

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO DE BOVINO**

NATHALIA ANDREA GÓMEZ CASTAÑO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO DE BOVINO**

NATHALIA ANDREA GÓMEZ CASTAÑO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Tutor de investigación
ALEJANDRA PÉREZ CESPEDES
Química
Co-tutor de investigación
GUILLERMO LEÓN MONTOYA, Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

Aprobado por:

Constain Hugo Salamanca Mejía
Evaluador

Aram Joel Panay Escobar
Evaluador

Alejandra Pérez Céspedes
Director del proyecto

Guillermo León Montoya Pelaez
Co-Director del proyecto

Santiago de Cali, 08 de Septiembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por brindarme su apoyo, y entusiasmo con cada logro.

Al profesor Guillermo Montoya, a la profesora Alejandra Pérez y al personal del Laboratorio de Instrumentación química por dejarme grandes enseñanzas y brindarme apoyo durante todo mi proceso formativo y en el desarrollo del presente proyecto.

A la universidad Icesi por ofrecerme el espacio para crecer y fortalecerme como persona y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| TABLA DE CONTENIDO | 5 |
| LISTA DE TABLAS | 7 |
| LISTA DE GRÁFICAS..... | 8 |
| LISTA DE ILUSTRACIONES | 9 |
| RESUMEN..... | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA | 13 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 14 |
| 3.1. Estado del arte..... | 14 |
| 3.2. Antimicrobianos | 15 |
| 3.3. UPLC/MS..... | 17 |
| 3.3.1. Ultra Performance Liquid Chromatography | 17 |
| 3.3.2. Espectrometría de masas..... | 17 |
| 3.4. Extracción en fase sólida (SPE)..... | 18 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4.1. Objetivo general..... | 22 |
| 4.2. Objetivos específicos | 22 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 23 |
| 5.1. Preparación de la solución de trabajo | 23 |
| 5.2. Tratamiento de la muestra | 23 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.2.1. | Extracción sólido-líquido | 23 |
| 5.2.2. | Extracción líquido-líquido y obtención de la matriz..... | 23 |
| 5.2.3. | Extracción en Fase sólida (SPE)..... | 23 |
| 5.3. | Preparación de las Fases móviles. | 24 |
| 5.4. | Determinación de los parámetros de validación | 24 |
| 5.4.1. | Selectividad..... | 24 |
| 5.4.2. | Rango lineal: | 25 |
| 5.4.3. | Porcentaje de Recuperación: | 25 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 27 |
| 6.1. | Determinación de parámetros de estandarización..... | 27 |
| 6.1.1. | Selectividad..... | 27 |
| 6.1.2. | Rango lineal | 32 |
| 6.1.3. | Porcentaje de Recuperación | 40 |
| 7. | CONCLUSIONES | 48 |
| 8. | RECOMENDACIONES..... | 49 |
| 9. | REFERENCIAS | 50 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Límites Máximos Residuales (LMR) en músculo de bovino, establecidos por <i>Codex Alimentarius Comision</i> , 2014..... | 16 |
| Tabla 2. Mecanismos de retención de los cartuchos Strata para extracción en fase sólida (Phenomenex, 2012) | 20 |
| Tabla 3. Propiedades de los antimicrobianos oxitetraciclina (Drug Bank, 2013), albendazol (Drug Bank, 2014) y febendazol (Human Metabolome Database, 2013) | 21 |
| Tabla 4. Preparación de la curva de calibración en solvente..... | 25 |
| Tabla 5. Preparación de la curva de calibración con adición de 10% de matriz | 25 |
| Tabla 6. Condiciones para ionización por ESI | 27 |
| Tabla 7. Condiciones cromatográficas del ensayo | 28 |
| Tabla 8. Datos de identificación de cada antibiótico dentro del ensayo | 28 |
| Tabla 9. Datos de respuesta en solvente y matriz para Albendazol | 34 |
| Tabla 10. Resultados curva de calibración en solvente y matriz para Albendazol | 35 |
| Tabla 11. Datos de respuesta en solvente y matriz para Fenbendazol | 36 |
| Tabla 12. Resultados curva de calibración en solvente y matriz para Fenbendazol | 37 |
| Tabla 13. Datos de respuesta en solvente y matriz para Oxitetraciclina | 38 |
| Tabla 14. Resultados curva calibración en solvente y matriz para Oxitetraciclina. | 39 |
| Tabla 15. Áreas de respuesta de los lavados de cartucho SPE | 44 |
| Tabla 16. Área de respuesta de recuperación de analitos por SPE | 45 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Evidencia de separación de los analitos bajo condiciones establecidas. Cromatograma en modo SIR (arriba) y Cromatograma de iones totales (abajo) ... | 30 |
| Gráfico 2. Espectros de masas para Albendazol (izq), Fenbendazol (medio) y Oxitetraciclina (der). A pesar de la abundancia de ion molecular se evidencia como aumenta el ruido en la medida que disminuye la respuesta a la ionización de izquierda a derecha respectivamente. | 31 |
| Gráfico 3. Efecto de la calidad del solvente sobre la resolución de los cromatogramas: nivel de concentración 90% (izq.), nivel de concentración 300% (der.)/ Solvente grado HPLC (sup.), solvente LC/MS (inf.) | 32 |
| Gráfico 4. Evaluación de la tendencia lineal con interferencia de matriz (der) y en solvente (izq) para Albendazol (arriba), Fenbendazol (medio) y Oxitetraciclina (abajo)..... | 33 |
| Gráfico 5. Curva de Calibración Albendazol en solvente (arriba) y en matriz (abajo)..... | 35 |
| Gráfico 6. Curva de Calibración Fenbendazol en solvente (arriba) y en matriz (abajo)..... | 37 |
| Gráfico 7. Curva de Calibración Oxitetraciclina en solvente (arriba) y en matriz (abajo)..... | 39 |
| Gráfico 8. Cromatograma de muestra dopada al 200% en cartucho SPE 1 (izq) y cartucho SPE 2 (der): lavado con metanol 20% (arriba), metanol 50% (medio) y metanol 80% (abajo) | 42 |
| Gráfico 9. Cromatograma de muestra dopada al 200% en cartucho SPE 1 (izq) y cartucho SPE 2 (der): lavado con metanol 20% (arriba), metanol 50% (medio) y metanol 80% (abajo) | 43 |
| Gráfico 10. Cromatograma de muestra blanco lavado 1 metanol 100% (izq) y lavado 2 (der)..... | 44 |
| Gráfico 11. Recuperación de analitos por SPE: Cartucho 1 (izq) y Cartucho 2 (der) | 45 |
| Gráfico 12. Espectro de masas para compuesto con tiempo de retención 5.1 del cromatograma reportando en el Gráfico 10. | 46 |

LISTA DE ILUSTRACIONES

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Estructura química de la Oxitetraciclina..... | 16 |
| Ilustración 2. Estructura química del Albendazol..... | 16 |
| Ilustración 3. Estructura química del Fenbendazol..... | 16 |
| Ilustración 4. Ionización por electrospray (ESI), (Waters, 2015) | 18 |
| Ilustración 5. Protocolo general para llevar a cabo una Extracción en Fase Solida (SPE) (Agilent Technologies, 2002)..... | 19 |

RESUMEN

Para la comercialización y exportación de carnes en Colombia, es necesario cumplir ciertos requisitos que garanticen buena calidad e inocuidad del producto. La optimización de la cadena de producción, la medicación y los análisis de residuos de medicamentos, son unos de los principales mecanismos a partir de los cuales se garantiza la calidad de la carne y su seguridad durante el consumo.

Los antimicrobianos son utilizados frecuentemente en el ganado vacuno para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades. Su utilización implica un riesgo para la salud pública, pudiendo causar hipersensibilidad y generación de cepas bacterianas resistentes, lo que ha llevado a exigir un mayor control en las plantas de beneficio y se han establecido límites máximos residuales (MLR) para diferentes matrices.

Para cuantificar los residuos de antimicrobianos en la carne para consumo, se requieren métodos rápidos, selectivos y sensibles. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es uno de los métodos más utilizados; sin embargo, en Colombia existen pocos laboratorios especializados para llevar a cabo dichos análisis. De esta forma, la oferta de servicios de análisis de antimicrobianos resulta importante en la industria ganadera, para garantizar los requisitos del ente regulatorio en cuestión.

De acuerdo con lo anterior se propone estandarizar el método UPLC-MS para determinar la residualidad de Albendazol, Fenbendazol y Oxitetraciclina en músculo de bovino como una oferta potencial de servicio de análisis, acorde con los requisitos vigentes. Como resultados principales del desarrollo de este trabajo experimental se lograron optimizar los parámetros de ionización y las condiciones cromatográficas bajo las cuales se desarrollaría el método de forma selectiva. Para cada antimicrobiano se logró establecer un rango lineal entre 90% y 300% con respecto al Límite Máximo Residual, con coeficientes de determinación en solvente y en matriz de 0,9874 y 0,9896 para albendazol; 0,9519 y 0,9787 para fenbendazol, y 0,9801 y 0,998 para oxitetraciclina; sin embargo, en cuanto a la recuperación, no se logró obtener un resultado satisfactorio.

Palabras clave: Antimicrobianos, residualidad de medicamentos, músculo de bovino, límite máximo residual (LMR), UPLC/MS.

ABSTRACT

For trading and export of meats in Colombia, must be met requirements to ensure quality and safety of the product. Optimization of the production chain, the medication and drug residue analysis, are one of the main mechanisms through which the meat quality and safety during consumption are guaranteed.

Antibiotics are drugs used most frequently in cattle for prophylaxis and treatment of diseases. Its use implies a risk to public health and can cause hypersensitivity and generation of resistant bacterial strains, which has led to calls for greater control in processing plants and have been established maximum residue limits (MLR) for different matrices.

To quantify residues of antibiotics in meat for consumption, rapid, selective and sensitive methods are required. Liquid chromatography coupled mass spectrometry is one of the most used methods; however, in Colombia there is little official cover to perform such analyzes. Thus, the supply of antibiotic testing services is important for livestock industry to ensure the requirements of the regulatory agency concerned.

According to, it is proposed to standardize UPLC-MS method to albendazole, fenbendazole and oxytetracycline, as a potential service offering analysis muscle of cattle, according to current requirements; thereby, ionization parameters and chromatographic conditions were optimize for the method, to be developed selectively. It was possible to establish a linear range between 90% and 300%, with determination coefficients in solvent and matrix of 0.9874 and 0.9896 for albendazole, 0.9519 and 0.9787 for fenbendazole and 0.9801 and 0.998 for oxytetracycline; nevertheless, in terms of recovery it was not achieved a satisfactory result.

Key words: antimicrobial, residual drug, bovine muscle, Maximum residual limit, UPLC / MS.

1. INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos han sido ampliamente utilizados por la industria ganadera, donde su uso inadecuado y la presencia de residuos en el producto final, pueden causar efectos indeseados en el consumidor, convirtiéndose en un problema de salud pública. Los consumidores que son cada vez más conscientes de los riesgos de algunos alimentos y las mismas aperturas comerciales de los países de la región han promovido un mayor control sobre la administración de los medicamentos y sobre las consecuencias de sus residuos en el producto final.

En Colombia las entidades sanitarias reguladoras son el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), los cuales deben verificar las condiciones de producción de animales destinados al consumo, incluyendo el análisis de peligros químicos donde figuran los niveles de medicamentos (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013).

Para llevar a cabo dichos análisis de residualidad de medicamentos, específicamente de antimicrobianos, es necesario utilizar un método que permita detectar con fiabilidad la presencia de los analitos de interés, determinar su concentración e identificar correctamente cada analito (Codex Alimentarius, 2009 (Revisadas en 2012, 2014)), donde la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ha sido el método más utilizado para la cuantificación de residuos de antimicrobianos en diferentes matrices (tejidos, leche, miel) (Cháfer-Pericás, Maquieira, & Puchades, Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples, 2010).

Debido a sus condiciones de ionización por electrospray (ESI), su amplio uso veterinario en bovinos, y con base en las reglamentaciones del ICA y el *Codex Alimentarius* (Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2014), se escogieron los antimicrobianos albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina para llevar a cabo el experimento de estandarización del método UPLC/MS, siguiendo un procedimiento inicial de tratamiento de la muestra por extracción sólido-líquido y extracción en fase sólida (SPE) (Montoya, Carrillo, Muñoz, & Giraldo, 2013).

2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La utilización de antimicrobianos en el ganado ha generado un problema de salud pública a nivel mundial, donde la mayor preocupación consiste en la generación de cepas bacterianas resistentes tanto en el ganado como en los humanos. Por tal razón, durante los últimos años, se ha ejercido un mayor control para la adecuada medicación del ganado y regulación de los residuos de antimicrobianos presentes en la carne de consumo, con el objetivo de contribuir a la calidad de los productos cárnicos en el mercado, cumpliendo con la reglamentación y minimizando el impacto sobre la salud.

Como mecanismo para controlar la residualidad de antimicrobianos y otros medicamentos, se ha hecho reglamentario en Colombia la cuantificación de antimicrobianos en la carne para consumo, buscando ampliar y fortalecer los laboratorios de análisis con técnicas sensibles, que permitan una cuantificación exacta de estas sustancias para dar garantía de la inocuidad de la carne.

