



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL EN
MÚSCULO DE POLLO Y HUEVO DE GALLINA
COMERCIALIZADOS EN MERCADOS DE LIMA SUR MEDIANTE
UNA TÉCNICA VALIDADA DE UPLC-MS/MS

Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico

Autoras

Angye Isabel Monge Aviles

Stefy Emma Camones Hernandez

Asesora

Dra. Maria Concepcion Rivera Chira

Lima, Perú

2026

Jurado calificador

Presidente: Mag. Denis Helan Castillo Pareja

Vocal: Mag. Leon Faustino Villegas Vilchez

Secretario: Maria Susana Roque Marroquin

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	CAMONES HERNANDEZ STEFY EMMA
2.	MONGE AVILES ANGYE ISABEL

Pertencientes al programa de la CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, autores del trabajo titulado: DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL EN MÚSCULO DE POLLO Y HUEVO DE GALLINA COMERCIALIZADOS EN MERCADOS DE LIMA SUR MEDIANTE UNA TÉCNICA VALIDADA DE UPLC-MS/MS, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO bajo la modalidad de TESIS.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	RIVERA CHIRA MARIA CONCEPCION	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de 18%, según el reporte emitido por el software Turnitin® (identificador de entrega: 3472915995; fecha de entrega: 04/02/2026).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 04 de enero de 2026



Firma del asesor
Nº DNI: 10003044
ORCID: 0000-0001-9470-6642

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	8
IV. OBJETIVOS.....	8
4.1. OBJETIVO GENERAL	8
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1 MATERIALES Y EQUIPOS	9
5.1.1. Lugar de trabajo	9
5.1.2. Muestras biológicas	9
5.1.3. Material de laboratorio.....	10
5.1.4. Reactivos	10
5.1.5. Equipos.....	10
5.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE CLORANFENICOL EN MÚSCULO DE POLLO Y HUEVO DE GALLINA	11
5.2.1. Preparación de las soluciones estándar	12
5.2.1.1.Preparación del estándar de cloranfenicol.....	12
5.2.1.2. Preparación del estándar interno.....	12
5.2.2. Preparación de fases móviles.....	13
5.2.3. Sintonización de moléculas.....	14
5.2.4. Ajuste de la gradiente del UPLC-MS/MS.....	14
5.2.5. Modificación de la gradiente	14
5.2.6. Preparación de las curvas de calibración del estándar de cloranfenicol.....	17
5.2.7. Procesamiento de la muestra sin adición del estándar y homogenización	19
5.2.8. Extracción de la muestra de músculo de pollo y huevo de gallina.....	19
5.2.8.1.Muestras fortificadas	22
5.2.9. Condiciones espectrométricas y cromatográficas	23
5.2.10. Determinación de cloranfenicol	23
5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO	24
5.3.1 Veracidad	24
5.3.2 Precisión	26
5.3.3 Selectividad	28
5.3.4 Linealidad	29

5.3.5	Límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD)	30
5.3.6	Robustez	32
5.3.7	Rango de trabajo	34
5.3.8	Sensibilidad	35
5.3.9	Límite de decisión ($CC\alpha$)	35
5.3.10	Incertidumbre	36
5.4. DETERMINACION DE CLORANFENICOL EN LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE MERCADOS DE ABASTO.		36
VI.	RESULTADOS	37
6.1.	DESARROLLO DEL MÉTODO	37
6.1.1.	Metodología optimizada	37
6.1.2.	Cromatografía del método optimizado	38
6.1.3.	Curva de calibración del cloranfenicol	38
6.1.3.1.	Curvas de calibración en ambas matrices	39
6.1.4.	Porcentaje de recuperación del método de extracción optimizado	40
6.1.4.1.	Porcentaje de recuperación en ambas matrices	41
6.2.	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	41
6.2.1.	Veracidad	41
6.2.2.	Precisión	45
6.2.3.	Selectividad	48
6.2.3.1.	Prueba de normalidad	49
6.2.3.2.	Prueba t de Student	50
6.2.3.3.	Cromatogramas	50
6.2.4.	Linealidad y sensibilidad analítica	52
6.2.4.1.	Matriz de músculo de pollo	52
6.2.4.2.	Matriz de huevo de gallina	56
6.2.5.	Límite de detección y cuantificación	59
6.2.5.1.	LOD y LOQ para matriz músculo de pollo	60
6.2.5.2.	LOD y LOQ para matriz de huevo de gallina	61
6.2.6.	Robustez	62
6.2.6.1.	Robustez en matriz de pollo	62
6.2.6.2.	Robustez en matriz de huevo de gallina	63
6.2.7.	Rango de trabajo	65
6.2.8.	Límite de decisión e incertidumbre	67
6.3.	DETERMINACIÓN DE CLORANFENICOL EN MUESTRAS OBTENIDAS EN MERCADOS DE LIMA SUR	71

6.3.1. Análisis de las muestras de los mercados	71
VII. DISCUSIÓN	74
VIII. CONCLUSIONES	82
IX. BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS	90

TABLAS

Tabla 1. Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración.	18
Tabla 2. Factores utilizados para el método de Youden y Steiner	33
Tabla 3. Prueba de robustez de Youden y Steiner	33
Tabla 4. Condiciones cromatográficas de optimización del método.	37
Tabla 5. Transiciones y condiciones óptimas utilizadas para el análisis de residuos de cloranfenicol.	37
Tabla 6. Curvas de calibración en matriz músculo de pollo y huevo de gallina	40
Tabla 7. Resultados de los porcentajes de recuperación en ambas matrices	41
Tabla 8. Porcentaje de recuperación para matriz de músculo de pollo.	42
Tabla 9. Porcentaje de recuperación para matriz de huevo de gallina.	43
Tabla 10. Precisión intermedia para la matriz de pollo.	45
Tabla 11. Precisión intermedia para la matriz de huevo de gallina	46
Tabla 12. Precisión intermedia en ambas matrices.	47
Tabla 13. Porcentaje de recuperación en ambas matrices.	48
Tabla 14. Resultados de estadísticas descriptivas de la prueba t de Student	50
Tabla 15. Datos experimentales para la curva de calibración en matriz de músculo de pollo y parámetros de la regresión lineal	53
Tabla 16. Análisis de varianza de la regresión.	55
Tabla 17. Resultados de la inferencia de los parámetros.	56
Tabla 18. Datos experimentales para la curva de calibración en matriz de huevo de gallina y parámetros de la regresión lineal.	56
Tabla 19. Análisis de varianza de la regresión	58
Tabla 20. Resultados de la inferencia de los parámetros.	59
Tabla 21. Límite de detección (LOD) en matriz de músculo de pollo.	59
Tabla 22. Límite de detección (LOD) en matriz de huevo de gallina.	60
Tabla 23. Robustez por cada ensayo en músculo de pollo.	62
Tabla 24. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada factor.	63
Tabla 25. Robustez por cada ensayo en matriz de huevo de gallina.	63
Tabla 26. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada factor.	64
Tabla 27. Niveles para determinación del rango de trabajo en matriz de músculo de pollo.	65
Tabla 28. Niveles para la determinación del rango de trabajo en matriz de huevo de gallina.	66
Tabla 29. Determinación del $CC\alpha$ en matriz pollo.	68
Tabla 30. Determinación del $CC\alpha$ en matriz huevo de gallina	69
Tabla 31. $CC\alpha$ para ambas matrices.	70
Tabla 32. Concentración de cloranfenicol en muestras de huevos de gallina provenientes de 4 mercados de Lima Sur.	72
Tabla 33. Concentración de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo provenientes de 4 mercados de Lima Sur.	73

FIGURAS

Figura 1. Diagramas de flujo del procedimiento de extracción del método de referencia y del método modificado.	21
Figura 2. Cromatograma de cloranfenicol con el cuarto cambio por UPLC-MS/MS	38
Figura 3. Regresión lineal de la curva de calibración para la matriz huevo de gallina ..	39
Figura 4. Regresión lineal de la curva de calibración para la matriz músculo de pollo .	39
Figura 5. Prueba de normalidad en matriz músculo de pollo	49
Figura 6. Prueba de normalidad en matriz huevo de gallina	50
Figura 7. Cromatogramas de muestras de músculo de pollo. A) fortificada con 0.038 µg CFC/Kg. B y C) fortificada con 0.037 µg CFC/Kg.....	51
Figura 8. Cromatogramas de muestras de huevo de gallina. A) fortificada con 0.038 µg CFC/Kg. B y C) fortificada con 0.037 µg CFC/Kg.....	51
Figura 9. Cromatograma del blanco en ambas matrices. A) Matriz de músculo de pollo, día 1. B) Matriz de músculo de pollo, día 2. C) Matriz de músculo de pollo, día 3. D) Matriz de huevo de gallina, día 1. E) Matriz de huevo de gallina, día 2. F) Matriz de huevo de gallina, día 3.	52
Figura 10. Gráfica de línea ajustada del promedio de las tres curvas de calibración.	54
Figura 11. Residuales de la matriz músculo de pollo	55
Figura 12. Gráfica de línea ajustada del promedio de las tres curvas de calibración.	57
Figura 13. Residuales de la matriz huevo de gallina.	58
Figura 14. Gráfica de línea ajustada para rango de trabajo en huevo de gallina.	67
Figura 15. Gráfica de línea ajustada para rango de trabajo en músculo de pollo.	67
Figura 16. Curvas de calibración para matriz pollo de 3 días.....	69
Figura 17. Curvas de calibración para matriz huevo de gallina de 3 días.	70

ABREVIATURAS

VRI: Valor de referencia a efectos de intervención

RSD: Desviación estándar relativa

DS: Desviación estándar

PPB: Parte por billón

ELISA: Enzimoimmunoanálisis de adsorción

UE: Unión Europea

LOD: Limite de detección

LOQ: Limite de cuantificación

CE: Comisión Europea

LMR: Límite máximo de residuos

ARGs: Genes de resistencia a antibióticos

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

ISO: Organización Internacional de Normalización o estandarización

AF: Ácido fórmico

MeOH: Metanol

ACN: Acetonitrilo

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

LaCCSA: Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria

UPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo

CC α : Limite de decisión

CFC: Cloranfenicol

USP: Farmacopea de los Estados Unidos

ICH: Conferencia Internacional de Armonización

RESUMEN

Introducción: El sector avícola constituye una fuente esencial de alimentos para la población, por lo que el pollo y los huevos de gallina representan productos de alto consumo humano. En el Perú, al igual que en otros países, existe regulación para el control y vigilancia de residuos de antibióticos en productos alimentarios, incluyendo el cloranfenicol. Sin embargo, el cumplimiento de estas normas no siempre es adecuado, observándose el uso indebido de antimicrobianos en la crianza de aves destinadas al consumo humano. A pesar de su relevancia para la inocuidad alimentaria, en el país existen pocas investigaciones que evalúen de manera sistemática la presencia de cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina. El objetivo del presente estudio fue determinar residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina comercializados en mercados de Lima Sur, empleando un método validado basado en cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

Método: Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina mediante UPLC-MS/MS. La validación incluyó veracidad, precisión, selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, robustez, rango de trabajo, sensibilidad, límite de decisión e incertidumbre, conforme a estándares regulatorios internacionales. Posteriormente, se aplicó el método para analizar muestras obtenidas en mercados de los distritos de Lima Sur (Chorrillos, Villa María del Triunfo, Villa El Salvador y San Juan de Miraflores).

Resultados: El método desarrollado cumplió satisfactoriamente con todos los parámetros de validación. En las muestras procedentes de los mercados Ciudad de Dios, Miguel Grau, Cuaves y Mach se detectaron concentraciones variables de cloranfenicol. En huevos de gallina, los valores oscilaron entre 0.08 y 0.334 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En músculo de pollo, las concentraciones estuvieron entre 0.1 y 2.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Conclusiones: Se desarrolló y validó un método confiable para la identificación y cuantificación de cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina. Se recomienda su implementación para el monitoreo rutinario de estos productos comercializados en el país.

Palabras clave: Músculo de pollo, huevo de gallina, cloranfenicol, UPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Introduction: The poultry sector is a substantial source of food for the population, and as such, both chicken and chicken eggs are significant products for human consumption. Peru, like other countries, has regulations for the control and monitoring of antibiotic residues in food industry products such as chicken and chicken eggs, including antibiotics like chloramphenicol. However, these health standards are not necessarily met, and misuse of these drugs is frequently observed in the raising of birds intended for human consumption. Despite the importance of analyzing food safety, rigorous research evaluating chloramphenicol levels in chicken muscle and chicken eggs has not been conducted in Peru. The objective of this study was the determination of chloramphenicol in chicken muscle and eggs from markets in southern Lima using a validated method of ultra-performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass detector (UPLC-MS/MS).

Method: The method was developed and validated for the determination of chloramphenicol in chicken muscle and eggs from markets in southern Lima using UPLC-MS/MS. The following validation parameters were evaluated: trueness, precision, selectivity, linearity, limit of detection and quantification, robustness, working range, sensitivity, decision limit, and uncertainty, in accordance with international regulatory standards. Chloramphenicol levels were subsequently determined in both matrices purchased from markets in the districts of southern Lima (Chorrillos, Villa María del Triunfo, Villa el Salvador, and San Juan de Miraflores).

Results: The developed and validated method met the established parameters. Samples evaluated at the Ciudad de Dios, Miguel Grau, Cuaves, and Mach markets showed varying concentrations of chloramphenicol. In chicken egg samples, concentrations ranged from 0.08 to 0.334 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In chicken muscle samples, values ranging from 0.1 to 2.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were detected.

Conclusions: Chloramphenicol was identified and quantified in chicken muscle and hen egg samples using a validated method. The use of this method is recommended for monitoring these products marketed in our region.

Keywords: Chicken muscle, chicken egg, chloramphenicol, UPLC-MS/MS.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, de acuerdo a las estadísticas del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, el sector avícola tiene una participación del 18,4% con respecto al valor total de la producción agropecuaria. De esta cifra, a la comercialización de ave le corresponde el 15.6% y a la del huevo de gallina el 2,8%, representando ambas la primera fuente de proteína animal para consumo humano a nivel nacional y regional [1]. Por ello es crucial el control y vigilancia de estos productos alimenticios, con el fin de asegurar su inocuidad y evitar poner en riesgo la salud pública.

A nivel internacional, existen diversas entidades que regulan el control de la presencia y de los límites de diversos medicamentos en alimentos de origen animal y derivados. En Europa, la agencia reguladora que se encarga de establecer la normativa sobre los límites de residuos máximos permitidos es la Comisión Europea [2,3]. Esta agencia, además, exige a las autoridades competentes de los estados miembros a llevar el control de la presencia de residuos veterinarios en productos de consumo humano [4]. En los Estados Unidos la entidad regulatoria es la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

Las regulaciones establecidas por la Comisión Europea y la FDA han servido de referencia en diferentes países para normar los límites permisibles de diversos medicamentos como los antibióticos en productos animales de consumo humano, incluyendo antibióticos como el cloranfenicol. Dichas regulaciones prohíben la presencia de cloranfenicol en productos de consumo humano en los países de la Unión Europea y en los Estados Unidos [5,6]. En lo que respecta a la regulación del cloranfenicol en América Latina, es un fármaco prohibido en diversos países como Paraguay, Venezuela y Chile [7,8,9].

En el Perú, la Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria se encarga de fijar los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas y agentes farmacológicos de uso veterinario en alimentos de consumo humano. La entidad encargada del control de los LMR de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos de origen animal y derivados es el Servicio Nacional de Sanidad Agraria, que realiza planes anuales de monitoreo de residuos de las sustancias reguladas en alimentos agropecuarios primarios y piensos [10], entre estos el cloranfenicol.

El uso indiscriminado de antibióticos (incluyendo al grupo de los anfenicoles, en el que está comprendido el cloranfenicol) en aves de corral destinadas al consumo humano se asocia con diversos efectos de toxicidad en los organismos expuestos y con la generación y transmisión de resistencia antimicrobiana de aves a humanos [11, 12, 13]. A pesar de su efectividad contra diversas infecciones, los anfenicoles pueden causar efectos adversos tales como depresión de la médula ósea, así como daño hepático, trastornos neurológicos y reacciones alérgicas [11].

Según el Codex Alimentarius, no existe un nivel seguro de residuos de cloranfenicol o sus metabolitos en los alimentos, que representen un riesgo aceptable para los consumidores, debido a que sus efectos tóxicos no son dosis dependientes [14], por lo que su uso en animales destinados a consumo humano está prohibido. Similarmente, la regulación peruana prohíbe el uso del cloranfenicol en el proceso de producción de productos veterinarios o alimentos para animales destinados al consumo humano [15]. Sin embargo, a pesar de las regulaciones mencionadas, se ha documentado el uso del cloranfenicol en el proceso de crianza de diversos animales en muchos países, incluido el nuestro [16,17].

Para entender mejor los riesgos relacionados al consumo de alimentos contaminados con cloranfenicol, es necesario revisar su actividad biológica y sus mecanismos de acción.

El cloranfenicol tiene tres grupos funcionales en su estructura química, el grupo p-nitrofenol, el grupo cloroacetilo y el grupo alcohólico en el tercer carbono de la cadena de propanodiol, lo cual determina en gran medida su actividad biológica [18].

El mecanismo de acción del cloranfenicol se basa en la inhibición de la síntesis proteica celular [19]. Su actividad biológica se produce a través de la interferencia con la actividad peptidiltransferasa en la subunidad ribosomal 50S, la cual se encuentra cerca del sitio de acción de los antibióticos macrólidos. Cuando ocurre la interacción del cloranfenicol con la ribozima peptidiltransferasa, se evita la unión de esta enzima con el sustrato aminoácido y ello inhibe la formación de enlaces peptídicos. El cloranfenicol afecta la síntesis de proteínas de los mamíferos, sobre todo las proteínas mitocondriales [18]. Los ribosomas mitocondriales de los mamíferos son 70S y son semejantes a los ribosomas

bacterianos, siendo más susceptibles las mitocondrias de la médula ósea. Esto explica los efectos adversos que puede causar el cloranfenicol tanto en animales como en humanos. El uso de cloranfenicol en humanos es restringido, debido a su potencial toxicidad, a la resistencia bacteriana que produce y a la disponibilidad de otros medicamentos más seguros. Entre los efectos adversos más comunes relacionados con el uso de cloranfenicol en adultos se encuentran las náuseas, vómitos y diarreas [20]. En ocasiones puede ocurrir leucopenia, trombocitopenia, agranulocitosis, anemia, neuritis óptica y neurotoxicidad [19]. La anemia aplásica es un efecto adverso poco frecuente pero grave, que suele ocurrir por el uso prolongado del medicamento [21]. El posible mecanismo es la formación de derivados nitro tóxicos los cuales lesionan el ADN de células madre de la médula ósea.[22]. Cabe resaltar también que el cloranfenicol es usado específicamente en algunos tipos de enfermedades como la fiebre tifoidea o como alternativa en infecciones localizadas en órganos o lugares que disponen de barreras difíciles de penetrar como el cerebro y el líquido cefalorraquídeo [19, 21].

Un estudio de la farmacocinética, metabolismo y residuos de cloranfenicol en aves, realizado en España, determinó que la biodisponibilidad del mismo tras una administración oral de 30 mg/kg y 50 mg/kg fue del 29% y del 38% respectivamente [23]. El cloranfenicol se distribuye rápidamente por todo el cuerpo de los pollos de engorde y alcanza niveles efectivos en la mayoría de los órganos a las 8 horas, especialmente en los pulmones. Por ello, la eliminación del cloranfenicol sin cambios y de sus tres metabolitos principales en pollos ocurre de manera tardía [23].

Con respecto a la genotoxicidad del cloranfenicol, existe evidencia sobre su capacidad de afectar el material genético celular en diferentes sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro* [24]. El cloranfenicol está catalogado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como probable agente cancerígeno en humanos [25]. Si bien la evidencia de su carcinogenicidad en humanos es limitada, hay pruebas suficientes en animales [26]. Debido a la prohibición de su uso en animales de consumo humano y a las restricciones de su uso terapéutico, las investigaciones sobre la genotoxicidad del cloranfenicol son limitadas [24]. Cabe remarcar además que el uso de cloranfenicol en gestantes y en niños está estrictamente restringido debido a la toxicidad mencionada, a pesar de que haya estudios escasos de este antibiótico en estas poblaciones [19,27,28].

La evidencia proveniente de la literatura internacional sobre la presencia de cloranfenicol en músculo de pollo o huevos de gallina demuestra la continuación de su utilización en la crianza de estas aves, particularmente en países de ingresos medios y bajos, a pesar de las prohibiciones establecidas. Así, en un estudio realizado en Nigeria utilizando la técnica de ELISA, se documentó la presencia de cloranfenicol en 51.1% de las muestras de tejido de ave de corral y en 25.4% de las muestras de huevos evaluados [29]. Similarmente, un estudio de determinación de residuos de medicamentos de uso común por HPLC con un detector de matriz de diodos, realizado en Ghana en tejido de pollo (hígado, riñones y músculo) y huevos de gallina, mostró la presencia de cloranfenicol en 88.9% de las muestras de tejido de pollo a una concentración promedio de $150,1 \pm 19,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$, así como en 25% de las muestras de huevos a una concentración promedio de $29,6 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ [30]. Por otra parte, un estudio realizado en Punjab-Pakistán por medio de LC-MS/MS, determinó los niveles de cloranfenicol en carne de aves de corral a partir de muestras aleatorias de mercados avícolas, demostrando su presencia en 4 muestras de 120, con un rango de concentración de 0,17 a 0,477 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [31]. Finalmente, en un estudio realizado en Irán utilizando el método de ELISA para determinar la presencia de cloranfenicol en músculo e hígado de pollo, se encontró que más del 31.1% de todas las muestras contenían este antibiótico [16].

Con respecto a la presencia de cloranfenicol en productos avícolas producidos y comercializados en nuestro medio, solamente se ha podido identificar un estudio realizado en carne de pollo en el año 2018, utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de masas de triple cuadrupolo masa-masa (HPLC-MS/MS). En dicho estudio, las 26 muestras analizadas, que procedían de 4 mercados de expendio de carne de pollo de Lima y Callao, contenían residuos de cloranfenicol [17]. Del total de las muestras evaluadas, 14 muestras tenían valores de límite máximo residual mayores a 0.3 ng/g, es decir, no cumplían con los límites establecidos por la FDA y la Unión Europea [17]. Por otra parte, los valores resultantes durante el proceso de validación demostraron buena especificidad.

Cabe señalar que la técnica de cromatografía líquida es la más utilizada en los estudios de determinación de contaminantes en alimentos, debido a la alta complejidad de las matrices [32]. Del mismo modo, el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo es, por

su alta sensibilidad, el detector recomendado por la Comisión Europea para análisis de sustancias prohibidas [33].

Por tanto, se propone la validación metodológica y la determinación de los niveles de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina comercializados en diferentes mercados de la ciudad de Lima, utilizando la técnica de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Perú el consumo de huevo de gallina y de músculo de pollo constituye una de las principales fuentes de proteína de la población. Durante la crianza de pollos de engorde para consumo humano, se suele administrar antibióticos de manera profiláctica para evitar pérdidas económicas. Dentro de estos antibióticos se encuentra el cloranfenicol [34].

Después de la administración de estos medicamentos es necesario cumplir con un tiempo de retiro para la eliminación completa del fármaco en el organismo del animal. No obstante, en ocasiones se apresura la comercialización sin que se cumpla con el tiempo requerido, lo que podría resultar en la presencia de residuos de cloranfenicol en los productos destinados al consumo [35].

Un desafío fundamental en el ámbito de la salud, resultante del uso de antibióticos en animales, es la resistencia bacteriana que se produce a través de diversos mecanismos incluyendo la aparición de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) [35]. Estos pueden pasar de patógenos animales a patógenos humanos, lo que implica un riesgo en el tratamiento de enfermedades y la salud en general.

