

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*, utilizando cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo

Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico

Nathaly Elizabeth Hurtado Galindo

Lima-Perú

2021

ASESORA

Dra. María Rivera Chira

CO-ASESOR

Ing. Wilfredo León Gonzales

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todos las oportunidades y lecciones de vida que ha puesto en mi camino. En especial por brindarme un hogar y cuidar de mis seres queridos.

Al laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y al proyecto de “validación de una metodología de análisis de multiresiduos veterinarios en productos acuícolas por LC-MS/MS”, por permitirme realizar mi trabajo de investigación de tesis.

Agradecer infinitamente a mis asesores por la oportunidad brindada. A la Dra. María Rivera por su conocimiento, comprensión, tiempo, consejos y sobre todo por su paciencia en el transcurso del trabajo de investigación. Al Ing. Wilfredo León por su apoyo, sus enseñanzas, sus charlas motivadoras y su comprensión.

A los miembros del LaCCSA, en especial, al Dr. Luis Huicho y al analista del laboratorio el Lic. Diego Chirinos por sus conocimientos y gran experticia compartida en cada momento.

Finalmente, a mi familia y amistades por brindarme su apoyo y cariño, en especial a mi amiga Katherina por su motivación constante.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	6
2.1.	ACUICULTURA	6
2.1.1.	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	7
2.1.2.	Residuos veterinarios	9
2.1.3.	Normativas sobre residuos veterinarios en productos acuícolas	10
2.2.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	12
2.2.1.	Espectrometría de masas	14
2.2.2.	Efecto matriz	15
2.3.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	15
2.4.	METODOLOGÍA DE METODO MULTIRESIDUOS.....	19
2.5.	JUSTIFICACIÓN.....	20
III.	HIPÓTESIS.....	21
IV.	OBJETIVOS.....	21
4.1.	OBJETIVO GENERAL	21
4.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1.	MATERIALES Y EQUIPOS	22
5.1.1.	Lugar de trabajo.....	22
5.1.2.	Muestras biológicas	22
5.1.3.	Material de laboratorio	22
5.1.4.	Reactivos	23
5.1.5.	Equipos	23
5.2.	DESARROLLO DEL MÉTODO DE MULTIRESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN TRUCHA ARCOIRIS.....	23
5.2.1.	Sintonización.....	24
5.2.2.	Preparación de las Soluciones	25
5.2.3.	Preparación de la Curva de Calibración en la matriz de trucha.....	26
5.2.4.	Método de extracción de la muestra.....	27
5.2.5.	Evaluación de las condiciones espectrométricas y cromatográficas.....	29
5.2.6.	Determinación de la concentración de antibióticos en la muestra	30
5.3.	VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PROPUESTA	31
5.3.1.	Selectividad/Especificidad	33
5.3.2.	Linealidad	33

5.3.3. Sensibilidad	33
5.3.4. Límite de detección y cuantificación	34
5.3.5. Recuperación	34
5.3.6. Precisión.....	35
5.3.7. Rango mínimo teórico.....	36
5.4. EVALUACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS DE DIFERENTES MERCADOS..	37
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
6. RESULTADOS	39
6.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE MULTIRESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN TRUCHA ARCOIRIS	39
6.1.1. Sintonización	39
6.1.2. Curva de calibración en matriz de trucha.....	41
6.1.3. Extracción de la muestra	42
6.1.4. Evaluación de las condiciones espectrométricas y cromatográficas	42
6.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	44
6.2.1. Prueba de selectividad o especificidad.....	44
6.2.2. Prueba de linealidad y sensibilidad	44
6.2.3. Prueba de límite de detección y cuantificación	47
6.2.4. Recuperación.....	47
6.2.5. Precisión	49
6.2.6. Rango mínimo teórico.....	50
6.3. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE MERCADO	52
6.3.1. Análisis de las muestras de mercado	53
6.3.2. Criterios de identificación de los residuos de las muestras de mercado	55
VII. DISCUSIÓN	57
VIII. CONCLUSIÓN.....	63
IX. RECOMENDACIONES	64
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
XI. ANEXOS.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos con registro sanitario en SANIPES.....	9
Tabla 2. Límite de residuos veterinarios según la Unión Europea, el Codex Alimentarius y SANIPES.....	11
Tabla 3. Parámetros de validación según la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos de Medicina Veterinaria de la Agencia Federal de Alimentos y Drogas (FDA).....	17
Tabla 4. Diluyente de cada estándar de Antibiótico	25
Tabla 5. Volumen de cada solución mezcla para realizar la curva de calibración	27
Tabla 6. Condiciones de la cromatografía líquida basadas en el método del FSIS	29
Tabla 7. Secuencia de Inyecciones en el Detector de Masas de Triple Cuadrupolo (Sintonización).....	29
Tabla 8. Secuencia de las corridas cromatográfica del UHPLC-MS/MS	30
Tabla 9. Resumen de los parámetros de validación y sus criterios de aceptación dependiendo de la guía de validación	32
Tabla 10. Datos obtenidos de la sintonización de los antibióticos utilizados para el patrón de identificación del método	39
Tabla 11. Recuperación del método multiresiduo para trucha arcoíris.....	42
Tabla 12. Recuperación del método de residuos veterinarios de la FSIS	42
Tabla 13. Porcentaje del área del pico cromatográfico en la matriz blanco respecto al área del pico en la matriz fortificada del analista 1 (A1) y del analista 2 (A2)	44
Tabla 14. Resultados de la curva de calibración: pendiente, coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), valor crítico (T _{cri}), valor calculado (T _r) y comparación entre el valor crítico y el calculado.....	45
Tabla 15. Resultados del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método.....	47
Tabla 16. Resultados de la recuperación de los analitos a diferentes concentraciones, para cada analista.....	48
Tabla 17. Resultados de la repetibilidad del método según el analito	49
Tabla 18. Resultados de la precisión intermedia del método entre analistas	50
Tabla 19. Resultados de los parámetros de la validación y sus criterios de aceptabilidad.	51
Tabla 20. Ecuación de la curva de calibración y el promedio de las áreas de las muestras de mercado	54
Tabla 21. Resultados de las muestras de mercado respecto a cada analito	54
Tabla 22. Criterio de identificación de los analitos respecto al ruido del cromatograma (S/N>3).....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción anual mundial de productos de captura y acuícolas, 1980-2018 [Ref. 1]	1
Figura 2. Toneladas de extracción de trucha arcoíris en el Perú desde 1981 al 2018 [Ref. 1]	7
Figura 3. Porcentaje de extracción de recursos de la acuicultura de origen continental del Perú en el 2017 [Ref. 15]	7
Figura 4. Componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida. [Ref. 55].....	13
Figura 5. Diagrama del proceso de validación de un método analítico. [Ref. 62]	16
Figura 6. Diagramas del proceso de extracción del método del FSIS (a) y del método propuesto en el presente estudio (b). [Ref. 31, 33]	28
Figura 7. Cromatograma de monitoreo de los picos de antibióticos en una matriz fortificada.	40
Figura 8. Curva de calibración de los 10 antibióticos.....	41
Figura 9. Cromatograma del método en matriz fortificada.....	43
Figura 10. Cromatograma del método en matriz blanco.....	43
Figura 11. Gráfica de comparación de las curvas de calibración de los 10 estándares. ..	46
Figura 12. Curvas de calibración de muestras de mercado (a) Enrofloxacino, (b) Ciprofloxacino, (c) Ácido oxolínico, (d) Amoxicilina, (e) Tetraciclina, (f) Clortetraciclina, (g) Oxitetraciclina, (h) Sulfadoxina, (i) Sulfadimetoxina, (j) Florfenicol	53
Figura 13. Cromatograma de los fragmentos de la oxitetraciclina de la muestra 1 del mercado 4	55
Figura 14. Cromatograma de los fragmentos de la oxitetraciclina de la muestra 2 del mercado 4	55

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Catastro acuícola nacional	72
Anexo 2. Equipo de cromatografía líquida acoplada a un detector de masas de triple cuadrupol.....	73
Anexo 3. Procedencia de los estándares de medicamentos	73
Anexo 4. Otros metodos multiresiduos de antibióticos realizados en UHPLC-MS/MS..	74
Anexo 5. Método multiresiduo desarrollado, estandarizado y validado para trucha arcoíris (oncorhynchus mykiss)	76
Anexo 6. Cromatograma de los fragmentos de cada estándar de antibiótico (cuantificación y confirmación).....	81
Anexo 7. Área de la curva de calibración en matriz fortificada de trucha arcoíris	86
Anexo 8. Tabla de valores de la prueba t de student para una distribución de dos colas .	87
Anexo 9. Tratamiento estadístico de la linealidad de la curva de calibración en stata.....	88
Anexo 10. Resultados obtenidos por el analista 1 de los 10 antibióticos del método	92
Anexo 11. Resultados obtenidos por el analista 2 de los 10 antibióticos del método	94
Anexo 12. Tratamiento estadístico de la recuperación	96
Anexo 13. Tratamiento estadístico de la precisión.....	100
Anexo 14. Foto de las muestras de los diferentes mercados.....	104
Anexo 15. Área de la curva de calibración para las muestras de mercado	105
Anexo 16. Tratamiento estadístico de la curva de calibración para las muestras de mercado en stata	106
Anexo 17. Resultados del área cromatográfica de las muestras de mercado.....	110

ABREVIATURAS

DIGESA: Dirección General de Salud Ambiental

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (siglas en inglés)

FDA: Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (siglas en inglés)

FSIS: Instituto de Seguridad Alimentaria de los Estados Unidos (siglas en inglés)

ICH: Conferencia Internacional de Armonización (siglas en inglés)

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (siglas en inglés)

JECFA: Comité Mixto de la FAO y la OMS de Expertos sobre Aditivos Alimentarios (siglas en inglés)

LOD: Límite de detección (siglas en inglés)

LOQ: Límite de cuantificación (siglas en inglés)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCSR: Programa de Control de Sustancias Prohibidas y Residuos de Productos

RASFF: Alerta Rápida para Alimentos y Piensos de la Unión Europea (siglas en inglés)

SANIPES: Organismo Nacional de Sanidad Pesquera

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento (siglas en inglés)

USP: Farmacopea de los Estados Unidos (siglas en inglés)

RESUMEN

Introducción: En el Perú existen protocolos de vigilancia para los residuos antibióticos en el sector alimentario, pero hay rubros en continuo crecimiento que no cumplen con este mismo énfasis de vigilancia como le ocurre a la acuicultura. Ya que a pesar de contar con importantes productos de consumo humano como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), su ente regulador no cuenta con ensayos validados y aceptados para determinar residuos antibióticos en los productos acuícolas. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*, utilizando cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo.

Método: Se desarrolló y validó un método multiresiduo de 10 antibióticos que puede identificar y cuantificar su concentración mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) en trucha arcoíris. Se determinó los parámetros de selectividad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, precisión y rango, basándose en los criterios de aceptabilidad de la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA). Finalmente, con el método desarrollado y validado se evaluó la presencia de antibióticos en muestras de trucha arcoíris adquiridas en 6 diferentes mercados de Lima Metropolitana (Los Olivos, Independencia, Comas, Pte. Piedra, San Martín).

Resultados: Se desarrolló exitosamente el método multiresiduo de antibióticos mediante una técnica analítica de UHPLC-MS/MS, para la determinación de los residuos de antibióticos de interés. El método cumplió con los parámetros de selectividad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, precisión y rango de trabajo descritos en la guía de validación utilizada. Las muestras de trucha arcoíris de los puntos de venta evaluados, sus concentraciones de antibióticos no fueron detectables con este método excepto la muestra obtenida de uno de los mercados (Comas), en las que se detectó trazas de oxitetraciclina.

Conclusiones: El método multiresiduo de antibióticos estudiado es adecuado para la detección de los analitos de interés y su cuantificación en muestras de trucha arcoíris provenientes de acuicultura. Se recomienda su implementación por parte de las autoridades regulatorias, para el monitoreo de la seguridad de los productos destinados para la comercialización en el mercado nacional e internacional.

Palabras clave: Trucha arcoíris, residuos antibióticos, cromatografía líquida/espectrometría de masas, validación

SUMMARY

Introduction: In Peru, there are surveillance protocols for antibiotic residues in the food sector, but there are areas in continuous growth that do not comply with this same vigilance emphasis, as is the case with aquaculture. Despite having important products for human consumption such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), its regulatory entity does not have validated and accepted methods to determine antibiotic residues in aquaculture products. The objective of the current study was to develop and validate an analytical methodology for the determination of ten residues of veterinary antibiotics in *Oncorhynchus mykiss*, using ultra-performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass detector.

Methodology: A multi-residue method of 10 antibiotics that can identify and quantify their concentration in samples of rainbow trout was developed and validated, using the liquid chromatography technique coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). Selectivity, linearity, sensitivity, detection limit, quantification limit, recovery, precision and range parameters were assessed, based on acceptability criteria of the chemical methods validation guide of the Food and Veterinary Medicine Program of the Food and Drug Administration of the United States. The method was additionally applied to samples of rainbow trout purchased from 6 different sales locations in Lima

Results: The method was successfully developed and validated. It met the validation criteria of selectivity, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantification, recovery, precision and working range described in the reference guidelines. Also, veterinary drugs residues concentration of the trout samples from different local markets were not detectable by the method, except for one of the evaluated markets (Comas) that showed oxytetracycline traces.

Conclusions: The reported method is adequate for the detection and quantification of the analytes of interest in aquaculture rainbow trout samples. Its implementation by the national regulatory authorities is recommended to monitor the safety of the products to be sold nationally and internationally.

Keywords: Rainbow trout, antibiotic residues, liquid chromatography/mass spectrometry, validation

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la sociedad se encuentra en la búsqueda de recursos renovables y sostenibles, no sólo en el área energética sino también en el campo alimentario, lo que obedece a la demanda que surge con el aumento de la población global y la disminución de diversos recursos. En los últimos años el sector alimentario, específicamente el área acuícola, ha mostrado una tendencia al crecimiento en su producción a nivel mundial, como se muestra en la **Figura 1** (1,2). Gran parte de ella es empleada en productos de consumo humano directo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2). Según la misma fuente, el porcentaje de productos acuícolas en relación al consumo total de pescado comestible alcanzó el 41% en el 2006, el 51% en el 2015 y el 53% en el 2016. (2)

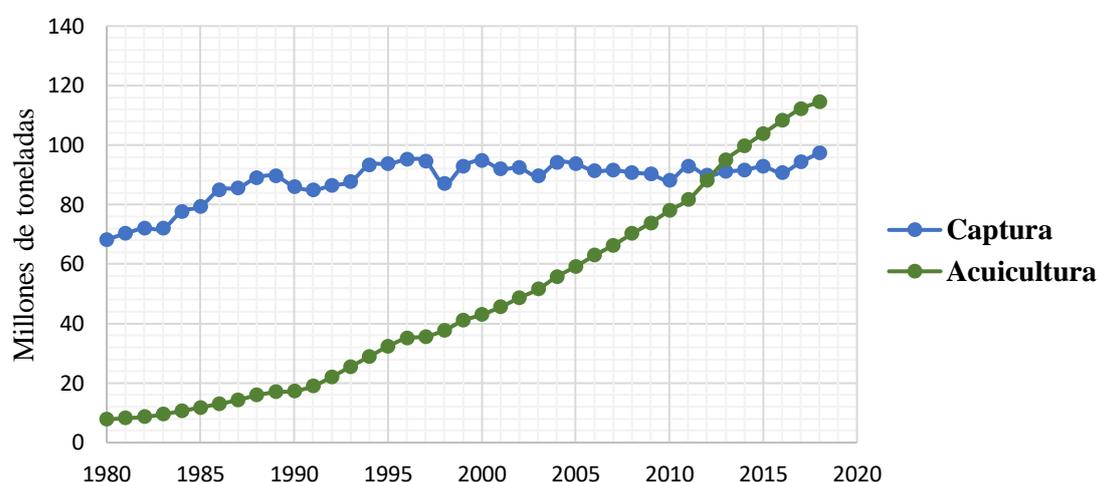


Figura 1. Producción anual mundial de productos de captura y acuícolas, 1980-2018 [Ref. 1]

El crecimiento del sector acuícola exige nuevos retos, uno de los cuales es la prevención y el tratamiento de las enfermedades de los especímenes involucrados a lo largo del proceso productivo, enfermedades que están asociadas a diversas condiciones ambientales y a la exposición de los estanques a focos infecciosos que se difunden rápidamente por el medio acuoso, siendo por tanto difíciles de controlar. (3,4) Esta situación induce al uso de medicamentos profilácticos y terapéuticos para mantener la sanidad de los especímenes acuícolas. (5,6) Sin embargo, el uso de antibióticos en los procesos productivos acuícolas plantea situaciones más complicadas. Una de ellas es la generación de resistencia a los antimicrobianos por parte de la microbiota de los especímenes, que a su vez transmiten esta

característica a otras bacterias, lo que contribuye a la epidemia global de microorganismos resistentes que afecta a la población humana consumidora de estos alimentos. (6,7)

Ante esta situación, las instancias gubernamentales de diferentes países han asumido la responsabilidad de proteger al consumidor implementando diversas medidas. Una de las estrategias de control es la exigencia de regímenes de monitoreo de los residuos veterinarios. (8) Esta exigencia varía de acuerdo con la normativa de cada país. (8,9) En una evaluación de las inspecciones realizadas en Estados Unidos, Canadá y Japón, se mostró que durante el período comprendido entre el año 2000 y el 2009 hubo un incremento de muestras que sobrepasaban los límites máximos (LMR) permitidos de los residuos en productos acuícolas. (9) Una de las posibles explicaciones a dicho incremento sería el uso de métodos de detección más sensibles para la cuantificación de las concentraciones de residuos veterinarios. (9) La Unión Europea por su parte, cuenta con estrategias más estrictas, que involucran el muestreo de por lo menos el 1% de los productos importados, porcentaje que aumenta en caso de que haya sospecha de contaminación. (8) De confirmarse la presencia de los residuos de medicamentos como antibióticos, se activa un sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) a toda la Unión Europea. Esta detección produce, en algunos casos, la suspensión de la importación de los productos involucrados por un determinado período. (8,9)

En Europa los antibióticos permitidos para uso en la acuicultura son oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacino, eritromicina y sulfonamidas (potenciadas con trimetoprim u ormetoprim) y en los Estados Unidos se permite el uso de cloramina-T, formalina, peróxido de hidrógeno, clorhidrato de oxitetraciclina, florfenicol, oxitetraciclina dihidratada y sulfadimetoxina/ormetoprim. (6,10)

En un estudio realizado en Vietnam, uno de los países que más exporta productos acuícolas en el mundo, se evidenció que los antibióticos más utilizados son los del grupo de las tetraciclinas. (11) Otro grupo de antibióticos utilizados en diversos países corresponde a las fluoroquinolonas, prohibidas por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) en animales productores de alimentos. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la vigilancia cuidadosa de medicamentos como fluoroquinolonas, cefalosporinas y macrólidos en el contexto de su uso en animales. (11,12)

Chile, nuestro país vecino, ha incrementado el uso de antibióticos, práctica que obedece al crecimiento de la producción acuícola, específicamente en lo que respecta al salmón. (13) Evidencia de ello es el incremento en las cifras de importación de antibióticos del grupo fenicoles para uso veterinario. (13)

En el Perú, de acuerdo con las estadísticas oficiales, la producción acuícola se ha incrementado en 10,7% durante la última década. (14) Las especies cultivadas más representativas en el 2017 fueron la trucha, la concha de abanico y los langostinos. (15) Al igual que otros países, Perú cuenta con sus propias regulaciones, que especifican los LMR de los medicamentos veterinarios, así como una lista de sustancias prohibidas, a fin de garantizar la inocuidad de estos productos. (16) La entidad encargada de la fiscalización, del control de calidad y de hacer cumplir las regulaciones, es el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). Esta entidad realiza los análisis de control de calidad de los productos hidrobiológicos, aunque algunos de los ensayos de laboratorio son derivados a sus entidades de apoyo. (17) Actualmente, Inspectorate Services Peru S.A.C es la única entidad de apoyo que dispone de un método de residuos veterinarios, el cual es específico para la determinación de antihelmínticos en crustáceos y peces, exceptuando los túnidos. (18)

El impacto negativo de la presencia de residuos de antimicrobianos veterinarios en la salud humana ha sido detectado hace ya un tiempo. Consiguientemente, se implementaron los primeros ensayos para su detección. (19) Estos análisis se realizaban en placas de ensayo, metodología que consistía en enfrentar la matriz (muestra del producto que se desea analizar) con un microorganismo específico, con el propósito de evidenciar la presencia o ausencia del antibiótico. (19) Esta metodología era de utilidad para los análisis cualitativos preliminares que sirven de guía para los análisis cuantitativos, que requieren técnicas más específicas. (19,20)

La aparición de nuevas tecnologías dio paso a análisis cuantitativos más exigentes para los residuos veterinarios de antimicrobianos. El punto crítico de estos análisis es el proceso de separación de los residuos veterinarios con los componentes de la muestra analizada (proteínas, carbohidratos y lípidos), que dificultan la identificación y cuantificación del residuo, si no son correctamente extraídos durante la preparación de la muestra. (21,22) En una muestra podrían encontrarse diferentes residuos de medicamentos y la técnica

apropiada para su separación sería una cromatografía líquida o gaseosa, aunque esta última tiene como dificultad la derivación hacia una molécula volátil, considerando que no todos los compuestos son volátiles. (21,22) Por ello lo más aconsejable es el uso de cromatografía líquida, que utiliza las polaridades de los analitos para lograr su separación y no necesita que los compuestos sean volátiles. (22)

La polaridad del compuesto está directamente ligada a su solubilidad. Los medicamentos son moléculas polares o se busca que sean polares, considerando que deben alcanzar una concentración en el torrente sanguíneo suficiente para llegar al tejido diana y cumplir así con la efectividad deseada. (22,23) Conocer la polaridad de la molécula contribuye a determinar el tipo de solventes, columnas y fases móviles más indicados que se utilizarán en la cromatografía líquida.

Otro aspecto importante a considerar es el tipo de detector al que se acoplará la cromatografía líquida para detectar mínimas cantidades de residuos y así asegurar que se trata de la molécula deseada. Para ello se requiere equipos suficientemente sensibles y específicos. Existen diferentes tipos de equipos acoplados a la cromatografía líquida, con sus propiedades como su rango de aplicabilidad o mínimas cantidades detectables dependiendo del compuesto. (24,25) Los detectores de mayor sensibilidad son los de fluorescencia, electroquímicos y de masas, que se utilizan en compuestos fluorescentes, compuestos oxidables y compuestos orgánicos, respectivamente. (24–26) En este contexto, el espectrómetro de masas sería el adecuado para el análisis de moléculas orgánicas tales como los residuos veterinarios y aparte están constantemente mejorando su alcance de detección a través de sus analizadores de masas. (24,26)

Actualmente, la espectrometría de masas cuenta con sofisticados analizadores de masa, con alta especificidad y sensibilidad, por lo que se la considera como un método confirmatorio. (26) Uno de los analizadores de masas es el de tiempo de vuelo (Q-TOF), muy preciso y de alta resolución. (27) Sin embargo, el analizador de masas más utilizado en numerosos estudios de análisis de residuos de medicamentos veterinarios es el analizador de cuadrupolo, debido a que presenta una alta selectividad y sensibilidad. (27,28) En algunos casos en los que no se puede discernir dos moléculas de interés por la similitud de sus masas, la cromatografía líquida es de ayuda para diferenciarlas por su tiempo de retención. (27)

La cromatografía líquida acoplada a un detector de masas con triple cuadrupolo (LC-MS/MS) es la metodología actualmente más utilizada para el desarrollo de métodos de análisis de multiresiduos. (28,29) Ello se debe a que es capaz de realizar un monitoreo de barrido completo, vale decir que logra ser selectiva en una mezcla de analitos e identifica individualmente a cada uno de ellos. (29) La técnica se basa en la separación de los analitos mediante la cromatografía líquida. Posteriormente los analitos eluidos son llevados a una fuente de iones, donde son ionizados para ser expuestos a un voltaje determinado. (28) Esto les permite tener una trayectoria en particular para ser diferenciados e identificados por el analizador, según la masa/carga del analito ionizado. (28) Seguidamente, el analito ionizado atraviesa una celda de colisión, a partir de la cual se obtienen los fragmentos (iones productos) detectados por el equipo, confirmando así su presencia y la cantidad en la que se encuentran. (28) Esta metodología es la utilizada por instituciones como el Instituto de Seguridad Alimentaria de los Estados Unidos (FSIS) e instituciones de países europeos en los que se investigan nuevos métodos multiresiduos. (30–33)

Por lo señalado anteriormente, se considera importante desarrollar un método de detección de multiresiduos veterinarios, específicamente residuos antibióticos, en un producto acuícola de interés comercial como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ACUICULTURA

La acuicultura se define como la cría de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (33). La crianza implica que hay intervención de un individuo o corporativo que se encarga de la alimentación, saneamiento, protección y de todo lo que abarque la mejora de la producción de los organismos involucrados. (34) La acuicultura se desarrolla en diferentes ambientes o sistemas, tales como una base terrestre que abarca estanques, arrozales y otras instalaciones construidas sobre tierra firme; sistemas de aguas libres continentales incluyendo diques, embalses, lagos y ríos; así como sistemas de aguas litorales y marinas que comprenden estuarios, alta mar, bahías y caletas. (35)

La acuicultura continental tiene sus orígenes en el siglo XX y su desarrollo ha sido impulsado en buena medida por la disminución en el rendimiento de la pesca extractiva, que se ha visto afectada por la sobrepesca y por el cambio climático. (34) En cambio, la acuicultura costera tiene una historia que se remonta a un pasado remoto, pudiendo encontrarse evidencia de la misma incluso desde los tiempos de la cultura egipcia. (34)

Ya en tiempos más recientes y particularmente desde la década de 1970, la producción proveniente de la acuicultura ha alcanzado un crecimiento mayor que cualquier otro producto alimentario, lo que se ha debido sobre todo a su impulso por parte de los países asiáticos, en especial de China, país que se ha constituido en una potencia en esta actividad. (2,34)

En el Perú la acuicultura convencional tal como se la ha definido se inició en 1934 y la primera especie dulceacuícola cultivada fue la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la cual es cultivada en regiones de la sierra como Puno, siendo este máximo productor de esta especie. (15,35) La acuicultura ha seguido una tendencia creciente y las especies cultivadas más relevantes aparte de la trucha son las conchas de abanico en Piura, Ancash e Ica; los langostinos en Tumbes y Lima aunque estas especies son de la acuicultura marítima mientras que de la acuicultura continental las especies representativas son el paco, la gamitana, la tilapia y el paiche, las cuales suelen producirse en regiones de la selva del Perú.(15,36).

2.1.1. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arcoíris es una especie de pez de aguas continentales, originaria de los ríos y lagos de Norte América al oeste de las Montañas Rocosas y pertenece a la familia *Salmonidae*. Es de fácil adaptación debido que soporta temperaturas de hasta 25°C, aunque su naturaleza es de aguas frías, y porque además tolera grandes rangos de salinidad. (37,38) Es un pez carnívoro y se suele alimentar de moluscos, crustáceos, gusanos, renacuajos y peces pequeños, por lo que cuando depende de alimento artificial requiere mayor proporción de proteínas. (38)

La adaptabilidad de la trucha ha facilitado su cultivo en diversos departamentos del país, tal como se puede apreciar en el **ANEXO 1**. (39) Y según los datos de la FAO a través del tiempo la trucha ha ido incrementando su producción anual en el país (ver **Figura 2**) y en el anuario estadístico del Ministerio de la Producción publicado en el 2018, la trucha es de lejos la especie acuícola más producida en el Perú (ver **Figura 3**). (15)

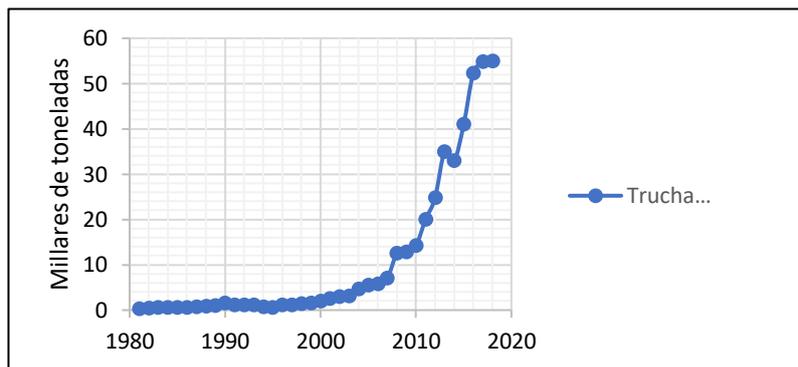


Figura 2. Toneladas de extracción de trucha arcoíris en el Perú desde 1981 al 2018 [Ref. 1]

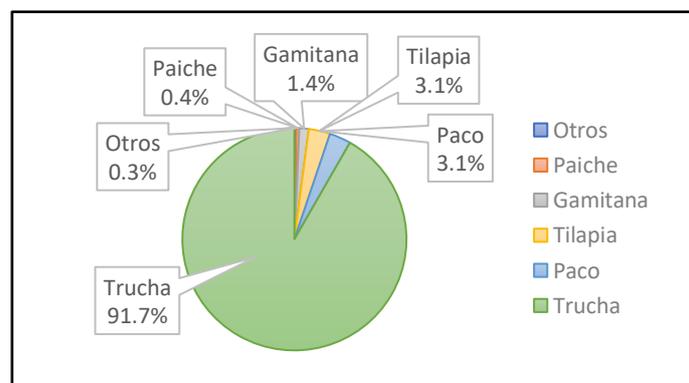


Figura 3. Porcentaje de extracción de recursos de la acuicultura de origen continental del Perú en el 2017 [Ref. 15]

En el país la crianza de la trucha se desarrolla en estanques de concreto, en pozas cerradas o en jaulas flotantes, siendo la última modalidad muy usada en la región Puno. (40) Sin embargo, mantener con éxito una biomasa de peces en determinado lugar exige disponer de una adecuada infraestructura, buena calidad de agua circulante, realizar una limpieza regular de los estanques o jaulas, así como de otros factores que disminuyan la posibilidad de que los peces contraigan una enfermedad. Entre las enfermedades que afectan a los peces se puede mencionar las no infecciosas y las infecciosas. Las primeras incluyen a aquellas relacionadas con situaciones de estrés y a factores nutricionales, mientras que en las infecciosas se incluyen las enfermedades ocasionadas por patógenos diversos como virus, bacterias, hongos y parásitos. (38,40) Las enfermedades infecciosas más comunes en truchas son las bacterianas, entre ellas la aeromoniasis, la enfermedad del agua fría, así como la enfermedad entérica de la boca roja. (38,40) Entre las virales se cuentan la necrosis hematopoyética y la pancreática. Entre las que debe mencionarse a la saprolegniosis y la ictiofoniasis. (38,40) SANIPES tiene registradas a las mencionadas causas infecciosas en su programa oficial de vigilancia y control de enfermedades de la trucha. (38,40,41)

Estudios realizados en diversas regiones del país muestran casos de enfermedad de aguas frías en Puno y Huancayo, la cual es causada por *Flavobacterium psychrophilum*, así como la enfermedad entérica de la boca roja en Huaraz, ocasionada por *Yersinia ruckeri*. (42–44) Por otra parte, un estudio reciente de evaluación de 90 piscigranjas del Lago Titicaca determinó que la causa primaria de mortalidad de las truchas era estacional, pero que las secundarias tenían relación con enfermedades bacterianas, seguidas en menor medida por enfermedades fúngicas. (38) Las mencionadas enfermedades están muy probablemente asociadas a deficientes condiciones sanitarias de los estanques o jaulas, pues se ha verificado que en las jaulas hay crecimiento de biofilm, que constituye un reservorio para microorganismos patógenos, los mismos que evitan el paso del agua, evitando así una adecuada oxigenación de los peces y propiciando la acumulación de desechos. (4) Para combatir las situaciones asociadas a contaminaciones como las mencionadas, los acuicultores utilizan productos medicamentosos o de desinfección que están permitidos y que se encuentran en la lista de SANIPES, institución responsable de proporcionar el registro sanitario. En nuestro país hay en total 32 productos con registro sanitario vigente, dentro de los cuales se encuentran antibióticos, antiparasitarios, acondicionadores de agua y antisépticos. En la **Tabla 1** se muestra los antibióticos con registro sanitario. (45)

Tabla 1. Medicamentos con registro sanitario en SANIPES

Producto	Principio activo	Registro Sanitario
TM-700	Oxitetraciclina	PV-PHI004I15TM70-SANIPES
Terrivet 80%		RSPV0006ITR
Oxi-Blend 50		RSPV0001IOI
Duflosan 50%	Florfenicol	PV-VET005I15DFOA-SANIPES
Flor-Blend aqua		RSPV0004IFO
Aquaflor 50 %		RSPV0009IAU
Enro-blend aqua	Enrofloxacino	RSPV0003IER
Magnam mix aqua	Fosfomicina	RSPV0005IMG

Fuente: SANIPES, 2020 [Ref. 45]

2.1.2. Residuos veterinarios

En 1956 se conformó el Comité de Aditivos de los Alimentos, un comité conjunto de la FAO y la OMS, conocido por sus siglas en inglés como JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), cuyos miembros son los encargados de evaluar la seguridad de los aditivos, toxinas y residuos veterinarios que pueden contaminar los productos alimentarios. Este Comité también tiene a su cargo la determinación de los niveles de ingesta diaria admisible de dichos componentes. Para determinar los límites, el Comité evalúa primero las características detalladas del aditivo, tales como sus características fisicoquímicas, farmacológicas, metabólicas, toxicológicas, su ingesta diaria normal, entre otras variables. Al final del proceso el Comité genera reportes que luego de su aprobación son publicados por el Codex Alimentarius, con recomendaciones a los gobiernos para el seguimiento de las pautas establecidas. (46)

Los productos de la acuicultura también son controlados, a fin de determinar la presencia de los residuos veterinarios que quedan como remanentes después de su uso. Los antibióticos utilizados a menudo de manera profiláctica para disminuir la mortalidad de los peces, suelen ser administrados en los alimentos, en baños e inyecciones. Los antibióticos residuales que quedan en el sedimento ejercen una presión selectiva, cambiando la microflora del ambiente. (7,47) Esta microflora se vuelve más resistente a los antibióticos y los genes de resistencia pueden ser transmitidos a otras bacterias. (47,48) Además se ha detectado que algunas bacterias patógenas de los peces tienen resistencia antibiótica a

medicamentos comúnmente usados en la acuicultura como el florfenicol y la tetraciclina.

