

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL
**ELABORACIÓN DE UN MATERIAL DE HÍGADO DE BOVINO CONTAMINADO
ARTIFICIALMENTE CON SULFONAMIDAS CANDIDATO A MATERIAL DE
REFERENCIA**

Prestadora de servicio social:

Gabriela Jocelyn Pedraza González
Matrícula: 206231009

Asesores:

Interno: Dr. José Antonio Martínez García
No. Económico 26263

Externo: Biol. Miguel Ángel Trujillo Vera
Cédula Profesional: 5399874

Lugar de Realización:

Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), ubicado
en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec,
Morelos, C. P. 62550

Fecha de Inicio y Término

Del 3 de mayo de 2014 al 3 de noviembre de 2014.

ELABORACIÓN DE UN MATERIAL DE HÍGADO DE BOVINO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON SULFONAMIDAS CANDIDATO A MATERIAL DE REFERENCIA

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	4
2. Introducción	4
3. Marco teórico	5
3.1. Historia de la carne	5
3.1.1. Inocuidad de la carne	5
3.2. Medicamentos veterinarios	5
3.2.1. Antibióticos	5
3.2.2. Sulfonamidas	5
3.3. Límite máximo de residuos	6
3.4. Materiales de referencia y materiales de referencia certificados	6
3.4.1 Homogeneidad de materiales de referencia	6
4. Objetivos	6
4.1. Objetivo general	6
4.2. Objetivos específicos	7
5. Metodología utilizada	7
5.1. Obtención del hígado	7
5.2. Homogeneizado de hígado	7
5.3. Preparación de disoluciones <i>stock</i> de estándares	8
5.4. Preparación de la disolución de trabajo para la contaminación del hígado	9

	Pagina
5.5. Preparación de la disolución de trabajo para la elaboración de curvas De calibración	9
5.6. Preparación de la disolución de trabajo de sulfapiridina (estándar interno) para la elaboración de curvas de calibración	9
5.7. Contaminación del hígado	9
5.8. Lotificación y envasado	10
5.9. Sistema cromatográfico	10
5.9.1. Determinación de la concentración de sulfonamidas en hígado	11
5.9.2. Calibración del instrumento analítico de CLAR utilizando estándares de referencia de sulfonamidas	13
5.10. Análisis del contenido de sulfonamidas en las muestras de homogeneidad	13
5.10.1. Procesamiento y análisis de las muestras para homogeneidad	14
6. Actividades realizadas	14
7. Objetivos y metas alcanzados	15
8. Resultados, discusión y conclusiones	15
8.1. Curvas de calibración de sulfonamidas	15
8.1.1. Graficas de calibración para cada sulfonamida	15
8.1.2 Análisis de ANDEVA	17
8.2. Discusión	17
8.3. Conclusiones	19
9. Recomendaciones	19
10. Literatura citada	19

1. Resumen

Se preparó una muestra de hígado de bovino, la cual fue contaminada artificialmente con estándares de sulfonamidas (sulfametazina, sulfidimetoxina, sulfisoxazol, sulfaclopiridazina). El material elaborado fue fraccionado y envasado en botellas de polipropileno para su análisis. Se seleccionaron 12 muestras de manera aleatoria y se cuantificó el contenido de las sulfonamidas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Las fracciones masa de la cuantificación de las sulfonamidas expresada en mg/kg, se sometieron a un análisis de varianzas (ANDEVA), con la finalidad de determinar su homogeneidad en el material. Se concluyó que los datos obtenidos para cada analito son homogéneos.

Palabras clave: ***Material de referencia, sulfonamidas, hígado de bovino, CLAR, ANDEVA.***

2. Introducción

Los sistemas pecuarios se han intensificado y con ello la prevalencia e incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias en los animales de producción; lo que conlleva a un aumento en el uso de fármacos veterinarios para contrarrestar dichas afectaciones y satisfacer la demanda productos cárnicos en el mercado (Vázquez *et al.*, 2002).

Dentro de los fármacos veterinarios usualmente empleados en la producción animal se encuentran las sulfonamidas. El uso de las sulfonamidas en la producción animal, resulta en la bioacumulación de estos fármacos o sus metabolitos en los tejidos de animales, implicando consecuencias negativas en la salud pública. Por ello, es de suma importancia contar con métodos de análisis exactos, sensibles y de bajo costo para el monitoreo de estos compuestos, de tal manera que se asegure la inocuidad de los productos cárnicos (Arroyo, 2013).

Una herramienta importante para asegurar la calidad en la determinación de residuos tóxicos, es la elaboración de ensayos de aptitud. Este tipo de ensayos son fundamentales para determinar la competencia técnica en las mediciones.

Para realizar ensayos de aptitud es necesario el uso de Materiales de Referencia (MR). Estos MR son patrones de medición con los cuales los laboratorios

compararán los resultados de sus mediciones para determinar su competencia técnica en la detección y cuantificación de residuos tóxicos (IAAC, 2007).

Actualmente, no se cuenta con materiales de referencia de sulfonamidas, como apoyo a la calidad alimenticia en nuestro país. En este sentido, el presente estudio se enfocó en elaborar un material de referencia de hígado de bovino contaminado artificialmente con sulfonamidas (CENAM, 2013).