Aprovechando la capacidad del Laboratorio de Instrumentación Química de la universidad Icesi, que cuenta con un espectrómetro de masas, un equipo lo suficientemente sensible como para detectar las bajas concentraciones de antimicrobianos en músculo de bovino, se puede llevar a cabo un estudio experimental en el cual se estandarice una metodología analítica acoplado el espectrómetro de masas con cromatografía líquida (UPLC).

De esta forma, es indispensable establecer los métodos de tratamiento de la muestra y parámetros del equipo, y conocer la sensibilidad del mismo para determinar la concentración de antimicrobianos en rangos cercanos al límite máximo residual (MRL). Finalmente concluir si es viable ofertar el servicio de análisis a la industria ganadera, lo cual conllevaría beneficios tanto para la industria en función del cumplimiento de sus requisitos de calidad, como para la Universidad en el incremento de ingresos y experiencia en el área.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Estado del arte

Los antimicrobianos son los medicamentos más ampliamente utilizados en el ganado bovino. La principal función de estos antimicrobianos se basa en la profilaxis y el tratamiento de patologías e infecciones; además, son adicionados en bajas dosis a los alimentos del ganado con el fin de promover su crecimiento (antimicrobianos promotores de crecimiento, APC) (Organización Mundial de la Salud, 2008).

La Organización mundial de la salud (OMS) estableció que los posibles riesgos causados por la presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos son la toxicidad, hipersensibilidad y la aparición de cepas bacterianas resistentes. La toxicidad e hipersensibilidad representan un riesgo de menor probabilidad debido a sus bajas concentraciones en los alimentos; sin embargo, la mayor preocupación en salud pública está asociada a la resistencia bacteriana. Se ha encontrado una relación directa entre el consumo de productos contaminados, con la aparición de cepas bacterianas resistentes en humanos, y una relación entre la manipulación de los antimicrobianos y la aparición de cepas resistentes en el ganado (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Teniendo en cuenta los riesgos que conlleva la presencia de antimicrobianos en productos pecuarios, la resistencia bacteriana es la problemática de mayor impacto en la salud pública (Álvares, 2013). Para el control de éste y cualquier efecto sobre el consumidor, se han creado a través de los años diversos mecanismos de apoyo a la salud pública en cuanto al control del ganado bovino y la inocuidad de los alimentos obtenidos.

Desde diciembre de 2012, a partir de la Resolución 451 (Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural, 2012), se designó al instituto colombiano agropecuario ICA en su calidad de máxima entidad sanitaria, y se delegó como la entidad administradora de los programas de control ganadero en Colombia como el Sistema Nacional de Identificación e Información de ganado bovino – SINIGAN, el cual es nombrado por el ICA como Sistema Nacional de Identificación e información y trazabilidad animal- IDENTIFICA. Este programa fue diseñado con el fin de llevar un mayor control del ganado, y se ha optimizado en función de mejorar el estatus sanitario y garantizar la inocuidad de los productos (Instituto Colombiano Agropecuario, 2013).

El ICA presenta diversas recomendaciones para prevenir la presencia de residuos de medicamentos veterinarios, (Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, 2000); sin embargo, como parte de la garantía de inocuidad en los productos cárnicos para

comercialización, se requiere verificar que la concentración de residuos de medicamentos en el producto no superen los niveles que han sido aceptados por el *Codex Alimentarius* como seguros (Comisión del Codex Alimentarius, 2014). Con este fin, se ha reglamentado que las plantas de beneficio deben implementar el sistema HACCP “Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control”, a lo largo de toda la cadena productiva (Ministerio de Salud y Protección social, 2012), y que se requiere la participación en el programa de control de los residuos de medicamentos en el cual se realizan los análisis químicos de las muestras (Instituto Colombiano Agropecuario, 2003). No obstante, a nivel nacional no se cuenta con una red de laboratorios de análisis especializados en la detección de residuos de medicamentos veterinarios contenidos en productos pecuarios como carne, leche y derivados (Consejo Nacional de Política Económica y Social, CONPES, 2005).

El método más utilizado para la detección y cuantificación de residuos de antimicrobianos y otros medicamentos en alimentos es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, estableciéndolo como un método de alta sensibilidad y confiabilidad. (Cháfer-Pericás, Maquieira, Puchades, Miralles, & Moreno, 2011), (Nováková, Matysová, & Solich, 2005), (Cháfer-Pericás, Maquieira, & Puchades, 2010), (Tszyrsznic, y otros, 2013), (Gomaa & Boye, 2014), (Tajik, Malekinejad, Razavi-Rouhani, Pajouhi, Mahmoudi, & Haghazari, 2010), (Rezende, Almeida, Brito, Nonaka, & Leite, 2012).

3.2. Antimicrobianos

Aunque las características de sensibilidad propias del equipo resultan adecuadas para realizar las pruebas analíticas de cuantificación de los antimicrobianos, todas las especificaciones del procedimiento, las condiciones de uso y el tratamiento de la muestra influyen decisivamente en la calidad de los resultados. Por tal razón, se debe plantear un método, estandarizando las condiciones de operación y de uso del equipo, y determinar ciertos parámetros de validación. (International Conference on Harmonisation, 2005).

La oxitetraciclina (antibiótico), el albendazol (antihelmíntico), el fenbendazol (antihelmíntico) y otros antimicrobianos de amplio uso, que incluyen penicilinas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, entre otros, han sido ampliamente estudiados por el *Codex Alimentarius*, y se han establecido LMR para diversos compuestos (Comisión del Codex Alimentarius, 2014). Dichos LMR se pueden expresar en función de un residuo marcador que proporcione una prueba inequívoca de la exposición al medicamento, el cual podría ser el medicamento original, un metabolito principal, la suma de un medicamento original y/o metabolitos, o un producto de la reacción formado a partir de los residuos del

medicamento durante el análisis. (Codex Alimentarius, 2009 (Revisadas en 2012, 2014)).

Debido al gran uso de estos antimicrobianos en la industria ganadera, es importante adecuar métodos que resulten útiles en la detección y cuantificación de dichos residuos, y así garantizar que no se superen los límites reglamentados.

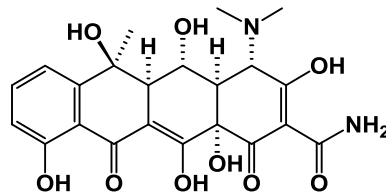


Ilustración 1. Estructura química de la Oxitetraciclina

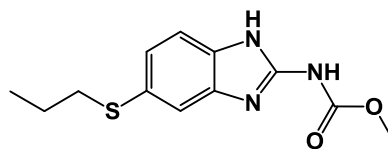


Ilustración 2. Estructura química del Albendazol

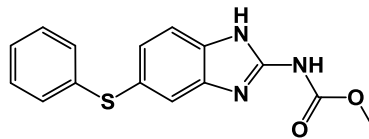


Ilustración 3. Estructura química del Fenbendazol

Tabla 1. Límites Máximos Residuales (LMR) en músculo de bovino, establecidos por *Codex Alimentarius Comision*, 2014

| Antibiótico | LMR (µg/kg o ppb) |
|-----------------|-------------------|
| Oxitetraciclina | 200 |
| Fenbendazol | 100 |
| Albendazol | 100 |

3.3. UPLC/MS

3.3.1. Ultra Performance Liquid Chromatography

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) es el resultado de una serie de diseños innovadores para cromatografía líquida, basados en una nueva tecnología de partículas, nuevo diseño de columnas, inyectores, bombas y detectores. El sistema ACQUITY UPLC permite el suministro de la fase móvil a alta presión y con una mínima dispersión, produciendo como resultado picos más estrechos y concentrados, además de aumentar el rendimiento y reducir el consumo del eluyente sin comprometer los resultados. De acuerdo con lo anterior, el sistema ACQUITY UPLC® presenta beneficios por el aumento de la resolución, sensibilidad y rapidez con respecto a los cromatógrafos convencionales (Waters, 2015).

La cromatografía líquida (LC) permite la separación de los analitos de una mezcla; sin embargo, la identificación inequívoca de los analitos de acuerdo con sus características de retención no es siempre viable. Las muestras en la mayoría de los casos presentan alta complejidad aumentando la probabilidad de encontrar sustancias que co-eluyan y que no puedan ser diferenciadas con certeza. (Montoya, 2011)

En casos de co-elución, una de las formas de identificar los compuestos se basa en la diferenciación por peso molecular, lo cual genera especificidad para identificar dichos analitos de forma fiable. De esta forma, la espectrometría de masas da lugar a una técnica de detección sensible y con especificidad para muestras en un amplio rango de pesos moleculares (Montoya, 2011).

3.3.2. Espectrometría de masas.

Un espectrómetro de masas contiene cuatro partes fundamentales: introducción de muestra, generador de iones, separación de iones, sistema de análisis y detección de iones. Para los sistemas LC-MS, en el sistema de introducción de muestras se da la producción de iones (interface) (Montoya, 2011).

Una de las interfaces más utilizadas en el acople LC-MS es la interfaz de electrospray (ESI). En este método de ionización el flujo del cromatógrafo llega a un capilar metálico que se mantiene con voltajes elevados que permiten la dispersión del líquido, formando una niebla de gotículas cargadas las cuales son desolvatadas por un gas a altas temperaturas. Las gotas reducidas, debido a los iones contenidos, experimentan fuerzas repulsivas que superan las fuerzas cohesivas generando una serie de explosiones coulómbicas que logran desolvatar el analito (Montoya, 2011).

Una vez los analitos se encuentran desolvatados son atraídos hacia el cono, el cual mantiene un voltaje óptimo para captar los analitos o los fragmentos de dichos analitos. Los iones son generalmente protonados y detectados en la forma $M+H^+$ en el modo de ionización positivo, o $M-H^-$ en el modo negativo (Waters, 2015).

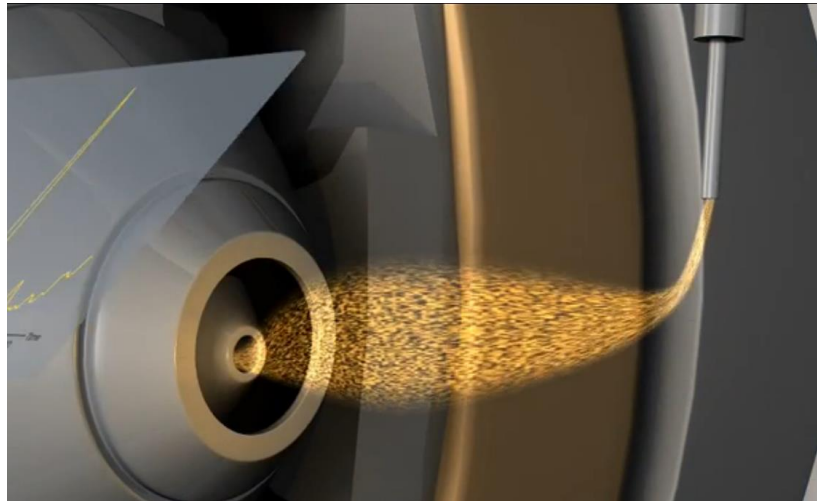


Ilustración 4. Ionización por electrospray (ESI), (Waters, 2015)

Posteriormente, los analitos son transferidos al analizador, donde las señales son diferenciadas. El analizador cuadrupolar está constituido con cuatro barras, las cuales están cargadas con voltajes específicos para desplazar iones de m/z particular hacia el detector. Aunque los cuadrupolos simples son clasificados como equipos de baja resolución, se puede incrementar utilizando arreglos de más de un cuadrupolo (doble, triple cuadrupolo). (Montoya, 2011).

Los voltajes de los cuadrupolos pueden ser ajustados para pasar específicamente una relación de masa/carga (m/z) al detector, de forma que se disminuye el ruido y se incrementa la sensibilidad obteniéndose una señal más definida; este modo de análisis es llamado SIM (Selected Ion Monitoring) o SIR (Selected Ion Recording) (Waters, 2015).

3.4. Extracción en fase sólida (SPE)

Extracción en fase sólida es una forma de cromatografía diseñada para extraer, partir y / o adsorber uno o más componentes de una fase líquida (muestra) en una fase estacionaria (sorbente o resina). SPE se ha convertido en la técnica más eficaz para la preparación rápida y selectiva de muestras, antes de la

cromatografía analítica. Dentro de los principales beneficios de utilizar esta técnica como parte del tratamiento de muestra, se tiene:

- Disminución de componentes que causen alto background, picos engañosos y/o baja sensibilidad.
- Posibilidad de purificar y concentrar la muestra, para una mayor sensibilidad.
- Llevar a cabo cambio de matriz o solvente, en caso de requerirse, a una forma más compatible con los análisis cromatográficos.
- Proteger la columna analítica de contaminantes.
- Remover interferencias para simplificar la cromatografía y mejorar la cuantificación.

De esta forma, SPE permite extender la vida del sistema cromatográfico, además de mejorar la calidad de los análisis cualitativos y cuantitativos. (Sigma-Aldrich, 2015).

