesta de OTC y TC es muy baja en el punto óptimo de los otros analitos (**Tabla 33**).

Tabla 34. Condiciones más favorables para el proceso de *clean-up* de cada una de las drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	pH	Solvente de elución
Clorhidrato de oxitetraciclina	9	Metanol/ metanol: <i>buffer</i> acetato (2:1)
Clorhidrato de tetraciclina	9	Metanol/ metanol: <i>buffer</i> acetato (2:1)
Albendazol	6	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)
Fenbendazol	6	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)
Boldenona	5	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)
17-β-estradiol	6	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)
Testosterona	6	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)
Flunixin	6	Metanol/ metanol:acetato de etilo (1:1)

Tabla 35. Condiciones más favorables para el proceso de *clean-up* en la extracción simultánea de un grupo selecto de drogas veterinarias y hormonas en carne.

Variable	Especificaciones
pH	9
Solvente de elución	Metanol/ metanol: <i>buffer</i> de acetato (2:1)

De manera que la etapa de *clean-up* se hizo de la siguiente forma: el acondicionamiento del cartucho de SPE C₁₈ se realizó mediante la adición de 6 mL de *n*-hexano, 6 mL de acetonitrilo y 6 mL de metanol consecutivamente; sin dejar secar el cartucho se adicionaron 10 mL de la muestra, lavando posteriormente con 6 mL de *n*-hexano y llevando a sequedad. Seguidamente se eluyó con 6 mL de metanol y 6 mL de solución metanol:*buffer* acetato (2:1). Por último se unieron las fracciones colectadas en la adición de la muestra y la elución, y se aforaron a un volumen de 10 mL. De acuerdo con la técnica cromatográfica seleccionada, el extracto se continuó procesando según el esquema propuesto en la **Sección 3.6**.

4.4.3. Extracción exhaustiva.

El procedimiento de extracción antes del análisis por HPLC-DAD, se aplicó varias veces a una misma muestra de carne, con el propósito de lograr cantidades de drogas veterinarias y hormonas por debajo del nivel de detección del equipo cromatográfico (**Ver Figura 42**). Con base en esta información, se pudo establecer que es necesario extraer dos veces una muestra de 10 g de carne.

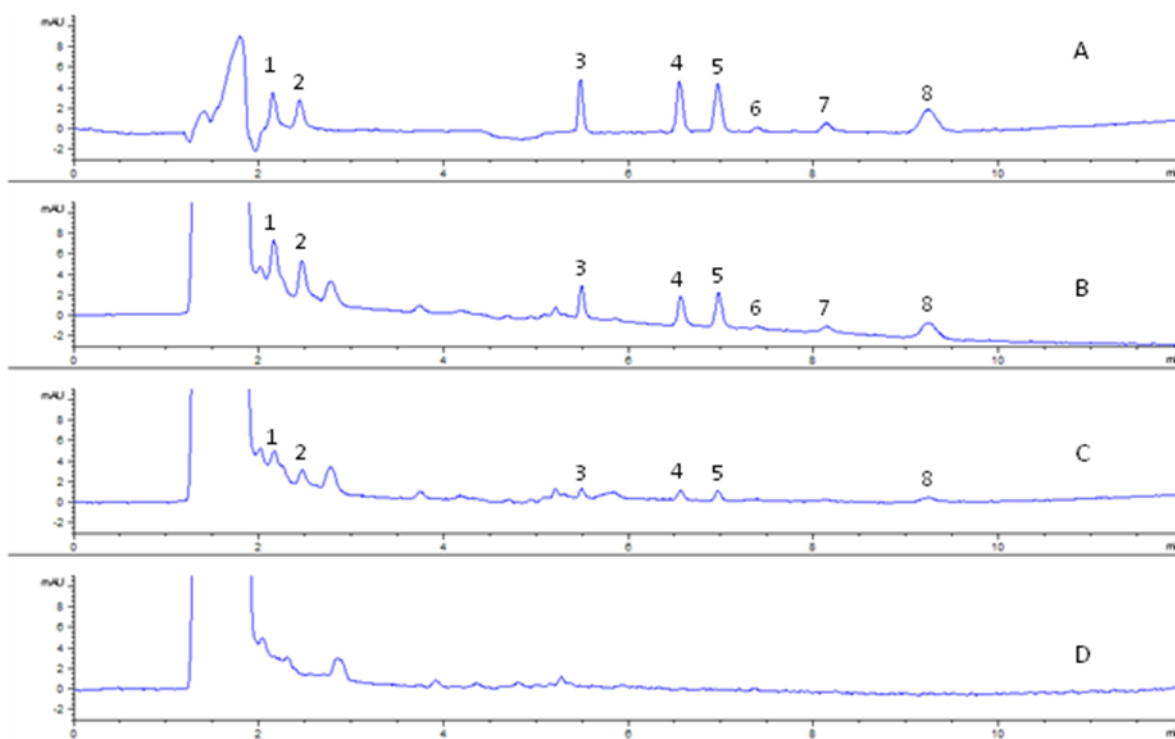


Figura 42. Comparación de los cromatogramas obtenidos mediante las extracciones consecutivas desarrolladas a la misma muestra enriquecida de hormonas y drogas veterinarias analizadas por HPLC.

Cromatogramas típicos de drogas veterinarias y hormonas, analizadas por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. A. Material de referencia certificado (MRC), B. Primera extracción, C. Segunda extracción, D. Tercera extracción.

La razón fundamental del procedimiento exhaustivo es garantizar que la mayor cantidad de analitos presentes en una muestra de carne, efectivamente, se transfieran a la mezcla de solventes de extracción. Toda vez que los resultados

involucrados en el presente trabajo de grado pueden representar medidas de rigor a los centros de sacrificio certificados en el país y un falso negativo continuaría repercutiendo en la salud de los consumidores.

4.4.4. Figuras analíticas de mérito

4.4.4.1. Determinación de la reproducibilidad del método de extracción.

La metodología de extracción fue desarrollada por personas diferentes, bajo las mismas condiciones. Con éstos resultados se evaluó el coeficiente de variación para los porcentajes de recuperación de cada analista (**Tabla 36**).

Tabla 36. Porcentajes de recuperación evaluados por diferentes analistas para estimar la reproducibilidad en el proceso de extracción de las drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	<X> Recuperación analista A, %	<X> Recuperación analista B, %	S	C.V, %
Clorhidrato de oxitetraciclina	97	90	4,9	5,3
Clorhidrato de tetraciclina	93	90	2,1	2,3
Albendazol	75	77	1,4	1,9
Fenbendazol	73	70	2,1	3,0
Boldenona	96	91	3,5	3,8
17-β-Estradiol	90	93	2,1	2,3
Testosterona	94	89	3,5	3,9
Flunixin	96	93	2,1	2,2

n=3

Como se observa en la **Tabla 36** la reproducibilidad del método de extracción medida por medio de los coeficientes de variación, está acorde con las BPL, ya que sus valores no superan el 5.3%.

4.4.4.2. Robustez de la metodología de extracción.

En el procedimiento de extracción previo al análisis de las drogas veterinarias y hormonas por cromatografía líquida, una de las etapas contempla la extracción de grasas con *n*-hexano, debido a que cerca del 15% de una muestra de carne se compone de ácidos grasos (saturados e insaturados), triglicéridos, colesterol, y algunos fosfolípidos. Para verificar la robustez del método se sustituyó *n*-hexano por dietiléter.

Tabla 37. Estimación de la robustez del proceso de extracción de las drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia	<X> Recuperación con <i>n</i> -hexano, %	<X> Recuperación con dietiléter, %	S	C.V, %
Clorhidrato de oxitetraciclina	94	96	1,4	1,5
Clorhidrato de tetraciclina	90	96	4,2	4,6
Albendazol	78	72	4,2	5,7
Fenbendazol	74	70	2,8	3,9
Boldenona	90	95	3,5	3,8
17- β -estradiol	93	96	2,1	2,2
Testosterona	89	93	2,8	3,1
Flunixin	94	95	0,7	0,7

n=3

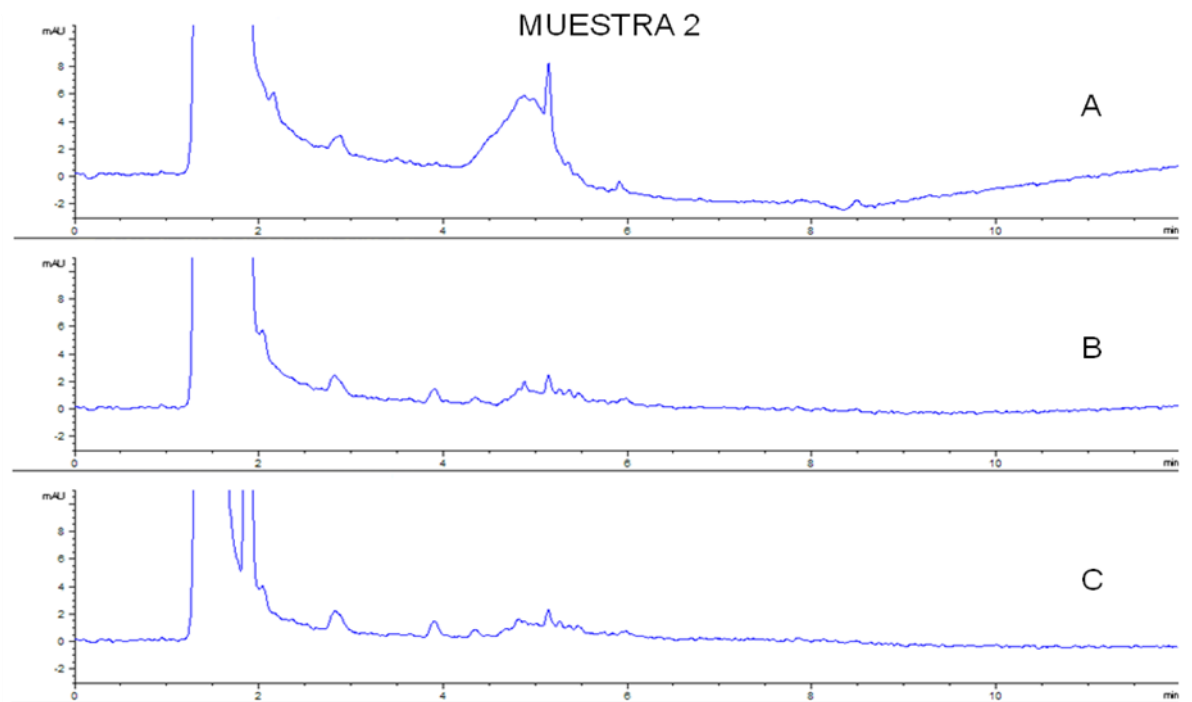
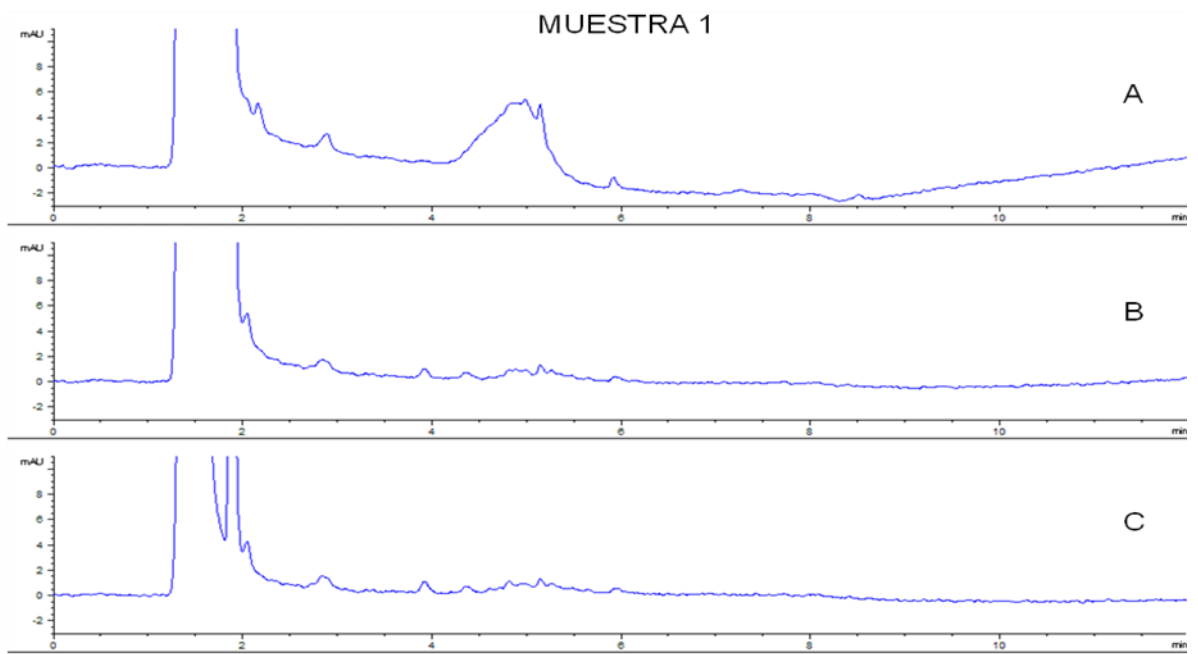
En la **Tabla 37**, se observa la variación de los porcentajes de recuperación de los analitos al desarrollar la metodología con la alternativa propuesta para la extracción de grasas. Los cambios no son muy altos, lo que se refleja en los coeficientes de variación que se encuentran en el rango de 0.7 – 5.7%.