(7) En este caso, las bacterias de los sedimentos han llegado a transmitir sus genes resistentes a bacterias propias de los peces. (7) Actualmente se promueve el uso de probióticos en un intento por disminuir el uso de antibióticos, pero estos microorganismos no están exentos de adquirir también genes de resistencia provenientes de las bacterias de los sedimentos. (48)

Por otra parte, los antibióticos al ingresar al organismo humano pueden alterar la microflora humana, incrementando la susceptibilidad a infecciones por gérmenes diversos y también al desarrollo de alergias o de problemas de toxicidad, especialmente en el personal de las empresas acuícolas. (7)

2.1.3. Normativas sobre residuos veterinarios en productos acuícolas

Todos los países disponen de criterios sobre los límites máximos de residuos (LMR) de diversos compuestos, incluidos los residuos veterinarios. Los límites máximos son relativamente homogéneos entre las diferentes normativas internacionales en el caso de la Comunidad Europea considera que LMR permitido es en músculo y piel mientras que en el Codex Alimentarius se refiere que es solo en músculo de pescado.(49–51) En el caso del Perú, en lo que respecta a los antibióticos, también sigue ese patrón en su lista publicada el 2008 sobre los límites máximos de residuos de diversas de sustancias controladas pero no describe exactamente el tejido al que corresponde los LMR (ver *Tabla 2*). (16,50–52)

En el 2016, la Dirección General de Salud ambiental (DIGESA), encargada del control de calidad de los productos alimentarios, publicó su lista de límites de residuos de medicamentos en músculo y piel en proporciones naturales del pez. (52) Un año después, SANIPES publicó nuevamente una lista de sustancias controladas, pero esta vez agregando la clortetraciclina, tetraciclina, griseína y bacitracina en la sección de antibióticos, aunque sin especificar los LMR, lo que hace suponer que se mantenía los parámetros del 2008. (53)

Tabla 2. Límite de residuos veterinarios según la Unión Europea, el Codex Alimentarius y SANIPES

Residuos medicamentosos	Límites máximos de residuos - LMR ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			
	Comunidad Europea (2009)	Codex Alimentarius (2018)	DIGESA (2016)	SANIPES (2008)
*Ácido oxolánico	100		100	100
*Amoxicilina	50	50	50	50
Ampicilina	50	50	50	
Bencilpenicilina	50		50	
Benzoato de Emamectina	100	100	100	100
*Ciprofloxacino				100
*Clortetraciclina	100	200	100	
Cloxacilina	300		300	
Colistina	150		150	
Deltametrina	10	30	30	
Dicloxacilina	300		300	
Difloxacino	300		300	
*Enrofloxacino	100		100	100
Eritromicina	200		200	200
Espectinomicina	300		300	
*Florfenicol	1 000		1000	1000
Flumequina	600	500	500	150
Lincomicina	100		100	
*Oxitetraciclina	100	200	200	100
Paromomicina	500		500	
*Sulfonamidas	100	100	100	100
*Tetraciclina	100	200	100	
Teflubenzurón		400	500	
Tianfenicol	50		50	
Tilmicosina	50		50	
Tilosina	100		100	
Trimetoprima	50		50	

*Antibióticos usados en el presente estudio.

Fuente: [Ref. 16,50-53]

2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cromatografía líquida es una técnica analítica que permite separar las moléculas a través de diferentes modos como la adsorción, la partición, el intercambio iónico, el tamaño de partícula y la afinidad. (54) Para ello, la muestra en cuestión debe estar disuelta en algún líquido soluble, de modo que se la pueda aplicar en una placa o columna, que contiene la fase estacionaria y a la que se le aplica un disolvente llamado fase móvil, que fluye y arrastra las moléculas a través de la fase estacionaria, pudiéndose entonces separar, identificar y cuantificar los compuestos de la muestra solubles en disolventes. (55) La técnica se basa en características del analito como su polaridad, su carga y su tamaño, para determinar la fase móvil y la fase estacionaria que sean adecuadas para una buena separación. (54,55) Para separarlas por su polaridad, las dos fases mencionadas deben ser de diferente polaridad. Si la fase móvil es apolar, la fase estacionaria deberá ser polar y a esta situación se la llama fase normal, mientras que si la fase estacionaria fuera apolar, se la llamaría fase reversa. (55)

En el caso de las cargas, la separación se basa en el principio de que cargas diferentes serán atraídas y por ello la fase estacionaria es intercambiador iónico débil y de carga opuesta al analito. Esta unión no debe ser fuerte, puesto que requeriría mayor fase móvil para competir y separar los analitos, lo que normalmente es usado en la separación de proteínas. (54,55) La separación por exclusión de tamaño se basa en el principio de que la fase estacionaria está compuesta por partículas con poros, los cuales presentan un tamaño determinado. Al ingresar los analitos son retenidos en función de su tamaño por estas partículas y los demás compuestos son liberados a través de la columna. (54,55)

Anteriormente se lograba pasar el flujo de la fase móvil por las columnas utilizando la gravedad y el vacío. (55) Las nuevas columnas son llamadas cartuchos, que son pequeñas columnas de material de acero, plástico y vidrio compuestas de una fase estacionaria denominada fase de extracción sólida (SPE), que pueden ser de tamaños menores a 10 micras y por ende requieren soportar altas presiones para hacer fluir la fase móvil y no obstruir el cartucho. (55) Este tipo de columnas requieren presiones altas de 6000 psi (400 bar), razón por la cual se denominó a la técnica relacionada con ellas cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aunque actualmente se la conoce como cromatografía líquida de alto rendimiento. (55)

Los equipos actuales que utilizan el sistema de cromatografía líquida tienen como componentes básicos un depósito con disolvente (la fase móvil), una o varias bombas de alta presión que sirven para suministrar el disolvente hasta la columna con un flujo específico (mL/min), un inyector de muestra que introduce la muestra al flujo de la fase móvil, una columna o cartucho cromatográfico que tiene el SPE, indispensable para separar los analitos y un detector que da señales electrónicas para graficar el cromatograma, que es una gráfica bidimensional donde se visualiza la intensidad de la señal y el tiempo de retención de los analitos y va graficándose según el orden en que salen los analitos con el disolvente de la columna (ver **Figura 4**). (55) Hay diversos detectores, que se seleccionan de acuerdo con las características de las moléculas y con el límite de detección que se requiera. Si la molécula puede absorber luz ultravioleta (UV), entonces se usará un detector de absorbancia de luz UV. Si puede emanar fluorescencia, entonces se usará un detector de fluorescencia. (55) Entre los diversos detectores, el detector de espectrometría de masas es el más útil, porque puede distinguir las moléculas por su masa, característica invariable y porque además tiene un buen límite de detección, (27,55) aunque lo mejor sería disponer de detectores múltiples que brinden la mayor información posible acerca de la molécula.

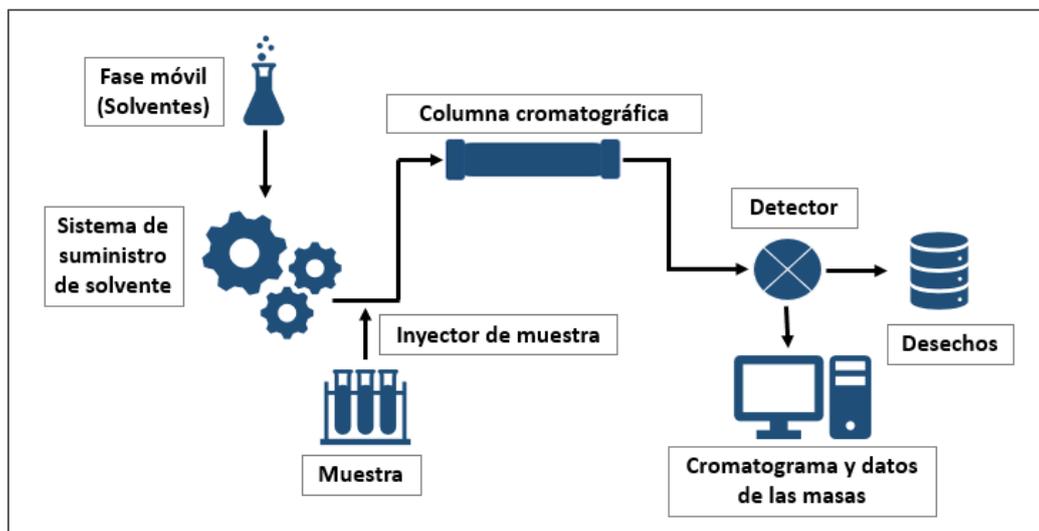


Figura 4. Componentes básicos de un sistema de cromatografía líquida. [Ref. 55]

En el 2004 surgieron nuevas columnas con partículas más pequeñas, de unas 1.7 micras de relleno, mejorando así la resolución, la velocidad y la sensibilidad, pero con el requerimiento de una presión de 15000 psi (1000 bar), dando paso de este modo a la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UHPLC). La técnica experimenta cada vez más

mejoras con el tiempo y de hecho se ha constituido en una de las alternativas más útiles en las investigaciones de química analítica. (55)

2.2.1. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas identifica la masa molecular a través de la medición de los fragmentos, para poder determinar las moléculas. (56) Esta técnica analítica consiste en ionizar la molécula y formar un flujo de corriente que pasa por una abertura estrecha a un tubo de vuelo de alto vacío que tiene un imán. (56) Cuando el haz de iones ingresa al campo magnético creado por el imán, los iones modifican su trayectoria, la misma que dependerá de su relación masa-carga (m/z). (56) Los iones con una masa particular logran pasar el tubo de vuelo y son registrados por un detector. (56) La señal eléctrica de los iones que capta el detector es proporcional al número de iones que ingresan y se representa en un espectro de masas, el cual grafica la masa del fragmento ionizado del analito en el eje x y la abundancia de los iones en el eje y, denominándose al pico más abundante el pico base. En la actualidad los componentes básicos de la espectrometría de masa son el inyector de la muestra, la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector de iones. (28)

De ellos, la fuente de iones y el analizador de masas son los que mejoran la selectividad y sensibilidad de esta técnica. (28) La ionización de las moléculas es esencial, puesto que sólo así se puede detectar la masa del analito mediante este método. Existen diversas formas de ionizar las moléculas y en caso esta técnica analítica esté acoplada a una cromatografía líquida, las mejores formas de ionizar serían las siguientes:

Ionización por electrospray (ESI): Es un proceso eficiente de ionización de moléculas por presión atmosférica. La muestra se encuentra disuelta en solvente polar y pasa a través de un capilar que puede tener un voltaje de 2000 a 4000 V. (57) El líquido se atomiza a medida que sale del capilar a presión atmosférica, las gotas se desolvatan y se liberan iones que fluyen hacia el espectrómetro de masas. (57) Esto es denominado fisión de Coulomb y ocurre hasta que quedan gotitas que contienen un solo ion analito, mientras que el disolvente se evapora, de modo que al final sólo quedan iones en fase gaseosa. (57)

Ionización química a presión atmosférica (APCI): Esta forma de ionización sirve para los analitos que resisten la ionización por ESI, que son normalmente analitos menos polares y más volátiles. (57) La ionización química se basa en la transferencia de carga de una especie reactiva a un analito neutro, para producir un ion analito mientras la fase móvil se transforma en fase gaseosa. (57)

El analizador de masa sirve para separar o diferenciar los iones y existe una gran variedad de ellos, de los cuales el más utilizado para detectar residuos o contaminantes de alimentos es el triple cuadrupolo debido a su robustez y relativo bajo costo, comparado con otros analizadores como la trampa de iones o de tiempo de vuelo. (28) El triple cuadrupolo o tándem (MS/MS) no es más que la adición de un cuadrupolo adicional, es decir, dos cuadrupolos y en medio de estos dos cuadrupolos se encuentra la celda de colisión que fragmentará los iones moleculares con un gas como el argón, para obtener los fragmentos del ion molecular. (57) Un cuadrupolo se compone de 4 barras metálicas conectadas eléctricamente, a las que se les aplica un voltaje. A voltajes particulares sólo los iones con cierta masa presentarán una trayectoria específica que les permitirá ser detectados, mientras que los demás son expulsados de la celda. (28,57) Al finalizar se puede obtener el espectro de masas en una computadora.

2.2.2. Efecto matriz

Es un efecto conocido en la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas y se refiere a la influencia de los componentes de la matriz, que pueden interaccionar con los analitos, logrando el aumento o la disminución de la señal de éstos al momento de la medición, en comparación con la señal de los analitos en solución, lo que puede deberse a las moléculas de la matriz que también se pueden ionizar y pueden competir con los analitos. (58) La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recomienda hacer una prueba del efecto de matriz realizando una curva de calibración en matriz enriquecida con la concentración de los analitos y compararla con una curva de calibración de los analitos en solución, para determinar si hay una diferencia significativa. (59) Si se determina la presencia de un efecto matriz significativo, la guía de validación del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura de Chile (SERNAPESCA) recomienda el uso de la calibración en matriz para minimizar sus efectos. (60)

2.3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es un paso fundamental para poder utilizarlo en la implementación de los análisis, ya que con ello se asegura que los resultados de dichos ensayos sean más fiables. La validación busca determinar que el método sea adecuado para los fines que se le va dar, para lo cual se evalúa su desempeño y su consistencia a través de los datos experimentales. (61,62) Un laboratorio debe validar un método siempre y cuando el procedimiento haya sido diseñado por el propio laboratorio, este no se encuentre

normalizado o sea normalizado, pero se le haya realizado modificaciones relevantes. (61,62) En caso que el método fuera normalizado, sólo requeriría una verificación, para corroborar si el laboratorio domina el método, para lo cual se debe realizar trabajos experimentales. (61,62) También ha de tenerse en cuenta que la validación debe tener un orden de trabajo y debe incluir el método para realizar dicho plan de validación. (62) En la **Figura 5** se muestra un diagrama básico del proceso de validación o verificación en un laboratorio.

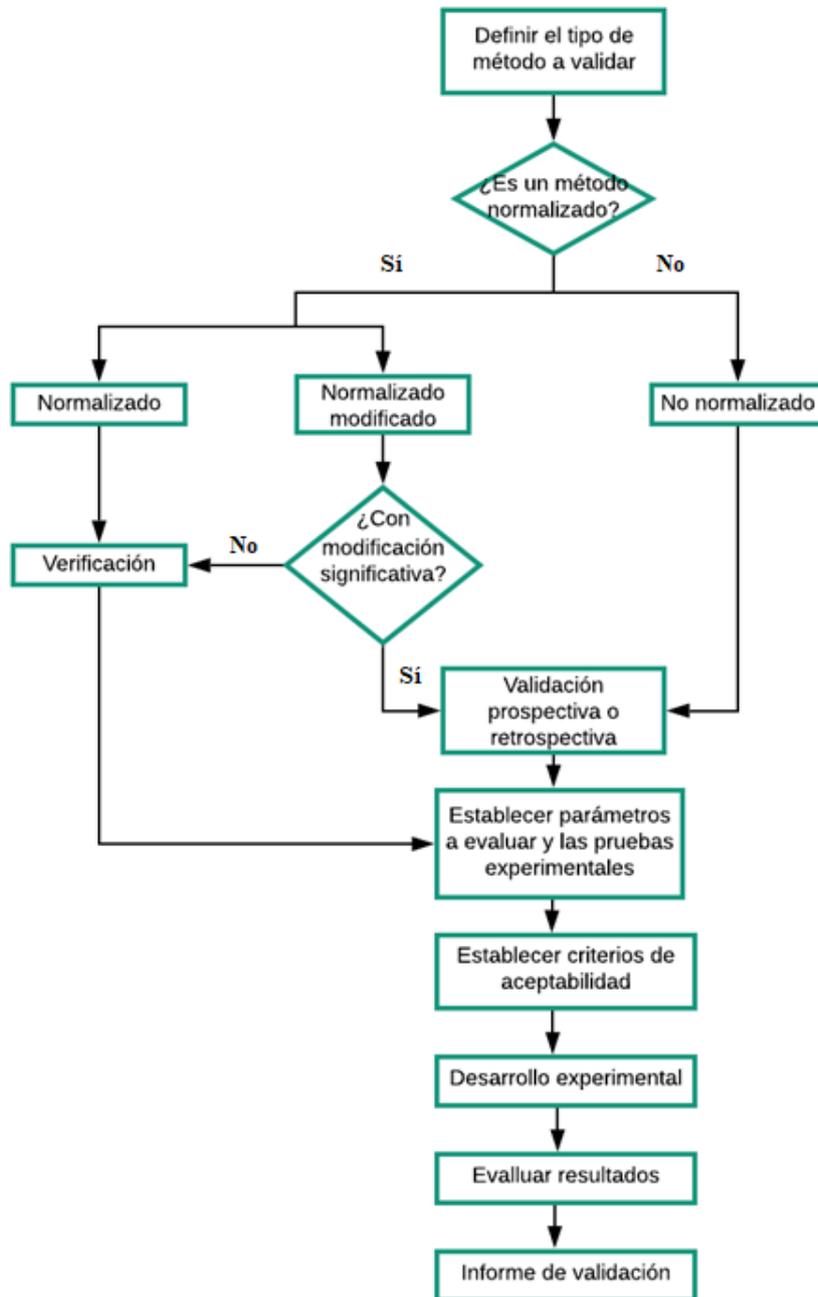


Figura 5. Diagrama del proceso de validación de un método analítico. [Ref. 62]

La validación de métodos requiere una serie de parámetros que son los mismos en casi todas las validaciones. Estas pequeñas diferencias varían según la guía que se utilice. Esta puede orientarse a un área en particular, como la guía del Consejo Internacional de Armonización de Requisitos Técnicos para Fármacos (ICH), que está orientada a métodos bionalíticos para medicamentos de uso humano. (63) La guía europea SANTE/12682/2019 en tanto, se enfoca en métodos para la determinación de pesticidas en alimentos, la guía de SERNAPESCA de Chile se centra en la validación de productos hidrobiológicos. (60,64) La FDA y el Codex Alimentarius tienen también una guía para alimentos. (58,65) Resulta claro entonces que puede haber varias guías para un área en específico. También hay guías más generales como la guía de la IUPAC, que valida métodos químicos analíticos en general. (59)

Los parámetros que se utilizan dependen del tipo de aplicación del método, como por ejemplo la identificación del analito a través de un método cualitativo o de uno cuantitativo. Dichos parámetros dependen también de si el ensayo es un método microbiológico, un método de ligandos que se utiliza en ensayos inmunológicos o un ensayo químico con métodos cromatográficos. Las guías correspondientes describen las diferencias que se deben determinar, dependiendo del tipo de ensayo a validar. En la **Tabla 3** se muestra los parámetros de validación para métodos cromatográficos, según la guía de la FDA y la aplicabilidad cuantitativa o cualitativa del ensayo.

Tabla 3. Parámetros de validación según la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos de Medicina Veterinaria de la Agencia Federal de Alimentos y Drogas (FDA).

Método Cuantitativo	Método Cualitativo
Confirmación de identidad del analito	Confirmación de identidad del analito
Selectividad	
Linealidad	Sensibilidad
Sensibilidad	
Límite de detección	Selectividad
Límite de cuantificación	
Veracidad	Falso positivo
Recuperación	
Precisión	Falso negativo
Rango	
Incertidumbre	Concentración mínima detectable y robustez
Robustez	

Fuente: FDA, 2019 [Ref. 58]

Los parámetros de validación evalúan los resultados de las pruebas realizadas al método para asegurar que dicho método es confiable para su uso en muestras y sus definiciones generales se muestran a continuación:

- **Selectividad/Especificidad:** Se describe como el grado en que el método determina analitos específicos en una mezcla o en la matriz, a pesar de la presencia de interferentes con comportamiento similar a los analitos, considerándose un método como buen método analítico si logra discernir los interferentes. (58,59) En química analítica la selectividad se denomina generalmente especificidad. (58)
- **Linealidad:** Describe la capacidad de un método para brindar resultados proporcionales a la cantidad del analito que se encuentra en la muestra y debe cumplir con la exigencia de estar en el rango que se prueba. (58) El criterio de aceptación son el coeficiente de correlación r y el coeficiente de determinación r^2 . Los valores límites que puede alcanzar el coeficiente de correlación son -1 y 1 . (62,66) El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. (62,66) Cuando $r=0$, no existe correlación alguna y hay independencia total de los valores X e Y. (62,66)
- **Sensibilidad:** Es la variación de la respuesta del instrumento según las diferentes cantidades medidas (por ejemplo, diferentes concentraciones de analito). (58)
- **El límite de detección (LOD):** Es la menor cantidad o concentración de analito en la matriz que se puede distinguir confiablemente. (58)
- **El límite de cuantificación (LOQ):** Es la menor cantidad o concentración de analito en la matriz que se puede cuantificar con precisión aceptable. (58) Este valor debe ser mayor que la menor cantidad detectable y suele definirse arbitrariamente como diez veces la desviación estándar que se utilizó en el límite de detección. (59,60)
- **Veracidad:** Es la cercanía entre el valor medio de una serie de mediciones con el valor verdadero o el valor de referencia, el mismo que se puede hallar a través del sesgo o la recuperación. En el estudio se utilizó el criterio de recuperación, ya que es el más usado para validar métodos en LC-MS/MS. (58,62)
- **Precisión:** Es la cercanía entre los resultados de diversas pruebas independientes obtenidos bajo las mismas condiciones. (58) La precisión se suele describir mediante la desviación estándar o un límite de confianza de los resultados. (58) La precisión también se puede clasificar entre diferentes pruebas como la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad. (58) La repetibilidad es obtenida bajo condiciones

controladas para analizar los resultados de pruebas independientes que se obtienen con el mismo método, la misma instalación, el mismo operador y más factores, es decir, tratando de reproducir las mismas circunstancias para todos los ensayos (58,62). Mientras que la precisión intermedia debe tener al menos una variación de estas circunstancias que puede referirse a diferentes analistas, equipos, reactivos, intervalos de tiempo u otros cambios. Y la reproducibilidad es mantener el ensayo analítico, pero en otras instalaciones.

- **Rango:** Es el intervalo de concentración donde el método proporciona mayor exactitud y precisión. (58)

2.4. METODOLOGÍA DE METODO MULTIRESIDUOS

En efecto las drogas veterinarias se pueden encontrar en diversos productos alimentarios de origen animal como las carnes, los pescados, la leche, los huevos y más productos de derivados cárnicos. Y los residuos de estas drogas veterinarias pueden ser sus metabolitos, sus metabolitos conjugados y hasta las mismas drogas sin metabolizarse, aunque por lo regular se trata de detectar las drogas de origen. (29)

Para detectar estos residuos es muy común utilizar métodos de cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS) debido a que se puede realizar una exploración más amplia de residuos comparada a otras técnicas, por ello, el Instituto de Seguridad Alimentaria de los Estados Unidos (FSIS) tiene una lista de métodos basadas en LC-MS y hay diversos estudios que agrupan una variedad de medicamentos para su detección en distintos productos alimentarios. (28,29,31)

El método realizado por la FSIS para residuos veterinarios es de acceso público comparado a otros métodos de organizaciones reconocidas y su desarrollado ha sido publicado en investigaciones científicas en la cual compararon cinco procedimientos de extracción y evaluaron la recuperación de diversos analitos. (20) También han logrado ampliar su número de analitos hasta 99 medicamentos entre ellos antibióticos, antihelmínticos, antiinflamatorios, entre otros. (31,33) Pero se debe remarcar que este método se enfoca en productos cárnicos como la mayoría de investigaciones mientras que para productos acuícolas no se encuentran una gran variedad de publicaciones. (27,29)

Estos métodos multiresiduos difieren en la forma de extracción de los residuos, pero se encuentra ciertas similitudes entre sus parámetros de cromatográficos y espectrométricas en diversas investigaciones.

2.5. JUSTIFICACIÓN

En el Perú el consumo y exportación de los productos acuícolas y en especial de la trucha arcoíris han aumentado a lo largo del tiempo y como cualquier producto de consumo humano, requiere pasar por diversos controles de calidad para asegurar su inocuidad y poder llegar así al mercado de destino cumpliendo con las regulaciones sanitarias correspondientes. Entre los diversos controles de calidad que se realiza a los productos acuícolas se encuentran los ensayos para detectar el nivel de residuos de medicamentos, lo que está descrito en el procedimiento del Programa de Control de Sustancias y Residuos (PCSR). (53) El PCSR no especifica el cronograma de recolección de muestras para el análisis de estas sustancias, pero explica que extrae sólo el 1% de la producción anual para tal propósito. (53) Este aspecto es algo que se debe resaltar, ya que no se realiza el análisis por empresa productora, sino más bien por la producción anual de un tipo de pez, lo cual resulta muy probablemente en lotes de productos no analizados. (53) Cabe mencionar además que SANIPES sólo cuenta con un método validado y aceptado, el cual es exclusivo para medicamentos antihelmínticos y se basa en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa tandem cuadrupolar, por lo que el resto de sustancias controladas deben ser analizadas por laboratorios extranjeros. (18) SANIPES también especifica que las enfermedades más comunes que padecen los peces en el país son producidas por bacterias, al igual que algunos casos estudiados sobre patologías en truchas arcoíris, que coinciden con dicha conclusión. (37-40)

En el mundo ya se considera como técnica analítica tradicional al LC-MS/MS, por ser un método sensible y selectivo con el que se puede realizar todo tipo de análisis de residuos antimicrobianos. (67,68) La seguridad alimentaria y servicio de inspección (FSIS) de los EE. UU. tiene un procedimiento oficial con esta técnica analítica para más de 90 antimicrobianos. (31) Esta técnica es utilizada incluso en productos acuícolas como el salmón, la trucha, el bagre, la corvina, la tilapia y más, habiendo sido desarrollados métodos para determinar grupos de analitos de 14 hasta 75 antibióticos diferentes en un solo análisis. (69–72) De lo anteriormente mencionado, queda clara la necesidad de contar en el país con un método confiable de cuantificación de residuos de antibióticos en productos de acuicultura como la trucha arcoíris, para contribuir a un mejor control de este producto hidrobiológico antes de que llegue a los consumidores finales dentro el país y afuera en el extranjero.

III. HIPÓTESIS

La metodología desarrollada en el Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) para la determinación de diez residuos antibióticos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadripolo (UHPLC-MS/MS), cumple con los parámetros de validación exigidos por la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA de los Estados Unidos del año 2019.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico para la identificación y cuantificación de diez residuos antibióticos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadripolo (UHPLC-MS/MS).

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

_ Desarrollar el método analítico multiresiduos para detectar residuos de enrofloxacino, ciprofloxacino, ácido oxolínico, amoxicilina, oxitetraciclina, clortetraciclina, hidrocloreuro de tetraciclina, sulfadoxina, sulfadimetoxina y florfenicol en matriz de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

_ Validar el método analítico bajo los parámetros y criterios de aceptación de la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA de los Estados Unidos del 2019.

_ Aplicar el método de ensayo validado en seis muestras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de mercados de Lima Metropolitana, verificando que cumplan con lo establecido por las normas internacionales, es decir, que su presencia sea menor a los límites máximos permitidos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1. Lugar de trabajo

El presente estudio fue ejecutado en el Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH).

5.1.2. Muestras biológicas

Matriz para la validación: La matriz (muestra libre de antibióticos) que se analizó es el producto acuícola más extraído de la acuicultura continental, es decir, *Oncorhynchus mykiss* (nombre común: trucha arcoíris).

La trucha matriz fue adquirida como producto fresco refrigerado, proveniente de la empresa productora acuícola Inversiones Roque Hermanos y se almacenó a -18°C, en la congeladora del LaCCSA.

Muestras de mercado: Se obtuvo muestra de los siguientes distritos de Lima Metropolitana:

- _ Los Olivos (M1)
- _ Independencia (M2, M3)
- _ Comas (M4)
- _ Puente Piedra (M5)
- _ San Martín de Porres (M6)

Se visitó solo a un mercado de cada distrito excepto por Independencia que se fue a dos mercados de la zona. De cada mercado se compró una muestra de tres truchas, con una masa de alrededor de un 1 kg y también se almacenó a -18°C, en la congeladora del LaCCSA.

5.1.3. Material de laboratorio

- _ Tubos de centrifuga de 50 mL con tapa enroscable
- _ Tubos de 5 mL
- _ Viales de 2 mL
- _ Jeringas de 5 mL
- _ Filtro de jeringa de 0.2 µm de polifluoruro de vinilideno (PVDF)
- _ Materiales de vidrio de clase A verificados (con mayor exactitud): beakers, probetas, fiolas y pipetas.

5.1.4. Reactivos

- _ Agua destilada y desionizada con resistividad de 18.2 M Ω .cm
- _ Hexano - grado HPLC (Merck)
- _ Acetonitrilo o ACN - grado LC-MS/MS (Merck)
- _ Ácido fórmico (Honeywell Fluka)
- _ Hidróxido de sodio (EMSURE)
- _ Metanol- grado LC-MS/MS (Sigma Aldrich)
- _ EDTA sal disódica o Na₂EDTA (Merck)
- _ Estándares de medicamentos de los siguientes antibióticos: enrofloxacino (99.8%, Sigma Aldrich), hidrato de hidrocloreto de ciprofloxacino (99.7%, Sigma Aldrich), ácido oxolínico (99%, Sigma Aldrich), amoxicilina trihidratada (98.74%, Dr. Ehrenstorfer), oxitetraciclina dihidratada (99.9%, Sigma Aldrich), hidrocloreto de clortetraciclina (93.3%, Sigma Aldrich), hidrocloreto de tetraciclina (97.5%, Sigma Aldrich), sulfadoxina (98.9%, Sigma Aldrich), sulfadimetoxina (99.6%, Sigma Aldrich) y florfenicol (99%, Sigma Aldrich). Los datos para obtener el certificado de los reactivos de la página web de los proveedores se encuentran en el **ANEXO 3**.

5.1.5. Equipos

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida rápida de alta eficacia con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS Triple Quadrupole Mass Spectrometry (Waters®), con una columna de fase reversa HSS T3, 100 mm largo*2.1 mm diámetro, 1.8 μ m tamaño de partículas (Waters®), un equipo condensador de gas de nitrógeno, un sonicador, una centrifugadora y un homogenizador de alimentos.

5.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE MULTIRESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN TRUCHA ARCOIRIS

Se desarrollo el método de multiresiduos basado en una técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas proveniente de la Seguridad Alimentaria y Servicio de Inspección (FSIS) de los EE. UU para la detección de antibióticos en bovino, aves, porcinos, caprinos, ovinos y en el pez bagre. (31)

La metodología consiste en obtener una curva de calibración valida a partir de la cual se obtiene los valores de la muestra, sin embargo, dicha curva de calibración es realizada en matriz (muestra de trucha libre de antibióticos), por lo que cada concentración de la curva debe ser extraída igual que la muestra. El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar

y optimizar la extracción del método original debido a que no mostró resultados satisfactorios. (33) Asimismo, se optimizó otras condiciones del método oficial de la FSIS se encuentra en el siguiente link: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/b9d45c8b-74d4-4e99-8eda-5453812eb237/CLG-MRM1.pdf?MOD=AJPERES>

A continuación, se describe las modificaciones realizadas a cada fase del método:

- **Sintonización:** Se optimiza el voltaje de cono y el voltaje de colisión de cada antibiótico donde se obtuvieran un pico mayor.
- **Preparación de Soluciones:** Se modificó la preparación de las soluciones de sintonización y la solución de la extracción de la muestra.
- **Curva de calibración de estándares que incluye la matriz:** Se modificó las concentraciones para la fortificación de la curva de calibración.
- **Extracción de la muestra a ensayar:** Se modificó el proceso de extracción.
- **Corridos cromatográficos de las muestras extraídas y de la curva de calibración:** Se establece una secuencia para realizar los ensayos y determinar los antibióticos de interés.

5.2.1. Sintonización

La sintonización se refiere a la optimización de las condiciones específicas para la medición de cierto analito (incluye parámetros para la formación y detección de los iones, como voltaje de cono y voltaje de colisión respectivamente).