Para llevar a cabo un proceso de Extracción en Fase Sólida, se deben seguir cuatro pasos principales (**Ilustración 5**. Protocolo general para llevar a cabo una Extracción en Fase Solida (SPE)), (Agilent Technologies, 2002) los cuales van a permitir la recuperación final de el/los analitos de interés, aprovechando los beneficios mencionados anteriormente.

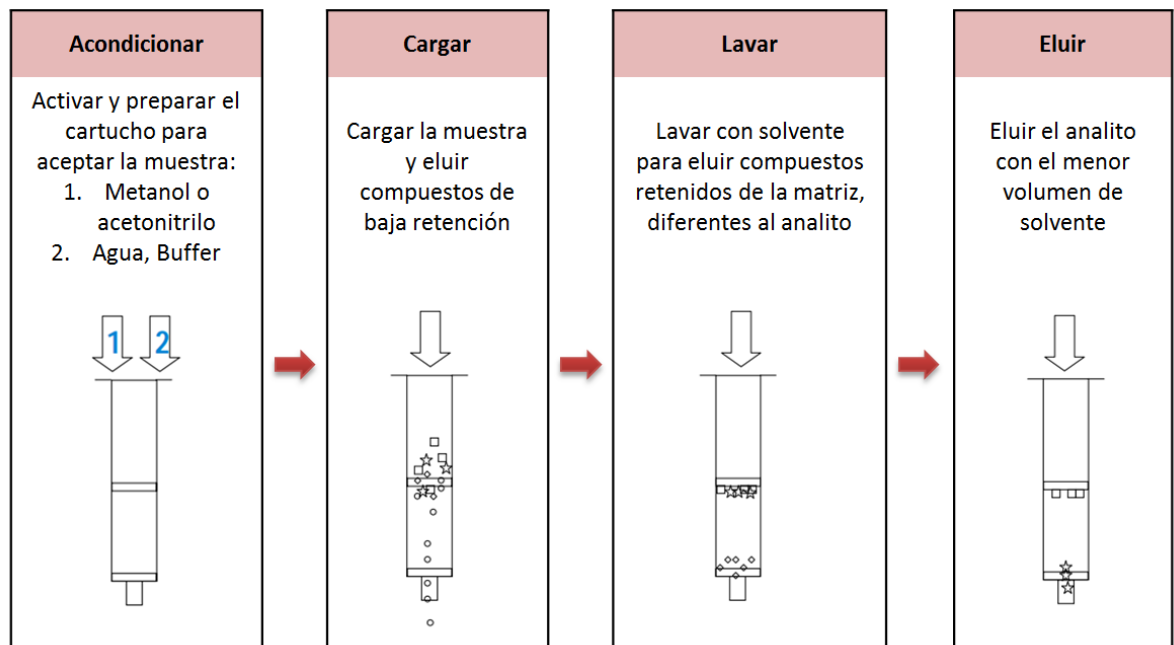
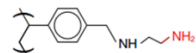
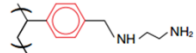
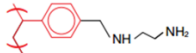
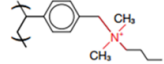
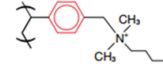
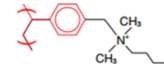
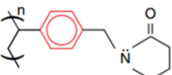
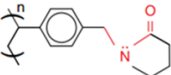
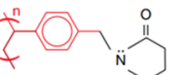
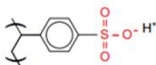
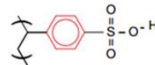
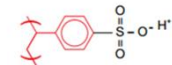
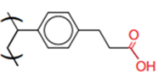
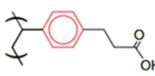
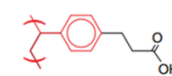


Ilustración 5. Protocolo general para llevar a cabo una Extracción en Fase Solida (SPE) (Agilent Technologies, 2002)

Los cartuchos SPE proveen diferentes mecanismos de retención basados en interacciones hidrofóbicas (dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, dipolo inducido-dipolo inducido), enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, los cuales van a determinar la naturaleza de las moléculas retenidas. (Phenomenex, 2012)

Los cartuchos Strata™-X de phenomenex presentan diferentes estructuras poliméricas en sus fases estacionarias, las cuales permiten se clasificar de acuerdo con su capacidad para retener compuestos ácidos fuertes ($pK_a < 2$) y débiles (pK_a 2-4), neutros y compuestos básicos débiles (pK_a 8-10) y fuertes ($pK_a > 10$) (**Tabla 2**). (Phenomenex, 2012). Teniendo en cuenta estas interacciones, las fases estacionarias o sorbentes de los cartuchos SPE son clasificados de forma general en: fase normal, fase reversa y fase de intercambio iónico (Agilent Technologies, 2002).

Tabla 2. Mecanismos de retención de los cartuchos Strata para extracción en fase sólida (Phenomenex, 2012)

| Compuestos | Cartucho | Mecanismo de retención | | |
|----------------|--------------|---|---|---|
| Ácidos fuertes | Strata-X-AW | Intercambio aniónico débil: Ligando di-amino | Enlace π - π | Interacción hidrofóbica |
| | Strata-XL-AW |  |  |  |
| Ácidos débiles | Strata-X-A | Intercambio aniónico fuerte: Ligando di-metilbutil amina cuaternaria | Enlace π - π | Interacción hidrofóbica |
| | Strata-XL-A |  |  |  |
| Neutros | Strata-X | Enlace π - π | Enlace de Hidrógeno Interacciones Dipolo-Dipolo | Interacción hidrofóbica |
| | Strata-XL |  |  |  |
| Bases débiles | Strata-X-C | Intercambio catiónico fuerte: Ligando ácido sulfónico | Enlace π - π | Interacción hidrofóbica |
| | Strata-XL-C |  |  |  |
| Bases fuertes | Strata-X-CW | Intercambio catiónico débil: Ligando ácido carboxílico | Enlace π - π | Interacción hidrofóbica |
| | Strata-XL-CW |  |  |  |

Para reconocer el tipo de fase estacionaria óptima, es imprescindible conocer las propiedades físicas y químicas de los analitos de interés (

Tabla 3), donde el Log P y el pK_a, son características claves para el desarrollo eficiente de la Extracción en Fase Sólida. El Log P indica el grado hidrofóbico o hidrofílico de un compuesto, y el pK_a es definido como el pH en el cual un compuesto ionizable está en equilibrio entre su estado cargado y su estado neutro; por tal razón, dichas características van a dar lugar a interacciones específicas con la fase estacionaria del cartucho, que van a permitir retener de forma óptima el o los analitos, y su facilidad de ser recuperados por el solvente de elución (Rummel, 2012).

Tabla 3. Propiedades de los antimicrobianos oxitetraciclina (Drug Bank, 2013), albendazol (Drug Bank, 2014) y febendazol (Human Metabolome Database, 2013)

| Compuesto | Propiedades | |
|-----------------|------------------------------------|--------------|
| Oxitetraciclina | punto de fusión | 184,5°C |
| | solubilidad en agua | 1,4 mg/mL |
| | Log P | -0,99 |
| | pK _a | 3,27 |
| | pK _a (ácido más fuerte) | 0,24 |
| | pK _a (base más fuerte) | 7,75 |
| Albendazol | punto de fusión | 208-210 °C |
| | solubilidad en agua | 0,0228 mg/mL |
| | Log P | 3,2 |
| | pK _a | - |
| | pK _a (ácido más fuerte) | 9,51 |
| | pK _a (base más fuerte) | 4,27 |
| Febendazol | punto de fusión | 233 °C |
| | solubilidad en agua | 0,0061 mg/mL |
| | Log P | 3,33 |
| | pK _a | - |
| | pK _a (ácido más fuerte) | 9,59 |
| | pK _a (base más fuerte) | 4,06 |

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estandarizar un método de análisis UPLC/MS para la determinación de la concentración de residuos de antimicrobianos en muestras de músculo de bovino destinada al consumo.

4.2. Objetivos específicos

Estandarizar la metodología UPLC/MS para determinar simultáneamente la concentración de albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina, en músculo de bovino.

Determinar los parámetros de validación: exactitud, precisión, rango lineal, límite de determinación, límite de cuantificación y selectividad, para garantizar eficacia del método.

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación de la solución de trabajo

Se tomó aproximadamente 1 mg de cada antibiótico, se diluyó en 10 mL de metanol a través de sonicación durante 10 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose una solución de 100 ppm. A partir de esta, se prepararon las soluciones de trabajo para cada antibiótico en metanol, a una concentración de 5000 ppb, con las cuales fueron preparadas las curvas de calibración.

5.2. Tratamiento de la muestra

El procedimiento seguido para llevar a cabo el tratamiento de la muestra en la fase 5.2.2, no fue optimizado y se definieron según artículos previamente reportados: (Montoya, Carrillo, Muñoz, & Giraldo, 2013), (Rezende, Almeida, Brito, Nonaka, & Leite, 2012)

5.2.1. Extracción sólido-líquido

Se tomó una muestra de músculo de bovino de 5g, y se dividió en trozos de aproximadamente 3mm x 1mm. Posteriormente se llevaron los trozos a un homogenizador Ultraturax®, se adicionaron 10 mL de una solución Acetonitrilo:Metanol (95:5) y 15 perlas metálicas para finalmente macerar la muestra por 50 segundos y 6000 revoluciones por minuto (nivel 9).

NOTA: Para el caso de la muestra dopada, los antimicrobianos fueron incorporados en el solvente de la extracción, formando una solución a la concentración requerida (ppb), en Acetonitrilo:Metanol (95:5), con el fin de evaluar el paso de los antibióticos en matriz durante la SPE (5.2.3.)

5.2.2. Extracción líquido-líquido y obtención de la matriz.

Seguidamente se retiraron las perlas, se transfirió la mezcla a un tubo Falcon de 50 mL y se adicionan 15 mL de n-Hexano y se llevó a una centrifuga a condiciones de 4000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se extrajo la fase Acetonitrilo:Metanol (95:5), denominada como matriz.

5.2.3. Extracción en Fase sólida (SPE)

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida, se utilizaron cartuchos Strata™-X de phenomenex, y se siguió el procedimiento acorde con los pasos mencionados en (**Ilustración 5**) Se tomaron 2 mL de la matriz en un tubo de ensayo, el cual fue

llevado a un RapidVap® y se sometió a una temperatura de 60°C y 180 mbar, hasta evaporar todo el solvente. Posteriormente, se adicionó 1 mL de agua para rediluir la muestra, y se sonicó durante 10 minutos a 60°C. Esta solución fue transferida al cartucho SPE previamente acondicionado con 1 mL de metanol seguido de 1 mL de agua. Finalmente se realiza el lavado de los cartuchos con 2 mL de una mezcla Metanol:Agua y se da la recuperación de los analitos con Metanol 100%.

5.3. Preparación de las Fases móviles.

Para llevar a cabo los análisis, se utilizó Metanol grado masas, Acetonitrilo grado masas, Agua Tipo I, ácido fórmico, a excepción de los ensayos establecidos en el numeral 5.4.

Fase móvil A: Agua + 0.1% Ácido fórmico

Fase móvil B: Metanol:Acetonitrilo (80:20) + 0.1% Ácido fórmico

5.4. Determinación de los parámetros de validación

5.4.1. Selectividad

5.4.1.1. Condiciones analíticas preliminares

Los análisis se llevaron a cabo en un Equipo de cromatografía Waters ACQUITY UPLC acoplado a un detector masas de cuadrupolo simple Waters SQ 2 y método de ionización por electrospray (ESI+). La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna HPLC-Waters XBridge BEH C18 2.5 µm, 4.6mm x 75mm. Se estableció un flujo de 0.6 mL/min, un volumen de inyección de 10 µL.

5.4.1.2. Determinación de condiciones de ionización y tendencia lineal

El paso inicial para llevar a cabo el ensayo fue establecer las condiciones cromatográficas y de ionización, de tal forma que permitieran separar y evidenciar el pico ion molecular para cada antibiótico (Albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina) de manera específica, permitiendo a su vez su identificación y cuantificación. Posteriormente, se realizaron diferentes soluciones con niveles de concentración alrededor de los MRLs (**Tabla 1**) en solvente (metanol) y con matriz al 20%, para garantizar la tendencia lineal de los datos y determinar la influencia de dicha matriz en los resultados del análisis.

5.4.2. Rango lineal:

Se elaboró una curva de calibración de los standards en solvente y una curva de calibración con adición de matriz al 10%, cada una por triplicado, utilizando las soluciones de trabajo: a 5000 ppb:

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración en solvente

| nivel concentración | Oxitetraciclina | Albendazol y Fenbendazol | Metanol |
|---------------------|-----------------|--------------------------|---------|
| 90% | 180 uL | 90 uL | 4.64 mL |
| 120% | 240 uL | 120 uL | 4.52 mL |
| 160% | 360 uL | 160 uL | 4.36 mL |
| 200% | 400 uL | 200 uL | 4.20 mL |
| 250% | 500 uL | 250 uL | 4.00 mL |
| 300% | 600 uL | 300 uL | 3.80 mL |

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración con adición de 10% de matriz

| nivel concentración | Oxitetraciclina | Albendazol y Fenbendazol | Matriz | Metanol |
|---------------------|-----------------|--------------------------|--------|---------|
| 90% | 180 uL | 90 uL | 500 uL | 4.14 mL |
| 120% | 240 uL | 120 uL | 500 uL | 4.02 mL |
| 160% | 360 uL | 160 uL | 500 uL | 3.86 mL |
| 200% | 400 uL | 200 uL | 500 uL | 3.70 mL |
| 250% | 500 uL | 250 uL | 500 uL | 3.50 mL |
| 300% | 600 uL | 300 uL | 500 uL | 3.30 mL |

Con base en las curvas de calibración se estableció el rango lineal del sistema y el rango lineal del método, respectivamente, a partir del coeficiente de correlación.

