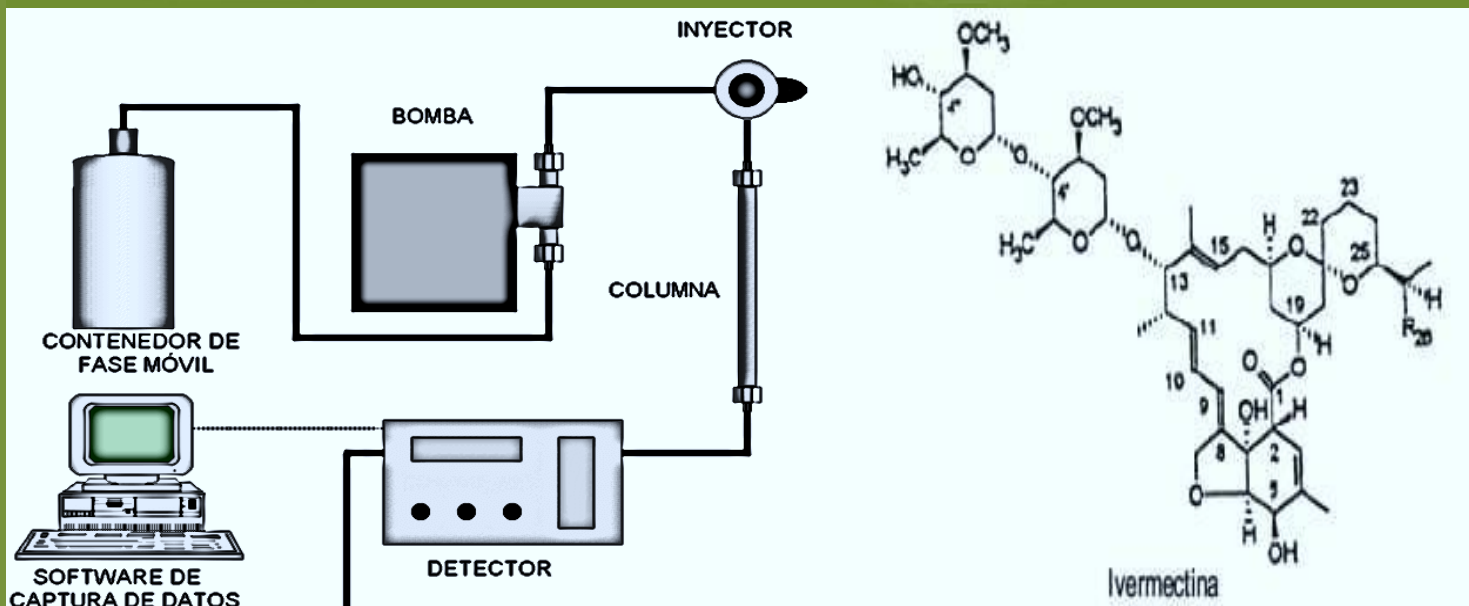
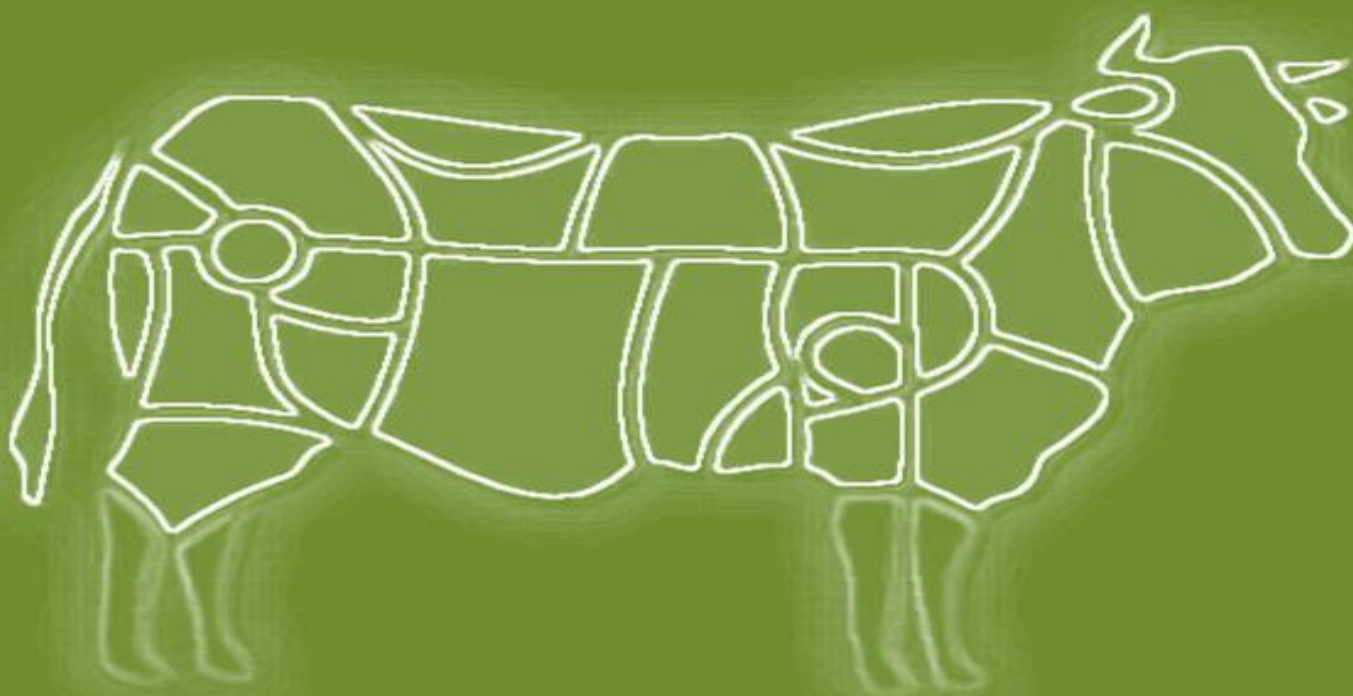




UNIVERSIDAD
NACIONAL
AGRARIA

MANUAL DE LA TÉCNICA PARA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE LÁCTONAS MACROCÍCLICAS EN MÚSCULO POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA HPLC.RP





**UNIVERSIDAD
NACIONAL
AGRARIA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO ESPECIAL DE GRADUACIÓN

Manual de la técnica para determinación de residuos de láctonas
macrocíclicas en músculo por Cromatografía líquida de alta resolución en fase
reversa HPLC.RP

Autores:

Celigen Zamira Blandón Blandón

William Rusbell Videa Blandón

Asesores:

M.V. Fredda Ramírez Gutiérrez

M.V. Julio López Flores MSc

Managua, Nicaragua

Abril, 2019

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal (FACA), de la Universidad Nacional Agraria (UNA), como requisito parcial para optar al título profesional de:

MEDICO VETERINARIO
En grado de Licenciatura

Miembros del tribunal examinador

Dra. Varinia Paredes Vanegas
Presidente

Dr. Max Solís Bermúdez
Secretario

Lic. Alba Rosa Vílchez
Vocal

Managua, Abril 2019

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
INDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
Unidad I. Generalidades	4
1.1 Cromatografía líquida (HPLC)	4
1.2 Desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa	4
1.3 Instrumentación general del Cromatógrafo líquido en fase reversa	5
1.3.1 Los elementos indispensables en cualquier Cromatógrafo HPLC	5
1) Sistema de suministro de fase móvil	5
2) Sistema de inyección de muestra	5
3) Columnas cromatografía	6
4) Detecto	6
1.4 Cromatografía de partición	7
1.5 Los componentes del cromatógrafo	8
1.5.1 Componentes del hardware del sistema cromatógrafo	8
1.5.2 Componentes del software del sistema cromatográfico	9
1.6 Descripción de los antiparasitarios a determinar en tejido bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase HPLC. RP	9

1.7 Equipos, materiales, cristalería y reactivos a utilizar en la técnica determinación de residuos de antiparasitarios en tejido de bovino en HPLC	11
1.7.1 Equipos.	11
1.7.2 Materiales.	11
1.7.3 Cristalería.	11
1.7.4 Reactivos y soluciones.	12
Unidad II. Uso de los equipos, materiales y preparación de soluciones	13
2.1 Equipos	13
2.1.1 Molino	13
2.1.2 Balanza Electrónica De Precisión	14
2.1.3 Centrifuga	15
2.1.4 Dispensador de solvente	16
2.1.5 N- Evaporador	17
2.1.6 Vortex	18
2.1.7 Cromatógrafo líquido HPLC	19
2.2 Materiales	20
2.3 Cristalería	21
2.4 Reactivos y soluciones	22
2.5 Preparación de estándares	24
2.5.1 Solución de stock	24
2.5.2 Solución de trabajo (Estándares externos)	25
2.5.3 Solución estándar de abamectina (Estándar Interno)	25
2.6 Almacenamiento de las soluciones	25
Unidad III. Procedimiento para la determinación de residuos de láctonas macrocíclicas en músculo de bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa HPLC.RP	26
3.1 Recepción de la muestra	26
3.2 Conjunto de muestras	26
3.3 Preparación de muestras	26
3.4 Procedimiento analítico (Extracción de analito(s) de la Muestra(s))	27
3.4.1 Extracción curva de calibración	27
3.4.2 Extracción muestra control y blancos	27

3.4.3 Evaporación de muestras, curva, muestra control y blanco matriz	29
3.4.4 Derivatización de muestras, curva, muestra control y blanco matriz	29
3.4.5 Inyección de muestras, curva, muestra control y blanco matriz	29
Unidad IV. Acondicionamiento del equipo cromatógrafo líquido	30
4.1 Pasos para acondicionar el equipo previo a la lectura de Ítems	30
4.1.1 Gestión del software online	30
4.1.2 Purga del sistema	32
4.1.3 Limpieza Rutinaria de la columna cromatográfica	33
4.1.4 Acondicionamiento del método avermectinas	34
Unidad V. Creación de una tabla de secuencia, previa a la lectura de la muestra	35
5.1 Creación de tabla de secuencia	35
5.2 Editar tabla de secuencia creada	37
5.3 Corrida de tabla de secuencia	39
Unidad VI. Integración Y Calibración de la curva para su cuantificación y de las muestras	40
6.1 Integración	40
6.2 Calibración	41
UNIDAD VII. Límites máximos permisibles de residuos antiparasitarios a determinar por HPLC.RP	43
GLOSARIO	44
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	53

DEDICATORIA

A Dios primeramente por darme la vida y fuerzas para seguir adelante durante el transcurso de mis años de estudio, conociendo los anhelos de mi corazón y con su misericordia ayudándome a cumplirlos; por abrirme paso hacia nuevos triunfos en la vida y guiarme por el buen camino.

A mi madre pues le debo todo; mujer de virtudes y gran corazón, me brindó su apoyo incondicional, consejos, amor, confianza y comprensión, siendo un pilar firme desde el inicio de mi formación educativa, por los valores que me dio convirtiéndome en una persona de bien; este logro es de ambas.

Celigen Z. Blandón

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiarme en el transcurso de mi vida, brindándome salud, sabiduría y entendimiento, sin él mi metas no serían posible, por no desampararme en momentos difíciles, porque ha colocado en mi camino personas de bien que me han apoyado y animado.

A mi madre, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida profesional y familiar, por celebrar conmigo aquellos logros alcanzados.

Aquellos familiares que fueron apoyo en mis años de estudio, por su cariño y por creer en mí.

A la Dra. Fredda Ramírez, gracias por su valiosa colaboración, por su atención incondicional y así poder conseguir esta meta trazada.

A la UNA, docentes y asesores académicos por su asumida responsabilidad y compromiso, compartiendo conocimiento y destrezas en la formación de profesionales.

A la empresa cárnica Novaterra por su amabilidad y disposición en la formación de futuros profesionales.

A todas aquellas excelentes personas que Dios ha hecho coincidir en mi camino que me han apoyado y animado, celebrando conmigo este éxito.

Celigen Z. Blandón

DEDICATORIA

Inicialmente a **Dios**, quien ha sido mi dirección y ayuda en todos los años de estudio, es quien me guardo y me dio salud física, mental y espiritual, mi ayuda diaria y el que impulso mis sueños y me dio la capacidad y las fuerzas de cada día, ya que él conoce mis anhelos y mis sueños mejor que yo.

A mi madre, **Maritza del Socorro Blandón Laguna**, por su apoyo abnegado, por sus consejos y palabras de ánimo que siempre estuvieron ahí, por sus oraciones, porque aun con limitaciones siempre lucho y mis sueños los hizo suyos, por ese amor tan especial y único que me ha dado.

A mi padre, **Rigoberto Videa Reyes** por sus consejos y apoyo económico, por su amor y palabras de ánimo, porque me demostró su confianza aun cuando muchos me quisieron hacer dudar, por enseñarme y forjarme con valores, responsabilidades y por ser mi guía espiritual.

William R. Videa Blandón.

AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero expresar mi agradecimiento, primera mente a Dios porque del dependo como persona, porque me ha dado las capacidades para poder llegar hasta este punto en mi vida, lo cual estoy seguro que no hubiera podido lograr sin su ayuda.

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, porque siempre en momentos de dificultades estuvieron conmigo, por sus palabras de aliento cuando me sentí desanimado o con ganas de rendirme, por sus consejos y por sus oraciones que siempre me acompañaron.

A mi esposa porque siempre estuvo ahí para ayudarme cuando lo necesite, por tomar responsabilidades y por sus tantos favores que me fueron de mucha ayuda para poder avanzar en mi carrera.

A mis amigos y compañeros de clase, amigos incondicionales con los cuales compartí gran parte de mi tiempo y vivimos muchas experiencias, porque me hicieron crecer como persona, porque me ayudaron de maneras increíble, por sus consejos, por los triunfos que logramos juntos y por ser mi segunda familia.

A la Dra. Fredda Ramírez, por su ayuda y su tutoría, por su comprensión, apoyo y por sus consejos. Por compartir sus experiencias.

Gracias a todos los maestros que dedicaron de su tiempo y de su vida en los salones de clases para poder enseñarnos y guiarnos hacia la victoria, por esa vocación a la hora de enseñarnos, por cada experiencia compartida y porque gracias a ellos hoy tengo la dicha de poder decir que soy un Médico Veterinario de la UNA.

Gracias a Dios y gracias a todos los mencionados y a los que pase por alto, pero me apoyaron mucho.

William R. Videa Blandón.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Representación de los elementos que integra un Cromatógrafo	5
Figura 2. Componentes del cromatógrafo.	8
Figura 3. Presentación química de analitos de interés y formación de sus derivados fluorescentes.	10
Figura 4. Molino Retsch	13
Figura 5. Balanza A&D	14
Figura 6. Centrifuga Megafuge	15
Figura 7. Dispensador BRAND	16
Figura 8. N-Evaporador Organomation Associates	17
Figura 9. Vortex VWR	18
Figura 10. Cromatógrafo Líquido Agilent 1260	19
Figura 11. Módulos del equipo	30
Figura 12. Último método seleccionado	31
Figura 13. Módulos encendidos y rellenar reservorios.	31
Figura 14. Reservorios agua (A) y metanol (B).	32
Figura 15. Módulo de Bomba cuaternaria y se ajusta el volumen.	32
Figura 16. Flujo ajustado para iniciar purga del sistema.	33
Figura 17. Limpieza de columna previa a la corrida	34
Figura 18. Creación tabla de secuencia.	35
Figura 19. Tabla creada con los datos contenidos para la corrida.	36
Figura 20. Editar tabla de secuencia.	37
Figura 21. Cambio del nombre de la muestra	37
Figura 22. Guardar cambios de tabla editada	38
Figura 23. Nombre de la corrida	38
Figura 24. Módulos activos.	39
Figura 25. Agregar datos de integración	40
Figura 26. Regresión lineal de los niveles de la curva	41
Figura 27. El orden y concentración de los niveles de curva de calibración	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Hardware del cromatógrafo.	8
Tabla 2. Software del cromatógrafo y la función de cada uno	9
Tabla 3. Materiales a usar en la técnica	20
Tabla 4. Cristalería a utilizar en la técnica	21
Tabla 5. Reactivos y soluciones usados en la técnica	22
Tabla 6. Preparación de Reactivos y soluciones	23
Tabla 7. Preparación de solución de stock	24
Tabla 8. Fortificación de curva de calibración	28
Tabla 9. Fortificación de muestras control y blanco	29
Tabla 10. Límites máximos de residuos antiparasitarios.	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. Recepcion de muestra de músculo bovino con su respectiva identificación, antes de su homogenización	54
Anexo 2. Pesaje de muestras y filtrado a través de las columnas de extracción que contiene alúmina, pasando el eluido a los tubos de ensayo	54
Anexo 3. Evaporación de la curva y muestras una vez extraídas	55
Anexo 4. Muestra evaporada y derivatizada contenida en un vial lista para posicionar en el equipo e iniciar lectura de la misma.	56
Anexo 5. Acuerdo ministerial MAGFOR publicado en Gaceta N.63 del año 2013; Referente a las regulaciones sanitarias con respecto a los residuos de antiparasitarios	57
Anexo 6. Representación cromatográfica de la lectura de una muestra, la cual contenía residuo de Doramectina	58
Anexo 7. Cromatograma de la lectura de muestra sin residuos de antiparasitarios, se observa E.I	59
Anexo 8. Parámetros o precauciones en la técnica determinación de Antiparasitarios	60
Anexo 9. Representación gráfica de los estándares de la curva de calibración	60

RESUMEN

Se explica de manera teórico – práctico la técnica para determinación de residuos de láctonas macrocíclicas en muestras de carne bovino, obtenida de las reses sacrificadas. El abuso o uso inadecuado de medicamentos en ganado, han provocado rechazo al querer introducirlos a EEUU. De esta manera se asegura que el ganado destinado a sacrificio no presente residuos de estos productos o bien que no sobre pase el límite máximo de residuos aceptables para cada analito de interés, garantizando las exportaciones y la salud del consumidor nacional e internacional. Para la obtención de información fidedigna se realizó una búsqueda de bibliografía relevante al tema tales como tesis, manuales, revistas en línea, blogs en línea, artículos científicos, entrevistas a personas calificadas en el tema y además la oportunidad de un entrenamiento en dicha técnica en el Laboratorio Novaterra en el área de Residuos y posteriormente experiencia laboral; con la información recopilada y siendo lo más ilustrativo posibles, se abarca este procedimiento en siete unidades. Las muestras son analizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con detección de fluorescencia para la cuantificación de residuos. La ONA es encargada de acreditar los laboratorio regidos por la Norma técnica nicaragüense 04 001 05 / ISO 17025, de esta manera se da por entendido que el laboratorio y el personal como tal cuenta con las condiciones idóneas para realizar dicho análisis; estimulando a dichos laboratorios a adoptar prácticas de pruebas y mediciones aceptadas internacionalmente, este enfoque uniforme permite establecer acuerdos entre países, basados en la aceptación de su sistema de acreditación, de esta manera los laboratorios acreditados alcanzan un reconocimiento internacional; permitiendo que los productos exportados sean aceptados más fácilmente en los mercados extranjeros, reduciendo costos para el exportador como para el importador, ya que se elimina la necesidad de que requieran pruebas en otro país.