Para la sintonización se mantuvieron las condiciones espectrométricas de la técnica original (detalladas abajo) y se optimizó el voltaje de cono y el voltaje de colisión de cada antibiótico para adquirir los mayores picos del precursor y de sus fragmentos.

Los valores obtenidos en la sintonización servirán como patrones para ser empleados en los cromatogramas de las muestras a ensayar, por lo que a fin de evaluar los adecuados voltajes de cono y de colisión, se siguen los siguientes criterios:

- a) Se determina el voltaje de cono donde se obtenga mayor cantidad de señal cercana al ratio de la masa molecular sobre la carga (m/z) del precursor y también se determina el voltaje de colisión donde se pueda obtener fragmentos con mayor señal.
- b) Se evaluó si con los voltajes de cono y colisión determinados en el ítem anterior para los estándares era también adecuado para las muestras fortificadas, es decir, si era capaz de detectar y reconocer (match) a los precursores y a los fragmentos.

Condiciones espectrométricas antes de inyectar cada estándar:

- **Capilaridad:** 3.0 kV
- **Temperatura de la fuente:** 150 °C
- **Temperatura de solvatación:** 500 °C
- **Flujo de gas cono (N₂):** 20 L/h
- **Flujo de gas de desolvatación (N₂):** 1000 L/h
- **Flujo de gas de colisión:** 0.10 mL/min
- **Modo Ion:** ES+
- **Volumen de inyección:** 10 µL

5.2.2. Preparación de las Soluciones

- ❖ **Solución Madre:** Se pesa 10 mg de estándar y se diluye en una fiola de 10 mL del disolvente que se indica en la **Tabla 4** para obtener una concentración de 1000 ppm, A cada una de estas soluciones se les denomina solución madre.

Tabla 4. Diluyente de cada estándar de Antibiótico

Clase o Familia	Antibiótico	Disolvente de la solución madre
Quinolonas	Enrofloxacino	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
	Ciprofloxacino	0.03 M NaOH (40 g/mol)
	Ácido Oxolínico	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
Betalactámico	Amoxicilina	Agua destilada ultra pura (tipo I)
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Metanol para LC-MS, Pureza >99.9%
	Clortetraciclina	Metanol para LC-MS, Pureza >99.9%
	Tetraciclina	Metanol para LC-MS, Pureza >99.9%
Sulfamidas	Sulfadoxina	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
	Sulfadimetoxina	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
Fenicol	Florfenicol	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%

- ❖ **Solución diluyente A:** Se prepara una solución de ácido fórmico y acetonitrilo en una proporción de (0.1:99.9) respectivamente.

❖ **Solución de estándares para la sintonización (SS):**

El método original indicaba que las diluciones de los estándares se realicen en acetonitrilo helado y en agua en caso de betalactámico. Sin embargo, se decidió modificar agregando ácido fórmico al acetonitrilo a fin de asemejarlo con la fase móvil que se emplea para las corridas cromatográficas y se procedió de la siguiente manera.

Cada solución madre del estándar de un antibiótico se lleva 0.1 ppm mediante 2 diluciones

- **Primera dilución:** 0.1 mL solución madre de un antibiótico se completa con 10 ml solución diluyente A.
- **Segunda dilución:** 0.1 mL de la primera dilución y se completa con 10 ml de la solución diluyente A. A esta última solución se le denomina solución de estándar de sintonización de antibiótico **SS**.

Cada una de estas soluciones **SS** se inyecta (10 μ L) directamente al detector.

❖ **Solución mezcla de estándares (SME):**

En una fiola de 10 mL se agrega 100 μ L de solución madre de cada estándar y se enraza a 10 mL con la **Solución diluyente A**. Se toma 0.1 mL de la solución previa y se completa a 10 mL con la **Solución diluyente A**. A esta última se le denomina solución mezcla de estándares (SME), la cual se coloca en un vial se inyecta 2 μ L y se realiza una lectura en el UHPLC-MS/MS para obtener el tiempo de retención de la mezcla de estándares.

❖ **Solución para la extracción de la muestra (denominada B):**

- **Solución B1:** Preparar una solución de Acetonitrilo + EDTA 0.1M en la proporción de 4:1 respectivamente.
- **Solución B2:** Preparar la solución B1 + Ac. Fórmico en la proporción de 99.9 :0.1 respectivamente.

❖ **Solución de reconstitución del extracto C:**

- **Solución C1:** Preparar una solución de Ac. Fórmico + Agua ultrapura tipo I en la proporción de 0.1:99.9 respectivamente.
- **Solución C2:** Preparar una solución de Acetonitrilo + la solución C1, en la proporción de 1: 9 respectivamente.

5.2.3. Preparación de la Curva de Calibración en la matriz de trucha

Se prepara a partir la **Solución mezcla de Estándares (SME)** la cual se considera que cada antibiótico está a 10 ppm. De aquella mezcla se prepara una solución de 2 ppm y se procede según la siguiente **Tabla 5**, para preparar el blanco y las cinco concentraciones de estándares. Previamente se procesa la matriz libre de antibióticos tal como la muestra (**ítem 5.2.4**) y se obtiene seis matrices de trucha de 2g. A cada matriz se le fortifica con un estándar (St_0 , St_1 , St_2 , St_3 , St_4 , St_5) y estos estándares se extraen de la misma manera como se extrae la muestra (ver **Figura 6**). La curva es válida si se obtiene $r^2 > 0.99$.

Tabla 5. Volumen de cada solución mezcla para realizar la curva de calibración

Mezcla de Estándares	Matriz (Homogenizado de trucha libre de antibióticos)	Volumen (μL)		Volumen total (μL)	Concentración obtenida	
		Mezcla SME de 10 ppm	Mezcla SME de 2 ppm		(ppm o $\mu\text{g/ mL}$)	(ppb o ng/ mL)
St 0	2g	--	--	1000	Blanco	Blanco
St 1	2g	--	5	1000	0.01	10
St 2	2g	--	25	1000	0.05	50
St 3	2g	--	50	1000	0.1	100
St 4	2g	20	--	1000	0.2	200
St 5	2g	30	--	1000	0.3	300

De cada estándar (luego de extraído y reconstituido según la *Figura 6*) se inyecta 2 μL al UHPLC-MS/MS.

5.2.4. Método de extracción de la muestra

❖ Procesamiento de la muestra y homogenización:

Los residuos de antibióticos no se encuentran en solución si no en una muestra (músculo de trucha), por ende, se deben extraer los antibióticos de la muestra o matriz fortificada. En el caso de los productos relacionados a los pescados, los límites establecidos para residuos de antibióticos (LMR) para la Unión Europea y DIGESA conciernen al conjunto de músculo y piel propia del pescado. (50,52)

Por ello se procede retirar las vísceras, la cabeza y otras partes innecesarias de la trucha hasta quedar el músculo y la piel. Luego el músculo de la trucha se pica y se homogeniza hasta obtener una textura uniforme posteriormente se pesa 2 gramos y se coloca en un tubo de 50 mL y se procede a la extracción. Pero si fuera para un ensayo en matriz en esta última parte se realizaría la fortificación.

❖ Extracción de la Muestra:

El procedimiento de extracción es uno de los pasos más relevantes del desarrollo del método ya que se determina si los residuos pueden ser extraídos de forma óptima para su identificación. La técnica original indicaba una solución de extracción de acetonitrilo y

agua en proporción de 4:1. (31) Sin embargo, dicha técnica obtiene una recuperación muy baja para las Tetraciclinas, por ende, se optimizó al agregar EDTA [0.1 M] y ácido fórmico al 0.1% en base a otras investigaciones.

El proceso de extracción de la muestra y del estándar se indican en la siguiente **Figura 6**, mostrándose resaltados las variaciones de la extracción comparado al método original:

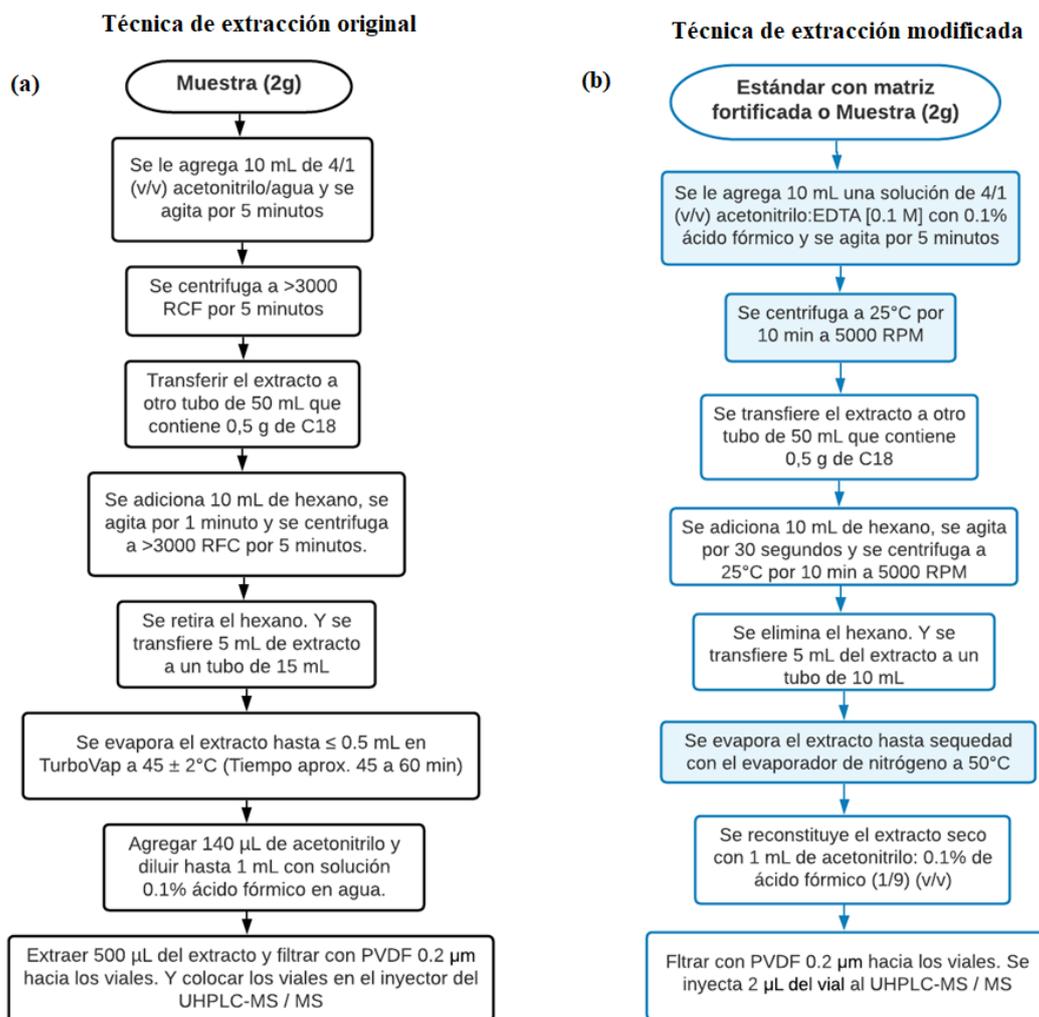


Figura 6. Diagramas del proceso de extracción del método del FSIS (a) y del método propuesto en el presente estudio (b). [Ref. 31, 33]

Para evaluar si la extracción era adecuada se evaluó la recuperación en matrices fortificadas a dos concentraciones (10 y 50 ppb) para todos los analitos y la recuperación obtenida de la investigación del FSIS aunque ellos realizaron su recuperación con una concentración diferente por cada analito. (33)

5.2.5. Evaluación de las condiciones espectrométricas y cromatográficas

Para evaluar las condiciones espectrométricas y cromatográficas del método se realizó la lectura en muestra fortificada a 100 ppb empleando el patrón de la sintonización, las mismas condiciones espectrométricas descritas en la sintonización, la curva de calibración y las condiciones cromatográficas basadas en el método de FSIS (*Tabla 6*). Por ende, se siguió la secuencia de la *Tabla 7* (Sintonización) y la *Tabla 8* para seguir el proceso del método y obtener el cromatograma de la muestra analizada.

Tabla 6. Condiciones de la cromatografía líquida basadas en el método del FSIS

Columna	Acquity HSS T3; 1.8 μm ; 2.1 mm de diámetro * 100 mm de largo con un 1.8 μm de tamaño de partículas.			
Temperatura de la columna	40 °C			
Volumen de inyección	2 μL			
Fase móvil A:	Concentración de 0.1% de ácido fórmico en agua.			
Fase móvil B:	Concentración 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo			
Lavado débil:	Solución de Acetonitrilo + Agua ultrapura tipo I en la proporción de (5:95) respectivamente.			
Lavado fuerte:	Solución de Acetonitrilo+ Agua ultrapura tipo I en la proporción de (95:5) respectivamente.			
Gradiente	Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B	Flujo (mL/min)
	Inicial	100	0	0.5
	0.1	100	0	0.5
	8.0	0	100	0.5
	9.5	0	100	0.5
	9.6	100	0	0.5
	13.0	100	0	0.5

Tabla 7. Secuencia de Inyecciones en el Detector de Masas de Triple Cuadrupolo (Sintonización)

Número de corrida	Muestra	(Volumen)
1	SS de Enrofloxacino	10 μL
2	SS de Ciprofloxacino	10 μL
3	SS de Ácido Oxolínico	10 μL
4	SS de Amoxicilina	10 μL
5	SS de Oxitetraciclina	10 μL
6	SS de Clortetraciclina	10 μL
7	SS de Tetraciclina	10 μL
8	SS de Sulfadoxina	10 μL
9	SS de Sulfadimetoxina	10 μL
10	SS de Florfenicol	10 μL

Tabla 8. Secuencia de las corridas cromatográfica del UHPLC-MS/MS

Número de corrida	Muestra	(Volumen)
1	St 0	2 µL
2	St 1	2 µL
3	St 2	2 µL
4	St 3	2 µL
5	St 4	2 µL
6	St 5	2 µL
8	Blanco: Solución C2 (Solución de reconstitución del extracto)	2 µL
9	Extracto de la Muestra M1 (replica 1)	2 µL
10	Extracto de la Muestra M1 (replica2)	2 µL
10	Lavado débil	1200 µL
11	Lavado fuerte	400 µL

Con el cromatograma de la muestra obtenido se evaluará lo siguiente:

- La resolución de los picos y si el método logra detectar todos los picos de antibióticos.
- También posible interferencia entre los estándares de la mezcla a fin de evaluar si el método es apto para la identificación de los diferentes antibióticos que forman la mezcla de estándares.
- Asimismo, se verifica un blanco (matriz sin fortificar) para observar si hay señal de algún interferente proveniente de la matriz o del proceso de extracción.

5.2.6. Determinación de la concentración de antibióticos en la muestra

Se determina la ecuación de la recta para cada uno de los antibióticos en base a la curva de calibración de la **Tabla 5**. Luego con la ecuación obtenida (**Ecuación 1**) se reemplaza la Absorbancia (A) para determinar la concentración de cada antibiótico (Co) en la muestra en ng/ml, luego empleando la **Ecuación 2** se obtiene la concentración de cada antibiótico expresado en ng/g,

Ecuación 1

$$C_o = m (A) \pm b$$

Donde:

Co = Concentración en ng/mL del estándar la calibración.

m = Pendiente de la ecuación lineal.

A = Área del pico cromatográfico

b = Intercepción en el eje y.

Ecuación 2

$$C = \frac{C_o \times V_e}{W} \times \frac{V_f}{V_i}$$

Donde:

C = Concentración en muestra en ng/g = μg/Kg = ppb

Co = Concentración en ng/mL obtenida por interpolación en la curva de calibración

Ve = Volumen del extracto en mL (10 mL)

Vi = Volumen tomado para evaporar con el gas nitrógeno (5 mL)

Vf = Volumen del vial que se analizó en el equipo (1 mL)

W = Peso de la muestra en g

Las concentraciones obtenidas se comparan con los límites de aceptación máximos permisibles de antibióticos de cada norma.

5.3. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PROPUESTA

Luego de obtener resultados satisfactorios de la técnica propuesta se procede a la validación de la misma. Para validar el presente método se utilizó prioritariamente los criterios de aceptabilidad de la guía de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA de los Estados Unidos del 2019 y se estudiaron los siguientes parámetros:

- Selectividad
- Sensibilidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Desviación estándar relativa (RSDr)
- Reproducibilidad intralaboratorio (PRSDr)
- Recuperación
- Rango mínimo aplicable

Se utilizaron también otras guías de apoyo como la guía de la IUPAC, el manual del Codex Alimentarius, la guía de residuos de pesticidas en alimentos SANTE, la guía de SERNAPESCA y la guía de validación de métodos del Instituto Nacional de Salud de Chile. (59,60,62,64,65) Todos los parámetros analizados fueron realizados en matrices fortificadas para minimizar el efecto matriz que pudiera existir, para asegurar que las muestras tengan antibiótico.

Tabla 9. Resumen de los parámetros de validación y sus criterios de aceptación dependiendo de la guía de validación

Parámetro de validación	Guía de validación	Criterios de aceptación (LM)			
		0.001 mg/Kg	0.01 mg/Kg	0.1 mg/Kg	1 mg/Kg
		1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm
Selectividad	SANTE	Al comparar una matriz blanco y una matriz fortificada de menor concentración, las señales o ruido que aparecen en la matriz blanco no deben ser superiores al 30% comparadas con las señales de la matriz fortificada (64)			
Sensibilidad	Aspectos generales sobre la validación de método (Chile)	Se determina la sensibilidad a través de la gráfica de calibración.			
Límite de detección	FDA	≤ 0.0002 mg/kg	≤ 0.002 mg/kg	≤ 0.01 mg/kg	≤ 0.1 mg/kg
	IUPAC	3*RSD			
Límite de cuantificación	FDA	≤ 0.0004 mg/kg	≤ 0.004 mg/kg	≤ 0.02 mg/kg	≤ 0.2 mg/kg
	IUPAC	10*RSD			
Desviación estándar relativa (RSDr)	FDA	≤ 22%	≤ 22%	≤ 11%	≤ 8%
	SANTE	≤ 20 %			
Reproducibilidad intralaboratorio (PRSDr)	FDA	≤ 22%	≤ 22%	≤ 22%	≤ 16%
	SANTE	≤ 20 %			
Recuperación	FDA	40% - 120%	60% - 115%	80% - 110%	80% - 110%
	SANTE	70-120 %			
Rango mínimo aplicable	FDA	0.0006 a 0.0014 mg/Kg	0.0006 a 0.0014 mg/Kg	0.003 a 0.017 mg/Kg	0.052 a 1.48 mg/Kg
	Codex Alimentarius	LM < 10 ⁻⁷ , LM ± 2 (0,22*LM)		LM ± 2 S _R < 1 ppm ≤ LM ± 3 S _R	

Fuente: [Ref. 58,59,62,64,65]

5.3.1. Selectividad/Especificidad

Se preparó muestra fortificadas con 10 ppb de una mezcla de 10 antibióticos y se comparó con una matriz blanco (libre de antibióticos). Luego se compararon de forma porcentual las áreas obtenidas a fin de verificar si las señales o ruido que aparecen en la matriz blanco no sean superiores al 30% y confirmar que cumple el criterio de la guía de la SANTE mostrada en la **Tabla 9**.

5.3.2. Linealidad

Se preparó muestras fortificadas empleando una matriz (libre de antibióticos) de la misma manera en la que se detalla en la **Tabla 5** cuyas concentraciones fueron 10, 50, 100, 200 y 300 ppb, ya que la guía de la IUPAC pide como mínimo 5 puntos. (58) Además se incluye una matriz blanco. Luego se determinó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2). El criterio de aceptación para la linealidad fue un valor mayor a 0.98 y 0.99 respectivamente. (73,74)

Para evaluar si la correlación lineal encontrada es significativa se emplea el método de t de Student, el cual considera como hipótesis nula (linealidad no significativa) y alterna (linealidad significativa). Si el valor calculado (Tr) es mayor que el valor crítico ($T_{crítico}$), entonces, se rechaza la hipótesis nula H_0 . (62) En el **ANEXO 8** se encuentra una tabla con los valores de la prueba t de Student para calcular el $T_{crítico}$, con los grados de libertad y el nivel de significancia. El Tr se calcula de la siguiente manera:

$$Tr = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Donde:

Tr = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlación

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlación

$n - 2$ = Numero de grados de libertad

r^2 = Valor del coeficiente de determinación

5.3.3. Sensibilidad

Como la sensibilidad es la variación de la respuesta del instrumento según la cantidad que se mida. A partir de los datos obtenidos de la curva de calibración de los estándares mostradas en la **Tabla 5**, se estableció una gráfica lineal y se determinó la pendiente con la cual se evalúa lo siguiente:

- Si la pendiente es más horizontal no habrá gran variación en la concentración, aunque aumente o disminuya el área de la concentración, lo que indica menor sensibilidad.
- En cambio, cuando la pendiente es más vertical los cambios son más evidentes y se reflejan en la concentración, es decir, hay una mayor sensibilidad del método.

Esto se observa una vez realizado el gráfico de la curva de calibración, aunque también se puede realizar su cálculo numérico este no muestra la tendencia visible del gráfico. El cálculo numérico se muestra a continuación:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Donde:

m = Pendiente

y₁, y₂ = Valores del eje Y

x₁, x₂ = Valores del eje X

Con las gráficas y valores obtenidos para la pendiente se comparó la sensibilidad de la técnica para cada antibiótico.

5.3.4. Límite de detección y cuantificación

Se empleó la guía de validación de SERNAPESCA, la cual considera que es posible realizar el límite de detección y cuantificación con matriz blanca o matrices fortificadas a concentraciones mínimas. Para el presente estudio se empleó muestras fortificadas a 10 ppb. (60)

Se preparó 10 matrices fortificadas a 10 ppb de la solución mezcla de estándares de la forma mostrada en la **Tabla 5**. Se obtuvo la concentración de cada antibiótico y se calculó la desviación estándar para cada caso. Se considera que el **límite de detección** teórico es igual a tres veces la desviación estándar y el **límite de cuantificación** teórico es igual a diez veces a la desviación estándar según lo especifica la IUPAC. (59) Con los resultados obtenidos se corroboró si se cumplía el criterio de aceptabilidad de la FDA mostrada en la **Tabla 9**.

5.3.5. Recuperación

Para este parámetro se preparó 10 matrices fortificadas de cada concentración de 10, 50 y 200 ppb de la forma mostrada en la **Tabla 5**, estas preparaciones también se duplicaron por otro analista. Se realizó las lecturas en el equipo y se determinó la recuperación en base a la concentración fortificada. (58) La recuperación se expresó como porcentaje para cada antibiótico y se calcula de la siguiente forma: (58)

$$\%R = (C_{\text{exp}}/C_{\text{Ref}}) * 100$$

Siendo:

C_{exp} = Concentración experimental detectada del analito

C_{Ref} = Concentración teórica del analito que es la fortificación en la matriz

Con los resultados obtenidos se corroboró si se cumplía el criterio de aceptabilidad de la FDA que se encuentra en un intervalo de recuperación de 60 % a 115 %. (58)

5.3.6. Precisión

Se determinó la precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

- **Repetibilidad:**

Se determinó la desviación estándar de los valores obtenidos para 10, 50 y 200 ppb (datos obtenidos de la recuperación). La precisión se expresó como desviación estándar relativa. La desviación estándar relativa se calculó de la siguiente manera:

$$\%RSDr = 100 * (s/\bar{X})$$

Siendo:

$\%RSDr$ = Porcentaje de la desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

\bar{X} = Promedio de valores

Con los resultados obtenidos se corroboró que el $\%RSDr$ cumplan con el criterio de aceptabilidad de la FDA que es una desviación estándar relativa menor e igual al 22%.

- **Precisión intermedia:**

La precisión intermedia se obtuvo a partir de dos grupos de resultados, el primer grupo corresponde a los datos obtenidos de la repetibilidad y el segundo grupo corresponde a los ensayos efectuados por un segundo analista el cual repitió las concentraciones de 10, 50 y 200 ppb en forma similar a lo indicado al primer grupo. Se le determinó la desviación estándar relativa de los datos en conjunto para cada antibiótico.

El criterio de aceptación para la precisión intermedia fue el siguiente:

- Comparar que la desviación estándar obtenida entre el primer y segundo grupo cumpla con los límites establecidos para la FDA (para 10 y 50 ppb debe ser menor a 22% y para 200 ppb debe ser menor de 11%).

- Para la concentración de 200 ppb además de cumplir con el criterio anterior se determinó el $HorRat_r$, este estadístico evalúa si los datos obtenidos del grupo A son homogéneos con respecto al grupo B (58,65)

Para la relación de $HorRat_r$ se calcula previamente la desviación estándar relativa de Horwitz ($PRSD_{Horwitz}$): (65,75)

$$PRSD_{Horwitz} = 2^{(1 - 0.5 \log C)} = 2 * C^{-0.1505}$$

C = Concentración del analito expresado en potencia de 10, es decir, 1ppm sería $10^{-6} = 0.000001$.

$$HorRat_r = \frac{RSD}{PRSD(Horwitz)}$$

El criterio de aceptación es que la razón de $HorRat_r$ se encuentre entre 0.5 y 2 ($0.5 < HorRat_r < 2$). Si la razón es mayor de 2, puede indicar que los resultados no son homogéneos y se necesita optimizar el método, y que el método no es satisfactorio. (65,75)

5.3.7. Rango mínimo teórico

Para evaluar este parámetro se empleó la teoría de Horwitz Thompson, la cual consiste en determinar la desviación estándar relativa pronosticada. Para calcular este parámetro se utiliza el ejemplo del manual de procedimiento para laboratorios del Codex Alimentarius. La fórmula de la desviación estándar relativa pronosticada ($PRSD$) se iguala con la ecuación de la desviación estándar de Horwitz para obtener la desviación estándar pronosticada (S_R). Luego este valor es multiplicado por un factor que puede ser 3 o 2, dependiendo de la concentración (LM). (65)

En resumen, se calcula de la siguiente manera:

_ $LM \geq 1$ ppm, entonces, el rango es $LM \pm 3 S_R$

_ $LM < 1$ ppm, entonces, el rango es $LM \pm 2 S_R$

$$PRSD = 100 * (S_R / X) = 2 * C^{-0.1505}$$

$$S_R = (X * 2 * C^{-0.1505}) / 100$$

Dónde:

$PRSD$ = Desviación estándar relativa pronosticada

S_R = Desviación estándar pronosticada

x = La concentración de interés, en este caso, la menor concentración del método (LM)

C = Concentración del analito (LM) expresado en potencia de 10.

En caso que la ratio de concentración mínima del analito sea $<10^{-7}$, se aplica la teoría de Horwitz Thompson, donde el $PRSD_R = 22\%$, es decir, $S_R = 0,22*LM$. El cálculo se realizaría de esta forma:

_ $LM < 1$ ppm, entonces, $LM \pm 2 (0,22*LM)$

5.4. EVALUACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS DE DIFERENTES MERCADOS

Con el método desarrollado y validado en el presente estudio, el cual se encuentra descrito en el *ANEXO 5*, se evaluó la posible presencia de antibióticos en muestras obtenidas de diferentes mercados de Lima Norte (Los Olivos, Independencia, Comas, Pte. Piedra, San Martín). El proceso de aplicación del método abarcó desde el procesamiento de las muestras hasta la identificación de los analitos encontrados.

La obtención de las muestras fue llevada a cabo según el procedimiento de toma de muestras para el control de sustancias prohibidas por SANIPES. (53) Este procedimiento describe que las muestras deben tener un peso de entre 600 g a 1 kg, pudiendo ser de uno o varios especímenes. (53) Por ello, se compró muestras (trucha arcoíris) de 1 Kg a seis mercados para su respectivo análisis como se aprecia en el *ANEXO 15*.

Como criterio adicional se consideró que la señal detectaba debe ser mayor a tres veces del blanco y que el tiempo de retención no debe oscilar más del 5% comparado con el estándar según la guía para la confirmación de residuos veterinarios en análisis de muestras de la FDA para ensayos en LC-MS/MS. (76)

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar los análisis estadísticos se empleó el software de análisis estadístico STATA 16.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA), con licencia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Para evaluar la curva de calibración de la validación y de las muestras de mercados, se determinaron las gráficas de la curva de calibración, se ejecutó la prueba de Shapiro Wilk que determinó si los datos seguían una distribución normal, se corrieron regresiones lineales para obtener la ecuación y el coeficiente de determinación y se obtuvo el coeficiente de correlación para constatar la linealidad de la curva.

Se realizó los análisis estadísticos correspondientes para el parámetro de recuperación y para el de precisión. En el caso de la recuperación se verificó si los resultados de las lecturas de las muestras eran similares o no a las concentraciones de referencia que debían recuperarse. Para ello se utilizó la prueba de t de Student para una sola muestra. Para el caso de la precisión se comparó los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2, utilizando la prueba de t de Student para los datos con distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para los datos sin distribución normal. Todos los resultados obtenidos del análisis estadístico en STATA se pueden observar en la sección de *ANEXOS*.

6. RESULTADOS

6.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE MULTIRESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN TRUCHA ARCOIRIS

El método desarrollado en el presente estudio se encuentra descrita de forma detalla en el *Anexo 5*. A continuación, se detalla los resultados obtenidos para cada modificación efectuada en las diferentes fases del método.

6.1.1. Sintonización

Se observó que los voltajes de cono y de colisión determinados a través de los estándares son adecuados para la detección de los picos de precursores y fragmentos en matriz fortificada con los diez antibióticos.

En la *Tabla 10* se detalla los voltajes de cono y de colisión óptimos encontrados para cada antibiótico. Asimismo, se muestra el tiempo de retención que se obtuvo de la solución mezcla de los 10 residuos inyectada al UHPLC. Los valores determinados en esta etapa son considerados los patrones para las muestras a evaluar.

Tabla 10. Datos obtenidos de la sintonización de los antibióticos utilizados para el patrón de identificación del método

Nº	Clase de antibiótico	Estándar/ Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Modo de ionización	Voltaje Cono (V)	Colisión (eV)	Tiempo de retención (min)	
1	Quinolonas	Enrofloxacino	360.168	316.115	Positivo	40	20	2.55	
				244.929	Positivo	40	10		
2		Ciprofloxacino	332.196	288.221	Positivo	40	25	2.39	
				245.143	Positivo	40	15		
3		Ácido oxolínico	262.068	244.063	Positivo	40	15	3.45	
				159.967	Positivo	40	25		
4		Penicilina	Amoxicilina	366.196	349.182	Positivo	40	32	1.68
					113.991	Positivo	40	10	
7		Tetraciclinas	Tetraciclina	445.27	410.25	Positivo	20	18	2.52
					154	Positivo	20	25	
6	Clortetraciclina		479.332	444.15	Positivo	40	15	2.99	
				462.2	Positivo	40	18		
5	Oxitetraciclina		461.24	426.21	Positivo	40	18	2.38	
				443.307	Positivo	40	12		
8	Sulfamidas		Sulfadoxina	311.07	155.922	Positivo	30	30	3.18
					91.989	Positivo	30	15	
9			Sulfadimetoxin	311.132	155.983	Positivo	30	25	3.62
					91.98	Positivo	30	16	
10	Anfenicol	Florfenicol	358.2	240.86	Positivo	25	16	3.24	
				205.8	Positivo	25	26		

Se encontró que los voltajes de cono y de colisión determinados también fueron óptimos en muestras fortificadas por cuanto la señal de precursores y fragmentos se visualizan en los cromatogramas pudiéndose establecer el match para cada caso. Los iones fragmento de cada molécula precursora son lo más importantes del patrón debido a que las moléculas no tienden a fragmentarse igual y con ello se logra su identificación. En el **Figura 7** se muestran el cromatograma de una matriz fortificada con la solución mezcla de 0.1ppm o 100 ppb y se muestran los picos de los precursores con una adecuada señal.

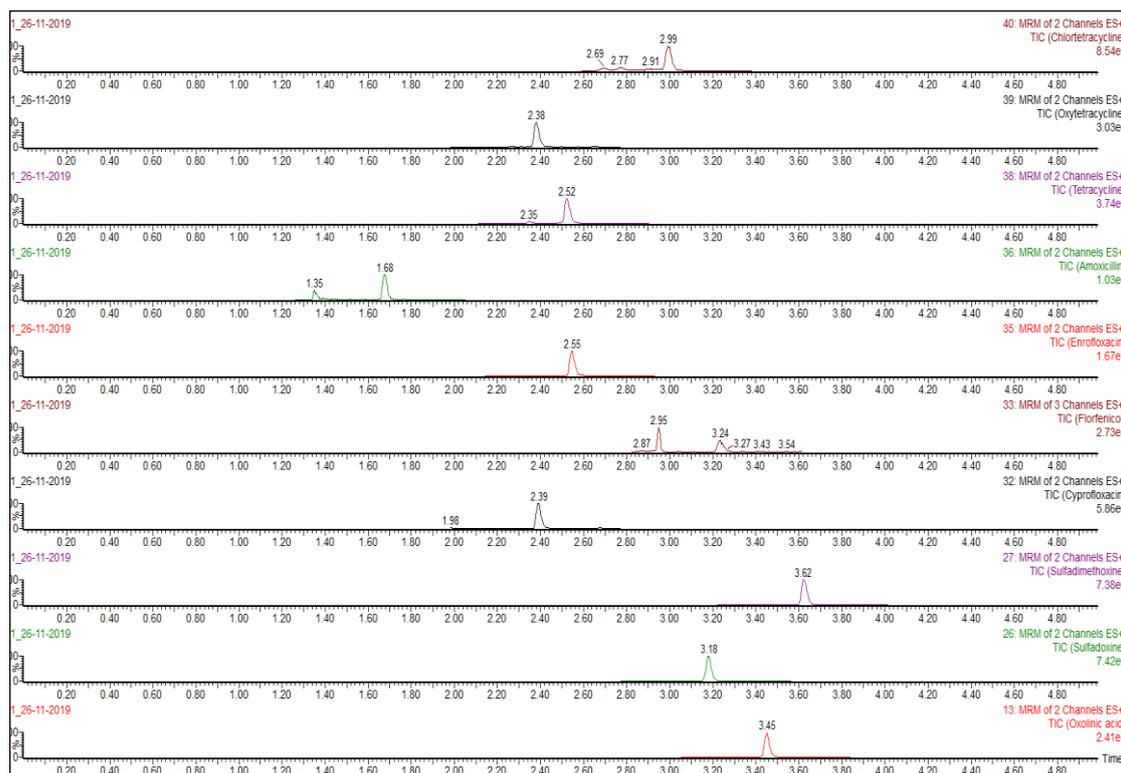


Figura 7. Cromatograma de monitoreo de los picos de antibióticos en una matriz fortificada.