Finalmente, debe remarcar que el cloranfenicol está clasificado en el grupo IIA de la IARC, lo que indica que existe la probabilidad de que sea carcinogénico en humanos [25]. Por ese motivo, es necesario el control y vigilancia de este medicamento en alimentos destinados a consumo humano como el huevo de gallina y el músculo de pollo. Sin embargo, en nuestro medio hay escasa evidencia sobre la presencia de residuos de

cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina destinados al consumo humano, debido a la falta de un método analítico adecuadamente validado.

III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los niveles de contaminación con cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina comercializados en mercados de la zona sur de Lima Metropolitana?

¿Se cuenta con un método validado que permita la determinación de la concentración de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina?

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina provenientes de mercados de la zona sur de Lima Metropolitana, mediante la aplicación de una técnica validada de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar el método analítico de determinación de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina mediante UPLC-MS/MS
- Validar el método analítico de determinación de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina mediante UPLC-MS/MS.
- Aplicar el método validado de UPLC-MS/MS para la cuantificación de residuos de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo y huevo de gallina provenientes de mercados de la zona sur de Lima Metropolitana mediante UPLC-MS/MS.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1. Lugar de trabajo

El presente estudio se realizó 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 (CITE acuícola UPCH), perteneciente al Centro de Investigación para el Desarrollo Integral y Sostenible (CIDIS). El LaCCSA está ubicado en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la UPCH.

5.1.2. Muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas para el desarrollo y validación de la metodología correspondieron a músculo (pechuga) de pollo y huevos de gallina, adquiridas de un supermercado del distrito de San Isidro como productos frescos y sin antibiótico.

Para la determinación de la presencia de cloranfenicol, se obtuvieron muestras biológicas de mercados de abastos de cuatro distritos de Lima (Chorrillos, Villa María del Triunfo, Villa el Salvador, San Juan de Miraflores). En base al estudio realizado por Vahideh Ebrahimzadeh y colaboradores [36] se seleccionó la pechuga como la parte del pollo adecuada para el análisis. Se eligió esta parte considerando que no hubo una diferencia significativa entre los tejidos evaluados (pechuga, muslo e hígado). Asimismo, se utilizó huevos de gallina. Tanto el músculo de pollo como el huevo de gallina fueron adquiridos como productos frescos o refrigerados. Las muestras de músculo de pollo se almacenaron a -20°C en una congeladora (las muestras pueden ser almacenadas por un tiempo máximo de un año). Los huevos de gallina se conservaron a 4°C en una refrigeradora (estas muestras pueden ser almacenadas por un tiempo máximo de 5 semanas). Las muestras utilizadas para la determinación de cloranfenicol, se obtuvieron de un mercado de abasto en cada distrito, el que fue seleccionado de acuerdo a las características previamente descritas. En cada mercado se adquirieron 7 muestras de músculo de pollo y 7 muestras de huevos de gallina, cada una proveniente de

un puesto diferente, lo que hace un total de 28 muestras para cada matriz de estudio. Cada muestra tuvo una masa aproximada de 0.5 kg.

5.1.3. Material de laboratorio

- Tubos de polipropileno de 50 mL con tapa enroscable
- Materiales de vidrio de clase A verificados: beakers, probetas, fiolas y pipetas
- Jeringas de 5 mL
- Filtros de jeringa 0.2 μm
- Viales de 2 mL

5.1.4. Reactivos

- Agua ultrapura con conductividad de 0.056 $\mu\text{S/cm}$
- Estándar de cloranfenicol (CFC) (estándar primario)
- Acetato de etilo grado LC-MS/MS
- Acetonitrilo grado LC-MS/MS (ACN)
- Metanol grado LC-MS/MS
- Hexano grado PA
- Ácido fórmico grado LC-MS/MS
- Octadecil sílice (C18)
- Tierra de diatomea
- Sulfato de sodio anhidro
- DL-Threo-Cloranfenicol-d5 (CFC d5)

5.1.5. Equipos

- Equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo, modelo Xevo TQ-XS (Waters®). (UPLC)
- Columna BEH C18 50mm x 2.1mm x 1.7 μm
- Evaporador con nitrógeno
- Agitador orbital
- Incubadora

- Ultrasonido
- Centrífuga
- Homogenizador
- Vortex
- Balanza analítica con precisión $\pm 0.01\text{g}$
- Equipo de filtración
- Bomba de vacío

5.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE CLORANFENICOL EN MÚSCULO DE POLLO Y HUEVO DE GALLINA

En el presente estudio se utilizó el método de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo (UPLC-MS/MS), un método de adiciones estándar que permite obtener resultados cuantitativos precisos.

Previo al desarrollo de la metodología, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura científica relacionada con la determinación de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina, con el fin de identificar los procedimientos analíticos empleados en estudios previos y contar con un método base sólido para el desarrollo del presente estudio. A partir de esta revisión, se seleccionó como método de referencia una técnica utilizada para la determinación de nitroimidazoles (7 analitos), nitrofuranos (4 analitos) y cloranfenicol (1 analito) en músculo de pollo y huevo de gallina mediante extracción en fase dispersiva y cromatografía líquida de ultra alta resolución-espectrometría de masas en tándem [37]. A partir de la técnica identificada, se procedió a la optimización de parámetros como condiciones cromatográficas, reducción del tiempo de corrida, detección de analitos, disminución de la cantidad de sales y solventes, en concordancia con la metodología utilizada en el LaCCSA para la determinación de cloranfenicol y otros residuos farmacológicos en diferentes matrices [38].

5.2.1. Preparación de las soluciones estándar

5.2.1.1. Preparación del estándar de cloranfenicol

Para la preparación de los estándares de cloranfenicol se elaboraron tres tipos de soluciones: stock, intermedia y de trabajo, con el fin de obtener una solución de trabajo con la concentración adecuada para su uso en el análisis cuantitativo.

- **Solución de stock estándar de cloranfenicol (1 mg/mL):**

Se disolvió 10 mg del estándar de cloranfenicol en 10 mL de metanol. Esta solución stock sirve como base para la preparación de las soluciones posteriores.

- **Solución intermedia estándar de cloranfenicol (10 µg/mL):**

Se preparó a partir de la solución de stock estándar de cloranfenicol. Se tomó una alícuota de 100 µL de la solución de stock estándar de cloranfenicol y se enrasó con acetonitrilo en una fiola de 10 mL. De esta manera, se obtuvo una solución intermedia de 10 µg/mL, la cual se utilizó posteriormente para la preparación de las soluciones de trabajo a concentraciones más bajas requeridas para el análisis.

- **Solución estándar de trabajo de cloranfenicol (0.01 µg/mL):**

Se preparó la solución estándar de trabajo a partir de la solución intermedia estándar de cloranfenicol. Se tomó una alícuota de 10 µL de la solución intermedia estándar de cloranfenicol (10 µg/mL) y se enrasó con acetonitrilo en una fiola de 10 mL.

Estas soluciones se almacenaron a -20°C, con un tiempo máximo de estabilidad de 8 semanas.

5.2.1.2. Preparación del estándar interno

Se prepararon tres soluciones:

- **Solución de stock estándar interno de cloranfenicol (0.2 mg/mL):** Se diluyó 1 mg del CFC-D5 en una fiola de 5 mL y se enrasó con acetonitrilo.

- **Solución intermedia estándar interno de cloranfenicol (0.01 mg/mL):** Se preparó a partir de la solución de stock estándar interno de cloranfenicol (CFC-D5). Se tomó una alícuota de 50 µL de la solución stock de estándar interno

de 0.2 mg/mL, se trasvasó en un vial de 1 mL y se adicionaron 950µL de acetonitrilo.

- **Solución estándar interno de trabajo de cloranfenicol (0.01 µg/mL):**
Se preparó la solución estándar de trabajo a partir de la solución intermedia estándar interno de cloranfenicol (CFC-D5). Se tomó una alícuota de 10 µL de la solución intermedia estándar interno de cloranfenicol (0.01 mg/mL) y se enrasó con acetonitrilo en una fiola de 10 mL, obteniendo así la concentración final requerida para los ensayos analíticos.

Estas soluciones se almacenaron a -20°C, para lograr un tiempo máximo de estabilidad de 8 semanas.

5.2.2. Preparación de fases móviles.

Se realizaron pruebas haciendo uso de diferentes fases móviles extraídas tanto del método de referencia como de los métodos del laboratorio LACCSA, para obtener una mejor resolución del analito cloranfenicol.

Composición de las fases móviles utilizadas según el método de referencia (12 analitos):

- **Fase A:** Ácido fórmico al 0.1% en agua. Preparación mediante la adición de 100 µL de ácido fórmico en un volumen final de 100 mL de agua.
- **Fase B:** Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, preparado con 100 µL de ácido fórmico en un volumen final de 100 mL de acetonitrilo.

Composición de las fases móviles según el método de análisis de cloranfenicol en productos acuícolas por LC-MS/MS (1 analito) del LaCCSA:

- **Fase A:** Mezcla de agua y acetonitrilo en proporción 95:5 (v/v), preparada con 5 mL de acetonitrilo y 95 mL de agua.
- **Fase B:** Acetonitrilo puro (100%).

Composición de las fases móviles según el método de análisis multiresiduos veterinarios (22 analitos) en productos acuícolas por LC-MS/MS del LaCCSA:

- **Fase A:** Ácido fórmico al 0.1% en mezcla 95:5 (v/v) de agua y acetonitrilo, preparada adicionando 100 µL de ácido fórmico a 95 mL de mezcla agua/acetonitrilo (95:5).
- **Fase B:** Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, obtenido por la adición de 100 µL de ácido fórmico a 100 mL de acetonitrilo.

Todas las fases móviles fueron preparadas con un volumen final de 100 mL para garantizar la reproducibilidad y precisión en los análisis realizados.

5.2.3. Sintonización de moléculas

Este proceso comprende las modificaciones que se realizan en el espectrómetro de masas, a fin de obtener una mejor resolución del producto a analizar, vale decir, detectar picos de alta intensidad para obtener mayor concentración del analito cloranfenicol. Para ello se ajustaron los voltajes del cono y la energía de colisión del equipo. Se utilizaron los valores de voltaje de cono (34 voltios) y energía de colisión (18/10 electro voltios) del estudio de referencia, así como el número de mediciones contempladas para cada pico, (dwell automático) [37].

5.2.4. Ajuste de la gradiente del UPLC-MS/MS

Se realizó la verificación de las condiciones del flujo, de la temperatura y del tiempo de corrida, a fin de optimizar las condiciones del método descrito en el estudio de referencia [37].

5.2.5. Modificación de la gradiente

La modificación de la gradiente implicó el cambio de los porcentajes de las fases móviles, a fin de obtener un menor tiempo de retención en las corridas del analito.

Primera modificación

La primera variable modificada en el proceso fue el tiempo total de corrida, reduciéndolo de 7.5 a 5 minutos con el propósito de optimizar el tiempo de retención del cloranfenicol. Asimismo, se ajustó el volumen de inyección de la

solución de trabajo, de 5 μ L a 2 μ L. Para esta etapa se utilizaron las mismas fases móviles descritas en el método de referencia. Dicho método emplea un gradiente inicial compuesto por 98% de fase móvil A (agua con 0.1% de ácido fórmico) y 2% de fase móvil B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico), con un tiempo total de corrida de 7.5 minutos y un volumen de inyección de 5 μ L, debido a que está diseñado para la detección simultánea de tres grupos farmacológicos (nitrofuranos, cloranfenicol y nitroimidazoles), comprendiendo un total de 12 analitos.

En la gradiente N°1, aplicada como punto de partida siguiendo las condiciones del estudio de referencia por UPLC-MS/MS [37], se estableció un programa cromatográfico orientado a optimizar la separación del analito de interés. Las condiciones operativas del gradiente, considerando la variación de las fases móviles, el flujo y el volumen de inyección, fueron las siguientes:

- En el tiempo inicial (0 minutos), se empleó un flujo constante de 0.4 mL/min, con una composición de 100% fase A y 0% fase B, y un volumen de inyección de 2 μ L.
- A los 2 minutos, se mantuvo el flujo en 0.4 mL/min, ajustándose la composición a 85% fase A y 15% fase B, conservando el mismo volumen de inyección (2 μ L).
- A los 4.5 minutos, se sostuvo el flujo constante mientras la composición de fases móviles se modificó a 50% fase A y 50% fase B, favoreciendo la elución de compuestos de menor polaridad.
- Finalmente, a los 5 minutos, la mezcla móvil se ajustó a 60% fase A y 40% fase B, manteniendo un flujo de 0.4 mL/min y un volumen de inyección de 2 μ L.
- Este programa de gradiente permitió alcanzar un adecuado balance entre retención y elución, mejorando la resolución cromatográfica y la sensibilidad del método para la determinación del cloranfenicol.

Segunda modificación

Se implementó una segunda reducción en el tiempo total de corrida, pasando de 5 a 3 minutos, manteniendo las fases móviles del método de referencia y ajustando el volumen de inyección de la solución de trabajo de 5 a 2 μ L.

La gradiente N° 2, derivada del método reportado para UPLC-MS/MS, fue diseñada para optimizar la separación del analito mediante una variación

controlada de las fases móviles durante el análisis. Las condiciones operativas establecidas fueron las siguientes:

- En el tiempo inicial (0 minutos), se empleó un flujo constante de 0.4 mL/min, con una composición de 100% fase A y 0% fase B, y un volumen de inyección de 2 μ L.
- A los 2 minutos, se mantuvo el flujo en 0.4 mL/min, ajustándose la mezcla móvil a 60% fase A y 40% fase B, conservándose el mismo volumen de inyección.
- A los 3 minutos, el flujo permaneció constante y la composición de fases se modificó a 50% fase A y 50% fase B.
- Este gradiente permitió una separación adecuada y una elución eficiente de los compuestos analizados, mejorando la sensibilidad y la resolución del método en un tiempo de corrida reducido.

Tercera modificación

A pesar de la reducción obtenida con la modificación anterior, se consideró necesario ajustar nuevamente el programa de gradiente con el fin de reequilibrar la fase móvil al final de la corrida y establecer un tiempo total de análisis de 4 minutos, manteniendo un volumen de inyección de 2 μ L.

La gradiente N° 3, basada en las condiciones del método de referencia para UPLC-MS/MS, se estructuró como un programa de variación progresiva de las fases móviles orientado a mejorar la resolución y la estabilidad cromatográfica. Las condiciones operativas fueron las siguientes:

- En el tiempo inicial (0 minutos), el análisis comenzó con un flujo constante de 0.4 mL/min y una composición de 58% fase A y 42% fase B, con un volumen de inyección de 2 μ L.
- A los 0.10 minutos, se mantuvo la misma composición (58% A y 42% B), conservando flujo y volumen de inyección.
- Al primer minuto, la mezcla móvil se ajustó a 35% fase A y 65% fase B, favoreciendo la elución de compuestos menos polares, sin modificar el flujo ni el volumen de inyección.
- A los 3 minutos, se retornó a la composición inicial de 58% fase A y 42% fase B, manteniendo un flujo de 0.4 mL/min.

- Finalmente, a los 4 minutos, se conservó la misma composición para reequilibrar el sistema antes de una nueva corrida.

Este perfil de gradiente permitió un control preciso de la interacción de los analitos con la fase móvil, optimizando la eficiencia cromatográfica, la reproducibilidad y la estabilidad del método.

Cuarta modificación

Se cambió la fase móvil señalada en el estudio de referencia [37] por la fase móvil del método de análisis de cloranfenicol en productos acuícolas (pescado y langostinos) por LC-MS/MS implementado en el LACCSA [38]. Debido a que las fases móviles cambiaron a Fase A: agua-acetonitrilo 95:5 y Fase B: acetonitrilo 100%, se prepararon las diluciones de las soluciones intermedia y de trabajo en solvente acetonitrilo, a partir de una solución de stock estándar de cloranfenicol en metanol, a fin de evitar la desestabilización de la columna del equipo.

5.2.6. Preparación de las curvas de calibración del estándar de cloranfenicol.

Con el fin de considerar el efecto matriz en la curva de calibración, se realizaron extracciones a muestras blanco de músculo de pollo y huevo de gallina, y se realizó una curva de calibración con 7 concentraciones diferentes para cada matriz.

Para establecer los puntos correspondientes de la curva de calibración, fue necesario convertir el valor de referencia establecido, que se expresa en $\mu\text{g}/\text{kg}$, a $\mu\text{g}/\text{L}$. Según el Reglamento de la Unión Europea 2023/411 [44], el valor de referencia para cloranfenicol es de $0,15 \mu\text{g}/\text{kg}$. Para llevar a cabo esta conversión, se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{C_o * V_e}{W} x \frac{V_f}{V_i} \quad \dots (1)$$

Donde:

- C: Concentración de cloranfenicol en la muestra fortificada (ng/g, µg/Kg o ppb)
- Co: Concentración de cloranfenicol resultante de la interpolación en la curva de calibración (µg/L)
- Ve: Volumen del extracto en mL
- Vi: Volumen tomado para evaporar con el gas nitrógeno
- Vf: Volumen del extracto seco reconstituido
- W: Peso de la muestra 2.00 ± 0.02 g.

Como resultado se obtuvo un valor de 0.15 µg/L. Con este valor se determinó los 7 puntos de la curva de calibración (0.05, 0.1, 0.15, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0 µg/L), siendo 0.15 µg/L el punto medio de la curva de calibración.

La elaboración de la curva de calibración se realizó usando la solución estándar de trabajo de cloranfenicol (10 ppb). Las alícuotas que se tomaron para cada punto de la curva de calibración se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración.

Estándares	Volumen total vial (µL)	Volumen en Stock de trabajo (µL)	Volumen del extracto Matriz (µL)	Concentración obtenida (µg/L)
Blanco	1000	0	1000	Blanco
1	1000	5	995	0,05
2	1000	10	990	0,1
3	1000	15	985	0,15
4	1000	30	970	0,3
5	1000	100	900	1
6	1000	200	800	2
7	1000	300	700	3

Para cada estándar preparado, se realizó la lectura instrumental con el fin de determinar el tiempo de retención y la señal obtenida correspondiente al cloranfenicol. Estas lecturas permitieron correlacionar la concentración conocida y la respuesta del equipo, para evaluar la linealidad y sensibilidad del método.

5.2.7. Procesamiento de la muestra sin adición del estándar y homogenización

Siguiendo el método de referencia, las muestras de músculo de pollo y huevo de gallina fueron uniformizadas independientemente con un homogeneizador modelo BLIXER 3D de alimentos y una licuadora modelo BRLY07-R00-051. Ambas se almacenaron a -20°C hasta el momento en que se realizó el análisis [36].

5.2.8. Extracción de la muestra de músculo de pollo y huevo de gallina

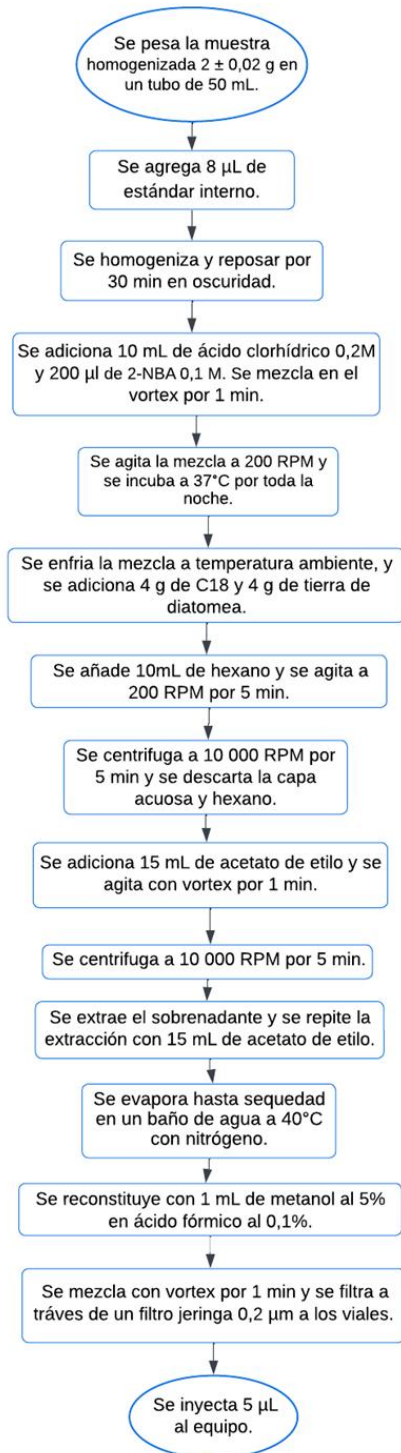
La extracción de cloranfenicol de las muestras es parte importante del desarrollo del método. Este paso implica separar al analito de interés de los posibles interferentes que se encuentran en las muestras con el fin de asegurar una identificación y cuantificación precisa. Para ello se tomó como referencia el trabajo de Zhang Z, Wu Y, Li X, Wang Y, Li H, Fu Q, Xia X quienes desarrollaron un método multiclase para la determinación de nitroimidazoles, nitrofuranos y cloranfenicol en músculo de pollo y huevo mediante SPE-dispersiva y UHPLC-MS/MS. A continuación, se detallan las principales modificaciones y los diagramas de flujo, tanto del método de referencia como del método desarrollado.

Modificaciones más relevantes:

1. Omisión del paso de derivatización: El procedimiento implica la adición de ácido clorhídrico (HCl) y 2-NBA, seguido de una incubación a 37 °C durante toda la noche. Su propósito fue optimizar la detección de nitrofuranos. De acuerdo con el método de referencia, este paso no afecta la recuperación de cloranfenicol, por lo que fue omitido [37].

2. Cambio en el orden del proceso de limpieza y extracción: Primero se realizó el procedimiento de extracción y después la limpieza. Este cambio se realizó teniendo en cuenta lo realizado en otra investigación [41].
3. Reducción del volumen del solvente de extracción acetato de etilo: El volumen total de extracción unificado según el método de referencia es de 30 mL, el cual fue modificado a 10 mL.
4. Sustitución de la sal tierra de diatomeas, utilizada para absorber la humedad por sulfato de sodio anhidro y omisión de la limpieza con hexano: Se utilizó sulfato de sodio anhidro, debido a que cumple la misma función que la tierra de diatomeas y que consiste en desecar la muestra para eliminar trazas de agua en soluciones orgánicas [39].
5. Reducción de la cantidad de sales: Se redujo la cantidad de sales utilizadas para el procedimiento de limpieza, con la finalidad de optimizar las cantidades de las sales empleadas para el desarrollo.
 - Sulfato de sodio anhidro: de 4g a 2g
 - C18: de 4g a 100 mg
6. Reducción del volumen de extracto de la muestra tomado para evaporar con el gas nitrógeno: El volumen del extracto de la muestra considerado para evaporar el gas nitrógeno según el método de referencia es de 30 mL, el cual fue modificado a 5 mL.

(X) Técnica del método de referencia



(Y) Técnica del método modificado

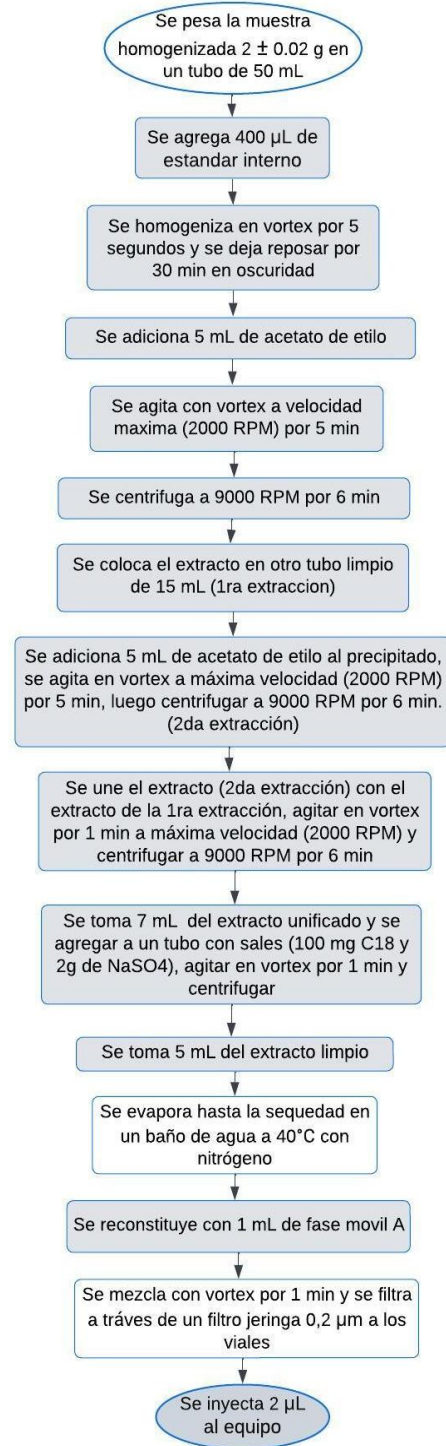


Figura 1. Diagramas de flujo del procedimiento de extracción del método de referencia y del método modificado.