3. Marco teórico

3.1. Inocuidad de la carne

La carne es una fuente de aminoácidos esenciales (proteína), vitaminas, minerales y ácidos grasos. En los últimos años, la industria cárnica se ha intensificado, por lo que se requiere un mayor control de calidad en los procesos de producción (FAO, 2014).

3.2. Medicamentos veterinarios

Para proteger la salud de los animales de abasto y asegurar una producción de carne libre de microorganismos patógenos, es necesario el uso de medicamentos veterinarios, los cuales tienen diferentes fines; profilácticos, terapéuticos y/o como promotores de crecimiento (Courtheyn *et al.*, 2002).

3.2.1. Antibióticos

Dentro de los fármacos más empleados en la producción animal se encuentran los antibióticos, los cuales se introdujeron en la medicina veterinaria en los años cincuenta. En los años ochenta, se estimó que al menos el 60% de todos los animales destinados al consumo humano habían sido tratados con antibióticos en algún momento de su vida, en la actualidad este porcentaje va en aumento (Cancho *et al.*, 2000).

3.2.2. Sulfonamidas

Algunos de los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria son las sulfonamidas. Estos son compuestos sintéticos con actividad bacteriostática de amplio espectro; antiparasitarios, coccidiostáticos y/o promotores de crecimiento.

Debido a sus múltiples propiedades para combatir patógenos, las sulfonamidas son empleadas en la producción animal de forma reiterativa y sin control adecuado, lo cual genera una acumulación de residuos tóxicos de estos antibióticos en los tejidos animales (Talero-Pérez *et al.*, 2014). Los residuos de sulfonamidas procedentes de animales destinados al consumo humano, constituyen un riesgo para la salud pública (Lazcano *et al.*, 2010).

3.3. Límite máximo de residuos

Debido a los efectos negativos de los residuos de sulfonamidas para la salud pública, se han establecido límites permitidos del contenido de los residuos de estos antibióticos y sus metabolitos en diferentes tejidos de consumo. En México, existe el acuerdo publicado por SAGARPA en el Diario Oficial de la Federación (DOF), el jueves 9 de Octubre del 2014, el cual establece un límite máximo permitido de 100 µg/Kg de residuos de sulfonamidas en hígado.

3.4. Materiales de referencia y materiales de referencia certificados

Los MRC son utilizados en la calibración de instrumentos de laboratorio y en la validación de métodos de medida, presentan un certificado que muestra sus valores asignados y sus incertidumbres declaradas. Los MR, no cuentan con un certificado, y pueden ser utilizados para determinar valores por consenso entre laboratorios expertos, mediante métodos validados altamente precisos, exactos y comparables a los métodos de uso general (IAAC, 2007).

3.4.1 Homogeneidad de los materiales de referencia

Una de las principales características que debe cumplir un MR o MRC es que el valor de la propiedad a medir debe ser homogéneo en el mismo. Por ejemplo, si la propiedad es medir la concentración de sulfonamidas en hígado, esta concentración debe ser significativamente igual en cualquier parte del material.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la homogeneidad del contenido de sulfonamidas una muestra de hígado de bovino contaminado artificialmente.

4.2. Objetivos específicos

Obtención de un lote de hígado de bovino contaminado con sulfonamidas de manera artificial.

Determinar el contenido de sulfonamidas en la muestra de hígado elaborada, mediante CLAR

Determinar la homogeneidad del contenido (mg/kg) de sulfonamidas a través de un análisis de varianza ANDEVA.

Determinar el valor de referencia para cada sulfonamida.

5. Metodología utilizada

5.1. Obtención del hígado de bovino

Una muestra de hígado de bovino (con certificado TIF) fue adquirido en un centro comercial y resguardado en congelación (Congelador-SANYO, modelo MDF-U5312) a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

5.2. Homogeneizado de hígado

El hígado fue cortado previamente en pequeños trozos con la finalidad de facilitar su molienda. Los trozos de hígado fueron molidos en un tazón de acero inoxidable de 5.7 L (*Kitchenaid*, modelo KN2B6PEH), mediante una licuadora de inmersión (*Kitchenaid*, modelo KHB300WH), obteniendo un peso de hígado molido de 1677.96 g, (Figura 1). El homogeneizado se realizó bajo una temperatura en el laboratorio de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