También en la **Figura 7** se observa que la matriz no interfiere con la identificación de cada analito y por ello se puede obtener el cromatograma para cada residuo, este cromatograma individual ayuda a observar mejor los tiempos de retención y además están indicados en la parte superior de los picos cromatográficos correspondientes. Se puede verificar que los analitos tienen un pico definido en sus respectivos cromatogramas, aunque para el florfenicol y la amoxicilina se constata la presencia de dos picos, lo que se logra discernir por los criterios de identificación del patrón de la sintonización. Además, en el **ANEXO 7** se muestra la gráfica de los fragmentos de los precursores de este mismo patrón.

6.1.2. Curva de calibración en matriz de trucha

La curva de calibración obtenida para los 10 antibióticos ensayados fue válida ($r^2 > 0.99$) por lo que las concentraciones empleadas en dichas curvas son consideradas adecuadas para el método definitivo.

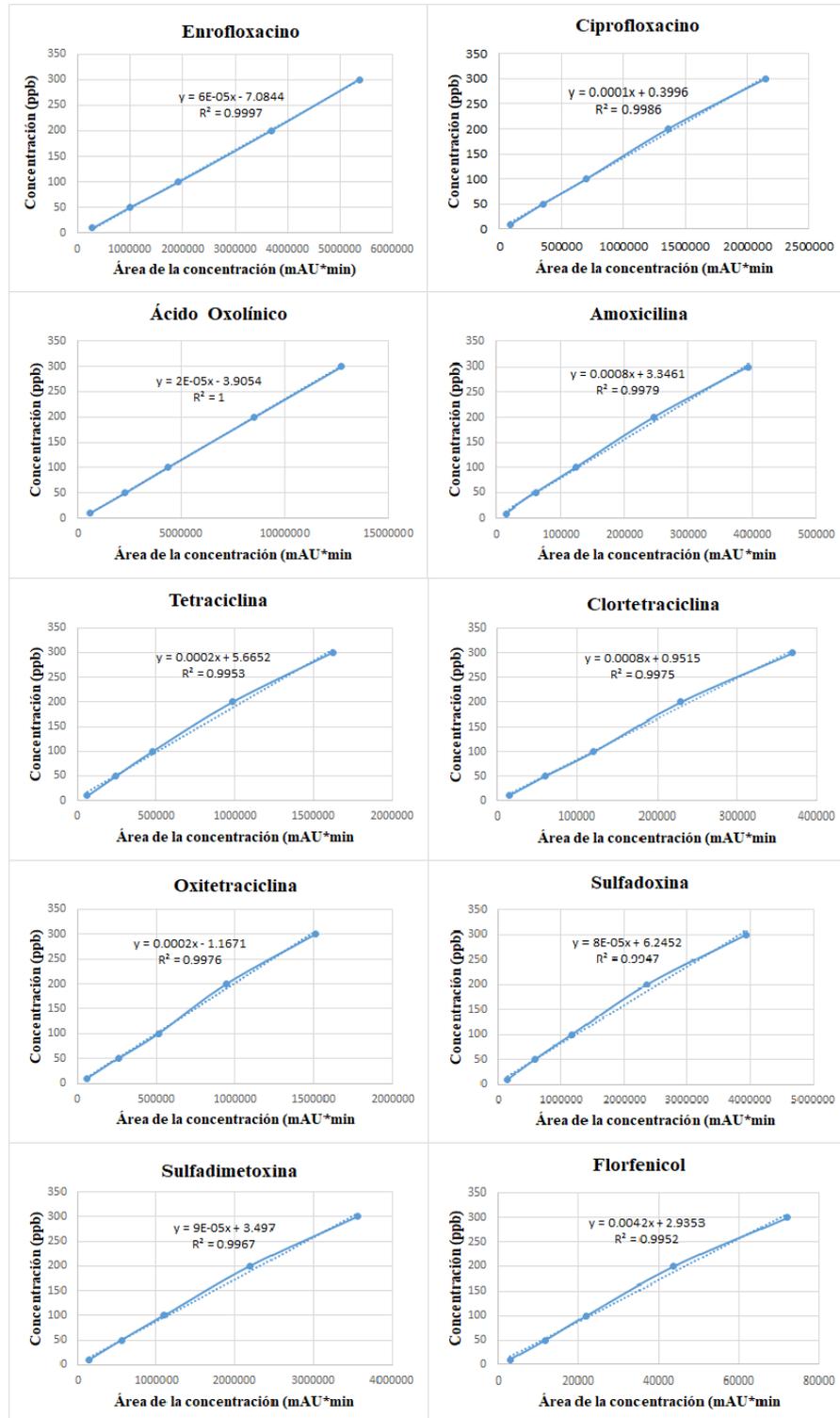


Figura 8. Curva de calibración de los 10 antibióticos

6.1.3. Extracción de la muestra

Luego de realizar el ensayo de la extracción de la muestra en matriz fortificada a dos concentraciones de 10 y 50 ppb, las recuperaciones obtenidas fueron mayores al 91% mientras que las del método del FSIS fueron menores del 84% como se aprecia en las siguientes tablas. También se puede comprobar que tiene mejores recuperaciones que otros métodos como se muestra en el *ANEXO 4*.

Tabla 11. Recuperación del método multiresiduo para trucha arcoíris

Analitos	Porcentaje de recuperación (10 ppb)	Porcentaje de recuperación (50 ppb)
Enrofloxacino	101.6	96.3
Ciprofloxacino	112.9	93.6
Ácido oxolinico	106.2	99.4
Amoxicilina	112.9	97.1
Tetraciclina	101.2	101.3
Clortetraciclina	111.8	99.2
Oxitetraciclina	115.0	92.0
Sulfadoxina	110.7	94.6
Sulfadimetoxina	109.8	91.6
Florfenicol	109.3	97.3

Tabla 12. Recuperación del método de residuos veterinarios de la FSIS

Analitos	Concentración ppb	Porcentaje de recuperación
Enrofloxacino	50	62
Ciprofloxacino	1000	69
Amoxicilina	10	66
Tetraciclina	1000	46
Clortetraciclina	2000	40
Oxitetraciclina	50	41
Sulfadoxina	100	82
Sulfadimetoxina	100	79
Florfenicol	200	84
Extracción de residuos en músculo bovino.		

6.1.4. Evaluación de las condiciones espectrométricas y cromatográficas

En la *Figura 9* se puede observar el cromatograma de una matriz fortificada a 100 ppb y se muestra a los analitos 2 y 3 con tiempos de retención similares lo mismo sucede con los analitos 4 y 5, pero a pesar de ello el equipo logra discernirlos con el patrón de la sintonización mostrándonos el pico de cada antibiótico con un color diferente por consiguiente se aprecia a los picos cromatográficos con una buena resolución.

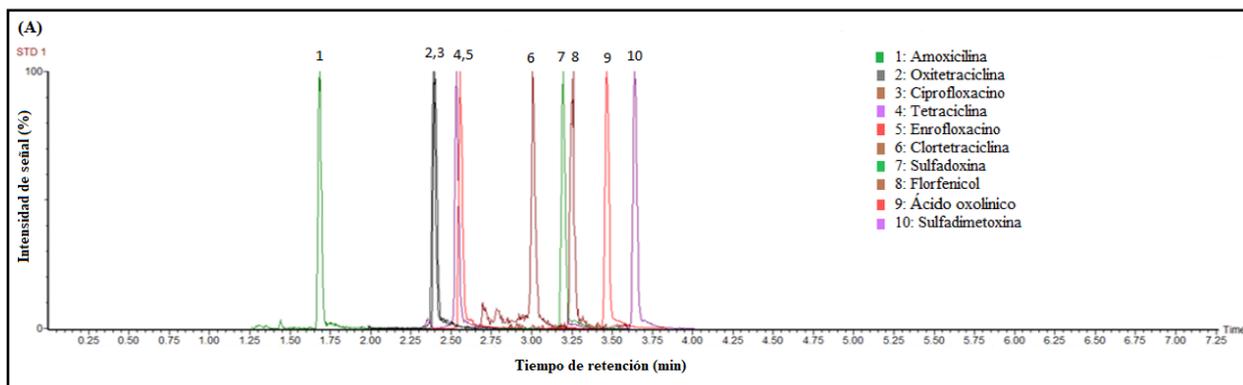


Figura 9. Cromatograma del método en matriz fortificada.

Por otra parte, en la **Figura 10** se muestra la lectura de una matriz blanco para determinar si existe algún componente de la matriz o del proceso de extracción que puedan ocasionar alguna interferencia y como se observar las señales son mínimas excepto por un pico al inicio del cromatograma, el cual no se localiza cerca a los tiempos de retención de los analitos, por lo que no debería afectar al método.

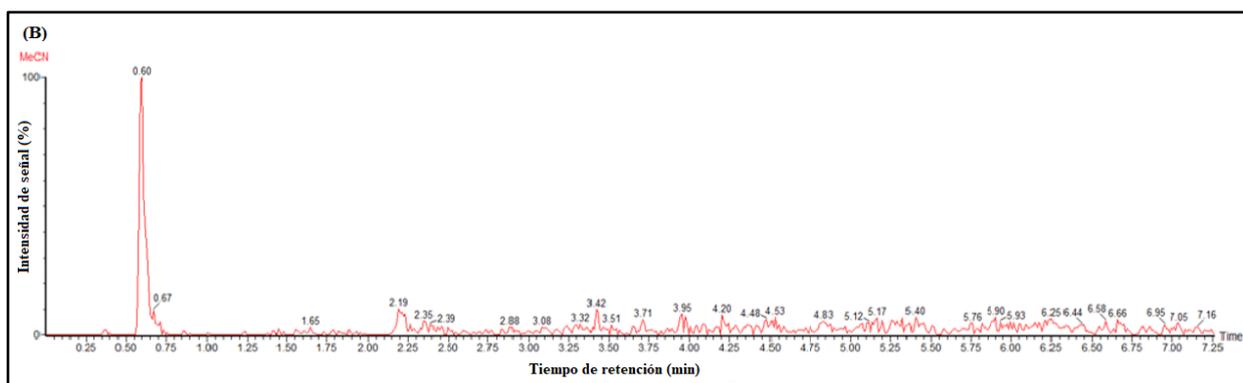


Figura 10. Cromatograma del método en matriz blanco

Después haber obtenido el patrón de identificación y de algunos ensayos, se tuvo listo el método multiresiduos para 10 residuos antibióticos, aunque todavía no se consideró un método fiable. Por ende, se realizó un proceso de validación que requiere de una guía de validación que describe los parámetros y los criterios de aceptabilidad de cada parámetro. Una vez validado el método se puede afirmar que es un método confiable y que puede ser utilizado en ensayos de laboratorio.

6.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

6.2.1. Prueba de selectividad o especificidad

En la *Tabla 13* se muestran las áreas de los picos cromatográficos de una matriz blanco y las lecturas de una matriz fortificada con una solución mezcla de 10 ppb, realizadas por dos analistas. Además, se muestra el porcentaje equivalente de las señales de la matriz blanco con respecto a las lecturas en la matriz fortificada, que se consideran como el 100%. Se puede apreciar que los porcentajes de la matriz blanco no superan el 30 %, por lo que se cumple con el parámetro de selectividad bajo el criterio de la guía SANTE. (64)

Tabla 13. Porcentaje del área del pico cromatográfico en la matriz blanco respecto al área del pico en la matriz fortificada del analista 1 (A1) y del analista 2 (A2)

Analitos	Área de la matriz blanco (MB)	Área del pico cromatográfico 10 ppb (A1)	% MB	Área del pico cromatográfico 10 ppb (A2)	% MB
Enrofloxacino	40030.41	289700.072	13.818	292976.741	13.663
Ciprofloxacino	6078.979	96260.664	6.315	96944.0047	6.271
Ácido oxolínico	18983.387	612786.513	3.098	634306.538	2.993
Amoxicilina	70.239	14384.302	0.488	14366.9994	0.489
Tetraciclina	449.111	61627.4557	0.729	62053.4102	0.724
Clortetraciclina	54.527	14784.016	0.369	14396.8384	0.379
Oxitetraciclina	3132.725	67280.5858	4.656	68176.0651	4.595
Sulfadoxina	1328.583	168330.087	0.789	161129.138	0.825
Sulfadimetoxina	2742.832	162807.939	1.685	161115.866	1.702
Florfenicol	303.211	4224.5143	7.177	3741.7327	8.103
Criterio de aceptación			% MB < 30%		

6.2.2. Prueba de linealidad y sensibilidad

La *Tabla 14* muestra el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, el valor crítico (T_{cri}) y el valor calculado (T_r), los cuales se calcularon en Excel para determinar si la curva de calibración era lineal. El coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación son mayores a 0.98 y 0.99, lo que indica que la curva de calibración es aceptable debido una correlación lineal entre las variables x e y para cada analito. (66,74) Las áreas de los picos cromatográficos con las cuales se realizaron las curvas de calibraciones se pueden observar en el *ANEXO 7*.

Las hipótesis planteadas para analizar la correlación mediante la prueba t de Student fueron las siguientes:

H_0 = Coeficiente de correlación es igual a 0 (no hay correlación)

H_1 = Coeficiente de correlación es diferente de 0 (si hay correlación)

Como se observa en la **Tabla 14**, se rechaza la hipótesis nula para la curva de calibración de cada analito y se corrobora que la correlación es significativa para la curva de calibración de cada analito. Se realizó también el análisis de linealidad, el mismo que se puede observar en el **ANEXO 9**.

Tabla 14. Resultados de la curva de calibración: pendiente, coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), valor crítico (Tcri), valor calculado (Tr) y comparación entre el valor crítico y el calculado

Analito	Pendiente	r	r^2	Tcri	Tr	Tr>Tcri
Enrofloxacino	17981.60	0.9999	0.9997	3.182	101.007	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	6762.07	0.9993	0.9986	3.182	46.097	Se rechaza Ho
Ác. oxolínico	41601.90	1.0000	1.0000	3.182	435.073	Se rechaza Ho
Amoxicilina	1238.11	0.9989	0.9979	3.182	37.519	Se rechaza Ho
Tetraciclina	4582.79	0.9988	0.9976	3.182	35.141	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	1129.97	0.9987	0.9975	3.182	34.597	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	4942.64	0.9977	0.9953	3.182	25.226	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	11882.31	0.9973	0.9947	3.182	23.638	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	10906.21	0.9983	0.9967	3.182	30.062	Se rechaza Ho
Florfenicol	212.91	0.9976	0.9952	3.182	24.896	Se rechaza Ho

En la **Tabla 14** se muestra los valores de las pendientes obtenidas de las curvas de calibración con concentraciones de 50 ng/mL y 200 ng/mL para cada analito. Las pendientes calculadas ilustran comparativamente a una gráfica, en la que la tendencia de la pendiente es más visible en términos de si es más horizontal o vertical. Como se observa en la **Figura 11**, las pendientes de los analitos tienen una tendencia más vertical, es decir, son sensibles a la variación de las concentraciones, siendo las menos sensibles de la curva de calibración el enrofloxacino y el ácido oxolínico.

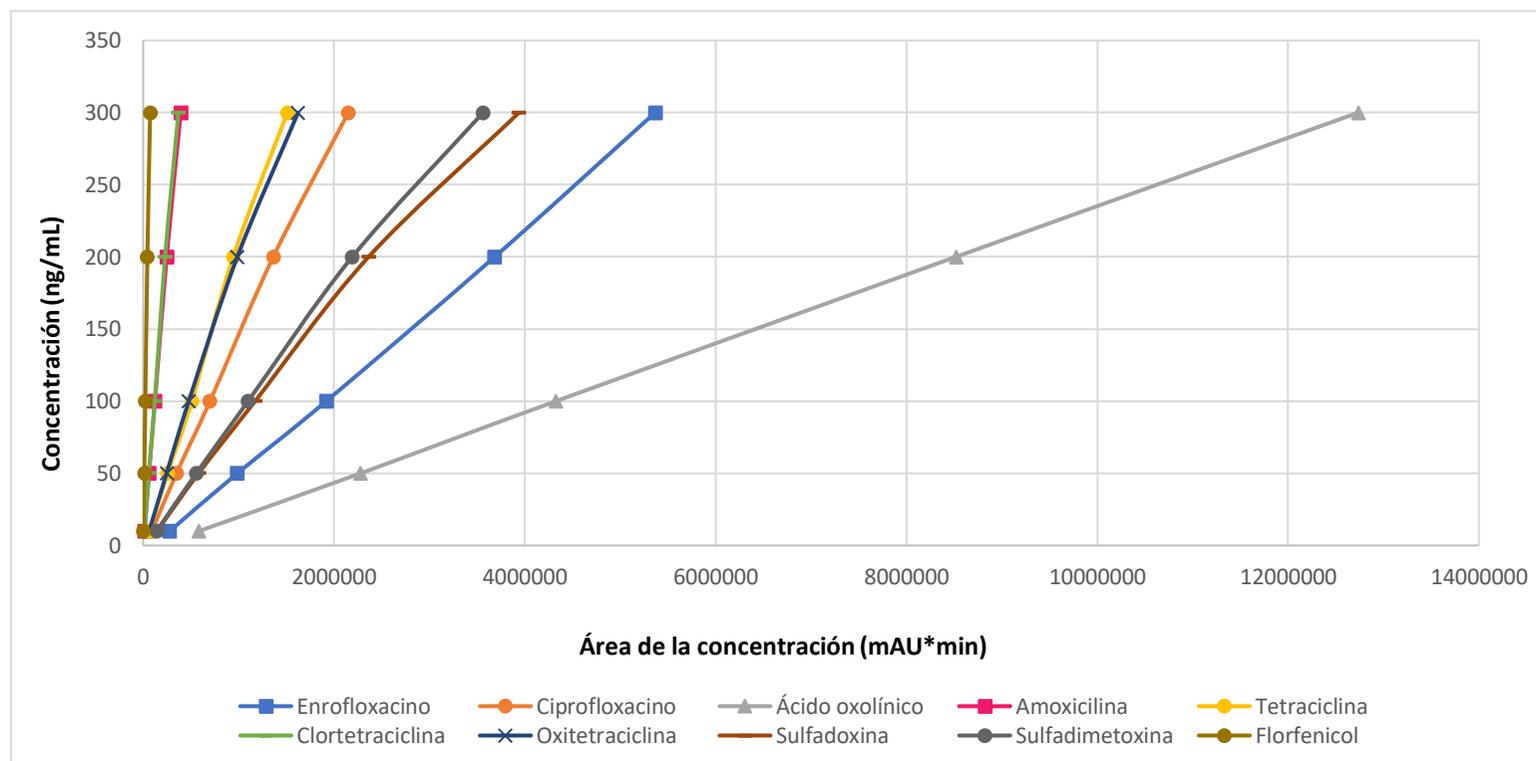


Figura 11. Gráfica de comparación de las curvas de calibración de los 10 estándares.

6.2.3. Prueba de límite de detección y cuantificación

En la *Tabla 15* se muestra la desviación estándar, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Se consideró la desviación estándar de la matriz con fortificación mínima de 10 ppb debido que era imposible en blanco. (60) El único analito que no cumplió con el límite de cuantificación fue la clortetraciclina, que excedió la cantidad que indica el criterio de aceptación de la guía de la FDA. Todos los analitos cumplieron con el límite de detección.

Tabla 15. Resultados del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método

N°	Analito	Desviación estándar (s)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ($3*s$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) ($10*s$)
1	Enrofloxacino	0.375	1.124	3.748
2	Ciprofloxacino	0.228	0.685	2.283
3	Ac. Oxolínico	0.377	1.130	3.765
4	Amoxicilina	0.303	0.910	3.035
5	Oxitetraciclina	0.290	0.869	2.898
6	Clortetraciclina	0.665	1.994	6.647
7	Tetraciclina	0.267	0.801	2.671
8	Sulfadoxina	0.221	0.664	2.214
9	Sulfadimetoxina	0.333	0.998	3.327
10	Florfenicol	0.302	0.906	3.020
Criterio de aceptación			LOD \leq 0.002 mg/Kg o 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	LOQ \leq 0.004 mg/Kg o 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$

6.2.4. Recuperación

En la *Tabla 16* se puede observar la recuperación de cada analito por cada analista y la recuperación promedio de ambos. Todos los analitos tuvieron un buen porcentaje de recuperación, excepto el residuo de florfenicol procesado por el analista 2, que excedió los límites de la recuperación. Sin embargo, al promediarse las lecturas de ambos analistas se logró cumplir el rango de aceptación de la guía de la FDA.

Tabla 16. Resultados de la recuperación de los analitos a diferentes concentraciones, para cada analista.

N°	Analito	Promedio de porcentaje (%) de recuperación								
		Fortificado a 10 µg/kg			Fortificado a 50 µg/kg			Fortificado a 200 µg/kg		
		Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Promedio	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Promedio	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Promedio
1	Enrofloxacino	101.6	106.8	104.2	96.3	101.5	98.9	95.2	103.0	99.1
2	Ciprofloxacino	112.9	114.9	113.9	93.6	98.0	95.8	95.3	101.1	98.2
3	Ácido oxolinico	106.2	108.8	107.5	99.4	103.2	101.3	96.9	101.6	99.2
4	Amoxicilina	112.9	104.7	108.8	97.1	92.4	94.7	101.4	95.1	98.2
5	Tetraciclina	101.2	107.6	104.4	101.3	100.9	101.1	96.0	95.3	95.7
6	Clortetraciclina	111.8	97.4	104.6	99.2	99.3	99.3	92.9	96.4	94.6
7	Oxitetraciclina	115.0	109.2	112.1	92.0	91.7	91.8	93.5	94.8	94.1
8	Sulfadoxina	110.7	110.9	110.8	94.6	94.2	94.4	97.0	95.9	96.5
9	Sulfadimetoxina	109.8	110.9	110.4	91.6	94.4	93.0	93.1	94.8	93.9
10	Florfenicol	109.3	118.4	113.9	97.3	91.7	94.5	102.8	92.5	97.7
Rango de aceptación		60 % - 115%			80% - 110%			80% - 110%		

6.2.5. Precisión

- **Repetibilidad**

En la **Tabla 17** se tiene los resultados de la desviación estándar relativa de cada analito a diferentes concentraciones y según el analista que realizó los ensayos. Todos los analitos cumplen el criterio de aceptabilidad de la FDA. Las desviaciones estándar relativas más altas correspondieron a la concentración más baja y viceversa, lo que puede explicarse porque a mínimas concentraciones las variaciones producen mayores cambios en la detección que en concentraciones mayores.

Tabla 17. Resultados de la repetibilidad del método según el analito

N°	Analito	Porcentaje de la desviación estándar relativa (RSDr)					
		Fortificado a 10 µg/kg		Fortificado a 50 µg/kg		Fortificado a 200 µg/kg	
		Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)
1	Enrofloxacino	3.69	3.05	0.89	1.79	0.97	1.27
2	Ciprofloxacino	2.02	2.34	1.28	1.90	2.06	2.01
3	Ác. oxolínico	3.55	2.16	1.59	1.46	1.12	1.86
4	Amoxicilina	2.69	3.82	1.40	1.57	1.50	0.78
5	Tetraciclina	2.86	2.24	1.31	1.22	1.37	1.76
6	Clortetraciclina	5.95	5.50	2.69	2.03	1.38	1.44
7	Oxitetraciclina	2.32	2.86	1.46	1.45	1.36	1.93
8	Sulfadoxina	2.00	4.34	1.53	1.09	1.21	1.43
9	Sulfadimetoxina	3.03	2.35	1.15	1.81	0.90	1.03
10	Florfenicol	2.76	3.71	3.36	4.16	1.92	2.60
Rango de aceptación		<22%		<11%		<6%	

- **Precisión intermedia**

En la **Tabla 18** se muestra los resultados de la desviación estándar relativa de las lecturas de ambos analistas, agrupados según las concentraciones de 10, 50 y 200 ppb, para determinar si su desviación es menor a 22%. Se evidenció que la desviación no se apartó del rango del criterio de aceptabilidad, aunque aumentó al compararse con los resultados individuales de cada analista, como se ve en la **Tabla 17**. También se analizó el HorRat_r a 200 ppb, ya que es la única concentración con una ratio mayor de 10⁻⁷, habiéndose observado que el HorRat_r obtenido es menor a 2, lo que indica que el método es reproducible por los dos analistas.

Tabla 18. Resultados de la precisión intermedia del método entre analistas

N°	Analito	Porcentaje de desviación estándar relativa (PRSDr)			
		Fortificado 10 µg/kg	Fortificado 50 µg/kg	Fortificado 200 µg/kg	
		Analista 1 y 2 (n=20)	Analista 1 y 2 (n=20)	Analista 1 y 2 (n=20)	HorRat _r
1	Enrofloxacino	4.16	3.04	4.14	0.20
2	Ciprofloxacino	2.31	2.84	3.65	0.18
3	Ácido oxolínico	3.10	2.43	2.86	0.14
4	Amoxicilina	5.00	2.93	3.48	0.17
5	Tetraciclina	4.01	1.25	1.58	0.08
6	Clortetraciclina	9.02	2.32	2.36	0.12
7	Oxitetraciclina	3.65	1.42	1.78	0.09
8	Sulfadoxina	3.29	1.31	1.43	0.07
9	Sulfadimetoxina	2.68	2.14	1.33	0.07
10	Florfenicol	5.22	4.76	5.84	0.29
Rango de aceptación		<22%	<22%	<11%	<2

6.2.6. Rango mínimo teórico

En el presente método multiresiduo desarrollado para 10 antibióticos, la concentración mínima que se pudo determinar fue de $10 \mu\text{g}/\text{Kg} = 10 \text{ ppb} = 10^{-8}$. Por ello, se usó el criterio que describe el Codex Alimentarius para encontrar el rango mínimo aplicable para ratios de concentraciones menores a 10^{-7} . Entonces, nuestro rango se calculó de la siguiente manera:

$$S_R = 0.22 * 10 \mu\text{g}/\text{Kg} = 2.2 \mu\text{g}/\text{Kg}$$

$$10 - 2*(2.2) < \text{rango mínimo} < 10 + 2*(2.2)$$

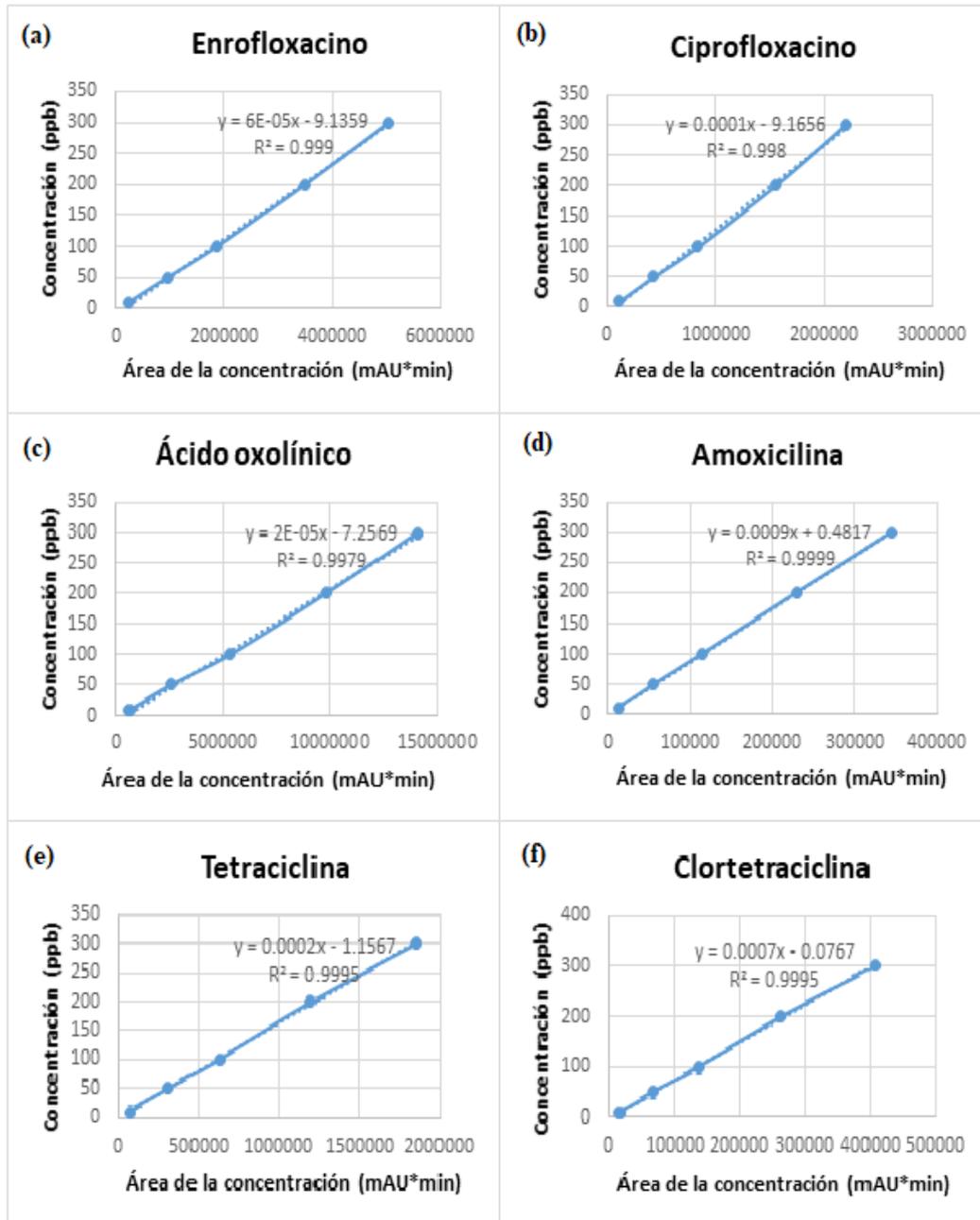
Es decir, nuestro rango mínimo debía ser de $5.6 \mu\text{g}/\text{Kg}$ a $14.4 \mu\text{g}/\text{Kg}$, que sería un rango mínimo teórico de trabajo, aunque el rango de trabajo cuantitativo se distribuiría desde la mínima concentración hasta la máxima de la curva de calibración, es decir, de 10 ppb a 300 ppb, puesto que el parámetro de linealidad permite la confiabilidad de los datos obtenidos mientras éstos se encuentren dentro de la curva de calibración. Al final se resume los resultados de la validación en la **Tabla 19** donde se muestran los criterios de aceptabilidad y los valores obtenidos de cada parámetro.

Tabla 19. Resultados de los parámetros de la validación y sus criterios de aceptabilidad.

Parámetro de validación	Guía de validación	Criterios de aceptabilidad	Resultados
Selectividad	SANTE	$\leq 30\%$ (nivel mínimo del método)	$\leq 13.82\%$
Linealidad	Mass Spectrometry Handbook (S. Lee)	$r^2 > 0.99$	$r^2 \geq 0.994$
Límite de detección	FDA	$\leq 2\ \mu\text{g/Kg}$	≤ 1.994
Límite de cuantificación	FDA	$\leq 4\ \mu\text{g/Kg}$	$\leq 3.765\ \mu\text{g/Kg}$ $C^* = 6.647\ \mu\text{g/Kg}$
Recuperación	FDA	60% - 115% (10 ppb) 80% - 110% (100 ppb)	97.4 - 118.4 % (10 ppb) 91.6 - 103.2 % (50 ppb)
	SANTE	70-120 %	92.5 - 103 % (100 ppb)
Desviación estándar relativa (RSDr)	FDA	$\leq 22\%$ (10 ppb) $\leq 11\%$ (100 ppb)	2 - 5.9 % (10 ppb) 0.9 - 4.2 % (50 ppb)
	SANTE	$\leq 20\%$	0.8 - 2.6 % (100 ppb)
Reproducibilidad intralaboratorio (PRSDr)	FDA	$\leq 22\%$ (10 -100 ppb)	2.3 - 9 % (10 ppb) 1.3 - 4.8 % (50 ppb)
	SANTE	$\leq 20\%$	1.3 - 5.8 % (100 ppb)
Rango mínimo aplicable	FDA	6 - 14 $\mu\text{g/Kg}$	5.6 - 14.4 $\mu\text{g/Kg}$,
C* (Clortetraciclina)			

6.3. RESULTADOS DE LAS MUESTRAS DE MERCADO

El área de los picos cromatográficos de la nueva curva de calibración se muestra en el *ANEXO 15*. Con dichos datos se obtuvo la gráfica de la curva, la ecuación y los coeficientes de determinación. Como se observa en la *Figura 12*, las curvas muestran linealidad y los valores de r^2 fueron mayores de 0.997, lo que indica una buena correlación entre las variables.