Palabras claves: Manual, HPLC, Láctonas Macrocíclicas, Bovino.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería vacuna constituye una de las actividades económicas más relevante en Nicaragua por su participación en el producto interno bruto como en las exportaciones. La producción de carne y leche se realiza bajo sistemas de doble propósito; sin embargo se debe mejorar principalmente aspectos regulatorios y el suministro de una información adecuada que oriente al sector pecuario a mejorar sus niveles de competitividad y conozca su grado de desempeño. (Pérez et al., 2006)

En el año 2013 inspectores estadounidenses detectaron trazas de ivermectina en un embarque enviado a ese país; pudiendo causar el cierre de hasta tres meses al producto Nicaragüense causando daños económicos, quedando sólo en el compromiso de aplicar medidas para asegurarse que la carne enviada a ese país estaría libre de antiparásitarios. (Olivares, 2013)

Nicaragua recibió la advertencia estadounidense y se publicó el Acuerdo Ministerial 004-2013, en el que el titular del MAGFOR, Ariel Bucardo (titular de Ministerio Agropecuario y forestal 2013), Ordeno suspender el registro sanitario, la refrenda o renovación, fabricación, importación, comercialización y el uso de ivermectina, abamectina y doramectina en concentraciones mayores al 1%. Adicionalmente los mataderos deberían de instalar y habilitar laboratorios para efectuar sus controles internos, ya que el país tenía que asegurarse de no cometer el mismo error dos veces. (Olivares, 2013)

La prevención de residuos en el área de inocuidad de carnes es un factor fundamental en cualquier estrategia a desarrollar para asegurar la salud de los consumidores, junto con otros importantes componentes del sistema (monitoreo, vigilancia, control antes del sacrificio). Existen medidas efectivas en el campo para prevenir o reducir el peligro de residuos en carne a niveles aceptables, como pueden ser las buenas prácticas de manejo de productos veterinarios, las buenas prácticas agrícolas, el sentido común de esperar la excreción del antiparásitario del cuerpo del animal. (Rovira, 2010)

Todos los antiparásitarios dejan residuos en el animal tratado, aplicándose ya sea de manera externa o interna. Lo que varía en cada producto, es la cantidad de residuos, los órganos donde se depositan (músculo, grasa, hígado, piel, etc.) y cuánto tiempo tardan en desaparecer tras la aplicación del producto (Junquera, 2015).

Si el Límite Máximo de Residuos no se supera inmediatamente tras la administración del producto, la carne se puede consumir inmediatamente tras su administración. Por lo tanto, un tiempo de espera igual a cero no significa que el producto no deja ningún residuo, sino que tales residuos están por debajo del LMR autorizado (Junquera, 2015).

Como residuo se entiende todos aquellos principios activos y/o sus productos de degradación presentes en los tejidos o vísceras de origen animal, los cuales han sido originados por tratamientos previos de los animales con sustancias químicas (medicamentos veterinarios, aditivos alimentarios) o bien por la presencia de estos compuestos en el medio ambiente (plaguicidas, herbicidas, metales pesados) (Rovira, 2010).

Los residuos de medicamentos de origen veterinario, son consecuencia del empleo de medicamentos (antiparasitarios, antibacterianos) para la prevención y control de enfermedades en ganado. Es poco probable encontrar casos de intoxicación aguda en humanos debido a la ingestión de carne con residuos de drogas veterinarias, ya que dicho residuo, en caso de estar presente, generalmente se encuentra en bajas concentraciones (Rovira, 2010).

Si bien muchos factores contribuyen al problema de residuos de medicamentos de origen veterinario en carnes, como por ejemplo pobre registro de los tratamientos y/o fallas en la identificación de los animales tratados. Esto ocurre principalmente cuando no se respetan los períodos de espera previo al envío a faena de los animales, así como cuando la droga se utiliza de una manera no especificada en la etiqueta en donde el tiempo de espera se desconoce (en diferente especie animal, con dosis mayores, utilizando diferente ruta de administración, con mayor frecuencia del tratamiento) (Rovira, 2010).

Al igual que con el resto de los medicamentos veterinarios, es fundamental respetar el tiempo de espera en caso de enviar animales a frigorífico (tiempo en el cual la concentración del producto activo o metabolito en carne disminuyen por debajo del límite máximo de residuo) (Rovira, 2010).

El análisis cromatográfico responde a estas exigencias, como técnica de confirmación se utiliza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la cual brinda información química del analito; permitiendo separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla; por ende es una herramienta confiable.

El presente trabajo tiene como objetivo ser una herramienta práctica para profesionales y futuros médicos veterinarios, ingenieros en alimentos, ingenieros industriales y químicos brindando información sobre la técnica cromatográfica líquida y su aplicación en identificación de residuos de láctonas macrocíclicas en productos de origen animal garantizando la salud pública e inocuidad de los alimentos y por ende ayudando al desarrollo económico del país.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

- Elaborar un manual de la técnica HPLC para determinación de residuos de láctonas macrocíclicas en músculo, dirigida a estudiantes y profesionales de la carrera de Medicina Veterinaria, ingenieros en alimentos, ingenieros industriales y químicos que estén laborando en el ámbito pecuario.

Objetivos Específicos

- Explicar la metodología de la Preparación de estándares y soluciones a utilizar en el proceso de la determinación de residuos.
- Detallar el procedimiento para determinación de láctonas macrocíclicas en músculo bovino.

Unidad I. Generalidades

Se pondrá al tanto en qué consiste la cromatografía líquida en fase reversa así como su avance como método analítico, también se mencionara los equipos, materiales y reactivos utilizados para la técnica.

1.1 Cromatografía líquida (HPLC)

La cromatografía se ha convertido en un método analítico de primer orden para separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en muestras líquidas (Caro, 2017).

Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa (RPC) se utiliza un empaque hidrofóbico, usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar (Soto y Guadarrama, 2004).

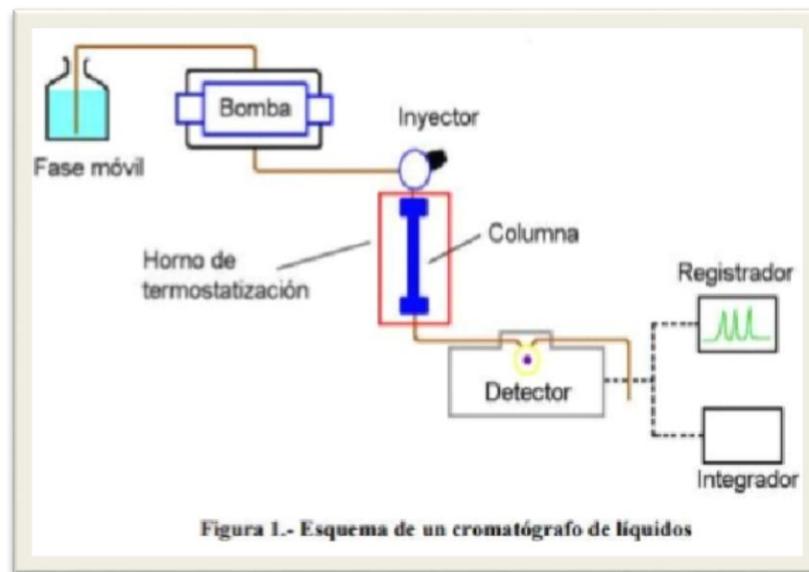
1.2 Desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

En los inicios de la cromatografía de líquidos se utilizaban columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. En este tipo de columnas realizó sus trabajos el botánico ruso Mikhail Tswett en 1906. Él empleó esta técnica para separar varios pigmentos vegetales, que aparecían como bandas coloreadas en la columna. El relleno de las columnas consistía en partículas de 150 a 200 micras de diámetro. Más tarde se encontró que se podía aumentar la eficiencia disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos. A finales de los años sesenta se logró desarrollar la tecnología adecuada para producir y utilizar partículas del orden de 3 a 10 micras. A esta nueva forma de cromatografía se le llamó cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography) (Soto y Guadarrama, 2004).

El sistema cromatográfico de fase reversa fue introducido por Howard y Marlin en 1950. Hasta ese momento, la cromatografía de líquidos se utilizaba básicamente para separar compuestos polares, siendo la fase estacionaria de un carácter altamente polar y la fase móvil poco polar. Estos científicos revirtieron la polaridad de las fases con el objetivo de separar ácidos grasos. Así fue cómo surgió la cromatografía de fase reversa; aquella en la que la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Entonces, a la primera modalidad de cromatografía se le empezó a conocer como cromatografía de fase normal (Soto y Guadarrama, 2004).

1.3 Instrumentación general del Cromatógrafo líquido en fase reversa

Figura 1. Representación de los elementos que integra un Cromatógrafo



Fuente: Ayora, 2006

1.3.1 Los elementos indispensables en cualquier Cromatógrafo HPLC

1) Sistema de suministro de fase móvil

Los equipos HPLC incluyen un sistema de bombeo de fase móvil de alta presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna. Existen diferentes tipos de bombas de alta presión con distintas características, las más frecuentes en fase reversa son bombas de pistón (Ayora, 2006).

La fase móvil puede trabajarse en dos modalidades:

a) **Isocrática:** la preparación de la fase móvil permanece constante durante la separación; utilizada en fase reversa, evitando cambios de presión (Ayora, 2006).

b) **En gradiente:** la composición se va modificando durante la separación. Para trabajar en esta modalidad el equipo debe contar con un sistema de programación de gradiente, que permita la mezcla de solventes en distintas porciones durante la separación (Ayora, 2006).

2) Sistema de inyección de muestra

La inyección de un volumen preciso de muestra a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo, los volúmenes son unos pocos microlitros. El sistema más utilizado son válvulas rotatorias de altas presión, la cual se pueden encontrar en dos posiciones (Ayora, 2006).

Primero en la posición de llenado en donde la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce a presión atmosférica con ayuda de una jeringa en un pequeño depósito tubular llamado bucle, este se puede escoger de diferente volumen siendo de 5 a 500 μ L. En la posición de inyección gracias a la rotación de la válvula, la muestra es arrastrada gracias al flujo de la fase móvil e introducida en la columna (Ayora, 2006).

3) Columnas cromatografía

Son tubos de acero que miden entre 3 y 30 cm de longitud. Su diámetro entre 2 y 5mm. Se emplean dos tipos de rellenos:

a) **Relleno pelicular:** bolitas de vidrio o polímeros no porosas de diámetro entre 30 a 40 μ m, sobre su superficie una capa delgada de partículas pequeñas (2-5 μ m) de gel de sílice, alúmina o un cambiador iónico que actúa como fase estacionaria. Si la fase estacionaria es líquida se forma una fina película de líquido sobre las esferas no porosas (Ayora, 2006).

b) **Partículas porosas:** micropartículas porosas de tamaño entre 3- 10 μ m de sílice, alúmina o un cambiador iónico, que actúan como fase estacionaria poseen una cadena larga C18 de hidrocarburos que ayudan a una mejor retención de los analitos. También puede recubrirse de películas orgánicas líquidas por adsorción (Ayora, 2006). Este relleno es utilizado en la determinación de residuos de antiparasitarios.

Para alargar la vida de columna, se utilizan pre-columnas que estas retienen las impurezas de las muestras que perjudicaría la columna; el relleno de la pre-columna es similar al de la columna pero con mayor tamaño de partículas (Ayora, 2006).

4) Detector

El detector se coloca en el extremo final de la columna, y la señal se transforma en una gráfica en función del tiempo denominada cromatograma, La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación de la altura o del área del pico de un analito con el de uno o más estándares. Ambos parámetros varían linealmente con la concentración. La cromatografía cualitativa se basa en la comparación de la posición de los picos (tiempos determinados de retención) con cromatogramas estándares (Ayora, 2006).

Un detector ideal en HPLC debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura el cromatograma (Ayora, 2006).

Algunos detectores más usados son:

- a) **Detectores espectrofotométricos:** miden la absorbancia a una o varias longitudes de onda en el ultravioleta o en el visible. La fase móvil no debe ser muy absorbente; este detector puede emplearse con gradiente si se utilizan disolventes no absorbentes (Ayora, 2006).

- b) **Detectores de fluorescencia:** miden la emisión fluorescente por parte de los analitos. Es un detector muy sensible, solo aplicable a compuestos fluorescente. Su campo de aplicación se amplía mediante reacciones de compuestos fluorescentes en el sistema cromatográfico mediante un reactor situado antes o después de la columna de separación (Ayora, 2006). Es utilizado en la detección de residuos antiparasitarios debido a su irradiación fluorescente.

- c) **Detectores electroquímicos:** se basan en métodos electroanalíticos; detectan compuestos electroactivos, es decir susceptibles a sufrir reacciones de oxidación o reducción (Ayora, 2006)

- d) **Detectores refractométricos:** cambios de índice de refracción de la fase móvil por la presencia de un soluto. Su funcionamiento se basa cuando un haz de luz pasa a través de una celda que está dividida en dos compartimientos; si no está eluyendo ningún soluto el índice de refracción de los líquidos contenidos es igual y el haz no se desplaza, sin embargo si algún componente es eluido el haz se desplaza, provocando una señal proporcional a la concentración del soluto. No se utiliza en gradiente y es más sensible a los cambios de temperatura (Ayora, 2006).

1.4 Cromatografía de partición

La cromatografía de partición en fase inversa es la más utilizada de todas las técnicas HPLC, pues las fases móviles polares permiten separar una amplia variedad de compuestos de interés bioquímico, farmacológico o químico. La fase estacionaria es líquida, es necesario ligarla o embeberla sobre partículas inertes (generalmente de sílice) para que permanezca fija en la columna. Hoy en día los grupos funcionales se fijan mediante enlace químico a las partículas de relleno, lo que permite a la fase estacionaria resistir las altas presiones aplicadas en HPLC (Alzate, 2014).

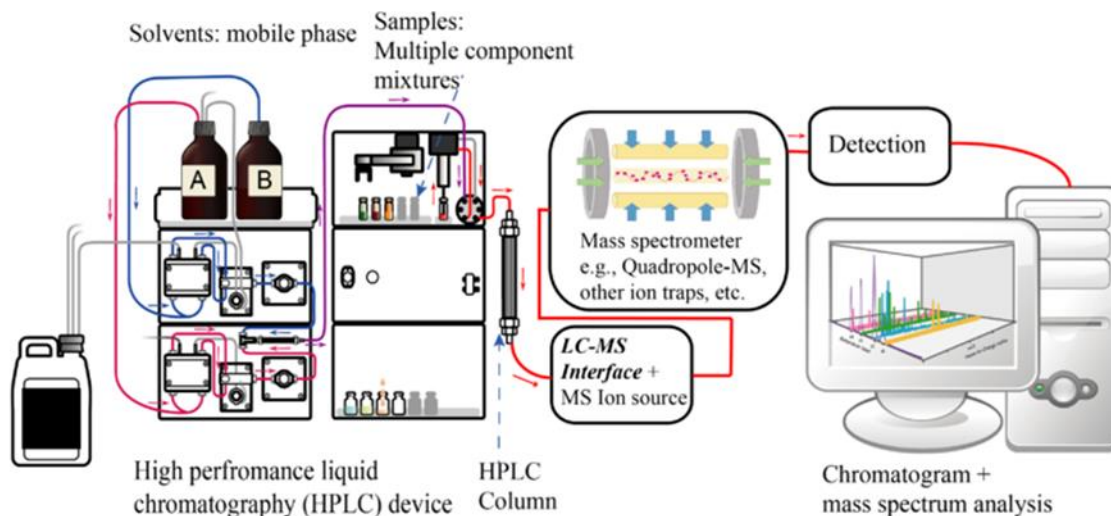
Suele hablarse de dos tipos de cromatografía de partición:

- a) Cromatografía en fase normal: emplea fase estacionaria polar y la móvil es poco polar (Ayora, 2006).

b) Cromatografía en fase inversa: la fase estacionaria es apolar y la móvil es polar, en ella los compuestos polares son eluidos más rápidos que los apolares. Actualmente es la más utilizada (Ayora, 2006).

1.5 Los componentes del cromatógrafo

Figura 2. Componentes del cromatógrafo.



Fuente: Ayora et al., 2006

1.5.1 Componentes del hardware del sistema cromatógrafo

Tabla 1. Hardware del cromatógrafo.