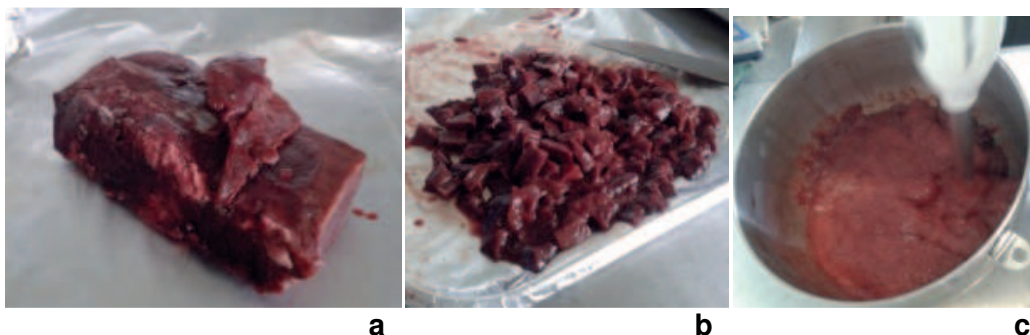


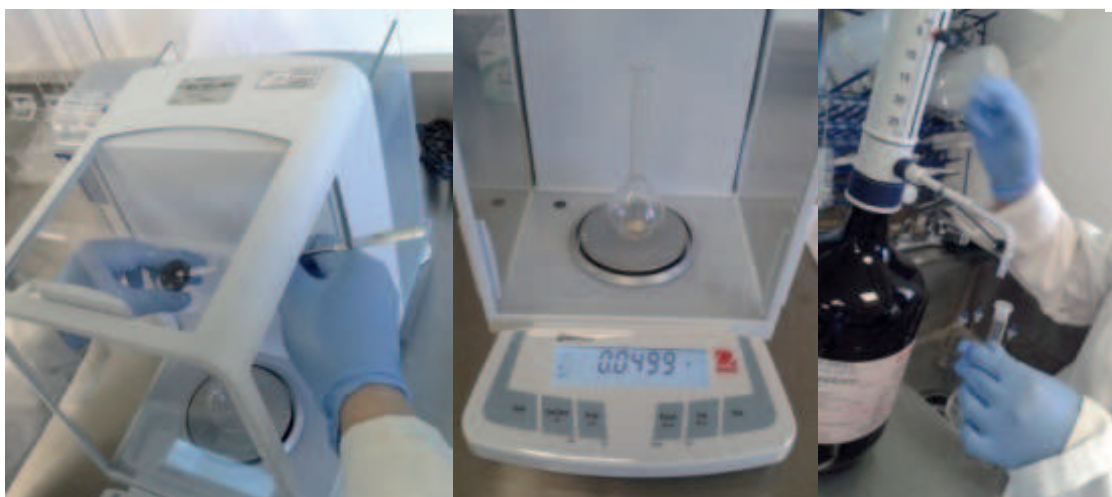
Figura 1. a) Porción de hígado sin cortar; b) Hígado fraccionado; c) Hígado homogeneizado en tazón.

5.3. Preparación de disoluciones *stock* de estándares.

Las disoluciones de estándares fueron preparadas de la siguiente forma. De cada estándar de sulfonamidas (Marca USP), se pesaron de manera individual en matraces de 50 mL, 0.0484 g de sulfapiridina (SP, estándar interno), 0.0533 g de sulfametazina (SMT), 0.0505 g de sulfadimetoxina (SDT), 0.0459 g de sulfisoxazol (SFX), 0.0499 g de sulfaclorpiridazina (SCP), en una balanza analítica (OHAUS, modelo DV314C, calibrada y verificada). Los estándares se diluyeron con acetona (grado CLAR de *Honeywell*) hasta el volumen de aforo, obteniendo concentraciones de 968 mg/mL de SP, 1066 mg/mL de SMT, 1010 mg/mL de SDT, 918 mg/mL de SFX y 998 mg/mL de SCP. Las disoluciones resultantes se colocaron en botellas de vidrio ámbar y se resguardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Figura 2).



a



b

Figura 2. a) Se muestran los estándares de sulfonamidas utilizados, marca USP; b) Se muestra el pesado de estándares y el aforo con acetona.

5.4. Preparación de la disolución de trabajo para la contaminación del hígado.

Para la preparación de la disolución de trabajo, se tomaron diferentes volúmenes de cada solución *stock* de sulfonamidas, 2 mL de SDT, 1.9 mL de SMT, 2 mL de SCP y 2 mL de SFX, y se adicionaron a un matraz volumétrico verificado de 50 mL, diluyéndose con buffer de fosfatos 0,2 M hasta el volumen de aforo. Las concentraciones obtenidas para cada sulfonamida fueron 40.4 µg/mL para SDT, 40.508 µg/mL para SMT, 39.92 µg/mL para SCP y 36.72 µg/mL para SFX.

5.5. Preparación de la disolución de trabajo para la elaboración de curvas de calibración.

Para la preparación de esta disolución, se tomaron diferentes volúmenes de cada solución *stock* de sulfonamidas, 0.117 mL de SMT, 0.125 mL de SCP, 0.136 de SFX, 0.125 mL de SDT, los cuales, se adicionaron a un matraz volumétrico verificado de 50 mL, donde se diluyeron con un buffer de fosfatos 0.2 M hasta el volumen de aforo. Las concentraciones obtenidas para cada sulfonamida fueron, 2.505 µg/mL para SDT, 2.494 µg/mL para SMT, 2.495 µg/mL para SCP y 2.497µg/mL para SFX.

5.6. Preparación de la disolución de trabajo de sulfapiridina (estándar interno) para la elaboración de curvas de calibración.

Por separado, se elaboró la disolución de SP, la cual fue establecida como estándar interno para la determinación de la concentración. Se tomó un volumen de 0.260 mL de SP y se adiciono en un matraz de 50 mL diluyéndose con un buffer de fosfatos 0.2 M hasta el volumen de aforo. La concentración obtenida fue de 5.033 µg/mL.