4.5. APLICACIÓN DEL ANÁLISIS A MUESTRAS REALES DEL MERCADO LOCAL

Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo, de cuatro muestras comerciales de carne adquiridas en el mercado de la ciudad de Bucaramanga.

4.5.1. Determinación:

Se realizó el proceso de extracción descrito anteriormente a cuatro muestras de carne por triplicado, y se compararon los t_R y espectros UV-Vis de cada una de las drogas veterinarias y hormonas de referencia, con los picos cromatográficos observados en los cromatogramas obtenidos en los extractos de las muestras, analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas **Figura 43**.



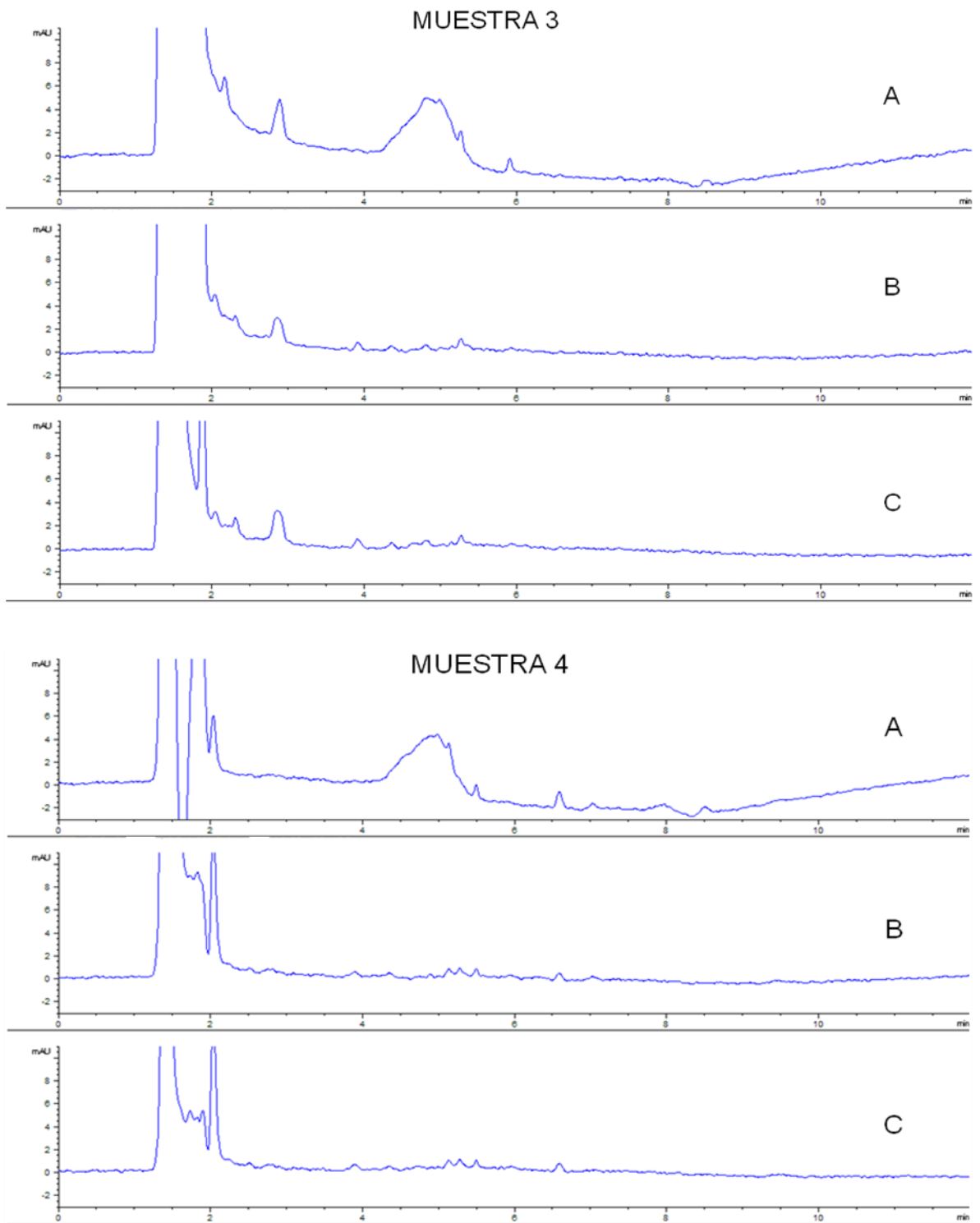


Figura 43. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda obtenidos a partir de los extractos de muestras de carne provenientes del mercado local de la ciudad de Bucaramanga, analizados por HPLC.

Cromatogramas típicos de extractos cárnicos, analizados por HPLC-DAD-UV-Vis, en la columna apolar Zorbax Eclipse XDB-C18. A. 247 nm, B. 270 nm, C. 280 nm.

De acuerdo con los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda de los extractos de muestras de carne del mercado local de la Ciudad de Bucaramanga, se estableció que: en dichas muestras las drogas veterinarias y hormonas a saber; clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, albendazol, fenbendazol, flunixin, boldenona, testosterona y 17- β -estradiol se encuentran por debajo del nivel mínimo de detección del equipo de HPLC-DAD. Por ende, no se hizo necesario desarrollar el procedimiento de derivatización para el análisis confirmatorio mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de las respectivas hormonas.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de proyecto de grado, se logró implementar una metodología de análisis cromatográfico confiable y reproducible para la determinación simultánea de un grupo selecto de hormonas: testosterona, 17 β -estradiol y boldenona, y drogas veterinarias: albendazol, fenbendazol, clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina y flunixin, residuales en carne de bovino, utilizando HPLC-DAD como técnica cromatográfica de *screening* y GC-MS como técnica confirmatoria, para los derivados de las hormonas.

Para garantizar una separación simultánea y una resolución aceptable (>4) en HPLC-DAD para las hormonas y drogas veterinarias, se fijaron las variables con mayor incidencia de la siguiente forma: temperatura 35°C, flujo de la fase móvil 1 mL/min, volumen de inyección de muestra 20 μ L, y ácido fórmico al 0.2%: metanol: acetonitrilo como composición de la fase móvil.

El método analítico desarrollado acata las normas establecidas por las buenas prácticas de laboratorio, BPL, con respecto a las repetibilidades de los tiempos de retención (C.V, 0-0.071%), las áreas cromatográficas (C.V, 1.1-7.3%). Las reproducibilidades de los tiempos de retención (C.V, 0-0.4%), las áreas cromatográficas (C.V, 0.6-2.0%). Así como, la obtención de coeficientes de correlación lineal ($R^2 > 0.99$) y una exactitud expresada como el porcentaje de recuperación satisfactorios (72-96%) para el método de calibración externa para HPLC-DAD. Con lo que se garantizó la realización reproducible del análisis cualitativo y cuantitativo simultáneo de las hormonas y drogas veterinarias contenidas en la solución patrón bajo estudio.

Para el análisis confirmatorio de los analitos por GC-MS, se hizo indispensable un proceso de derivación para disminuir la polaridad de los analitos y por ende su

volatilidad y estabilidad, ensayos que solo arrojaron resultados positivos para las hormonas. Las condiciones de derivación fueron: relación molar hormona/agente derivante 1:50, temperatura ambiente, tiempo reacción de 12 horas, piridina como solvente y catalizador; y *n*-hexano como solvente de extracción del derivado.

Los acetil y trimetilsilil derivados de las hormonas se caracterizaron por medio de sus espectros infrarrojos y espectros de masas. Los estudios mostraron que las dos reacciones de derivación son viables para convertir a las hormonas cuantitativamente a sus derivados. Sin embargo, para el desarrollo del trabajo de investigación se utilizó la reacción de acetilación con anhídrido acético, puesto que es más económico, de fácil consecución y manipulación, más volátil, lo que facilita la etapa posterior de concentración.

Se comprobó la realización reproducible del análisis cualitativo y cuantitativo de los derivados acetilados de las hormonas contenidas en la solución patrón bajo estudio, al cumplir las normas establecidas por las buenas prácticas de laboratorio, BPL, con respecto a las repetibilidades de los tiempos de retención (C.V, 0.06-0.08%), las áreas cromatográficas (C.V, 6.2-9.2%); las reproducibilidades de los tiempos de retención (C.V, 0.021-0.06%); así como, la obtención de coeficientes de correlación lineal ($R^2 > 0.99$) y una exactitud expresada como el porcentaje de recuperación aceptables (85-93%) para el método de calibración externa para GC-MS.

Se implementó una técnica de extracción simultánea de las hormonas y drogas veterinarias, teniendo en cuenta la importancia de la precipitación de las proteínas contenidas en la matriz cárnica; para lo cual fue necesario establecer las condiciones de extracción que precipitaran la mayor cantidad de proteínas de la siguiente manera: solvente de extracción y agente precipitante acetonitrilo; 1 gramo de sulfato de amonio, como coadyudante; 30 minutos de sonicación a una temperatura de 80°C, para la liberación de los analitos de la matriz y aumento de

su solubilidad. Al igual que para la precipitación de proteínas por desnaturalización con calentamiento; 10 minutos de centrifugación y 20 minutos en el agitador horizontal, que permitieron una mejor separación entre el precipitado y el sobrenadante.

Las condiciones empleadas para el *clean-up* en el desarrollo del proyecto, corresponden a las mejores condiciones arrojadas por el diseño factorial 3^2 para las OTC y TC: el acondicionamiento del cartucho de SPE C₁₈ se realizó mediante la adición de 6 mL de *n*-hexano, 6 mL de acetonitrilo y 6 mL de metanol consecutivamente; sin dejar secar el cartucho se adicionaron 10 mL de la muestra, lavando posteriormente con 6 mL de *n*-hexano y llevando a sequedad. Seguidamente se eluyó con 6 mL de metanol y 6 mL de solución metanol: *buffer* de acetato (2:1). Por último se unieron las fracciones colectadas en la adición de la muestra y la elución, y se aforaron a un volumen de 10 mL.

La reproducibilidad del método de extracción medida por medio de los coeficientes de variación, está acorde con las BPL, ya que sus valores no superan el 5.3%, por tal motivo se puede garantizar la realización reproducible del proceso de extracción simultáneo de las hormonas y drogas veterinarias en muestras de carne.

El método desarrollado se aplicó a la extracción, reconocimiento y cuantificación simultánea de las hormonas y drogas veterinarias: testosterona, 17 β -estradiol, boldenona, albendazol, fenbendazol, clorhidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de tetraciclina y flunixin, en muestras de carne de bovino tomadas del mercado local de la ciudad de Bucaramanga. En estas muestras no se detectó ninguno de los analitos estudiados por encima de los niveles mínimos de detección de las técnicas implementadas.

6. RECOMENDACIONES

Partiendo del método de extracción, limpieza y concentración en matrices cárnicas, se recomienda optimizar este procedimiento, aumentando los porcentajes de recuperación de las drogas veterinarias y hormonas analizadas, ya que las condiciones escogidas en el proceso de *clean-up* favorecen la recuperación de las OTC y TC principalmente.

Desarrollar un diseño de experimento en el método cromatográfico por HPLC-DAD con el propósito de mejorar la sensibilidad del método o en su defecto sustituir el detector por uno de mejor respuesta y, que pueda brindar información estructural, e.g., LC-TOF, de modo que el análisis realizado a una muestra sospechosa sea confirmatorio.