5.4.3. Porcentaje de Recuperación:

Para establecer las condiciones de recuperación de analitos tras un tratamiento por SPE, se llevaron a cabo múltiples experimentos con matriz dopada al 200%, que permitieron definir el volumen y la concentración de metanol en la solución de lavado. Adicional, se determinó el volumen de metanol necesario para una óptima elución de los analitos.

Se utilizó una muestra comercial de músculo de bovino, y se siguió el procedimiento indicado en el numeral 5.2.1., dopando la muestra al 300% (600 ppb de Oxitetraciclina, 200 ppb de Albendazol y 200 ppb de Fenbendazol).

Una vez obtenida la matriz dopada al 200%, se tomaron 2 mL. Posteriormente se evaporó el solvente, se rediluyó en agua y se transfirió al cartucho SPE previamente acondicionado, donde se realizó un lavado con 2mL de metanol 50% y finalmente se recuperaron los analitos con 3 mL de Metanol 100%.

Los demás parámetros postulados no fue posible determinarlos debido a complicaciones técnicas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de parámetros de estandarización

6.1.1. Selectividad

El primer paso fue establecer las condiciones de ionización por ESI (**Tabla 6**), para lo cual se ensayaron y compararon diferentes condiciones, y se establecieron finalmente aquellas bajo las cuales se obtuvo una adecuada separación de los analitos, y se logró detectar el pico ion molecular de Albendazol, Fenbendazol y Oxitetraciclina, de forma más abundante (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.-2**)

Adicionalmente se establecieron las condiciones cromatográficas pertinentes. Adicionalmente se establecieron condiciones cromatográficas y dos fases móviles en gradiente (**Tabla 7**), con lo cual se favoreció la separación de estos tres antimicrobianos y se logró obtener picos selectivos y definidos, estableciendo tiempos de retención específicos para cada molécula, los cuales se encuentran reportados en la **Tabla 8**.

Tabla 7) con las cuales se favoreció la separación de estos tres antimicrobianos y se logró obtener picos selectivos y definidos, definiendo tiempos de retención específicos para cada molécula (**Tabla 8**)

Además, se comparó cómo la calidad de los solventes utilizados afectaba la definición de los picos en los cromatogramas, para los diferentes analitos (**Gráfico 3**).

Utilizando una mezcla multicomponente, se realizó un corrido cromatográfico en el cual se lograron establecer las condiciones de ionización (ESI+) bajo las cuales se pudo evidenciar el pico ion molecular de cada antibiótico (albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina) y la menor cantidad de fragmentaciones posibles. Para lograrlo se debió utilizar un voltaje de 3.5 KV en el capilar y un bajo voltaje en el cono (10 V), procurando mantener la integridad del analito protonado.

Tabla 6. Condiciones para ionización por ESI

| Parámetro | Unidades | Valor definido |
|---------------------------|----------|----------------|
| Voltaje del Capilar | KV | 3.5 |
| Voltaje del Cono | V | 10 |
| Temperatura desolvatación | °C | 650 |
| Flujo gas desolvatación | L/h | 900 |
| Flujo gas cono | L/h | 20 |

Adicionalmente se establecieron condiciones cromatográficas y dos fases móviles en gradiente (**Tabla 7**), con lo cual se favoreció la separación de estos tres antimicrobianos y se logró obtener picos selectivos y definidos, estableciendo tiempos de retención específicos para cada molécula, los cuales se encuentran reportados en la **Tabla 8**.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas del ensayo

| Gradiente de las fases móviles | | |
|--|----|----|
| <i>tiempo</i> | %A | %B |
| 0 | 80 | 20 |
| 2 | 80 | 20 |
| 3 | 40 | 60 |
| 6 | 10 | 90 |
| 11 | 10 | 90 |
| 11,1 | 80 | 20 |
| 13 | 80 | 20 |
| Temperatura de la Columna: 45°C | | |
| Temperatura de la muestra: 10°C | | |

Tabla 8. Datos de identificación de cada antibiótico dentro del ensayo

| compuesto | masa (g/mol) | Pureza standard (%) | tiempo de retención (min) | m/z | Aducto |
|-----------------|--------------|---------------------|---------------------------|-----|--------------------|
| Albendazol | 265,088 | 99,9 | 5,7 - 5,8 | 266 | [M+H] ⁺ |
| Fenbendazol | 299,073 | 99,6 | 6,2 - 6,4 | 300 | [M+H] ⁺ |
| Oxitetraciclina | 460,434 | 91,3 | 4,2 - 4,3 | 461 | [M+H] ⁺ |

La columna utilizada para la estandarización del método, fue una columna HPLC, elegida debido a la posibilidad de un mayor volumen de inyección, lo cual resulta útil en este caso, donde las concentraciones de los analitos son tan bajas. Con un mayor volumen de inyección, más cantidad de analito es capaz de pasar al espectrómetro de masas, ser ionizada y detectada, incrementando la sensibilidad y resolución de los picos, lo cual también se vio favorecido al realizar el análisis en modo SIR. De esta forma, con los parámetros de trabajo anteriormente presentados, se lograron obtener los cromatogramas del **Gráfico 1**, y los espectros (**Gráfico 2**) correspondientes a cada antibiótico.

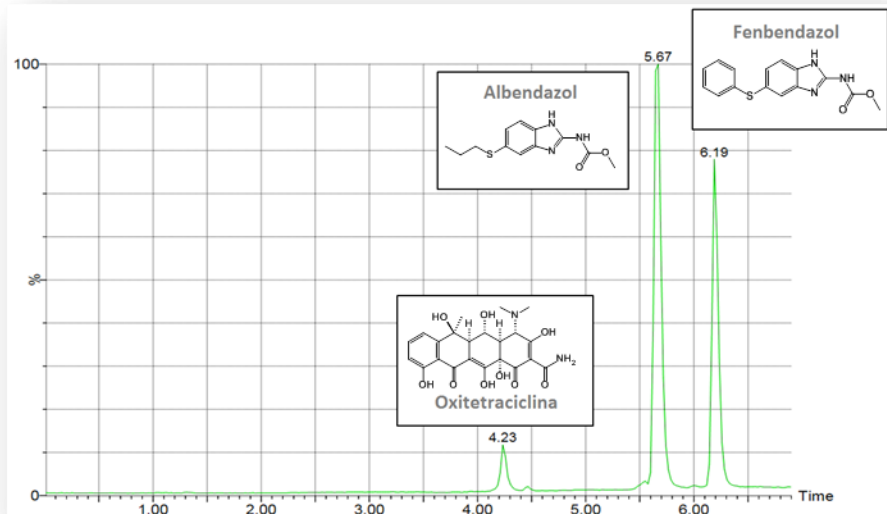


Gráfico 1. Evidencia de separación de los analitos bajo condiciones establecidas. Cromatograma en modo SIR (arriba) y Cromatograma de iones totales (abajo)

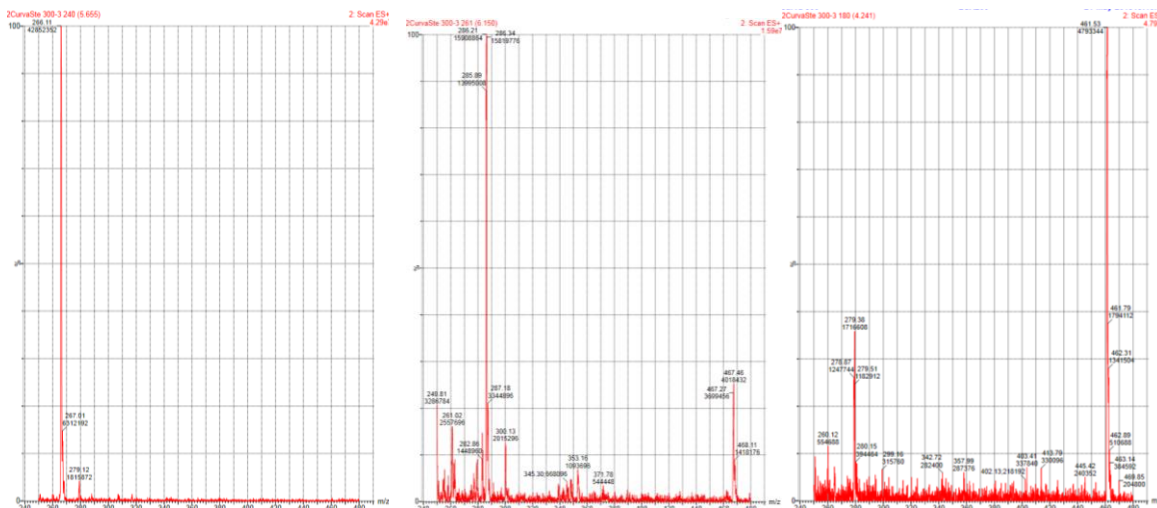


Gráfico 2. Espectros de masas para Albendazol (izq), Fenbendazol (medio) y Oxitetraciclina (der). A pesar de la abundancia de ion molecular se evidencia como aumenta el ruido en la medida que disminuye la respuesta a la ionización de izquierda a derecha respectivamente.

Adicionalmente, se logró identificar la gran influencia de la calidad de los solventes utilizados durante el análisis. En el **Gráfico 3** se pueden observar cromatogramas obtenidos utilizando solventes de menor calidad (grado HPLC) para la preparación de las fases móviles, frente a los cromatogramas obtenidos utilizando solventes de mayor calidad (grado masas), logrando evidenciar picos más definidos y con menor ruido utilizando solvente grado masas, incluso, el pico referente a la oxitetraciclina deja de ser cuantificable a causa de la disminución de la relación señal/ruido y a que este pico presenta un área de muy baja magnitud.

En el gráfico se comparan cromatogramas de soluciones en niveles de concentración del 90% y del 300% con respecto al LMR, y se hace notoria la forma en que la oxitetraciclina es desfavorecida incluso en el nivel más alto establecido; por el contrario, el albendazol y el fenbendazol no se observan tan afectados por la calidad del solvente, debido a la mayor área de respuesta que presentan estas sustancias.

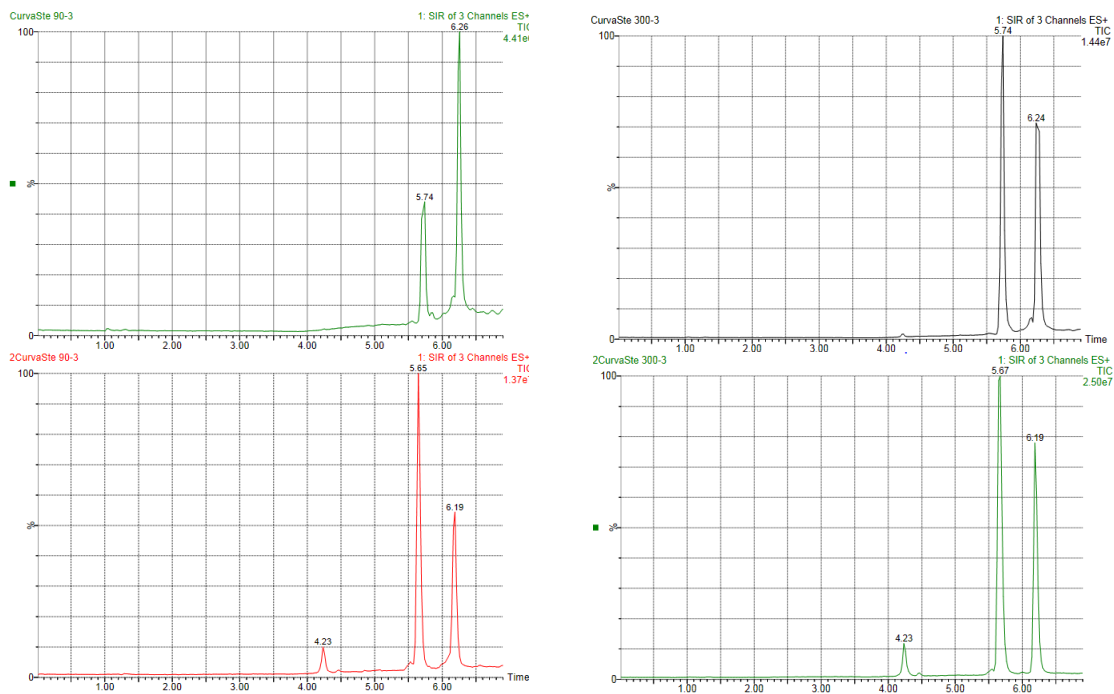


Gráfico 3. Efecto de la calidad del solvente sobre la resolución de los cromatogramas: nivel de concentración 90% (izq.), nivel de concentración 300% (der.)/ Solvente grado HPLC (sup.), solvente LC/MS (inf.)