5.7. Contaminación del hígado

El hígado contenido en el recipiente de mezclado (1677.96 g), se montó en la base de una batidora *KitchenAid* modelo KP26M1XNP, donde se mezcló por alrededor de 30 minutos, previo a la adición de las sulfonamidas, a velocidad baja y utilizando un batidor plano modelo KSMC50B de *KitchenAid*. Al término de este tiempo, se adicionó la disolución de estándares de sulfonamidas. Para ello, un infusor con capacidad de 60 mL (calibrado a un flujo de 2 mL/h) fue llenado con la disolución de estándares de trabajo. Después de verificar el goteo de la disolución, se fijó el extremo conector de la manguera del infusor (el cual estaba acoplado a una aguja) a

la orilla del tazón de mezclado. La adición de las sulfonamidas se dio durante 4 horas a una velocidad de agitación baja (Figura 3).

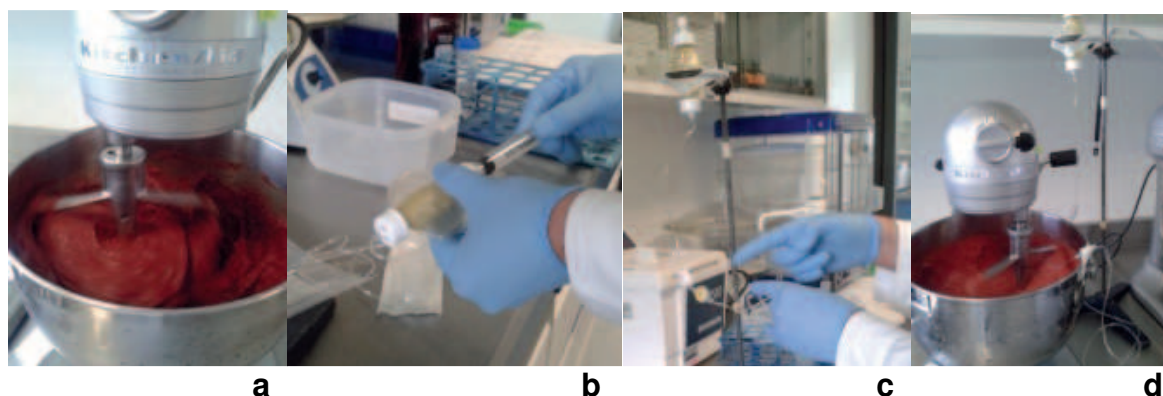


Figura 3. a) Batido del hígado; b) Introduciendo las soluciones con sulfonamidas al infusor utilizando una jeringa; c) Instalación del infusor; d) Integración de las sulfonamidas por goteo al hígado.

5.8. Lotificación y envasado

Transcurridas las 4 horas de mezclado en la batidora, se procedió a realizar el envasado del hígado homogeneizado con las sulfonamidas en botellas de polipropileno blancas. Cada botella fue llenada con aproximadamente 50 g del homogeneizado. A este material se le asignó una clave de lote de acuerdo con el “Proceso para la elaboración de pruebas interlaboratorio ensayos de aptitud,” CENAPA-PD-906, con la finalidad de facilitar su trazabilidad e identificación.



Figura 4. Envasado del hígado

5.9. Sistema cromatográfico.

Todas las muestras fueron sometidas al “Procedimiento para la determinación de sulfonamidas por cromatografía de alta resolución (CLAR)”, CENAPA-PDF-607, el

cual se resume en la Figura 6, y se analizaron en un cromatógrafo de líquidos *Agilent* (Infinity G1321B) acoplado a un detector de fluorescencia *Agilent* 1260 (Figura 5), utilizando una columna cromatográfica *Luna C18 (2) 100 Å 150 x 3.00 mm phenomenex*, bajo los siguientes parámetros cromatográficos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Parámetros cromatográficos del método CENAPA-PDF-607. * λ = longitud de onda, nm=nanómetros.

Fase móvil	Acetonitrilo/Ácido acético al 2% en gradiente
Velocidad de flujo	1.2 mL/minutos
Volumen de inyección	50 μ l
Temperatura de la columna	55 °C
* λ de excitación	405 nm
* λ de emisión	495 nm



Figura 5. a) Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, b) Columna cromatográfica instalada en el equipo.

5.9.1. Determinación de la concentración de sulfonamidas en hígado

La concentración de las sulfonamidas en hígado se realizó mediante el procedimiento CENAPA-PDF-607 (Figura 6).