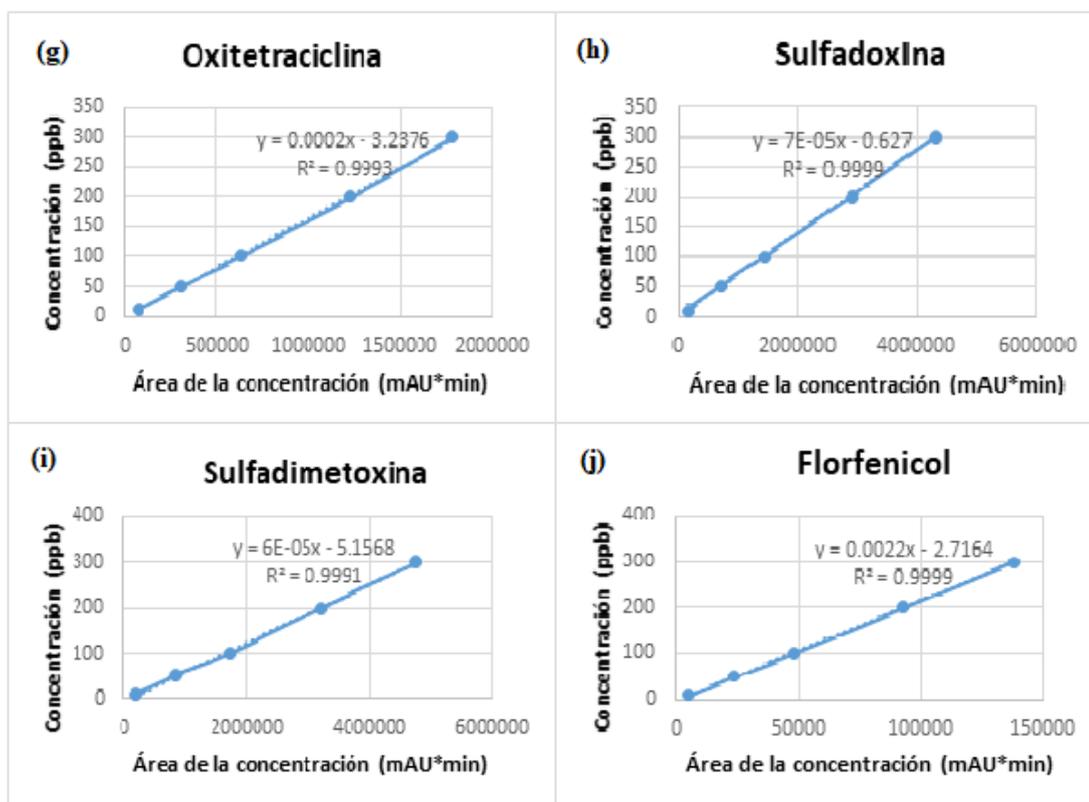


Figura 12. Curvas de calibración de muestras de mercado (a) Enrofloxacino, (b) Ciprofloxacino, (c) Ácido oxolínico, (d) Amoxicilina, (e) Tetraciclina, (f) Clortetraciclina, (g) Oxitetraciclina, (h) Sulfadoxina, (i) Sulfadimetoxina, (j) Florfenicol

6.3.1. Análisis de las muestras de mercado

Las áreas de los picos cromatográficos del análisis de las muestras se muestran en el ANEXO 17. En la *Tabla 20* se muestra las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración y el promedio de áreas de los picos cromatográficos de cada mercado. Tal como se observa en las regiones sombreadas, algunos resultados no mostraron señales por ende no contaban con área de pico cromatográfico y otros presentaron áreas muy pequeñas. Estas áreas no se acercan a las áreas de nuestras curvas de calibración (ANEXO 15) y, en consecuencia, no fueron cuantificadas por el método.

En la *Tabla 21* se confirma que tampoco se pudo detectar la concentración de varios analitos en las muestras, aunque no se puede asegurar si hay o no presencia de dichos analitos en las muestras. Pero se puede mencionar que si hubiera presencia de estos analitos en las muestras, estos deben encontrarse a concentraciones menores del rango de nuestro método. Por ende, no pudieron ser detectados ni cuantificadas.

Tabla 20. Ecuación de la curva de calibración y el promedio de las áreas de las muestras de mercado

Analitos	Ecuación	Área del pico cromatográfico (mAU*min)					
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
Enrofloxacino	$y = 0.00006x - 9.1359$	435.893	382.428	416.451	401.8165	392.0605	411.121
Ciprofloxacino	$y = 0.0001x - 9.1656$	147.788	148.1505	166.7275	161.601	166.3945	168.342
Ácido oxolínico	$y = 0.00002x - 7.2569$	399.315	-	164.695	426.565	122.215	231.46
Amoxicilina	$y = 0.0009x + 0.4817$	20.06635	-	2.6665	4.1275	-	18.946
Tetraciclina	$y = 0.0002x - 1.1567$	57.1215	389.506	384.35	396.034	255.5735	278.601
Clortetraciclina	$y = 0.0007x - 0.0767$	1.747	53.8245	48.8535	-	2.6665	60.431
Oxitetraciclina	$y = 0.0002x - 3.2376$	1648.653	1690.7225	1705.7245	22983.3605	1878.998	1260.09
Sulfadoxina	$y = 0.00007x - 0.627$	56.242	1160.427	507.417	538.2165	439.5465	444.946
Sulfadimetoxina	$y = 0.00006x - 5.1568$	47.1125	250.717	552.7505	432.209	553.863	286.903
Florfenicol	$y = 0.0022x - 2.7164$	24.8985	93.47	15.5735	116.3855	77.97	-

Los antibióticos que sí pudieron ser detectados son la amoxicilina y la oxitetraciclina, aunque el único cuya concentración estuvo por encima del límite de detección del método fue la oxitetraciclina (ver *Tabla 15*).

Tabla 21. Resultados de las muestras de mercado respecto a cada analito

Analitos	Concentración de las muestras de mercado (ng/g) o (ppb)					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Enrofloxacino	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciprofloxacino	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido oxolínico	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amoxicilina	0.500	ND	0.484	0.485	ND	0.499
Tetraciclina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clortetraciclina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oxitetraciclina	ND	ND	ND	1.359	ND	ND
Sulfadoxina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfadimetoxina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Florfenicol	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Leyenda de mercado M1 (Los Olivos), M2 (Independencia), M3 (Independencia), M4 (Comas), M5 (Pte. Piedra), M6 (San Martín de Porres)

6.3.2. Criterios de identificación de los residuos de las muestras de mercado

Las muestras de mercado, tal como se observó en la *Tabla 21*, no mostraron señales detectables por el presente método, excepto la oxitetraciclina. Para corroborar la identificación del analito se corroboró el precursor, sus fragmentos y su tiempo de retención (patrón de identificación), además se verificó que su señal sea mayor al blanco.

En la *Figura 13* y *Figura 14* se muestra el pico cromatográfico de los fragmentos de la señal de oxitetraciclina de las dos lecturas que se realizaron a las muestras del mercado 4 (Comas). Ambas lecturas coinciden con el patrón de identificación de la oxitetraciclina, mostrada en la *Tabla 10*.

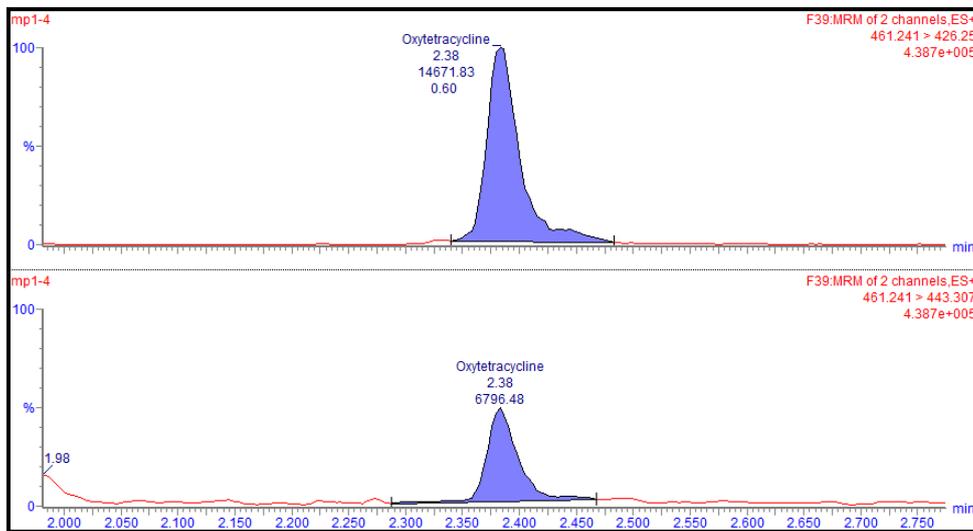


Figura 13. Cromatograma de los fragmentos de la oxitetraciclina de la muestra 1 del mercado 4

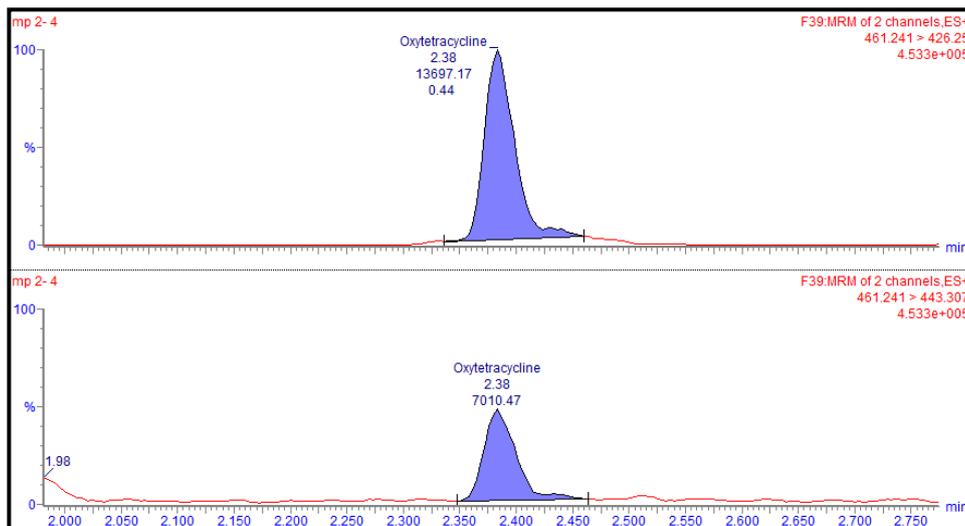


Figura 14. Cromatograma de los fragmentos de la oxitetraciclina de la muestra 2 del mercado 4

Además, la señal del analito (S) debe ser mayor de 3 veces o igual a la señal de ruido del blanco (N). La **Tabla 22** muestra el área de la matriz blanco, así como las áreas del mercado 4 y se comparó si el área de la señal es mayor al blanco.

Tabla 22. Criterio de identificación de los analitos respecto al ruido del cromatograma ($S/N > 3$)

Analito	Área de la matriz blanco (MB)	Área de M4	$M4/MB \geq 3$
Enrofloxacino	437.301	401.8165	0.919
Ciprofloxacino	156.779	161.601	1.031
Ácido oxolínico	390.64	426.565	1.092
Amoxicilina	20.178	4.1275	0.205
Tetraciclina	58.297	396.034	6.793
Clortetraciclina	1.621	-	-
Oxitetraciclina	92.072	22983.3605	249.624
Sulfadoxina	58.498	538.2165	9.201
Sulfadimetoxina	54.238	432.209	7.969
Florfenicol	20.573	116.3855	5.657

Después de corroborar el patrón de identificación y mostrar una señal mayor al blanco se evidencia la detección de la oxitetraciclina en la muestra 4 con el presente método para trucha arcoíris.

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio permitió desarrollar y validar exitosamente el método de multiresiduos de antibióticos en muestras de trucha arcoíris provenientes de la acuicultura, mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadrupolo (UHPLC-MS/MS). El método desarrollado y validado puede ser utilizado para identificar diez residuos de antibióticos y cuantificar nueve de ellos a una concentración mínima de 10 ppb.

El proceso de desarrollo del método se inició con la selección de los antibióticos de interés en el área acuícola según lo visto en la *Tabla 1*, los mismos que incluyeron a la oxitetraciclina, el florfenicol y el enrofloxacino. Se incluyó además otros antimicrobianos pertenecientes a familias de antibióticos usualmente presentes en los productos alimentarios, como quinolonas, tetraciclinas, sulfamidas y penicilinas. (30,31,68–72)

Una vez elegidos los antibióticos de interés (enrofloxacino, ciprofloxacino, ácido oxolínico, amoxicilina, oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina, sulfadoxina, sulfadimetoxina y florfenicol), se realizó la sintonización correspondiente, con el fin de adquirir un patrón de identificación de cada analito. Se debe remarcar que las masas del ion precursor de los analitos en el presente estudio son parecidas a otras investigaciones previas con métodos similares, debido a que la masa del ion es propia del analito y no depende del método. (31,32,68,71) Sin embargo, algunas condiciones espectrométricas del equipo pueden variar como la energía de colisión, el voltaje de cono y el modo de ionización, estos condicionan los fragmentos que se generan del ion precursor. Los fragmentos formados son similares al método de la FSIS de los EEUU y a otros estudios como el de Kanda y el de Dubreil, aunque existan pequeñas diferencias debido a la elección de otros valores para el voltaje de colisión y el voltaje de cono. (31,71,72) Respecto a los fragmentos, la guía SANTE/12682/2019 requiere 2 iones fragmento para considerar al método como un método confirmatorio, puesto que cuantos más fragmentos se adquiera es más fácil distinguirlos entre distintas moléculas. (64)

El método desarrollado en el laboratorio es una optimización del método realizado por el FSIS, ya que este mostró una baja recuperación para los residuos antibióticos que se desea determinar con el presente método. La diferencia más sustancial fue el proceso de extracción de los analitos, para lo cual se comparó el porcentaje de recuperación de otros

métodos multiresiduos que tuvieran incluido la mayoría de estos 10 residuos, con el fin de determinar qué tan eficientes eran sus procesos de extracción con estos antibióticos. Dos estudios de multiresiduos muestran la menor variación de recuperación entre sus residuos, con la casualidad de que ambos estudios mostraron utilizar EDTA en su extracción aparte de otros compuestos. (32,70) En la bibliografía se encuentra que el EDTA es recomendado para extracciones de residuos de tetraciclinas debido a que las tetraciclinas son quelantes y quelan rápidamente a los metales catiónicos, por ende, compite con las tetraciclinas y permite que estas puedan estar libres para su extracción lo que genera una mejoría en los métodos multiresiduos para la extracción de tetraciclinas (ver **ANEXO 4**). (20,31,71) Como el uso de tetraciclinas está permitido en el país, estos residuos son relevantes para el estudio, por lo tanto, se consideró realizar ensayos con EDTA y se elaboró el proceso de extracción mostrado en la **Figura 6**.

Una vez desarrollado el método en el LaCCSA del CITEacuícola UPCH, se procedió a su validación, bajo los parámetros de ensayos cuantitativos de la guía de la FDA para productos alimentarios, aunque se utilizó también criterios de otras guías importantes como las de SANTE, IUPAC, Codex Alimentarius y guías chilenas, lo que le agregó exigencia y consistencia a nuestro proceso de validación (58–60,62,64,65) Se analizaron como parámetros de validación la selectividad, la linealidad, la sensibilidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la recuperación, la precisión y el rango de trabajo.

En lo que respecta a la selectividad, se determinó que el método es selectivo, pues cumplió con el patrón de identificación exigidos a los métodos basados en esta técnica, (28,29) así como con el criterio de la guía de la SANTE, que establece la exigencia de que el método a evaluar tenga señales de interferencia menores al criterio de aceptabilidad SANTE. (64) Debe remarcarse que la mayoría de estudios previos sólo hacen referencia a sus propios patrones de identificación para corroborar la selectividad de su método multiresiduos particular basados en espectrometría de masas. (29)

Con relación al parámetro de linealidad, fue analizado determinando el coeficiente de determinación y el de correlación, obtenidos de su curva de calibración. En general, la exigencia es que los resultados se acerquen a 1, pero en ensayos analíticos la exigencia mínima es que el coeficiente de determinación sea mayor a 0.98 y el coeficiente de correlación mayor a 0.99. (73,74). En el caso de nuestro método, tanto el coeficiente de

determinación como el de correlación cumplieron con dichos criterios, siendo los resultados similares a investigaciones previas de residuos para productos acuícolas y para productos porcinos. (32,70)

El criterio de sensibilidad de nuestro método fue evaluado a través de la exploración visual de la curva de calibración, en concordancia con las guías de la FDA y la IUPAC. Con este criterio, el método mostró una buena sensibilidad para los analitos. Otros estudios evalúan la sensibilidad a través del porcentaje de falsos positivos en los ensayos en matriz blanco, determinando así si el método detecta el analito o un falso analito y qué tan sensible es para diferenciarlo. (68,72)

En cuanto al límite de detección y al límite de cuantificación, nuestros resultados mostraron que el método cumple con los parámetros de la FDA, excepto por la clortetraciclina para el límite de cuantificación. Cabe recalcar que no se usó una matriz blanco para obtener estos límites, sino una concentración de 10 ppb. Es posible que, si hubiéramos utilizado la desviación estándar de una concentración menor a 10 ppb, la clortetraciclina hubiera cumplido con el criterio de cuantificación. Sin embargo, nuestros resultados se encuentran dentro del rango de otros estudios realizados también en productos acuícolas. Por ejemplo, Dubreil y col. (66) obtuvieron un límite de detección menor de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en tanto Guidi y col. (68) obtuvieron LODs concentraciones menores de 1.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para las quinolonas y sulfamidas, pero para la clortetraciclina fue menor a 34.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el año siguiente Guidi y col. publicó otro estudio de multiresiduos específico para quinolonas y tetraciclinas en el cual el límite de cuantificación para tetraciclinas fue menor de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y quinolonas menor 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y los LOQs de Pereira y col muestra concentraciones para las tetraciclinas de 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. (70,77) Aunque las validaciones de los estudios mencionados siguen la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE que a diferencia de la guía de la FDA, no incluye un criterio de aceptabilidad para el límite de detección ni para el límite de cuantificación. (68,72,78)

Por otra parte, los parámetros de recuperación y precisión se centraron en la constancia de los resultados de las lecturas. En cuanto a la recuperación, el método cumplió con el criterio de aceptación de la FDA en todos los casos, excepto por el residuo de florfenicol del analista 2, pero este cumplió con el criterio de la guía SANTE, que establece un rango de recuperación de 70-120%. (58,64) El rango de SANTE es constante sin importar las

concentraciones, mientras que según la guía de FDA este rango varía de acuerdo a la concentración. (58,64) Una explicación posible del resultado obtenido para el florfenicol es la manipulación del proceso de fortificación, pues justamente no cumple con el criterio establecido a una concentración inferior de 10 ppb, donde cualquier variación del método es más susceptible. En lo que se refiere a estudios previos en productos acuícolas que también realizaron sus recuperaciones a concentraciones semejantes a las nuestras, Pereira y col. obtuvieron una recuperación de 76-125% para las tetraciclinas, las quinolonas y la sulfadimetoxina a 50 ppb, en tanto Fedorova y col. obtuvieron recuperaciones entre 70-116% para las tetraciclinas, las quinolonas, la sulfadimetoxina y un 120% para el florfenicol a 10 ppb, pero también se mostró poco eficiente para amoxicilina recuperando menos de 50%. (69,77) Por otra parte, Kanda y col. obtuvieron una recuperación muy variable entre 25-118% para 37 antibióticos de diversos grupos a 10 ppb, pero aumenta a 75%-103% para el grupo de antibióticos en común con nuestro método y cabe recalcar que es un método con una extracción de EDTA. (71) En tal contexto, el método desarrollado en el presente estudio tiene mejores recuperaciones comparado con los estudios mencionados y no se encuentra en los límites inferiores del rango aceptable de recuperación. Debe mencionarse además que no hay estudios recientes en productos acuícolas que detallen este parámetro, pero hay un estudio realizado en las plumas de aves que también mostro buenas recuperaciones usando EDTA, aunque también las recuperaciones suelen ser variables cuando el método determina un mayor número de analitos. (20,29,32)

Las pruebas de repetibilidad y de precisión intermedia llevadas a cabo para evaluar el parámetro de precisión, cumplieron con el criterio de aceptación de la FDA e incluso con el de la guía SANTE, puesto que la precisión obtenida fue menor a 20% de desviación estándar relativa. (58,64) Pereyra y col. obtuvieron para todos los antibióticos evaluados una desviación estándar relativa menor de 20%, al igual que Fedorova y col., mientras que Kanda y col. obtuvieron una repetibilidad menores de 7%, y Gajda y col. menores de 8.9% (32,69,71,77) Es necesario mencionar que los valores reportados en los estudios revisados cumplieron con el parámetro de la guía de la FDA, al igual que nuestro presente método, pero los valores fueron mayores en comparación con nuestros resultados.

Finalmente, en lo que respecta al rango mínimo, se usó como referencia la guía de la FDA y el manual del Codex Alimentarius, este último desarrolla el parámetro en función de un

cálculo que depende de una concentración de referencia, la cual en este estudio correspondió a la menor concentración de la curva y dio como resultado un rango de 5.6 a 14.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, muy ligeramente diferente al del criterio de la FDA, que es de 6 a 14 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. (58,65) La interpretación de este resultado es que, si detectamos concentraciones mínimas, ese es el rango mínimo teórico en el que los resultados aún son considerados precisos. Pero el rango de trabajo abarcaría el intervalo al que pertenecen las concentraciones de la curva de calibración. Además, se debe puntualizar que en la guía de la FDA sólo se menciona la definición del parámetro, sin describirse su procedimiento. (58)

Culminado el proceso de validación, se corroboró que nuestro método tenía una mejor recuperación, repetibilidad y reproducibilidad que el método del FSIS en el que nos basamos. Esto puede ser debido a los cambios realizados al método en base a otros estudios que mostraron mejores resultados como se puede ver en el *ANEXO 4*.

Por último, se procedió a aplicar el método en muestras de trucha arcoíris adquiridas en mercados de la zona de Lima Norte. De estas muestras solo se pudo detectar trazas de oxitetraciclina (concentración menor de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras del mercado 4 (Comas), mientras que para los demás residuos de antibióticos mostró áreas inferiores a la curva de calibración, es decir, no fueron detectables para el presente método por lo que se puede inferir que ninguna muestra de mercado infringe los niveles máximos permitidos según las normas del Codex Alimentarius, la Unión Europea, SANIPES y DIGESA.

Estudios de bioacumulación o farmacocinética de los analitos en productos acuícolas han mostrado que ciertos antibióticos tienen un tiempo de depuración determinado antes de alcanzar niveles permitidos. Como en el caso de Nunes y col., que estudiaron la excreción de una sulfamida y demostraron que toma 10 días para llegar obtener una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en musculo de tilapia, luego de la última dosis del medicamento. (79) Por otra parte, una revisión de varios medicamentos usados en acuicultura concluye que la depuración de medicamentos depende no sólo del espécimen, sino además de las condiciones del hábitat como la temperatura y la salinidad (80). La revisión refiere una vida media de eliminación de 4.8 días a 16 °C y 8.9 días a 5 °C para el grupo de las tetraciclinas. Presumiblemente el tiempo de depuración pueda haber contribuido en parte a que en nuestro estudio no se hubiese detectado ni siquiera trazas de los antibióticos evaluados, excepto la Oxitetraciclina. Pero por lo descrito hace suponer que las muestras

analizadas habían estado en contacto reciente con este medicamento veterinario debido a su corto tiempo de eliminación. A parte en pruebas de metabolización en perros y ratas, las tetraciclinas han demostrado que no sufren biotransformación ya que se encontró en la orina de estos animales la molécula en su forma base por lo que la concentración encontrada en la trucha sería una guía para extrapolar el tiempo de su última dosis en el animal. (81) Aunque no es muy común el estudio de metabolitos debido a que los mismos límites de residuos no especifican o no incluyen los límites máximos para los metabolitos de drogas veterinarias.

El método de multiresiduos de antibióticos desarrollado y validado en este estudio, que utilizó la técnica de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) en muestras de trucha arcoíris provenientes de acuicultura, demostró ser óptimo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el procedimiento de validación. El estudio siguió un método de desarrollo y un procedimiento de validación que pueden ser replicados, los que constituyen fortalezas adicionales. El presente trabajo de investigación constituye el primer estudio que realiza el análisis instrumental de residuos de medicamentos en productos acuícolas (trucha) en nuestro país utilizando una tecnología de punta como el equipo de LC-MS/MS.

Cabe señalar que una limitación del estudio fue trabajar con una matriz tan compleja como la trucha arcoíris, que contiene altas cantidades de interferentes como lípidos y grasas, entre otras biomoléculas y que podrían interferir en la cuantificación de los analitos o deteriorar el equipo de LC-MS/MS. Por ello, se requiere de adsorbentes costosos como el C18 para remover dichos interferentes.

La exitosa validación del método lograda con este estudio, abre el camino para su aplicación en el monitoreo de los residuos de medicamentos veterinarios en productos acuícolas como la trucha que se comercializan en nuestro país o que se desean exportar, a concentraciones que estén por debajo de los límites máximos permitidos (100 ppb). Se espera que el método se extienda otros productos acuícolas de interés comercial. Esperamos que con ello se contribuirá de manera decisiva en la mejora de la calidad y la seguridad de los productos acuícolas y por ende la eficiencia de su comercialización, tanto en el mercado interno como en el externo.

VIII. CONCLUSIÓN

- 1) Se desarrolló exitosamente el método multiresiduo de antibióticos mediante una técnica analítica de UHPLC-MS/MS, para la determinación de diez residuos de antibióticos (enrofloxacino, ciprofloxacino, ácido oxolínico, amoxicilina, oxitetraciclina, clortetraciclina, hidrocloreuro de tetraciclina, sulfadoxina, sulfadimetoxina y florfenicol) en muestras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de acuicultura.
- 2) Se validó exitosamente el método, que cumplió con los parámetros de selectividad, linealidad ($r \geq 0.997$, $r^2 \geq 0.994$), sensibilidad, límite de detección (valores ≤ 1.994 $\mu\text{g/Kg}$), límite de cuantificación (valores ≤ 6.647 $\mu\text{g/Kg}$), recuperación (90% - 118%), precisión ($< 6\%$), precisión intermedia ($< 9\%$) y rango mínimo de trabajo (5.6 $\mu\text{g/Kg}$ a 14.4 $\mu\text{g/Kg}$) bajo los criterios descritos en la guía de validación del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA.
- 3) Las muestras de trucha arcoíris de seis puntos de venta (Los Olivos, Independencia, Comas, Pte. Piedra, San Martín) dieron resultados indetectables con este método, excepto las muestras del mercado 4 (Comas), en las que se detectó trazas de oxitetraciclina.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores determinando una curva de calibración a concentraciones menores que las del presente estudio, ya que hay una diferencia sustancial entre las señales del blanco y las señales de los analitos a 10 ppb, de modo que el método pueda discernir entre ambas señales.
- Implementar el método para un rango expandido de antibióticos y para un espectro mayor de medicamentos o sustancias utilizados comúnmente en acuicultura.
- Ampliar la aplicación del método a través de ensayos en muestras de trucha arcoíris provenientes de diferentes lugares del país.
- Recomendar a las autoridades regulatorias la implementación del método para el monitoreo de la seguridad de los productos acuícolas que se comercializan en el mercado interno y aquellos destinados a la exportación.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura [FAO]. FishStatJ. FAO; 2020.
2. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. 2018. 250 p.
3. Turnbull JF, Berrill IK, Green DM, Kaye R, Morris D, Murray AG, et al. Applied epidemiology with examples from UK aquaculture. *Aquac Res.* 2011;42(SUPPL. 1):21–7.
4. Fitridge I, Dempster T, Guenther J, de Nys R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling.* 2012;28(7):649–69.
5. ICA. Manual para garantizar la seguridad alimentaria de los productos de la Acuicultura. Manual para garantizar la seguridad alimentaria de los productos de la Acuicultura. 2016.
6. Santos L, Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52(2):135–43.
7. Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol.* 2006;8(7):1137–44.
8. Morris DJ, Gray AJ, Kay JF, Gettinby G. EU sampling strategies for the detection of veterinary drug residues in aquaculture species: Are they working? *Drug Test Anal.* 2012;4(SUPPL.1):1–9.
9. Love DC, Rodman S, Neff RA, Nachman KE. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environ Sci Technol.* 2011;45(17):7232–40.
10. FDA. Approved Aquaculture Drugs. 2018.
11. Pham DK, Chu J, Do NT, Brose F, Degand G, Delahaut P, et al. Monitoring Antibiotic Use and Residue in Freshwater Aquaculture for Domestic Use in Vietnam. *Ecohealth.* 2015;12(3):480–9.
12. World Health Organization. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. World Health Organization. 2017. 1–88 p.
13. Millanao AR, Barrientos-Schaffeld C, Siegel-Tike CD, Tomova A, Ivanova L, Godfrey HP, et al. Resistencia a los antimicrobianos en Chile y el paradigma de Una

- Salud: manejando los riesgos para la salud pública humana y animal resultante del uso de antimicrobianos en la acuicultura del salmón y en medicina. *Rev Chil infectología*. 2018;35(3):299–308.
14. Ministerio de la Producción del Perú. Guideline for public/private enterprise to invest in aquaculture industry in Perú. KOPE-LAR., editor. Lima; 2019.
 15. Ministerio de la Producción del Perú. Anuario estadístico pesquero y acuicola 2017. Lima; 2018.
 16. División de control sanitario del medio ambiente acuícola. Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura PR-DSANIPES/CSMAA-02. 2008.
 17. SANIPES. Relación de laboratorios autorizados como entidades de apoyo. Lima; 2019.
 18. SANIPES. Relación de métodos aprobados N° PTE-037-19-SANIPES. 2020.
 19. Gaudin V, Hedou C, Rault A, Verdon E. Validation of a five plate test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010;27(7):935–52.
 20. Lehotay SJ, Lightfield AR, Geis-Asteggiane L, Schneider MJ, Dutko T, Ng C, et al. Development and validation of a streamlined method designed to detect residues of 62 veterinary drugs in bovine kidney using ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal*. 2012;4(SUPPL.1):75–90.
 21. Aerts MML, Hogenboom AC, Brinkman UAT. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1995;667(1):1–40.
 22. Rahman MM, Abd El-Aty AM, Kim SW, Shin SC, Shin HC SJ. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography- A review. *J Sep Sci*. 2017;40(1):203-212.
 23. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm*. 2012;1–10.
 24. Quirós M. Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño. 1st ed. Universidad de Costa Rica, editor. 2004. 26 p.
 25. Swartz M. HPLC detectors: A brief review. *J Liq Chromatogr Relat Technol*.

- 2010;33(9–12):1130–50.
26. Locatelli M, Melucci D, Carlucci G, Locatelli C. Recent HPLC strategies to improve sensitivity and selectivity for the analysis of complex matrices. *Instrum Sci Technol*. 2012;40(2-3):112-37.
 27. Stolker AAM, Brinkman UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - A review. *J Chromatogr A*. 2005;1067(1–2):15–53.
 28. González RR, Moreno JLF, Bolaños PP, Frenich AG, Vidal JLM. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: Hacia la seguridad alimentaria. *Rev Esp Salud Publica*. 2007;81(5):461–74.
 29. Mainero Rocca L, Gentili A, Pérez-Fernández V, Tomai P. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2017;34(5):766–84.
 30. Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ Sci*. 2014;19(1):11–28.
 31. FSIS. Screening and Confirmation of Animal Drug Residues by UHPLC-MS-MS. Estados Unidos; 2018. Report No.: CLG-MRM1.08.
 32. Gajda A, Nowacka-Kozak E, Gbylik-Sikorska M, Posyniak A. Multi-residues UHPLC–MS/MS analysis of 53 antibacterial compounds in poultry feathers as an analytical tool in food safety assurance. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2019;1104:182–9.
 33. Geis-Asteggiante L, Lehotay SJ, Lightfield AR, Dutko T, Ng C, Bluhm L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1258:43–54.
 34. Edwards P, Demaine H. History, status and potential of rural aquaculture. In: Nations F and AO of the U, editor. *Rural Aquaculture: Overview and Framework for Country Reviews*. Bangkok; 1998.
 35. Orvay F. Sistemas y técnicas de producción. In: *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Universitat Barcelona; 1993. p. 27–31.
 36. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura [FAO].