5.2.8.1. Muestras fortificadas

Se añadió 30 μL de la solución de trabajo de cloranfenicol (10 $\mu\text{g/L}$) después de pesar y homogenizar la matriz de músculo de pollo y de huevo de gallina, con el objetivo de obtener una concentración de 0,15 $\mu\text{g/kg}$ en cada matriz, a fin de analizar la eficiencia del proceso de extracción mediante el cálculo del porcentaje de recuperación.

Corridas cromatográficas

Para las corridas cromatográficas se utilizaron muestras de músculo de pollo (muestra 1) y huevo de gallina (muestra 2).

- Blanco de muestra: muestra 1 y muestra 2 sin el analito cloranfenicol.
- Muestras fortificadas: muestras 1 y 2 se elaboraron por duplicado con una fortificación de 30 μL (0.15 $\mu\text{g/kg}$) con la solución estándar de trabajo con cloranfenicol (10 ppb).

Se realizaron las corridas cromatográficas para ambas muestras (músculo de pollo y huevo de gallina) en la secuencia respectiva y se determinó el analito cloranfenicol. La secuencia es la siguiente:

1. Se inyecta la curva de calibración con 7 puntos, usando un volumen de inyección de 2 μL para todos los puntos.
2. Se inyecta el blanco de muestra.
3. Se inyecta la muestra de matriz fortificada, con una solución de trabajo de cloranfenicol (10ppb) (adición 1)
4. Se inyecta la muestra de matriz fortificada por duplicado (adición 2)

Nota: La secuencia se realizó por separado para ambas matrices.

5.2.9. Condiciones espectrométricas y cromatográficas

Se tomaron en cuenta las condiciones espectrométricas y cromatográficas del método optimizado.

5.2.10. Determinación de cloranfenicol

Se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_0 = m(A) \pm b \quad \dots (2)$$

Donde:

- C_0 : Concentración del estándar en la curva de calibración ($\mu\text{g/L}$).
- m : Pendiente de la recta obtenida en la curva de calibración lineal
- A : Área del pico cromatográfico
- b : Intercepción en el eje y.

Después de haber aplicado la fórmula anterior, se emplea la siguiente ecuación:

$$C = \frac{C_0 \times V_e}{W} * \frac{V_f}{V_i} \quad \dots (3)$$

Donde:

- C : Concentración de cloranfenicol en la muestra fortificada ($\mu\text{g/Kg}$)
- C_0 : Concentración de cloranfenicol resultante de la interpolación en la curva de calibración ($\mu\text{g/L}$)
- V_e : Volumen de extracción en mL (10 mL)
- V_i : Volumen inicial antes de la concentración con nitrógeno (5 mL)
- V_f : Volumen final después de la concentración y reconstitución del extracto seco (1 mL)
- W : Peso de la muestra (2.0000g)

Los resultados fueron comparados con los valores de referencia que se aplica para el antibiótico cloranfenicol según la norma establecida [14, 15].

5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

La validación del método es parte importante del estudio, ya que asegura que el método analítico desarrollado sea adecuado para el objetivo previsto y nos permite obtener resultados confiables. Para la validación del método propuesto se consideraron los siguientes parámetros: veracidad, precisión, selectividad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, robustez, rango de trabajo, sensibilidad, límite de decisión e incertidumbre, conforme a lo establecido en la Directriz para la validación de métodos de ensayo (DA-ACR-20D) emitida por el Instituto Nacional de Calidad (INACAL), que es aplicable a laboratorios acreditados bajo la norma ISO 17025. Para determinar el cumplimiento de cada uno de los parámetros de validación propuestos, se consideraron los criterios establecidos por entidades regulatorias internacionales como la Comisión Europea, el Instituto de Salud Pública de Chile, la FDA y la Eurachem [40,42,47,49]. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa Minitab.

5.3.1 Veracidad

Según la ISO 5725-1, la veracidad se refiere a la cercanía entre los resultados de la prueba con el valor verdadero [43]. Se determinó mediante el porcentaje de recuperación. Para ello se fortificaron 30 muestras libres de antibiótico a tres niveles de concentración diferentes para cloranfenicol. Se analizó en el equipo y se calculó la concentración en función de la recuperación fortificada. La recuperación se expresa en porcentaje mediante la fórmula:

$$\%R = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} * 100 \quad \dots (4)$$

Donde:

- \bar{x} = Concentración experimental promedio detectada del analito
- x_{ref} = Concentración teórica del analito que es la fortificación en la matriz

Para la determinación de los tres niveles de concentración se aplicó la directriz establecida por la Unión Europea en la norma 2021/808, que establece, mediante el uso de muestras enriquecidas, niveles equivalentes a 0.5, 1.0 y 1.5 veces el valor de referencia para efectos de intervención (VRI). Conforme al Reglamento (UE) 2023/411, el VRI para cloranfenicol en la matriz analizada es 0.15 µg/kg. En función de ello, las concentraciones seleccionadas para los ensayos de recuperación fueron 0.075, 0.15 y 0.225 µg/kg [44].

La efectividad del método se evaluó mediante la prueba t de Student para una muestra, que permite determinar si la media observada difiere significativamente de un valor teórico. En este estudio, la prueba se empleó para contrastar el promedio de los porcentajes de recuperación frente a un valor hipotético de referencia que debe ubicarse dentro del rango de aceptación establecido por la regulación (UE) 2021/808, comprendido entre 50 y 120 por ciento [40]. Para el análisis estadístico se consideraron ambos límites del rango, utilizando 50 por ciento como límite inferior y 120 por ciento como límite superior. El estadístico t se calculó según la expresión:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{ds / \sqrt{n}} \quad \dots (5)$$

Donde:

- \bar{x} : media muestral
- μ_0 : Media hipotética bajo la hipótesis nula
- ds: desviación estándar muestral
- n: tamaño de la muestra

Para evaluar si el método de recuperación cumple con los criterios establecidos, se plantearon dos hipótesis estadísticas: la hipótesis nula y la hipótesis alterna.

- Hipótesis nula (H_0): La hipótesis nula plantea que la variable independiente no tiene un efecto significativo sobre la variable dependiente. Matemáticamente, esto se expresa como que la media poblacional (μ) es igual a 50 y la desviación estándar (σ) es igual a 120. Bajo esta hipótesis, se asume que

cualquier diferencia observada en la recuperación puede deberse al azar o a variaciones naturales del proceso experimental, y no a un efecto real del método evaluado.

- Hipótesis alterna (H_1): La hipótesis alterna postula que la variable independiente sí tiene un efecto significativo sobre la variable dependiente. En términos estadísticos, se establece que la media poblacional (μ) es mayor a 50 y menor a 120 ($\mu > 50$ y $\mu < 120$). De confirmarse esta hipótesis, se interpretaría que el método de recuperación influye de manera real y significativa en los resultados obtenidos, indicando un desempeño adecuado dentro del rango esperado.

Estas hipótesis son esenciales para el análisis estadístico del método de recuperación, ya que permiten determinar si los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos, apoyando la validez del método empleado.

Se plantearon dos hipótesis, la hipótesis nula (H_0) establece que la media del porcentaje de recuperación es igual al valor planeado 50 o 120% según corresponda. Esto quiere decir que $H_0: \mu=50$ y 120 . Lo que representa el valor de referencia mínimo aceptable para considerar que el método de recuperación cumple con los criterios establecidos. Por otro lado, la hipótesis alterna (H_1) plantea que la media del porcentaje de recuperación es mayor al planeado, sea 50 y menor a 120%, lo que quiere decir $H_1: \mu > 50$ y $\mu < 120$. Para la interpretación de los resultados, si el valor de p es mayor a 0.05 significa que el personal no reporta resultados veraces; por el contrario, si el valor de p es menor a 0.05 significa que el personal reporta resultados veraces. Para afirmar que el método cumple con este criterio de aceptación se debe rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna.

5.3.2 Precisión

La precisión intermedia estima la variación de resultados tomando en cuenta diferentes condiciones dentro de un mismo laboratorio [42].

Se determinó la precisión intermedia tomando los resultados de dos analistas en diferentes días. Para ello se realizaron los análisis tomando tres concentraciones a tres niveles diferentes. La precisión se expresa en términos de desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

Se utilizaron 5 fórmulas matemáticas las cuales están representadas como T1, T2, T3, T4 y T5, que permiten descomponer la variabilidad en estos dos componentes: repetibilidad, esta variación se da cuando el mismo analista realiza el análisis en el mismo día y condiciones; y reproducibilidad, variación que tiene lugar cuando intervienen diferentes analistas y/o condiciones. Estos dos componentes juntos son conocidos también como precisión intermedia [44]. Las fórmulas matemáticas utilizadas para su cálculo son 5 sumatorias, utilizadas para organizar datos y calcular varianzas:

$$T1 = \sum n_l \bar{Y}_l \quad \dots (6)$$

$$T2 = \sum n_l \bar{Y}_l^2 \quad \dots (7)$$

$$T3 = \sum n_l \quad \dots (8)$$

$$T4 = \sum n_l^2 \quad \dots (9)$$

$$T5 = \sum (n_l - 1) S_l^2 \quad \dots (10)$$

A partir de ellas, se puede calcular la varianza de repetibilidad (S_r^2), varianza entre analistas (S_l^2) y la varianza de reproducibilidad (S_R^2) [44]. A continuación, se exponen las fórmulas aplicables:

$$S_r^2 = \frac{T5}{T3 - p} \quad \dots (11)$$

$$S_l^2 = \left[\frac{T2 T3 - T1^2}{T3(p - 1)} - S_r^2 \right] \left[\frac{T3(p - 1)}{T3^2 - T4} \right] \quad \dots (12)$$

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad \dots (13)$$

Para el análisis correspondiente se debe hallar el RSD de repetibilidad (RSD_r) y el RSD de reproducibilidad (RSD_R), que posteriormente se utilizan para calcular los RSD de Horwitz correspondientes: $RSD_{Horwitzr}$ y $RSD_{HorwitzR}$, que se aplican a los tres niveles de concentraciones diferentes.

El criterio de aceptación establecido por la FDA indica que un método se considera preciso cuando el RSD experimental ($RSD_{Exp.}$) es menor que el RSD de Horwitz para repetibilidad ($RSD_{Horwitzr}$), donde r corresponde al límite de repetibilidad. Para el límite de reproducibilidad (R), el criterio exige que el RSD experimental ($RSD_{Exp.}$) sea inferior al RSD de Horwitz para reproducibilidad ($RSD_{HorwitzR}$). En otras palabras, la variabilidad experimental debe ser menor a la variabilidad máxima aceptable, según el criterio de Horwitz. Ello asegura que el método sea confiable y consistente [47].

5.3.3 Selectividad

La selectividad es la capacidad del método para identificar y cuantificar solo al analito de interés (cloranfenicol), en presencia de otros componentes que puede poseer la muestra (interferentes), ya sea de músculo pollo o huevo de gallina. Este método selectivo asegura que la señal que emite el analito de interés corresponda solo al cloranfenicol y no a otros interferentes que pudieran estar presentes en la matriz.

Para evaluar la selectividad, se prepararon dos tipos de muestras: matrices fortificadas a las que se le añadieron una concentración conocida de cloranfenicol (0.150 $\mu\text{g}/\text{kg}$); y muestras en blanco, libres del antibiótico. Este procedimiento implicó el análisis de 20 muestras fortificadas, con el fin de determinar tanto, la eficacia de recuperación del método como la capacidad de distinguir el analito en presencia de la matriz. La comparación entre los resultados de las muestras fortificadas y la muestra blanco permitió evaluar si el método genera una señal

cuantificable exclusiva del cloranfenicol, sin que otros componentes de la matriz interfieran en el resultado.

Se verificó que las recuperaciones se distribuyeran de manera gaussiana, y a continuación se utilizó la prueba t de Student para comparar la media de recuperación obtenida con el valor teórico ideal al 100%. Para aceptar la hipótesis nula, se estableció un umbral de significancia de $p > 0.05$ y se hizo el contraste estadístico para evaluar si las recuperaciones obtenidas diferían significativamente del valor teórico ideal de 100% [40].

Además, se evaluó la forma de los picos cromatográficos mediante una comparación directa entre las muestras fortificadas y una matriz blanco. Con ello, se confirmó la ausencia de interferencias químicas que pudieran distorsionar la forma gaussiana característica de los picos, un indicador crítico que nos permite asegurar que el método no sufre de solapamiento de señales. Estos resultados permiten validar la selectividad del método y demostrar su capacidad para distinguir el analito de otros componentes de la matriz en condiciones realistas de trabajo.

5.3.4 Linealidad

La linealidad indica la capacidad que tiene un método para producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito. Se midió utilizando los siguientes criterios: coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de correlación (r) y el análisis de residuos [42]. Asimismo, se realizaron pruebas estadísticas para comprobar la significancia estadística de la relación entre las variables.

Se prepararon tres curvas de calibración para la evaluación de la matriz utilizando 7 puntos (0.05, 0.1, 0.15, 0.3, 1, 2 y 3 $\mu\text{g/L}$). Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2). El criterio de aceptación, según el Instituto de Salud Pública de Chile indica un coeficiente de correlación $r \geq 0.99$. Asimismo, el criterio de aceptación en el análisis de residuos indica una distribución aleatoria de residuales en torno a cero.

Para establecer la significancia de la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración se realizó también el análisis de varianza (ANOVA). Sin embargo, antes de realizar esta prueba es necesario verificar los supuestos estadísticos requeridos: normalidad de los residuos y homocedasticidad. Los resultados de estas pruebas se encuentran en el Anexo 8. Asimismo, se realizó un análisis de inferencia estadística de los parámetros de la ecuación de la regresión lineal (pendiente, intercepto y coeficiente de correlación). Por ello, se realizaron pruebas de hipótesis con el fin de evaluar su significancia estadística. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- Pendiente (m):
 $H_0: m = 0.$
 $H_A: m \neq 0.$
- Intercepto (b):
 $H_0: b = 0.$
 $H_A: b \neq 0.$
- Coeficiente de correlación (r):
 $H_0: r = 0.$
 $H_A: r \neq 0.$

5.3.5 Límite de cuantificación (LOQ) y límite de detección (LOD)

Los límites de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD) se evalúan mediante pruebas de 7 corridas de un estándar de concentración conocida en 3 días diferentes.

El LOD se entiende como el valor más bajo de concentración del analito al que puede ser detectado y no necesariamente cuantificado con exactitud en condiciones experimentales del método. Este se determina estadísticamente y representa la menor cantidad de cloranfenicol que produce una señal distinguible del ruido de base, que posee un nivel de confianza del 99%.

$$\text{LOD} = \text{DS} * \text{Valor de } t \quad \dots (14)$$

Donde:

- DS: desviación estándar de los resultados
- Valor de t: Valor de t al 99% de probabilidad para 7 réplicas, equivale a 3.143

El LOQ es la concentración más baja del analito a la que puede ser determinado cuantitativamente tanto con precisión como exactitud, bajo condiciones del método. Este siempre es mayor que el LOD y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{LOQ} = \text{DS} * \text{Factor} \quad \dots (15)$$

Donde:

- DS: desviación estándar de los resultados
- factor: 10

El límite de cuantificación (LOQ) puede determinarse experimentalmente mediante al menos 10 réplicas de muestras con baja concentración del analito. Se calcula la desviación estándar de los resultados y se multiplica por un factor generalmente igual a 10, asegurando que la señal sea suficientemente superior a la variabilidad del método.

Para el LOQ se espera que corresponda al primer punto de la curva de calibración del método, mientras que para el LOD se espera que la concentración del analito sea menor al primer punto de la curva de calibración.

Para corroborar la selectividad del método, se aplicó la normativa del Instituto de Salud Pública Chile [42], por lo que se realizó una verificación del límite de detección y del límite de cuantificación. El cálculo de estos parámetros se efectuó mediante la determinación del promedio, la desviación estándar (SD) y el porcentaje de recuperación de los resultados obtenidos en ambas matrices, las cuales fueron fortificadas con una concentración de 0.05 µg/Kg, denominada Spiked teórico. Este valor representa la concentración teórica añadida a las muestras en blanco para evaluar la capacidad del método para detectar y cuantificar el analito cloranfenicol en niveles bajos.

Para validar el límite de detección se verificó que la concentración fortificada cumpliera con el siguiente criterio:

$$LOD_{calculado} < Spiked_{teorico} < 10 * LOD_{calculado}$$

5.3.6 Robustez

Eficacia del método está referida a la capacidad de mantener la estabilidad frente a cambios premeditados de los parámetros, lo que proporciona fiabilidad al método. Para la robustez se consideran las siguientes variaciones: proceso de pesado, proceso de extracción, condiciones cromatográficas entre otros, que se determinan mediante el método de Youden y Steiner [42]. Se examinaron un total de 7 factores, realizando 8 pruebas por duplicado para cada factor, a fin de verificar si esos cambios tienen un impacto significativo o no. Estos factores se encuentran en la Tabla 2. La combinación de factores utilizados para los 8 ensayos se encuentra en la Tabla 3.

Con el fin de representar estas combinaciones de manera clara, se utilizó una codificación alfabética, donde cada letra representa un factor específico. Las letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F, G) indican que el factor se mantuvo en la condición nominal, mientras que las minúsculas señalan una variación en el nivel del factor (a, b, c, d, e, f, g).

Tabla 2. Factores utilizados para el método de Youden y Steiner

Factores	Medida representativa de cada factor	Condición nominal		Variación	
A/a	Gradiente	A	Método optimizado	a	Método de referencia
B/b	Fases móviles	B	Agua: acetonitrilo (95:5) + acetonitrilo 100%	b	Agua 0.1% ácido fórmico + acetonitrilo 0.1% ácido fórmico
C/c	Volumen de extracción	C	30 mL	c	10 mL
D/d	Agitación en vortex después de la extracción	D	5 min	d	1 min
E/e	Limpieza	E	Sulfato de sodio + C18	e	Tierra diatomea + C18
F/f	Agitación en vortex después de la limpieza	F	5 min	f	1 min
G/g	Reconstitución	G	Fase móvil A (agua/acetonitrilo 95:5)	g	Solución de metanol al 5% con 0,1% ácido fórmico

Tabla 3. Prueba de robustez de Youden y Steiner

Factores	Número de ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	A	a	a
B/b	B	B	B	B	B	B	B	b
C/c	C	c	C	C	C	C	C	c
D/d	D	D	D	D	d	D	D	D
E/e	E	e	E	E	e	E	E	E
F/f	F	f	F	F	F	F	F	F
G/g	G	g	G	G	g	G	G	g
Resultados	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Cada uno de los ocho ensayos se realizó por triplicado, obteniéndose tres valores de concentración de cloranfenicol por ensayo. El promedio de dichas concentraciones se tomó como resultado y se designó con las letras S, T, U, V, W, X, Y y Z.

Para evaluar el efecto de cada factor de manera individual, se calcularon los promedios de los resultados obtenidos bajo la condición nominal (valor más alto) y la variación (valor más bajo). La diferencia de respuesta se obtiene restando ambas medias. Esto se describe en la siguiente fórmula:

$$D_{X/x} = \frac{\sum X}{4} - \frac{\sum x}{4} \quad \dots (16)$$

Donde:

- $D_{X/x}$: Diferencia de respuesta por cada factor
- X: Factor (condición nominal)
- x: Factor (variación)

Según el Instituto de Salud Pública de Chile, el método se considera robusto si la diferencia de respuesta es menor a la $\sqrt{2}$ x desviación estándar de la precisión del método.

5.3.7 Rango de trabajo

Se considera el rango de trabajo del método desde el punto mínimo hasta el punto máximo de concentración del analito cloranfenicol. Según la guía Eurachem, el punto mínimo corresponde al LOQ y el punto máximo corresponde al mayor nivel de concentración evaluado, es decir, el último punto de la curva de calibración [49].

Para demostrar la efectividad del parámetro se evaluó el rango de trabajo desde el límite de cuantificación de 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta el último punto de la curva de calibración de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se tomaron en consideración 10 datos por los tres niveles estimados (0.075, 0.150 y 3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) A partir de ello, se construyó una gráfica de línea ajustada, y se aplicó el criterio de decisión estipulado por la norma:

$$R^2 > 0.991$$
$$r > 0.995$$

5.3.8 Sensibilidad

De acuerdo con el Instituto de Salud Pública de Chile, la sensibilidad analítica se define como la capacidad de un método para discriminar pequeñas variaciones en la concentración de un analito. En una regresión lineal, la sensibilidad se expresa a través de la pendiente de la curva de calibración construida a partir de diferentes concentraciones del analito [42].

Para determinar la sensibilidad en ambas matrices se realizó la curva de calibración con 7 puntos, los cuales son: 0.05, 0.1, 0.15, 0.3, 1.0, 2.0, 3.0 µg/kg.

Para el cálculo de la sensibilidad se utilizó la siguiente ecuación:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \dots (17)$$

Donde:

- m: pendiente
- x_1, x_2 : Valores de la concentración del analito que corresponden al eje de la abscisa
- y_1, y_2 : Valores del área del pico cromatográfico que corresponden al eje de la ordenada

Esta característica de funcionamiento permite observar la capacidad de respuesta del instrumento frente a una determinada cantidad del analito [41].

5.3.9 Límite de decisión ($CC\alpha$)

De acuerdo con lo estipulado por la Comisión Europea, para aquellas sustancias sin un límite permitido establecido, el $CC\alpha$ se define como la concentración más baja del analito que puede ser detectada mediante un método analítico con una certeza estadística de $(1 - \alpha)$, siendo α la probabilidad de error tipo I, es decir, la probabilidad de obtener un resultado falso positivo. Asimismo, el valor α para el cloranfenicol es equivalente o inferior a 1%. El criterio de aceptación del $CC\alpha$ será aquella concentración del analito menor al LOQ del método [40].

Para determinar el límite de decisión se fortificaron muestras de matriz en blanco con concentraciones desde el VRI y superiores (0.15 µg/kg, 0.225 µg/kg y 1.0 µg/kg). Este procedimiento se realizó durante 3 días consecutivos.

El cálculo del $CC\alpha$ se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$CC\alpha = X + 2,33 * DS \quad \dots (18)$$

Donde:

- X: Concentración correspondiente al valor del intercepto (ordenada en el origen) de la curva de calibración obtenida de cada día experimental
- DS: Desviación estándar de los puntos del intercepto obtenidos en los diferentes días de análisis

5.3.10 Incertidumbre

Es un parámetro asociado a la medición, que caracteriza razonablemente la dispersión de los valores atribuibles al mensurando, en función de la información utilizada. Según el documento de la Comisión Europea, la incertidumbre está considerada en el cálculo del valor de $CC\alpha$ [40], con un intervalo de confianza correspondiente al 99%.

5.4. DETERMINACIÓN DE CLORANFENICOL EN LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE MERCADOS DE ABASTO.

Una vez validado el método, se procedió al análisis de 28 muestras recolectadas en los mercados de abasto de distritos de Lima Sur (Chorrillos, Villa María del Triunfo, Villa el Salvador y San Juan de Miraflores). El tipo de muestreo aplicado fue no probabilístico intencional y las muestras fueron recolectadas siguiendo las directrices del Codex Alimentarius, considerando una cantidad de muestra aproximada de 0.5 kg para cada matriz [38]. El procesamiento de las muestras y la extracción del analito se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 5.2.8 y 5.2.9. Se elaboraron dos curvas de calibración independientes, correspondientes a cada una de las matrices evaluadas, que se emplearon para la cuantificación del analito en las muestras, conforme a lo detallado en el apartado 5.2.11.