De esta forma, todos los analitos se pudieron identificar y separar de forma adecuada; sin embargo es de gran importancia aprovechar modos de análisis como el SIR y utilizar solventes de alta calidad para mejorar la resolución de los picos.

6.1.2. Rango lineal

Una vez establecidas las condiciones del equipo, se procedió a realizar múltiples ensayos con el fin de verificar que las concentraciones y sus respuestas se ajustaran a una tendencia lineal, para lo cual se realizó una curva de calibración en solvente y en matriz (solución metanol-matriz 80:20) para cada sustancia (**Gráfico 4**). Con base en esto se estableció un rango lineal entre los niveles de concentración 90% a 300% para cada antibiótico.

Una vez establecido el rango lineal, se realizó una curva de calibración por triplicado en solvente y en matriz (solución metanol-matriz 90:10), como se indica en la **Tabla 4** y **Tabla 5**, obteniéndose los resultados reportados en los **Gráficos 5-7**. A partir de estos gráficos obtenidos, se determinó el coeficiente de correlación para cada una de las curvas (**Tablas 10, 12 y 14**)

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo del equipo, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de verificar la relación lineal entre la concentración y el área de los picos generados (**Gráfico 4**) y adicionalmente, para establecer el rango lineal en el cual fueran obtenidos picos con buena resolución. Además, se pudo evidenciar que la matriz no interfería con la linealidad de las curvas. Este ensayo fue realizado utilizando solventes grado HPLC, razón por la cual la oxitetraciclina mostró serias desviaciones de una tendencia lineal.

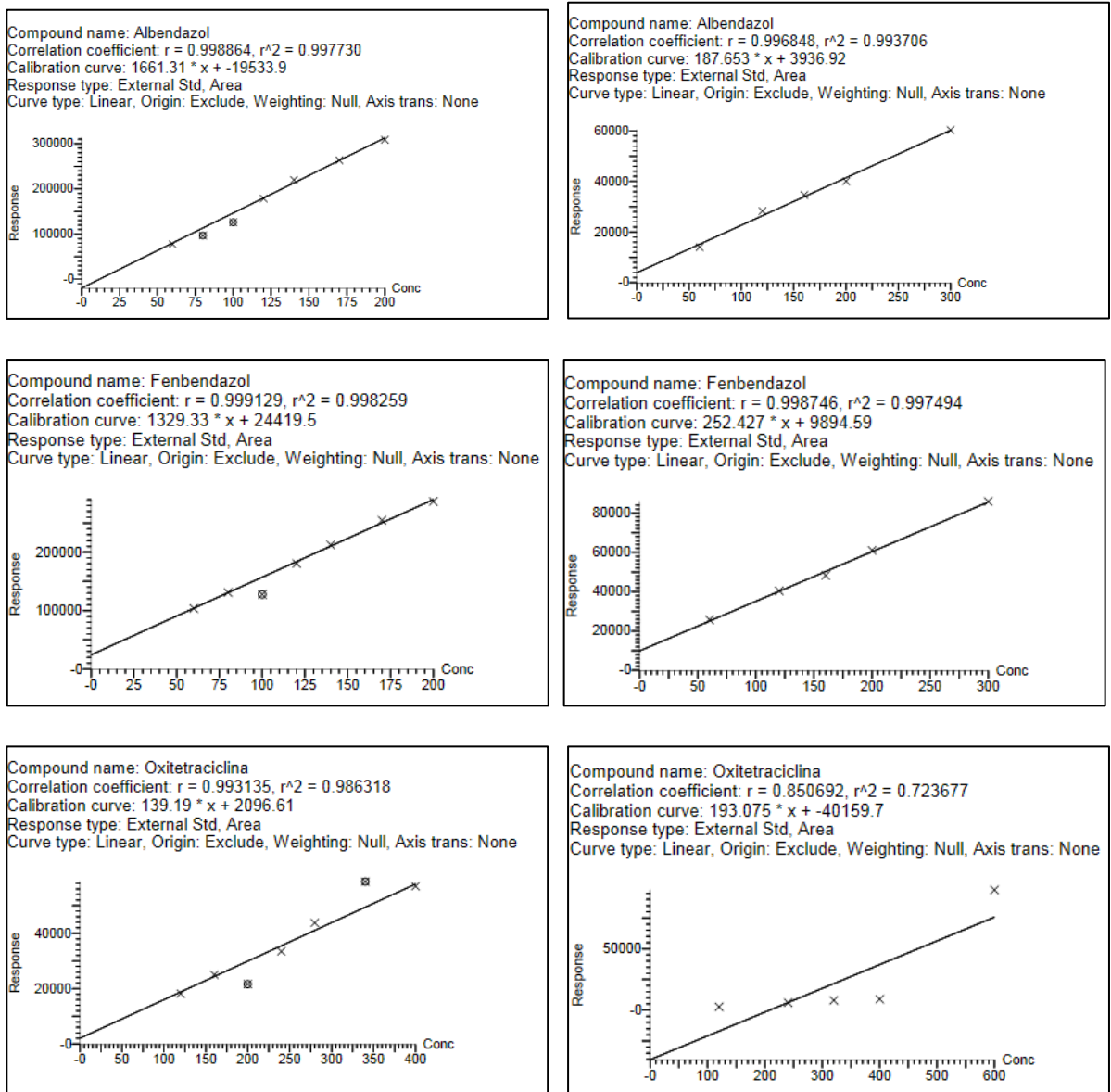


Gráfico 4. Evaluación de la tendencia lineal con interferencia de matriz (der) y en solvente (izq) para Albendazol (arriba), Fenbendazol (medio) y Oxitetraciclina (abajo)

Teniendo en cuenta los datos arrojados, el rango lineal se estableció desde solo un nivel de concentración menor al LMR, con el fin de favorecer la cuantificación de la oxitetraciclina, y se amplió el rango lineal llevando la curva hasta el nivel de concentración de 300% (90%-300%).

Una vez establecido el rango lineal, se prepararon dos curvas de calibración por triplicado con seis niveles de concentración dentro del rango (90%, 120%, 160%, 200%, 250%, 300%); una de las curvas se realizó en solvente (metanol), y la otra curva se realizó con matriz en un 10%. Los resultados obtenidos para cada antibiótico se reportan a continuación:

Tabla 9. Datos de respuesta en solvente y matriz para Albendazol

| Nivel concentración | Concentración | Solvente | | Matriz | |
|---------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| | | Área | Promedio área | Área | Promedio área |
| 90 | 93,866 | 814886,56 | 823790,79 | 780586,31 | 793903,15 |
| | | 823919,50 | | 802988,62 | |
| | | 832566,31 | | 798134,50 | |
| 120 | 125,155 | 1080426,62 | 1051383,71 | 1077700,25 | 1077051,92 |
| | | 1035694,37 | | 1092765,62 | |
| | | 1038030,12 | | 1060689,87 | |
| 160 | 166,873 | 1347614,12 | 1347644,54 | 1461220,37 | 1389173,08 |
| | | 1422008,37 | | 1313130,75 | |
| | | 1273311,12 | | 1393168,12 | |
| 200 | 208,591 | 1437633,25 | 1461402,08 | 1698419,25 | 1647944,29 |
| | | 1528281,87 | | 1643816,00 | |
| | | 1418291,12 | | 1601597,62 | |
| 250 | 260,739 | 1678922,00 | 1718296,79 | 1866490,50 | 1914942,12 |
| | | 1753629,62 | | 2021359,75 | |
| | | 1722338,75 | | 1856976,12 | |
| 300 | 312,887 | 2005412,75 | 2048928,71 | 2153681,25 | 2206837,58 |
| | | 2125899,00 | | 2214733,75 | |
| | | 2015474,37 | | 2252097,75 | |

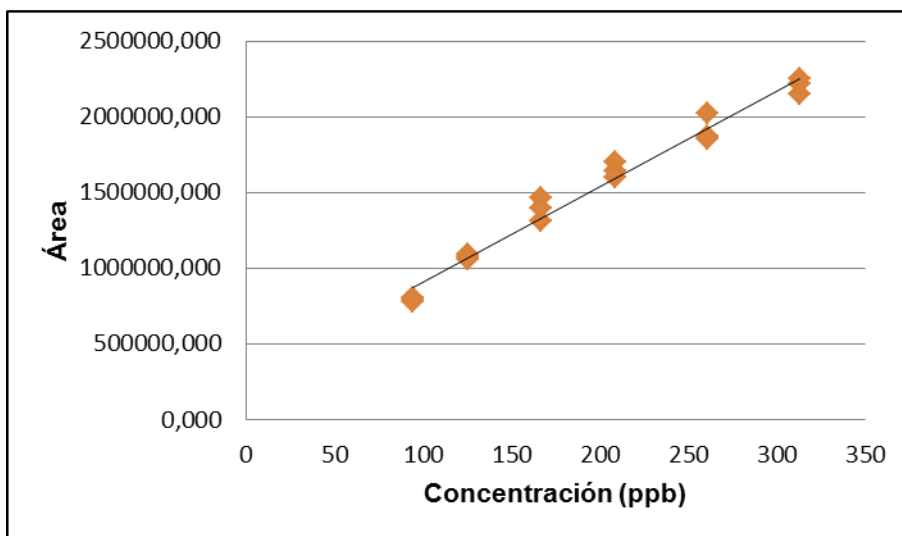
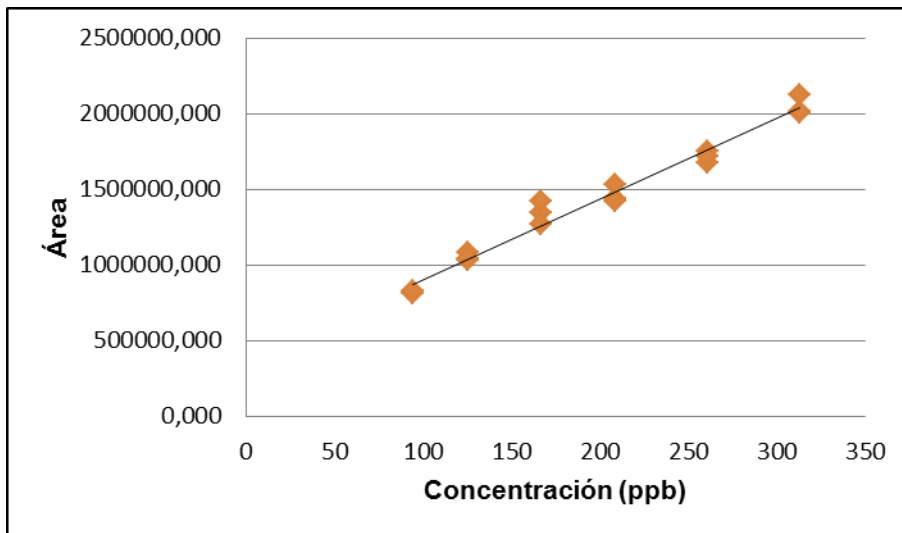


Gráfico 5. Curva de Calibración Albendazol en solvente (arriba) y en matriz (abajo)

Tabla 10. Resultados curva de calibración en solvente y matriz para Albendazol

| | Solvente | Matriz |
|----------------------|-----------------|---------------|
| Pendiente | 5316,9 | 6317,5 |
| Intercepto | 373461 | 275056 |
| R² | 0,9874 | 0,9896 |

Tabla 11. Datos de respuesta en solvente y matriz para Fenbendazol

| nivel concentración | Concentración | | | | |
|------------------------|---------------|------------|------------------|------------|------------------|
| | | Área | Promedio área | Área | Promedio área |
| 90 | 90,895 | 412846,56 | 476667,96 | 468531,41 | 482322,75 |
| | | 518402,97 | | 467272,19 | |
| | | 498754,34 | | 511164,66 | |
| 120 | 121,193 | 671010,75 | 647722,13 | 621055,31 | 632017,35 |
| | | 678027,31 | | 635935,12 | |
| | | 594128,31 | | 639061,62 | |
| 160 | 161,591 | 821998,12 | 832796,46 | 899662,12 | 866072,75 |
| | | 968068,44 | | 883818,81 | |
| | | 708322,81 | | 814737,31 | |
| 200 | 201,989 | 739497,12 | 811350,04 | 1085649,50 | 1042270,58 |
| | | 842423,81 | | 1047067,56 | |
| | | 852129,19 | | 994094,69 | |
| 250 | 252,486 | 1039614,00 | 1011266,63 | 1055796,50 | 1128730,17 |
| | | 885730,12 | | 1201598,50 | |
| | | 1108455,75 | | 1128795,50 | |
| 300 | 302,983 | 1239279,37 | 1263226,25 | 1310666,62 | 1395036,38 |
| | | 1254305,75 | | 1450748,50 | |
| | | 1296093,62 | | 1423694,00 | |