Con la implementación del presente método de análisis de drogas veterinarias y hormonas, se podría realizar un estudio sobre la presencia de estas sustancias en otros centros de abastecimiento de alimentos del departamento de Santander; además para complementar el estudio se podría aplicar la metodología al análisis de estas sustancias como residuos en otras matrices cárnicas. Posteriormente sería necesario elaborar un programa para informar y capacitar al sector ganadero sobre el manejo adecuado de las drogas veterinarias y hormonas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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: www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf. Acceso: 27 de mayo de 2010.
2. Anabólicos en producción de carnes Seguridad Alimentaria Instituto Tecnología de Alimentos, *INTA Cautelar*.
3. VAN E., N., VAN P., C., HELBO, V., New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products, *The Analyst*, **123** **1998**, pp. 2423–2427.
4. Apuesta Exportadora Agropecuaria. Ganado bovino – carne [Sitio em Internet] Disponible en: www.agronet.gov.co/www/htm3b/Apuesta%20Exportadora/005Ganado%20Bovino.pdf. Acceso: 15 de junio 2010.
5. REIG, M., TOLDRÁ, F., Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection, *Meat Science*, **78**, **2008**, pp. 60 – 67.
6. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 2004. Resolución 322/2004 del 24 febrero por la cual se adiciona un párrafo 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: 24 junio 2010.
7. LOZANO, M., ARIAS, D., Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama actual en Colombia, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, **21**, **2008**, pp. 121-135.
8. WOLTERS, B., KRAAN, G., Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography mass-espectrometry of esteroids, *Journal of Chromatography A*, **843**, **1999**, pp. 247 – 274.

9. KAIRUZ, L., Introducción al estudio de la composición de los alimentos. 1ª edición. Ed. Guadalupe Ltda., Bogotá, 2002, pp. 27-64.
10. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.inchem.org/. Acceso: 18 junio 2010.
11. Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos 2003. Decreto 5/2003 por la cual se elabora el glosario de términos y definiciones para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.codexalimentarius.net. Acceso: 18 junio 2010.
12. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.chemblink.com/index.htm . Acceso: 18 junio 2010.
13. ROSENSTEIN, E., Diccionario de especialidades veterinarias. 13ª Edición, Ed. Thomsom, Bogotá, 2003.
14. Sitio en Internet]. Disponible en: www.brovel.com.mx/. Acceso: 10 Junio 2010. Para la carne http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root//Decreto1500_2007.pdf.
15. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 1996. Resolución 1056 por la cual se dictan disposiciones sobre el control técnico de los insumos pecuarios. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/498ca7d0-65d6-4f6d-bb03-bc905c0a22d7/1056.aspx>. Acceso: 25 Junio 2010.
16. GENTILI, A., LC-MS methods for analyzing anti-inflammatory drugs in animal-food products, *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, **2007**, pp. 595 – 608.
17. SHAO, B., ZHAO, R., MENG, J., Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **548**, **2005**, pp. 41– 50
18. MARTÍNEZ, J., SANZ, A., Repercusiones del implante de anabolizantes androgénicos sobre los perfiles hormonales de ganado vacuno, Madrid,

- 1993, 220p. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Fisiología Animal
19. REIG, M., TOLDRÁ, F., Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat, *Food Analytical Methods*, 1, **2008**, pp. 2–9.
 20. CHALELA, J., Agentes Anabólicos, *Kyron*, 7, 2000, pp. 2 – 21.
 21. MARCHAND, P., BIZEC, B., MONTEAU, G., Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 867, **2000**, pp. 219 – 233.
 22. ZAVALA, P., Residuos químicos en carnes y su relación con la normatividad, Octubre de 2006, Ministerio de Agricultura, Dirección general de promoción agraria- Dirección de crianzas.
 23. [Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protein_precipitation_procedures.html
Acceso: 24 Junio 2010.
 24. VOET, D. and VOET, J., Bioquímica. 3a. Ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2006, pp. 135 – 166.
 25. COX M. and LEHNINGER D. Principios de Bioquímica. 4ª. Ed., Editorial Omega, pp: 59-311
 26. MARASHIELLO, C., DÍAZ, I. and GARCÍA, J.A., *Journal of High Resolution Chromatography*, 19, **1996**, pp. 165 – 168.
 27. BRUNER, F., Gas Chromatographic Environmental Analysis Principles, Techniques, Instrumentation, VCH Publishers, Inc., New York, E.E.U.U., 1993, pp. 185-190
 28. POOLE, C. F. and POOLE, S. K. Chromatography. *Today*, Elsevier, *Amsterdam*, 1991, pp. 752-763.
 29. SPE, Reference Manual & Users Guide. Penomenex, 2000.
 30. PENTON, Z. E., Advances in Chromatography: sample preparation for Gas Chromatography with Solid-Phase Extraction and Solid Phase Microextraction, Ed. Marcel Decker, Inc., New York, **1993**, pp. 206-215.

31. Solid phase Extraction Application Guide. Macherey-Nagel, 2004.
32. STOLKER, A., BRINKMAN, U., Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals, *Journal Chromatography A*, 1067, **2005**, pp. 15 – 53.
33. TOLDRÁ, F., REIG, M., Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods, *Trends in Food Science & Technology*, 17, **2006**, pp. 482– 489.
34. SKOOG, D., HOLLER, J., NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. 5^{ta} Ed. McGraw-Hill: España, 2003, pp. 269 - 458, 409 - 458, 730 - 807.
35. RUBINSON, J. Análisis Instrumental. 2^{da} Ed. Prentice Hall: Madrid, 2001, pp. 522 - 708.
36. ARDREY, R.E. Liquid chromatography–mass spectrometry. University of Huddersfield, Huddersfield, Wiley, New York, **2003**, pp.200-240.
37. CARREÑO, L., Implementación y comparación de técnicas de preparación de muestras y de métodos de análisis (GC, GC-MS y LC) para la determinación de fenoles en muestras de interés ambiental, Bucaramanga, 1997, 131p. Tesis de Maestría (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
38. GROB, R., Modern Practice Of Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1985, p. 897.
39. CLEMENT, R.E., Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1990, p. 385.
40. DRUZD, J., Chemical Derivatization in Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1981, p. 223.
41. BLAU, K. And HALKET, M., Hanbook of Derivaties for Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1993, pp. 1-100.
42. INMACULADA, G., SARABIA, L., ORTIZ, C., Optimization of the chromatographic conditions for the determination of hormones by gas

chromatography with mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta*, 544, **2005**, pp. 26–35.

43. BUFFINGTON, R. And WILSON, M.K., *Detector and Chromatographic*, Ed. Hewlett-Packard, 1987, pp. 27 – 47.
44. CABALLERO, D., *Implementación de un método cromatográfico para la determinación y cuantificación del colesterol en alimentos*, Bucaramanga, 2002. Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
45. CHRISTIE W, *Gas Chromatography and Lipis*, Ed. The Oily Press Ltda., Dundee, 1^a Edition, 1989, p 303.
46. SMITH, B. *Infrared Spectral Interpretation*. CRC Press, New York, 1999, pp. 75 – 124.
47. Calderón, C. *Manual para la interpretación de espectros infrarrojos*. 1^{ra} Ed. Guadalupe Ltda.: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.E, 1985, pp. 37-84.
48. PULIDO, H. y DE LA VARA, R., *Análisis y diseño de experimentos*, Ed. McGrawHill, 2008, p 121.
49. MILLER, MILLER. *Estadística y quimiometría para química analítica*, Ed. Prentice-Hall, 4^a Ed. Madrid, 2002. p.278.

BIBLIOGRAFÍA

Anabólicos en producción de carnes Seguridad Alimentaria Instituto Tecnología de Alimentos, *INTA Cautelar*.

Apuesta Exportadora Agropecuaria. Ganado bovino – carne [Sitio em Internet] Disponible en: www.agronet.gov.co/www/htm3b/Apuesta%20Exportadora/005Ganado%20Bovino.pdf. Acceso: 15 de junio 2010.

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

BLAU, K. And HALKET, M., Hanbook of Derivaties for Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1993, pp. 1-100.

BUFFINGTON, R. And WILSON, M.K., Detector and Chromatographic, Ed. Hewlett-Packard, 1987, pp. 27 – 47.

BRUNER, F., Gas Chromatographic Enviromental Analysis Principles, Techniques, Instrumentation, VCH Publishers, Inc., New York, E.E.U.U., 1993, pp. 185-190

CABALLERO, D., Implementación de un método cromatográfico para la determinación y cuantificación del colesterol en alimentos, Bucaramanga, 2002. Tesis de Pregrado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

Calderón, C. Manual para la interpretación de espectros infrarrojos. 1^{ra} Ed. Guadalupe Ltda.: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.E, 1985, pp. 37-84.

CARREÑO, L., Implementación y comparación de técnicas de preparación de muestras y de métodos de análisis (GC, GC-MS y LC) para la determinación de fenoles en muestras de interés ambiental, Bucaramanga, 1997, 131p. Tesis de Maestría (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

CHALELA, J., Agentes Anabólicos, *Kyron*, 7, 2000, pp. 2 – 21.

CHRISTIE W, Gas Chromatography and Lipis, Ed. The Oily Press Ltda., Dundee, 1^a Edition, 1989, p 303.

CLEMENT, R.E., Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical

Applications, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1990, p. 385.

Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos 2003. Decreto 5/2003 por la cual se elabora el glosario de términos y definiciones para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.codexalimentarius.net. Acceso: 18 junio 2010.

COX M. and LEHNINGER D. Principios de Bioquímica. 4^a. Ed., Editorial Omega, pp: 59-311

DRUZD, J., Chemical Derivatization in Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1981, p. 223.

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: www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf. Acceso: 27 de mayo de 2010.

GENTILI, A., LC-MS methods for analyzing anti-inflammatory drugs in animal-food products, *Trends in Analytical Chemistry*, 26, **2007**, pp. 595 – 608.

GROB, R., Modern Practice Of Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York. 1985, p. 897.

INMACULADA, G., SARABIA, L., ORTIZ, C., Optimization of the chromatographic conditions for the determination of hormones by gas chromatography with mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta*, 544, **2005**, pp. 26–35.

KAIRUZ, L., Introducción al estudio de la composición de los alimentos. 1^a edición. Ed. Guadalupe Ltda., Bogotá, 2002, pp. 27-64.

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

MARASHIELLO, C., DÍAZ, I. and GARCÍA, J.A., *Journal of High Resolution Chromatography*, 19, **1996**, pp. 165 – 168.

MARCHAND, P., BIZEC, B., MONTEAU, G., Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 867, **2000**, pp. 219 – 233.

MARTÍNEZ, J., SANZ, A., Repercusiones del implante de anabolizantes androgénicos sobre los perfiles hormonales de ganado vacuno, Madrid, 1993, 220p. Tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de

Veterinaria. Departamento de Fisiología Animal

MILLER, MILLER. Estadística y quimiometría para química analítica, Ed. Prentice-Hall, 4ª Ed. Madrid, 2002. p.278.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 1996. Resolución 1056 por la cual se dictan disposiciones sobre el control técnico de los insumos pecuarios. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/498ca7d0-65d6-4f6d-bb03-bc905c0a22d7/1056.aspx>. Acceso: 25 Junio 2010.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, 2004. Resolución 322/2004 del 24 febrero por la cual se adiciona un párrafo 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: 24 junio 2010.

PENTON, Z. E., Advances in Chromatography: sample preparation for Gas Chromatography with Solid-Phase Extraction and Solid Phase Microextraction, Ed. Marcel Decker, Inc., New York, **1993**, pp. 206-215.

POOLE, C. F. and POOLE, S. K. Chromatography. *Today, Elsevier, Amsterdam*, 1991, pp. 752-763.

PULIDO, H. y DE LA VARA, R., Análisis y diseño de experimentos, Ed. McGrawHill, 2008, p 121.

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

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

ROSENSTEIN, E., Diccionario de especialidades veterinarias. 13ª Edición, Ed. Thomsom, Bogotá, 2003.

RUBINSON, J. Análisis Instrumental. 2^{da} Ed. Prentice Hall: Madrid, 2001, pp. 522 - 708.

SHAO, B., ZHAO, R., MENG, J., Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 548, **2005**, pp. 41– 50

[Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protein_precipitation_procedures.html
Acceso: 24 Junio 2010.

[Sitio en Internet]. Disponible en: www.brovel.com.mx/. Acceso: 10 Junio 2010.
Para la carne
http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root//Decreto1500_2007.pdf.

[Sitio en Internet]. Disponible en: www.chemblink.com/index.htm . Acceso: 18 junio 2010.

[Sitio en Internet]. Disponible en: www.inchem.org/. Acceso: 18 junio 2010.

SKOOG, D., HOLLER, J., NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. 5^{ta} Ed. McGraw-Hill: España, 2003, pp. 269 - 458, 409 - 458, 730 - 807.

SMITH, B. Infrared Spectral Interpretation. CRC Press, New York, 1999, pp. 75 – 124.