VI. RESULTADOS

6.1. DESARROLLO DEL MÉTODO

6.1.1. Metodología optimizada

La metodología optimizada resultante, con las modificaciones de las fases móviles, del tiempo de corrida total y del volumen de inyección que brindaron las condiciones óptimas, se resume en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas de optimización del método.

Temperatura de la columna	40°C			
Volumen de inyección	2 µL			
Fase móvil A	Agua: Acetonitrilo (95:5)			
Fase móvil B	Acetonitrilo 100%			
Gradiente	Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B	Flujo (mL/min)
	Inicial	58%	42%	0.4
	0.1	58%	42%	0.4
	1	35%	65%	0.4
	3	58%	42%	0.4
	4	58%	42%	0.4

Tabla 5. Transiciones y condiciones óptimas utilizadas para el análisis de residuos de cloranfenicol.

Analito	Ión precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Dwell time (segundos)	Voltaje de cono (voltios)	Energía de colisión (electronvoltio)
Cloranfenicol	321	151.8	Automático	34	18
Cloranfenicol	321	257	Automático	34	10

6.1.2. Cromatografía del método optimizado

Este cromatograma (Figura 2) se obtuvo optimizando el cambio de gradiente, ajustes de las fases móviles, tiempo de corrida total y volumen de inyección, de acuerdo a las tablas arriba señaladas.

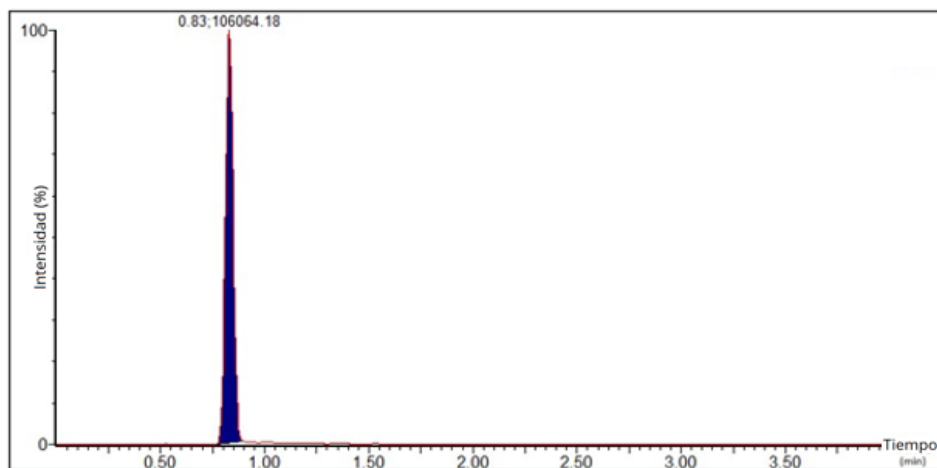


Figura 2. Cromatograma de cloranfenicol con el cuarto cambio por UPLC-MS/MS

El cromatograma de cloranfenicol muestra una buena resolución del pico, en un tiempo de detección del analito menor a un minuto (0.84 minutos), que se observa en el Anexo 3.

6.1.3. Curva de calibración del cloranfenicol

Luego de establecer las condiciones óptimas de la metodología se obtuvo una curva de calibración para cada matriz, con un coeficiente de determinación de $r^2= 0.9946$ para la matriz huevo de gallina y $r^2= 0.9992$ para la matriz músculo de pollo, que indica que existe una excelente correlación entre la concentración de cloranfenicol y el área de la concentración detectada.

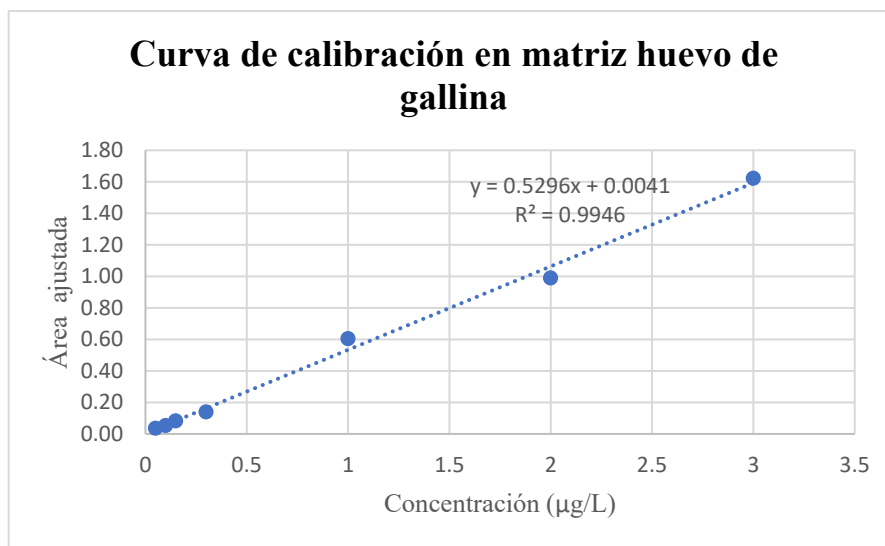


Figura 3. Regresión lineal de la curva de calibración para la matriz huevo de gallina

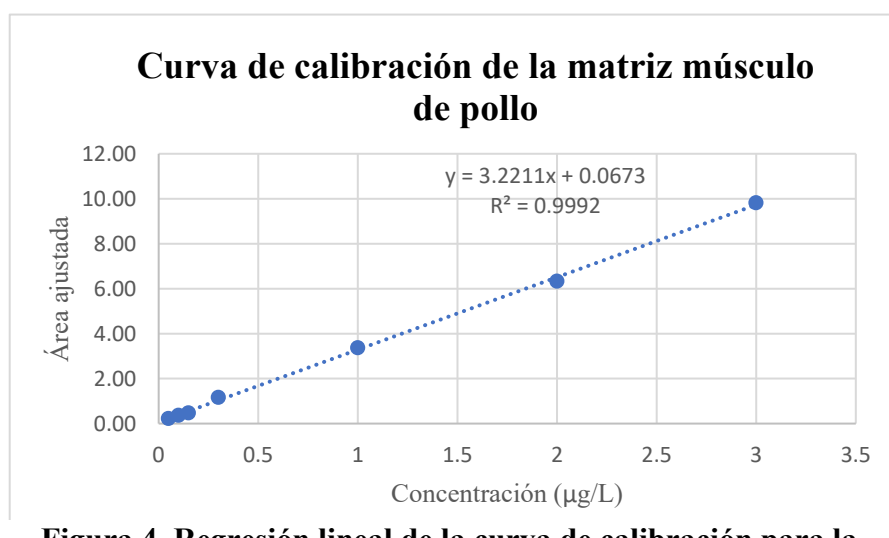


Figura 4. Regresión lineal de la curva de calibración para la matriz músculo de pollo

6.1.3.1. Curvas de calibración en ambas matrices

Se construyeron 3 curvas de calibración para las matrices de músculo de pollo y huevo de gallina. Para cada punto de la curva se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Curvas de calibración en matriz músculo de pollo y huevo de gallina

Curvas de calibración en matriz músculo de pollo y huevo de gallina								
Matriz	Curva	STD-1 0.05 ppb	STD-2 0.1 ppb	STD-3 0.15 ppb	STD-4 0.3 ppb	STD-5 1 ppb	STD-6 2 ppb	STD-7 3 ppb
Músculo de pollo	1	0.0530	0.1010	0.1390	0.3290	1.0040	1.9820	3.0080
	2	0.0512	0.0965	0.1247	0.3481	1.0375	1.9300	3.0307
	3	0.0530	0.0930	0.1230	0.3480	1.0410	1.9220	3.0350
	Promedio	0.0524	0.0968	0.1289	0.3417	1.0275	1.9447	3.0246
	Desviación	0.0010	0.0040	0.0087	0.0109	0.0204	0.0325	0.0145
	CV	1.9832	4.1415	6.8177	3.2187	1.9879	1.6752	0.4796
Huevo de gallina	1	0.0470	0.0950	0.1350	0.1900	1.255	1.902	2.992
	2	0.0560	0.0730	0.1270	0.2930	1.2210	1.7460	3.0990
	3	0.0790	0.1110	0.1810	0.2840	0.9370	1.9290	3.0670
	Promedio	0.0607	0.0930	0.1477	0.2557	1.1377	1.8590	3.0527
	Desviación	0.0165	0.0190	0.0291	0.0570	0.1746	0.0987	0.0549
	CV	27.2019	20.5148	19.7358	22.31294	15.3482	5.3140	1.7991

Los resultados presentados en la Tabla 6 se interpretan conforme al Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión Europea, adoptado el 22 de marzo de 2021 [40], que establece un límite máximo del coeficiente de variación (CV) del 30% para concentraciones inferiores a 10 µg/kg (ppb). En este estudio, las concentraciones evaluadas, que varían entre 0.05 y 3.0 ppb, se encuentran dentro de este rango, y todos los valores de CV obtenidos cumplen con el criterio regulatorio establecido [40].

6.1.4. Porcentaje de recuperación del método de extracción optimizado

Estos resultados, que se muestran en las subsecciones siguientes, se obtuvieron a partir de las curvas de calibración construidas para cada matriz.

6.1.4.1. Porcentaje de recuperación en ambas matrices

Los resultados de recuperación del método de referencia en matriz pollo fueron de 96% para una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [40], (Anexo 4) en comparación con el método optimizado que resultó de 88.13% para una concentración de 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 92% para una concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otro lado, el porcentaje de recuperación en la matriz huevo de gallina para el método de referencia fue de 90.9% para una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que el método optimizado propuesto obtuvo una recuperación de 110.43% para una concentración de 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 99,08% de recuperación para una concentración de 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 7. Resultados de los porcentajes de recuperación en ambas matrices

Matriz	Analista	Concentración teórica ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Recuperación (%)	Promedio de réplicas
Músculo de pollo	1	0.075	88,13	3
	2	0,15	92,00	4
Huevo de gallina	1	0,075	110,43	4
	2	0,15	99,08	8

6.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

6.2.1. Veracidad

En la Tabla 8 se presenta el porcentaje de recuperación obtenidos a partir de un total de 30 ensayos realizados para tres niveles de concentración, correspondiente a la matriz de músculo de pollo, se evidencia que los resultados obtenidos para el criterio de aceptación en los tres niveles analizados son satisfactorios, expresados en porcentaje de recuperación, dado que se sitúan dentro del intervalo establecido de 50 a 120 % [40].

Tabla 8. Porcentaje de recuperación para matriz de músculo de pollo.

N° ensayo	Porcentaje de recuperación					
	Concentración añadida 0.075 µg/kg		Concentración añadida 0.15 µg/kg		Concentración añadida 0.225 µg/kg	
	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)
1	0.076	101.33	0.147	98.00	0.220	97.78
2	0.077	102.67	0.143	95.33	0.236	104.89
3	0.080	106.67	0.148	98.67	0.243	108.00
4	0.075	100.00	0.148	98.67	0.234	104.00
5	0.076	101.33	0.148	98.67	0.249	110.67
6	0.078	104.00	0.145	96.67	0.237	105.33
7	0.081	108.00	0.149	99.33	0.231	102.67
8	0.077	102.67	0.151	100.67	0.230	102.22
9	0.079	105.33	0.145	96.67	0.237	105.33
10	0.082	109.33	0.150	100.00	0.250	111.11
11	0.077	102.67	0.144	96.00	0.238	105.78
12	0.080	106.67	0.150	100.00	0.253	112.44
13	0.079	105.33	0.147	98.00	0.242	107.56
14	0.078	104.00	0.152	101.33	0.249	110.67
15	0.079	105.33	0.151	100.67	0.217	96.44
16	0.080	106.67	0.143	95.33	0.251	111.56
17	0.079	105.33	0.145	96.67	0.235	104.44
18	0.078	104.00	0.147	98.00	0.222	98.67
19	0.083	110.67	0.147	98.00	0.236	104.89
20	0.080	106.67	0.149	99.33	0.236	104.89
21	0.078	104.00	0.142	94.67	0.233	103.56

22	0.081	108.00	0.146	97.33	0.256	113.78
23	0.077	102.67	0.149	99.33	0.252	112.00
24	0.081	108.00	0.149	99.33	0.228	101.33
25	0.082	109.33	0.148	98.67	0.219	97.33
26	0.082	109.33	0.146	97.33	0.226	100.44
27	0.078	104.00	0.144	96.00	0.233	103.56
28	0.078	104.00	0.143	95.33	0.244	108.44
29	0.077	102.67	0.147	98.00	0.237	105.33
30	0.081	108.00	0.149	99.33	0.258	114.67
Promedio	-	105.29	-	98.04	-	105.66
Rango de aceptación 50-120%	Cumple con el criterio de aceptación		Cumple con el criterio de aceptación		Cumple con el criterio de aceptación	

En la Tabla 9 se presenta el porcentaje de recuperación obtenido a partir de un total de 30 ensayos realizados para tres niveles de concentración, correspondiente a la matriz de huevo de gallina, se evidencia que los resultados obtenidos para el criterio de aceptación en los tres niveles analizados son satisfactorios, expresados en porcentaje de recuperación, dado que se sitúan dentro del intervalo establecido de 50 a 120 % [40].

Tabla 9. Porcentaje de recuperación para matriz de huevo de gallina.

N° ensayo	Porcentaje de recuperación					
	Concentración añadida 0.075 µg/kg		Concentración añadida 0.15 µg/kg		Concentración añadida 0.225 µg/kg	
	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Concentración obtenida (µg/kg)	Porcentaje de recuperación (%)
1	0.084	112.00	0.149	99.33	0.224	99.56
2	0.078	104.00	0.150	100.00	0.225	100.00

3	0.081	108.00	0.152	101.33	0.226	100.44
4	0.080	106.67	0.151	100.67	0.224	99.56
5	0.084	112.00	0.152	101.33	0.226	100.44
6	0.082	109.33	0.148	98.67	0.223	99.11
7	0.079	105.33	0.150	100.00	0.225	100.00
8	0.079	105.33	0.148	98.67	0.222	98.67
9	0.077	102.67	0.150	100.00	0.227	100.89
10	0.081	108.00	0.147	98.00	0.228	101.33
11	0.080	106.67	0.153	102.00	0.223	99.11
12	0.085	113.33	0.149	99.33	0.224	99.56
13	0.086	114.67	0.148	98.67	0.223	99.11
14	0.083	110.67	0.152	101.33	0.227	100.89
15	0.084	112.00	0.149	99.33	0.223	99.11
16	0.082	109.33	0.151	100.67	0.226	100.44
17	0.079	105.33	0.148	98.67	0.223	99.11
18	0.084	112.00	0.150	100.00	0.224	99.56
19	0.082	109.33	0.153	102.00	0.226	100.44
20	0.081	108.00	0.151	100.67	0.228	101.33
21	0.078	104.00	0.150	100.00	0.227	100.89
22	0.084	112.00	0.147	98.00	0.226	100.44
23	0.084	112.00	0.149	99.33	0.224	99.56
24	0.079	105.33	0.150	100.00	0.225	100.00
25	0.085	113.33	0.150	100.00	0.228	101.33
26	0.080	106.67	0.149	99.33	0.226	100.44
27	0.080	106.67	0.147	98.00	0.226	100.44
28	0.085	113.33	0.148	98.67	0.225	100.00
29	0.083	110.67	0.153	102.00	0.226	100.44

30	0.085	113.33	0.148	98.67	0.225	100.00
Promedio	-	109.07	-	99.82	-	100.07
Rango de aceptación 50-120%	Cumple con el criterio de aceptación		Cumple con el criterio de aceptación		Cumple con el criterio de aceptación	

6.2.2. Precisión

Para evaluar la precisión del método analítico aplicado a la matriz pollo y huevo de gallina, se realizaron 15 ensayos con dos analistas diferentes, utilizando tres concentraciones añadidas: 0.075, 0.15 y 0.225 µg/kg. Los resultados de este parámetro se expresan en las Tablas 10 y 11 en términos de promedio, varianza y desviación estándar.

Tabla 10. Precisión intermedia para la matriz de pollo.

N° ensayo	Estimadores de precisión					
	Concentración añadida 0.075 µg/kg		Concentración añadida 0.15 µg/kg		Concentración añadida 0.225 µg/kg	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0.076	0.080	0.147	0.143	0.220	0.251
2	0.077	0.079	0.143	0.145	0.236	0.235
3	0.080	0.078	0.148	0.147	0.243	0.222
4	0.075	0.083	0.148	0.147	0.234	0.236
5	0.076	0.080	0.148	0.149	0.249	0.236
6	0.078	0.078	0.145	0.142	0.237	0.233
7	0.081	0.081	0.149	0.146	0.231	0.256
8	0.077	0.077	0.151	0.149	0.230	0.252
9	0.079	0.081	0.145	0.149	0.237	0.228
10	0.082	0.082	0.150	0.148	0.250	0.219
11	0.077	0.082	0.144	0.146	0.238	0.226

12	0.080	0.078	0.150	0.144	0.253	0.233
13	0.079	0.078	0.147	0.143	0.242	0.244
14	0.078	0.077	0.152	0.147	0.249	0.237
15	0.079	0.081	0.151	0.149	0.217	0.258
Promedio	0.078	0.080	0.148	0.146	0.238	0.238
Varianzas	0.00000392	0.00000381	0.0000074	0.0000058	0.000111	0.000147
Desviación estándar	0.00198	0.00195	0.0027	0.0024	0.0105	0.0121

Tabla 11. Precisión intermedia para la matriz de huevo de gallina

N° ensayo	Estimadores de precisión para la matriz huevo de gallina					
	Concentración añadida 0.075 µg/kg		Concentración añadida 0.15 µg/kg		Concentración añadida 0.225 µg/kg	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
1	0.084	0.082	0.149	0.151	0.224	0.226
2	0.078	0.079	0.150	0.148	0.225	0.223
3	0.081	0.084	0.152	0.150	0.226	0.224
4	0.080	0.082	0.151	0.153	0.224	0.226
5	0.084	0.081	0.152	0.151	0.226	0.228
6	0.082	0.078	0.148	0.150	0.223	0.227
7	0.079	0.084	0.150	0.147	0.225	0.226
8	0.079	0.084	0.148	0.149	0.222	0.224
9	0.077	0.079	0.150	0.150	0.227	0.225
10	0.081	0.085	0.147	0.150	0.228	0.228
11	0.080	0.080	0.153	0.149	0.223	0.226
12	0.085	0.080	0.149	0.147	0.224	0.226
13	0.086	0.085	0.148	0.148	0.223	0.225

14	0.083	0.083	0.152	0.153	0.227	0.226
15	0.084	0.085	0.149	0.148	0.223	0.225
Promedio	0.082	0.082	0.150	0.150	0.225	0.226
Varianzas	0.00000741	0.00000592	0.0000033	0.0000035	0.000003	0.000002
Desviación estándar	0.00272	0.00243	0.0018	0.0019	0.0018	0.0014

La precisión del método analítico se evaluó calculando el porcentaje de desviación estándar relativa (RSD), aplicando como criterio de aceptación el RSD de Horwitz, de acuerdo con las directrices establecidas por la FDA [47]. En la Tabla 12 se muestran los resultados de la precisión intermedia obtenidos para ambas matrices. El método se considera aceptable, ya que el RSD experimental de reproducibilidad es inferior al valor del RSD de Horwitz para reproducibilidad, lo que indica que la variabilidad observada se encuentra dentro de los límites recomendados y respalda la robustez del método validado.

Tabla 12. Precisión intermedia en ambas matrices.

Porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD Horwitz)						
Concentración añadida	0.075 µg/kg		0.15 µg/kg		0.225 µg/kg	
Matriz	Pollo	Huevo	Pollo	Huevo	Pollo	Huevo
Límite de repetibilidad (r)	0.0055	0.0072	0.0072	0.0052	0.032	0.005
Límite de reproducibilidad (R)	0.0066	0.0074	0.0076	0.0050	0.033	0.005
RSD_{Expr}	2.49	3.16	1.75	1.23	4.77	0.72
$RSD_{Horwitzr}$	44.8	44.8	40.3	40.3	38.0	38.0
Criterio de aceptación	$RSD_{Expr} < RSD_{Horwitzr}$					

RSD_{ExpR}	2.71	3.23	1.85	1.20	4.93	0.76
$RSD_{HorwitzR}$	66.8	66.8	60.2	60.2	56.6	56.6
Criterio de aceptación	$RSD_{ExpR} < RSD_{HorwitzR}$					
Conclusión	El método es preciso		El método es preciso		El método es preciso	

6.2.3. Selectividad

La selectividad del método analítico se evaluó mediante la pendiente de la curva de calibración para cada componente, confirmando que el método es selectivo para cloranfenicol en ambas matrices. La recuperación porcentual obtenida en las matrices fortificadas (músculo de pollo y huevo de gallina) mostró valores cercanos al 100%, con rangos de recuperación entre 96.6% y 102.7%, lo que indica una alta precisión y exactitud del método [40], expresados en la Tabla 13:

Tabla 13. Porcentaje de recuperación en ambas matrices.

Matriz	Músculo de pollo			Huevo de gallina		
Concentración añadida	0.150 µg/kg			0.225 µg/kg		
Nº ensayo	Analista	Cloranfenicol (µg/Kg)	% Recuperación	Analista	Cloranfenicol (µg/Kg)	% Recuperación
1	1	0.147	100.0	1	0.224	99.6
2	1	0.143	97.3	1	0.225	100.0
3	1	0.148	100.7	1	0.226	100.4
4	1	0.148	100.7	1	0.224	99.6
5	1	0.148	100.7	1	0.226	100.4
6	1	0.145	98.6	1	0.223	99.1
7	1	0.149	101.4	1	0.225	100.0
8	2	0.151	102.7	2	0.222	98.7
9	2	0.145	98.6	2	0.227	100.9

10	2	0.150	102.0	2	0.228	101.3
11	2	0.143	97.3	2	0.226	100.4
12	2	0.145	98.6	2	0.223	99.1
13	2	0.147	100.0	2	0.224	99.6
14	2	0.147	100.0	2	0.226	100.4
15	1	0.149	101.4	1	0.228	101.3
16	1	0.142	96.6	1	0.227	100.9
17	1	0.146	99.3	1	0.226	100.4
18	1	0.149	101.4	1	0.224	99.6
19	1	0.149	101.4	1	0.225	100.0
20	1	0.148	100.7	1	0.228	101.3

6.2.3.1. Prueba de normalidad

Se realizó una prueba de normalidad sobre los porcentajes de recuperación, evidenciando una distribución adecuada para el análisis estadístico posterior, mostradas en las Figuras 5 y 6.