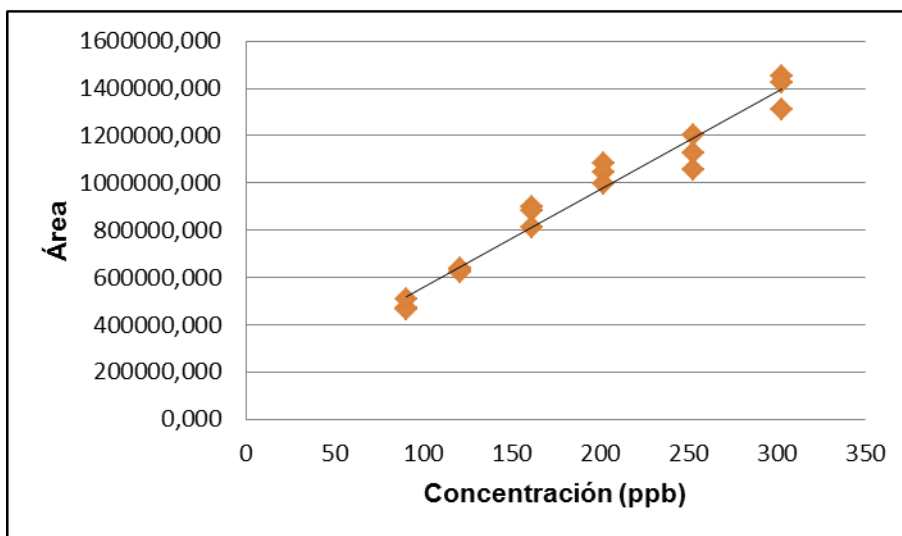
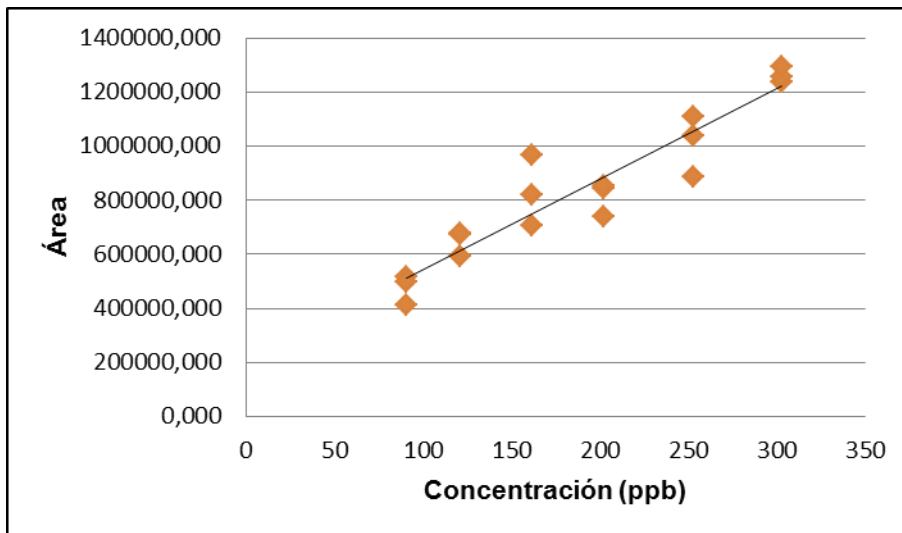


Gráfico 6. Curva de Calibración Fenbendazol en solvente (arriba) y en matriz (abajo)

Tabla 12. Resultados curva de calibración en solvente y matriz para Fenbendazol

| | Solvente | Matriz |
|----------------------|-----------------|---------------|
| Pendiente | 3346,1 | 4133,3 |
| Intercepto | 209687 | 145185 |
| R² | 0,9519 | 0,9787 |

Tabla 13. Datos de respuesta en solvente y matriz para Oxitetraciclina

| Nivel concentración | Concentración | Solvente | | Matriz | |
|---------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| | | Área | Promedio área | Área | Promedio área |
| 90 | 166,641 | 50040,56 | 57499,34 | 90520,27 | 80893,61 |
| | | 45481,15 | | 78712,953 | |
| | | 76976,33 | | 73447,594 | |
| 120 | 222,188 | 58411,59 | 66031,12 | 104347,60 | 105394,59 |
| | | 73767,44 | | 100238,51 | |
| | | 65914,35 | | 111597,65 | |
| 160 | 296,250 | 90709,89 | 89926,30 | 151255,16 | 142731,83 |
| | | 93056,27 | | 140311,36 | |
| | | 86012,74 | | 136628,97 | |
| 200 | 370,312 | - | 122785,79 | - | 172587,63 |
| | | 129367,56 | | - | |
| | | 116204,01 | | 172587,63 | |
| 250 | 462,891 | 147731,58 | 133887,48 | 211366,86 | 207308,47 |
| | | 121006,77 | | 202990,63 | |
| | | 132924,11 | | 207567,94 | |
| 300 | 555,469 | 130966,91 | 161022,68 | 241438,28 | 247673,89 |
| | | 172516,62 | | 245183,06 | |
| | | 179584,52 | | 256400,31 | |

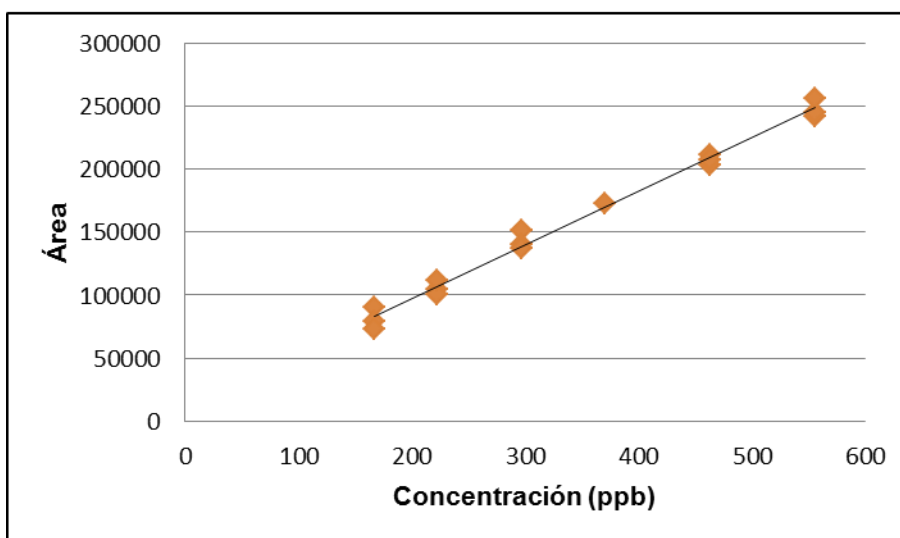
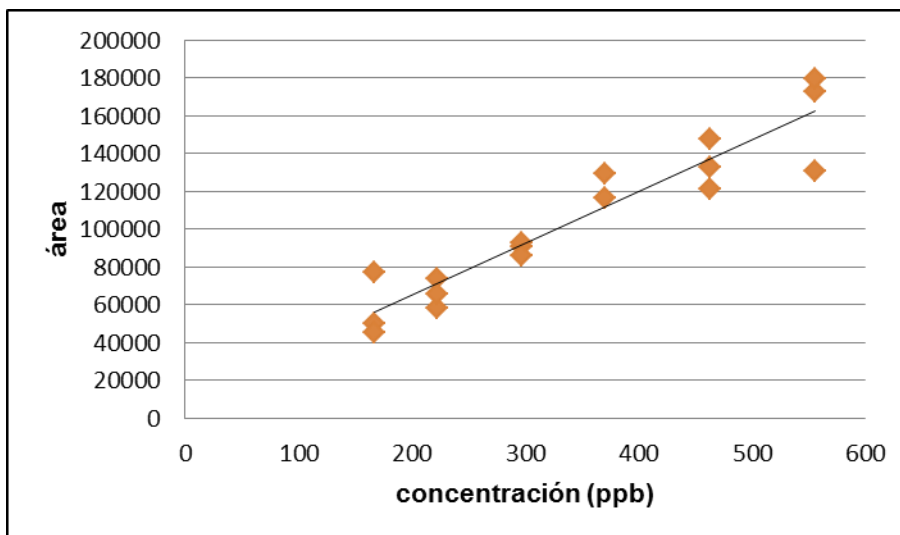


Gráfico 7. Curva de Calibración Oxitetraciclina en solvente (arriba) y en matriz (abajo)

Tabla 14. Resultados curva calibración en solvente y matriz para Oxitetraciclina

| | Solvente | Matriz |
|----------------------|-----------------|---------------|
| Pendiente | 274,17 | 425,59 |
| Intercepto | 10433 | 12339 |
| R² | 0,9801 | 0,998 |

En este caso, las fases móviles se prepararon utilizando solventes grado masas, con lo cual se pudo evidenciar una mejora en el comportamiento de la oxitetraciclina frente a las condiciones establecidas. Sin embargo, en la **Tabla 9** se puede observar la ausencia de ciertos valores de área, los cuales fueron omitidos debido a la alta desviación que presentaban con respecto a los otros datos y que no pudieron ser repetidos debido a problemas técnicos presentados durante el análisis.

Para los tres compuestos se observó un mayor ajuste de linealidad con la adición de matriz; sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores para verificar si es efecto de la matriz, o fue a causa de la preparación de las muestras por parte del analista. No obstante, se deben realizar mediciones repetidas de una misma muestra para comparar dichas curvas, ya que las mediciones para la construcción de la curva corresponden a preparaciones diferentes de la muestra.

Debido a que hubo una notoria mejora de la resolución de los picos, especialmente para oxitetraciclina al utilizar solvente grado masas, es muy probable que el rango lineal pueda ser extendido a niveles de concentración inferiores, dejando la oxitetraciclina de ser un limitante. Al obtener resultados inferiores al LMR, se puede garantizar con mayor certeza el cumplimiento de los requisitos establecidos por el *Codex Alimentarius*.

6.1.3. Porcentaje de Recuperación

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida, fue necesario realizar ensayos previos para determinar el volumen y la concentración de metanol a utilizar en los lavados del cartucho y el volumen de metanol 100% para eluir los analitos.

Para definir la solución de lavado (2mL), se llevaron a cabo ensayos sobre un blanco dopado al 200%, por duplicado, con soluciones de metanol a diferentes concentraciones: metanol 20%, metanol 50% y metanol 80% (**Gráfico 8**) y con metanol 100%, realizando doble lavado con 2mL de metanol sobre cada cartucho (**Gráfico 9**). En este mismo experimento se lavados con metanol 100% para una muestra blanco (**Gráfico 10**).

Posteriormente se evaluó la presencia de analitos en dichos procesos de lavado y elución, a partir de la presencia o ausencia de los picos correspondientes en cada cromatograma y de la respuesta en área detectada por el equipo para cada uno (**Tabla 15**).

Una vez diseñado el ensayo anteriormente mencionado, se decidió utilizar una solución de metanol 50% para el lavado del cartucho SPE y posteriormente eluir los analitos con 3mL de metanol, en una muestra previamente dopada al 300%. El procedimiento se realizó por duplicado, y se obtuvieron los cromatogramas del

Gráfico 11. Se determinó la cantidad de antimicrobianos recuperados, reportados en la **Tabla 16**.

Para determinar las condiciones bajo las cuales se debe realizar la extracción en fase sólida, se llevó a cabo una serie de experimentos para la selección de la solución de lavado (Agua-Metanol) y el volumen de metanol necesario para extraer la mayor cantidad de analitos del cartucho Strata-X™ de phenomena.

La solución de lavado consta de un solvente apolar (metanol), con el cual se pretende eliminar compuestos inorgánicos que generen interferencia o ruido durante el análisis, y agua para disminuir la polaridad y evitar pérdida de los analitos durante el lavado de los cartuchos. De esta forma, se pretende recuperar posteriormente los analitos con un menor número de interferencias que puedan afectar su ionización

Inicialmente se llevó a cabo la preparación de una matriz dopada al 200%, la cual fue utilizada para realizar los ensayos de extracción en fase sólida: se realizaron dos ensayos por solución de lavado, donde las soluciones de lavado fueron: metanol 20%, metanol 50% y metanol 80% para evaluar la cantidad de analito que se podría perder, y determinar así la solución que resultaba más adecuada; adicionalmente, se realizó un lavado con 2 mL de metanol 100%, con el fin de comprobar la capacidad del solvente para eluir los analitos.

Se encontró que en los cromatogramas de los lavados con metanol 20%, 50% y 80 (**Gráfico 6**) no se observaron picos referentes a los analitos de interés. Al realizar la integración, se percibieron señales demasiado bajas de los analitos, de forma tal que no se puede conocer con certeza la cantidad de analito eluído, sin embargo, se asume que la cantidad no fue significativa. Lo mismo sucedió con el primer lavado utilizando metanol 100% (**Gráfico 9**), por lo cual se realizó un lavado adicional de 2 mL a estos cartuchos previamente lavados con metanol 100%, lográndose evidenciar esta vez la presencia de los picos correspondientes a los antimicrobianos albendazol y fenbendazol, y por consiguiente obteniéndose un área considerablemente mayor para cada pico (**Tabla 15**); no obstante, las áreas detectadas aun no alcanzaron a ser cuantificadas.