Solid phase Extraction Application Guide. Macherey-Nagel, 2004.

SPE, Reference Manual & Users Guide. Penomenex, 2000.

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

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

VAN E., N., VAN P., C., HELBO, V., New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products, *The Analyst*, 123 **1998**, pp. 2423– 2427.

VOET, D. and VOET, J., Bioquímica. 3a. Ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2006, pp. 135 – 166.

WOLTERS, B., KRAAN, G., Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography mass-spectrometry of esteroids, *Journal of Chromatography A*, 843, **1999**, pp. 247 – 274.

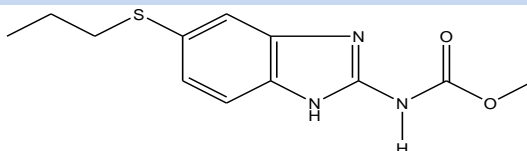
ZAVALA, P., Residuos químicos en carnes y su relación con la normatividad, Octubre de 2006, Ministerio de Agricultura, Dirección general de promoción agraria- Dirección de crianzas.

ANEXOS

Anexo A. Estructuras, propiedades toxicológicas y fisicoquímicas de las hormonas y drogas veterinarias

Droga veterinaria

Albendazol, C₁₂H₁₅N₃O₂S



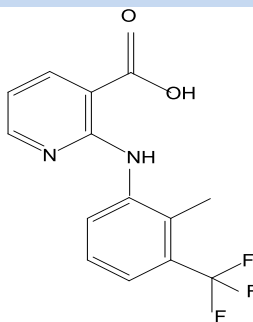
Propiedades fisicoquímicas CAS: 54965-21-8, peso molecular: 265,33 g/mol; Color: Cristal blanco; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 208-210 °C.

Parámetros toxicológicos LMR: 100 µg/kg , DL₅₀: 2400 (mg/kg)

Usos Erradicación del parasitismo gastrointestinal, pulmonar y hepático (mariposa del hígado), con efecto total sobre larvas, huevos y parásitos adultos.

Droga veterinaria

Flunixin, C₁₄H₁₁O₂N₂F₃



Propiedades fisicoquímicas CAS: 38677-85-9, peso molecular: 296.24 g/mol; Color: No reportado; punto de ebullición: No reportado. Punto de fusión: 227-228 °C.

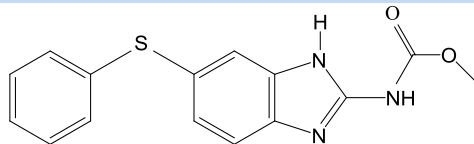
Parámetros toxicológicos LMR: 20 µg/kg, DL₅₀: No reportado (mg/kg) [16].

Usos Tratamiento y control de dolor, inflamación y fiebre, asociados con trastornos musculoesqueléticos. Así mismo, para el alivio del dolor

visceral asociado con cólicos.

Droga veterinaria

Fenbendazol, C₁₅H₁₄N₃O₂S



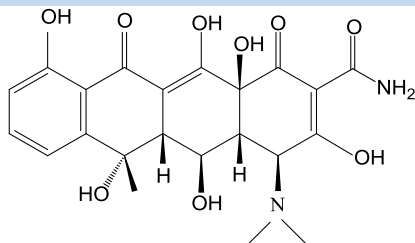
Propiedades fisicoquímicas CAS: 43210-67-9, peso molecular: 299,35 g/mol; Color: Cristal blanco; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 215 °C.

Parámetros toxicológicos LMR: 100 µg/kg , DL₅₀: 2400 (mg/kg)

Usos Erradicación del parasitismo gastrointestinal, pulmonar y hepático (mariposa del hígado), con efecto total sobre larvas, huevos y parásitos adultos.

Droga veterinaria

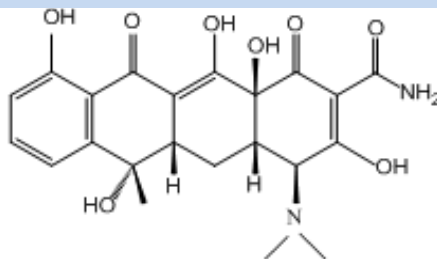
Clorhidrato de Oxitetraciclina, C₂₂H₂₄N₂O₁₀



Propiedades fisicoquímicas CAS: 2058-46-0, peso molecular: 496,89 g/mol; Color: amarillo brillante; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 183 °C.

Parámetros toxicológicos LMR: 200 µg/kg , DL₅₀: 280 (mg/kg)

Usos En infecciones ocasionadas por gérmenes sensibles a la sustancia, como *Anaplasma sp.* (anaplasmosis), *Rickettsia sp.*, *Streptococcus sp.* (mastitis), *Clostridium sp.* (tétanos), *Escherichia coli* (enteritis bacteriana), *Pasteurellas sp.* (neumonías), *Leptospira sp.* (leptospirosis), *Campylobactor sp.* (vibriosis bovina), *Haemophilus sp.*, *Listeria sp.* y *Shigella sp.*

Droga veterinaria**Clorhidrato de tetraciclina, C₂₂H₂₄N₂O₉****Propiedades fisicoquímicas**

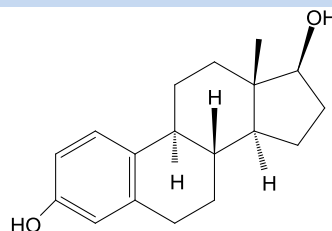
CAS: 64-75-5, peso molecular: 480,90 g/mol; Color: amarillo; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 213-214 °C.

Parámetros toxicológicos

LMR: 200 µg/kg , DL₅₀: 2759 (mg/kg)

Usos

En infecciones ocasionadas por gérmenes sensibles a la sustancia, como *Anaplasma sp.* (anaplasmosis), *Rickettsia sp.*, *Streptococcus sp.* (mastitis), *Clostridium sp.* (tétanos), *Escherichia coli* (enteritis bacteriana), *Pasteurellas sp.* (neumonías), *Leptospira sp.* (leptospirosis), *Campylobactor sp.* (vibriosis bovina), *Haemophilus sp.*, *Listeria sp.* y *Shigella sp.*

Hormona**17-β-estradiol, C₁₈H₂₄O₂****Propiedades fisicoquímicas**

CAS: 50-28-2, peso molecular: 272,39g/mol; Color: Blanquecino; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 175-178 °C.

Parámetros toxicológicos

LMR: No fijado, DL₅₀: No reportado.

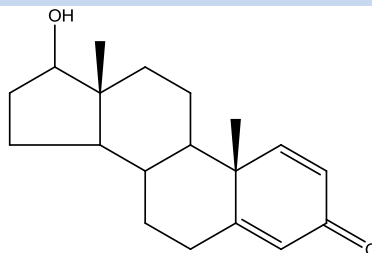
Usos

Indicado para el anestro (ausencia de calores) causados por deficiencia estrogénica y para aumentar los síntomas de celo o calor

en las hembras que presentan “calores silenciosos”.

Hormona

Boldenona, C₁₉H₂₆O₂



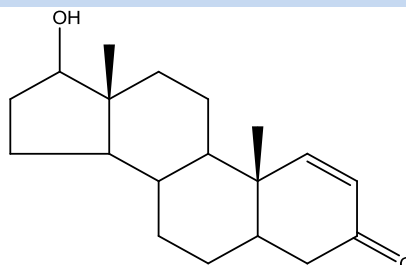
Propiedades fisicoquímicas CAS: 846-48-0, peso molecular: 286,41 g/mol; Color: Blanquecino; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 169-172 °C.

Parámetros toxicológicos LMR: No fijado, DL₅₀: No reportado.

Usos Efectos anabólicos incluyen el crecimiento de la masa muscular, el aumento de la densidad ósea y la fuerza, y el fomento del crecimiento lineal y la maduración ósea.

Hormona

Testosterona, C₁₉H₂₈O₂

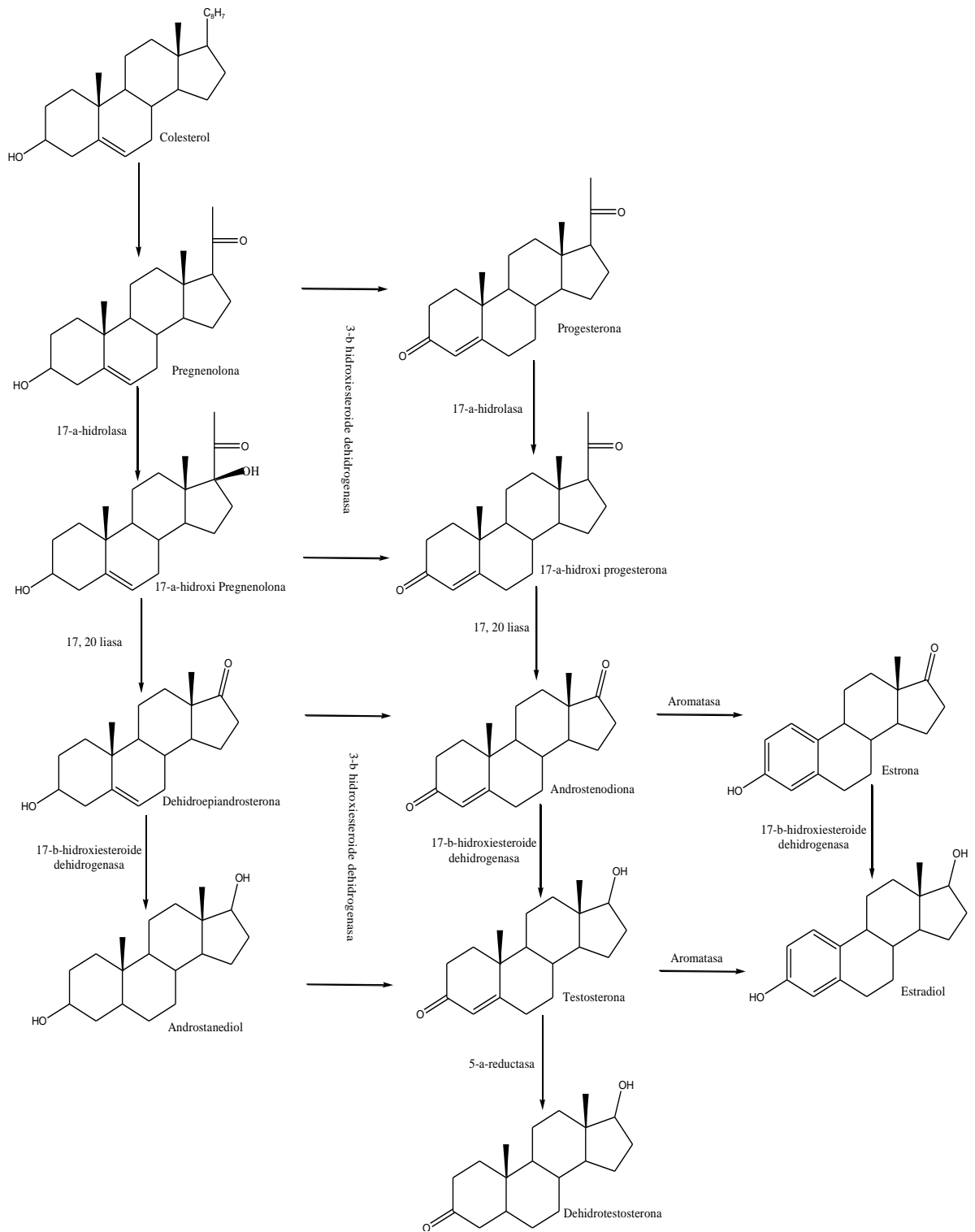


Propiedades fisicoquímicas CAS: 58-22-0, peso molecular: 288,42g/mol; Color: Cristal blanco; punto de ebullición: No reportado; punto de fusión: 152-156 °C.

Parámetros toxicológicos LMR: No fijado, DL₅₀: No reportado.

Usos Efectos anabólicos incluyen el crecimiento de la masa muscular, el aumento de la densidad ósea y la fuerza, y el fomento del crecimiento lineal y la maduración ósea.

Anexo B. Obtención de hormonas a partir de colesterol. [3,10]



Anexo C. Clasificación farmacológica de drogas veterinarias y hormonas.