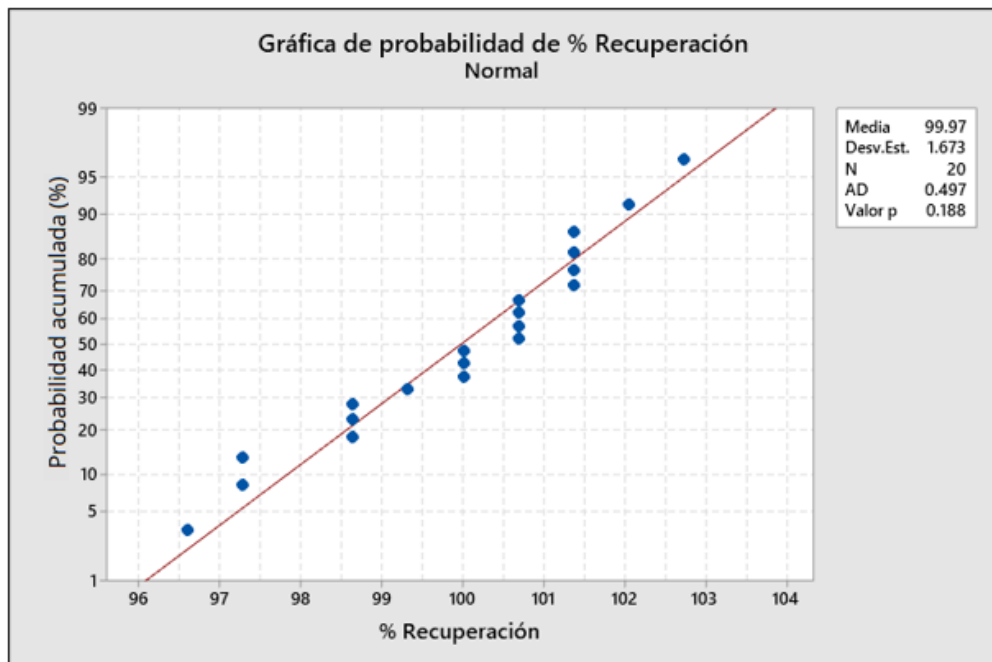


Figura 5. Prueba de normalidad en matriz músculo de pollo

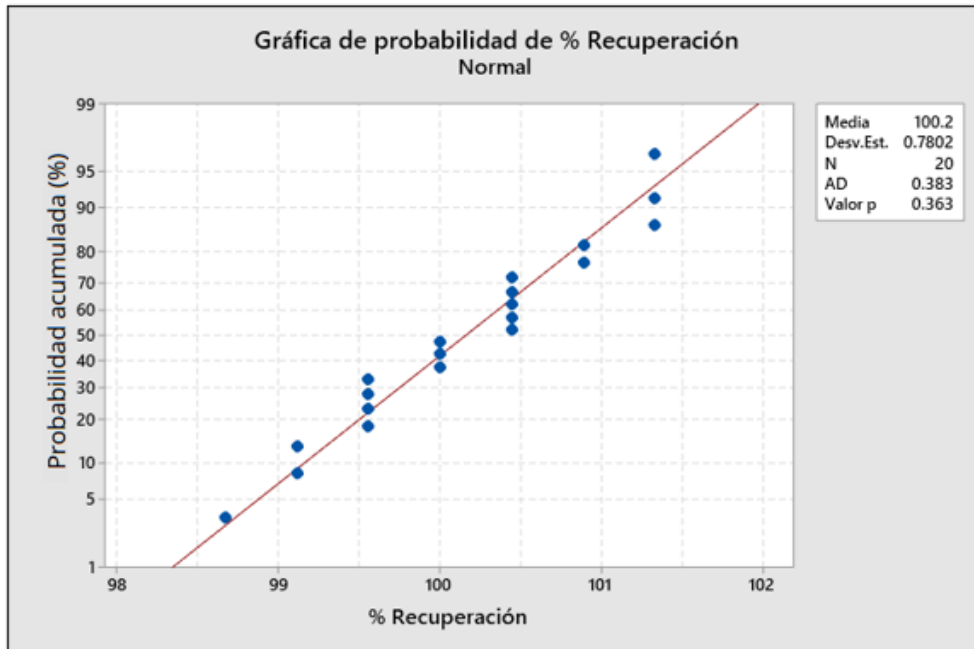


Figura 6. Prueba de normalidad en matriz huevo de gallina

6.2.3.2. Prueba t de Student

Se confirmó la validez del método para la cuantificación precisa del cloranfenicol a través de la prueba t de Student aplicada a 20 réplicas fortificadas con 0.150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La prueba mostró que la media de recuperación no difiere significativamente del 100% (Hipótesis nula: $\mu = 100\%$), con intervalos de confianza al 95% que incluyen el valor esperado (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de estadísticas descriptivas de la prueba t de Student

Matriz	Número de muestras	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
Músculo de pollo	20	99.966	1.673	0.374	(99.183; 100.749)
Huevo de gallina	20	100.156	0.780	0.174	(99.790; 100.521)

6.2.3.3. Cromatogramas

Los cromatogramas de las muestras fortificadas con una concentración conocida de cloranfenicol (0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$), presentados en la Figura 7 (matriz de músculo de pollo) y la Figura 8 (matriz de huevo de gallina), evidenciaron una detección y

cuantificación claras y precisas del analito. Asimismo, los cromatogramas correspondientes a las muestras sin fortificar, utilizadas como blancos y representados en la Figura 9 para ambas matrices, no mostraron interferencias significativas. Estos resultados confirman la selectividad y especificidad del método analítico empleado, garantizando su idoneidad para la determinación de cloranfenicol en las matrices estudiadas.

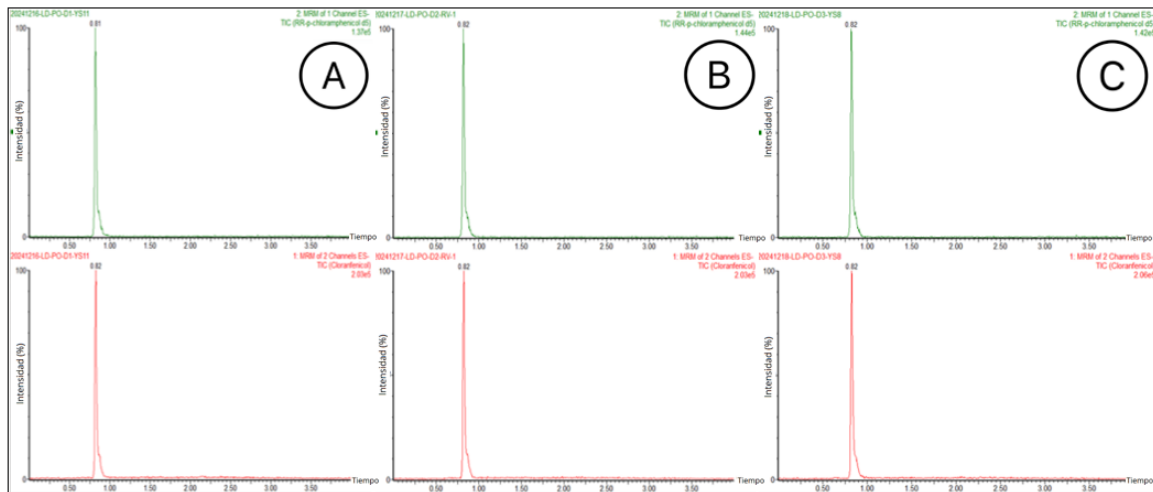


Figura 7. Cromatogramas de muestras de músculo de pollo. A) fortificada con 0.038 μg CFC/Kg. B y C) fortificada con 0.037 μg CFC/Kg.

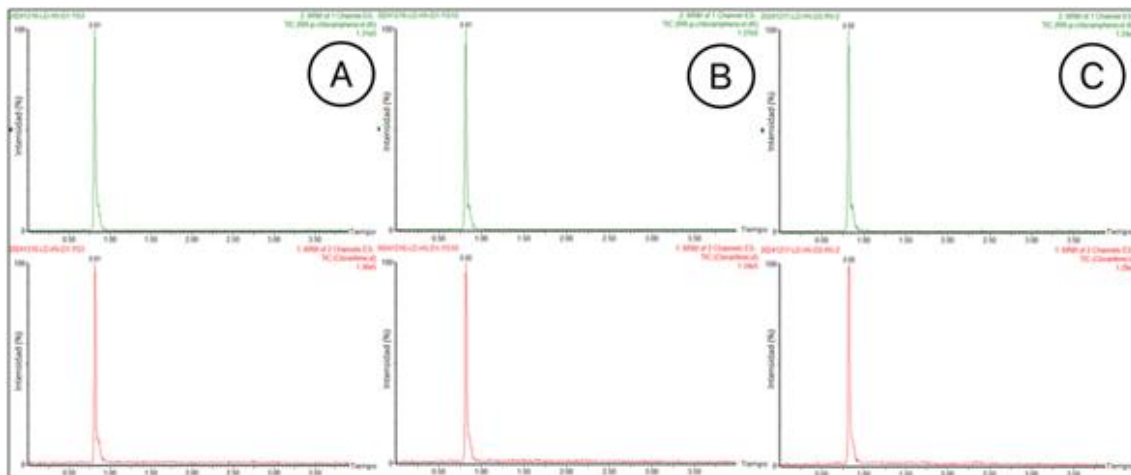


Figura 8. Cromatogramas de muestras de huevo de gallina. A) fortificada con 0.038 μg CFC/Kg. B y C) fortificada con 0.037 μg CFC/Kg.

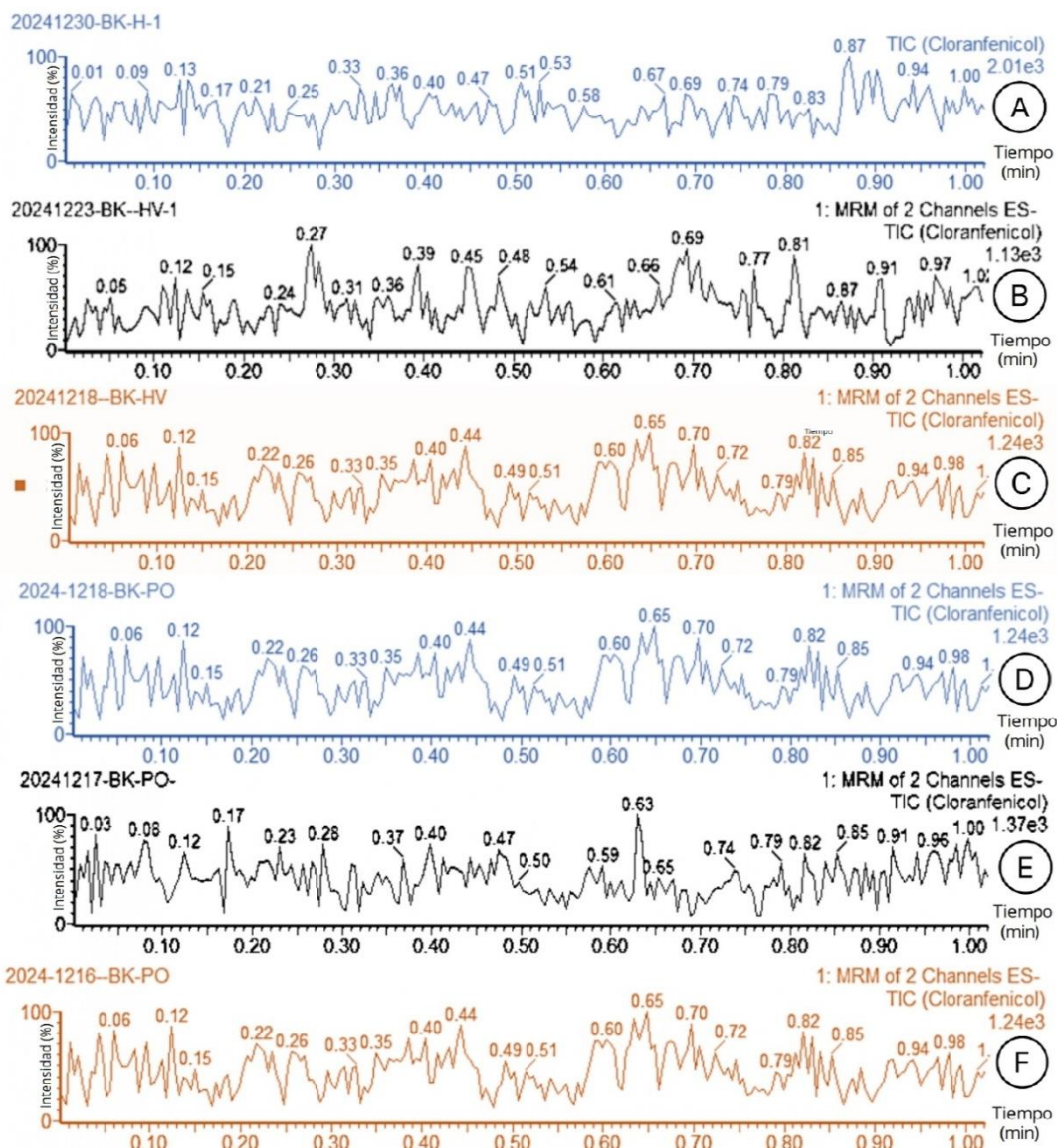


Figura 9. Cromatograma del blanco en ambas matrices. A) Matriz de músculo de pollo, día 1. B) Matriz de músculo de pollo, día 2. C) Matriz de músculo de pollo, día 3. D) Matriz de huevo de gallina, día 1. E) Matriz de huevo de gallina, día 2. F) Matriz de huevo de gallina, día 3.

6.2.4. Linealidad y sensibilidad analítica

6.2.4.1. Matriz de músculo de pollo

Se realizaron tres curvas de calibración. Para cada curva de calibración se realizó la regresión lineal correspondiente, obteniéndose como resultado 3 ecuaciones por cada curva. Las tres ecuaciones representan tres análisis independientes de la relación concentración-respuesta. En la Tabla 15 se

describen los datos obtenidos de las áreas de las tres curvas de calibración, los residuales y los resultados de la regresión lineal.

Tabla 15. Datos experimentales para la curva de calibración en matriz de músculo de pollo y parámetros de la regresión lineal.

Concentración	Área	Área Ajustada	Residuales
0.05	0.225447	0.224413	0.001034
	0.2254427	0.2253269	0.000116
	0.2191236	0.2181405	0.000983
0.10	0.378739	0.378487	0.000251
	0.3710733	0.3711766	-0.000103
	0.3476894	0.3482702	-0.000581
0.15	0.500294	0.500463	-0.000169
	0.4619876	0.4619705	0.000017
	0.4455226	0.4458675	-0.000345
0.30	1.109394	1.110340	-0.000946
	1.1812650	1.1812381	0.000027
	1.1774432	1.1778473	-0.000404
1.00	3.277187	3.277009	0.000178
	3.4007130	3.4008581	-0.000145
	3.4325898	3.4323450	0.000245
2.00	6.415175	6.416272	-0.001096
	6.2745010	6.2743871	0.000114
	6.2987933	6.2984525	0.000341
3.00	9.710356	9.709608	0.000748
	9.8182199	9.8182452	-0.000025
	9.9190736	9.9193124	-0.000239
Curva	Pendiente	Intercepto	R
1	3.203467	0.067672	0.999917
2	3.247339	0.058257	0.999237
3	3.212434	0.075877	0.999357

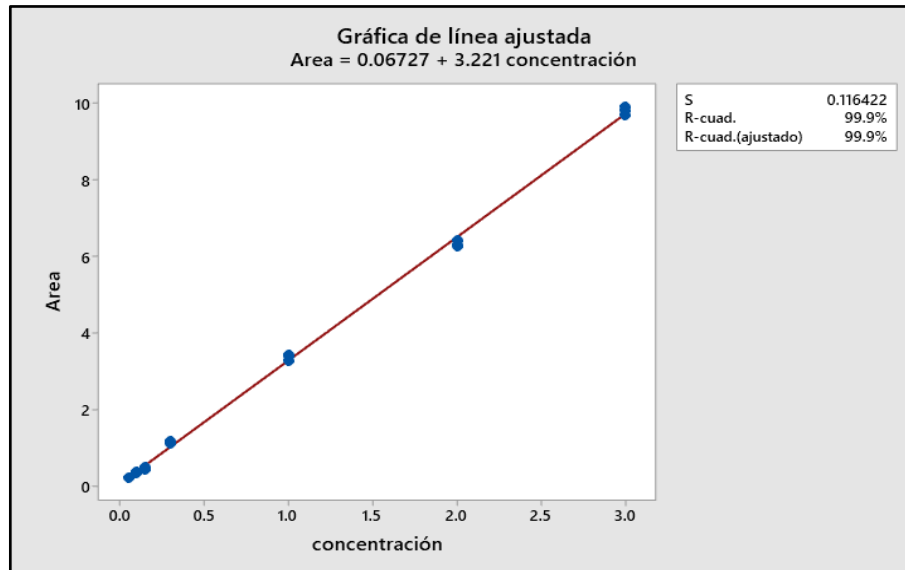


Figura 10. Gráfica de línea ajustada del promedio de las tres curvas de calibración.

Ecuación:

$$\text{Área} = 3.221 \times \text{Concentración} + 0.067267 \quad \dots (19)$$

Donde la pendiente del promedio de las 3 curvas de calibración equivale a 3.221.

Coefficiente de correlación:

$$R = 0.99948$$

Coefficiente de determinación:

$$R^2 = 0.99895$$

Ambos coeficientes, mayores a 0.99, representan una fuerte correlación entre área y concentración.

Análisis de los residuales:

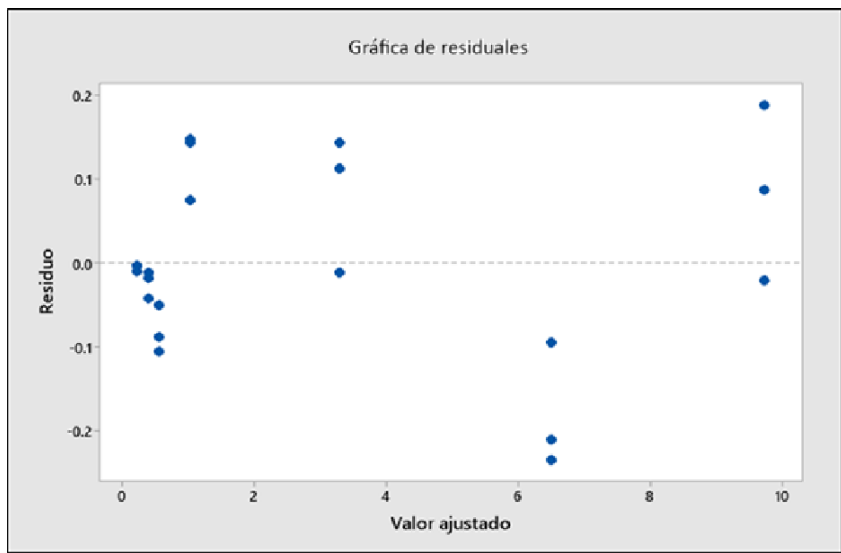


Figura 11. Residuales de la matriz músculo de pollo

La figura de residuales muestra una distribución aleatoria, pues no presenta tendencias de ningún tipo (Figura 11).

La Tabla 16 muestra los resultados del análisis de varianza de la regresión, considerando los supuestos del análisis de varianza de la regresión descritos en el Anexo 8.

Tabla 16. Análisis de varianza de la regresión.

	GL	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Nivel de Aceptación	P
Regresión	1	245.9627	245.9626757	18130.48	8.8309E-30	Existe relación entre X e Y	0.000
Error	19	0.2578	0.013566247				
Total	20	246.2204					

GL: Grados de libertad

Como el valor F experimental es mayor que el F crítico, la regresión es significativa. Asimismo, el valor de p es < 0.05 , por lo que se rechaza la hipótesis nula. Por otro lado, el intercepto de la regresión contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: $[-0.00385537524494152, 0.138392643]$

A continuación, se describen los resultados de la inferencia de los parámetros de la ecuación de regresión en la Tabla 17:

Tabla 17. Resultados de la inferencia de los parámetros.

Ítem	Valor de P	Criterio de aceptación
Pendiente	0.000	$p < 0.05$
Intercepto	0.062	$p > 0.05$ o $p \leq 0.05$
Regresión	0.000	$p < 0.05$

6.2.4.2. Matriz de huevo de gallina

Se elaboraron tres curvas de calibración de manera independiente. En la Tabla 18 se presentan los datos de las áreas de las tres curvas, los residuales y los resultados de la regresión correspondiente a cada una de ellas.

Tabla 18. Datos experimentales para la curva de calibración en matriz de huevo de gallina y parámetros de la regresión lineal.

Concentración	Área	Área Ajustada	Residuales
0.05	0.032579	0.032596	0.002023
0.05	0.037247	0.0373163	0.0066909
0.05	0.036729	0.0368899	0.0061736
0.10	0.057217	0.493931	0.000183
0.10	0.046556	0.3944986	-0.0104778
0.10	0.054400	0.0544578	-0.0026332
0.15	0.077803	0.077555	-0.005708
0.15	0.074897	0.0749423	-0.0086146
0.15	0.092694	0.0928877	0.0091831
0.30	0.105602	0.105654	-0.057343
0.30	0.162810	0.1629130	-0.0001352
0.30	0.149647	0.1494346	-0.0829790
1.00	0.649711	0.649753	0.096076
1.00	0.654881	0.6547011	0.0821246
1.00	0.507854	0.5079310	-0.0257804
2.00	0.980354	0.980299	-0.082838
2.00	0.932665	0.9329217	-0.1305263

2.00	1.052784	1.0525380	-0.0104076
3.00	1.537292	1.537170	-0.055457
3.00	1.649691	1.6499359	0.0569424
3.00	1.677448	1.6772989	0.0846990
Curva	Pendiente	Intercepto	R
1	0.5109	0.0086	0.9999
2	0.5299	0.0077	0.9999
3	0.5491	-0.0066	0.9999

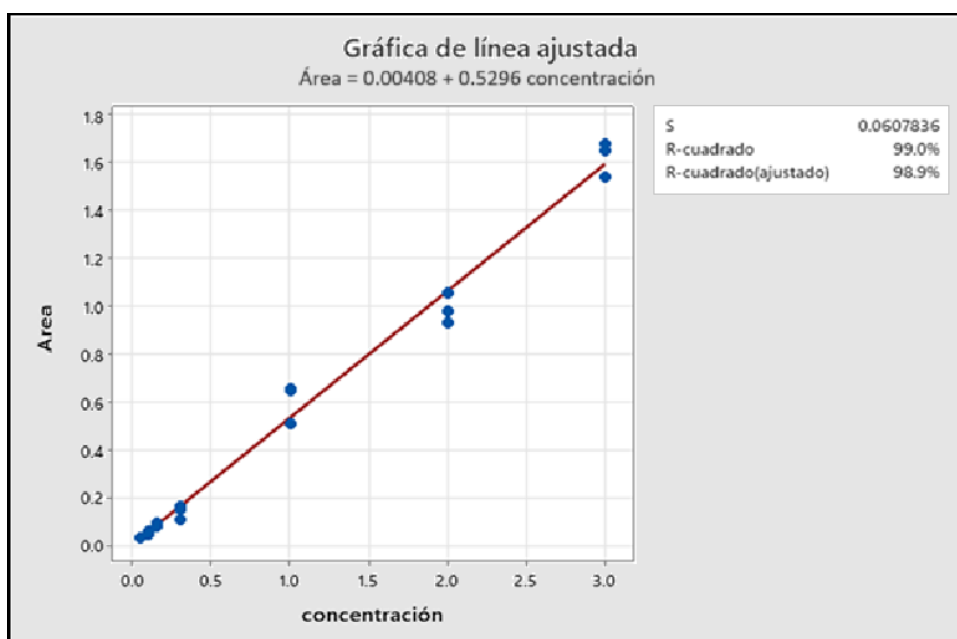


Figura 12. Gráfica de línea ajustada del promedio de las tres curvas de calibración.

Ecuación de la regresión lineal:

$$\hat{\text{Área}} = 0.5296 \times \text{Concentración} + 0.004077838,$$

Donde la pendiente del promedio de las 3 curvas de calibración equivale a 0.52956.

Coefficiente de correlación:

$$R = 0.994762$$

Como se obtiene un $r > 0.99$; esto indica que existe una correlación positiva.