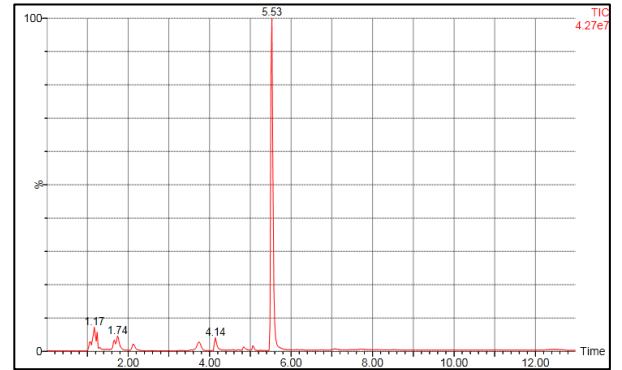
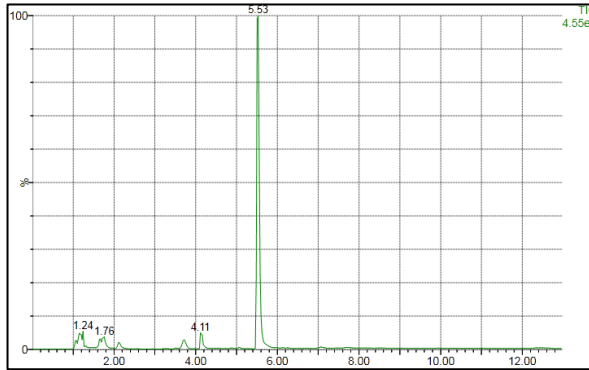
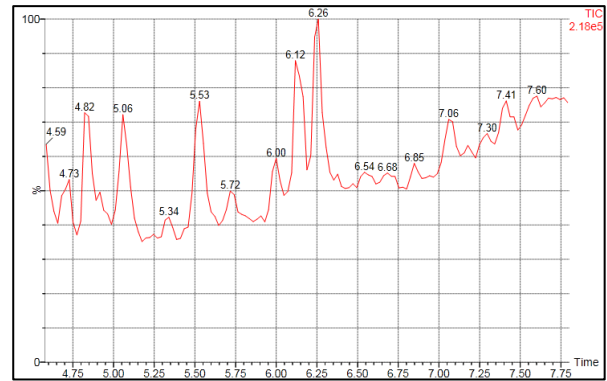
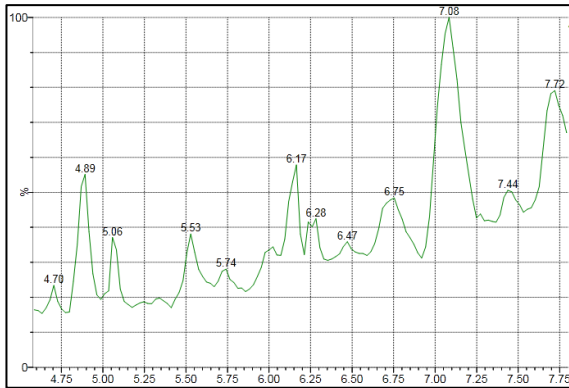
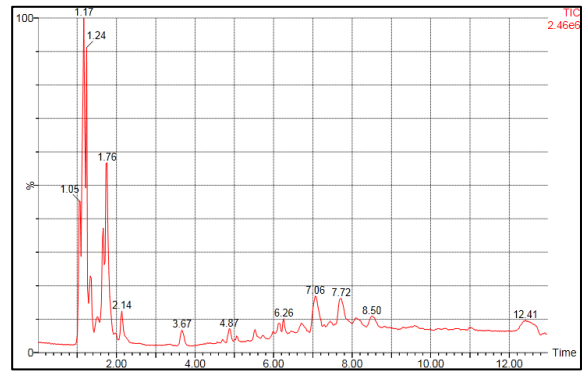
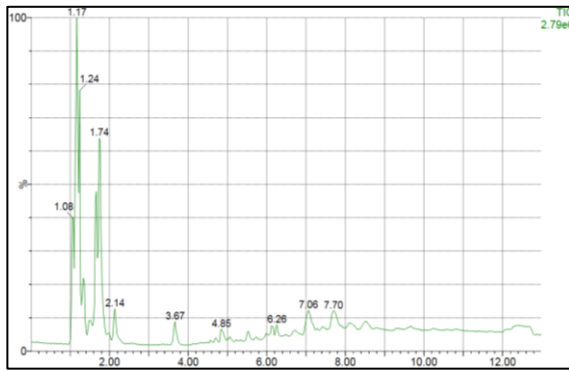


Gráfico 8. Cromatograma de muestra dopada al 200% en cartucho SPE 1 (izq) y cartucho SPE 2 (der): lavado con metanol 20% (arriba), metanol 50% (medio) y metanol 80% (abajo)

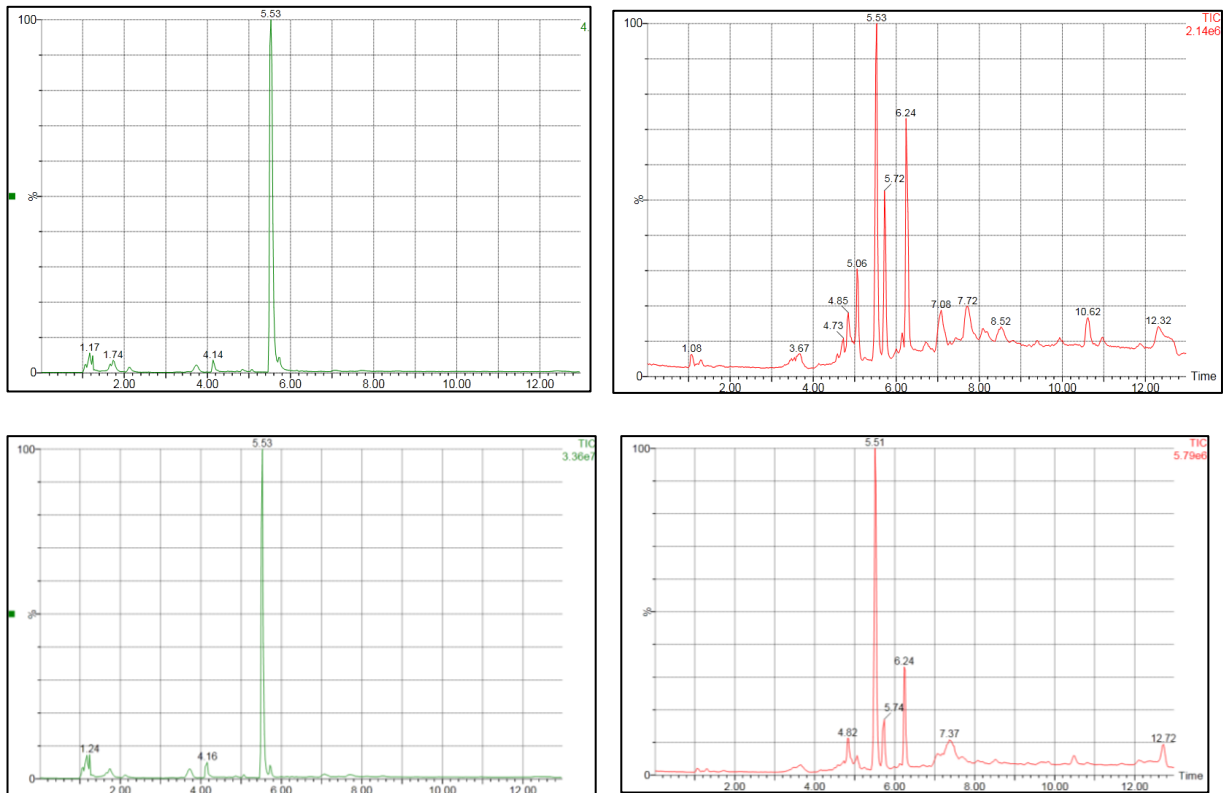


Gráfico 9. Cromatograma de muestra dopada al 200% lavado 1 (izq) y lavado 2 (der) con metanol 100%

También se llevó a cabo un experimento en el cual se realizaron dos lavados con metanol 100% a un cartucho de una muestra blanco (sin dopar) y cabe resaltar que en dichas muestras se logró detectar la presencia de antimicrobianos, tal como se puede observar en el cromatograma del **Gráfico 9** y en los datos de la **Tabla 15**; sin embargo, no se pueden realizar apreciaciones al respecto, sin posteriores pruebas confirmatorias.

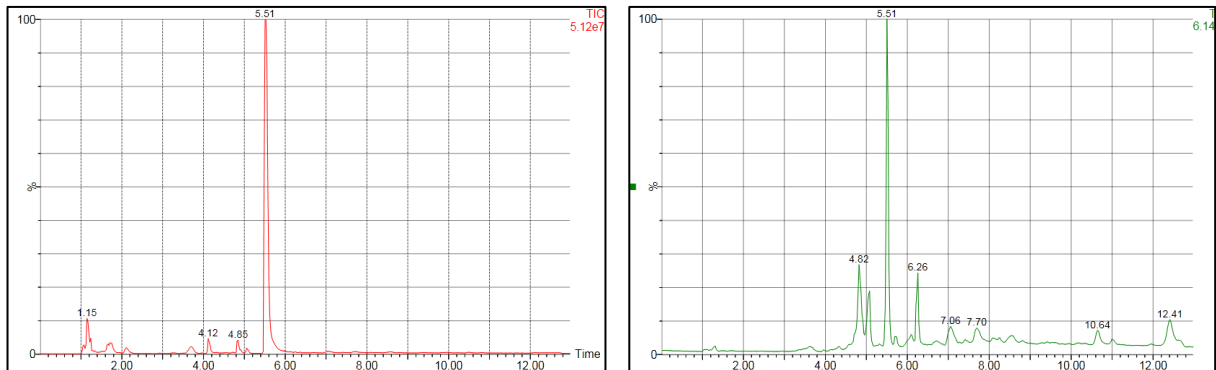


Gráfico 10. Cromatograma de muestra blanco lavado 1 metanol 100% (izq) y lavado 2 (der)

Tabla 15. Áreas de respuesta de los lavados de cartucho SPE

| Lavados | Área del pico | | |
|---|-----------------|------------|-------------|
| | Oxitetraciclina | Albendazol | Fenbendazol |
| lavado metanol 20%-cartucho1 | 245,856 | 1659,778 | 6075,902 |
| lavado metanol 20%-cartucho 2 | 904,572 | 1796,036 | 6485,918 |
| lavado metanol 50%-cartucho1 | 742,429 | 1449,249 | 5053,029 |
| lavado metanol 50%-cartucho 2 | 1505,653 | 1772,299 | 6244,698 |
| lavado metanol 80%-cartucho1 | 13758,237 | 2378,182 | 4780,641 |
| lavado metanol 80%-cartucho 2 | 9359,158 | 1519,401 | 5345,056 |
| lavado 1 metanol 100%-cartucho 1 (Blanco) | 8204,512 | 6780,633 | 7161,291 |
| lavado 2 metanol 100%-cartucho 2 (Blanco) | 355,989 | 14028,123 | 87589,289 |
| lavado 1 metanol 100%-cartucho 1 | 118,976 | 61698,145 | 5473,42 |
| lavado 2 metanol 100%-cartucho 1 | 10,649 | 62172,336 | 100193,516 |
| lavado 1 metanol 100%-cartucho 2 | 121,198 | 62710,078 | 5918,106 |
| lavado 2 metanol 100%-cartucho 2 | 6,26 | 66445,727 | 118269,984 |

De acuerdo con los resultados encontrados, se decidió realizar un lavado con 2 mL de metanol 50% y 3 mL de metanol 100% para recuperar los analitos de una muestra dopada al 300%, como se indica en el numeral 5.2.1., esperando obtenerse una concentración equivalente al 200% en el volumen final de recuperación (3 mL). Se establecieron dichas condiciones bajo la hipótesis de que la cantidad de metanol de la solución de lavado ayuda a arrastrar los analitos retenidos en el cartucho, para finalmente ser recuperados con los 3 mL de metanol 100%. Sin embargo, los resultados encontrados (**Tabla 16**) indican que las recuperaciones de los analitos continúan siendo bajas, y ya que las áreas de los picos aun no pueden ser cuantificadas, no se logra determinar un porcentaje de recuperación.