Sub-clasificación	Ejemplos
Grupo A: Sustancias con efecto anabólico [1, 2, 7,9,15,18]	
1. Estilbenos	Dietilestilbestrol, hexestrol, dienestrol
2. Agentes antitiroideos	Tiouracilos
3. Esteroides	
(a) Andrógenos	Acetato de trembolona, testosterona, Boldenona
(b) Gestagenos	Acetato de melengestrol, progesterona
(c)Estrógenos	Estradiol
4.Ácido resorcílico lactosas	Zeranol
6.Otros compuestos	Nitrofurazona, nitrofurantoína, furazolidona, furaladona, cloranfenicol
Grupo B: Drogas veterinarias [1, 2, 7, 9, 18]	
1. Sustancias antibacteriales	Sulfadiazinas (sulfatiazol, sulfapiridina, sulfamerazina),
Sulfonamidas y quinolonas	quinolonas (ácido oxolínico, cinoxacina), fluoroquinolonas (enrofloxacina, sarafloxacina, ciprofloxacina)
2. Otras drogas veterinarias	
Antimicrobianos	Bencilpenicilina procaína, estreptomicina, oxitetraciclina, tetraciclina, gentamicina, neomicina
Antihelmínticos	Benzimidazoles (albendazol, fenbendazol, oxfendazol, tiabendazol), ivermectina, levamisol, rafoxanida
Anticoccidiales, incluyendo nitroimidazoles	Nitroimidazoles (metronidazol, dimetridazol, tinidazol), halofuginona
Carbamatos y piretroides	Carbamatos, piretroides
Sedantes	Acepromazina, azaperona, clorpromazina
Drogas anti-inflamatorias no esferoidales	Flunixin, meglumina
Otras sustancias activas farmacológicamente.	Dexametasona, cipermetrina

Anexo D. Comparación de los métodos más usados para la cuantificación de proteínas. [23,24 y 25]

Método	Rango de Sensibilidad (µg)	Ventajas	Desventajas
Métodos de Absorción	A_{280} 100-3000	No se pierden las muestras.	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV.
	A_{205} 3-100		
	$A_{280} - A_{260}$ 100-3000		
	$A_{235} - A_{280}$ 25-700		
	$A_{224} - A_{236}$ 5-180		
	$A_{215} - A_{225}$ 2-45		
Métodos Derivados Colorimétricos			
<i>Biuret</i>	λ_{595} 1000-10000	Bastante específico para proteínas. Muestra pocas interferencias. Es barato. Rápido (se puede completar en menos de 30 minutos).	Tiene poca sensibilidad. Requiere de al menos 2 a 4 mg de proteína por prueba. Las concentraciones altas de sales de amonio interfieren con la reacción. Puede ocurrir opalescencia en la solución final si están presentes altas concentraciones de lípidos o carbohidratos. Debe estandarizarse el color mediante cantidades de proteína conocidas.
<i>Lowry</i>	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Tiene bastante sensibilidad. Menos afectado por la turbidez de la muestra. Más específico que la mayoría de los otros métodos. Relativamente simple. Es rápido.	No todas las proteínas reaccionan igual; el color varía con diferentes proteínas (más que el método de <i>biuret</i>). El color no es estrictamente proporcional a la concentración de proteínas. La sacarosa, lípidos, buffers fosfato, monosacáridos y hexoaminas interfieren con la reacción. Las altas concentraciones de azúcares reductores, sulfato de amonio y compuestos con sulfhidrilo interfieren con la reacción.

<i>Bradford</i>	λ_{595}	1-15 ₅	<p>Muy sensible (mucho más que el método de <i>Lowry</i>).</p> <p>Método rápido (la reacción se puede completar en 2 minutos).</p> <p>Reproducibile.</p> <p>No existe interferencia de cationes como K⁺, Na⁺, y Mg⁺, sulfato de amonio, los polifenoles ni carbohidratos.</p>	<p>Muestra interferencias con detergentes y soluciones básicas.</p> <p>El complejo proteína-colorante formado puede unirse a las celdas de cuarzo.</p> <p>El color varía con diferentes tipos de proteínas.</p> <p>La proteína estándar debe seleccionarse con mucho cuidado.</p>
-----------------	-----------------	-------------------	--	---

BCA		0.5- 10	<p>Es el método más sensible.</p> <p>Es el que muestra menos interferencias.</p>	
-----	--	---------	--	--

Métodos Derivados Fluorimétricos

<i>o</i> -ftalaldehido	1-5 $\lambda_{excitación}$	340 nm a 475 nm $\lambda_{emisión}$	Muy sensible.	<p>La interferencia de aminas contaminantes en la muestra.</p> <p>No todas las muestras reaccionan igual.</p>
------------------------	----------------------------	-------------------------------------	---------------	---

Otros

<i>Kjeldahl</i>			<p>Aplicable a todo tipo de alimentos.</p> <p>Relativamente simple.</p> <p>Barato.</p> <p>Preciso.</p> <p>Es el método oficial para medir el contenido de proteína cruda.</p>	<p>Mide el nitrógeno orgánico total, no sólo el nitrógeno protéico.</p> <p>Consume mucho tiempo (al menos 2 horas para completarse).</p> <p>Precisión más pobre que el método de <i>biuret</i>.</p> <p>Usa reactivos corrosivos.</p>
-----------------	--	--	---	--

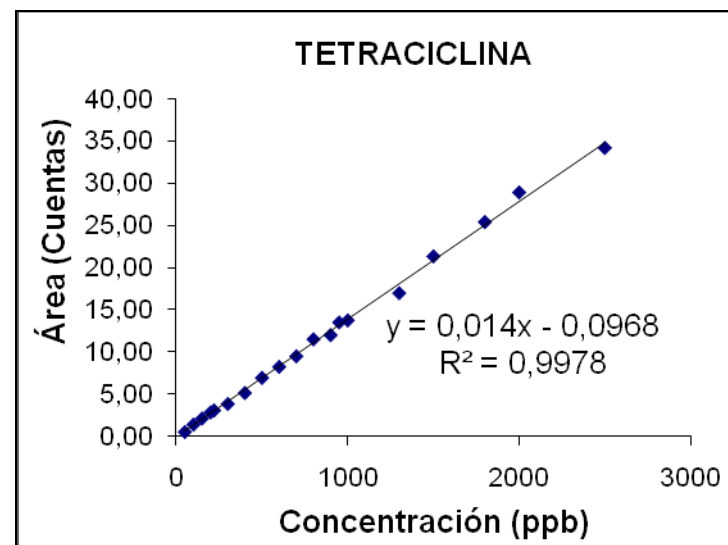
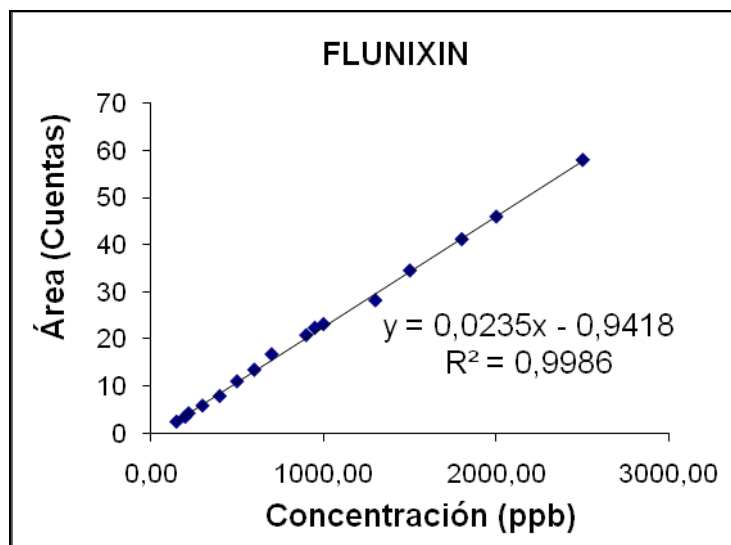
Anexo E. Comparación de técnicas de análisis de residuos de medicamentos veterinarios.

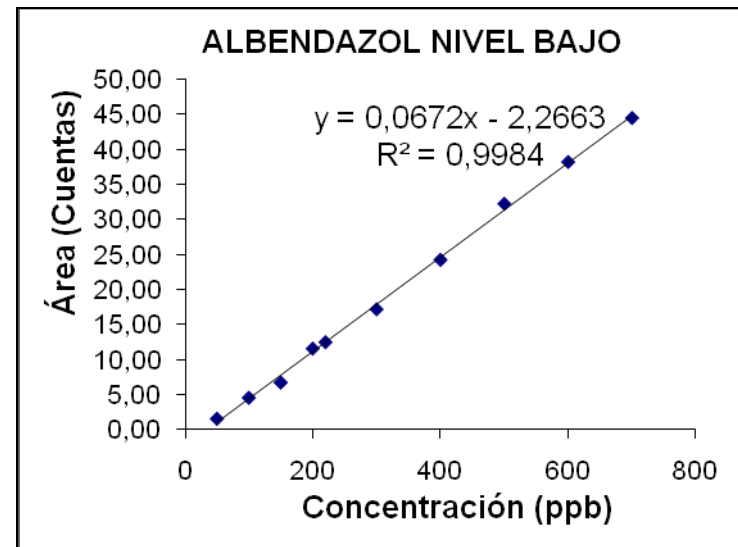
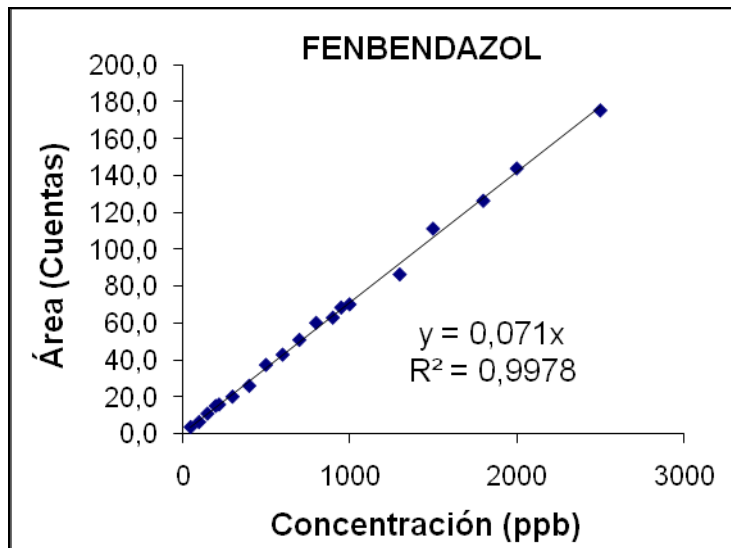
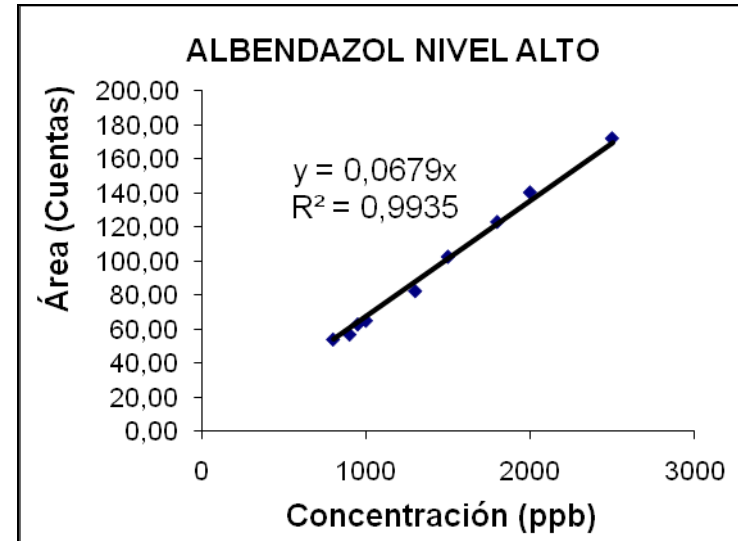
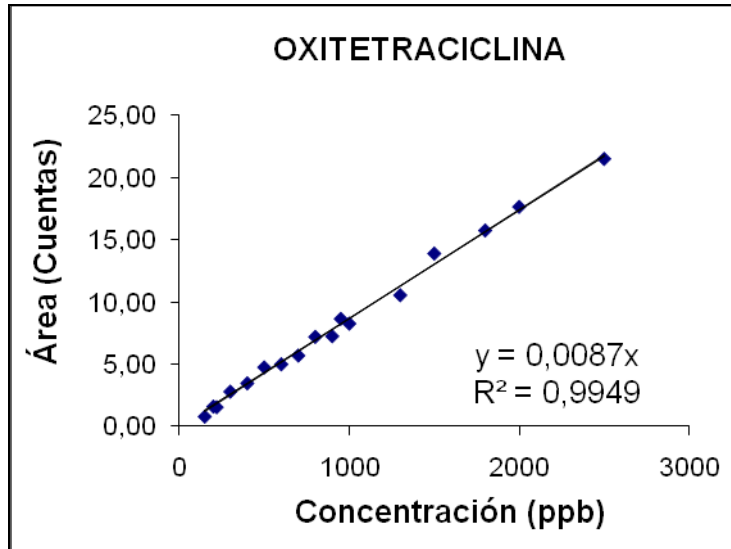
Métodos Inmunológicos			
Técnica	ELISA	Radioinmunoensayo	Biosensores
Principio	Reacción entre un antígeno y un anticuerpo.		
Propiedad que mide	Detección de la señal provocada por agentes marcadores enzimáticos.	Radioactividad, quimioluminiscencia o fluorescencia de complejos inmunológicos.	Señal bioquímica, producto de la reacción entre el analito y el anticuerpo, medida ópticamente o por conversión de la respuesta a una señal electrónica.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Incremento de costos desde el año 2002. ✓ Interferencias dan falsos positivos. ✓ Se dispone de un <i>kit</i> por residuo de interés 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto costo operacional. ✓ Largo tiempo de operación manual. ✓ Interferencias dan falsos positivos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta inversión inicial en equipos. ✓ Elevados costos operativos (<i>chips</i>). ✓ Análisis restringido a <i>chips</i> disponibles.