Coefficiente de determinación:

$$R^2 = 0.98955$$

Análisis de los residuales:

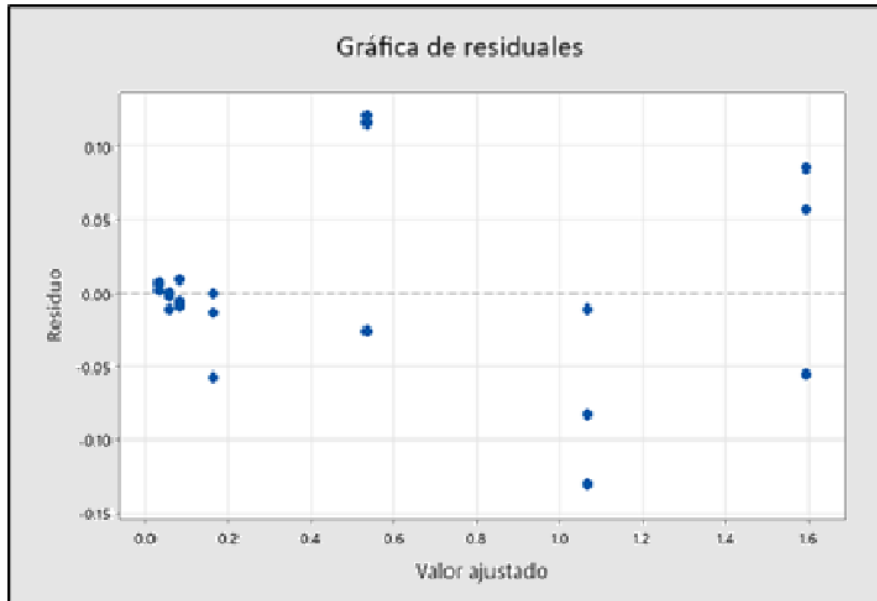


Figura 13. Residuales de la matriz huevo de gallina.

La gráfica de residuales muestra que su distribución es aleatoria, por no presentar tendencias de ningún tipo (Figura 13).

Dado el tratamiento estadístico de los datos mostrados en el Anexo 8, se describen los siguientes resultados.

Tabla 19. Análisis de varianza de la regresión

	GL	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F	Nivel de Aceptación	P
Regresión	1	6.6480	6.6480	1799.3653	2.75E-20	Existe relación entre X e Y	0.000
Error	19	0.0702	0.0136				
Total	20	6.7182					

GL: Grados de libertad

Según los siguientes resultados el valor F experimental es mayor que el F crítico. Por lo tanto, se concluye que la regresión es significativa. Asimismo, el valor de p es < 0.05 , entonces se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la variable independiente tiene un efecto significativo sobre la variable dependiente. Asimismo, el intercepto de la regresión

contiene al valor cero pues pertenece al intervalo de: [-0.0330391261224566, 0.0411948011719749].

En la siguiente tabla se describen los resultados de la inferencia de los parámetros de regresión lineal.

Tabla 20. Resultados de la inferencia de los parámetros.

Ítem	Valor de P	Criterio de aceptación
Pendiente	0.000	$p < 0.05$
Intercepto	0.821	$p > 0.05$ o $p \leq 0.05$
Regresión	0.000	$p < 0.05$

6.2.5. Límite de detección y cuantificación

En las Tablas 21 y 22 se muestra el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de recuperación a partir de la adición de blancos fortificados con el Spiked teórico de 0.05 $\mu\text{g/Kg}$ para ambas matrices. Se evaluaron en 7 réplicas en 3 días diferentes y con asignación aleatoria de los analistas.

Tabla 21. Límite de detección (LOD) en matriz de músculo de pollo.

Ítem	Día 1		Día 2		Día 3	
	Cloranfenicol ($\mu\text{g/Kg}$)	Analista	Cloranfenicol ($\mu\text{g/Kg}$)	Analista	Cloranfenicol ($\mu\text{g/Kg}$)	Analista
LD – 1	0.042	1	0.037	2	0.045	1
LD – 2	0.041	1	0.036	2	0.035	1
LD – 3	0.038	1	0.055	2	0.054	1
LD – 4	0.037	1	0.037	2	0.039	1
LD – 5	0.043	1	0.049	2	0.055	1
LD – 6	0.056	1	0.039	2	0.038	1
LD – 7	0.036	1	0.041	2	0.035	1
Promedio	0.042		0.042		0.043	
Desviación estándar	0.00677		0.00723		0.00854	
Spiked _{teórico} ($\mu\text{g/Kg}$)	0.05		0.05		0.05	
% Recuperación	83.7		84.0		86.0	

Tabla 22. Límite de detección (LOD) en matriz de huevo de gallina.

Ítem	Día 1		Día 2		Día 3	
	Cloranfenicol (µg/Kg)	Analista	Cloranfenicol (µg/Kg)	Analista	Cloranfenicol (µg/Kg)	Analista
LD – 1	0.036	1	0.045	2	0.052	1
LD – 2	0.040	1	0.053	2	0.054	1
LD – 3	0.050	1	0.035	2	0.039	1
LD – 4	0.056	1	0.039	2	0.047	1
LD – 5	0.047	1	0.054	2	0.038	1
LD – 6	0.053	1	0.051	2	0.049	1
LD – 7	0.037	1	0.035	2	0.044	1
Promedio	0.046		0.045		0.046	
Desviación estándar	0.00798		0.00832		0.00615	
Spiked _{teorico} (µg/Kg)	0.05		0.05		0.05	
% Recuperación	91.1		89.1		92.3	

6.2.5.1. LOD y LOQ para matriz músculo de pollo

El límite de detección fue igual a 0.024 µg/Kg y el límite de cuantificación fue igual a 0.075 µg/Kg, lo que significa que en lo que respecta a la matriz músculo de pollo, el LOD y LOQ cumplen con el criterio de aceptación de la FDA [47].

Los valores obtenidos para el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método analítico para la determinación del cloranfenicol (CFC) en muestras de músculo de pollo. Para una concentración de CFC de 0.05 microgramos por kilogramo (µg/Kg), se calculó una desviación estándar (DS) de 0.00752 µg/Kg.

Con base en estos datos, el límite de detección del método fue determinado como 0.024 µg/Kg, valor que indica la menor concentración del analito que puede ser detectada. Por su parte, el límite de cuantificación fue establecido

en 0.075 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, que representa la concentración mínima a partir de la cual el analito puede ser cuantificado con un nivel de certeza adecuado.

Estos valores se encuentran dentro de los criterios de aceptación especificados para el método, donde el LOD debe ser menor o igual a 0.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y el LOQ menor o igual a 0.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, cumpliendo con los requisitos establecidos.

6.2.5.2. LOD y LOQ para matriz de huevo de gallina

Los valores de LOD y LOQ obtenidos para matriz de huevo de gallina cumplen con los estándares establecidos por la FDA, siguiendo el mismo criterio de aceptación del Instituto de Salud Pública de Chile [42, 47].

Los resultados obtenidos para el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) del método analítico utilizado para la detección del cloranfenicol (CFC) en muestras de matriz de huevo de gallina. Para una concentración estándar de 0.05 microgramos por kilogramo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de CFC, la desviación estándar (DS) calculada fue de 0.00748 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

El límite de detección del método, definido como la concentración mínima detectable del analito, se estableció en 0.02 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, evidenciando una alta sensibilidad del método para identificar incluso pequeñas cantidades de cloranfenicol en la matriz estudiada. Por otro lado, el límite de cuantificación, que determina la menor concentración a partir de la cual el analito puede ser cuantificado con exactitud y precisión, fue de 0.075 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Estos parámetros cumplen con los criterios de aceptación estipulados para el método, donde el LOD debe ser igual o inferior a 0.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y el LOQ igual o inferior a 0.4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ [47].

6.2.6. Robustez

Los resultados de robustez del método se presentan en las Tablas 23, 24, 25 y 26 correspondientes a las dos matrices analizadas. En ellas, se muestran los resultados de ocho pruebas realizadas con diferentes combinaciones de factores que podrían influir en el desempeño del método. Cada combinación fue evaluada por duplicado.

6.2.6.1. Robustez en matriz de pollo

A continuación, se muestran los resultados para la matriz de pollo.

Tabla 23. Robustez por cada ensayo en músculo de pollo.

Robustez								
FACTOR	Ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gradiente	A	A	A	A	a	a	A	A
Fases móviles	B	B	b	B	B	B	B	B
Volumen de extracción	C	c	C	C	C	c	C	C
Agitación en vortex después de la extracción	D	D	d	D	d	d	D	D
Limpieza	E	e	E	E	e	E	E	E
Agitación en vortex después de la limpieza	F	f	f	F	F	f	F	F
Reconstitución	G	g	G	G	g	G	G	G
Respuesta Cloranfenicol ($\mu\text{g CFC/Kg}$)	0.151	0.166	0.148	0.169	0.126	0.155	0.131	0.146
Promedio								0.149
Desviación estándar (s)								0.0152
$s * \sqrt{2}$								0.0215

Asimismo, en la Tabla 24 se presentan los resultados por cada factor evaluado para la matriz pollo, así como las diferencias observadas entre las condiciones nominales (representadas con letras mayúsculas) y sus respectivas variaciones (letras minúsculas).

Tabla 24. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada factor.

Condición nominal	Promedio	Variación	Promedio	Diferencia de respuesta	Valor	Diferencia de respuesta $s * \sqrt{2}$
A	0.158	A	0.139	A-a	0.019	Cumple con el criterio de aceptación
B	0.149	B	0.148	B-b	0.001	Cumple con el criterio de aceptación
C	0.139	C	0.159	C-c	0.020	Cumple con el criterio de aceptación
D	0.148	D	0.149	D-d	0.001	Cumple con el criterio de aceptación
E	0.150	E	0.148	E-e	0.002	Cumple con el criterio de aceptación
F	0.148	F	0.150	F-f	0.002	Cumple con el criterio de aceptación
G	0.151	G	0.146	G-g	0.005	Cumple con el criterio de aceptación

Para cada factor evaluado, la diferencia entre la condición nominal y su respectiva variación fue menor al valor de 0.0273, correspondiente al criterio de aceptación establecido ($s * \sqrt{2}$). Esto demuestra que ninguna de las modificaciones introducidas afectó significativamente la respuesta del método por lo que cuenta con la robustez necesaria para ser considerado adecuado.

6.2.6.2. Robustez en matriz de huevo de gallina

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los 8 ensayos realizados para la matriz huevo de gallina.

Tabla 25. Robustez por cada ensayo en matriz de huevo de gallina.

Robustez								
Factor	Ensayo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gradiente	A	A	A	A	a	a	a	A
Fases móviles	B	B	b	B	B	B	b	B
Volumen de extracción	C	c	C	C	C	c	C	C
Agitación en vortex después de la extracción	D	D	d	D	d	d	D	D

Limpieza	E	e	E	E	e	E	e	E
Agitación en vortex después de la limpieza	F	f	f	F	F	f	f	F
Reconstitución	G	g	g	G	g	G	G	G
Respuesta Cloranfenicol ($\mu\text{g CFC/Kg}$)	0.109	0.154	0.167	0.146	0.111	0.134	0.143	0.176
							Promedio	0.143
							Desviación estándar (s)	0.02407
							$s * \sqrt{2}$	0.03403

En la Tabla 26 se presentan los resultados de los promedios correspondientes a cada factor evaluado para la matriz huevo de gallina, así como las diferencias observadas entre las condiciones nominales (representadas con letras mayúsculas) y sus respectivas variaciones (letras minúsculas).

Tabla 26. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada factor.

Condición nominal	Promedio	Variación	Promedio	Diferencia de respuesta	Valor	Diferencia de respuesta $< s * \sqrt{2}$
A	0.144	a	0.141	A-a	0.003	Cumple con el criterio de aceptación
B	0.127	b	0.158	B-b	0.031	Cumple con el criterio de aceptación
C	0.132	c	0.153	C-c	0.020	Cumple con el criterio de aceptación
D	0.145	d	0.139	D-d	0.006	Cumple con el criterio de aceptación
E	0.146	e	0.138	E-e	0.008	Cumple con el criterio de aceptación
F	0.135	f	0.150	F-f	0.014	Cumple con el criterio de aceptación
G	0.133	g	0.152	G-g	0.019	Cumple con el criterio de aceptación

Para cada factor evaluado, la diferencia entre la condición nominal y su respectiva variación fue menor al valor de 0.03403, correspondiente al criterio de aceptación establecido ($s*\sqrt{2}$). Por lo que se demuestra que para la matriz huevo de gallina, ninguna de las modificaciones introducidas afectó significativamente la respuesta

del método por lo que cuenta con la robustez necesaria para ser considerado adecuado.

6.2.7. Rango de trabajo

Se realizaron 10 determinaciones de cada uno de los niveles seleccionados (0.075, 0.150 y 3.000 µg/kg), con el fin de registrar la concentración experimental y el porcentaje de recuperación de cada replica. Tanto en la Tabla 27 y 28 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para todos los niveles evaluados, los que se encuentran dentro del rango aceptable (90.1 % a 112 %), evidenciándose una excelente exactitud y precisión en todo el rango de trabajo validado. En conjunto, estos resultados demuestran que el método es confiable y adecuado para la cuantificación de cloranfenicol en las matrices analizadas.

Tabla 27. Niveles para determinación del rango de trabajo en matriz de músculo de pollo.

Concentración teórica (µg/kg)	0.075		0.150		3.000	
	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)
1	0.076	101.33	0.147	98.00	3.109	103.63
2	0.077	102.67	0.143	95.33	3.128	104.26
3	0.080	106.67	0.148	98.67	3.143	104.77
4	0.074	98.67	0.148	98.67	3.049	101.62
5	0.076	101.33	0.148	98.67	3.096	103.19
6	0.078	104.00	0.143	95.33	3.078	102.59
7	0.081	108.00	0.145	96.67	3.289	109.63
8	0.077	102.67	0.147	98.00	3.291	109.70
9	0.079	105.33	0.147	98.00	3.228	107.60
10	0.082	109.33	0.149	99.33	3.061	102.03

Tabla 28. Niveles para la determinación del rango de trabajo en matriz de huevo de gallina.

Concentración teórica(µg/kg)	0.075		0.150		3.000	
Ítem	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)	Concentración Experimental (µg/kg)	Recuperación (%)
1	0.084	112.00	0.149	99.33	2.760	92.00
2	0.078	104.00	0.150	100.00	2.737	91.23
3	0.081	108.00	0.152	101.33	2.703	90.10
4	0.080	106.67	0.151	100.67	2.696	89.87
5	0.084	112.00	0.152	101.33	2.867	95.57
6	0.082	109.33	0.151	100.67	2.729	90.97
7	0.079	105.33	0.148	98.67	2.739	91.30
8	0.084	112.00	0.150	100.00	2.797	93.23
9	0.082	109.33	0.153	102.00	2.697	89.90
10	0.081	108.00	0.151	100.67	2.698	89.93

Las gráficas de línea ajustada mostradas en la Figura 14 (músculo de pollo) y la Figura 15 (huevo de gallina) muestran la regresión lineal entre la concentración teórica y la experimental de cloranfenicol. Estos resultados respaldan que la respuesta del método es proporcional a la concentración del analito en todo el rango evaluado, ya que tanto el coeficiente de determinación como el coeficiente de correlación superan ampliamente los criterios de aceptación establecidos ($R^2 > 0.991$ y $r > 0.995$). Asimismo, estos resultados indican una excelente exactitud y precisión, sin sesgos significativos, en el rango de 0.075 a 3.00 µg/kg.

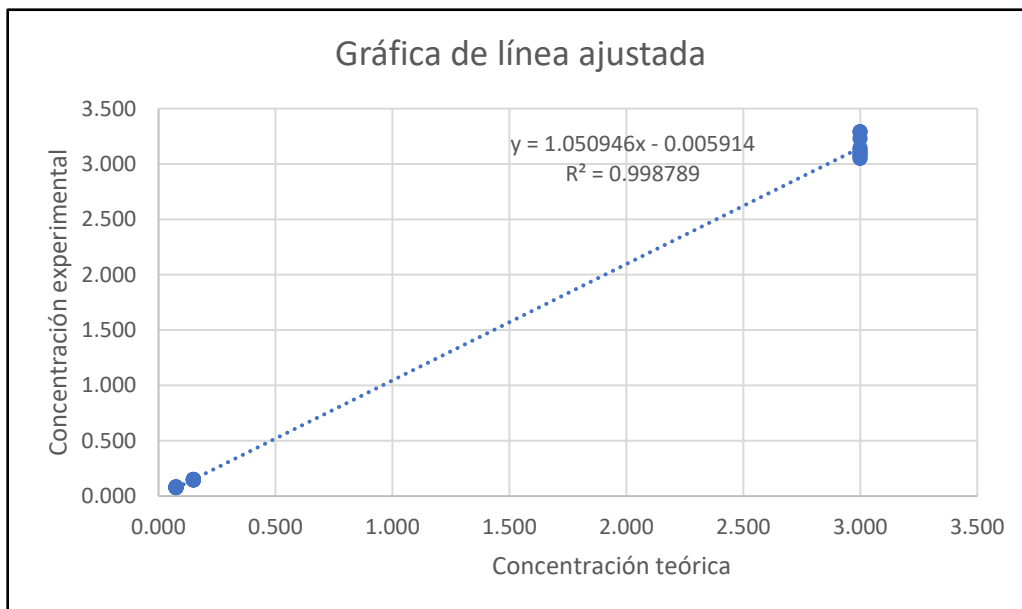


Figura 15. Gráfica de línea ajustada para rango de trabajo en músculo de pollo.

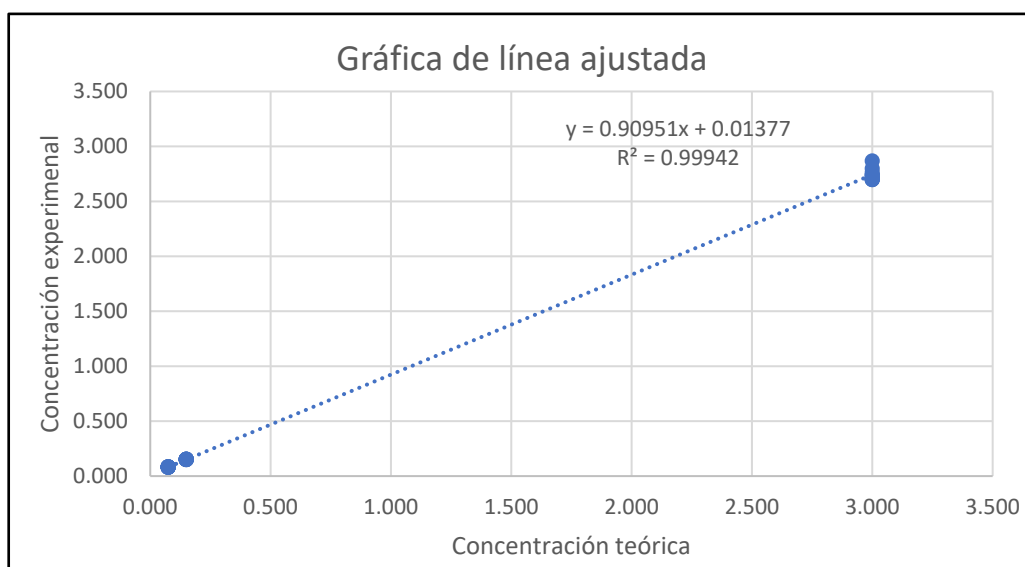


Figura 14. Gráfica de línea ajustada para rango de trabajo en huevo de gallina.

6.2.8. Límite de decisión e incertidumbre

De los análisis realizados durante 3 días consecutivos se obtuvieron las siguientes áreas que corresponden a las señales detectadas de medida del analito. A partir de ello se obtuvieron tres curvas de calibración independientes para ambas matrices, construidas a partir de la relación entre la concentración de cloranfenicol y el área de respuesta analítica. Estos resultados se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Determinación del CC α en matriz pollo.

Ítem	Concentración CFC ($\mu\text{g/Kg}$)	Área		
		Día 1	Día 2	Día 3
1	0.150	99.668	110.248	101.717
2	0.150	101.022	109.363	93.862
3	0.150	98.944	101.919	97.465
4	0.150	99.841	111.897	91.923
5	0.150	102.604	90.954	95.357
6	0.225	129.591	116.395	100.006
7	0.225	130.894	111.616	105.052
8	0.225	127.376	115.912	96.184
9	0.225	133.858	115.127	110.190
10	0.225	130.396	116.316	99.871
11	1.000	446.091	463.443	470.568
12	1.000	427.166	478.194	477.120
13	1.000	436.725	468.854	483.612
14	1.000	424.832	490.787	476.292
15	1.000	459.744	485.224	485.349
Promedio		398.156640	450.0857385	464.5444704
Intercepto		40.762	26.127	12.722

En el caso específico del cloranfenicol (CFC), se consideró el valor de referencia que corresponde a 0.15 $\mu\text{g/kg}$. Se realizaron tres análisis en días consecutivos, obteniéndose curvas de calibración independientes para cada día. Cada curva se construyó a partir de la relación entre la concentración de CFC y el área de respuesta obtenida.

A continuación, se presentan las tres curvas de calibración para matriz de pollo utilizadas en los tres diferentes días.

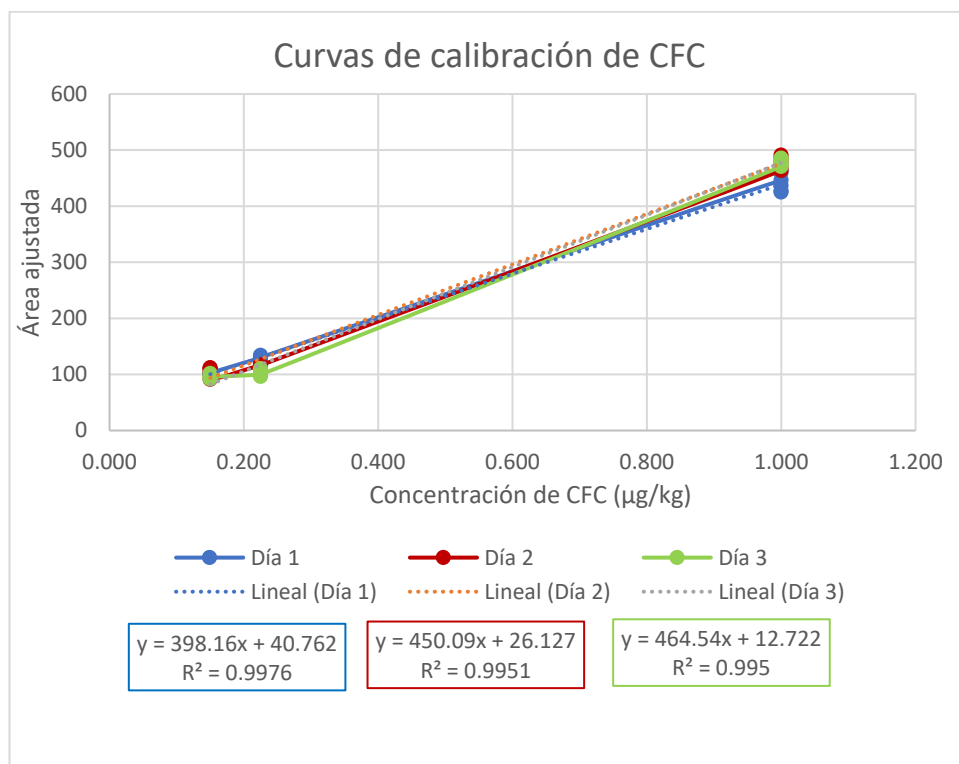


Figura 16. Curvas de calibración para matriz pollo de 3 días.