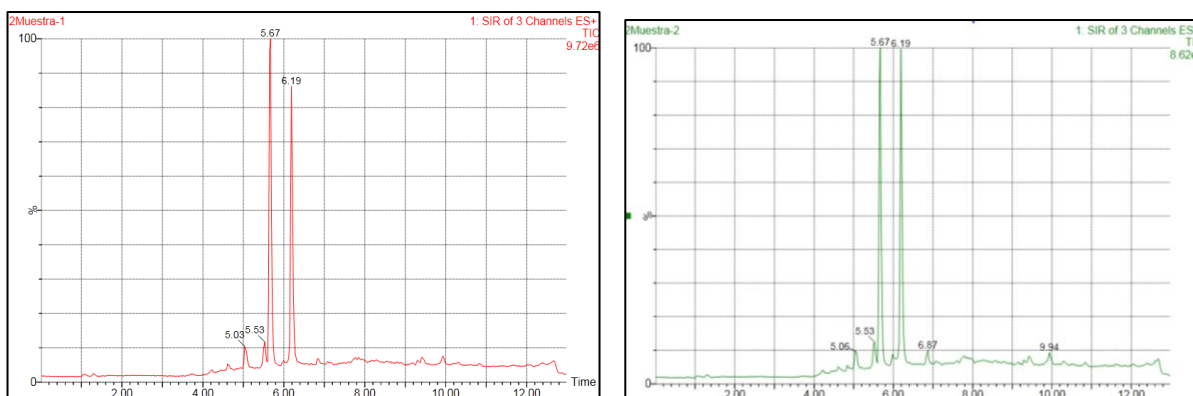


Gráfico 11. Recuperación de analitos por SPE: Cartucho 1 (izq) y Cartucho 2 (der)

Tabla 16. Área de respuesta de recuperación de analitos por SPE

| Lavados | Área del pico | | |
|---------------------------------|-----------------|------------|-------------|
| | Oxitetraciclina | Albendazol | Fenbendazol |
| muestra recuperación-cartucho 1 | 7747,968 | 671034,88 | 476409,06 |
| muestra recuperación-cartucho 2 | 8979,235 | 551906,25 | 488445,97 |

Como se puede observar en los **Gráficos 8-10**, hay una señal que aparece entre los tiempos de retención 5.51-5.54, la cual posee una mayor área de respuesta que las señales de interés que se han relacionado con el albendazol, el

fenbendazol y la oxitetraciclina. El espectro de masas correspondiente a dicha señal se encuentra en el **Gráfico 12** y debido a su ausencia en los cromatogramas de las soluciones preparadas en solvente, lo más probable es que se deba a una interferencia de la matriz. Sin embargo, como se puede observar en el **Gráfico 11**, la señal se vuelve despreciable tras el lavado previo de los cartuchos (en este caso con solución de metanol 50%), donde las señales establecidas para la identificación de cada ion adquieren abundancia.

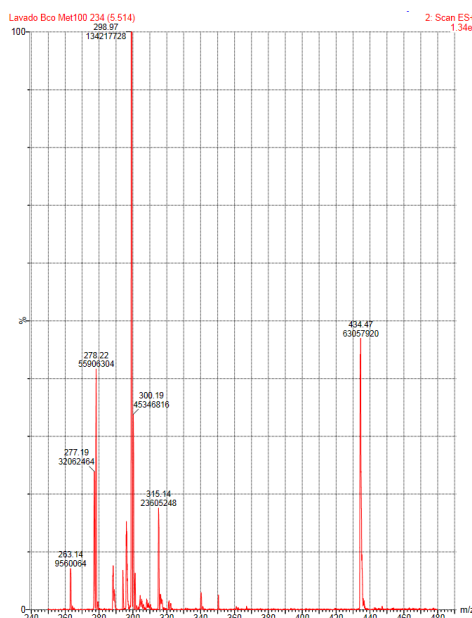


Gráfico 12. Espectro de masas para compuesto con tiempo de retención 5.1 del cromatograma reportando en el Gráfico 10.

Con base en los datos de Log P y pK_a de los analitos (**Tabla 3**), se puede observar que todos los analitos son ionizables, el albendazol y el fenbendazol presentan baja solubilidad en agua a temperatura ambiente, a diferencia de la oxitetraciclina (Rummel, 2012). Con base en estas estimaciones, se puede afirmar que los cartuchos disponibles no corresponden a los cartuchos más adecuados para estandarizar la recuperación de los analitos, debido a que la química de la fase estacionaria de los cartuchos Strata-X viene definida para la retención de analitos neutros, y teniendo en cuenta que estos son re-disueltos en agua, probablemente se encuentren ionizados y por tanto resulten incapaces de ser retenidos por el sorbente, especialmente la oxitetraciclina, debido a su alta solubilidad en agua (Phenomenex, 2012). De esta forma, los cartuchos utilizados resultan poco favorables para la retención de los analitos de interés (albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina) y deben ser reemplazados por cartuchos con otro tipo de química; no obstante, por cuestión de presupuesto no fue posible acceder a otro tipo de cartucho y el trabajo tuvo que ser realizado utilizando el material disponible en el laboratorio.

Otras probables explicaciones sobre la baja recuperación de los analitos, incluyen pérdida durante los procesos de tratamiento de muestra: extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido, y pérdida durante la re-dilución con agua (no se logró disolver la cantidad de antimicrobianos presentes).

7. CONCLUSIONES

Se logró establecer las condiciones cromatográficas y las condiciones de ionización que favorecen la separación e identificación inequívoca de los analitos albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina.

Se evidenció la importancia de utilizar solventes de alta calidad en análisis cuantitativos de residualidad de antimicrobianos, ya que permiten aumentar la relación señal/ruido, incrementando la resolución de los picos, lo cual es de gran importancia, debido a las pequeñas cantidades encontradas en las muestras. pudo determinar que el equipo era lo suficientemente sensible como para determinar concentraciones inferiores a los respectivos MRLs.

Se estableció un rango lineal con niveles de concentración desde 90% a 300%, donde los antimicrobianos presentaron mejor respuesta frente a las condiciones de tratamiento (interferencia de matriz) y las condiciones de equipo establecidas, con lo cual se

Se determinaron ciertas condiciones para la recuperación de los analitos a través del proceso de extracción en fase sólida en un cartucho Strata-X; sin embargo, dichas condiciones no resultaron satisfactorias y no se logró establecer un porcentaje de recuperación de los analitos.

8. RECOMENDACIONES

El presente trabajo puede ser utilizado como base para la posterior validación del método; sin embargo, es necesario complementar ciertos aspectos que no se lograron concretar:

1. Estandarizar y validar el método de extracción de los antimicrobianos presentes en músculo de bovino, para muestras blanco y muestras dopadas.
2. Se requiere revisar el rango lineal con la expectativa de lograr incluir niveles de concentración inferiores, lo cual es viable utilizando solventes de calidad óptima para este tipo de análisis (solventes grado masas).
3. Se deben realizar mediciones repetidas de una misma muestra con el objetivo de conocer variaciones que pueda tener el equipo para la detección y cuantificación de los analitos.
4. Se deben realizar mediciones repetidas de cada muestra utilizada para la construcción de las curvas, a fin de comparar las curvas en solvente y en matriz.
5. Se debe evaluar las condiciones bajo las cuales lleva a cabo la extracción en fase sólida, procurando optimizar las condiciones para la recuperación simultánea de albendazol, fenbendazol y oxitetraciclina: Tener control sobre el pH de las soluciones teniendo en cuenta el pK_a de los analitos, y elegir un cartucho SPE de acuerdo con las propiedades químicas del sorbente y los antimicrobianos evaluados.

9. REFERENCIAS

- Agilent Technologies. (16 de 05 de 2002). *The Secrets of Solid Phase Extraction (SPE) for Sample Preparation*. Recuperado el 19 de 06 de 2015, de sitio web de Agilent Technologies: <https://www.chem.agilent.com/Library/eseminars/Public/Secrets%20of%20SPE.pdf>
- Álvares, E. M. (2013). *Prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos en productos avícolas: influencia de diferentes factores y consecuencias para la seguridad alimentaria*. León: Universidad de León.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1039-1049.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R., Miralles, J., & Moreno, A. (2011). Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control*, 993-999.
- Codex Alimentarius. (2009 (Revisadas en 2012, 2014)). *DIRECTRICES PARA EL DISEÑO Y LA IMPLEMENTACIÓN DE PROGRAMAS NACIONALES REGLAMENTARIOS DE ASEGURAMIENTO DE INOCUIDAD ALIMENTARIA RELACIONADOS CON EL USO DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ANIMALES DESTINADOS A LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS*.
- Comisión del Codex Alimentarius. (Julio de 2014). *CODEX ALIMENTARIUS*. Recuperado el 07 de Noviembre de 2014, de sitio web de Codex Alimentarius: <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lmr-de-medicamentos-veterinarios/es/>
- Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Aditivos alimentarios. (1970). *Normas de identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: Diversos antibióticos*. Ginebra: FAO/OMS.
- CONPES. (05 de Septiembre de 2005). *Documento Conpes 3376: Política Sanitaria de Inocuidad para las cadenas de la Carne Bovina y de la Leche*. Recuperado el 08 de Noviembre de 2014, de Consejo Nacional de Política Económica y Social: <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Conpes/3376.pdf>
- Consejo Nacional de Política Económica y Social, CONPES. (05 de Septiembre de 2005). *Documento Conpes 3376: Política Sanitaria de Inocuidad para las*

- cadenas de la Carne Bovina y de la Leche*. Recuperado el 08 de Noviembre de 2014, de Instituto Colombiano Agropecuario (ICA): http://www.ica.gov.co/Trazabilidad/Normatividad/Files/CONPES/3376_Sep2005.aspx
- Drug Bank. (16 de 09 de 2013). *Oxytetracycline*. Recuperado el 18 de 06 de 2015, de Drug Bank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00595>
- Drug Bank. (27 de 03 de 2014). *Albendazole*. Recuperado el 18 de 06 de 2015, de Drug Bank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00518>
- Federación Colombiana de Ganaderos. (2014). *FEDEGAN*. Recuperado el 08 de Noviembre de 2014, de FEDEGAN: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/consumo-0>
- Gomaa, A., & Boye, J. (2014). Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *Food Chemistry*, 585-592.
- Human Metabolome Database. (30 de 06 de 2013). *metabocard for Fenbendazole*. Recuperado el 18 de 06 de 2015, de HMDB: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB29745.xml>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (20 de Febrero de 2014). *ICA*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2014, de Sitio Web de ICA: <http://www.ica.gov.co/CMSPages/GetFile.aspx?nodeguid=49ab2753-6861-43f2-b58a-e0adc1e5e797&lang=es-CO>
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2003). *Resolución 889 Por la cual se establecen requisitos sanitarios para las fincas que produzcan bovinos, ovinos, caprinos y bubalinos para sacrificio con destino a la exportación*. Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2013). *ICA*. Recuperado el 07 de Noviembre de 2014, de sitio web de ICA: <http://www.ica.gov.co/Trazabilidad.aspx>
- Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (2000). *"La prevención de los Residuos de medicamentos veterinarios es responsabilidad de todos"*. Bogotá, DC: Produmedios.
- International Conference on Harmonisation. (2005). Validation of Pharmaceutical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline* (págs. 5-6). ICH.

- Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. (2012). *Resolución N° 000451: Por la cual se delega al instituto Colombiano agropecuario -ICA como entidad administradora del sistema Nacional de Identificación e Información del Ganado Bovino*. Colombia.
- Ministerio de Salud y Protección social. (2012). *Decreto 2270*. Colombia.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). *Resolución 240*. Colombia.
- Montoya, G. (2011). *Consideraciones sobre la espectrometría de masas debido a su moderno acople con cromatografía líquida y su modo de aplicación en la química de productos naturales*. Cali: Universidad Icesi.
- Montoya, G., Carrillo, L. C., Muñoz, A., & Giraldo, L. (2013). Confirming the presence of veterinary drugs in bovine muscle using house LC/MS library. *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, 1-7.
- Nováková, L., Matysová, L., & Solich, P. (2005). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 908-917.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos*. Ginebra: Red Internacional de autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos.
- Phenomenex. (2012). *Strata-X SPE*. Recuperado el 19 de 06 de 2015, de sitio web de Phenomenex: http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf
- Rezende, C., Almeida, M., Brito, R., Nonaka, C., & Leite, M. (Abril de 2012). Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of β -lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle. *Food Additives & Contaminants*, 29(4), 1-10.
- Rummel, M. (01 de 02 de 2012). *Successful reversed-phase SPE*. Recuperado el 19 de 06 de 2015, de The Column: <http://digital.findanalytichem.com/nxtbooks/advanstaruk/thecolumn020112/#/1>
- Sigma-Aldrich. (2015). *Solid Phase Extraction*. Recuperado el 18 de 06 de 2015, de sitio web de Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/learning-center/spe-overview.html>
- Tajik, H., Malekinejad, H., Razavi-Rouhani, S., Pajouhi, M., Mahmoudi, R., & Haghazari, A. (2010). Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney

and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food and Chemical Toxicology*, 2464-2468.

The United States Pharmacopeial Convention. (2013). *USP 36 - NF 31: Farmacopea de los Estados Unidos de América - Formulario Nacional*. Rockville, Maryland : The United States Pharmacopeial Convention.

Tszyrsznic, W., Borowiec, A., Pawlowska, E., Jazwiec, R., Zochowska, D., Bartlomiejczyk, I., y otros. (2013). Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants compared to immunoassay. *Journal of Chromatography B*, 9-15.

Waters. (2015). *Mass Spectrometry, Glosary*. Recuperado el 15 de 06 de 2015, de sitio web de Waters: http://www.waters.com/waters/en_US/Glossary/nav.htm?cid=10091204&locale=en_US

Waters. (2015). *Sistema ACQUITY UPLC*. Recuperado el 13 de 06 de 2015, de sitio web de Waters: http://www.waters.com/waters/es_CO/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?cid=514207&locale=es_CO

Waters. (2015). *SQ Detector 2*. Recuperado el 13 de 06 de 2015, de sitio web de Waters: http://www.waters.com/waters/en_US/SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection/nav.htm?cid=134631584