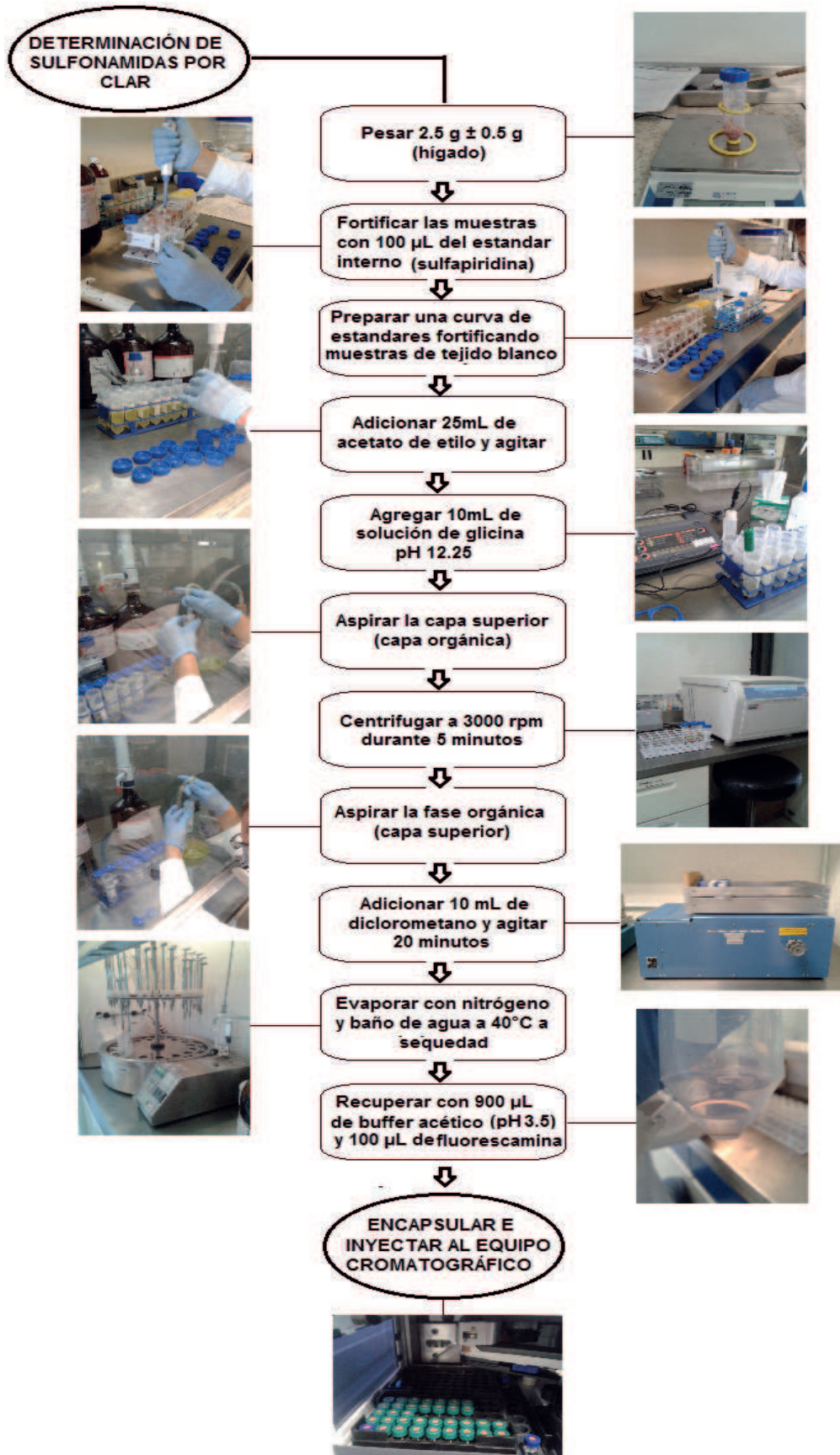


Figura 6. Procedimiento para la determinación de sulfonamidas

5.9.2. Calibración del equipo analítico de CLAR utilizando estándares de referencia de sulfonamidas.

Para la calibración del equipo de CLAR, se elaboraron gráficas de calibración (curvas) para cada sulfonamida. Primero, se realizó la fortificación de cinco muestras de hígado de bovino de 2.5 g (blancos), tomando diferentes volúmenes (0.05, 0.075, 0.1, 0.2 y 0.4 mL) de la solución de estándares de sulfonamidas del punto 5.5. y un volumen (0.1 mL) de la disolución del estándar interno (SP) del punto 5.6., por lo cual, se obtuvieron las concentraciones teóricas en hígado que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Concentraciones teóricas obtenidas después de la fortificación de las cinco muestras de hígado de bovino para la elaboración de las curvas de calibración.

Concentración teórica (mg/kg)				
SMT	SCP	SFX	SDT	SP (estándar interno)
0.0499	0.0498	0.0497	0.0498	0.2013
0.0748	0.0747	0.0746	0.0747	0.2013
0.0998	0.0996	0.0020	0.0020	0.2013
0.2000	0.2000	0.1990	0.2000	0.2013
0.3990	0.3980	0.3980	0.3980	0.2013

Posteriormente, las muestras fueron procesadas y analizadas por CLAR, mediante el procedimiento CENAPA-PDF-607. Las respuestas obtenidas fueron graficadas y relacionadas con su correspondiente concentración teórica, y posteriormente sometidas a un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, determinando el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y la recta de regresión ($y = mx + b$).

5.10. Procesamiento y análisis de las muestras para homogeneidad

Las muestras para la homogeneidad (Cuadro 3) fueron procesadas y analizadas mediante el procedimiento CENAPA-PDF-607. Las respuestas experimentales obtenidas fueron ajustadas con las respuestas del estándar interno (SP). Las relaciones obtenidas, se sometieron a una interpolación con la ecuación de la recta de calibración de cada sulfonamida. De esta manera, se obtuvo el contenido de cada sulfonamida en mg/kg.

Cuadro 3. Concentraciones teóricas obtenidas después de la fortificación de las cinco muestras de hígado de bovino para la elaboración de las curvas de calibración.