Tabla 30. Determinación del CC α en matriz huevo de gallina

Ítem	Concentración (µg/kg)	Área ajustada		
		Día 1	Día 2	Día 3
1	0.150	114.163	104.683	99.908
2	0.150	109.902	104.831	96.500
3	0.150	133.768	98.976	82.212
4	0.150	100.998	103.903	92.483
5	0.150	121.690	92.316	90.069
6	0.225	124.160	104.204	100.006
7	0.225	115.710	131.555	105.052
8	0.225	118.214	104.192	96.184
9	0.225	123.929	106.942	105.958
10	0.225	130.313	103.386	99.871
11	1.000	844.686	922.291	1076.311
12	1.000	907.740	955.898	997.137
13	1.000	830.275	887.791	1040.865
14	1.000	885.839	951.754	1022.748
15	1.000	851.073	884.408	1002.680
Pendiente:		911.196388	997.3929821	1139.498826
Intercepto:		-50.134	-79.996	-115.071

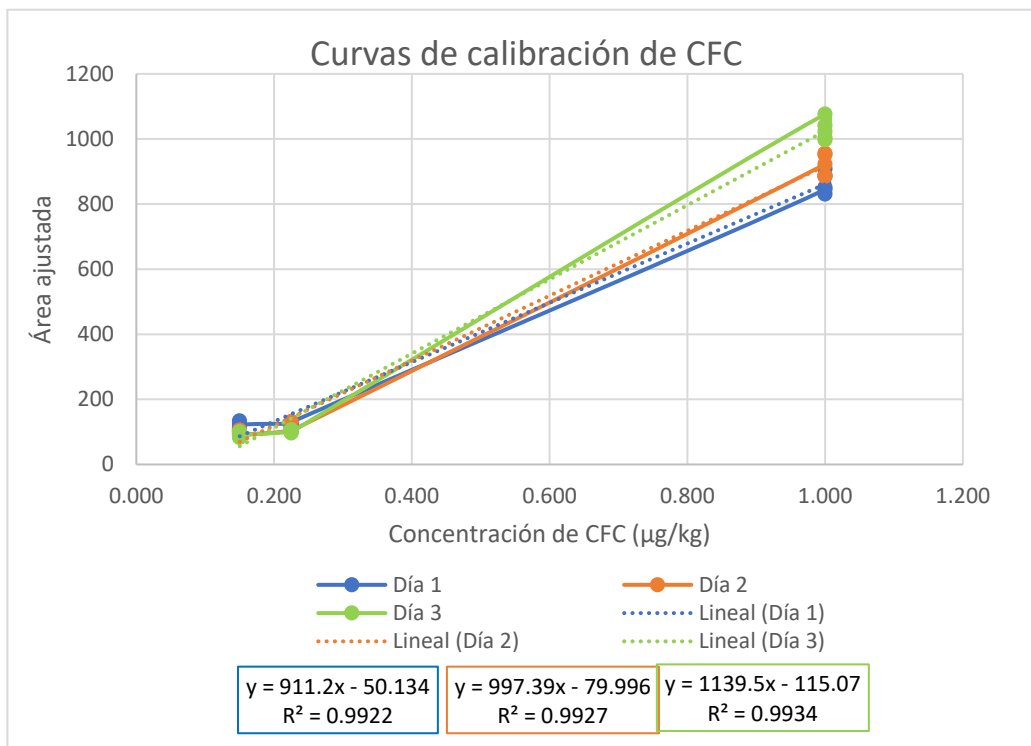


Figura 17. Curvas de calibración para matriz huevo de gallina de 3 días.

A partir de ello, aplicando el cálculo matemático, se expresan los resultados resumidos utilizando valores del promedio de la pendiente, promedio del intercepto y desviación estándar del intercepto, se obtiene lo siguiente:

Tabla 31. CC α para ambas matrices.

Matriz	Músculo de pollo	Huevo de gallina
Promedio de la pendiente	437.596	1016.029
Promedio del intercepto	26.537	-81.734
Desviación estándar del intercepto	14.024	32.503
CC α (concentración)	0.07	0.07
CC α (µg/kg)	0.075	0.075
Criterio de aceptación	CC α < 0.15 µg/kg	CC α < 0.15 µg/kg

6.3. DETERMINACIÓN DE CLORANFENICOL EN MUESTRAS OBTENIDAS EN MERCADOS DE LIMA SUR

6.3.1. Análisis de las muestras de los mercados

Una vez validado el método, se procedió a la determinación de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo y huevo de gallina procedentes de mercados de cuatro distritos de Lima Sur. Se recolectaron un total de siete muestras de cada matriz en cada uno de cuatro mercados distintos en cada distrito: Mercado Ciudad de Dios de San Juan de Miraflores, Mercado Miguel Grau de Villa María del Triunfo, Mercado Cuaves de Villa El Salvador y Mercado Mach de Chorrillos.

Los resultados mostrados en las siguientes tablas por cada matriz se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos fueron evaluados tomando como comparativo al límite de cuantificación ($0.075 \mu\text{g CFC}/\text{kg}$) y al límite de detección ($0.02 \mu\text{g CFC}/\text{kg}$); asimismo, la normativa de la Unión Europea especifica que, para sustancias no autorizadas o prohibidas, como el cloranfenicol, en las que no se hayan establecido un LMR, se utiliza el límite de decisión ($CC\alpha$) para determinar si una muestra es no conforme. El $CC\alpha$ es el nivel de concentración en el que se puede decidir, con certeza estadística ($1-\alpha$), que el analito está presente. Un $CC\alpha$ de $0.075 \mu\text{g}/\text{kg}$ significa que, si la concentración medida está por encima de este valor, se puede concluir estadísticamente que la muestra contiene cloranfenicol.

El contraste de los resultados con estos criterios nos permite determinar si las muestras exceden los niveles permitidos, lo que podría indicar un riesgo para la salud pública. Adicionalmente, la identificación de residuos que se encuentren por debajo del límite de cuantificación, pero por encima del límite de detección permite el monitoreo de tendencias, así como asegurar que las prácticas productivas cumplan con las normativas vigentes, previniendo así la acumulación de residuos que podrían poner en peligro la inocuidad alimentaria.

Tabla 32. Concentración de cloranfenicol en muestras de huevos de gallina provenientes de 4 mercados de Lima Sur.

Concentración de cloranfenicol ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
Nº Muestra	Analito	Mercado Ciudad de Dios	Mercado Miguel Grau	Mercado Cuaves	Mercado Mach
1	Cloranfenicol	0.179	ND	<LC	ND
2	Cloranfenicol	0.123	<LC	0.334	<LC
3	Cloranfenicol	0.104	0.112	0.111	0.08
4	Cloranfenicol	0.130	ND	0.156	<LC
5	Cloranfenicol	ND	0.147	<LC	ND
6	Cloranfenicol	0.128	<LC	<LC	ND
7	Cloranfenicol	<LC	0.139	0.117	<LC
Mercado Ciudad de Dios (San Juan de Miraflores), Mercado Miguel Grau (Villa María del Triunfo), Mercado Cuaves (Villa el Salvador), Mercado Mach (Chorrillos)					

ND: No detectable, LC: Límite de cuantificación

Los resultados obtenidos para la matriz de huevo de gallina evidencian variabilidad en las concentraciones de cloranfenicol en las muestras provenientes de cuatro mercados de Lima Sur expresados en la Tabla 32.

En el Mercado Ciudad de Dios (San Juan de Miraflores), se detectó la presencia de cloranfenicol en seis muestras, con concentraciones que oscilaron entre 0.104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.179 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Asimismo, se registró una muestra con concentración no detectable y otra cuya concentración estuvo por debajo del límite de cuantificación.

En el Mercado Miguel Grau (Villa María del Triunfo), se identificaron tres muestras con concentraciones detectables de cloranfenicol, especificadas en 0.112 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.139 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.147 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dos muestras presentaron niveles no detectables, mientras que otras dos se encontraron por debajo del límite de cuantificación.

En cuanto al Mercado Cuaves (Villa El Salvador), se observaron cuatro muestras con concentraciones detectables de cloranfenicol, con valores de 0.111 $\mu\text{g}/\text{kg}$,

0.117 µg/kg, 0.156 µg/kg y 0.334 µg/kg. Las restantes tres muestras presentaron niveles por debajo del límite de cuantificación.

En el Mercado Mach (Chorrillos) se detectó cloranfenicol en una muestra, con una concentración de 0.08 µg/kg; tres muestras presentaron registros por debajo del límite de cuantificación y tres no mostraron presencia detectable del analito.

Tabla 33. Concentración de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo provenientes de 4 mercados de Lima Sur.

Concentración de cloranfenicol (µg/kg)					
Nº Muestra	Analito	Mercado Ciudad de Dios	Mercado Miguel Grau	Mercado Cuaves	Mercado Mach
1	Cloranfenicol	<LC	0.32	<LC	ND
2	Cloranfenicol	<LC	2.24	<LC	<LC
3	Cloranfenicol	<LC	ND	ND	0.10
4	Cloranfenicol	<LC	0.63	<LC	<LC
5	Cloranfenicol	ND	<LC	<LC	ND
6	Cloranfenicol	<LC	ND	ND	0.22
7	Cloranfenicol	<LC	<LC	ND	<LC
Mercado Ciudad de Dios (San Juan de Miraflores), Mercado Miguel Grau (Villa María del Triunfo), Mercado Cuaves (Villa el Salvador), Mercado Mach (Chorrillos)					

ND: No detectable, LC: Límite de cuantificación

Los análisis realizados sobre la matriz de músculo de pollo provenientes de cuatro mercados de Lima Sur, reportados en la Tabla 33, mostraron variabilidad en la concentración de cloranfenicol.

En el Mercado Ciudad de Dios (San Juan de Miraflores), seis de las siete muestras presentaron concentraciones por debajo del límite de cuantificación, mientras que una muestra no registró presencia detectable del analito.

Se identificaron en el Mercado Miguel Grau (Villa María del Triunfo) tres muestras con concentraciones detectables de cloranfenicol, con valores de 0.32 µg/kg, 0.63 µg/kg y 2.24 µg/kg. Dos muestras evaluadas en este mercado se

determinaron con niveles por debajo del límite de cuantificación y otras dos muestras fueron no detectables.

En el Mercado Cuaves (Villa El Salvador), cuatro de las siete muestras analizadas se encontraron por debajo del límite de cuantificación, y las tres muestras restantes resultaron no detectables.

Finalmente, en el Mercado Mach (Chorrillos), se detectaron concentraciones de cloranfenicol en dos muestras, con valores de 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que tres muestras presentaron niveles por debajo del límite de cuantificación y dos no detectables.

VII. DISCUSIÓN

Nuestro estudio logró desarrollar, optimizar y validar con éxito el método para la determinación de cloranfenicol en músculo de pollo y huevos de gallina mediante UPLC-MS/MS. El método desarrollado y optimizado cumplió con los parámetros de validación establecidos. Asimismo, las muestras de huevo de gallina y músculo de pollo obtenidas en los mercados y evaluadas utilizando nuestro método validado, mostraron concentraciones variables de cloranfenicol.

Para el desarrollo del método que se describe en el presente estudio, se buscó mejorar las condiciones espectrométricas y cromatográficas para un equipo UPLC-MS/MS. La UPLC proporciona una separación de mayor capacidad de pico que el HPLC, esto quiere decir que la UPLC es capaz de lograr picos más definidos y separados en el cromatograma. Un pico más definido indica que los compuestos se separan mejor, lo cual es crucial para la identificación y cuantificación precisa para la detección del cloranfenicol.

Una de las modificaciones realizadas en las condiciones cromatográficas fue el de las fases móviles. Estas son utilizadas en cromatografía para separar los componentes de una muestra. El método de referencia utilizó fase móvil A: 0.1% de ácido fórmico en agua y fase B: 0.1% de ácido fórmico en ACN, con pH igual a 2 y 6 respectivamente. Sin

embargo, las fases móviles fueron cambiadas por fase A: Agua: ACN (95:5) y fase B: ACN 100%, ambas con un pH igual a 7 para mejorar la forma y la resolución del pico, que indican una mejor recuperación del cloranfenicol.

Otro de los cambios realizados fue el volumen de inyección. El modelo de espectrómetro de masas utilizado para la optimización y desarrollo del método es el Xevo TQ-XS. Este nos proporciona una mayor sensibilidad en comparación con el equipo utilizado en el método de referencia (Micromass Xevo TQ-S) [37]. La optimización permitió una reducción del volumen de inyección a 2 μL .

También se realizó una reducción del tiempo de corrida total. A diferencia del método de referencia, que demora 7.5 minutos en realizar el análisis, nuestro método analiza cloranfenicol en solo 4 minutos. Esto permite incrementar la eficiencia en la productividad, y la optimización de recursos en el laboratorio (reactivos), lo que representa una ventaja significativa en términos de aplicabilidad práctica y eficiencia analítica.

Adicionalmente, se realizó la optimización del método de extracción utilizado en el artículo de referencia. Para analizar la eficiencia del método optimizado se evaluó el porcentaje de recuperación. La recuperación obtenida en el método de referencia en la matriz de pollo fue de 96% para una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Anexo 4) [37], en comparación con el método optimizado que resultó de 88.13% para 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 92% para una concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Si bien los resultados fueron menores a los obtenidos en el método de referencia, estos se encuentran dentro del rango de aceptación descrita en la regulación 2021/808 de la Unión Europea (50 a 120 %). [40]

Por otro lado, el porcentaje de recuperación en la matriz de huevo de gallina para el método de referencia fue de 90.9% para una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; mientras que el método optimizado propuesto obtuvo un resultado de 110.43% para una concentración de 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 99,08% para una concentración de 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, lo que nos muestra un resultado favorable, de acuerdo con la normativa 2021/808 de la Unión Europea. [40]

Se realizaron cambios sustanciales para la mejora del método desarrollado por Zhiwen Zhang y colaboradores [37]. Entre ellos se incluye la omisión del paso de derivatización, esencial para la separación de analitos como los nitrofuranos. Sin embargo, nuestro

método sólo detecta cloranfenicol, por lo que se omitió este paso. Asimismo, se cambió el orden del proceso de limpieza y extracción. La reducción del volumen total del solvente de extracción (30 mL a 10 mL) se realizó con el objetivo de desarrollo sostenible, buscando usar menor cantidad de solvente sin que este afecte la eficiencia del método. También se realizó la sustitución de la sal utilizada (tierra de diatomeas) por sulfato de sodio anhidro y se omitió la limpieza con hexano y la reducción de la cantidad de sales (sulfato de sodio anhidro: 4g a 2g y C18: 4g a 100 mg). Si bien los resultados de recuperación obtenidos con tierra de diatomeas fueron comparables a los obtenidos con sulfato de sodio anhidro, se observó que la manipulación del extracto presentaba complicaciones al emplear tierra de diatomeas, dificultando el proceso de separación y aumentando el riesgo de pérdida del analito o variabilidad entre replicados. En cambio, el uso de sulfato de sodio anhidro permitió un manejo más controlado y reproducible del procedimiento. De esta manera se facilitó la separación del extracto sin inconvenientes operativos. Por lo tanto, el cambio se realizó con base en criterios de mejor desempeño práctico y robustez del método, manteniendo los parámetros de validación dentro de los criterios de aceptación establecidos.

Finalmente, se redujo el volumen tomado para evaporar con el gas nitrógeno (30 mL a 5 mL), ya que, al utilizarse menor volumen de solvente de extracción, era necesaria también la reducción del volumen de evaporación con el gas nitrógeno.

Una vez desarrollado el método en el laboratorio LaCCSA del CITEacuícola de la UPCH, se procedió a realizar la validación teniendo como referencia las regulaciones de la Comisión Europea, el Instituto de Salud Pública de Chile, la FDA y la Eurachem. [40,42,47,49] Los criterios empleados y examinados para llevar a cabo la validación incluyeron los siguientes parámetros: veracidad, precisión, selectividad, linealidad, límite de cuantificación y límite de detección, robustez, rango de trabajo, sensibilidad, límite de decisión e incertidumbre.

El parámetro de veracidad fue determinado y analizado con respecto al criterio de decisión, estipulado por la normativa de la Unión Europea (2021/808). [40] Este fue evaluado mediante la comparación entre el promedio de los resultados obtenidos de 30 muestras en tres niveles y la concentración agregada del analito, conforme a las recomendaciones internacionales para la validación de métodos analíticos. [42, 43, 44]

Este parámetro expresa el grado de concordancia entre el valor promedio medido y el valor verdadero y su evaluación permite identificar la presencia del sesgo, es decir, para considerar este método veraz la diferencia entre el resultado medio y el valor referencial deber ser mínima, además de encontrarse dentro de los límites de aceptación establecidos por la norma o guías técnicas reconocidas internacionalmente. Los resultados reportados para este parámetro se estiman a través del porcentaje de recuperación, los cuales se encontraron dentro del rango de aceptación (50 a 120%). Así mismo, se realizó la prueba *t* de student aplicada y que tiene criterio de decisión (valor de *p* menor a 0.05). Los resultados obtenidos en esta prueba arrojaron para el criterio de aceptación > 50% el valor de *p* es igual 0.000 y para el criterio de aceptación <120% valor de *p* es igual 0.000, ello se puede observar en los Anexos 6 y 7, evidenciándose que los analistas reportan resultados similares (veraces) comparándose con el valor de referencia dado de concentración conocida [40].

En lo que respecta al análisis de la reproducibilidad y la repetibilidad a través de cálculos matemáticos para determinar el parámetro de precisión, de acuerdo al cumplimiento del criterio de aceptación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) [47] y el cumplimiento de la normativa estipulada por el Instituto de Salud Pública de Chile [42]. Los resultados obtenidos por ambos analistas en los tres niveles evaluados (0.075, 0.15 y 0.225 µg/kg) fueron cercanos entre sí, con varianzas y desviaciones estándar que indican poca dispersión y buena consistencia en las mediciones, expresadas en las Tablas 10 y 11. Asimismo, al evaluar el porcentaje de desviación estándar relativa experimental ($RSD_{Exp.}$) tanto en la repetibilidad como la reproducibilidad, se observaron que en todos los casos estos valores son considerablemente menores que los límites teóricos establecidos por el RSD de Horwitz, expresados en la Tabla 12. El cumplimiento del criterio de aceptación de la FDA, que expresa que el RSD experimental sea inferior al RSD de Horwitz, confirma que el método es preciso para los tres niveles de concentración evaluados en ambas matrices. Así como, la precisión intermedia evaluada confirma que la variabilidad entre los dos analistas durante los tres días se mantuvo dentro de los límites aceptables, lo que evidencia la reproducibilidad del método en condiciones reales del laboratorio.

Asimismo, se ha demostrado que el método es selectivo, utilizando un método analítico a través de enfoques estadísticos y visuales, destacando su importancia para asegurar que las mediciones correspondan únicamente al analito de interés. Se tomaron como referencia el cálculo del porcentaje de recuperación, encontrando un valor cercano al 100%, lo que indica una buena capacidad del método para detectar el analito sin interferencias. Además, se realizaron pruebas de normalidad y t de Student, que confirmaron la aleatoriedad de las variaciones en las mediciones y la ausencia de sesgos, respectivamente. Así como, el análisis visual de los cromatogramas mostró claramente la presencia del analito sin interferencias, lo que refuerza la selectividad del método. En conjunto, estos resultados validan la fiabilidad del método analítico para la determinación del analito en muestras complejas.

Se cumplieron satisfactoriamente con los criterios de linealidad y sensibilidad analítica para la determinación de cloranfenicol en ambas matrices, teniendo en cuenta las normativas, del Instituto de Salud Pública de Chile, Eurachem y Validación de Métodos en Análisis Químicos Cuantitativos. Con los resultados obtenidos en la Tabla 16 y 19, se puede afirmar la significancia de la regresión para ambas matrices ya que los valores de F experimentales son mayores que los valores críticos para F. Asimismo el valor de la pendiente presenta un valor de P de 0.821 para la matriz de huevo de gallina y de 0.062 para la matriz de músculo de pollo. Esto indica que ambas pendientes son significativamente diferentes a cero. Según los resultados obtenidos para el coeficiente de correlación y determinación para ambas matrices se puede afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal.

Los valores del límite de cuantificación y del límite de detección demuestran que nuestros resultados cumplen con los parámetros del Instituto de Salud Pública de Chile [42]. De acuerdo al concepto del Límite de Detección (LD) se define como la menor concentración de un analito que puede ser detectada con un nivel de confianza conocido, y en este estudio, el cálculo del LD estimado para la matriz músculo de pollo fue de 0.024 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y para la matriz huevo de gallina fue de 0.02 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, lo que indica la capacidad del método para detectar niveles muy bajos de cloranfenicol, un aspecto crítico para la seguridad alimentaria. Por otro lado, el Límite de Cuantificación (LC) se refiere a la menor concentración que puede ser cuantificada con precisión y el LC calculado para ambas

matrices fue de 0.075 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, lo que demuestra que el método es capaz de cuantificar concentraciones muy bajas, incluso por debajo de los límites establecidos por normativas de salud. Se verificó el LD calculado, confirmando su validez al ser menor que el cloranfenicol teórico añadido. Ambos límites se calcularon considerando la desviación estándar de los resultados y un nivel de confianza del 99%, lo que asegura un análisis robusto.

Los resultados del parámetro de robustez indican que, ante variaciones menores, el método cumple con los criterios de aceptación. Asimismo, en este parámetro se buscó comparar las condiciones del método de referencia con las condiciones de nuestro método desarrollado, dando como resultado un método robusto para ambas matrices.

Con respecto al parámetro del rango de trabajo, se determinó el criterio de aceptación basado en la guía de Eurachem. Este indica que el rango debe abarcar desde el límite de cuantificación (LOQ) hasta el mayor nivel de concentración. [49] Para evaluar ello se realizaron las gráficas de línea ajustada para ambas matrices, en el cual la gráfica de la línea ajustada el R cuadrado fue mayor al criterio de decisión y que el r mayor al criterio de decisión, lo que comprueba la linealidad de los datos. Estos resultados son consistentes con las recomendaciones internacionales como la USP y ICH que establecen que un método debe demostrar linealidad, precisión y exactitud en el rango de trabajo para ser considerado apto para su uso en el análisis de muestras reales. Así como la ausencia de sesgos significativos y la baja dispersión de los resultados refuerzan la robustez del método [51, 52].

Tanto para el límite de decisión ($CC\alpha$) como para la incertidumbre en ambas matrices, nuestro método cumple con el criterio de aceptación de la normativa de la Comisión Europea, que dictamina que para sustancias prohibidas como el antibiótico cloranfenicol, que no posee un LMR establecido, el límite de decisión debe evaluarse en el nivel de concentración más bajo posible, cuyo fin es garantizar la detección temprana. Para ello, se utilizaron los blancos fortificados de tres concentraciones diferentes (0.15, 0.225 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), tomando 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como valor de referencia para cloranfenicol, lo que se alinea con los valores recomendados para asegurar la sensibilidad del método. Además, estos resultados obtenidos a partir de tres series de análisis independientes en tres días

diferentes reflejan una buena repetibilidad y linealidad en las curvas de calibración realizadas en ambas matrices, con coeficientes de correlación elevados y parámetros consistentes. El cálculo del CC α arrojó un valor de 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ambas matrices, inferior al valor de referencia de 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, lo que indica que el método es suficientemente sensible para detectar concentraciones por debajo del umbral establecido. Este resultado es crucial para la vigilancia sanitaria, ya que permite identificar la presencia de cloranfenicol incluso en niveles muy bajos, contribuyendo a la seguridad alimentaria y al cumplimiento normativo. [39]

Este estudio no realiza una comparación experimental directa. En cambio, se aplica un método validado de UPLC-MS/MS que ha sido evaluado en profundidad mediante varios parámetros de validación, siguiendo estrictamente las normativas internacionales y nacionales.. Cabe remarcar que todos los parámetros evaluados cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación, lo que garantiza la confiabilidad y aplicabilidad local del método para la determinación de residuos de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina comercializados en Lima Sur.

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de los niveles de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo y huevo de gallina adquiridos en mercados del sector Lima Sur aplicando el método validado, a través del cual se detectaron concentraciones de cloranfenicol en diferentes muestras. Para la matriz huevo de gallina, de las 28 muestras evaluadas, el 46.43% presentaba concentraciones superiores al CC α . Por otro lado, para la matriz músculo de pollo, el 17.86 % de las muestras superan el CC α . Esto revela el uso indebido del medicamento en la crianza de animales destinados al consumo humano. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en un estudio realizado en 2018 en otras zonas de la ciudad de Lima, donde también se identificó la presencia de cloranfenicol en muestras de músculo de pollo [17]. Si bien las condiciones geográficas, temporales y metodológicas no son directamente comparables, la coincidencia de resultados sugiere que la detección de este antibiótico en productos avícolas podría no ser un hecho aislado, sino un problema recurrente que requiere una vigilancia continua.