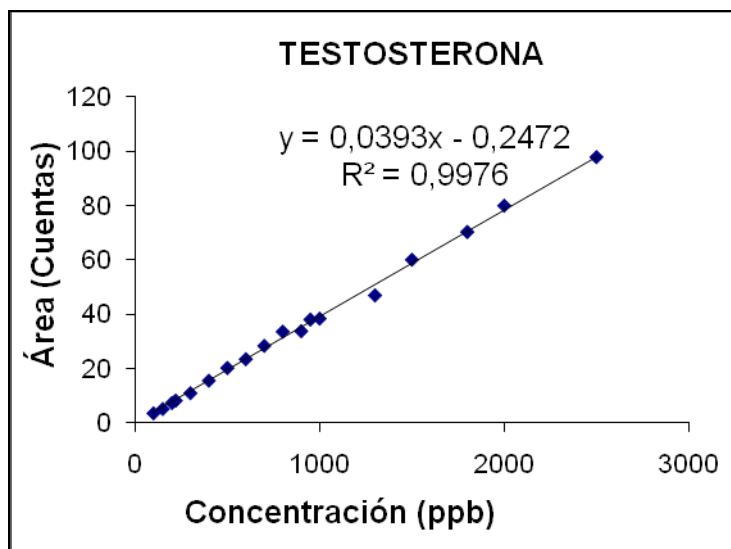
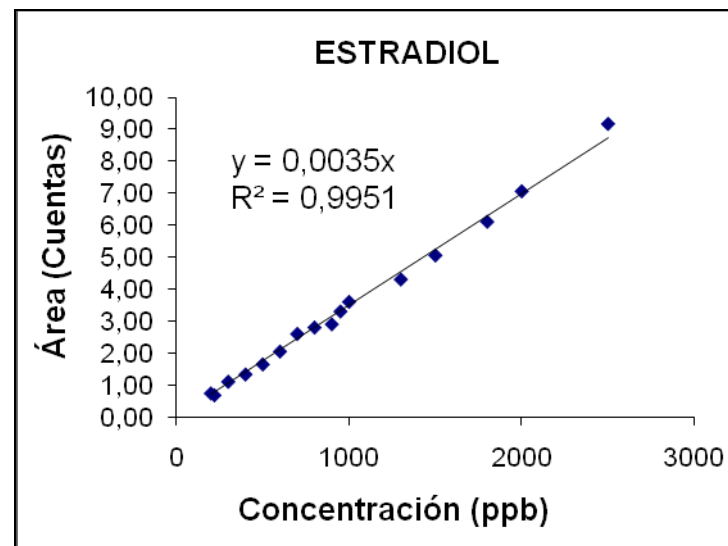
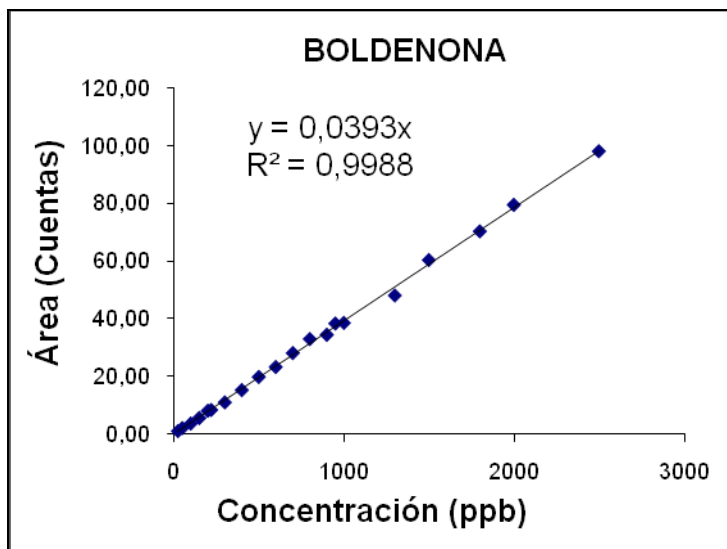
Continuación de la **Tabla**

Métodos Cromatográficos			
Técnica	HPTLC	HPLC	GC
Principio	Elución del analito a través de una placa recubierta con una fase estacionaria, aprovechando la difusión capilar de un solvente apropiado.	Las sustancias eluyen mediante el bombeo de un líquido (fase móvil) a alta presión a través de una columna con una fase estacionaria.	La muestra se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte que transporta el analito a través de la fase estacionaria.
Propiedad que mide	Relación de desplazamiento en la placa respecto a una sustancia de referencia, revelada mediante agentes cromogénicos o radiación UV.	Los tiempos de retención que dependen de las condiciones cromatográficas empleadas.	Los tiempos de retención que dependen de las condiciones cromatográficas empleadas.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Produce la formación de isómeros ✓ No se pueden identificar todos los medicamentos de manera simultánea. ✓ Requiere experiencia y las interferencias dan falsos positivos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Grandes cantidades de solvente de ultra-alta pureza. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Los medicamentos veterinarios producen deterioro de la columna cromatográfica y requieren la derivatización para su análisis, debido al alto peso molecular de estos medicamentos.

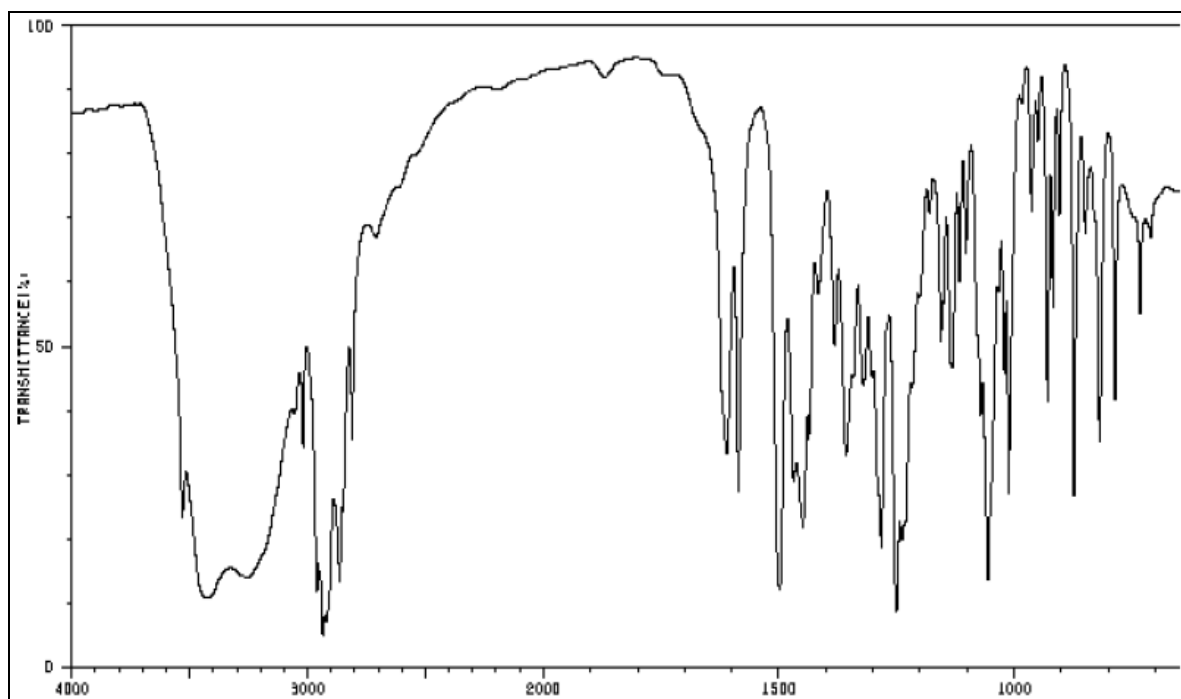
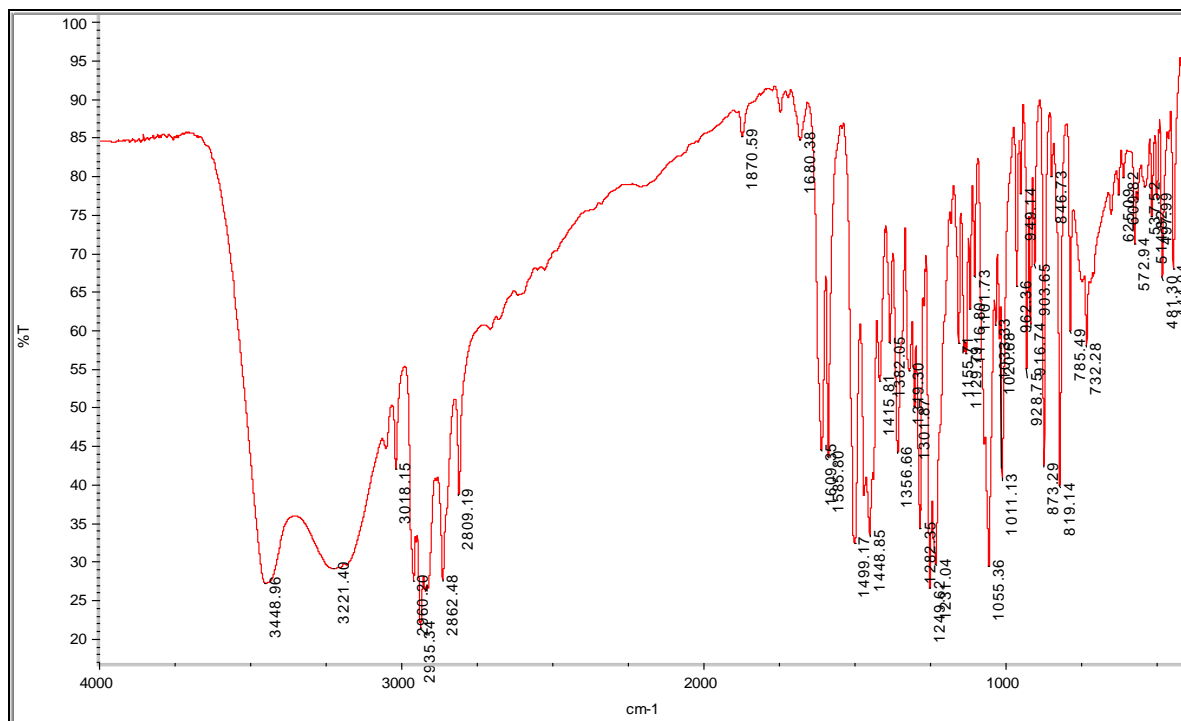
Anexo F Curvas de calibración para cada una de las drogas veterinarias y hormonas analizados, siguiendo la metodología HPLC-DAD-UV-Vis.