- Visión general del sector acuícola nacional - Perú. FAO Fisheries and Aquaculture. 2005. p. 15.
37. Bojorquez RM, Ramos AP. Manual de cultivo de trucha arcoíri en jaulas. Lima: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero; 2004. 123 p.
 38. Montesinos JA. Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del lago titicaca. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2018.
 39. Ministerio de la Producción del Perú. Catastro Acuícola Nacional. 2019.
 40. FONDEPES. Manual de crianza de trucha en ambientes convencionales. Minist la Prod -Fondo Nac Desarro Pesq. 2014;88.
 41. SANIPES. Programa oficial de vigilancia y control de enfermedades en animales acuáticos. Lima; 2016. p. 12.
 42. Fernández JGG. Flavobacteriosis en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), procedentes del Lago Tititaca. Biol. 2013;11(2):205–15.
 43. León J, Ávalos R, Ponce M. Flavobacterium psychrophilum y su patología en alevines de Onchorhynchus mykiss del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. Rev Peru Biol. 2008;15(2):117–24.
 44. Fernando Mesías V, Mario Vargas L, Alexander Cueva Q, Alberto Manchego S, Nieves Sandoval C. Patogenicidad de una cepa de Yersinia ruckeri de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Huaraz, Perú. Rev Investig Vet del Peru. 2019;30(1):387–403.
 45. SANIPES. Acuicultura / Registro sanitario.
 46. MacNeil JD. The Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives and its role in the evaluation of the safety of veterinary drug residues in foods. AAPS J. 2005;7(2):274–80.
 47. Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. Environ Int. 2008;34(8):1215–26.
 48. Watts JEM, Schreier HJ, Lanska L, Hale MS. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: Sources, sinks and solutions. Mar Drugs. 2017;15(6):1–16.
 49. SANIPES. Indicadores Sanitarios de Inocuidad y Calidad para los Productos Pesqueros y Acuicolas para Mercado Nacional y de Exportacion. Lima; 2016. p. 21.

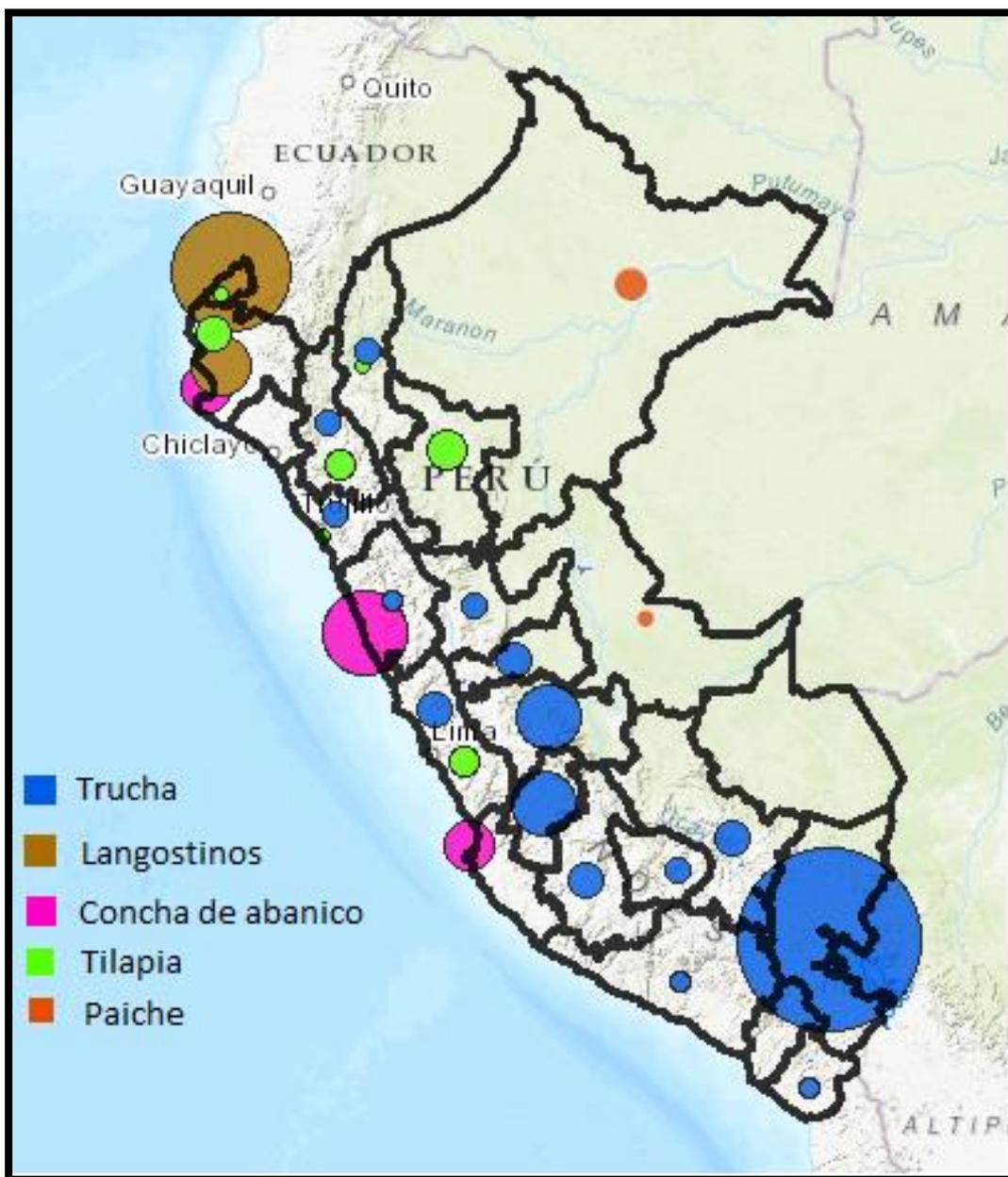
50. Comisión Europea. Reglamentos UE N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009. Diario Oficial de la Unión Europea 2010.
51. Codex Alimentarius. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre La Gestión de Riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios. 2018;45.
52. Ministerio de Salud. Norma Sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumos humano. N°372-2016/MINSA 2016.
53. SANIPES. Procedimiento: Toma y envío de muestras para el programa control de sustancias prohibidas y residuos de productos en acuicultura. Perú; 2017. Report No.: Resolución directoral 006-2017-SANIPES-DSNPA.
54. Alfonso R. Gennaro. Remington Farmacia . 20th ed. Vol. 1. Buenos Aires: Panamericana; 2003. 699 p.
55. WATERS. HPLC - High Performance Liquid Chromatography Explained. [Internet]. [Consultado 15 Mar 2020]. Disponible en: https://www.waters.com/waters/es_PE/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es_PE
56. L.G. Wade. Espectrometría de masas. In: Química Orgánica. 7th ed. México D.F.: Pearson; 2011. p. 539–51.
57. WATERS. Mass Spectrometry (MS) Beginner’s Guide: Waters. [Internet]. [Consultado 22 Mar 2020]. Disponible en: https://www.waters.com/waters/es_PE/MS---Mass-Spectrometry-%28MS%29-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=es_PE&cid=10073244
58. FDA. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. 3rd ed. Foods Program Science and Research Steering Committee. 2019. 37 p.
59. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem. 2002;74(5):835–55.
60. SERNAPESCA. Guía de Validación de Métodos Analíticos. 2018.
61. Eurachem. La adecuación al uso de los Métodos Analíticos. 1st ed. Vol. 56, Planta Medica. 1990. 544 p.
62. Instituto de Salud Pública Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.” Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodriguez L, Soto M, et al., editors. 2010.

63. International Conference on Harmonization (ICH). Bioanalytical Method Validation M10. 2019.
64. Method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/12682/2019. 2019;
65. FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission. Procedural manual. Twenty-fourth edition. 2015. 231 p.
66. Triola MF, Lossi L. Estadística. 12th ed. Fonseca S, editor. Ciudad de México: Pearson Hispanoamérica; 2018.
67. Sherri B. Turnipseed, Joseph M. Storey, I-Lin Wu, Charles M. Giesecker, Nicholas R. Hasbrouck, Tina C. Crosby, Wendy C. Andersen¹, Shanae Lanier, Christine R. Casey, Robert Burger and MRM. Application and evaluation of a high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug residues in incurred fish and imported aquaculture samples. *Anal Bioanal Chem.* 2018;176(1):100–106.
68. Guidi LR, Santos FA, Ribeiro ACSR, Fernandes C, Silva LHM, Gloria MBA. A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish. *Talanta.* 2016;163:85–93.
69. Fedorova G, Nebesky V, Randak T, Grabic R. Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. *Chem Pap.* 2013;68(1):29–36.
70. Guidi LR, Santos FA, Ribeiro ACSR, Fernandes C, Silva LHM, Gloria MBA. Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chem.* 2017;245:1232–8.
71. Kanda M, Nakajima T, Hayashi H, Hashimoto T, Kanai S, Nagano C, et al. Multi-residue determination of polar veterinary drugs in livestock and fishery products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int.* 2015;98(1):230–47.
72. Dubreil E, Gautier S, Fourmond MP, Bessiral M, Gaugain M, Verdon E, et al. Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2016;34(4):453–68.
73. Association of Analytical Communities International. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. AOAC International. 2002.
74. Lee M. *Mass Spectrometry Handbook* . 2012.

75. AOAC. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. Interlab Collab Study. 2002;Appendix D:1–12.
76. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues. 2003;11.
77. Pereira R, Cazorla R, Romero-gonzález R, Luis J, Vidal M, Garrido A. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2012;895–896:39–47.
78. The Commission of The European Communities. Decisión de La Comisión de 12 de agosto de 2002/657/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Off J Eur Communities*. 2002;L221/8(3):8–36.
79. Nunes KSD, Vallim JH, Assalin MR, Queiroz SCN, Paraíba LC, Jonsson CM, et al. Depletion study, withdrawal period calculation and bioaccumulation of sulfamethazine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with medicated feed. *Chemosphere*. 2018;197:89–95.
80. Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE, Johnson GR, Rainnie DJ, Speare DJ. Drugs in salmonid aquaculture - A review. *J Vet Pharmacol Ther*. 1997;20(5):333–49.
81. Botsoglou NA., Fletouris DJ. Drug Residues in Foods: Pharmacology, food safety, and analysis. Marcel Dekker. 2001; p. 97-100

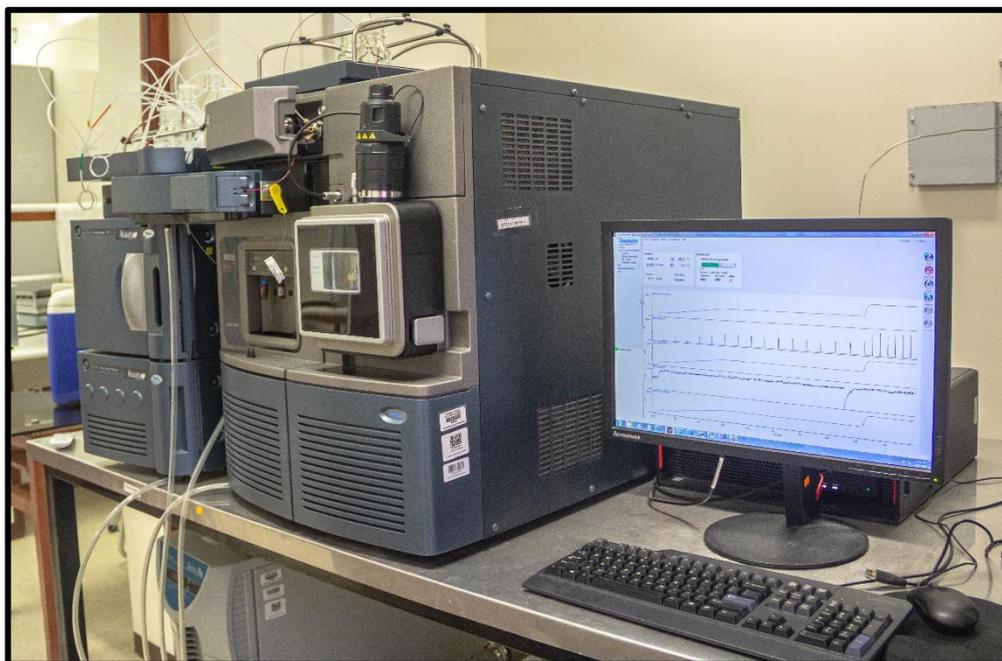
XI. ANEXOS

ANEXO 1. CATASTRO ACUÍCOLA NACIONAL



Fuente: <http://catastroacuicola.produce.gob.pe/web/>

ANEXO 2. EQUIPO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A UN DETECTOR DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LaCCSA) del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH)

ANEXO 3. PROCEDENCIA DE LOS ESTÁNDARES DE MEDICAMENTOS

Estándar	Marca	Número de Producto	Lote
Enrofloxacin	Sigma- Aldrich	33699	BCBZ6597
Ciprofloxacin hydrochloride hydrate	Sigma- Aldrich	32982	BCBW6810
Ácido Oxolinico	Sigma- Aldrich	67126	BCBV6265
Amoxicillin trihydrate	Dr. Ehrenstorfer	DRE-C10242500	G138081
Tetracycline hydrochloride	Sigma- Aldrich	31741	BCBW2124
Chlortetracycline hydrochloride	Sigma- Aldrich	46133	BCBT9837
Oxytetracycline dihydrate	Sigma- Aldrich	O4636	088M4074V
Sulfadoxin	Sigma- Aldrich	31736	BCBS4285V
Sulfadimethoxine	Sigma- Aldrich	46794	BCBX1159
Florfenicol	Sigma- Aldrich	F1427	MKCJ0616

ANEXO 4. OTROS METODOS MULTIRESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS REALIZADOS EN UHPLC-MS/MS.

Método multiresiduo para más de 100 residuos veterinarios de la FSIS (Lucía Geis-Asteggianti, 2012)

Analitos	Concentración ppb	Porcentaje de recuperación	Porcentaje de repetibilidad	Porcentaje de reproducibilidad
Enrofloxacino	50	62	30	26
Ciprofloxacino	1000	69	29	27
Amoxicilina	10	66	52	49
Tetraciclina	1000	46	25	21
Clortetraciclina	2000	40	12	12
Oxitetraciclina	50	41	20	19
Sulfadoxina	100	82	11	10
Sulfadimetoxina	100	79	9	9
Florfenicol	200	84	15	15

Extracción de residuos en riñón bovino.

Método multiresiduo para 32 residuos veterinarios (Renata Pereira, 2012)

Analitos	% Recuperación		% Precisión		LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
	10 µg/Kg	50 µg/Kg	10 µg/Kg	50 µg/Kg		
Enrofloxacino	112	109	17	12	3	10
Ácido oxolínico	NQ	109	NQ	15	7.5	25
Tetraciclina	NQ	95	NQ	11	15	50
Clortetraciclina	NQ	125	NQ	17	7.5	25
Oxitetraciclina	NQ	111	NQ	20	15	50
Sulfadimetoxina	NQ	76	NQ	17	7.5	25

NQ: No cuantificable.
Extracción de residuos en productos acuícolas.

Método multiresiduo para 32 residuos veterinarios (Ganna Fedorova, 2013)

Analitos	% Recuperación		LOQ (µg/Kg)
	10 µg/Kg	50 µg/Kg	
Enrofloxacino	107	103	0.52
Ciprofloxacino	88	113	0.37
Ácido oxolínico	116	118	0.52
Amoxicilina	42	52	1
Tetraciclina	88	80	0.39
Oxitetraciclina	70	78	0.06
Sulfadimetoxina	100	81	0.1
Florfenicol	120	111	2.1

Extracción de residuos en productos acuícolas.

Método multiresiduo para 37 residuos veterinarios (Maki kanda, 2015)

Analitos	% Recuperación (10 µg/Kg)	% Repetibilidad (10 µg/Kg)	% Reproducibilidad (10 µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
Enrofloxacino	89	5	7	1
Ciprofloxacino	75	7	9	5
Ácido oxolínico	92	4	8	0.5
Tetraciclina	77	7	8	1
Clortetraciclina	103	3	5	2
Oxitetraciclina	76	7	9	1
Sulfadimetoxina	82	5	5	0.2

Extracción de residuos con **EDTA** en productos acuícolas.

Método multiresiduo para 14 residuos de quinolonas y tetraciclinas (L. Guidi, 2017)

Analitos	% Recuperación (50 µg/Kg)	% Repetibilidad (50 µg/Kg)	% Reproducibilidad (50 µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
Enrofloxacino	91.8	8.7	11.5	12.5
Ciprofloxacino	100.5	6.9	1.9	12.5
*Ácido oxolínico	101.3	5.7	3.5	5
Tetraciclina	100.2	5.1	5.1	25
Clortetraciclina	101.8	8.3	4.4	25
Oxitetraciclina	100.4	7	5.6	25

*Los parámetros se realizaron a una concentración de 10 µg/Kg.
Extracción de residuos en productos acuícolas

Método multiresiduo para 53 residuos veterinarios (A. Gajda, 2019)

Analitos	% Recuperación	% Repetibilidad	% Reproducibilidad
^a Enrofloxacino	102	6.1	11.4
^a Ciprofloxacino	104	6.5	10.9
^a Ácido oxolínico	102	6.3	13.2
^b Amoxicilina	95	8.9	13.5
^c Tetraciclina	103	5.3	10.9
^c Clortetraciclina	99	6.8	12.5
^c Oxitetraciclina	102	5.9	12.8
^c Sulfadoxina	107	5.5	13.4
^c Sulfadimetoxina	106	8.7	15.1

^a Los parámetros se realizaron a una concentración de 5 µg/Kg.
^b Los parámetros se realizaron a una concentración de 25 µg/Kg.
^c Los parámetros se realizaron a una concentración de 10 µg/Kg.
Extracción de residuos con **EDTA** en plumas de aves de corral para control de tratamientos.

ANEXO 5. MÉTODO MULTIRESIDUO DESARROLLADO, ESTANDARIZADO Y VALIDADO PARA TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

❖ Reactivos

- Agua destilada (tipo I)
- Acetonitrilo o ACN - grado LC- MS, Pureza $\geq 99.9\%$
- Hexano - grado LC- MS, Pureza $\geq 99\%$
- Ácido fórmico ACS, Pureza $\geq 98\%$
- Hidróxido de sodio (40.00 g/mol)
- Metanol- grado LC-MS, Pureza $\geq 99.9\%$
- EDTA sal disódica o Na₂EDTA (372.24 g/mol)
- Fase solida de extracción C- 18 en polvo.

❖ Muestras biológicas

- Músculo de trucha arcoíris libre de antibióticos (se emplea para realizar la curva de calibración con la matriz).

❖ Equipos

- **Equipo:** Sistema de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión (UHPLC), acoplado a un detector de espectrometría de masas con triple cuadrupolo
- **Columna:** Acquity HSS T3; 1.8 μm ; 2.1 mm de diámetro * 100 mm de largo con un 1.8 μm de tamaño de partículas.
- **Evaporador:** Evaporador de muestras con nitrógeno de 45 posiciones con regulador de presión, un contador de tiempo, y a un regulador de temperatura digital para el baño de agua.

❖ Preparación de las Soluciones

Solución Madre: Se pesa 10 mg de estándar y se diluye en una fiola de 10 mL del disolvente que se indica en la siguiente tabla para obtener una concentración de 1000 ppm, a cada una de estas soluciones se les denomina solución madre.

Tabla de diluyentes de cada estándar de Antibiótico

Clase o Familia	Antibiótico	Disolvente de la solución madre
Quinolonas	Enrofloxacino	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
	Ciprofloxacino	0.03 M NaOH (40 g/mol)
	Ácido Oxolínico	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
Betalactámico	Amoxicilina	Agua destilada ultra pura (tipo I)
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Metanol para LC-Masas Pureza >99.9%
	Clortetraciclina	Metanol para LC-Masas Pureza >99.9%
	Tetraciclina	Metanol para LC-Masas Pureza >99.9%
Sulfamidas	Sulfadoxina	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
	Sulfadimetoxina	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%
Fenicol	Florfenicol	Acetonitrilo para LC-MS, Pureza >99.9%

Solución diluyente A: Se prepara una solución de ácido fórmico y acetonitrilo en una proporción de (0.1:99.9) respectivamente.

Solución de estándares para la sintonización (SS): Cada solución madre del estándar de un antibiótico se lleva a una concentración de 0.1 ppm mediante 2 diluciones

- **Primera dilución:** 0.1 mL solución madre de un antibiótico se completa con 10 mL de solución diluyente A
- **Segunda dilución:** 0.1 mL de la primera dilución y se completa con 10 mL de la solución diluyente A. A esta última solución se le denomina solución de estándar de sintonización de antibiótico **SS**.

Cada una de estas últimas soluciones se inyectan directamente al detector (10 µL).

Solución mezcla de estándares (SME): En una fiola de 10 ml se agrega 100 µL de solución madre de cada estándar y se enraza a 10 mL con la Solución diluyente A. Se toma 0.1 mL de la solución previa y se completa a 10 mL con la Solución diluyente A. A esta última se le denomina solución mezcla de estándares (SME), la cual considera que cada antibiótico está a 10 ppm y esta se coloca en un vial se inyecta 2 µL y se realiza una lectura en el UHPLC-MS/MS para obtener el tiempo de retención de la mezcla de estándares.

Solución para la extracción de la muestra (B):

- **Solución B1:** Preparar una solución de Acetonitrilo + EDTA 0.1M en la proporción de 4:1 respectivamente.
- **Solución B2:** Preparar la solución B1 + Ac. Fórmico en la proporción de 99.9 :0.1 respectivamente

Solución de reconstitución del extracto (C):

- **Solución C1:** Preparar una solución de Ac. Fórmico + Agua ultrapura tipo I en la proporción de 0.1:99.9 respectivamente.
- **Solución C2:** Preparar una solución de Acetonitrilo + la solución C1, en la proporción de 1: 9 respectivamente.

Solución de fase móvil A: Preparar una solución de Ac. Fórmico + Agua ultrapura tipo I en la proporción de 0.1:99.9 respectivamente. (Igual a la solución C1)

Solución de fase móvil B: Prepara una solución de Ac. Fórmico + acetonitrilo en la proporción de 0.1:99.9 respectivamente. (Igual a la solución diluyente A)

Solución de lavado débil: Preparar una solución de Ac. Fórmico + Agua ultrapura tipo I en la proporción de 5:95 respectivamente.

Solución de lavado fuerte: Preparar una solución de Ac. Fórmico + Agua ultrapura tipo I en la proporción de 95:5 respectivamente.

- ❖ **Preparación de la Curva de Calibración en la matriz de trucha:** Se prepara a partir de la SME otra solución mezcla a 2 ppm y se procede según la tabla mostrada a continuación para preparar el blanco y las cinco concentraciones de estándares. Cada estándar (St₀, St₁, St₂, St₃, St₄, St₅) es adicionado a una matriz de trucha (2g), luego se debe extraer de la misma manera como se extrae los residuos en muestra (ver ítem **Extracción de muestra**). La curva es válida si se obtiene $r^2 \geq 0.99$.

Tabla de volumen de cada solución mezcla para realizar la curva de calibración

Mezcla de Estándares	Matriz (músculo de trucha 2 g)	Volumen (μL)		Volumen total (μL)	Concentración obtenida	
		Mezcla de 10 ppm	Mezcla de 2 ppm		(ppm o μg/ mL)	(ppb o ng/ mL)
St 0	2g	--	--	1000	Blanco	Blanco
St 1	2g	--	5	1000	0.01	10
St 2	2g	--	25	1000	0.05	50
St 3	2g	--	50	1000	0.1	100
St 4	2g	20	--	1000	0.2	200
St 5	2g	30	--	1000	0.3	300

De cada estándar (luego de extraído y reconstituido según el ítem de **Extracción de muestra**) se inyecta 2 μL UHPLC-MS/MS.

❖ **Extracción de la Muestra**

- a. Se pesa 2 g del homogenizado en un tubo de 50 mL y se agregó 10 mL de la solución B2 y se lleva al agitar por 5 minutos y. Se centrifuga a 25°C por 10 min a 5000 RPM y se separa el sobrenadante que contiene a los posibles antibióticos.
- b. El sobrenadante (aprox. 10 ml) se transfiere el extracto a un tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 0.5 g de la fase sólida de extracción C-18, luego se adiciona 10 mL de hexano helado y se agita suavemente los tubos por 30 segundos. Se centrifuga a 25°C por 10 min a 5000 RPM. Se forman 3 fases: la superior corresponde al Hexano, la intermedia contiene los residuos antibióticos y la inferior corresponde a la fase sólida C18 con impurezas.
- c. Se elimina superior que es el hexano.
- d. Se transfiere 5 ml del extracto (fase intermedia) a un tubo de ensayo de 10 mL y se evapora hasta sequedad con el evaporador de nitrógeno con un baño de agua de 50°C.
- e. Se reconstituye al extracto seco con 1 mL de la solución C2.
- f. Por último, se filtra en un vial el extracto con una jeringa de PVDF (0.2 μm) y se inyecta 2 μL al UHPLC-MS/MS.

❖ **Proceso del ensayo en muestra con el método multiresiduo:**

Sintonización de los estándares: Se inyecta en forma secuencial 10 µL de **solución SS** de cada uno de los estándares. El detector de espectrómetro de masas y se determina el voltaje de cono, el voltaje de colisión, el ion precursor, los iones fragmento y el tipo de ionización, esto se repite con cada uno de los estándares para obtener el patrón de cada uno.

Condiciones espectrométricas antes de inyectar cada estándar:

- **Capilaridad:** 3.0 kV
- **Temperatura de la fuente:** 150 °C
- **Temperatura de solvatación:** 500 °C
- **Flujo de gas cono (N2):** 20 L/h
- **Flujo de gas de desolvatación (N2):** 1000 L/h
- **Flujo de gas de colisión:** 0.10 mL/min
- **Modo Ion:** ES+
- **Volumen de inyección:** 10 µL

Condiciones cromatográficas para inyectar al UHPLC-MS/MS:

- **Temperatura de columna:** 40 °C
- **Flujo de la gradiente constante:** 0.5 mL/min
- **Gradiente de la fase móvil:**
Inicial – 8.0: Fase móvil A (100%)
8.0 – 9.5: Fase móvil B (100%)
9.5 – 13.0: Fase móvil A (100%)

Tabla de secuencia de Inyecciones en el Detector de Masas de triple cuadrupolo para la sintonización

Número de corrida	Muestra	(Volumen)
1	SS de enrofloxacino	10 µL
2	SS de Ciprofloxacino	10 µL
3	SS de Ácido Oxolínico	10 µL
4	SS de Amoxicilina	10 µL
5	SS de Oxitetraciclina	10 µL
6	SS de Clortetraciclina	10 µL
7	SS de Tetraciclina	10 µL
8	SS de Sulfadoxina	10 µL
9	SS de Sulfadimetoxina	10 µL
10	SS de Florfenicol	10 µL

Tabla de secuencia de las corridas cromatográfica del UHPLC-MS/MS

Número de corrida	Muestra	(Volumen)
1	St 0	2 µL
2	St 1	2 µL

3	St 2	2 µL
4	St 3	2 µL
5	St 4	2 µL
6	St 5	2 µL
8	Blanco: Solución C2 (Solución de reconstitución del extracto)	2 µL
9	Extracto de la Muestra M1 (replica 1)	2 µL
10	Extracto de la Muestra M1 (replica2)	2 µL
10	Lavado débil	1200 µL
11	Lavado fuerte	400 µL

❖ Determinación de la concentración

Se determina la ecuación de la recta para cada uno de los antibióticos en base a la curva de calibración elaborada anteriormente. Luego con la ecuación obtenida (**Ecuación 1**) se reemplaza la Absorbancia (A) para determinar la concentración de cada antibiótico (Co) en la muestra (ng/ml), luego empleando la **Ecuación 2** se obtiene la concentración de cada antibiótico expresado en ng/g.

Ecuación 1

$$C_o = m(A) \pm b$$

Donde:

Co = Concentración en ng/mL del estándar la calibración.

m = Pendiente de la ecuación lineal.

A = Área del pico cromatográfico

b = Intercepción en el eje y.

Ecuación 2

$$C = \frac{C_o \times V_e}{W} \times \frac{V_f}{V_i}$$

Donde:

C = Concentración en muestra en ng/g = µg/Kg=ppb

Co = Concentración en ng/mL, obtenida por interpolación en la curva de calibración

Ve = Volumen del extracto en mL (10 mL)

Vi = Volumen tomado para evaporar con el gas nitrógeno (5 mL)

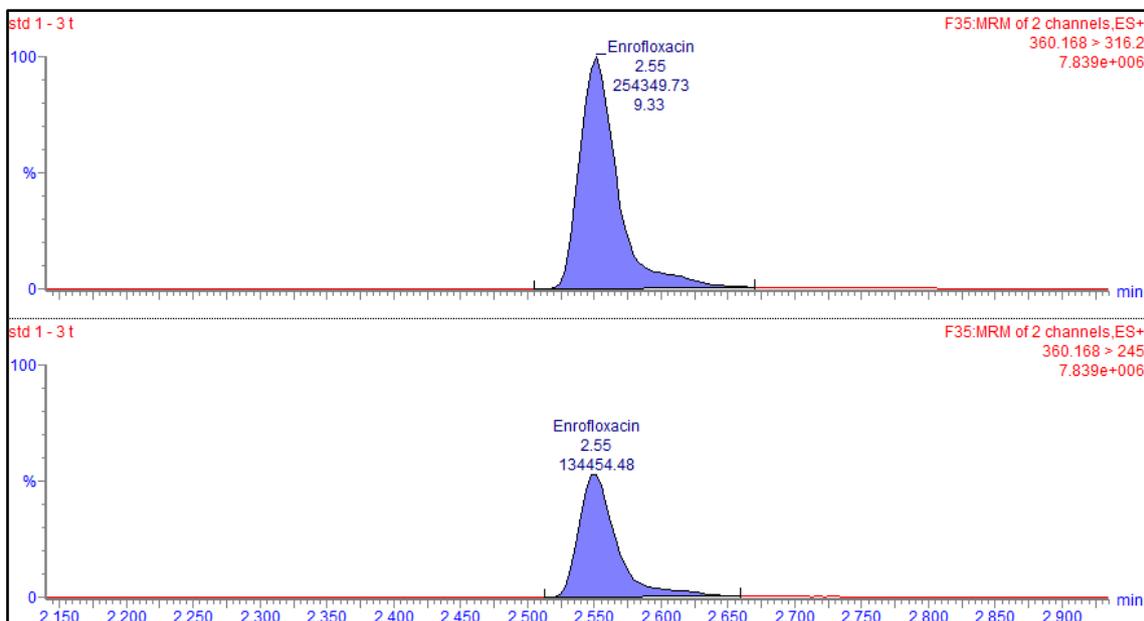
Vf = Volumen del vial que se analizó en el equipo (1 mL)

W = Peso de la muestra en g

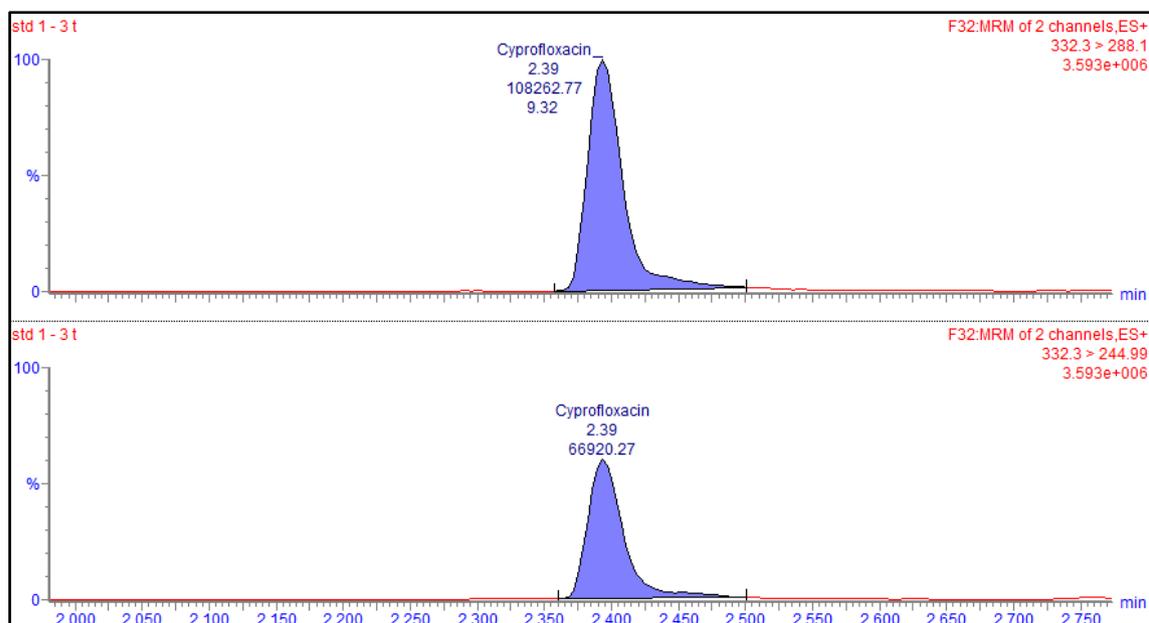
Las concentraciones obtenidas se comparan con los límites de aceptación máximos permisibles de antibióticos de cada norma.