# de componentes	Nombre	Función
1	Bomba Cuaternaria	Proveer de solvente al sistema, consta de una cabina, un desgasificador al vacío y un gradiente multicanal
2	Inyector automático	Inyectar los ítems a la columna
3	Compartimiento de la columna	Calentar la columna analítica para lograr reproducibilidad en los tiempos de retención
4	Detector de longitud de onda variable	Detectar analito separado una vez que sale de la columna *No empleado en detección de antiparasitarios
5	Detector de fluorescencia	Detectar analito separado una vez que sale de la columna

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

1.5.2 Componentes del software del sistema cromatográfico

Tabla 2. Software del cromatógrafo y la función de cada uno

# de componente	Nombre	Función
1	LC1260 Online	Mediante el cual se acondiciona el equipo y se opera para obtener datos
2	LC1260 Offline	Dar tratamiento de los datos obtenidos
3	OpenLAB control panel	Control general del equipo

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

De acuerdo a instructivo gestión del cromatógrafo líquido (Orochena *et al.*, 2017) la columna analítica y pre columna no están declaradas como un módulo del equipo, pero son de importancia para el equipo por las siguientes razones:

Columna Analítica: Es el corazón de la cromatografía, es el lugar donde se da la separación de los componentes de la mezcla

Pre columna: Aumenta la vida y prestaciones de la columna analítica debido a que la protege de la contaminación proveniente de las muestras, solventes o de la matriz.

1.6 Descripción de los antiparasitarios a determinar en tejido bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase HPLC. RP

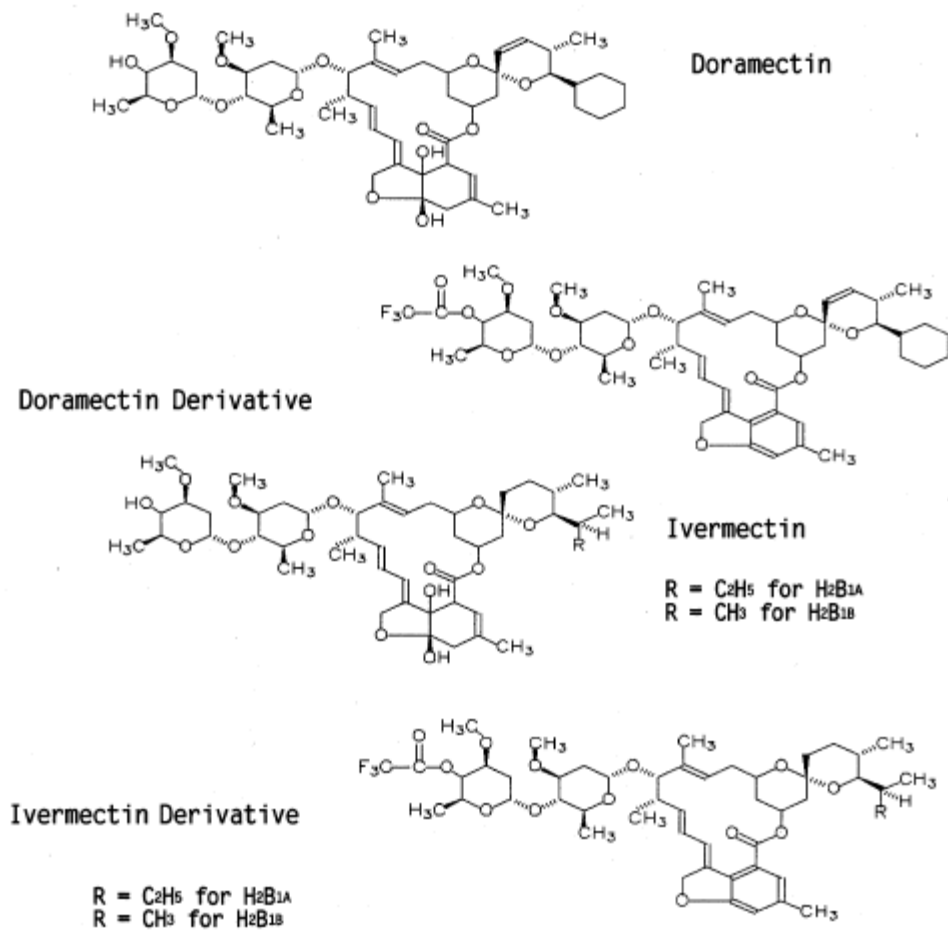
Los analitos son determinados por la formación de sus derivados fluorescentes por derivatización de N-metilimidazol y anhídrido trifluoroacético (Orochena, *et al.*, 2017)

Las avermectinas (Doramectina e Ivermectinas) y milbemicina (Moxidectina) son potentes antihelmínticos usados en animales destinados para la producción de alimentos, .con el fin de controlar infecciones parasitarias. Estos 3 compuestos son extraídos del tejido por el solvente acetonitrilo; las sustancias extrañas son removidas por la alúmina (CLG-AVR.04. 2011).

Las avermectinas son producto de la fermentación de *Streptomyces avermitilis* las cuales genera ocho avermectinas diferentes, las mezclas de estas genera la Abamectina, Doramectina, Ivermectina y Selamectina (Orochena. *et al.*, 2017).

La Moxidectina químicamente es un derivado de la milbemicinas, que se obtiene de la fermentación de *Streptomyces cyaneogriseus* (Orochena *et al.*, 2017).

Figura 3. Presentación química de analitos de interés y formación de sus derivados fluorescentes.



Fuente: CLG-AVR.04. (2011)

1.7 Equipos, materiales, cristalería y reactivos a utilizar en la técnica determinación de residuos de antiparasitarios en tejido de bovino en HPLC

1.7.1 Equipos.

- 1- Molino
- 2- Balanza
- 3- Centrifuga
- 4- Dispensador de solventes
- 5- N- evaporador
- 6- Vortex
- 7- Cromatógrafo agilent 1260

1.7.2 Materiales.

- 1- Columnas, espátulas y pinzas
- 2- Tubos cónicos de 50ml de polipropileno
- 3- Tape y marcador para rotular
- 4- Micropipetas

1.7.2.1 Consumibles

- 1- Algodón
- 2- Guantes de Nitrilo
- 3- Bolsas plásticas
- 4- Puntas de 200ul con filtro para dispensar derivatizantes
- 5- Puntas de 200ul sin filtro para dispensar estándar interno y externo
- 6- Puntas de 1000ul para adicionar acetonitrilo a columnas y a tubos

1.7.3 Cristalería.

- 1- Tubos de ensayo de 34 ml para contener eluido
- 2- Viales de 2 ml para contener eluido
- 3- Matraz contiene alúmina
- 4- Beaker para pesar
- 5- Balón 250 ml preparación de solución de trabajo
- 6- Balón 50 ml preparación solución de stock

1.7.4 Reactivos y soluciones.

- 1- Acetonitrilo grado HPLC
- 2- Agua grado HPLC
- 3- Metanol grado HPLC
- 4- Alúmina neutral, grado actividad 1
- 5- Anhídrido trifluoroacético pureza ≥ 99
- 6- N- metilimidazol pureza ≥ 99

1.7.4.1 Soluciones

- 1- Solución stock
- 2- Estándar interno
- 3- Estándar externo

Unidad II. Uso de los equipos, materiales y preparación de soluciones

En esta unidad se detallará cada uno de los equipos y su manipulación para el desarrollo de la técnica, la preparación de cada una de las soluciones, siendo lo más ilustrativo posible.

2.1 Equipos

2.1.1 Molino

Es empleado para la homogenización de las muestras cárnicas.

Figura 4. Molino Retsch



Fuente: Autoría propia (2017)

Básicamente el molino se programa para la molienda, se deberá ajustar al tiempo y velocidad, en este caso se utilizara 10 segundos a 2.000 rpm; todo ello observado en la pantalla de visualización del equipo. De no quedar la muestra con una textura fina se le puede dar una segunda molienda con el mismo o menor tiempo e igualmente reduciendo o maximizando su velocidad, asegurando la extracción adecuada del analito.

Para su utilización se debe

- ✓ Encender el interruptor On / Off
- ✓ Colocar el cilindro de cuchillas dentro del recipiente de molienda
- ✓ Se procede añadir los trozos de carne ya cortados y sin tejido conectivo
- ✓ Colocar la tapa y poner el recipiente en el aparato
- ✓ Presionar el botón Start dándole inicio a la homogenización del ítem

2.1.2 Balanza Electrónica De Precisión

Se utiliza para pesar la(s) muestra(s) una vez homogenizada.

Figura 5. Balanza A&D



Fuente: Autoría propia (2017)

Antes de iniciar a pesar debemos verificar que la balanza este nivelada, con esto aseguramos que obtendremos el peso exacto para llevar a cabo la técnica, el peso con el que se trabaja la muestra es de 2.5 ± 0.2 en unidad de gramo observado en la pantalla.

- ✓ Encendemos o apagamos presionando el botón On / Off
- ✓ Programamos la unidad de pesado con la que trabajaremos (gr)
- ✓ Se coloca un Beaker de pesaje con un tubo cónico de 50ml en el plato de la cámara de pesaje y se presiona el botón RE-ZERO para que la pantalla vuelva a quedar en cero
- ✓ Al tubo cónico poco a poco con una espátula se le agrega porciones de la muestra homogenizada hasta llegar al peso indicado
- ✓ Se retira el tubo y se repite el procedimiento las veces necesarias según la cantidad de muestras

2.1.3 Centrifuga

Separa por fuerza rotatoria los componentes de una mezcla de diferentes densidades.

Figura 6. Centrifuga Megafuge



Fuente: Autoría Propia (2017)

Antes de iniciar cualquier corrida se debe asegurar que la centrifuga este limpia, no posea ningún objeto que afecte el uso de la misma y sobre todo que este con una alimentación de energía, no se debe abrir la tapa en ninguna corrida; y para la técnica utilizamos 1500 rpm en 3 minutos.

- ✓ Se presiona el interruptor On / Off que se encuentra en la parte de atrás del equipo
- ✓ Se presiona el botón OPEN para abrir la puerta de la centrifuga
- ✓ Se introduce los tubos cónico la cantidad que quepan en el aparato
- ✓ Se cierra la tapa, y se presiona Start
- ✓ Abrimos la puerta hasta que la pantalla muestre RUN COMPLETED
- ✓ Se retiran las muestras centrifugadas, se repite el proceso con muestras faltantes

2.1.4 Dispensador de solvente

Utilizado para almacenar y dosificar disolventes o reactivos agresivos, de una manera rápida y segura.

Figura 7. Dispensador BRAND



Fuente: Autoria propia (2017)

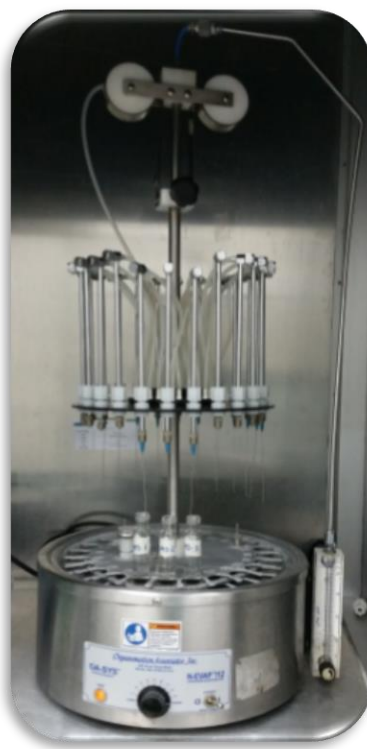
Este tipo de dispensadores están hechos para adaptarlos al envase de los reactivos, de esta manera su manipulación es segura, además de evitar que se contaminen o derramen accidentalmente.

- ✓ Se ajusta el volumen deseado, girando la rosca en la parte de arriba, observando el indicador digital
- ✓ Se levanta el embolo flotante el cual contendrá el volumen exacto de líquido
- ✓ Se baja el embolo y por ende saldrá el solvente por la válvula de expulsión
- ✓ Se subirá y bajara el embolo, ajustando o no el volumen a utilizar y las veces necesarias

2.1.5 N- Evaporador

Diseñado para evaporación o concentración de las muestras analíticas o biológicas, bajo condiciones controladas.

Figura 8. N-Evaporador Organomation Associates



Fuente: Autoría propia (2017)

Para que la(s) muestra(s) se evaporen o se concentre el analito a estudiar, se debe condicionar a un flujo de nitrógeno continuo a la misma vez que se encuentra en baño maría. La Temperatura del baño maría debe ser $65^{\circ}\text{C} \pm 5$, encendiendo el aparato una hora antes de su uso y el flujo de nitrógeno regulado en el medidor de corriente del gas para todas las muestras a la vez.

- ✓ Se mueve la palanca para la opción On / Off
- ✓ Asegurarse que el agua destilada caliente esté 0.5" del borde del baño maría
- ✓ Ajustar termostato a la temperatura deseada
- ✓ Rellenar con agua destilada caliente cada vez que sea necesario
- ✓ Colocar los tubos en el porta muestra con su respectiva aguja que filtra el gas hacia el interior del tubo
- ✓ Abrir la válvula para cada muestra y la válvula del medidor de corriente

- ✓ Colocar la aguja a una distancia de 0.6mm sobre la superficie de la solución, evitando salpicaduras
- ✓ Continuar la evaporación hasta que la muestra en el tubo esté seca
- ✓ Cerrar la válvula de medidor de corriente y de cada aguja
- ✓ Retirar los tubos y agujas
- ✓ Limpiar las agujas
- ✓ Apagar la fuente del nitrógeno y del baño

2.1.6 Vortex

Dispositivo que se utiliza para mezclar líquidos, debido a la agitación del tubo

Figura 9. Vortex VWR



Fuente: Autoría propia (2017)

En la parte delantera del aparato, contiene un botón para encender o apagarlo, el cabezal o goma empieza hacer movimientos circular rápidamente, transmitiéndose el movimiento al interior del tubo produciéndose un vértice. Contiene un regulador de la velocidad, en este caso utilizar la velocidad máxima.

- ✓ Posicionar el Vortex en una superficie segura y encenderlo para que inicie su funcionamiento
- ✓ Presionar firmemente el tubo verticalmente sobre el cabezal de agitación
- ✓ Mantener el tubo durante treinta segundos y retirar
- ✓ Apagar el Vortex y limpiarlo al terminar su uso con un paño limpio, impregnado de alcohol

2.1.7 Cromatógrafo líquido HPLC

Es utilizado en técnicas analíticas, para separar los componentes de una mezcla

Figura 10. Cromatógrafo Líquido Agilent 1260



Fuente: Autoría propia (2017)

Antes de empezar el análisis de las muestras, se debe hacer una corrida con la “curva de calibración” esta no es más que una corrida de rutina para integración y calibración del equipo, por ende obtener resultados de las muestras; se deberá filtrar al vacío el volumen total de solventes (agua y metanol) a utilizar en el día, esté compondrá la fase móvil del procedimiento analítico.

- ✓ Encender cada componente del sistema Hardware y del software del cromatógrafo
- ✓ Se debe filtrar la fase móvil y purgar el interior del equipo con la misma, antes de iniciar el procedimiento
- ✓ Posicionar la curva de calibración y las muestras e iniciar la corrida de las mismas
- ✓ Verificar los resultados de la curva de calibración
- ✓ Guardar los resultados en el software del equipo
- ✓ Verificar los resultados de las muestras para saber si se han pasado o no de los límites permisibles en caso de tener residuos y que los picos estén bien formados
- ✓ Guardar los resultados en el software del equipo
- ✓ Una vez terminada la faena, volver a purgar con la fase móvil y apagar el aparato

2.2 Materiales

Tabla 3. Materiales a usar en la técnica

Reutilizables	Función	Consumibles	Función
Columnas Desechables	Se utilizan para filtrar el eluido de las muestras y matriz de la curva una vez centrifugadas	Algodón	Se le agrega a las columnas desechables para retener alúmina ayudando a filtrar, evitando que suciedad o trozos de carne pasen a los tubos de ensayo cuando esté pasando el eluido
Espátula	Para tomar porciones de carne molida para su pesaje	Bolsas Plásticas	Se deposita el musculo para almacenar en el congelador con su respectiva identificación, en caso de repetir análisis
Tubos cónicos de 50ml de polipropileno	Donde se añade musculo molido con peso deseado para agregarle solventes y soluciones para luego ser vorteadado y centrifugado	Puntas plásticas desechables	Utilizadas para adicionar derivatizantes y soluciones a las muestras y estándares
Tape y marcador	Utilizados en tubos cónicos y de ensayo para identificar cada muestra	Jeringas descartables de 3ml y filtros de jeringas de 0.22µm	jeringas con el filtro para recolectar el eluido de muestra y estándares derivatizados del tubo de ensayo para pasarlo a los viales
Alúmina	Se agrega a la columna que contiene algodón para filtrar eluido de muestras y estándares	Guantes de nitrilo	Se usa durante toda la técnica, de esta manera tenemos un aislante de las salpicaduras de reactivos/soluciones
Micropipetas	Empleado para succionar y transferir pequeños volúmenes de reactivos y soluciones		

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

2.3 Cristalería

Tabla 4. Cristalería a utilizar en la técnica

Instrumental	Función
Tubo de ensayo 34 ml	Se recolecta el eluido de muestras y estándares
Viales de 2 ml	Contiene la muestra/estándares derivatizada para ser analizada en el Cromatógrafo líquido
Matraz	Donde se almacena alúmina para ser utilizada en la filtración
Beaker 50ml	Útil para colocar los tubos cónicos para el pesaje de muestras y matriz (musculo molido)
Balón 250 ml	Se prepara la solución de trabajo (estándar externo/interno)
Balón 50ml	Se prepara la solución de stock (Solución madre)