Sulfonamidas							
SMT		SCP		SFX		SDT	
mg/kg	Respuesta	mg/kg	Respuesta	mg/kg	Respuesta	mg/kg	Respuesta
0.0499	0.7976	0.0499	0.4118	0.0499	0.3703	0.0501	0.9275
0.0748	1.1559	0.0748	0.6594	0.0749	0.6097	0.0751	1.4152
0.0998	1.5437	0.0998	0.8732	0.0999	0.8058	0.1001	1.8576
0.1995	3.3515	0.1995	1.8375	0.1997	1.6566	0.2003	4.0280
0.3991	6.0549	0.3991	3.2612	0.3995	2.9423	0.4007	7.2647

5.10.1. Análisis de la homogeneidad mediante el método de ANDEVA

Con el propósito de evaluar la homogeneidad del contenido de sulfonamidas en la muestra de hígado, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de ANDEVA. Para este análisis, se partió de una hipótesis nula (H_0), la cual indica que las medias de los grupos de datos evaluados (Pesada1 y pesada 2) no varían significativamente, y por lo tanto son considerados de una misma población. Bajo esta consideración, los resultados son considerados como homogéneos. El criterio de decisión para este análisis, es el estadístico F, donde $F \text{ calculada} \leq F \text{ crítica de tablas } (n-1_{gl})$ y con un valor de α del 5%.

6. Actividades realizadas

Cuadro 4. Se muestran las actividades generales que llevadas a cabo en este trabajo.

Actividad	Fecha
Recopilación de información y planeación	mayo 2014
Análisis de riesgos	junio 2014
Revisión de materiales y equipos	junio 2014
Solicitud de materiales	julio 2014
Adquisición de materiales	julio 2014
Adquisición de hígado de bovino	agosto 2014
Análisis de las muestras blanco	agosto 2014
Contaminación artificial del hígado de bovino con sulfonamidas	agosto 2014
Medición de las sulfonamidas en hígado de bovino	agosto 2014
Análisis de homogeneidad en las muestras del material	septiembre 2014
Elaboración de análisis estadístico	octubre 2014

7. Objetivos y metas alcanzados

Se contaminó una muestra de hígado de bovino de manera artificial con sulfonamidas.

Se identificaron y cuantificaron los contenidos de sulfonamidas contaminado por CLAR.

Se evaluó la homogeneidad de las concentraciones (mg/kg) para cada sulfonamida a través de un análisis de varianza ANDEVA.

Se determinó el valor de referencia para cada sulfonamida.

8. Resultados, discusión y conclusiones

8.1. Curvas de calibración de sulfonamidas

Se muestra un resumen de los resultados obtenidos a través del análisis de regresión lineal de las sulfonamidas. En él, se observa los r obtenidos para cada analito y el criterio de aceptación establecido de $r \geq 0.99$ (Cuadro 5).

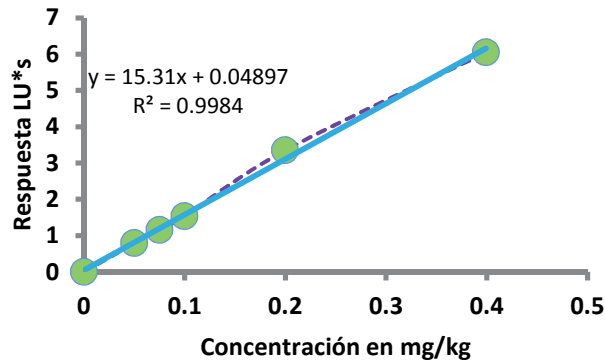
Cuadro 5. Valores de r obtenidos para cada sulfonamida y su cumplimiento de acorde al criterio de aceptación.

Criterio de aceptación	Linealidad		Cumple
	Sulfonamida	r obtenido	
$r \geq 0,990$	Sulfaclopiridazina	0,9998	Si
	Sulfisoxazol	0,9989	Si
	Sulfadimetoxina	0,9991	Si
	Sulfametazina	0,9992	Si

8.1.1. Graficas de las curvas de calibración para cada sulfonamida

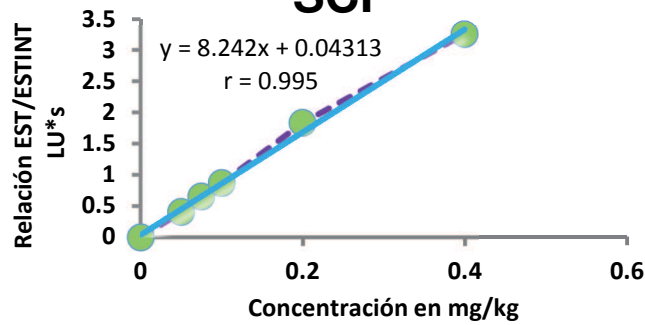
A continuación se muestran las gráficas de las curvas de calibración para las sulfonamidas evaluadas. En ellas se exponen las ecuaciones lineales para cada analito y sus r correspondientes.