ANEXO 6. CROMATOGRAMA DE LOS FRAGMENTOS DE CADA ESTÁNDAR DE ANTIBIÓTICO (CUANTIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN)

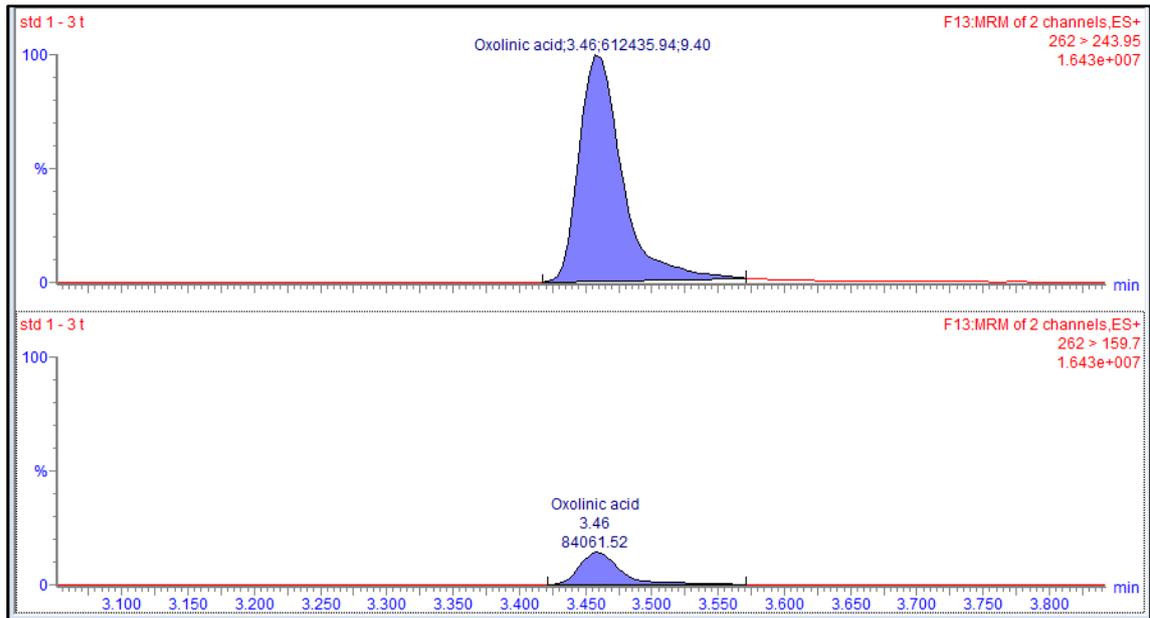
Fragmentos ionizados de enrofloxacin



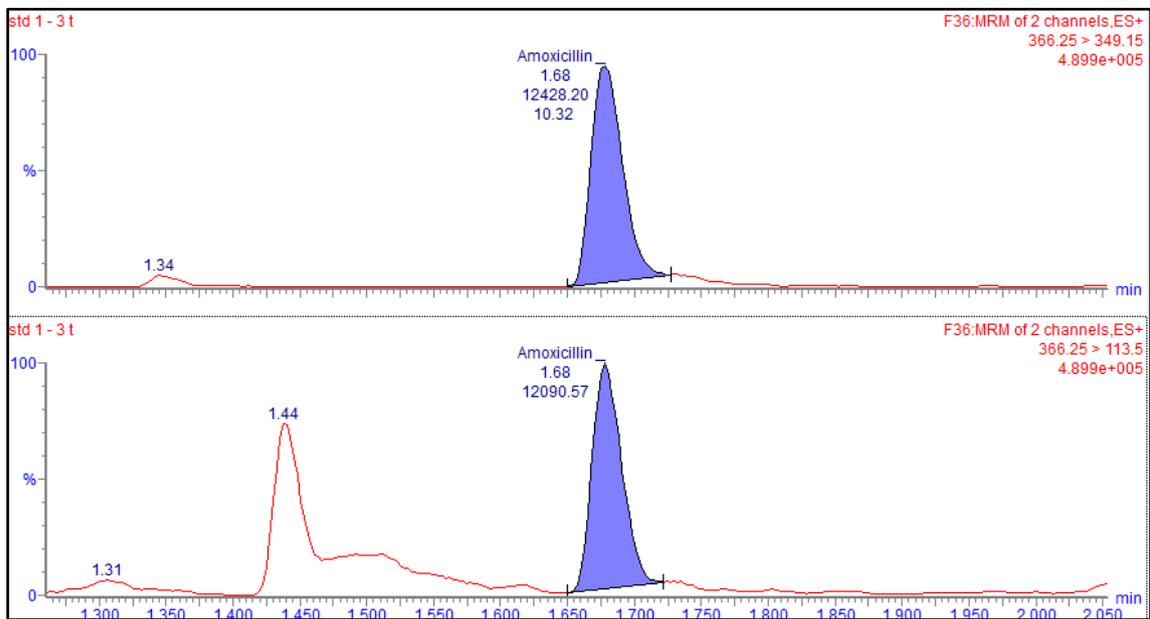
Fragmentos ionizados de ciprofloxacino



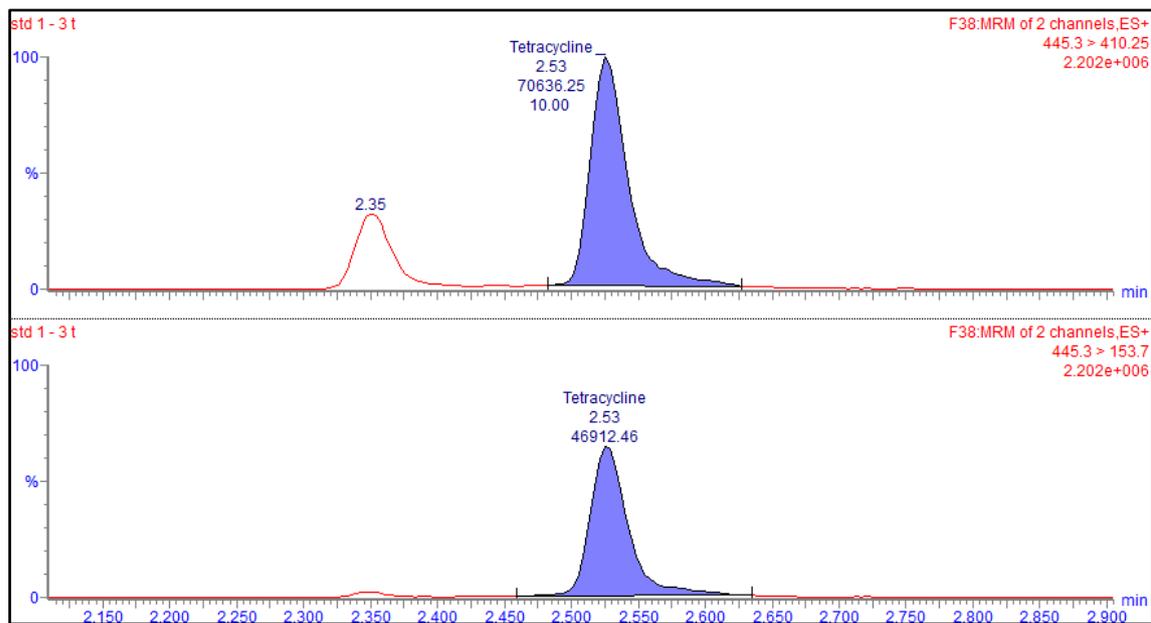
Fragmentos ionizados de ácido oxolínico



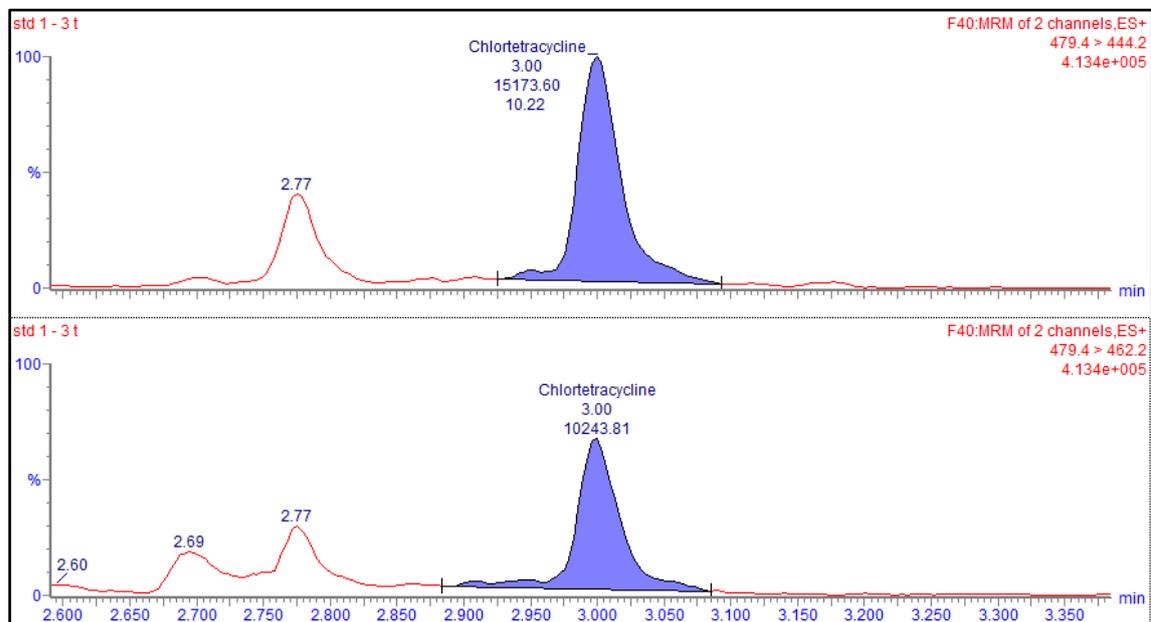
Fragmentos ionizados de amoxicilina



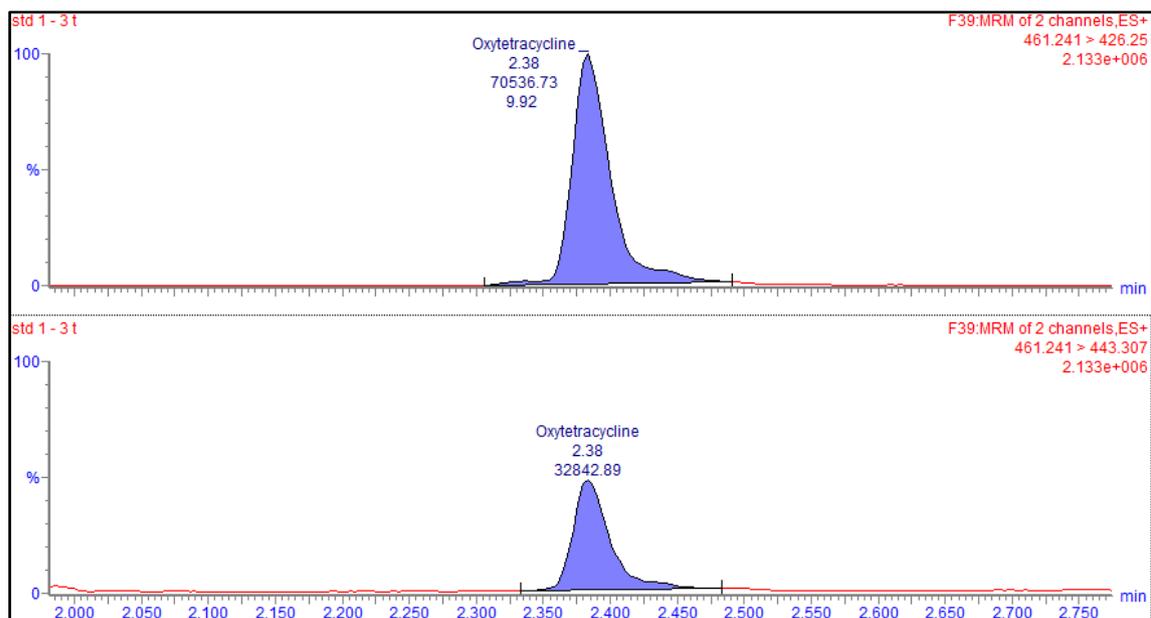
Fragmentos ionizados de tetraciclina



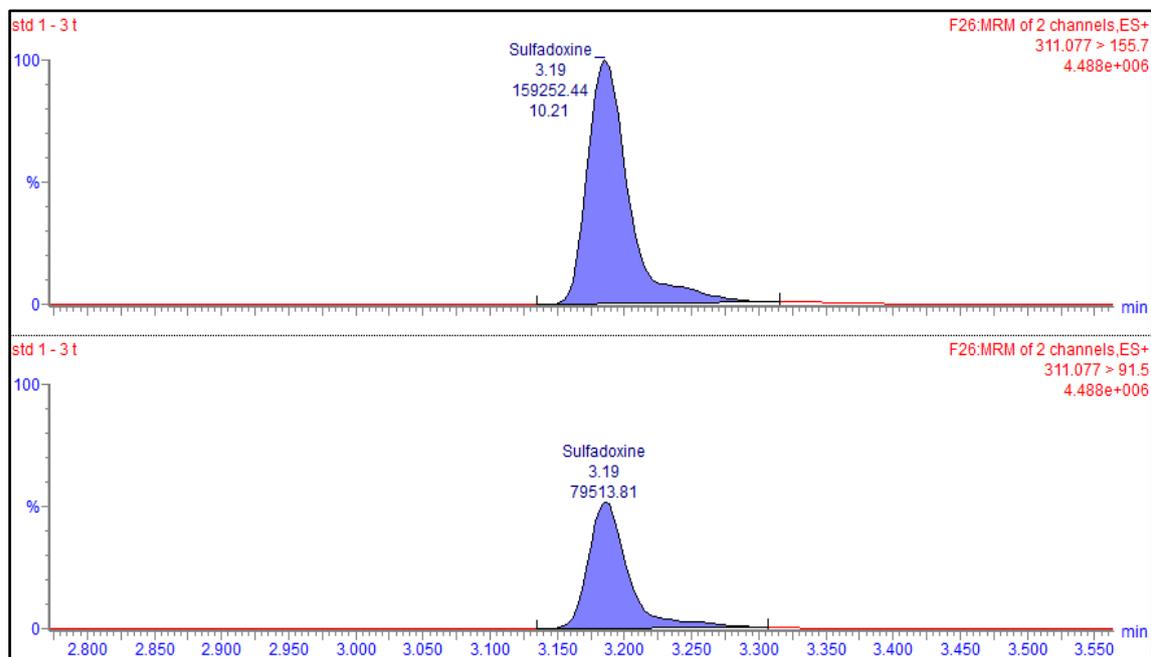
Fragmentos ionizados de clortetraciclina



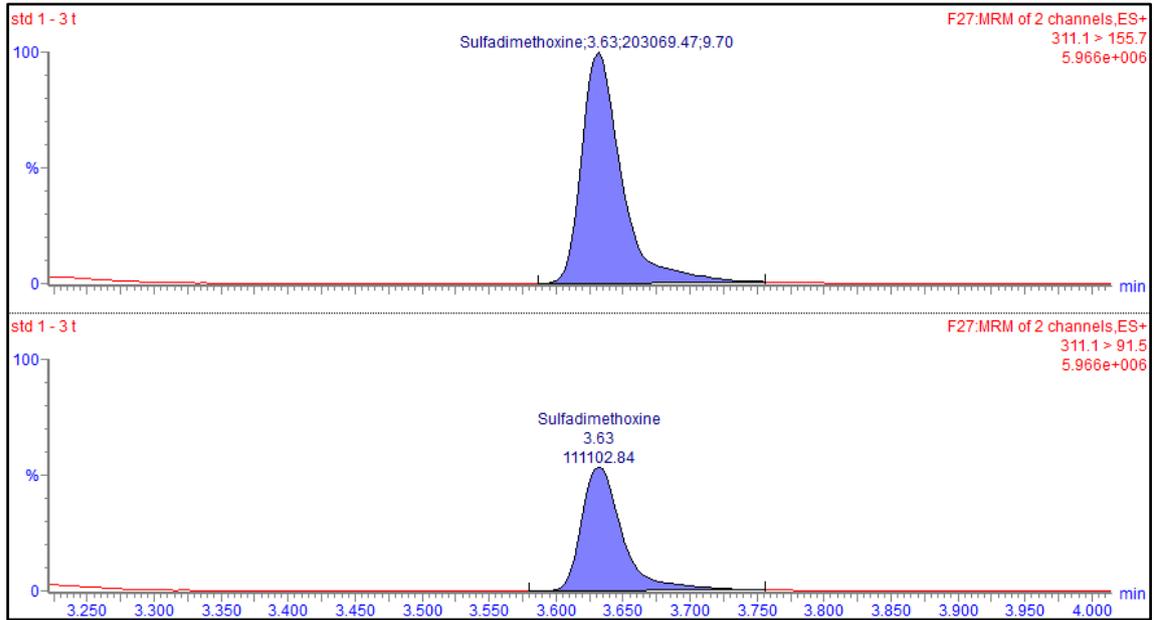
Fragmentos ionizados de oxitetraciclina



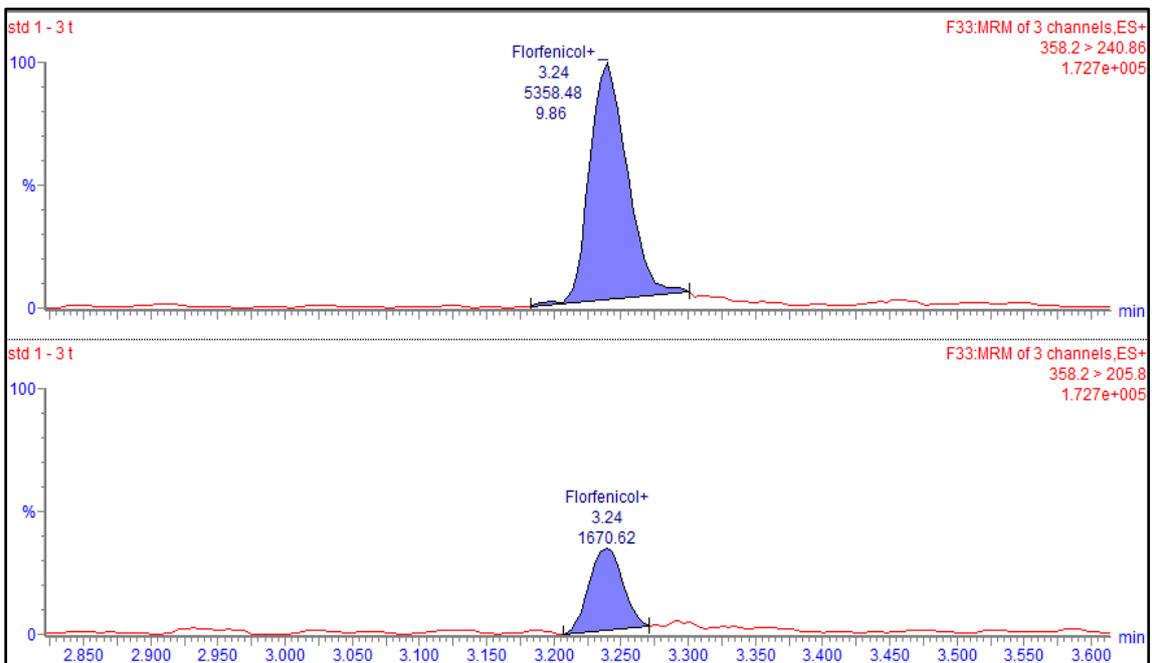
Fragmentos ionizados de sulfadoxina



Fragmentos ionizados de sulfadimetoxina



Fragmentos ionizados de florfenicol

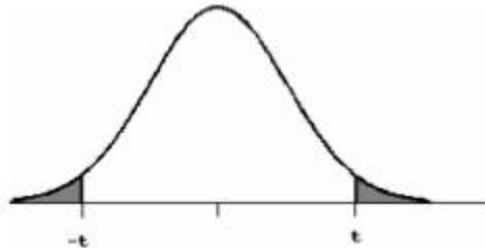


ANEXO 7. ÁREA DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN EN MATRIZ FORTIFICADA DE TRUCHA ARCOÍRIS

Estándar	Área de los picos cromatográficos (mAU*min)				
	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5
	10 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	200 ng/mL	300 ng/mL
Enrofloxacino	278048.4	987031.9	1919084.4	3684272.3	5366153.5
Ciprofloxacino	91219.3	348947.8	700026.1	1363258.3	2150575.5
Ácido oxolínico	586001.0	2277498.3	4326778.0	8517783.0	12737452.0
Amoxicilina	15008.2	60220.7	123170.8	245936.9	393328.8
Tetraciclina	63645.0	255757.5	510007.9	943176.2	1511132.5
Clortetraciclina	14681.8	59865.5	120939.9	229361.0	369353.5
Oxitetraciclina	62450.1	245117.1	477880.9	986513.8	1623553.0
Sulfadoxina	144728.1	580218.6	1173184.4	2362564.5	3939104.0
Sulfadimetoxina	140113.2	555425.1	1099809.0	2191357.0	3562786.8
Florfenicol	3016.9	11767.7	21898.1	43704.7	72046.4

ANEXO 8. TABLA DE VALORES DE LA PRUEBA t DE STUDENT PARA UNA DISTRIBUCIÓN DE DOS COLAS

Tabla de cuantiles de la distribución t de Student



(a) El área de las dos colas está sombreada en la figura.

(b) Si H_A es direccional, las cabeceras de las columnas deben ser divididas por 2 cuando se acota el P-valor.

gl	ÁREA DE DOS COLAS						
	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001	0,0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891

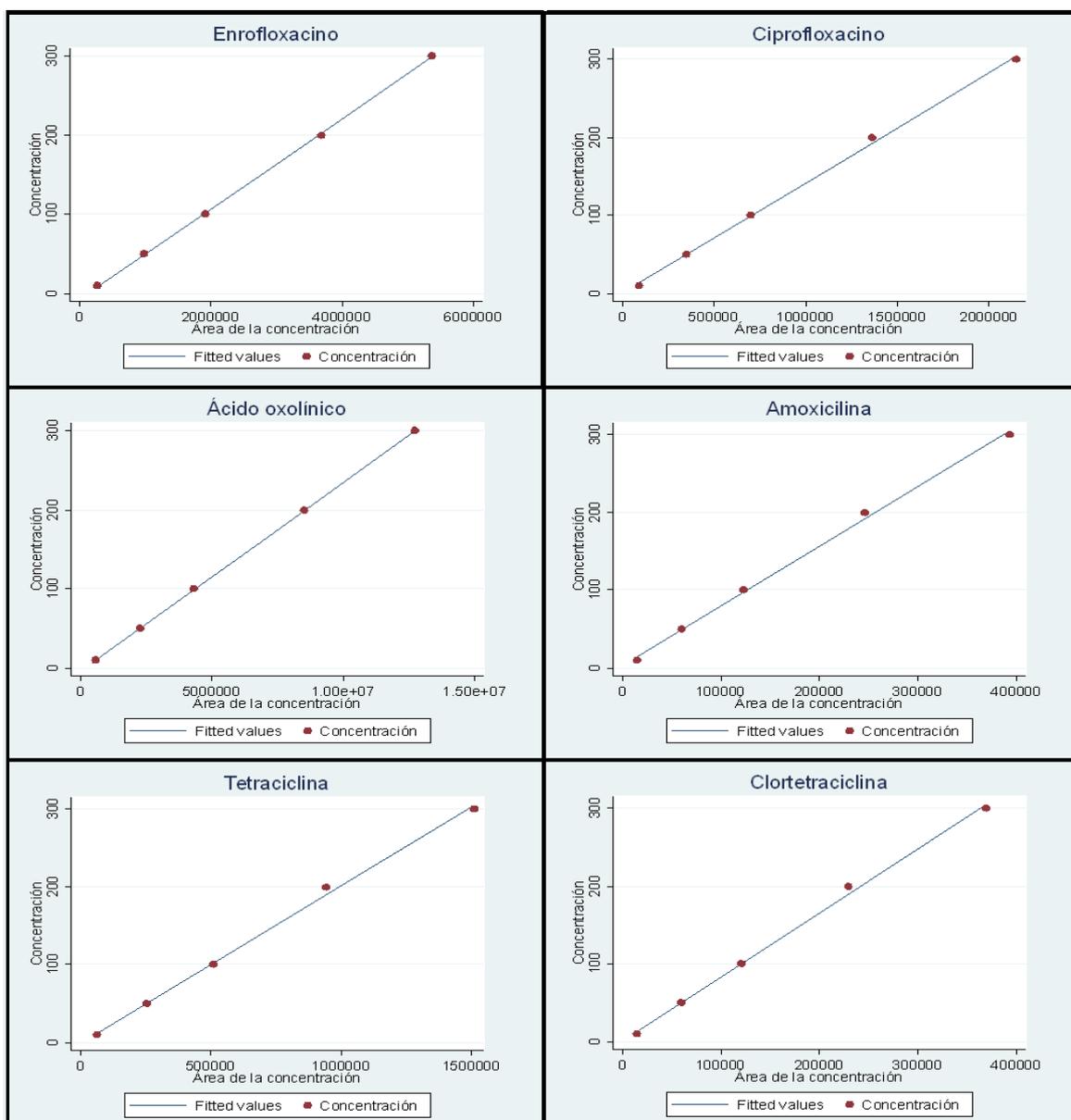
ANEXO 9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN EN STATA

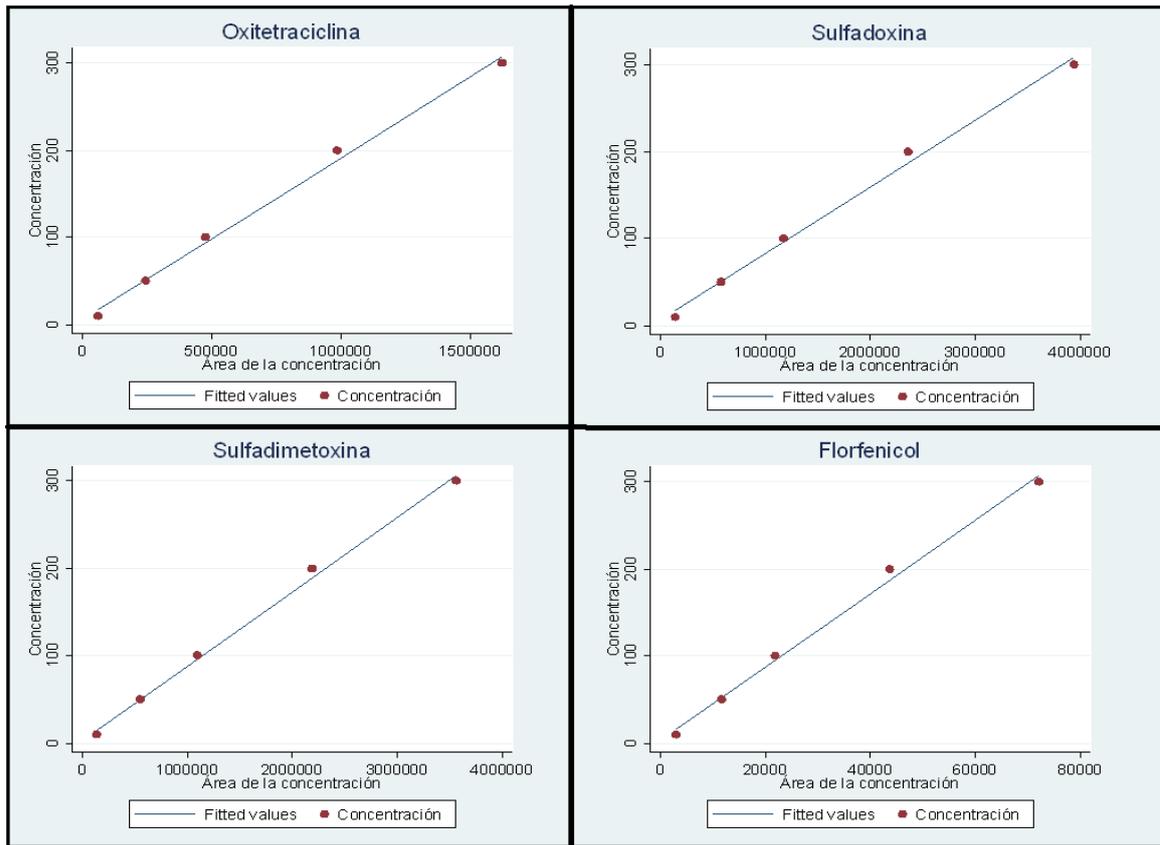
Para interpretar la linealidad de los datos se obtuvo y se evaluó visualmente las gráficas lineales correspondientes, y se corrió una regresión lineal, para encontrar la ecuación lineal correspondiente y el coeficiente de determinación, a fin de determinar qué tan significativa es la ecuación. Finalmente, se corrieron correlaciones bivariadas para determinar la relación entre las variables.

y = Concentración del estándar del antimicrobiano. (variable dependiente)

x = Área del pico cromatográfico. (variable independiente)

Gráfico de linealidad





Modelo de la ecuación:

$$y_i = b_0 + b_1x_i$$

Tabla de modelo de ecuación de la curva de calibración para los 10 antimicrobianos

Analito	Modelo de la ecuación
Enrofloxacino	$y = -7.08 + 0.000057 x$
Ciprofloxacino	$y = 0.40 + 0.000141 x$
Ácido oxolínico	$y = -3.905 + 0.000024 x$
Amoxicilina	$y = 3.35 + 0.000768 x$
Tetraciclina	$y = -1.17 + 0.000203 x$
Clortetraciclina	$y = 0.95 + 0.000825 x$
Oxitetraciclina	$y = 5.67 + 0.000186 x$
Sulfadoxina	$y = 6.25 + 0.000077 x$
Sulfadimetoxina	$y = 3.50 + 0.000085 x$
Florfenicol	$y = 2.94 + 0.004233 x$

Contraste de hipótesis

$$y_i = b_0 + b_1x_i$$

H_0 = El modelo de la ecuación no es significativo. ($b_1=0$)

H_1 = El modelo de la ecuación es significativo. ($b_1 \neq 0$)

Criterio:

$\alpha = 0.05 < p$ -valor, entonces se acepta H_0 .

$\alpha = 0.05 > p$ -valor, entonces se rechaza H_0 .

Tabla de significancia del modelo de la curva de calibración para los 10 antimicrobianos

Analito	p-valor	Entonces
Enrofloxacino	0.000	Rechazo H_0
Ciprofloxacino	0.000	Rechazo H_0
Ácido oxolínico	0.000	Rechazo H_0
Amoxicilina	0.000	Rechazo H_0
Tetraciclina	0.000	Rechazo H_0
Clortetraciclina	0.000	Rechazo H_0
Oxitetraciclina	0.000	Rechazo H_0
Sulfadoxina	0.000	Rechazo H_0
Sulfadimetoxina	0.000	Rechazo H_0
Florfenicol	0.000	Rechazo H_0

Conclusión: El coeficiente de la variable independiente es significativo para la ecuación de la curva de calibración de cada analito del método multiresiduos.

Coefficiente de determinación (r^2):

Criterio:

Modelo muy bueno: $0.9 \leq r^2 < 1$

Modelo bueno: $0.6 \leq r^2 < 0.9$

Modelo no tan bueno: $r^2 < 0.6$

Tabla de coeficiente de determinación para los 10 antimicrobianos

Analito	r^2 (%)	P - valor	Entonces
Enrofloxacino	99.97	0.0000	Se rechaza H_0
Ciprofloxacino	99.86	0.0000	Se rechaza H_0
Ácido oxolínico	100	0.0000	Se rechaza H_0

Amoxicilina	99.79	0.0000	Se rechaza Ho
Tetraciclina	99.76	0.0001	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	99.75	0.0001	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	99.53	0.0001	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	99.47	0.0002	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	99.67	0.0001	Se rechaza Ho
Florfenicol	99.52	0.0001	Se rechaza Ho

Conclusión: El coeficiente de determinación expresa un modelo muy bueno para las ecuaciones de la curva de calibración lo que hace significativo el modelo especialmente del ácido oxolínico.

Coeficiente de correlación (r):

Criterio:

Correlación positiva fuerte: $0.9 \leq r < 1$

Correlación moderada: $0.5 \leq r < 0.9$

Correlación positiva débil: $r < 0.5$

Tabla de coeficiente de correlación para los 10 antimicrobianos

Analito	r	Correlación
Enrofloxacino	0.9999	Positiva fuerte
Ciprofloxacino	0.9993	Positiva fuerte
Ácido oxolínico	1	Positiva fuerte
Amoxicilina	0.9989	Positiva fuerte
Tetraciclina	0.9988	Positiva fuerte
Clortetraciclina	0.9987	Positiva fuerte
Oxitetraciclina	0.9977	Positiva fuerte
Sulfadoxina	0.9973	Positiva fuerte
Sulfadimetoxina	0.9983	Positiva fuerte
Florfenicol	0.9976	Positiva fuerte

Conclusión: Existe una relación directa y positiva entre x e y para todas las ecuaciones de calibración es decir si aumenta la variable x también aumenta la variable y.