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

2.4 Reactivos y soluciones

Tabla 5. Reactivos y soluciones usados en la técnica

Solventes y/o soluciones	Función
Acetonitrilo HPLC	Disolvente utilizado para extracción de residuos de antiparasitarios en análisis de muestras y curva
Agua HPLC	Disolvente ayuda a la separación de los compuestos, usado como fase móvil
Metanol HPLC	Solvente que se utiliza como fase móvil
Alúmina neutral, grado actividad 1	Se desactiva la alúmina al 12%, y se utiliza para la filtración del eluido centrifugado
Estándar Interno	Estándar de abamectina de 500PPB , utilizado para adicionarse a las muestras y curva para su análisis
Estándar Externo	Estándar de Doramectina, Ivermectina y Moxidectina de 500PPB que se le adiciona a la curva de calibración
N- metilimidazol pureza ≥ 99	Derivatizante, modifica la estructura química de los compuestos permitiendo su detección, obteniendo un producto fluorescente
Anhídrido trifluoroacetico pureza ≥ 99	Derivatizante, modifica la estructura química de los compuestos permitiendo su detección, obteniendo un producto fluorescente

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

2.5 preparación de reactivos y soluciones

Tabla 6.Preparación de Reactivos y soluciones

Reactivos / Solución	Preparación	Observación
<p>Alúmina neutral al 12%</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Secarla por 24 horas antes de su uso ($135 \pm 5^\circ \text{C}$). • Llevarla al desecador por 2 horas. • Preparar la alúmina desactivada al 12% de la siguiente manera • Para Preparar 200gr: <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 176gr de alúmina seca 2. Adicionar 24ml de agua destilada/desionizada 3. Mezcle manualmente hasta que desaparezcan grumos visibles 	<p>Almacenar alúmina desactivada en un recipiente hermético a temperatura ambiente y usar una semana después</p>
<p>Anhídrido trifluoroacético/ Acetonitrilo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 1:1 de anhídrido trifluoroacético a acetonitrilo • Para preparar 10 ml: <ol style="list-style-type: none"> 1. Se toman 5 ml de trifluoroacético en tubo de ensayo 2. Se le adiciona 5 ml de acetonitrilo 3. Se mezcla en el Vortex 	<p>Para evitar que se evapore se almacena la solución en desecador o refrigeración alargando su vida útil</p>
<p>N-Metilimidazole/ Acetonitrilo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Agregar 1:1 de N-metilimidazole a acetonitrilo • Para preparar 10ml: <ol style="list-style-type: none"> 1. 5 ml de N-metilimidazole en un tubo de ensayo 2. Adicionarle 5 ml de acetonitrilo 3. Se mezcla en Vortex 	<p>Para evitar que se evapore se almacena la solución en desecador o refrigeración alargando su vida útil</p>

Fuente: CLG-AVR.04. (2011)

2.5 Preparación de estándares

Estándares utilizar en: “Determinación de residuos de lácetonas macrocíclicas en musculo bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa HPLC. RP”

2.5.1 Solución de stock

Solución stock o solución madre, de esta parte las disoluciones para preparar el estándar interno y externo; equivalente a $125 \pm 1\mu\text{g/ml}$ en 100 ml aproximadamente de acetonitrilo.

Tabla 7.Preparación de solución de stock

Nombre del estándar	Forma de preparación	Observación
Estándar de Abamectina	<ol style="list-style-type: none">1- Pesar 0.0129 gramos de abamectina2- Adicionarlos a un beaker de 100ml que contenga 30ml aproximadamente de acetonitrilo grado HPLC3- Agitar el beaker para disolver el estándar4- Aforar con acetonitrilo	Equivalente a 125,000PPB
Estándar de Doramectina	<ol style="list-style-type: none">1- Pesar 0.0132 gramos de Doramectina2- Adicionarlos a un beaker de 100ml que contenga 30ml aproximadamente de acetonitrilo grado HPLC3- Agitar el beaker para disolver el estándar4- Aforar con acetonitrilo	Equivalente a 125,000PPB
Estándar de Ivermectina	<ol style="list-style-type: none">1- Pesar 0.0129 gramos de Ivermectina2- Adicionarlos a un beaker de 100ml que contenga 30ml aproximadamente de acetonitrilo grado HPLC3- Agitar el beaker para disolver el estándar4- Aforar con acetonitrilo	Equivalente a 125,000PPB
Estándar de Moxidectina	<ol style="list-style-type: none">1- Pesar 0.0142 gramos de Moxidectina2- Adicionarlos a un beaker de 100ml que contenga 30ml aproximadamente de acetonitrilo grado HPLC3- Agitar el beaker para disolver el estándar4- Aforar con acetonitrilo	Equivalente a 125,000PPB

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

2.5.2 Solución de trabajo (Estándares externos)

Estándar de Doramectina, Ivermectina y Moxidectina al 0.5µg/ml, equivalente a 500PPB, se hace una dilución de 1:250 a partir de la solución (125 ±1 µg/ml)

Agregar 1ml de cada estándar de la solución de stock a un frasco volumétrico de 250ml y luego aforar con acetonitrilo HPLC, mezclar.

2.5.3 Solución estándar de abamectina (Estándar Interno)

Estándar de abamectina al 0.5µg/ml, equivalente a 500PPB, se hace una dilución de 1:250 a partir de la solución al (125 ±1 µg/ml)

Agregar 1ml del estándar de abamectina de la solución de stock a un frasco volumétrico de 250ml y luego aforar con acetonitrilo HPLC, mezclar.

2.6 Almacenamiento de las soluciones:

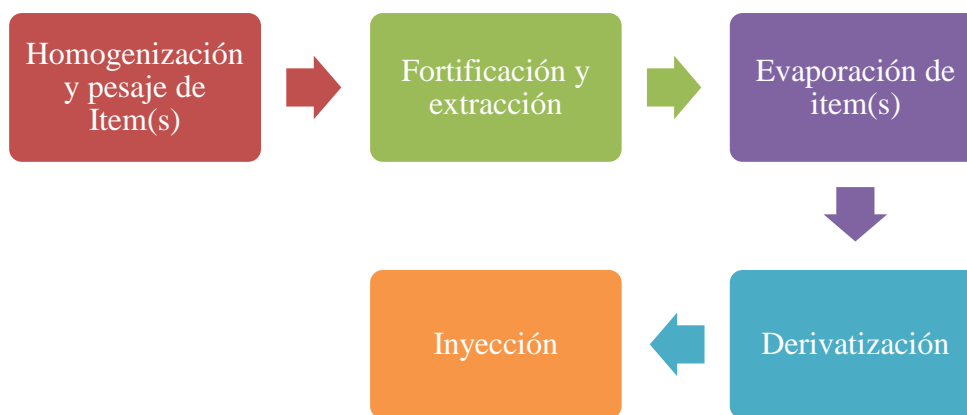
Se debe almacenar la solución de stock a una Temperatura de $\leq -10^{\circ} \text{C}$

Almacenar solución de trabajo y de abamectina a temperatura ambiente o refrigerada a $\leq -10^{\circ} \text{C}$

En esas condiciones la vida útil de la solución de stock es de 1 año y de solución de fortificación 90 días.

Unidad III. Procedimiento para la determinación de residuos de lácetonas macrocíclicas en músculo de bovino por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa HPLC.RP

Se explicara cada paso del procedimiento analítico de la(s) muestra(s), curva de calibración y muestras control.



3.1 Recepción de la muestra:

- 1- Muestra: Músculo
- 2- Especie: Bovina
- 3- Porción de la muestra: mínimo 150 gramos
- 4- Almacenamiento de muestra: congelada, vida útil de 6 meses
- 5- Analista: encargado de recibir muestras

3.2 Conjunto de muestras:

- 1- Muestras cárnicas
- 2- Curva de estándares externos (0, 7.5, 15, 30 y 60 PPB)
- 3- Muestras control (Recobro y Check)
- 4- Blanco matriz
- 5- Blanco Reactivo

3.3 Preparación de muestras:

- 1- Recepcionar la muestra, cortarla en trozos eliminándole el tejido conectivo o grasa antes de homogenizar.
- 2- Colocar en los tubos cónicos y de ensayo la ID (identificación) correspondiente
- 3- Verificar la temperatura del N- evaporador
- 4- Verificar la presión de cromatógrafo
- 5- Usar medidas de seguridad al manipular reactivos.

3.4 Procedimiento analítico (Extracción de analito(s) de la Muestra(s))

1. Pesar 2.5 ± 0.2 gramos del tejido molido en un tubo cónico de 50ml de polipropileno para centrifugar
2. Fortificar 150 μ l (30 PPB) del estándar interno abamectina (500 PPB)
3. Adicionar 8 ml de acetonitrilo HPLC
4. Mezclar en el Vortex durante 30 segundos
5. Centrifugar durante 3 minutos a 1500rpm
6. Verter el eluyente de acetonitrilo a través de la columna desechable que contiene 2.0 ± 0.2 g alúmina desactivada y colecte el eluato en un tubo de ensayo
7. Repetir la extracción de la misma muestra, adicionando los 8 ml de acetonitrilo, centrifugar y decante combinando eluidos
8. Lavar la columna con 2 ml de acetonitrilo arrastrando el excedente
9. Recolectar el eluido

3.4.1 Extracción curva de calibración

- 1- Pesar 2.5 ± 0.2 gramos de tejido (Blanco matriz) dentro de un tubo cónico de 50 ml para centrifuga
- 2- Fortificar 150 μ l de estándar interno para cada nivel de la curva (Abamectina) 500 PPB
- 3- Fortificar con solución de trabajo el volumen según Estándar (Moxidectina, Doramectina e ivermectina)
- 4- Adicionar 8ml de acetonitrilo
- 5- Mezclar en Vortex 30 segundos
- 6- Centrifugar durante 3 minutos a 1500rpm
- 7- verter el eluyente de acetonitrilo a través de la columna desechable con 2.0 ± 0.2 g de alúmina desactivada y colecte el eluato en un tubo de ensayo
- 8- Repetir la extracción de la misma muestra, adicionando los 8 ml de acetonitrilo, centrifugar y decante combinando eluidos
- 9- Lavar la columna con 2 ml de acetonitrilo arrastrando el excedente
- 10- Recolectar el eluido.

3.4.2 Extracción muestra control y blancos

- 1- Pesar 2.5 ± 0.2 gramos de tejido (Blanco matriz) dentro de tubo cónico de 50 ml para centrifuga
- 2- Fortificar 150 μ l del estándar interno (abamectina) 500 PPB; excepto al ítem blanco matriz
- 3- Fortificar con solución de trabajo; excepto al blanco matriz
- 4- Adicionar 8 ml de acetonitrilo
- 5- Mezclar en el Vortex 30 segundos
- 6- Centrifugar 3 minutos a 1500rpm

- 7- Verter el eluyente de acetonitrilo a través de la columna desechable con 2.0 ± 0.2 g de alúmina desactivada y colecte el eluato en un tubo de ensayo
- 8- Repetir la extracción de la misma muestra, adicionando 8 ml de acetonitrilo, centrifugue y decante combinando eluidos
- 9- Lavar la columna con 2 ml de acetonitrilo arrastrando el excedente
- 10- Recolectar el eluido

Nota: Es importante mencionar que durante la segunda extracción, no debe dejar que la alúmina se seque, agregándole pequeños volúmenes de acetonitrilo de ser necesario (0.5ml)

Tabla 8. Fortificación de curva de calibración

Curva de calibración			
Nivel	Concentración PPB	Estándar externo μL	Estándar interno μL
1	0	0	150
2	7.5	37.5	150
3	15	75	150
4	30	150	150
5	60	300	150

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

Tabla 9. Fortificación de muestras control y blanco

Muestra control y Blanco		
Muestra control y Blanco matriz	Estándar externo μL	Estándar interno μL
Check (Ck)	-----	150
Recobro	75	150
Blanco matriz	0	0

Fuente: Empresa Cárnica Novaterra S.A (2017)

E.E de Check fortificado por otro analista en volumen de 0 a 300 μL .

3.4.3 Evaporación de muestras, curva, muestra control y blanco matriz

- 1- El tubo de ensayo que contiene el eluato, transferirlo al N- Evaporador
- 2- Evaporar el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno seco mientras se mantiene en baño maría a $65 \pm 5^\circ \text{C}$, hasta observar que este seca la muestra.

3.4.4 Derivatización de muestras, curva, muestra control y blanco matriz

- 1- Reconstituir la muestra con 2 ml de acetonitrilo y vortear durante 30 segundos
- 2- Adicionar al eluato $200 \pm 10 \mu\text{L}$ del reactivo N- metilimidazole: Acetonitrilo (1:1) vortear por 10 segundos
- 3- Adicionar $200 \pm 10 \mu\text{L}$ del reactivo Anhídrido trifluoroacético (1:1) y vortear por 10 segundos
- 4- Derivatizar bajo campana de aire, con el respectivo equipo de protección
- 5- Dejar reposar las muestras por 15 minutos en obscuridad antes de análisis HPLC

3.4.5 Inyección de muestras, curva, muestra control y blanco matriz

Después de derivatizada las muestras se recolecta empleando jeringa y filtro de 0.20 a 0.22 μm pasando a viales, para así dar inicio a la lectura en el HPLC.

Unidad IV. Acondicionamiento del equipo cromatógrafo líquido

Se hará mención a cada pauta a seguir para que el equipo trabaje en las condiciones óptimas previo a la inyección de las muestras y curva de calibración.

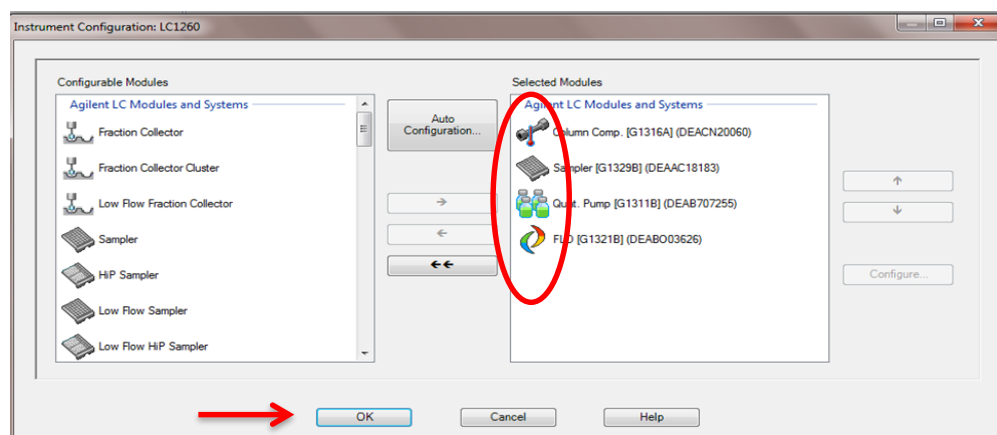
4.1 Pasos para acondicionar el equipo previo a la lectura de Ítems

- 1- Filtrar al vacío la fase móvil, para eliminar partículas en suspensión de los solventes.
- 2- Rellenar los reservorios de la fase móvil en los siguientes volúmenes:
 - Aproximadamente 900ml de metanol
 - Aproximadamente 300ml de agua
- 3- Encender los módulos de la siguiente manera:
 - Bomba Cuaternaria.
 - Inyector automático.
 - Compartimiento de la columna.
 - Detector de longitud de onda variable.
 - Detector de fluorescencia.

4.1.1 Gestión del software online

- 1- Ir a la aplicación con nombre “LC 1260 Online” ubicada en el escritorio y automáticamente se abrirá una pantalla
- 2- Ingresar los datos y clave correspondiente del analista autorizado
- 3- Luego aparece una pantalla que indica los módulos configurados para el equipo, darle click en *ok*, para que se configure

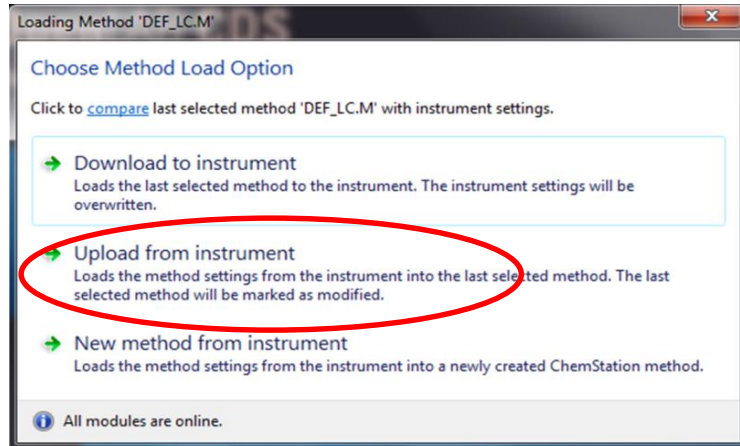
Figura 11. Módulos del equipo



Fuente: Autoría propia (2017).

- 4- Aparecerá una pantalla con 3 opciones para cargar el método. Dar click en *Upload from instrument*

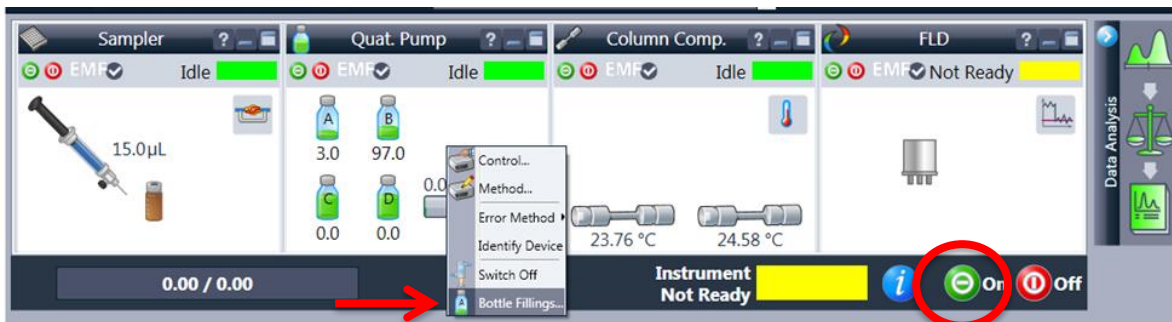
Figura 12. Último método seleccionado



Fuente: Autoría Propia (2017).