SMT



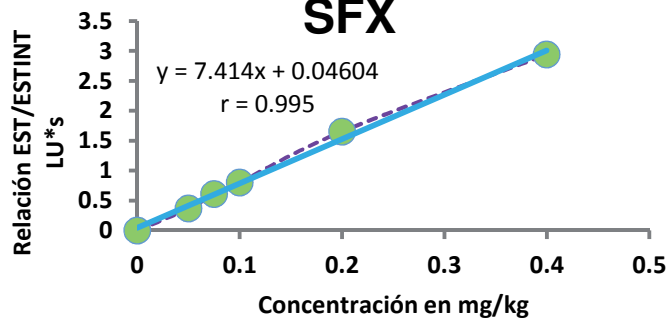
Grafica 1. Curva de calibración de la sulfametazina. Se muestra en morado la curva de calibración junto con la recta de regresión en azul, además, de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación. EST= estándar, ESTINT= estándar interno.

SCP

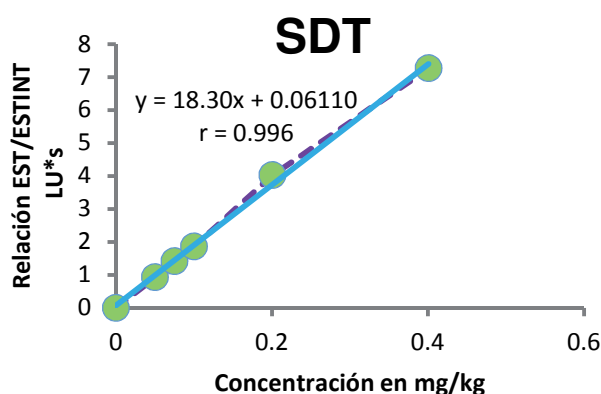


Grafica 2. Curva de calibración de la sulfaclorpiridazina. Se muestra en morado la curva de calibración junto con la recta de regresión en azul, además, de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación. EST= estándar, ESTINT= estándar interno.

SFX



Grafica 3. Curva de calibración de la sulfisoxazol. Se muestra en morado la curva de calibración junto con la recta de regresión en azul, además, de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación.



Grafica 4. Gráfica de calibración de la sulfadimetoxina. Se muestra en morado la curva de calibración junto con la recta de regresión en azul, además, de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación.

8.1.2. Análisis de ANDEVA

Los resultados obtenidos en el análisis de varianzas, indicaron el grado de homogeneidad de la concentración de cada analito en el material de hígado de bovino. Tomando en consideración que las cuatro sulfonamidas cumplieron con los criterios de aceptación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores de F calculada y probabilidades para cada sulfonamida, y su cumplimiento acorde al criterio de aceptación.

ANDEVA				
Criterio de aceptación	Sulfonamida	F calculada	Probabilidad P	Cumple (Si/No)
El valor de F calculada debe ser menor que el valor de F crítico de 4,351	Sulfaclopiridazina	0,01	0,921340	Si
	Sulfisoxasol	0,00064	0,9998	Si
	Sulfadimetoxina	0,0090	0,9253	Si
	Sulfametazina	0,0219	0,888952	Si

8.2. Discusión

El presente proyecto se enfocó en evaluar la homogeneidad del contenido de cuatro sulfonamidas en una muestra de hígado de bovino molido, con la finalidad de obtener un material de referencia no certificado que puede ser utilizado en la elaboración de ensayos de aptitud en la detección y cuantificación de sulfonamidas. Par ello, una muestra previamente molida de hígado de bovino fue contaminada artificialmente con un volumen de una solución de sulfonamidas de concentración conocida. Posteriormente, la muestra contaminada se sometió a agitación constante mediante una batidora durante un tiempo determinado. El batido de hígado

resultante, se envasó en frascos de polipropileno y se prosiguió a seleccionar de manera aleatoria, un total de doce muestras para el análisis del contenido de sulfonamidas por CLAR. Una vez finalizado el análisis por CLAR, los datos de las concentraciones obtenidas para cada sulfonamida, se sometieron a un análisis de varianzas para evaluar su variabilidad y por consiguiente determinar su homogeneidad.

Para la cuantificación de las sulfonamidas, se prepararon curvas de calibración utilizando estándares de referencia de sulfonamidas. Los resultados muestran linealidad de las sulfonamidas evaluadas, mostrando coeficientes de correlación satisfactorios en apego al criterio de aceptación establecido de $r \geq 0.99$. Cabe mencionar que este criterio es tomado como referencia por el CENAPA en apego a los criterios que exige la Entidad Mexicana de Acreditación (Criterio plasmado en el procedimiento interno de validaciones).

En lo referente al análisis de ANDEVA, este se llevó a cabo para saber si había diferencias significativas entre los grupos de muestras evaluadas. Al haber diferencias significativas en las medias de ambos grupos, estas pueden ser atribuidas significativamente a errores sistemáticos, lo que indica que pueden estar involucrados errores de calibraciones del material volumétrico, instrumentos para pesar o la experiencia o habilidad propia del analista. Por el contrario, al no haber diferencias significativas, nos indica que la variabilidad encontrada en ambos grupos solo se debe a errores aleatorios propios del proceso de análisis y medición, los cuales no podemos controlar (*Guimarães et al., 2014*). Este análisis también nos indica la probabilidad obtenida. Cuando se obtienen probabilidades cercanas a 1, aumenta la certeza de la H_0 y de atribuir significativamente la variabilidad de los grupos a los errores aleatorios; mientras que probabilidades más alejadas a la unidad, indican menos certeza de la H_0 . Por lo tanto, para este análisis, los resultados obtenidos reflejan que no hay diferencias significativas en la concentración de sulfonamidas en las muestras evaluadas, ya que se obtuvieron valores de F calculada por debajo del valor de F crítica, además de que las probabilidades cercanas a la unidad indican una alta certeza de nuestros resultados.