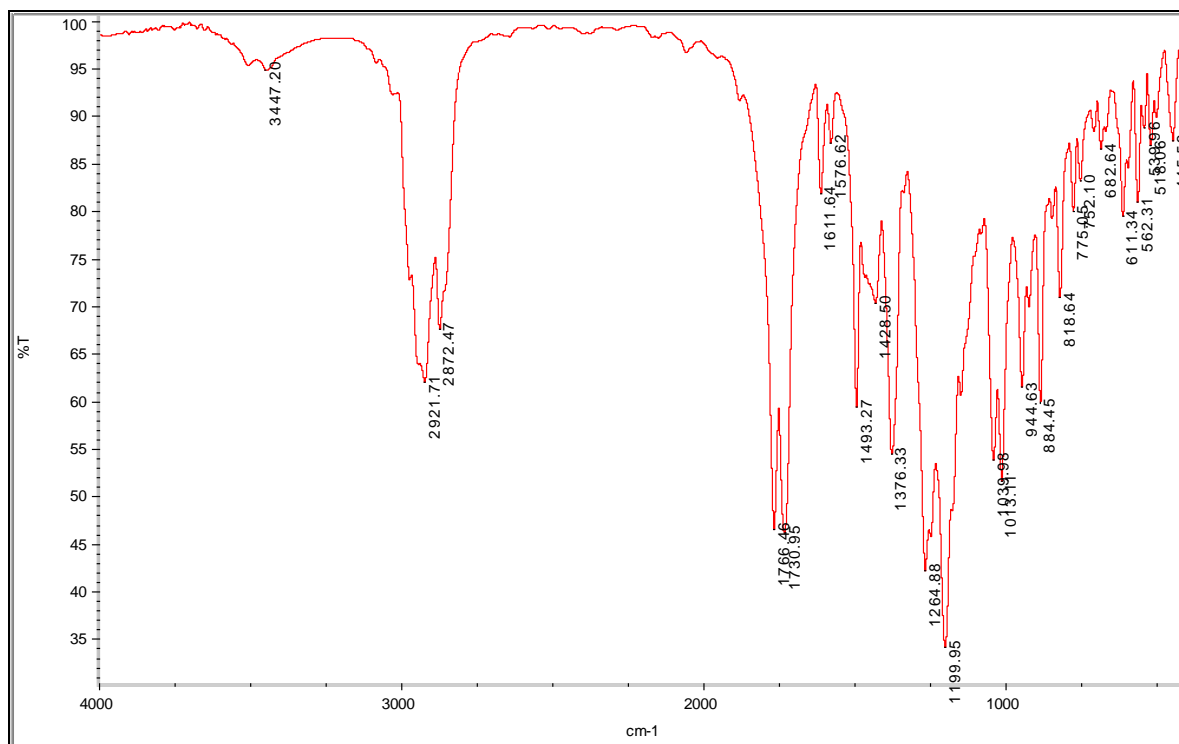




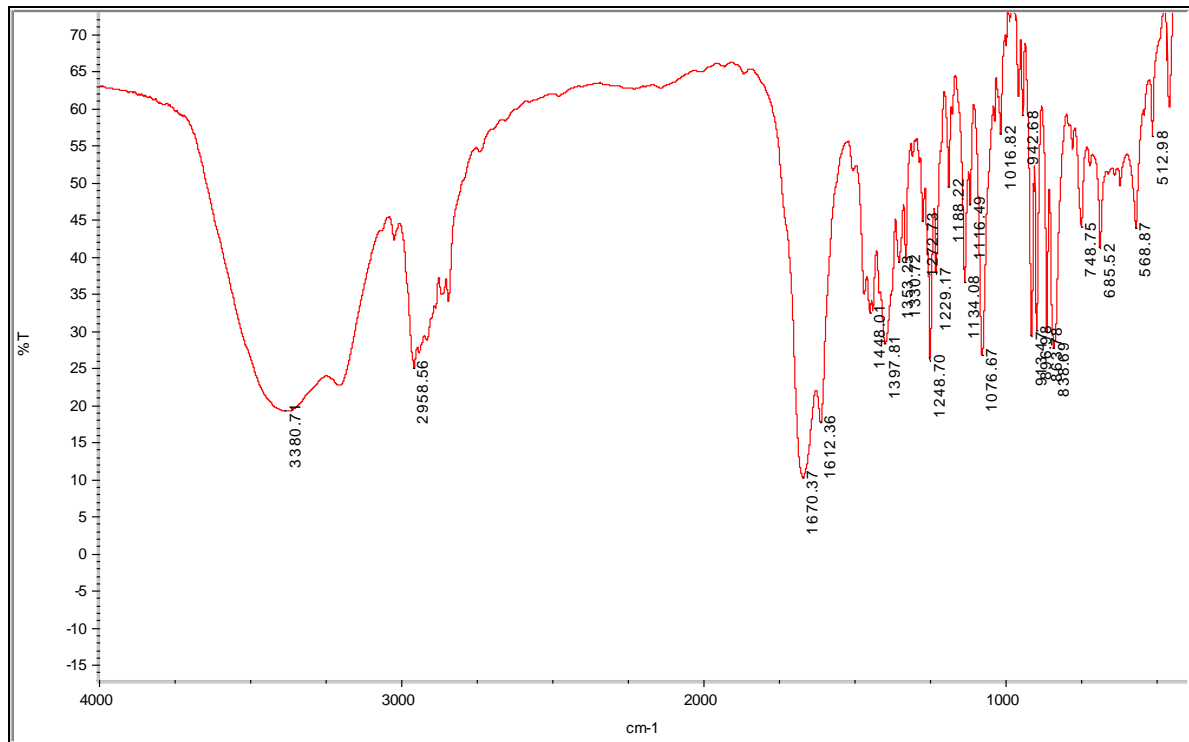
Anexo G. Espectro IR de 17- β -estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos *Spectral Database of Organic Compounds, National (SDBS)*.



Anexo H. Espectro IR del acetato de estradiol obtenido experimentalmente

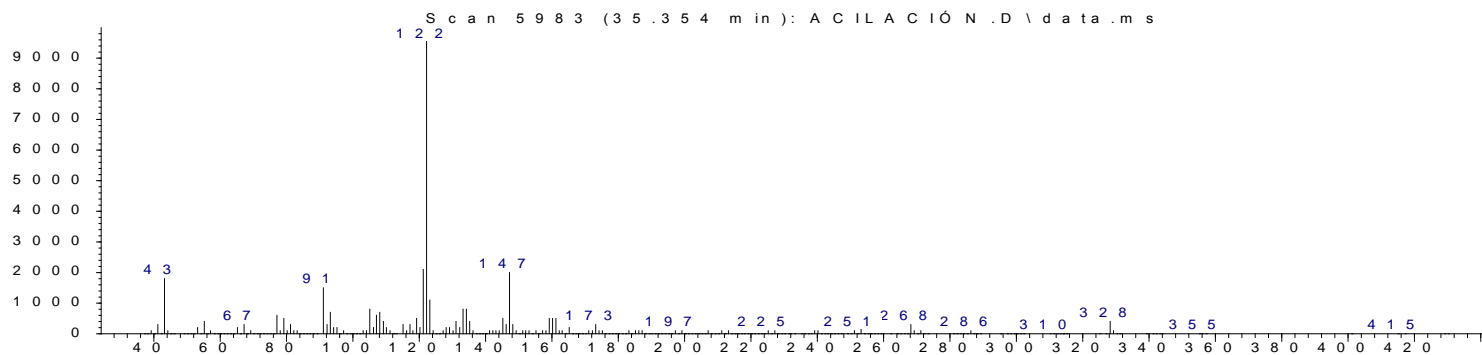


Anexo I Espectro IR del TMS-estradiol obtenido experimentalmente.

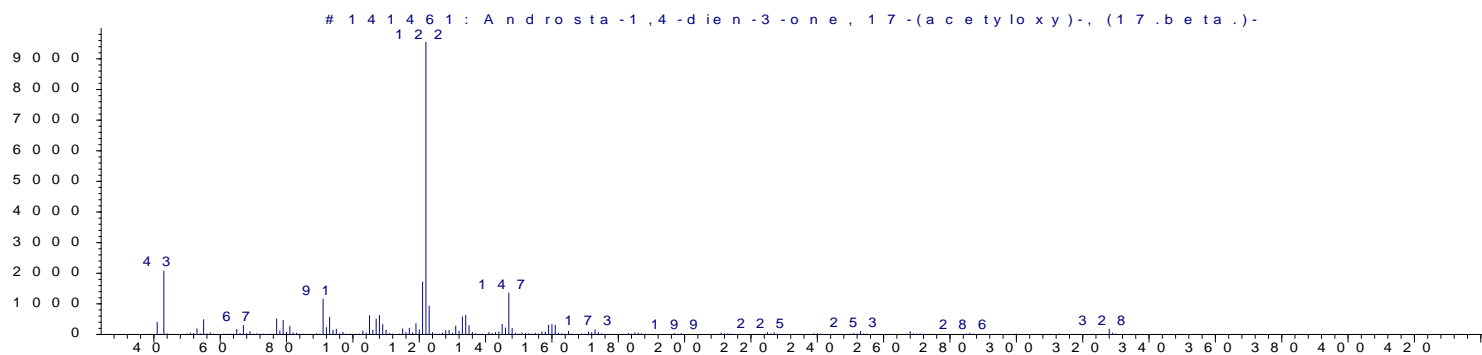


Anexo J. Espectro de masas del acetato de boldenona obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos *Wiley*.

Abundance

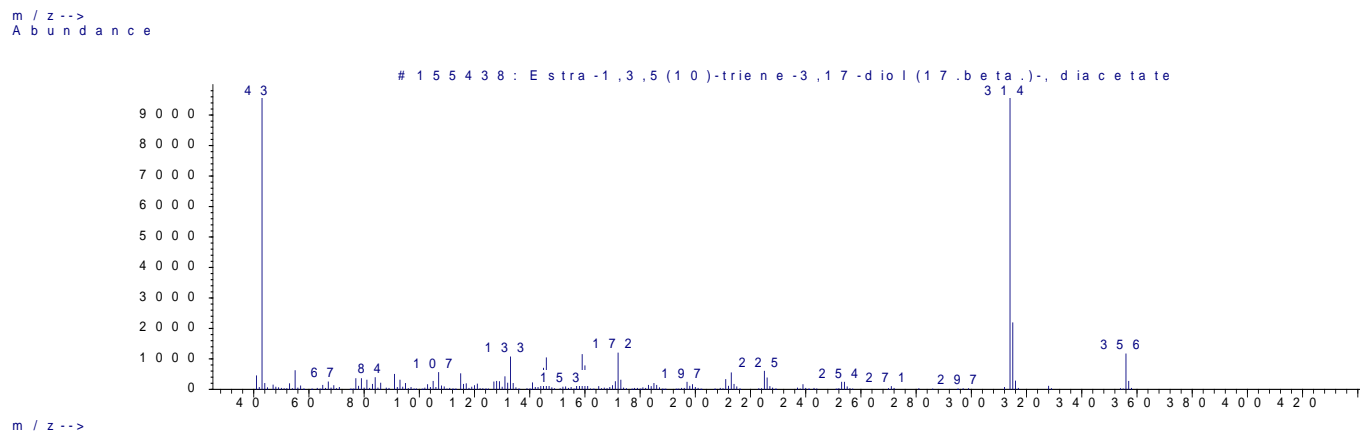
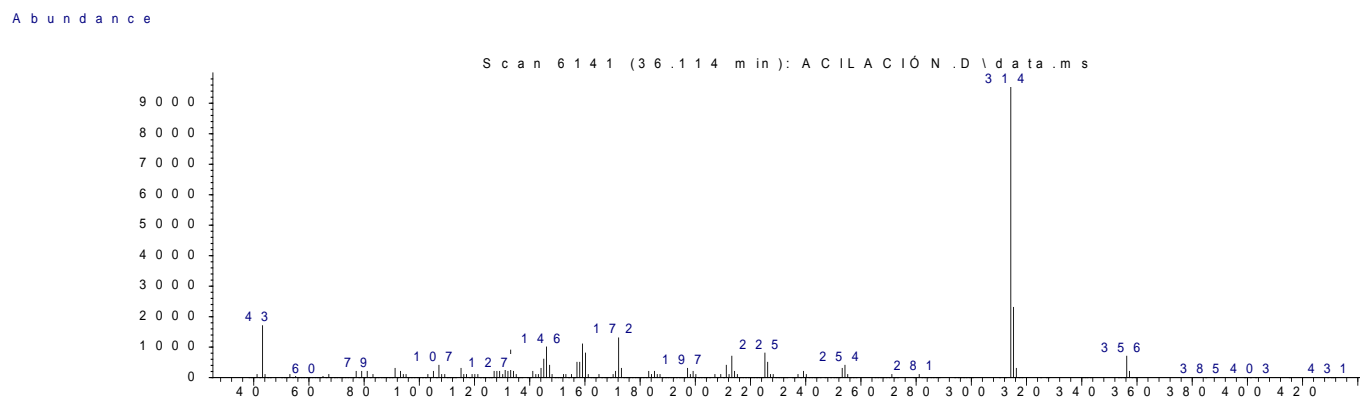


m/z -->
Abundance



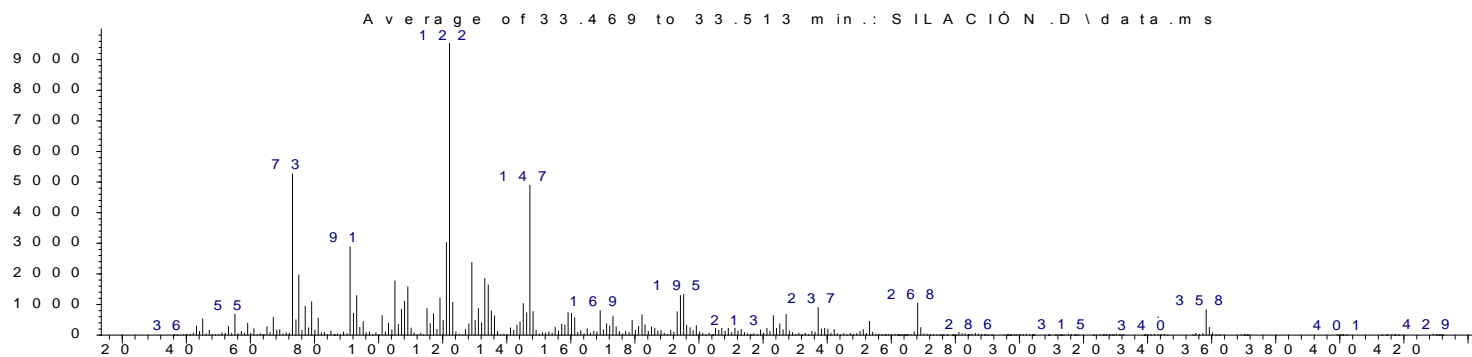
m/z -->

Anexo K. Espectro de masas del acetato de estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos Wiley.