- 5- A continuación se muestra la pantalla de inicio de la aplicación
- 6- Proceder a encender los módulos pulsando sobre el botón *On*
- 7- Posicionarse en el módulo de la bomba y dar click derecho, apareciendo el menú de opciones, para actualizar el nivel de relleno de los reservorios dar click en *Bottle fillings*

Figura 13. Módulos encendidos y rellenar reservorios.



Fuente: Autoría propia (2017).

- 8- Aparecerá una pantalla nueva, actualizar la fase móvil modificando el volumen previamente filtrado y dar click en *Ok*
- 9- Los iconos de relleno de la botella aumentara, indicando que se actualizo el volumen de la misma

Figura 14. Reservorios agua (A) y metanol (B).

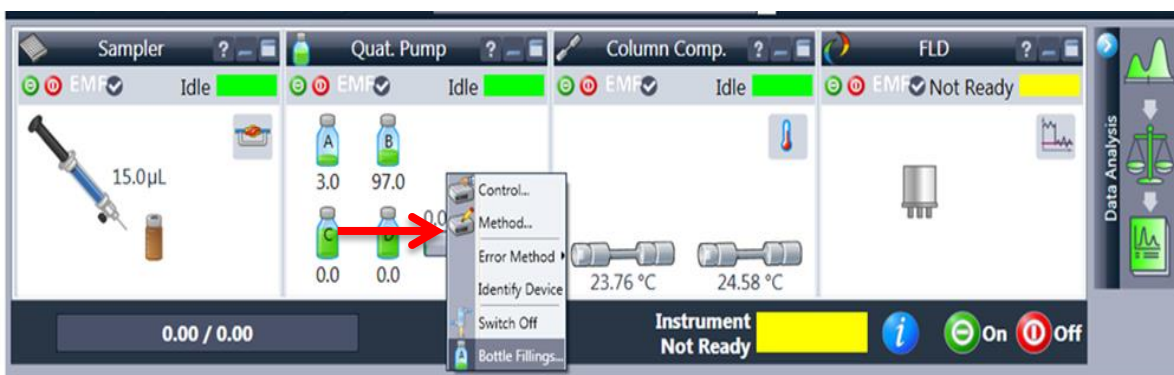


Fuente: Autoría Propia (2017)

4.1.2 Purga del sistema

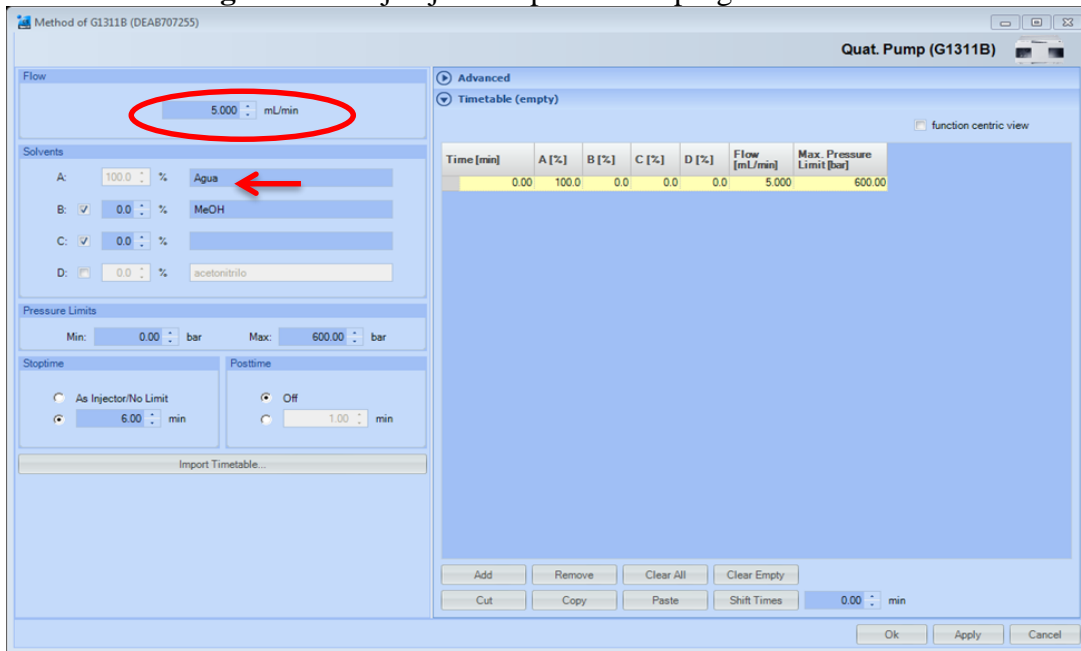
- 1- Abrir la válvula de purga del módulo Bomba cuaternaria
- 2- Posicionarse en el módulo bomba y dar click derecho
- 3- Hacer click en *Method*
- 4- Aparecerá una pantalla de dicho modulo y ajustar de la siguiente manera:
 - Flujo 5ml/min
 - Posición de fase móvil: 100% Agua
 - Dar click en *ok* y dejar purgar 10 minutos
 - Pasado los 10 minutos ajustar la fase móvil 100% Metanol
 - Dar click en *ok* y dejar purgar 10 minutos

Figura 15. Módulo de Bomba cuaternaria y se ajusta el volumen.



Fuente: Autoría propia (2017).

Figura 16. Flujo ajustado para iniciar purga del sistema.



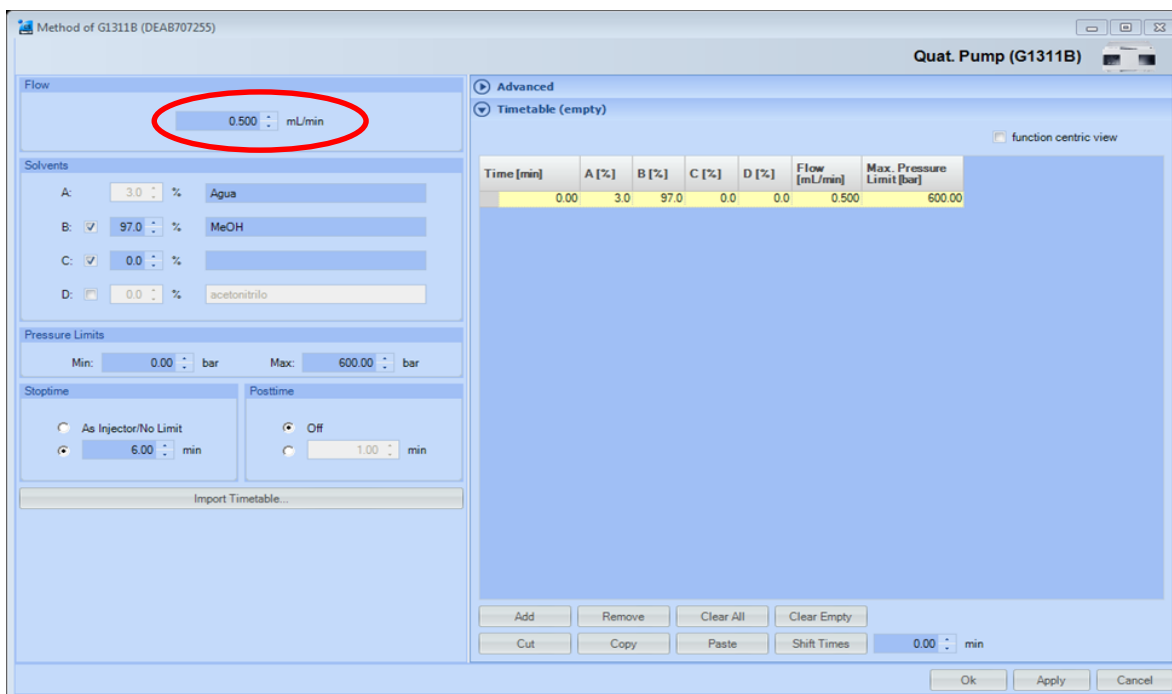
Fuente: Autoría propia (2017).

4.1.3 Limpieza Rutinaria de la columna cromatográfica

Pasado los 10 minutos de cada reservorio, se procede a lavado de la columna. De la siguiente manera:

- Flujo: 0.5ml/min
- Composición de fase móvil: 97/3% metanol/Agua
- Cerrar válvula
- Dejar el lavado por 10 minutos

Figura 17. Limpieza de columna previa a la corrida



Fuente: Autoría propia (2017).

4.1.4 Acondicionamiento del método avermectinas

Finalizado el lavado de la columna se ajusta de nuevo la bomba en la siguiente manera:

- Flujo: 1.8ml/min
- Composición de la fase móvil: 97% metanol y 3% agua
- Temperatura de columna: 30° C
- Volumen de inyección: 50 µL según las condiciones del detector/ integrador
- Tiempo de ejecución: 15 minutos
- En esta condiciones se debe dejar el equipo por lo menos 30 minutos antes de iniciar la corrida con los ítems
- Hasta entonces encender la lámpara del módulo detector, la longitud de onda de excitación 365 ± 20 nm, longitud de onda de emisión 465 ± 20 nm.

Asegurar que la presión se encuentre entre 80- 110 Bar y que sea estable; para evitar que varíen los tiempos de retención de la muestra con respecto a los estándares, que conllevaría a una no cuantificación de la (s) muestra (s) y curva de calibración.

Si la presión es alta, deberá hacerse una limpieza exhaustiva de la columna y capilares del equipo.

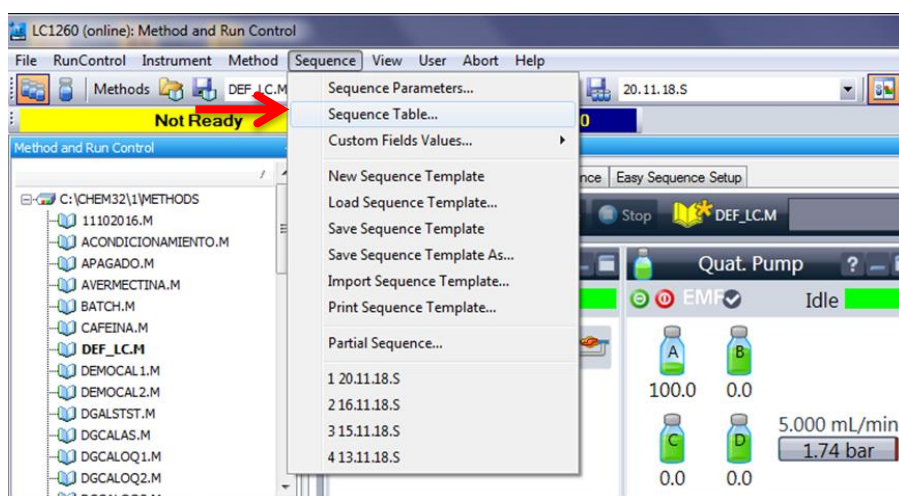
Unidad V. Creación de una tabla de secuencia, previa a la lectura de la muestra

Se creara o se editara una tabla de secuencia en la cual se especifica los diferentes ítems que se desea leer, esta tabla se deberá crear o editar antes de cada corrida.

5.1 Creación de tabla de secuencia

- 1- En el menú principal dar click en **sequence** y después en **new sequence template**

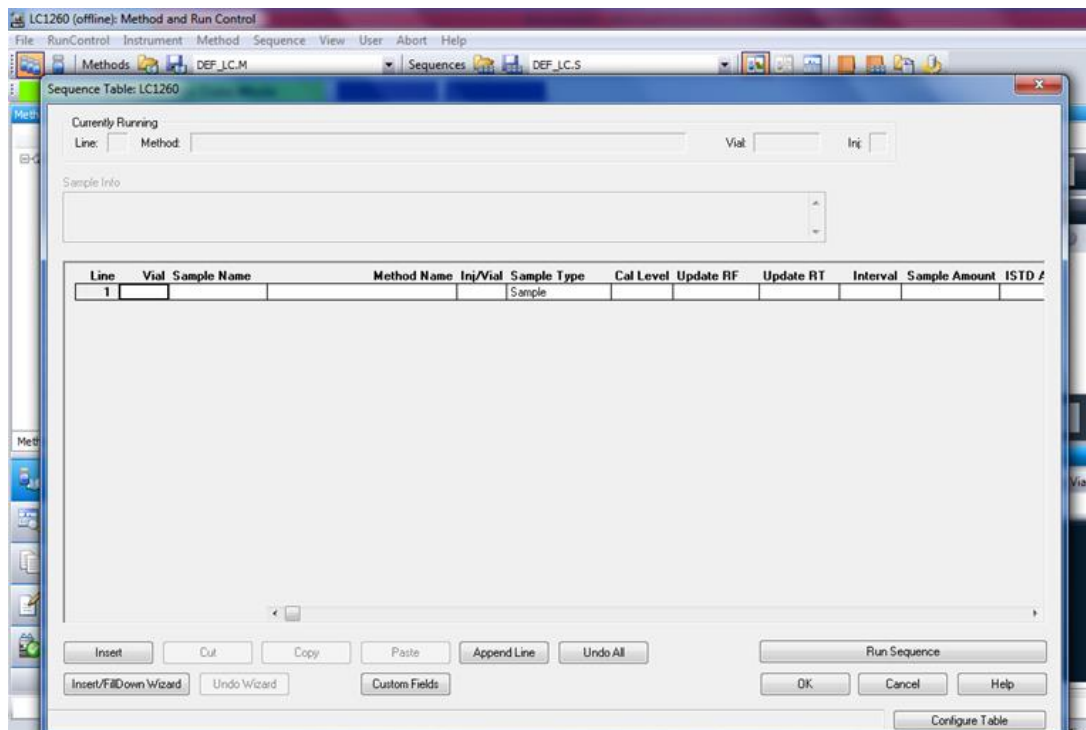
Figura 18. Creación tabla de secuencia.



Fuente: Autoría propia (2017).

- 2- Aparecerá una pantalla donde se agregará líneas y editara campos que contendrán lo siguiente:
 - Vial
 - Sample name
 - Method name
 - Inj/ vial
 - Simple type
 - Cal level
 - Update RF y update RT (se genera automáticamente)
 - ISTD Amount
 - Multiplier
 - Dilution
 - Inj volumen.
- 3- Y luego se da click en OK

Figura 19. Tabla creada con los datos contenidos para la corrida.



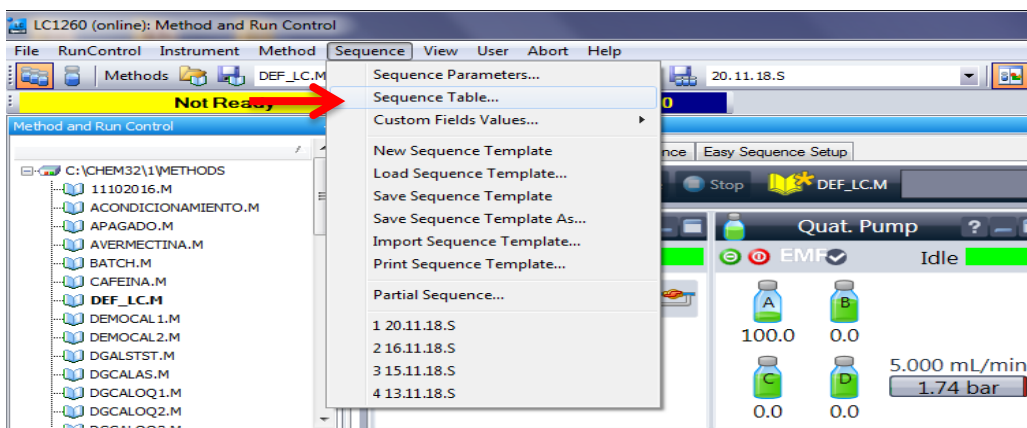
Fuente: Autoría propia (2017).

- 4- Se procede a guardar la tabla:
 - Dar click en **sequence** y después en **save sequence table as**
 - Aparecerá una pantalla donde se guardará el nombre de la corrida (fecha de lectura)
 - Dar click en OK
- 5- Cada corrida se almacenará en una carpeta por mes, se debe verificar que se guardó en la carpeta, de la siguiente manera:
 - Dar click en **sequence / sequence parameters**
 - Verificar que se almacene en la carpeta correcta
 - Dar click en ok.

5.2 Editar tabla de secuencia creada

- 1- Dar click en **sequence / sequence table**

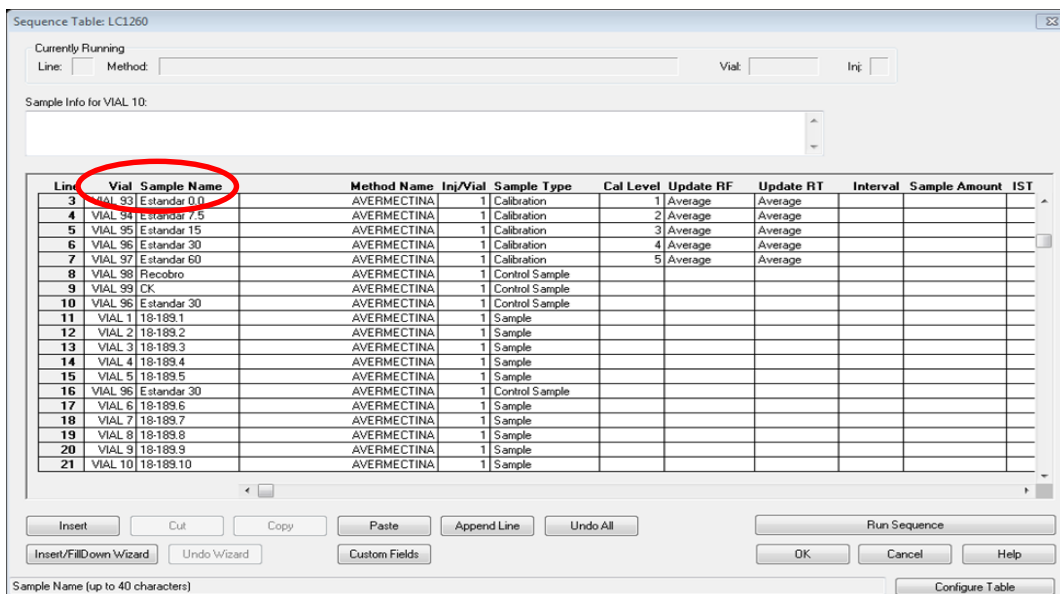
Figura 20. Editar tabla de secuencia.