8.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos sugieren que la muestra de hígado preparada en el CENAPA, la cual fue contaminada artificialmente con sulfonamidas, contiene concentraciones homogéneas de sulfametazina, sulfaclopiridazina, sulfisoxazol y sulfadimetoxina, de acuerdo a un análisis de ANDEVA. Se asignaron concentraciones de referencia para cada sulfonamida a partir de la media de los datos, resultando en 0.121 mg/kg para la sulfametazina, 0.146 mg/kg para la sulfaclopiridazina, 0.164 mg/kg para sulfisoxazol y 0.121 mg/kg para la sulfadimetoxina. Finalmente, esta muestra de hígado de bovino, quedó a disposición del CENAPA para posteriores análisis, con la posibilidad de convertirse en Material de Referencia para la elaboración de ensayos de aptitud en la determinación cuantitativa de sulfonamidas en hígado de bovino.

9. Recomendaciones

Evaluar la estabilidad de este material, ya que se requiere de esta condición para ser considerado como material de referencia.

Es recomendable cuantificar mediante otras técnicas, como la espectrometría de masas

10. Literatura citada

- Arroyo-Manzanares. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by CLAR with fluorescence detection. Food Chemistry [en línea]. Ago. 2013, n° 143, pp. 459-464. [Consulta: 22 de Mayo de 2014]. Disponible en web: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054267>>
- Arvizu T., Valle M., Reyes del V. Estudio de trazabilidad en materiales de referencia certificados de matriz acuosa empleados en el método de pérdidas de transpiración. Simposio de Metrología 2010, 27 al 29 de Octubre. pp.1, 2010 [en línea] 2011 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: <<https://www.cenam.mx/sm2010/info/pmiercoles/sm2010-mp02d.pdf>>
- Cancho Grande, B. García Falcón, M. S., Simal Gándara, J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. Cienc. Tecnol. Aliment. Vol. 3, No. 1, pp. 39-47, 2000 [en línea] 2001 [fecha de consulta septiembre

2014]. Disponible en web: <<https://webs.uvigo.es/altaga/cyta/cyta-3-2000-3947.pdf>>

- CENAM, Proyecto SAGARPA-CONACyT desarrollo de Materiales de Referencia. Boletín junio 2013 [en línea] 2013 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: <<http://www.cenam.mx/boletin/bol062013.aspx#sagarpa>>
- Courtheyn D, Le Bizec B, Branbilla G, De Brabander F, Cobbaert, E, Van de Wiele M, Vercammen J, De Wasch, K. Recent development in the use and abuse of growth promoters. Anal. Chin. Acta, 2002: 473: 71-82 [en línea] 2003 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: <https://fri.wisc.edu/files/.../FRIBrief_VetDrgRes.pdf>
- Doyle ME, Veterinary Drug Residues in Processed Meats Potential Health Risk; A Review of the Scientific Literature. FoodResearchInstitute 2006. [en línea] 2007 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: <https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/FRIBrief_VetDrgRes.pdf>
- Inter American AccreditationCooperation, Guía para la selección y uso de Materiales de Referencia, ILAC-G9:2007 [en línea] 2008 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: <www.iaac.org.mx/.../ILAC%20G9%20IAAC%20GD%20021.pdf>
- Lazcano Villarreal J.L., Wong González A., Roig Sagués A. X. b, Pérez,Fernández B., Moreno Degollado G., Cantú Martínez M. A., Zarate Ramos, J.J., Avalos Ramírez R, Aguirre Ramos A, Dávalos Aranda G., Determinación de sulfonamidas en musculo de bovinos sacrificados en rastros tipo inspección federal (TIF) en Nuevo León, México, por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología en alimentos, Jueves y Viernes 28 de Mayo de 2010, Guanajuato. Gto. [en línea] 2011 [fecha de consulta septiembre 2014] Disponible en web: <www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-09-2010/.../CA33.pd>
- Guimarães E. F., do Rego E. C. P., H. C. M. Cunha, Rodrigues J. M., Figueroa-Villar J. D., Certified reference material for traceability in environmental analysis: PAHs in toluene, J. Braz. Chem. Soc. vol. 25 São Paulo Feb. 2014. [en línea] 2014 [fecha de consulta septiembre 2014] Disponible en web:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532014000200018>

- Oficina Regional de la FAO, Inocuidad de los alimentos [en línea] 2014 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: *<<http://www.fao.org/americas/perspectivas/inocuidad/es/>>*
- Segura, Historia de la carne [en línea] 2012 [fecha de consulta septiembre, 2014]. Disponible en web: *<<http://www.comecarne.org/historia-de-la-carne/>>*
- Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. Universitas Scientiarum 19 (1): 11-28 doi: 10.11144/Javeriana.SC19-1.taci [en línea] 2013 2014 [fecha de consulta septiembre 2014]. Disponible en web: *<<http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/viewFile/6618/pdf>>*