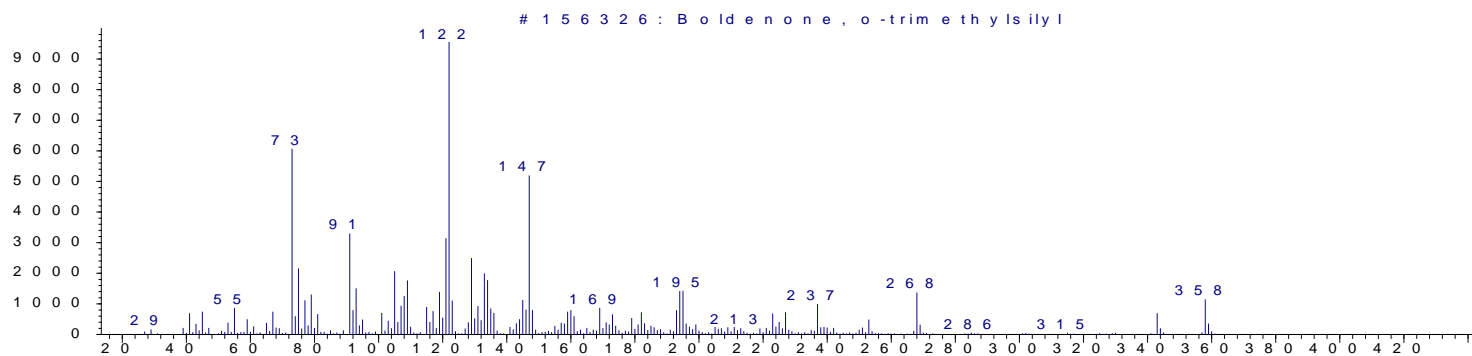


Anexo L. Espectro de masas del TMS-boldenona obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos Wiley.

Abundance



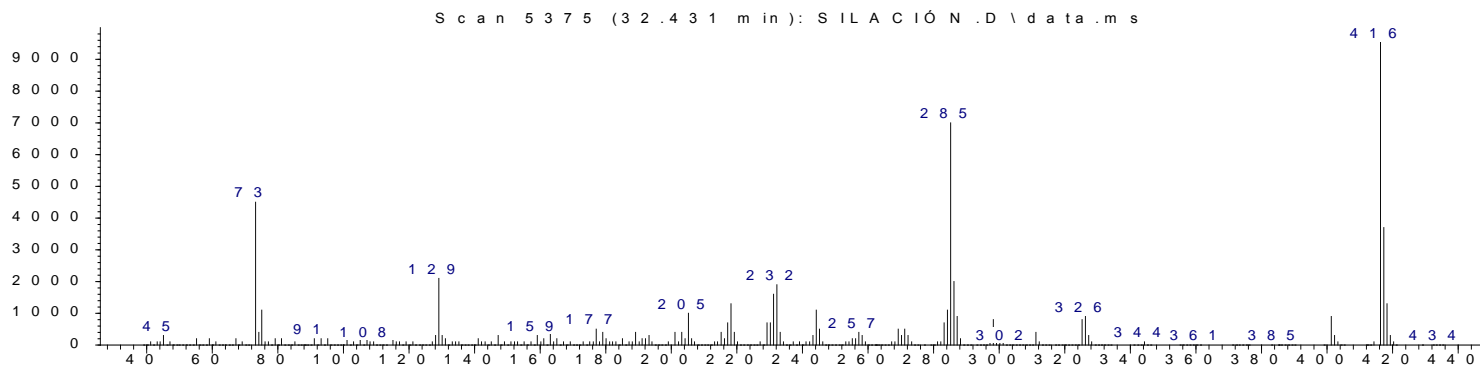
m/z-->
Abundance



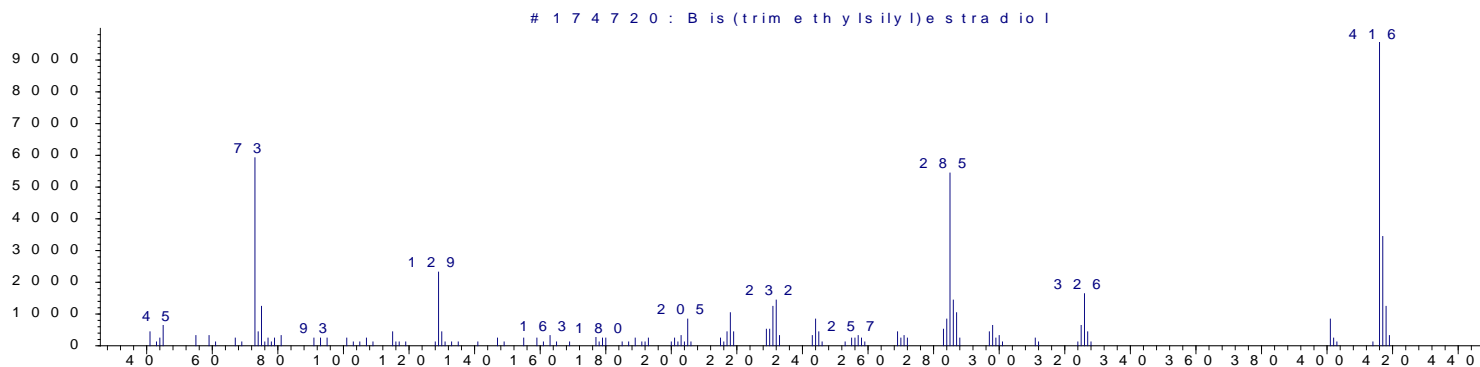
m/z-->

Anexo M. Espectro de masas del TMS-estradiol obtenido experimentalmente comparado con el de la base de datos Wiley.

Abundance

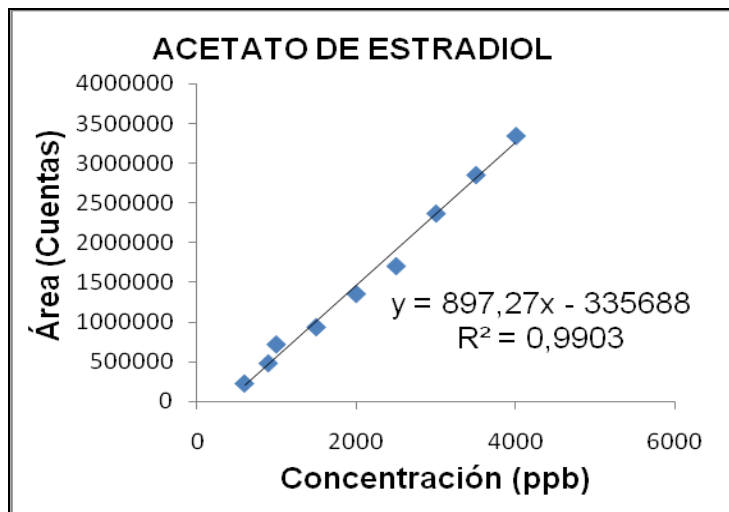
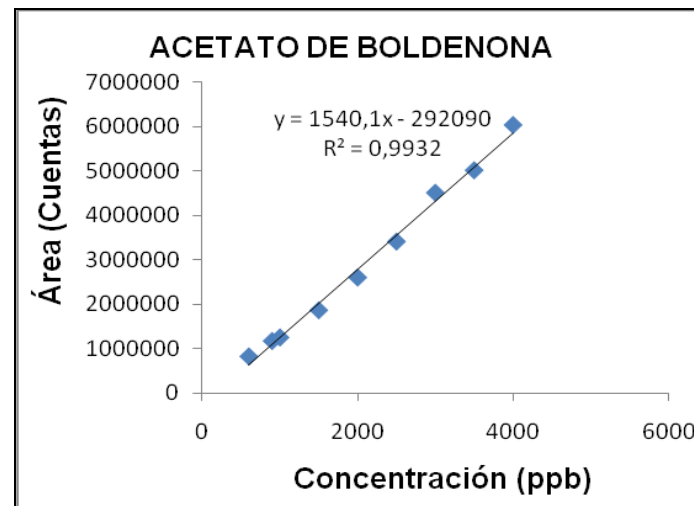
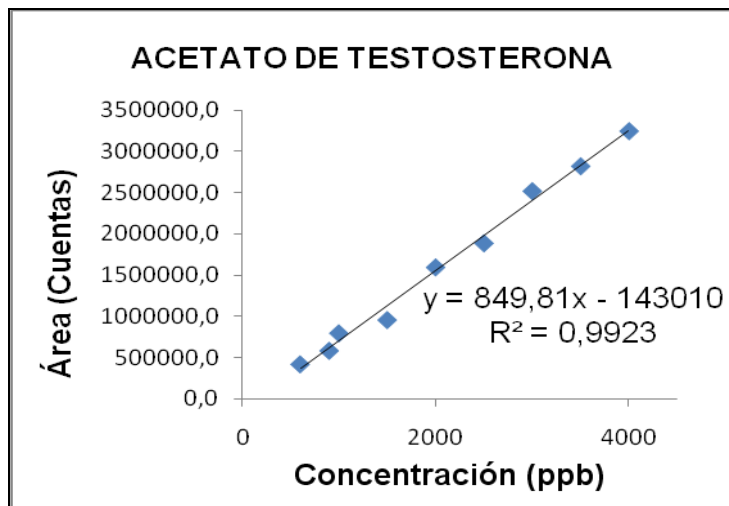


m/z -->
Abundance



m/z -->

Anexo N. Curvas de calibración para cada una de las hormonas acetiladas analizadas con la metodología GC-MS.



Anexo O. Resultados, obtenidos por el software estadístico *Statgraphics Centurion XVI*, de los efectos de diferentes parámetros y sus interacciones, para la extracción en fase sólida de las drogas veterinarias y hormonas.

Sustancia		Factores		Interacción		
		A: pH	B: Solvente de Elución	AA	AB	BB
Clorhidrato de oxitetraciclina	Razón-F	0,27	10,67	8,75	0,08	14,31
	Valor-P	0,6228	0,0171	0,0253	0,7846	0,0091
Clorhidrato de tetraciclina	Razón-F	0,01	11,8	17,03	0,27	13,06
	Valor-P	0,9169	0,0139	0,0062	0,6232	0,0112
Albendazol	Razón-F	1,62	6,88	6,09	3,59	4,39
	Valor-P	0,2499	0,0395	0,0486	0,1071	0,081
Fenbendazol	Razón-F	1,25	14,68	7,27	3,38	8,82
	Valor-P	0,3069	0,0086	0,0357	0,1158	0,025
Boldenona	Razón-F	0	28,3	0,16	6,67	11,43
	Valor-P	0,9985	0,0018	0,7039	0,0416	0,0148
17-β-estradiol	Razón-F	0,03	40,29	2,64	10,18	0,84
	Valor-P	0,8666	0,0007	0,1551	0,0188	0,3955
Testosterona	Razón-F	0,07	38,66	1,3	14,85	23,41
	Valor-P	0,8057	0,0008	0,2969	0,0084	0,0029
Flunixin	Razón-F	5,07	20,86	58,68	4,95	10,63
	Valor-P	0,0653	0,0038	0,0003	0,0678	0,0172