Fuente: Autoría propia (2017).

- 2- Aparecerá una pantalla con la tabla de la última corrida y solamente se editara las casillas de **sample name** y **vial**, ir verificando la posición de los ítems
- 3- El resto de campo por ser lo mismo no se edita

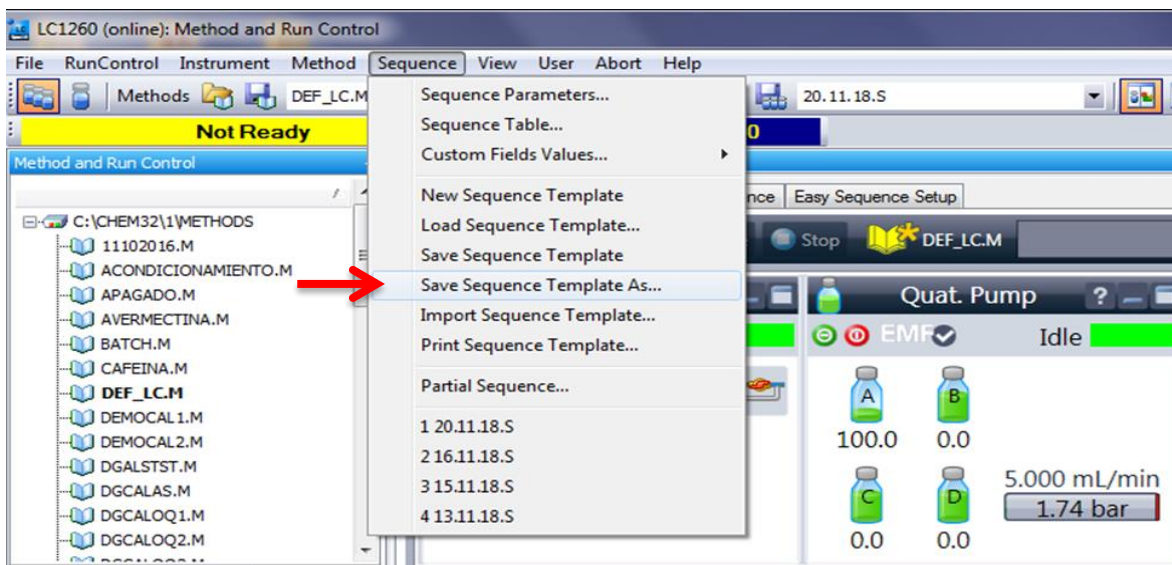
Figura 21. Cambio del nombre de la muestra



Fuente: Autoría propia (2017).

- 4- Una vez terminado de editar, se procede a guardar la tabla dando click en **ok** y después en **save sequence table as**

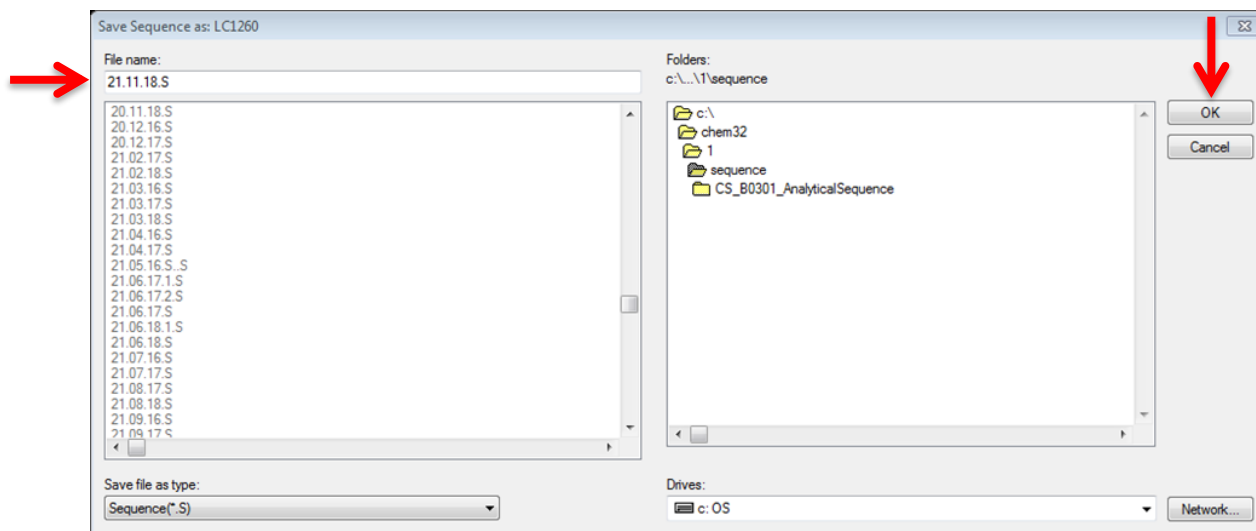
Figura 22. Guardar cambios de tabla editada



Fuente: Autoría propia (2018).

- Aparecerá una pantalla donde se guardara el nombre de la corrida (fecha de lectura)
- Dar click en **ok**

Figura 23. Nombre de la corrida



Fuente: Autoría propia (2018)

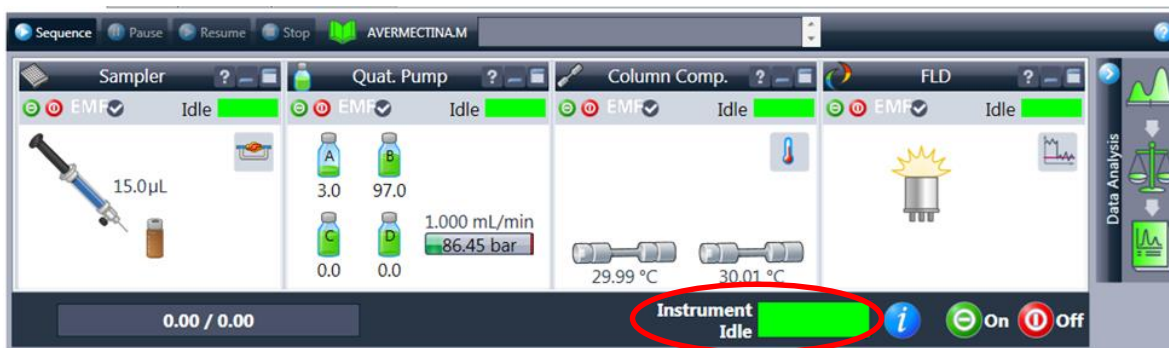
5.3 Corrida de tabla de secuencia

Una vez guardada y verificada la tabla de secuencia se procede a correr los ítems, entre ellos se leerá: blanco reactivo, blanco matriz, estándares, muestras control (Check y Recobro) y muestras.

Estando todos los ítems preparados para la corrida, se procede a lo siguiente:

- 1- Asegurarse que los 4 módulos en la pantalla de inicio tengan la barra de color verde, que indica que están listos en el método de avermectina para iniciar corrida.

Figura 24. Módulos activos.



Fuente: Autoría propia (2018).

- 2- Dar click en **sequence** y después en **sequence table**
- 3- Aparecerá la tabla de secuencia que se editó inicialmente y dar click en **Run sequence**
- 4- Se regresara a la pantalla de inicio donde se observara las barras de color azul, indicando el inicio de la corrida
- 5- Las condiciones del método deben ser:
 - Fase móvil: 97 metanol: 3 agua
 - Temperatura de la columna en 30°C
 - Longitud onda de excitación 365 ± 20 nm,
 - Longitud de onda de emisión 465 ± 20 nm.

Unidad VI. Integración Y Calibración de la curva para su cuantificación y de las muestras

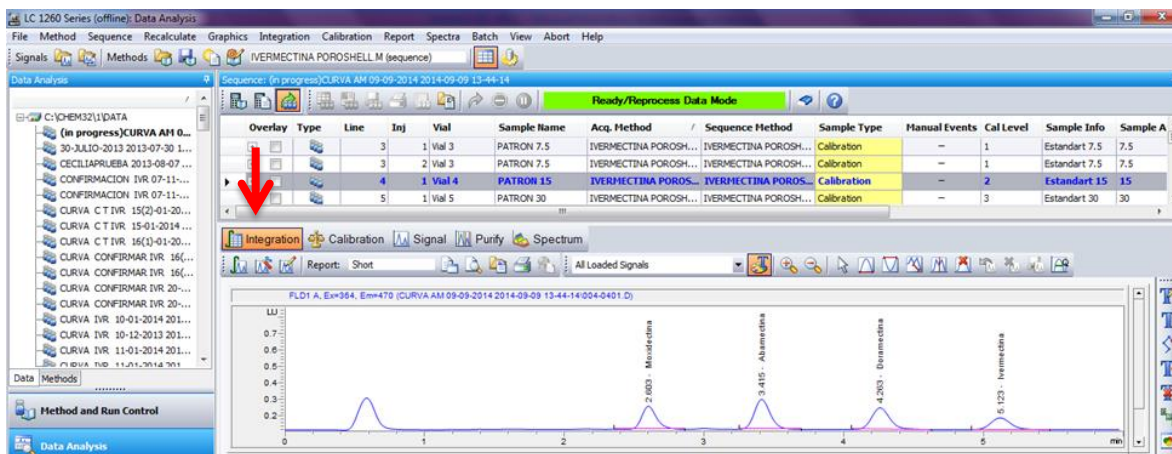
En esta unidad se mencionara los eventos de integración del equipo HPLC, su función y los pasos a seguir para integrarlos; al igual que los pasos para calibración de la curva y de esta manera estimar la concentración de las muestras, en relación a la regresión lineal.

6.1 Integración

La Integración es el mecanismo de cálculo de áreas de los picos cromatográfico, permitiendo discriminar picos que no son de interés o delimitar aquellos de interés. Los eventos de integración son: Slope sensitivity, Peak width, Área reject, Height reject.

- S. Sensitivity: Permite integrar según la forma del pico, ya sean anchos y bajos o bien altos y finos.
- A. reject: Permite establecer el área mínima para que un pico sea integrado
- H. reject: permite establecer la altura mínima para que un pico sea integrado
- P. width: Permite establecer el ancho requerido para que un pico sea integrado

Figura 25. Agregar datos de integración



Fuente: Autoría propia (2018).

- 1) Dentro del software LC 1260 Series (offline) buscar la corrida que previamente se había guardado.
- 2) Posicionarse en el Nivel 3 de la curva para ver los tiempos en que abre y cierra cada pico (analitos) y anotarlos
- 3) Click en *Integration/integration Events/Add new line to the events table*
- 4) Editar: Que cierre en el tiempo 0.00

Que habrá en el tiempo que sale el pico de la Moxidectina

Que cierre en el tiempo que finaliza el pico de la Moxidectina

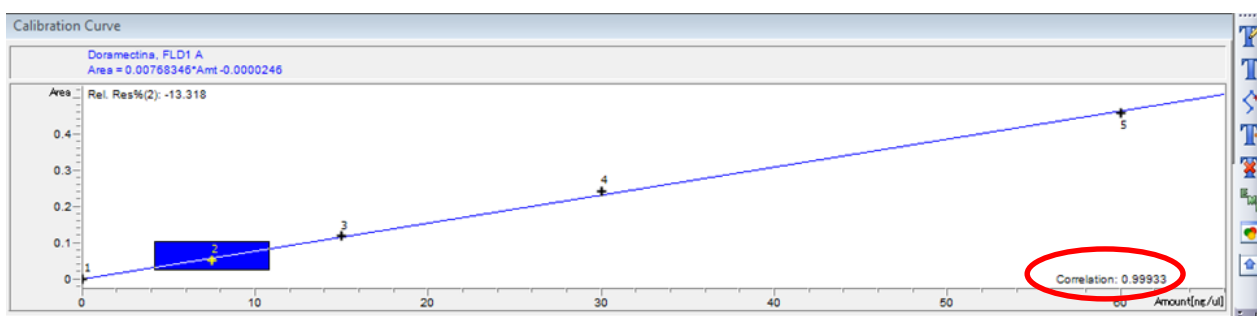
Hacer lo mismo para los otros 3 picos de los analitos de interés

5) Click en Exit and save events to method

6.2 Calibración

En este se estima las concentraciones de las muestras a partir de la regresión lineal; donde el coeficiente de correlación aceptable al calibrar deberá ser de 0.995 a 1.

Figura 26. Regresión lineal de los niveles de la curva



Fuente: Autoría propia (2018).

1) Luego de haber integrado, posicionarse en el nivel 2 (7.5)/ Doble click.

2) Click en Calibration/New calibration table/editar la cantidad en 7.5/ Nivel 2 /OK

3) Seleccionar el Nivel 1 (0)

4) Click en Calibration/Add level/editar la cantidad en 0 /OK

5) Seleccionar el Nivel 3 (15)

5) Click en Calibration/Add level/editar la cantidad en 15 /OK

5) Hacer lo mismo para el PATRON 30 y el PATRON 60

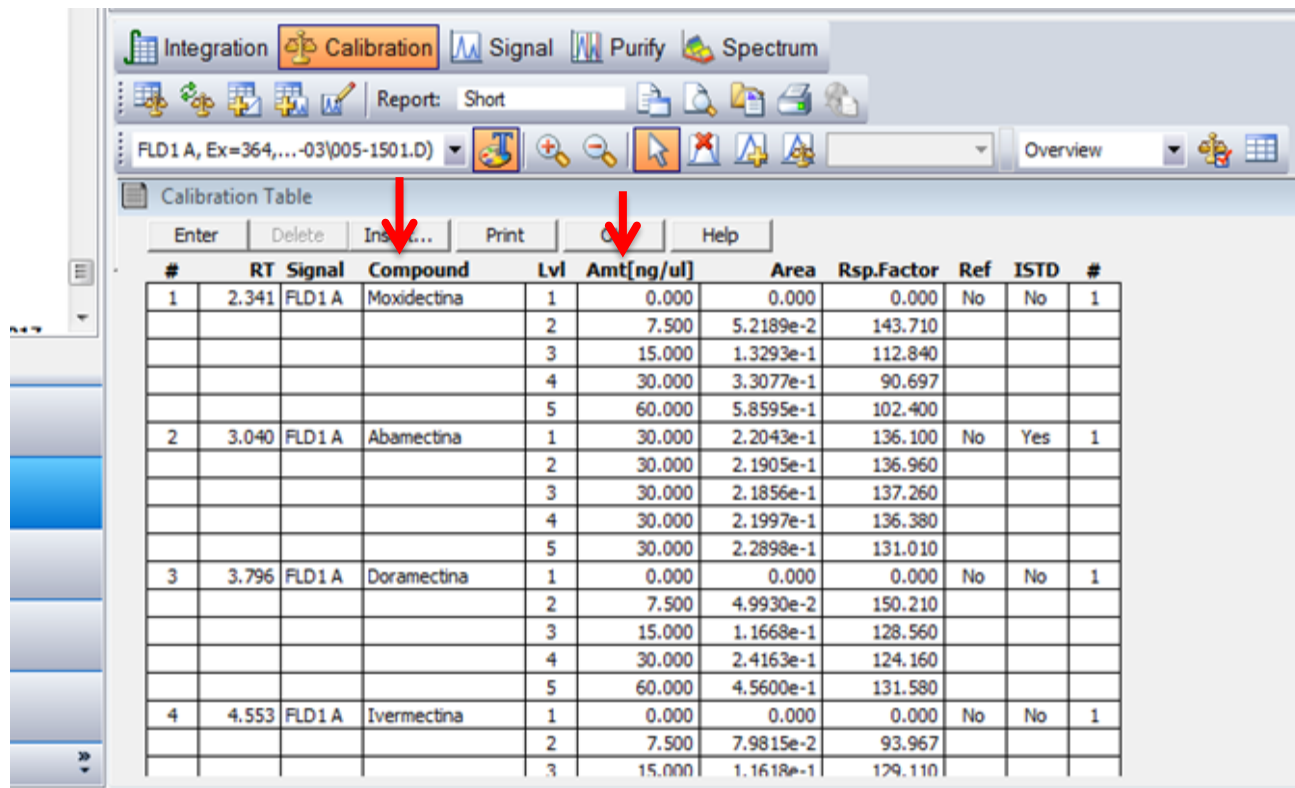
6) Darle el nombre a los 4 componentes en el siguiente orden:

- Moxidectina
- Abamectina
- Doramectina
- Ivermectina

7) Para la Abamectina dejar la cantidad de 30 ppb para los 4 niveles

8) Click en Ok

Figura 27. El orden y concentración de los niveles de curva de calibración



Integration Calibration Signal Purify Spectrum

Report: Short

FLD1 A, Ex=364,...-03\005-1501.D

Overview

Calibration Table

Enter Delete Ins... Print Ok Help

#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD	#
1	2.341	FLD1 A	Moxidectina	1	0.000	0.000	0.000	No	No	1
				2	7.500	5.2189e-2	143.710			
				3	15.000	1.3293e-1	112.840			
				4	30.000	3.3077e-1	90.697			
				5	60.000	5.8595e-1	102.400			
2	3.040	FLD1 A	Abamectina	1	30.000	2.2043e-1	136.100	No	Yes	1
				2	30.000	2.1905e-1	136.960			
				3	30.000	2.1856e-1	137.260			
				4	30.000	2.1997e-1	136.380			
				5	30.000	2.2898e-1	131.010			
3	3.796	FLD1 A	Doramectina	1	0.000	0.000	0.000	No	No	1
				2	7.500	4.9930e-2	150.210			
				3	15.000	1.1668e-1	128.560			
				4	30.000	2.4163e-1	124.160			
				5	60.000	4.5600e-1	131.580			
4	4.553	FLD1 A	Ivermectina	1	0.000	0.000	0.000	No	No	1
				2	7.500	7.9815e-2	93.967			
				3	15.000	1.1618e-1	129.110			

Fuente: Autoría propia (2018)

UNIDAD VII. Límites máximos permisibles de residuos antiparasitarios a determinar por HPLC.RP

Se establecieron límites máximos de residuos para los medicamentos de uso veterinario en los alimentos destinados al consumo humano, con el fin de proteger la salud de la población.