ANEXO 10. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ANALISTA 1 DE LOS 10 ANTIBIÓTICOS DEL MÉTODO

N°	Concentración	Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Ácido oxolínico	Amoxicilina	Tetraciclina
1	1A-10	11	11.5	10.7	11.1	9.8
2	1A-10	9.7	11.3	10.1	11.6	10.8
3	1A-10	10	11.4	10.2	11.5	9.9
4	1A-10	10.1	10.9	10.3	11.4	10.1
5	1A-10	9.8	11.1	10.4	10.8	10.1
6	1A-10	10	11.1	11	11.2	10.1
7	1A-10	10.2	11.3	11	11.8	9.9
8	1A-10	10.3	11.4	10.5	11.4	10
9	1A-10	10.5	11.7	10.8	11	10.1
10	1A-10	10	11.2	11.2	11.1	10.4
Promedio		10.16	11.29	10.62	11.29	10.12
Desviación estándar		0.375	0.228	0.377	0.303	0.290
1	1A- 50	48.6	47.5	50.6	48.2	50.1
2	1A- 50	47.7	47.2	49.6	48.4	49.8
3	1A- 50	48.6	47.1	48.8	47.5	49.8
4	1A- 50	48	45.4	50.9	48.7	50.4
5	1A- 50	47.6	46.2	50.2	48.7	51.5
6	1A- 50	48.2	46.9	49.1	47.8	51.5
7	1A- 50	48	46.9	48.9	48.5	50.4
8	1A- 50	47.6	46.9	49.5	48.5	50.4
9	1A- 50	48.6	46.8	50.5	49.8	51.2
10	1A- 50	48.6	47.2	48.9	49.4	51.2
Promedio		48.15	46.81	49.7	48.55	50.63
Desviación estándar		0.430	0.601	0.792	0.679	0.665
1	1A-200	192.5	187.9	195.4	201.7	196.4
2	1A-200	189	192.6	196.1	206.2	192.1
3	1A-200	188.6	199.6	190.8	205.6	195.3
4	1A-200	189.3	192.2	194.8	206.1	194.5
5	1A-200	192.4	190.7	191.7	202.9	191.3
6	1A-200	193.1	192	192	201.6	191.1
7	1A-200	188.9	186.2	195.4	202.2	188.9
8	1A-200	189.3	186.7	190.6	199.2	188.2
9	1A-200	192.4	188.4	195.2	197.1	191.5
10	1A-200	189.4	188.9	195.2	204.8	191.6
Promedio		190.49	190.52	193.72	202.74	192.09
Desviación estándar		1.841	3.931	2.164	3.032	2.629

N°	Concentración	Clortetraciclina	Oxitetraciclina	Sulfadoxina	Sulfadimetoxina	Florfenicol
1	1A-10	11.7	11.5	11.1	11.1	11.3
2	1A-10	11.6	11.4	10.7	11.3	10.5
3	1A-10	11.2	11.8	10.8	11.4	11.4
4	1A-10	10.1	11.9	11	10.7	10.5
5	1A-10	10.3	11.6	11.1	10.9	10.8
6	1A-10	11.2	11.2	11	10.8	11.1
7	1A-10	11.6	11.2	11.1	11.5	10.8
8	1A-10	11.5	11.65	11.2	10.7	10.9
9	1A-10	12.1	11.6	11.2	10.5	10.9
10	1A-10	10.5	11.1	11.5	10.9	11.1
Promedio		11.18	11.495	11.07	10.98	10.93
Desviación estándar		0.665	0.267	0.221	0.333	0.302
1	1A- 50	52	45.6	47.8	46.2	49.6
2	1A- 50	49.9	45	48	46.4	45.6
3	1A- 50	49.9	46.3	46.4	46.1	46.3
4	1A- 50	48.2	46.9	46.9	45.4	49.2
5	1A- 50	50	46.3	48.5	46.1	48.6
6	1A- 50	50.3	45	48	45.5	48.3
7	1A- 50	49.4	45.5	47.2	45.4	50.1
8	1A- 50	47.4	46.6	46.5	45.8	48.2
9	1A- 50	50.7	46.2	47.1	44.7	49.8
10	1A- 50	48.4	46.5	46.7	46.2	50.7
Promedio		49.62	45.99	47.31	45.78	48.64
Desviación estándar		1.336	0.671	0.722	0.525	1.632
1	1A-200	182.6	186.5	198.5	185.8	205.3
2	1A-200	182.6	185.2	194.6	188.1	207.6
3	1A-200	189.6	188.1	194.9	183.9	200.5
4	1A-200	187	184.7	194.4	186.9	210.4
5	1A-200	189.3	190.8	191.1	185.1	199
6	1A-200	186.2	185	194.8	184.6	210.8
7	1A-200	185.6	184.2	192.6	188.7	202.2
8	1A-200	186.9	188.1	191.1	184.2	207
9	1A-200	183.4	185.2	196.5	186.3	207.3
10	1A-200	183.9	191.2	192.4	187.5	205.9
Promedio		185.71	186.9	194.09	186.11	205.6
Desviación estándar		2.567	2.544	2.351	1.673	3.947

**ANEXO 11. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ANALISTA 2 DE LOS 10
ANTIBIÓTICOS DEL MÉTODO**

N°	Concentración	Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Ácido oxolínico	Amoxicilina	Tetraciclina
1	2A-10	10.6	11.6	11.3	11.2	10.8
2	2A-10	10.6	11.5	10.6	10.5	10.5
3	2A-10	10.8	11.8	10.6	10.6	10.7
4	2A-10	10.7	11.2	10.9	10.3	10.9
5	2A-10	10.8	11.7	10.9	10	10.8
6	2A-10	11.4	11.6	11	10.9	10.5
7	2A-10	10.6	11.5	10.8	10.1	10.6
8	2A-10	10.8	11.7	11.1	10.2	10.6
9	2A-10	10.2	11.4	10.6	10.1	10.9
10	2A-10	10.3	10.9	11	10.8	11.3
Promedio		10.68	11.49	10.88	10.47	10.76
Desviación estándar		0.326	0.269	0.235	0.400	0.241
1	2A-50	50.4	48	51.6	46.1	51.8
2	2A-50	51.1	48.5	50.9	47.8	50.2
3	2A-50	50.8	48.9	52.2	46.4	50.4
4	2A-50	49.6	48	50.7	46	49.7
5	2A-50	49.4	48.5	51.8	46.1	50
6	2A-50	52.5	49.2	53.1	46	50.7
7	2A-50	51.7	49.9	51.4	46.6	51.1
8	2A-50	50.5	49	50.8	44.9	50.5
9	2A-50	50.9	49	52.2	45.8	50.2
10	2A-50	50.6	51.1	51.3	46.2	50
Promedio		50.75	49.01	51.6	46.19	50.46
Desviación estándar		0.911	0.929	0.751	0.723	0.615
1	2A-200	206	200	207.6	191.7	188.7
2	2A-200	205.7	209.6	205.1	189.1	191.7
3	2A-200	210.3	206	205.1	191	192.8
4	2A-200	209	206.3	201	188.8	194.4
5	2A-200	205.4	202.5	204.3	190.3	188
6	2A-200	207.1	200.4	207	188.4	189.5
7	2A-200	201.9	203.4	198.3	189	192.6
8	2A-200	206.4	198.2	198.5	191.6	184
9	2A-200	202.2	198.8	198	192.8	195.2
10	2A-200	205	197.1	206.2	189.5	189.9
Promedio		205.9	202.23	203.11	190.22	190.68
Desviación estándar		2.613	4.071	3.788	1.489	3.354

N°	Concentración	Clortetraciclina	Oxitetraciclina	Sulfadoxina	Sulfadimetoxina	Florfenicol
1	2A-10	10.2	11	11.6	11.2	11.5
2	2A-10	9.1	10.9	11.2	11.2	11.6
3	2A-10	10.1	10.9	11.9	10.9	12.5
4	2A-10	10.3	10.4	11.4	11.2	11.9
5	2A-10	9.2	11.5	11.1	11.1	11.8
6	2A-10	9.4	11.1	10.3	10.8	11.9
7	2A-10	9.9	10.6	10.6	11.1	11.8
8	2A-10	8.9	10.7	10.7	11.5	11.12
9	2A-10	10	11.2	10.9	11.3	12.6
10	2A-10	10.3	10.9	11.2	10.6	11.7
Promedio		9.74	10.92	11.09	11.09	11.842
Desviación estándar		0.536	0.312	0.482	0.260	0.439
1	2A-50	50.3	46.8	47.1	46.9	46
2	2A-50	51.3	45.3	47.8	47.4	46.6
3	2A-50	50.4	46.4	47.4	49.1	45.1
4	2A-50	49.9	45.8	47.3	48	46.4
5	2A-50	48.3	45.7	46.9	46.8	47.5
6	2A-50	50	46.5	47.2	46.4	49.7
7	2A-50	49.1	45.9	47.6	46.8	44.1
8	2A-50	50.2	44.5	47.1	47.4	45.1
9	2A-50	48.2	46.1	46.3	46.8	42.8
10	2A-50	48.8	45.5	46.2	46.2	45
Promedio		49.65	45.85	47.09	47.18	45.83
Desviación estándar		1.008	0.664	0.513	0.852	1.904
1	2A-200	187.7	191.6	194.1	192.9	184.7
2	2A-200	193.9	196.8	190.3	189.3	185.3
3	2A-200	192.6	186.3	190.4	191.9	189.8
4	2A-200	195.3	192.6	186.8	189.7	184.3
5	2A-200	194.7	184.8	191.3	187.9	187.5
6	2A-200	190.3	189.5	195.8	185.9	189.7
7	2A-200	189.6	190.4	192.2	189.4	186.6
8	2A-200	193.1	186.1	191.7	190.4	180.3
9	2A-200	194.6	186.8	195.4	188.8	173.9
10	2A-200	196.3	190.6	189.9	189.4	187.9
Promedio		192.81	189.55	191.79	189.56	185
Desviación estándar		2.773	3.659	2.738	1.949	4.811

ANEXO 12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA RECUPERACIÓN

Se agrupa las lecturas de ambos analistas por cada concentración teniendo 3 grupos de concentraciones, es decir, 20 muestras para 10 ppb, 50 ppb y 200 ppb. Los resultados obtenidos se comparan con la concentración de referencia de sus grupos. Para ello primero se ve la normalidad de los datos y luego se aplica una prueba de T de Student.

Normalidad: Se realiza una prueba de Shapiro-Wilk para observar si los datos de las lecturas son normales.

H₀: Los datos presentan una distribución normal

H₁: Los datos no presentan una distribución normal

Prueba t de Student: Se la aplica para una única muestra.

H₀: La recuperación de los analitos son similares a 10, 50 y 200 ppb

H₁: La recuperación de los analitos no son similares a 10, 50 y 200 ppb

Criterio de aceptación:

Si $\alpha = 0.05 < p\text{-valor}$, entonces se acepta H₀.

Si $\alpha = 0.05 > p\text{-valor}$, entonces se rechaza H₀.

❖ Procedimiento estadístico a una concentración de 10 ppb.

Tabla de los valores de p de la normalidad para el grupo de 10 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.93415	Se acepta Ho
Ciprofloxacino	0.34047	Se acepta Ho
Ácido oxolínico	0.83823	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.53346	Se acepta Ho
Tetraciclina	0.43194	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.32646	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.95541	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.98986	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.97732	Se acepta Ho
Florfenicol	0.54664	Se acepta Ho

Conclusión: Se acepta que la distribución normal para todos los analitos de 10 ppb.

Tabla de los valores de p para la prueba t de Student del grupo de 10 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.0004	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.0000	Se rechaza Ho
Ácido oxolínico	0.0000	Se rechaza Ho
Amoxicilina	0.0000	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.0002	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	0.0421	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Florfenicol	0.0000	Se rechaza Ho

Conclusión: La recuperación de los analitos no es similar a 10 ppb.

❖ **Procedimiento estadístico a una concentración de 50 ppb**

Tabla de los valores de p de la normalidad para el grupo de 50 ppb.

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.10990	Se acepta Ho
Ciprofloxacino	0.79557	Se acepta Ho
Ácido oxolínico	0.60520	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.23750	Se acepta Ho
Tetraciclina	0.15473	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.70442	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.73589	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.87878	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.47145	Se acepta Ho
Florfenicol	0.49859	Se acepta Ho

Conclusión: Se acepta la distribución normal para todos los analitos de 50 ppb.

Tabla de los valores de p para la prueba t de Student del grupo de 50 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.1182	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.0000	Se rechaza Ho
Ácido oxolínico	0.0290	Se rechaza Ho
Amoxicilina	0.0000	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.0010	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	0.1728	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Florfenicol	0.0000	Se rechaza Ho

Conclusión: La recuperación de los analitos no es similar a 50 ppb.

❖ **Procedimiento estadístico a una concentración de 200 ppb.**

Tabla de los valores de p de la normalidad para el grupo de 200 ppb.

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.00305	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.30149	Se acepta Ho
Ácido oxolínico	0.06842	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.00651	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.69459	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.23559	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.06683	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.91856	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.79488	Se acepta Ho
Florfenicol	0.06963	Se acepta Ho

Conclusión: Se acepta la distribución normal para todos los analitos de 200 ppb excepto del enrofloxacino y amoxicilina.

Tabla de los valores de p para la prueba t de Student del grupo de 200 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino		
Ciprofloxacino	0.0354	Se rechaza Ho
Ácido oxolínico	0.2269	Se acepta Ho
Amoxicilina		
Tetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	0.0000	Se rechaza Ho
Florfenicol	0.0809	Se acepta Ho

Conclusión: La recuperación de los analitos no es similar a 200 ppb, excepto por el florfenicol

ANEXO 13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA PRECISIÓN

Se comparó las lecturas obtenidas por el analista 1 y el analista 2 a tres diferentes concentraciones para observar si había una diferencia significativa entre sus resultados. Para ello se realizó la prueba Shapiro-Wilk para observar la normalidad de los datos y se realizó la prueba U de Mann-Whitney a los datos que no cumplieron la distribución normal. A los que sí cumplieron se les realizó una prueba de varianzas para luego elegir entre una prueba de t de Student para varianzas homogéneas o heterogéneas.

Las hipótesis de las pruebas de varianza, U de Mann-Whitney y t de Student se muestran a continuación:

Varianzas: Prueba de homogeneidad de varianzas.

H₀: Los resultados de los dos analistas tienen varianzas homogéneas a una concentración de 10, 50 y 200 ppb.

H₁: Los resultados de los dos analistas tienen varianzas heterogéneas a una concentración de 10, 50 y 200 ppb.

T de Student o U de Mann-Whitney: Para dos muestras independientes.

H₀: Los resultados de los dos analistas no presentan una diferencia significativa a concentraciones de 10, 50 y 200 ppb.

H₁: Los resultados de los dos analistas si presentan una diferencia significativa a concentraciones de 10, 50 y 200 ppb.

Criterio de aceptación:

Si $\alpha = 0.05 < p\text{-valor}$, entonces se acepta H₀.

Si $\alpha = 0.05 > p\text{-valor}$, entonces se rechaza H₀.

❖ **Procedimiento estadístico a una concentración de 10 ppb.**

Tabla de valores de p para las varianzas a 10 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.6841	Se acepta Ho
Ciprofloxacino	0.6363	Se acepta Ho
Ácido oxolínico	0.1755	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.4227	Se acepta Ho
Tetraciclina	0.5938	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.5311	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.6513	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.0299	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	0.4751	Se acepta Ho
Florfenicol	0.2804	Se acepta Ho

Conclusión: Las varianzas son homogéneas de casi todos los resultados excepto de la sulfadoxina y para ella se utilizará un t de student para varianzas heterogéneas.

Tabla de valores de p para la prueba t de student a 10 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.0039	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.0896	Se acepta Ho
Ácido oxolínico	0.0804	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.0001	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	0.0003	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	0.9069	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.4209	Se acepta Ho
Florfenicol	0.0000	Se rechaza Ho

Conclusión: Se observó que los analistas no presentan diferencias significativas para 4 antibióticos a 10 ppb, los cuales fueron ciprofloxacino, ácido oxolínico, sulfadoxina y sulfadimetoxina mientras que en los demás si muestran diferencias significativas entre los dos analistas.

❖ **Procedimiento estadístico a una concentración de 50 ppb.**

Tabla de valores de p para las varianzas a 50 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.0357	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino		
Ácido oxolínico	0.8788	Se acepta Ho
Amoxicilina	0.8524	Se acepta Ho
Tetraciclina	0.8194	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.4134	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.9756	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.3237	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.1644	Se acepta Ho
Florfenicol	0.6536	Se acepta Ho

Conclusión: Las varianzas son homogéneas de casi todos los resultados excepto del enrofloxacino entonces se le realizará un t de student para varianzas heterogéneas.

Tabla de valores de p para las pruebas t de Student y U de Mann-Whitney a 50 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.0000	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.0002	Se rechaza Ho
Ácido oxolínico	0.0000	Se rechaza Ho
Amoxicilina	0.0000	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.5603	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.9554	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.6446	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.4423	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.0003	Se rechaza Ho
Florfenicol	0.0023	Se rechaza Ho

Conclusión: Se observó que los analistas no presentan diferencias significativas para 4 antibióticos a 50 ppb, los cuales fueron todas del grupo de las tetraciclinas y la sulfadoxina mientras que en los demás si muestran diferencias significativas entre los dos analistas.

❖ **Procedimiento estadístico a una concentración de 200 ppb.**

Tabla de valores de p para las varianzas a 200 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino		
Ciprofloxacino	0.9183	Se acepta Ho
Ácido oxolínico		
Amoxicilina	0.0457	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.4794	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.8222	Se acepta Ho
Oxitetraciclina	0.2941	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.6565	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.6559	Se acepta Ho
Florfenicol	0.5649	Se acepta Ho

Conclusión: Las varianzas son homogéneas de casi todos los resultados excepto de la amoxicilina entonces se le realizará un t de student para varianzas heterogéneas.

Tabla de valores de p para las pruebas t de Student y U de Mann-Whitney a 200 ppb

Analito	P - valor	Decisión
Enrofloxacino	0.0002	Se rechaza Ho
Ciprofloxacino	0.0000	Se rechaza Ho
Ácido oxolínico	0.0002	Se rechaza Ho
Amoxicilina	0.0000	Se rechaza Ho
Tetraciclina	0.3092	Se acepta Ho
Clortetraciclina	0.0000	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	0.0763	Se acepta Ho
Sulfadoxina	0.0590	Se acepta Ho
Sulfadimetoxina	0.0005	Se rechaza Ho
Florfenicol	0.0000	Se rechaza Ho

Conclusión: Se observó que los analistas no presentan diferencias significativas para 3 antibióticos a 200 ppb, los cuales fueron la tetraciclina, oxitetraciclina y la sulfadoxina mientras que en los demás si muestran diferencias significativas entre los dos analistas.

ANEXO 14. FOTO DE LAS MUESTRAS DE LOS DIFERENTES MERCADOS



Mercado 1 (Los Olivos)



Mercado 2 (Independencia)



Mercado 3 (Independencia)



Mercado 4 (Comas)



Mercado 5 (Pte. Piedra)



Mercado 6 (San Martín de Porres)

ANEXO 15. ÁREA DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LAS MUESTRAS DE MERCADO

Analito/ Estándar	Área de los picos cromatográficos (mAU*min)				
	10 ppb	50 ppb	100 pbb	200 ppb	300 ppb
Enrofloxacino	254349.734	970286.063	1881186	3498369.75	5047974.5
Ciprofloxacino	108262.773	420704.656	832209.063	1560125.25	2204195
Ácido oxolínico	612435.938	2558890.5	5324062.5	9827141	14053664
Amoxicilina	12428.196	55994.746	114089.828	229238.203	345630.594
Tetraciclina	70636.25	312833.656	626929.375	1200415.13	1851476.75
Clortetraciclina	15173.597	66462.57	136902.094	263502.656	407443.844
Oxitetraciclina	70536.727	304910.125	627678.188	1228526	1780558.13
Sulfadoxina	159252.438	709355.75	1447305.13	2900501.25	4304591.5
Sulfadimetoxina	203069.469	833195.063	1742556.63	3205804.75	4756192
Florfenicol	5358.476	23836.361	47899.465	93031.516	138081.172

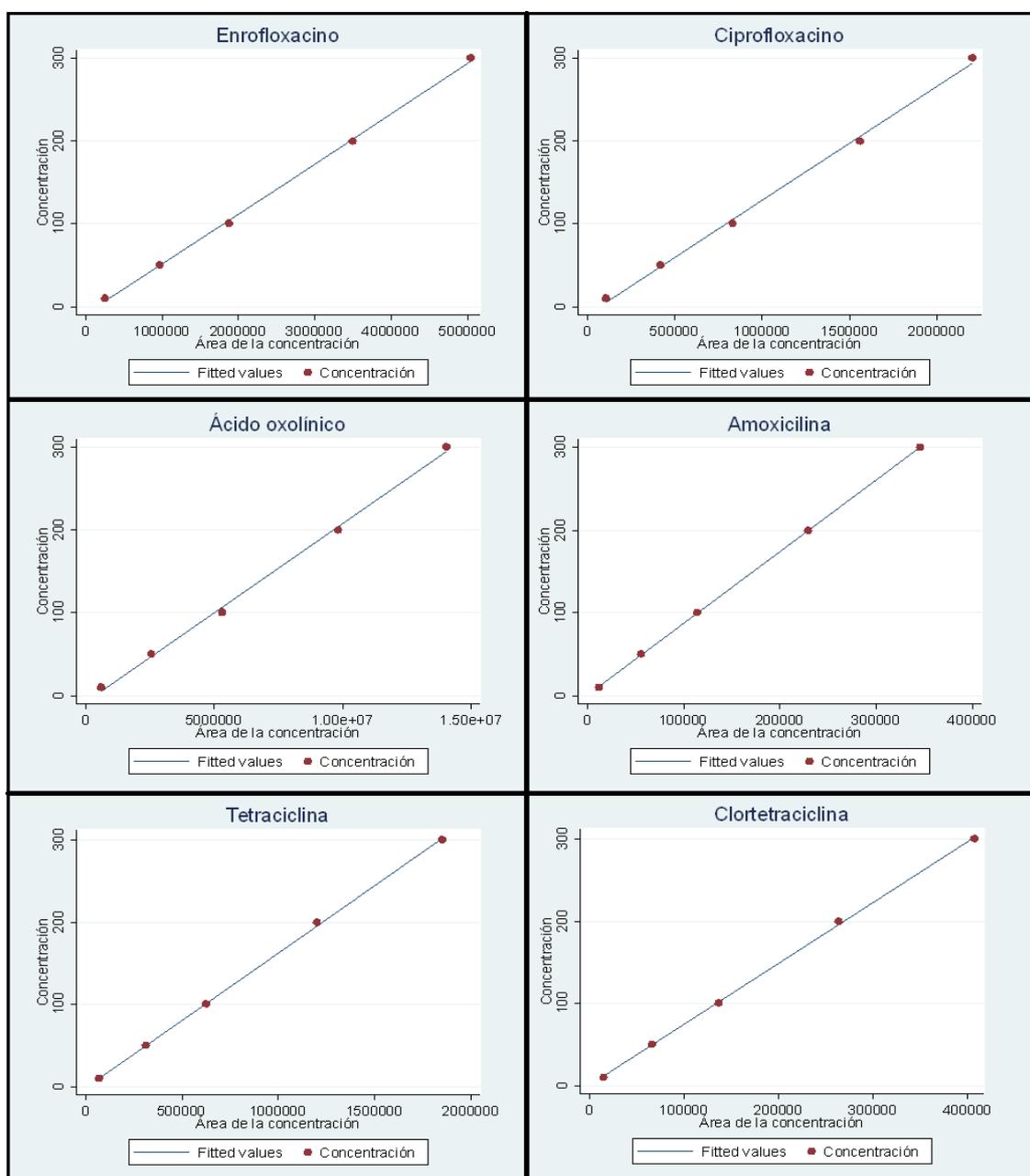
ANEXO 16. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LAS MUESTRAS DE MERCADO EN STATA

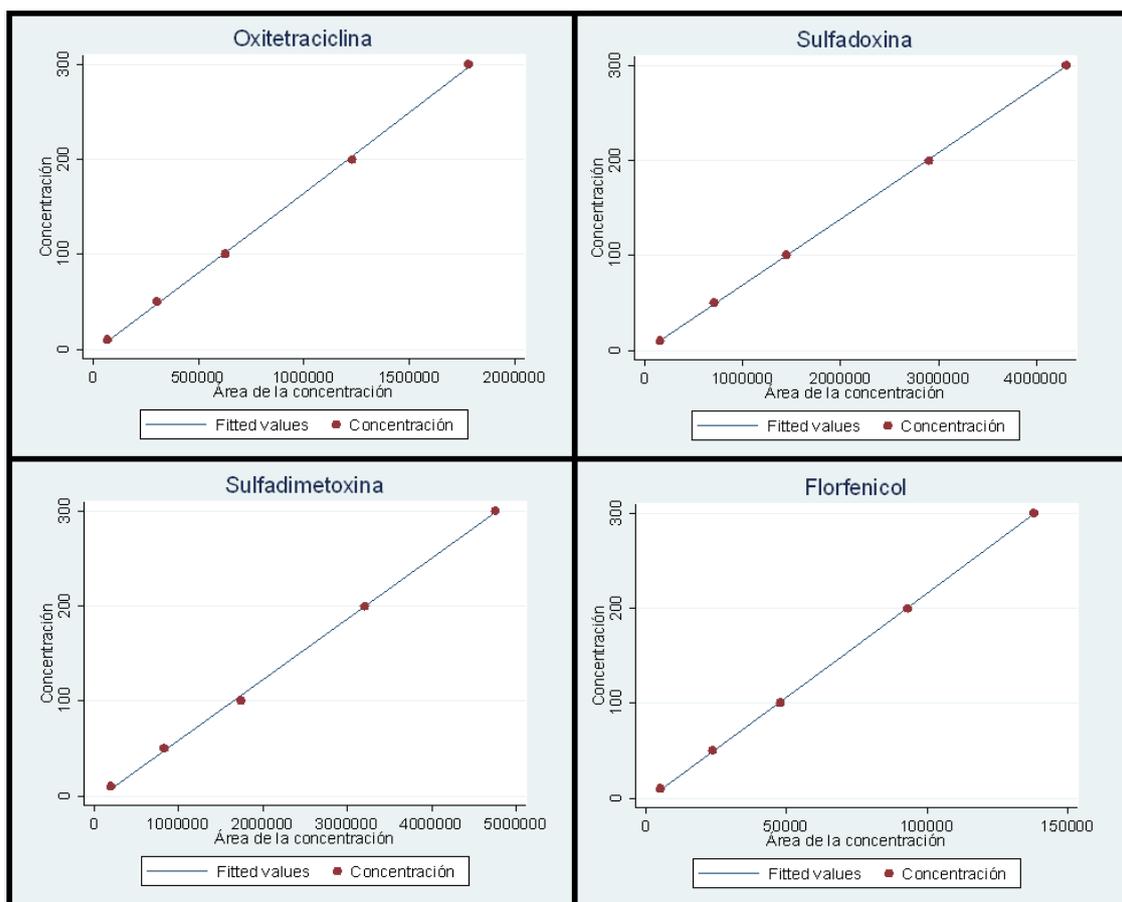
Se construyeron las gráficas de las curvas de calibración, la prueba de regresión lineal para encontrar la ecuación lineal de cada antibiótico, así como el coeficiente de determinación, los que ayudan a determinar qué tan significativa es su ecuación. Finalmente se corrió la prueba de correlación bivariada para determinar la relación entre las variables.

y = Concentración del estándar del antimicrobiano. (variable dependiente)

x = Área del pico cromatográfico. (variable independiente)

Gráfico de linealidad:





Modelo de la ecuación:

$$y_i = b_0 + b_1x_i$$

Tabla de modelo de ecuación de la curva de calibración

Analito	Modelo de la ecuación
Enrofloxacino	$y = -9.135886 + 0.0000606 x$
Ciprofloxacino	$y = -9.165555 + 0.0001377 x$
Ácido oxolínico	$y = -7.256884 + 0.0000215 x$
Amoxicilina	$y = 0.4817194 + 0.0008682 x$
Tetraciclina	$y = -1.156745 + 0.0001639 x$
Clortetraciclina	$y = -0.076722 + 0.0007424 x$
Oxitetraciclina	$y = -3.237596 + 0.0001685 x$
Sulfadoxina	$y = -0.626983 + 0.0000696 x$
Sulfadimetoxina	$y = -5.156833 + 0.0000638 x$
Florfenicol	$y = -2.716379 + 0.0021855 x$

Contraste de hipótesis:

$$y_i = b_0 + b_1x_i$$

H_0 = El modelo de la ecuación no es significativo. ($b_1=0$)

H_1 = El modelo de la ecuación es significativo. ($b_1 \neq 0$)

Criterio:

$\alpha = 0.05 < p$ -valor, entonces se acepta H_0 .

$\alpha = 0.05 > p$ -valor, entonces se rechaza H_0 .

Tabla de significancia de la ecuación según la constante de la variable independiente

Analito	p-valor	Entonces
Enrofloxacino	0.000	Se rechaza H_0
Ciprofloxacino	0.000	Se rechaza H_0
Ácido oxolínico	0.000	Se rechaza H_0
Amoxicilina	0.000	Se rechaza H_0
Tetraciclina	0.000	Se rechaza H_0
Clortetraciclina	0.000	Se rechaza H_0
Oxitetraciclina	0.000	Se rechaza H_0
Sulfadoxina	0.000	Se rechaza H_0
Sulfadimetoxina	0.000	Se rechaza H_0
Florfenicol	0.000	Se rechaza H_0

Conclusión: El coeficiente de la variable independiente es significativo para la ecuación de la curva de calibración de cada analito del método multiresiduos.

Coefficiente de determinación (r)

Criterio:

Modelo muy bueno: $0.9 \leq r^2 < 1$

Modelo bueno: $0.6 \leq r^2 < 0.9$

Modelo no tan bueno: $r^2 < 0.6$

Tabla del coeficiente de determinación

Analito	r^2 (%)	P - valor	Entonces
Enrofloxacino	99.90	0.0000	Se rechaza H_0
Ciprofloxacino	99.80	0.0000	Se rechaza H_0
Ácido oxolínico	99.79	0.0000	Se rechaza H_0
Amoxicilina	99.99	0.0000	Se rechaza H_0

Tetraciclina	99.95	0.0000	Se rechaza Ho
Clortetraciclina	99.95	0.0000	Se rechaza Ho
Oxitetraciclina	99.93	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadoxina	99.99	0.0000	Se rechaza Ho
Sulfadimetoxina	99.91	0.0000	Se rechaza Ho
Florfenicol	99.99	0.0000	Se rechaza Ho

Conclusión: El coeficiente de determinación expresa un modelo muy bueno para las ecuaciones de la curva de calibración lo que hace significativo el modelo especialmente de la amoxicilina.

Coeficiente de correlación (r)

Criterio:

Correlación positiva fuerte: $0.9 \leq r < 1$

Correlación moderada: $0.5 \leq r < 0.9$

Correlación positiva débil: $r < 0.5$

Tabla de coeficiente de correlación

Analito	r	Correlación
Enrofloxacino	0.9995	Positiva fuerte
Ciprofloxacino	0.9990	Positiva fuerte
Ácido oxolínico	0.9990	Positiva fuerte
Amoxicilina	1.0000	Positiva fuerte
Tetraciclina	0.9998	Positiva fuerte
Clortetraciclina	0.9997	Positiva fuerte
Oxitetraciclina	0.9997	Positiva fuerte
Sulfadoxina	1.0000	Positiva fuerte
Sulfadimetoxina	0.9996	Positiva fuerte
Florfenicol	0.9999	Positiva fuerte

Conclusión: Existe una relación directa y positiva entre x e y para todas las ecuaciones de calibración es decir si aumenta la variable x también aumenta la variable y.

ANEXO 17. RESULTADOS DEL ÁREA CROMATOGRÁFICA DE LAS MUESTRAS DE MERCADO

		Área Cromatográfica (mAU*min)									
Muestra de mercados		Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Ácido oxolínico	Amoxicilina	Tetraciclina	Clortetraciclina	Oxitetraciclina	Sulfadoxina	Sulfadimetoxina	Florfenicol
Blanco		437.301	156.779	390.64	20.178	58.297	1.621	92.072	58.498	54.238	20.573
Mercado 1	MP 1	439.227	149.015	397.52	20.0841	55.64	1.64	1864.976	53.766	43.642	23.337
	MP 2	432.559	146.561	401.11	20.0486	58.603	1.854	1432.33	58.718	50.583	26.46
Mercado 2	MP 1	384.68	147.199	-	-	390.868	52.942	1896.443	1834.903	252.805	91.816
	MP 2	380.176	149.102	-	-	388.144	54.707	1485.002	485.951	248.629	95.124
Mercado 3	MP 1	431.953	162.834	165.73	2.795	385.653	50.492	1962.434	387.601	565.097	14.955
	MP 2	400.949	170.621	163.66	2.538	383.047	47.215	1449.015	627.233	540.404	16.192
Mercado 4	MP 1	400.926	160.262	423.45	4.267	395.556	-	22686.831	278.369	427.743	118.508
	MP 2	402.707	162.94	429.68	3.988	396.512	-	23279.89	798.064	436.675	114.263
Mercado 5	MP 1	386.797	167.182	123.53	-	254.526	2.784	1806.826	311.317	542.385	76.803
	MP 2	397.324	165.607	120.9	-	256.621	2.549	1951.17	567.776	565.341	79.137
Mercado 6	MP 1	411.121	168.342	231.46	18.946	278.601	60.431	1260.09	444.946	286.903	-
	MP 2	416.043	170.402	222.64	16.189	280.069	62.059	1358.739	309.135	280.492	-