Límite máximo para residuos (LMR) de medicamentos veterinarios es la concentración máxima de residuos resultante del uso de un fármaco veterinario, expresada en miligramos por kilo o en microgramos por kilo sobre la base del peso fresco, admisible dentro de un alimento.

Las infracciones a las disposiciones del mercado internacional serán sancionadas por los Servicios de Salud en cuyo territorio se hayan cometido, ya que los límites son de cumplimiento obligatorio.

Los límites máximos de residuos antiparasitarios permitidos en alimentos destinados al consumo humano en unión europea y estados unidos.

Tabla 10. Límites máximos de residuos antiparasitarios.

Principio activo	Especie	Unión Europea (µg/Kg tejido)	Estados Unidos (µg/Kg tejido)
Abamectina	Bovino	10 Grasa	50 Grasa
		20 Hígado	90 Vísceras
			20 Músculo
			15 Leche
Doramectina	Bovino	150 Grasa	
		100 Hígado	100 Hígado
		60 Riñón	
		40 Músculo	30 Músculo
Ivermectina	Bovino	100 Grasa	
		100 Hígado	1600 Hígado
		30 Riñón	
		30 Músculo	650 Músculo
Moxidectina	Bovino	500 Grasa	900 Grasa
		100 Hígado	100 Hígado
		50 Riñón	
		50 Músculo	50 Músculo
		40 leche	40 Leche

Fuente: (E-CFR, 2014 y EUR-Lex, 2009)

GLOSARIO

Absorbancia: Abs. Se trata de la medida que refleja, cómo se atenúa la radiación cuando atraviesa un elemento.

Acetitrilo: Acet. Es un compuesto químico con fórmula CH₃CN.

Add level: Añadir nivel.

Aforar: Es una marca circular grabada con precisión sobre el vidrio (o material que corresponda) del material volumétrico para indicar que ese es el volumen determinado.

Alúmina: Alna. Óxido de aluminio.

Analito: Anal. Una sustancia cuya composición química es determinada por análisis químico.

Anhídrido trifluoroacético: También reciben el nombre de óxidos no metálicos u óxidos ácidos, utilizado para derivatizar.

Antihelmíntico: Ah. Sustancia que destruye o expulsa los helmintos intestinales.

Antiparasitario: Ap. Que reduce o combate los parásitos.

Área reject: Área rechazo.

Bar: Unidad de presión equivalente a 0.987 atm o 105 Pa.

Blanco matriz: Bm. Matriz que no contienen el analito de interés (placebo) son difíciles de obtener, pero son necesarios para estimar la interferencia que pudieran encontrarse durante el análisis de las muestras de prueba.

Blanco reactivo: Br Reactivos usados durante el proceso analítico incluyendo los solventes usados en la extracción o disolución los cuales son analizados para garantizar que la medición no es influenciada por los materiales utilizados durante el análisis.

Bovino: Bov. Los bovinos son animales mamíferos y rumiantes que constituyen una subfamilia del grupo de los bóvidos.

Coefficiente de correlación: Medida estadística que señala lo bien o mal que el conjunto de puntos representados, se aproxima a una recta.

Cromatografía de partición: C.P. Consiste en la separación de los componentes de una mezcla sobre una fase estacionaria constituida por un soporte sólido inerte cubierto por una película líquida que es fuertemente retenida por dicha fase.

Cromatografía: C. Técnica empleada para separar y detectar componentes de una muestra.

Cualitativa: Cualt. La cromatografía cualitativa se basa en la comparación de la posición de los picos.

Cuantitativa: Cuant. La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación de la altura o del área del pico de un analito con el de uno o más estándares. Ambos parámetros varían linealmente con la concentración.

Derivatización: Deriv. Consiste para darle fluorescencia a la muestra ya que naturalmente no tiene, y se necesita para la detección de los analitos.

Detector: Det. El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna.

Detectores de fluorescencia: Cuando la lámpara emita flashes, los compuestos fluorescentes de la muestra producirán luminiscencia de forma casi simultánea. La luminiscencia dura poco tiempo, por lo que el detector de fluorescencia sólo necesita medir durante un breve período de tiempo después de que la lámpara emita el flash.

Detectores espectrofotométricos: La espectrofotometría es un método científico utilizado para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra. Esta medición también puede usarse para medir la cantidad de un producto químico conocido en una sustancia.

Detectores electroquímicos: Se basa en métodos electroanalíticos; detectan compuestos electroactivos, es decir susceptibles a sufrir oxidación o reducción.

Detectores refractométricos: Cambios de índices de refracción de la fase móvil por la presencia de un soluto.

Eluato: Cada una de las sustancias que migran a través del lecho de la fase estacionaria (impulsadas por la fase móvil) dentro de un sistema de separación cromatográfico.

Eluido: Eldo. Proceso por el que se separan sustancias absorbidas por un cuerpo por medio de un lavado progresivo con un líquido apropiado.

Fase estacionaria: Fe. Sustancia que muestra afinidades diferentes para los distintos componentes en una mezcla de la muestra en una separación por cromatografía.

Fase móvil: Fm. Es la fase que se mueve en una dirección definida.

Frigorífico: Frig. Que produce frío artificialmente.

Gradiente: Grad. Composición que se va modificando durante la separación.

Height reject: Rechazo de altura.

Hidrófobico: Sustancias que no son solubles en agua y por tanto no son capaces de interaccionar con las moléculas de agua.

Homogenizar: Homog. Término que connota un proceso por el que se hace que una mezcla presente las mismas propiedades en toda la sustancia.

HPLC: Acrónimo de High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución).

Isocrática: Iso. Composición de la fase móvil constante durante la separación.

LMR: límite máximo de residuos.

Matriz: M. Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Migración diferencial: Md. Separaciones o sustituciones químicas.

Muestra fortificada: Mf. Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adiciona cantidades conocidas del analito de interés.

New calibration table: Nueva tabla de calibración.

Nm: Nanómetros.

N-metilimidazole: Es un líquido incoloro que se usa como un solvente especial, una base y como un precursor de algunos líquidos iónicos, utilizado en derivatización.

Octadecilo: C18. Compuesto orgánico con la fórmula C₁₈H₃₈O.

Octilo: C8 Éster del ácido acético y del alcohol octanol.

ONA: Organismo Nacional de Acreditación.

Partículas porosas: Micro partículas que actúan como fase estacionaria, este relleno es utilizado en la determinación de residuos.

Peak width: Ancho de pico.

Polar: Pol. De las moléculas en las que los centros de gravedad de las cargas positivas y de las negativas no coinciden.

PPB: Partes por billón, unidad de concentración.

Regresión lineal: técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables.

Relleno pelicular: Bolitas de vidrio o polímeros no porosas sobre su superficie, una capa delgada de partículas pequeñas que actúa como fase estacionaria, si la fase estacionaria es líquida se forma una fina película de líquido sobre la esfera no porosa.

RPC: Cromatografía en fase reversa.

Sílice: Sil. Es un compuesto de silicio y oxígeno.

Sequence table: Tabla de secuencia.

Save Sequence table as: guardar tabla de secuencia como.

Slope sensitivity: Sensibilidad a la pendiente.

Solución de stock: Sl. Stock. Composición concentrada de nutrientes las cuales están formuladas por sales minerales que se emplean en un medio particular.

Streptomyces avermitilis: S. avermitilis. Es una especie de bacteria del género Streptomyces.

Streptomyces cyanogriseus: S. cyanogriseus. Es una especie de bacteria del género Streptomyces.

Termostatación: Que se mantiene a una temperatura constante.

BIBLIOGRAFÍA

Alzate, E. 2014. Tipos de cromatografía (En línea). Consultado el 07 de diciembre del 2017. Disponible en:

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:k8gxDzfdQGYJ:blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/09/TIPOS-CROMATOGRAF%25C3%258DA.pdf+&cd=14&hl=es-419&ct=clnk&gl=ni>

Arauz, M. 2016. Residuos de ivermectina en carne bovina en matadero Novaterra S.A., Tipitapa enero- junio 2015. Tesis. M.V. Lic. Universidad Nacional Agraria, Facultad De Ciencia Animal. Managua, NI 43p. Consultado el 20 de septiembre del 2017.

Ayora, M. 2006. Técnica cromatográfica II: Cromatografía de líquidos, Tema 6. (En línea). ES, Consultado el 22 noviembre del 2017. Disponible en:

http://www4.ujaen.es/~mjayora/Analitica_ambiental.htm

Consejería agroindustrial de los estados unidos, ministerios de ganadería agricultura y pesca. 2015. Importación de carnes bovinas a estados unidos, actualización de los residuos de ivermectina. 2p. (En línea). Consultado el 24 de febrero del 2018. Disponible en:

<http://www.consejeria-usa.org/PDFs/Informes/2015/Caw%20306.pdf>

Cuadra, L. 2007. Laboratorio de cromatografía, Cromatografía líquida de alta eficacia. ES. 57p. (en línea). Consultado el 06 septiembre del 2017. Disponible en:

http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf

E-CFR.2014. Electronic Code of Federal Regulations, Title 21 Food and Drugs, Chapter I—Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (Continued), Subchapter E—Animal Drugs, Feeds, and Related Products, Part 558—New Animal Drugs For Use In Animal Feeds. (En línea). US, consultado 23 julio 2017. Disponible en:

https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=bc20839ff116ec55b017b5cec55280aa&mc=true&node=pt21.6.556&rgn=div5#se21.6.556_1344

EUR-Lex.2009. Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. (En línea). UE, Consultado 22 julio del 2017. Disponible en:

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R0396-20160212&qid=1467900153418&from=ES>

Escalona, A. 2004. Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos. (En línea). Consultado el 03 de diciembre del 2017. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Jaime_Valls_Puig/publication/307634220_Validacion_de_metodologias_de_cromatografia_liquida_de_alta_resolucion_en_alimentos/links/57cdf9d08ae582e06923eef/Validacion-de-metodologias-de-cromatografia-liquida-de-alta-resolucion-en-alimentos.pdf

Espuny, A.; Escudero, E.; Cárceles, C.; Díaz, C.1998 Farmacología de los endectocidas: aplicaciones terapéuticas. ES. Analecta Veterinaria P.3-6. (En línea). Consultado el 10 enero del 2018. Disponible en:

<http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/18191/17551>

Girón, CM. 2016. Determinación de la presencia de residuos de ivermectina en leche fluida de bovinos a través de cromatografía líquida de alta resolución en centros de acopio de leche fluida, supervisadas por el viceministerio de sanidad agropecuaria y regulaciones del maga. Tesis de maestría. MSc. Lic. Universidad De San Carlos De Guatemala, Facultad De Ciencias Médicas. GT. 71p. (En línea). Consultado el 15 enero del 2018. Disponible en:

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/05/05_10323.pdf

Hernández, J. 2005. Cromatografía líquida de alta eficacia. (En línea). Servicio de Bioquímica, Hospital Universitari Germans 2005, (8) 49-62. Consultado 12 septiembre 2017. Disponible en:

http://www.academia.edu/23825141/CROMATOGRAF%C3%8DA_LIQUIDA_DE_ALTA_EFICACIA

IPSA. 2013. La Gaceta, ministerio agropecuario y forestal acuerdo ministerial No.004-2013 de 10 abril 2013. NI. (63) 3028-3029. (En línea). Consultado 20 agosto del 2017. Disponible en:

<http://www.ipsa.gob.ni/Portals/0/3%20Salud%20Animal/Registro%20Veterinario/Registro%20y%20Control%20de%20Insumos%20Pecuarios/Legislacion/Acuerdo%20Ministerial%20MAGFOR%20No%20%20004-2013%20publicado%20en%20Gaceta%20No%20%2063%20del%20a%20C3%B1o%202013%20ref%20%20ivermectina%20abamectina%20o%20doramectina.pdf>

Junquera, P. 2015. Residuos en carne de los antiparasitarios (En línea). Consultado 20 agosto del 2017. Disponible en:

http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=129&Itemid=201

Murillo, OF. 2014. Propuesta de un método para el análisis de nimesulida por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis de maestría. MSc. Lic. Universidad Nacional Autónoma De México, facultad de estudios superiores Zaragoza, MX. 88p. (En línea). Consultado el 25 noviembre del 2017. Disponible en:

https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_lopez_murillo.pdf

Olivares, I. (2013) Mercado de EE.UU sigue abierto a carne nica. Nicaragua, NI. Confidencial. Consultado el 20 febrero 2018. Disponible en:

<https://confidencial.com.ni/archivos/articulo/11471/mercado-usa-sigue-abierto-a-carne-nica>

Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (En línea). Roma (IT). Resistencia a los antiparasitarios, estado actual con énfasis en Latinoamérica. 2003. Consultado el 10 agosto del 2017. Disponible en:

<http://www.fao.org/3/a-y4813s.pdf>. ISSN 1014- 1200

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2017. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Determinación de residuos de antiparasitarios en tejidos de reses por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa HPLC.RP. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 15p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Preparación del analista para determinación de láctonas macrocíclicas. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 7p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Manejo de balanza electrónica. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 10p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Manejo de molino. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 9p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Manejo de centrifuga. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 10p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A. Manejo del N- Evaporador. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 10p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2017. Instructivo laboratorio Novaterra S.A. Preparación de Reactivos. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 10p.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M.2016. Instructivo laboratorio Novaterra S.A, Acondicionamiento del cromatógrafo líquido. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 9P.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo Novaterra S.A. Tabla de secuencia. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 7P.

Orochena, S. Téllez, C. Benítez, M. 2016. Instructivo Novaterra S.A. Corrida de la tabla de secuencia y calibración. Managua, NI. Laboratorio Novaterra S.A. 12p.

Pérez Chávez, FR.; Torres García, AM. 2013. Residuos de Ivermectina en carne bovina en industrial comercial San Martín - matadero de Nandaime Septiembre 2012 - Septiembre 2013. Tesis. M.V. Lic. Universidad Nacional Agraria, Facultad De Ciencia Animal. Managua, NI 49p. Consultado el 04 febrero del 2018

Pérez, E. Holmann, F. Shuetz, P. Fajardo, E. (2006) Evolución de la ganadería bovina en países de américa central.. Centro Internacional de agricultura tropical. CO. 51P. (en línea). Consultado el 19 febrero 2018. Disponible en:

https://ciat-library.ciat.cgiar.org/forrajes_tropicales/pdf/Books/Evolucion_Ganaderia_Bovina.pdf

Rovira, P. 2011. Residuos en carne, una visión desde el sector productivo. UY. Plan agropecuario. (127). P38-42. (En línea). Consultado el 03 agosto del 2017. Disponible en:

https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R127/R_127_38.pdf

USDA-FSIS.2011. Determination of ivermectin, doramectin and moxidectin by HPLC, CLG-AVR.04. US. (4) 1-13. (En línea). Consultado el 25 julio del 2017. Disponible en:

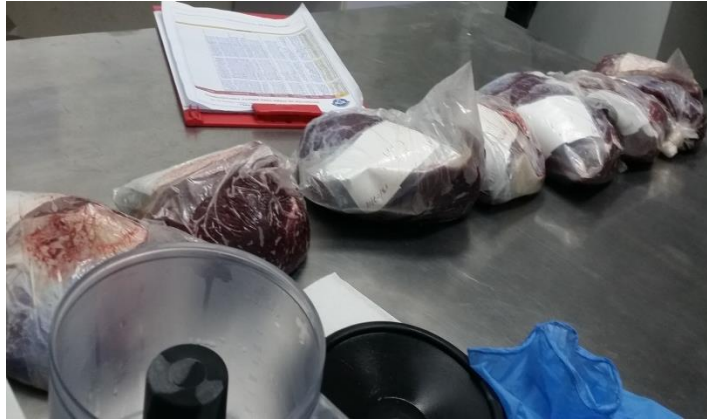
https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/87680e50-d76b-407b-9d94-d2ecc37b3cd0/CLG_AVR_04.pdf?MOD=AJPERES

Yagues, V. 2008. Cromatografía líquida de alta resolución. 2p. (En línea). Consultado el 22 septiembre del 2017. Disponible en:

<http://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%20%C3%ADquidos.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Recepcion de muestra de músculo bovino con su respectiva identificación, antes de su homogenización



Fuente: Autoría propia, Blandón y Videa (2017).

Anexo 2. Pesaje de muestras y filtrado a través de las columnas de extracción que contiene alúmina, pasando el eluido a los tubos de ensayo



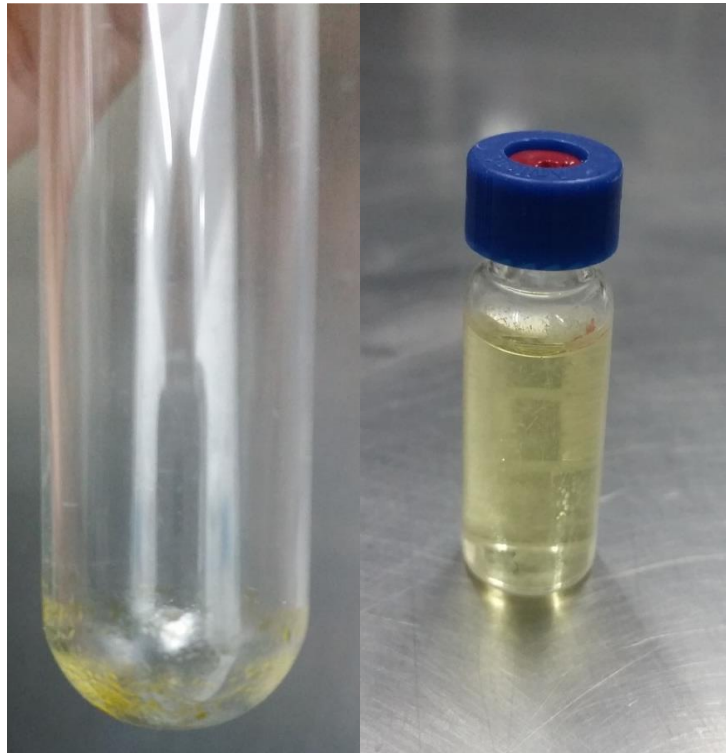
Fuente: Autoría propia, Blandón y Videa (2017).

Anexo 3. Evaporación de la curva y muestras una vez extraídas



Fuente: Autoría propia, Blandón y Videá (2017).

Anexo 4. Muestra evaporada y derivatizada contenida en un vial lista para posicionarse en el equipo e iniciar lectura de la misma.



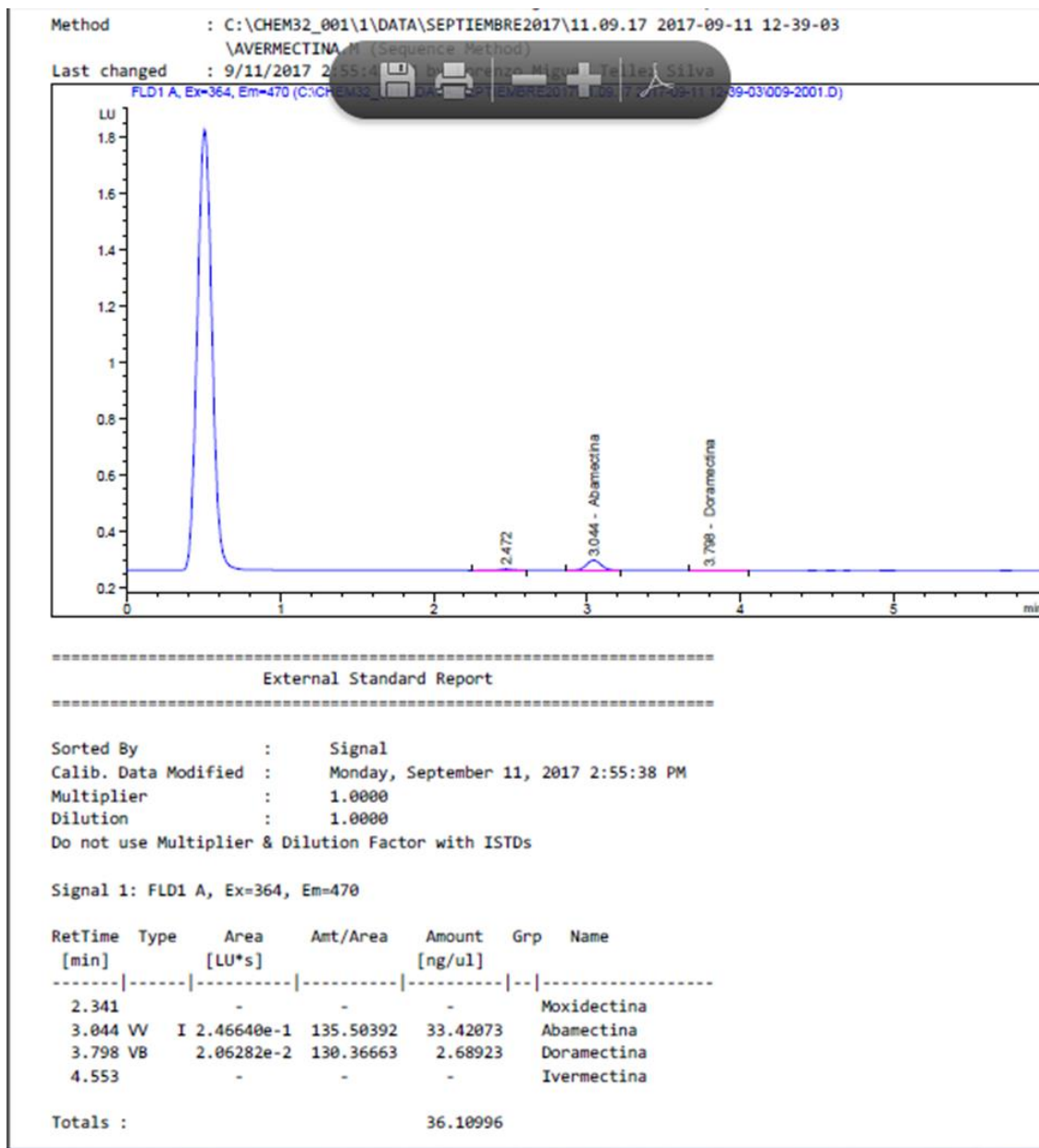
Fuente: Autoría propia, Blandón y Videá (2017).

Anexo 5. Acuerdo ministerial MAGFOR publicado en Gaceta N.63 del año 2013; Referente a las regulaciones sanitarias con respecto a los residuos de antiparasitarios

10-04-13	LA GACETA - ÓRGANO OFICIAL	63
<p style="text-align: center;">II</p> <p>Que corresponde al Ministerio Agropecuario y Forestal, MAGFOR, aplicar las normas sanitarias, fitosanitarias e inocuidad de alimentos, así como diseñar, elaborar, aplicar y ejecutar las políticas orientadas, entre otros, al sector agropecuario y dirigir sus esfuerzos, para fortalecer el registro y control de los insumos agropecuarios.</p>	<p>ivermectina, abamectina o doramectina, ya sean solas o combinadas, destinadas a especies productoras de alimentos, cuya concentración sea mayor al 1%.</p>	<p>SEGUNDO. Los establecimientos industriales autorizados para procesar carne bovina, implementarán los análisis para la detección de residuos de las sustancias sujetas a regulación del presente acuerdo, a través de la instalación y habilitación de laboratorios para sus controles internos en un periodo no mayor de 90 días, desde la fecha de la firma de este Acuerdo Ministerial.</p>
<p style="text-align: center;">III</p> <p>Que se debe ejercer control en la obtención de productos inocuos en las cadenas agroalimentarias pecuarias, para prevenir riesgos químicos y biológicos que puedan afectar la salud humana o generar dificultades en el comercio internacional.</p>	<p>TERCERO. Se incrementará mínimo en siete veces el número de análisis de esta sustancia en carne bovina, a través del Laboratorio de Residuos Biológicos de la DGPSA/MAGFOR, así como agilizar la entrega de los resultados.</p>	<p>CUARTO. A partir de la publicación del presente Acuerdo, la DGPSA/MAGFOR suspenderá el funcionamiento a los establecimientos que incumplan con la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense NTON 20 001-03 "Norma Técnica de Funcionamiento para Establecimientos y Regentes de Productos Veterinarios".</p>
<p style="text-align: center;">IV</p> <p>Que las regulaciones y exigencias sanitarias de nuestros principales mercados comerciales, relativos a los residuos de medicamentos veterinarios, establecen los requerimientos a cumplir en el comercio de carne bovina.</p>	<p>QUINTO. Los animales bovinos importados y exportados con fines de sacrificio, deberán contar con un certificado que muestre que los animales están dentro de los límites permisibles de las sustancias sujetas a esta regulación.</p>	<p>Así mismo, los animales que se importan y exportan destinados a la reproducción, desarrollo o engorde deben contar con una constancia emitida por un Médico Veterinario, debidamente registrado por la autoridad competente, que declare si fueron tratados y en que periodo con las sustancias sujetas al presente Acuerdo.</p>
<p style="text-align: center;">V</p> <p>Que la legislación nacional contempla los Límites Máximos de Residuos (LMR) en carne bovina para ivermectina, doramectina y abamectina, siendo estos de obligatorio cumplimiento.</p>	<p>SEXTO. Los lotes y sus productos de las canales analizadas y con residuos no permisibles de las moléculas mencionadas en el acuerdo primero del presente Acuerdo Ministerial, serán condenados y destruidos en cumplimiento de lo establecido en la NTON 03 087-09, referida a "Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios", en el Reglamento de Inspección Sanitaria de la Carne, artículo 134 y en la Ley 291, Ley Básica de Salud Animal y Sanidad Vegetal y su reglamento.</p>	<p>SEPTIMO. Se faculta a la DGPSA, para realizar las acciones correspondientes con el fin de dar cumplimiento efectivo a las disposiciones vigentes sobre estas sustancias y del presente Acuerdo Ministerial.</p>
<p style="text-align: center;">VI</p> <p>Que la actividad pecuaria bovina, constituye más del 8% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional, representando una alta generación de empleos.</p>	<p>OCTAVO. Las infracciones a lo dispuesto en el presente Acuerdo Ministerial, serán sancionadas de conformidad a lo establecido en la legislación correspondiente, sin perjuicio de las acciones penales que resultaren aplicables por otra legislación.</p>	<p>NOVENO. El presente Acuerdo Ministerial entrará en vigencia a partir de su firma, sin perjuicio de su Publicación en la Gaceta Diario Oficial u otro medio escrito de mayor circulación en el país. El presente acuerdo deroga en su totalidad el Acuerdo Ministerial 016-2012, del veintiséis de noviembre del dos mil doce y publicado en La Gaceta Diario Oficial número 29 del catorce de febrero del año dos mil trece y deja sin efecto cualquier otro acuerdo o disposición que se haya dictado en relación al tema tratado en este Acuerdo Ministerial.</p>
<p style="text-align: center;">VII</p> <p>Que las restricciones o prohibiciones comerciales para proteger la vida o la salud humana, animal y vegetal o para el control de la calidad de los productos destinados al comercio internacional son permitidas de conformidad con los Artículos XI (b) y XX (b) del GATT (Acuerdo General sobre Aranceles Aduaneros y Comercio) de 1994.</p>	<p style="text-align: center;">ACUERDA</p>	<p>PRIMERO. Suspender por el periodo mínimo de un año el registro sanitario, la refrenda o renovación, fabricación, importación, comercialización y el uso de los medicamentos veterinarios inyectables, que en su composición contengan moléculas a base de</p>
<p style="text-align: center;">VIII</p> <p>Que la protección de la salud humana, la salud animal, la sanidad vegetal, los recursos naturales y el medio ambiente en general, están en estrecha relación con las actividades que se desarrollan en el sector agropecuario, acuícola y pesquero, particularmente con las medidas de prevención, manejo, control y erradicación de las plagas y enfermedades de los vegetales y animales que afectan a la producción nacional y por consiguiente corresponde al Ministerio de Agropecuario y Forestal, aplicar las normas sanitarias, fitosanitarias e inocuidad de alimentos, así como diseñar, elaborar, aplicar y ejecutar las políticas dirigidas al sector agropecuario, acuícola, pesquero, forestal y Agroforestal.</p>	<p style="text-align: center;">ACUERDA</p>	<p>PRIMERO. Suspender por el periodo mínimo de un año el registro sanitario, la refrenda o renovación, fabricación, importación, comercialización y el uso de los medicamentos veterinarios inyectables, que en su composición contengan moléculas a base de</p>

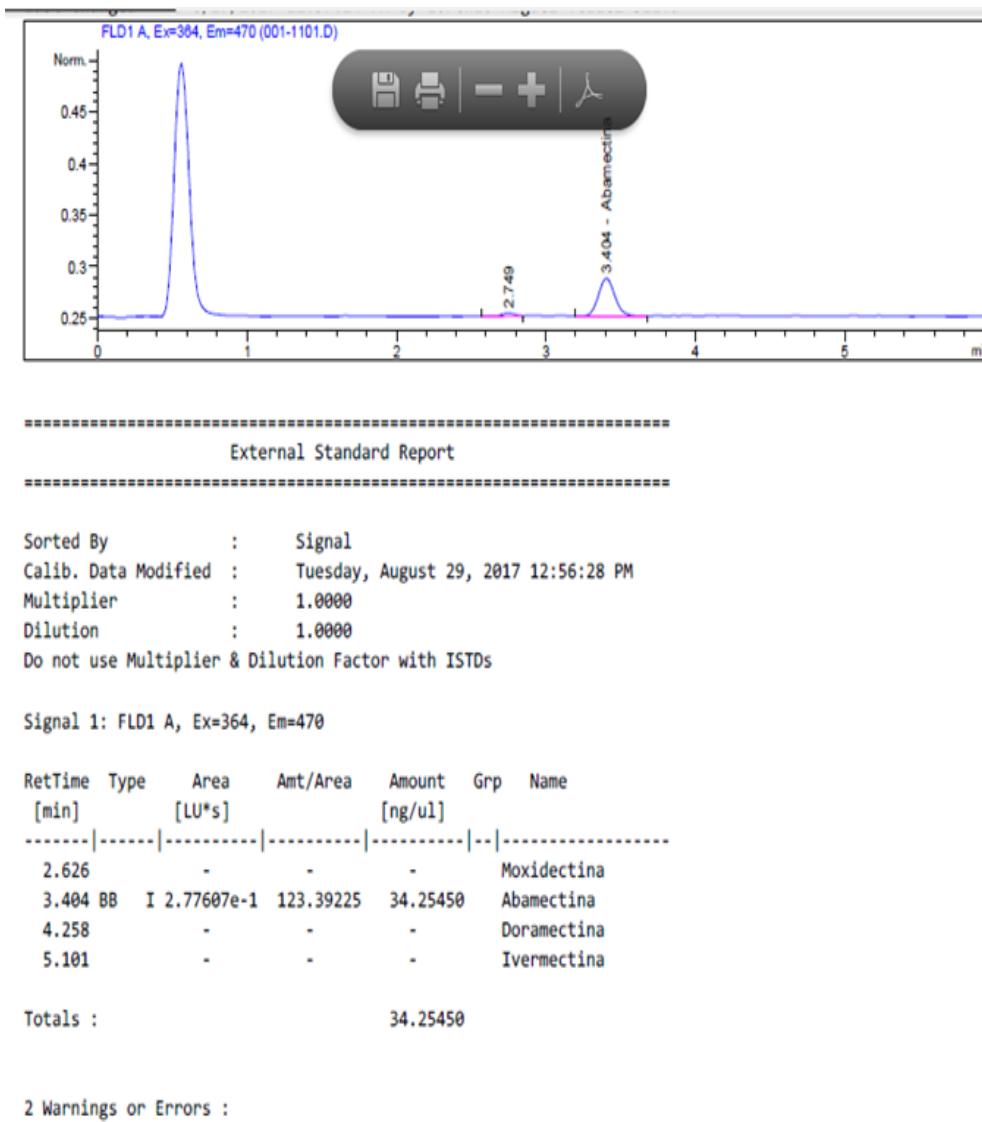
Fuente: La Gaceta (2013)

Anexo 6. Representación cromatográfica de la lectura de una muestra, la cual contenía residuo de Doramectina



Fuente: Autoría propia, Blandón y Videa (2017).

Anexo 7. Cromatograma de la lectura de muestra sin residuos de antiparasitarios, se observa E.I



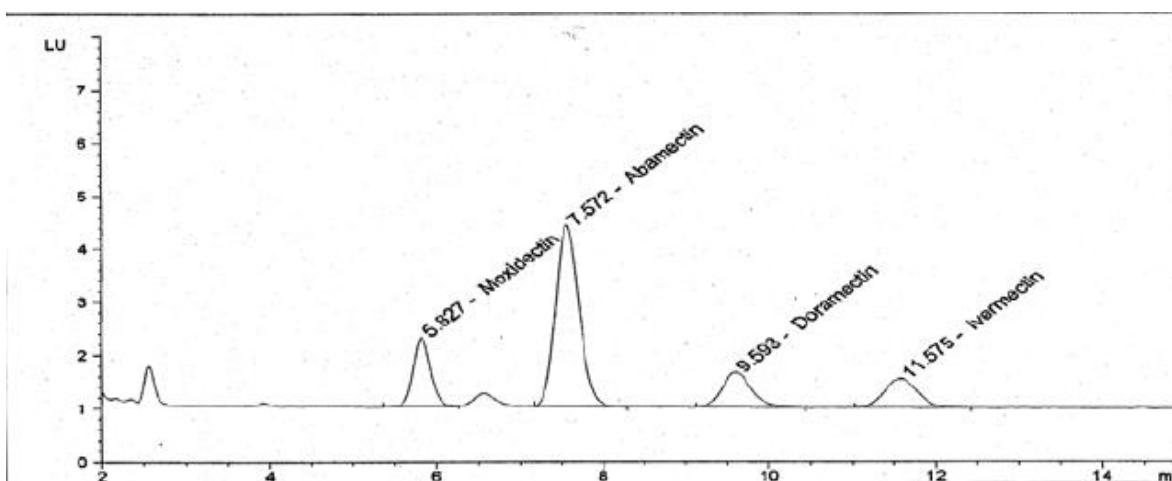
Fuente: Autoría propia, Blandón y Videá (2017)

Anexo 8. Parámetros o precauciones en la técnica determinación de Antiparasitarios

Puntos Críticos de control	Criterios de Aceptación
Peso de la muestra $2.5g \pm 0.2g$	Coefficiente de correlación ≥ 0.995
Nivel de desactivación de la alúmina 12%	Recuperación media para cada ítems en el rango de 60-120%
Volumen de derivatizantes $200\mu l \pm 10\mu l$	No falsos positivos ni falsos negativos
No permitir que la alúmina se seque durante la extracción	
Derivatización en la oscuridad durante un mínimo de 15 minutos	

Fuente: CLG-AVR.04. (2011)

Anexo 9. Representación gráfica de los estándares de la curva de calibración



Fuente: CLG-AVR.04. (2011)

Managua, Nicaragua

Abril, 2019