La presencia de cloranfenicol en productos animales destinados al consumo humano depende de diversos factores, entre ellos sus características de absorción, distribución y

eliminación en los animales expuestos. Un estudio farmacocinético desarrollado por Anadón y colaboradores (1994) evidenció una absorción rápida tras la administración oral de dosis de 30 y 50 mg/kg, con concentraciones plasmáticas máximas a los cinco minutos y una persistencia de entre dos y cuatro horas, lo que indica una rápida disponibilidad sistémica. No obstante, la biodisponibilidad oral relativamente baja (29 a 38 por ciento) sugiere que una fracción importante del fármaco no alcanza la circulación sistémica, posiblemente debido a metabolismo presistémico o a una absorción incompleta.

La vida media de eliminación, situada entre 6.8 y 7.4 horas por vía oral y alrededor de 5.2 horas tras administración intravenosa, indica una depuración moderadamente rápida en aves. Esto sugiere que el cloranfenicol no tiende a acumularse de manera excesiva en los tejidos si se respetan los intervalos adecuados entre dosis y el correspondiente tiempo de retiro previo al sacrificio. Sin embargo, la presencia de metabolitos con reconocida toxicidad hematológica, como diclorohidroxifenilacetato (DHCAP), nitrocloranfenicol (NOCAP) y nitrofenilacetato (NPAP), así como la depleción lenta tanto del fármaco inalterado como de dichos metabolitos en tejidos como el riñón—donde se detectaron niveles superiores a 0.6 ppm hasta 12 días después de la retirada—evidencian la necesidad de considerar no solo el principio activo sino también sus productos de biotransformación en los programas de control de residuos.

Estos hallazgos tienen implicaciones sanitarias y regulatorias relevantes. Aunque el cloranfenicol presenta una eliminación relativamente rápida, el tiempo de retiro debe ser suficiente para asegurar que los residuos totales (fármaco y metabolitos) se mantengan por debajo de los límites establecidos para consumo humano. Dado que el cloranfenicol se encuentra prohibido o estrictamente regulado en numerosos países por su potencial toxicidad y efectos adversos, el cumplimiento riguroso de los tiempos de retiro resulta esencial para prevenir riesgos asociados con la ingestión de productos avícolas contaminados [53].

Una limitación de este estudio fue el tamaño muestral reducido, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela y no pueden extrapolarse a la población general. No obstante, el objetivo principal se centró en determinar los niveles de cloranfenicol en matrices de consumo habitual—músculo de pollo y huevo de gallina—previo desarrollo, optimización y validación del método analítico empleado. A pesar de la limitación muestral, los resultados proporcionan una base inicial valiosa y permiten considerar este

trabajo como un estudio piloto que puede orientar investigaciones posteriores con un diseño muestral más amplio y robusto. En este sentido, los hallazgos contribuyen al avance del conocimiento y pueden servir como referencia para consolidar estrategias de control y vigilancia sanitaria en productos avícolas, fortaleciendo la seguridad alimentaria y la salud pública.

Finalmente, la participación en un ensayo de aptitud se plantea como una oportunidad futura para confirmar externamente el desempeño del método optimizado y reforzar su confiabilidad analítica.

VIII. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología modificada y optimizada para la determinación del analito de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina mediante una técnica analítica de UPLC-MS/MS.
- Se validó satisfactoriamente el método analítico basado en cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para la determinación de cloranfenicol en músculo de pollo y huevo de gallina. El método cumplió con los criterios de aceptación, conforme a los lineamientos de la FDA, la Comisión Europea, el Instituto de Salud Pública de Chile y Eurachem.
- Mediante la aplicación del método validado, se determinó la presencia de cloranfenicol en un total de 56 muestras de músculo de pollo y huevo de gallina se detectó la presencia de cloranfenicol en 5 de las 28 muestras evaluadas de músculo de pollo y en 13 de 28 muestras de huevo de gallina. Las muestras restantes presentaron concentraciones por debajo del límite de cuantificación o no fue detectable.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Boletín Estadístico Mensual de la Producción y Comercialización de Productos Avícolas [Internet]. Perú: 2024. [citado el 10 de abril de 2024]. Disponible en: [Boletín Estadístico Mensual del Sector AVÍCOLA - 2025 - Informes y publicaciones - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - Plataforma del Estado Peruano](#)
2. Comisión Europea. Reglamentos UE N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009. Europa: 2010. [citado el 10 de abril de 2024] Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex%3A32010R0037>
3. European Medicines Agency. Maximum residue limits (MRL) [Internet]. Europa: 2009 [citado el 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/maximum-residue-limits-mrl>
4. Parlamento Europeo. Reglamento delegado - 2022/1644 - ES - EUR-Lex [Internet]. Europa: 2022 [citado el 17 de abril de 2024]. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2022/1644/oj?locale=es
5. Codex Alimentarius Commission. Recommendations on risk management for veterinary drugs for which JECFA has not recommended an ADI or MRL due to specific human health concerns [Internet]. 21st Session of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods; 2013 Aug 26-30; Minneapolis, MN, USA. Rome: FAO/WHO; 2013 [citado el 26 de abril de 2024]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FShared%2BDocuments%252FArchive%252FMeetings%252FCRVDf%252Fccrvdf21%252Frv21_06_add1e.pdf
6. U.S. Food and Drug Administration. Import Alert 16-127: Detention Without Physical Examination of Animal Drugs, Feeds, and Related Products Due to Chloramphenicol [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2025 Mar 31 [citado el 26 de abril de 2024]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/CMS_IA/importalert_29.html
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Base de datos FAOLEX [Internet]. Paraguay: 1989 [citado el 26 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC042971>

8. Briceño Ferreira ED, Guevara Pérez J, Riera Betancourt J, Arrieta-Mendoza D, Maniglia Mérida G. Determinación de residuos de cloranfenicol y dimetridazol en riñones de cerdos beneficiados en el estado Aragua, Venezuela. *Revista Científica* [Internet]. 2015 [citado el 25 de mayo de 2024] 25(6):439-445. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95944009004>
9. Biblioteca del Congreso Nacional. Resolución 3599 Exenta [Internet]. Chile: 1996. [citado el 25 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?i=40373&f=1996-12-10>
10. SENASA. Laboratorio de análisis de residuos tóxicos. [Internet]. Perú. 2015. [citado el 10 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/laboratorio-de-analisis-de-residuos-toxicos/>
11. Sharma SK, Galav V, Rathore PS. Amphenicols: Dilemma of Use and Abuse in Poultry. *Handbook on Antimicrobial Resistance* [Internet]. 2023 [citado el 10 de junio de 2024]. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-16-9723-4_12-1
12. Hedman HD, Vasco KA, Zhang L. A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *Animals (Basel)* [Internet]. 2020 Jul 24 [citado el 19 de junio de 2024];10(8):1264. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ani10081264> doi: 10.3390/ani10081264.
13. Mund MD, Khan UH, Tahir U, Mustafa BE, Fayyaz A. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int J Food Prop* [Internet]. 2017 [citado el 19 de junio de 2024];20(7):1433–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1212874>
14. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Límites máximos de residuos (LMR) [Internet]. Roma: 2023 [citado el 10 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
15. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Resolución directoral No. 0072-2013-MINAGRI-SENASA-DIAIA. Perú: 2013 [citado el 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/marcolegal/normaslegales/resolucionesdirectorales/2013/setiembre/rd72-2013-minagri-senasa-diaia.pdf>
16. Vahideh EA, Mehran MA, Nasim A, Alireza O, Abolfazl G. Investigation of Enrofloxacin and Chloramphenicol Residues in Broiler Chickens Carcasses Collected From Local Markets of Tabriz, Northwestern Iran. *Health Promot* [Internet]. 2014 [citado

- el 5 de mayo de 2024] 4(2):151-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5681/hpp.2014.020>
17. Ortiz G, Angel M. Determinación de residuos de cloranfenicol en carnes por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. [Tesis de maestría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. 149 p.
18. Riviere JE, Mark GP. Veterinary Pharmacology and Therapeutics [Internet]. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell; 2017 [citado el 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://search-ebscohost-com.upch.lookproxy.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1642576&lang=es&site=ehost-live>
19. Vademecum. Cloranfenicol [Internet]. España. 2015 [citado el 16 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-cloranfenicol-j01ba01>
20. Beauduy CE, Winston LG. Tetracyclines, macrolides, clindamycin, chloramphenicol, streptogramins, oxazolidinones and pleuromutilins. McGraw Hill. 2024 [citado el 16 de abril de 2024]. Disponible en: Medical.<https://accessphysiotherapy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=3382§ionid=281754666>
21. Morales GYE, Herrera MC, Muñoz RJ. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [Internet]. 2007 [citado el 2 de mayo del 2024];38(1):58-69. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938108>.
22. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. [Internet]. 9a ed. Elsevier; 2020 Sep. [citado el 2 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/book/3-s2.0-B9788491134992000266?scrollTo=%23h10002396>
23. Bringas de LLP. Farmacocinética, metabolismo y residuos de cloranfenicol en aves. [Internet]. España. 1991 [citado el 2 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=201541>
24. Hanekamp JC, Bast A. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. Environ Toxicol Pharmacol [Internet]. 2015 [cited 2024 May 15]; 39(1):213–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.016>

25. WHO International Agency for Research on Cancer. List of classifications [Internet]. Francia: IARC; 1965-2024 [citado el 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>
26. Los carcinógenos [Internet]. Madrid: Prevor; 2018 [citado el 22 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.prevor.com/es/los-carcinogenos/>
27. Moya MP, Jayo DE, López NC, Graña MG, Halac E. Tratamiento con cloranfenicol en nueve niños con disentería bacilar. Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba [Internet]. 4 de septiembre de 2012 [citado 20 de mayo de 2024]; 69(3):160-1. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/21124>
28. Yu PA, Tran EL, Parker CM, Kim HJ, Yee EL, Smith PW, Russell Z, Nelson CA, Broussard CS, Yu YC, Meaney D. Safety of Antimicrobials During Pregnancy: A systematic Review of Antimicrobials Considered for Treatment and Postexposure Prophylaxis of Plague. Clin Infect Dis [Internet]. 2020 May [citado el 12 de mayo de 2024]; 70 (Suppl 1):S37–S50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciz1231>
29. Olatoye IO, Oyelakin EF, Adeyemi IG, Call DR. Chloramphenicol use and prevalence of its residues in broiler chickens and eggs in Ibadan, Nigeria. Niger Vet J [Internet]. 2012 [citado el 2 de julio de 2024];33(4). Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/nvj/article/view/98877>
30. Darko G, Mensah JK, Dapaah SS, Odei J. Estimated dietary exposure to veterinary residues in chicken and eggs. Int J Food Contam [Internet]. 2015 [citado el 2 de julio de 2024];2(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40550-015-0022-2>
31. Imran M, Habi, F, Majeed S, Tawab A, Rauf W, Rahman, M, Iqbal M. LC-MS/MS-based determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry meat from the Punjab-Pakistan. Food Additives & Contaminants. [Internet]. 2018 [citado el 2 de julio de 2024]; 35(8), 1530–1542. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1463569>
32. Guidi LR, Tette PAS, Fernandes C, Silva LHM, Gloria MBA. Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food. Talanta [Internet]. 2017 [Citado el 3 de mayo del 2024]; 162:324–38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.068>
33. Comisión Europea. Reglamento de ejecución - 2021/808 - EN - EUR-Lex [Internet]. Europa: 2021 [Citado el 26 de abril]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32021R0808>

34. BMeditores. Retiro de antibióticos presacrificio. [Internet]. México. BM Editores; 2020. [Citado el 3 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://bmeditores.mx/entorno-pecuario/retiro-de-antibioticos-presacrificio/>
35. Maestre. L. Historia de un viaje: dinámica de los genes de resistencia a antibióticos, del cuerpo humano y del ecosistema. [Internet]. España: Universidad de Alicante; 2022. [Citado el 3 de mayo del 2024]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10045/126814>
36. Investigation of Enrofloxacin and Chloramphenicol Residues in Broiler Chickens Carcasses Collected From Local Markets of Tabriz, Northwestern Iran. 2014 [citado el 10 de abril de 2024]. Disponible en: https://hpp.tbzmed.ac.ir/Article/HPP_73_20141018125821
37. Zhang Z, Wu Y, Li X, Wang Y, Li H, Fu Q, Xia X. Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food chemistry. 2017, 182-190. [Citado el 3 de mayo del 2024]; Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616313371?casa_token=DS4sbADjTNcAAAAA:6v5f2CXF31mUBeyP6a2Hdwr9b8ajubueWjlem_rh_s_1SXxzFh4fW1O7odqSt4PxxWBy_qgN6TY
38. Comisión del Codex Alimentarius. Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos. CAC/GL 71-2009. Roma: FAO/OMS; 2009 2017 [Citado el 3 de mayo del 2024]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B71-2009%252FCXG_071s.pdf
39. Hurtado Galindo, N. E. 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. 2021 [Citado el 3 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/9609?show=full>
40. Comisión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión de 22 de marzo de 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los

residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE. [Internet]. 2021. [Citado el 24 de junio de 2024] Disponible en: [Reglamento de ejecución - 2021/808 - EN - EUR-Lex \(europa.eu\)](#)

41. Penney L, Smith A, Coates B, Wijewickreme A. Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. J AOAC Int [Internet]. 2005;88(2):645–53. [Citado el 3 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/88/2/645/5657400?login=false>

42. Instituto de Salud Pública Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.” Chile:2010 [Citado el 20 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf

43. ISO 5725-1. Exactitud (Veracidad y precisión de los métodos y resultados de medición). Parte 1: Principios generales y definiciones. Ginebra: 2023 [Citado el 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/69418/a7c3fb78cdce4a6398bd3f759670d72e/ISO-5725-1-2023.pdf>

44. Comisión Europea. REGLAMENTO (UE) 2023/411 DE LA COMISIÓN de 23 de febrero de 2023 por el que se modifica el Reglamento (UE) 2019/1871 en lo que respecta a la aplicación de valores de referencia para los nitrofuranos y sus metabolitos. [Internet]. 2023. [Citado el 12 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32002D0657>

45. Portuondo Paisan Y, Portuondo Moret J. La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. Tecnología Química [Internet]. 2010 [citado 27 Abr 2025]; 30(2):117-21. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4455/445543770014.pdf>

46. Waters. Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-XS. Estados Unidos:2024. [Citado el 28 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.waters.com/nextgen/xg/es/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry->

[systems/xevo-tqxs.html?srsId=AfmBOoqZJJ2SA2UjoNJT8QK7w9pUZqYfFtNjK3XmBHlHzAalt2bzHBu](https://www.fda.gov/oc/ohrt/ohrt-systems/xevo-tqxs.html?srsId=AfmBOoqZJJ2SA2UjoNJT8QK7w9pUZqYfFtNjK3XmBHlHzAalt2bzHBu)

47. Food and Drug Administration. Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products [Internet]. USA: 2019 [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/81810/download>

48. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. Geneva: ICH; 2005 [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

49. Cantwell H, editor. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 3rd ed. Eurachem; 2025 [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf

50. Roy-García I, Rivas-Ruiz R, Pérez-Rodríguez M, Palacios-Cruz L. Correlación: no toda correlación implica causalidad. Rev Alerg Mex. 2019 Sep;66(3):354-360. [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-91902019000300354. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.651>

51. United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43–NF 38). Validation of Compendial Procedures <1225>. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2020. [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: [United State Pharmacopeia 2024 \(USP 47 - NF 42\)](#)

52. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. Geneva: ICH; 2005 [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

53. Anadón A, Bringas P, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ. Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. J Vet Pharmacol Ther. 1994;17(1):52-8. [Citado el 24 de junio de 2024]. Disponible en: [Biodisponibilidad, farmacocinética y residuos de cloranfenicol en el pollo - PubMed](#)

ANEXOS

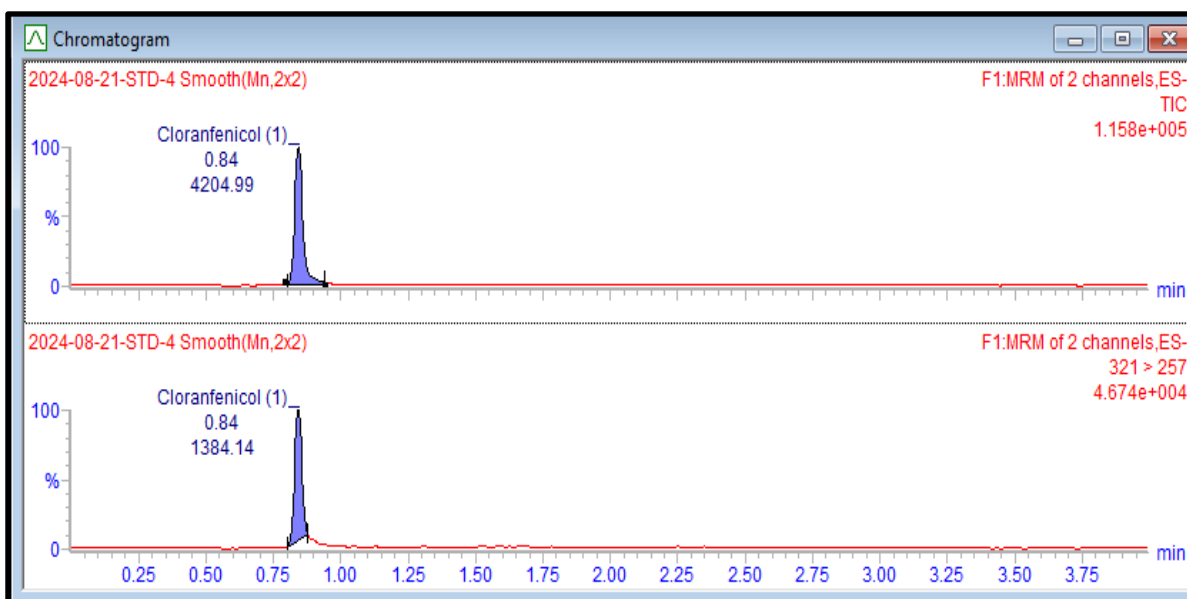
ANEXO 1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DEL MÉTODO DE REFERENCIA.

Columna	BEH C18; 50mm de largo; 2.1mm de diámetro; 1.7 μ m de tamaño de partícula.			
Temperatura de la columna	40°C			
Volumen de inyección	5 μ L			
Fase móvil A	0.1% de ácido fórmico en agua.			
Fase móvil B	0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo.			
Gradiente	Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B	Flujo (mL/min)
	Inicial	98%	2%	0.4
	0.5	98%	2%	0.4
	2	85%	15%	0.4
	4.5	60%	40%	0.4
	5.5	1%	99%	0.4
	6	1%	99%	0.4
	6.1	98%	2%	0.4
	7.5	98%	2%	0.4

ANEXO 2. CONDICIONES ESPECTROMÉTRICAS DEL MÉTODO DE REFERENCIA.

Voltaje capilar	3 kV
Temperatura de la fuente	150°C
Temperatura de la solvatación	500°C
Flujo de gas de cono (N2)	150 L/h
Flujo de gas de solvatación (N2)	800 L/h
Flujo de gas de colisión	0.15 mL/min
Modo ión	ES -

ANEXO 3. Cromatograma de cloranfenicol de concentración 0.3 ppb por UPLC-MS/MS



ANEXO 4. Resultados de recuperación del método de referencia.

Matriz	Concentración teórica (µg/kg)	Recuperación (%)
Músculo de pollo	0.1	96.00
Huevo de gallina	0.1	90.90

ANEXO 5. Fotos de las muestras de los diferentes mercados



Mercado Ciudad de Dios en San Juan de Miraflores



Mercado Miguel Grau de Villa Maria del Triunfo



Mercado Cuaves de Villa el Salvador



Mercado Bach de Chorrillos

ANEXO 6. Prueba de t de Student (1 muestra) para la matriz músculo de pollo

Estadísticas descriptivas de nivel I (concentración añadida 0.075 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para µ
30	105.289	2.746	0.501	104.437

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
110.3	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel I (concentración añadida 0.075 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para µ
30	105.289	2.746	0.501	106.141

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-29.35	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel II (concentración añadida 0.15 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	98.044	1.768	0.323	97.496

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
61.53	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel II (concentración añadida 0.15 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	98.044	1.768	0.323	98.593

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-68.03	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel III (concentración añadida 0.225 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	105.659	4.955	0.91	104.122

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
61.53	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel III (concentración añadida 0.225 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	105.659	4.955	0.905	107.196

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-15.85	0.0000

ANEXO 7. Prueba de t de Student (1muestra) para la matriz huevo de gallina

Estadísticas descriptivas de nivel I (concentración añadida 0.075 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	109.067	3.402	0.621	108.011

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
95.1	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel I (concentración añadida 0.075 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	109.067	3.402	0.621	110.122

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-17.6	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel II (concentración añadida 0.15 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	99.822	1.212	0.221	99.446

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
225.13	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel II (concentración añadida 0.15 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	99.822	1.212	0.221	100.198

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-91.18	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel III (concentración añadida 0.225 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	100.074	0.739	0.135	99.845

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 50$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 50$

Valor T	Valor p
371.16	0.0000

Estadísticas descriptivas de nivel III (concentración añadida 0.225 µg/kg)				
N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	Límite inferior de 95% para μ
30	100.074	0.739	0.135	100.303

μ : media de % recuperación

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 120$

Hipótesis alterna $H_1: \mu > 120$

Valor T	Valor p
-147.69	0.0000

ANEXO 8. Resultados del tratamiento estadístico de linealidad

Se construyó un modelo de regresión lineal para las curvas de calibración, con el fin de describir la relación entre la concentración del analito y la señal instrumental. La validez del modelo se evaluó comprobando el cumplimiento de sus supuestos fundamentales. A continuación, se presentan los resultados de la prueba de homocedasticidad y normalidad de los residuos para ambas matrices:

a. Matriz músculo de pollo

Prueba de Homocedasticidad

La homocedasticidad, u homogeneidad de varianzas, es un supuesto de varianzas iguales o similares en diferentes grupos que se comparan. Se realizó esta prueba para evaluar las varianzas de las 3 curvas de calibración.

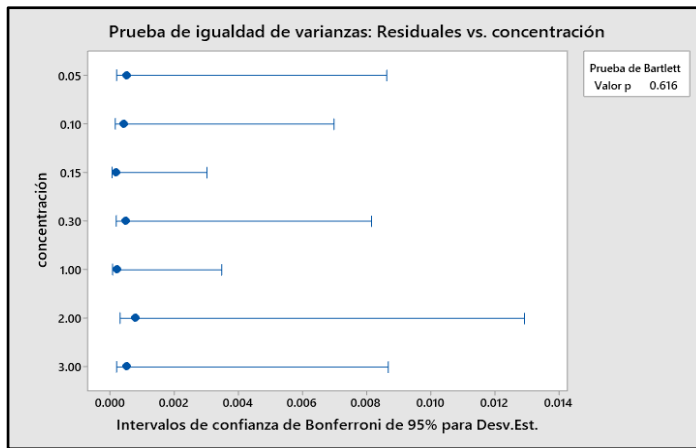
Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las varianzas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Por lo menos una varianza es diferente

Valor de P	Criterio de aceptación
0.616	$P > 0.05$

Como el valor de P es mayor que 0.05, se acepta la hipótesis nula y se concluye que las varianzas son iguales.



Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

concentración	N	Desv.Est.	IC
0.05	3	0.0005162	(0.0002174; 0.0086296)
0.10	3	0.0004176	(0.0001759; 0.0069821)
0.15	3	0.0001811	(0.0000763; 0.0030270)
0.30	3	0.0004875	(0.0002054; 0.0081505)
1.00	3	0.0002085	(0.0000878; 0.0034856)
2.00	3	0.0007725	(0.0003254; 0.0129151)
3.00	3	0.0005190	(0.0002186; 0.0086760)

Nivel de confianza individual = 99.2857%

Asimismo, se realizó la prueba de distribución normal de los residuos para establecer si los datos se distribuyen de manera uniforme.

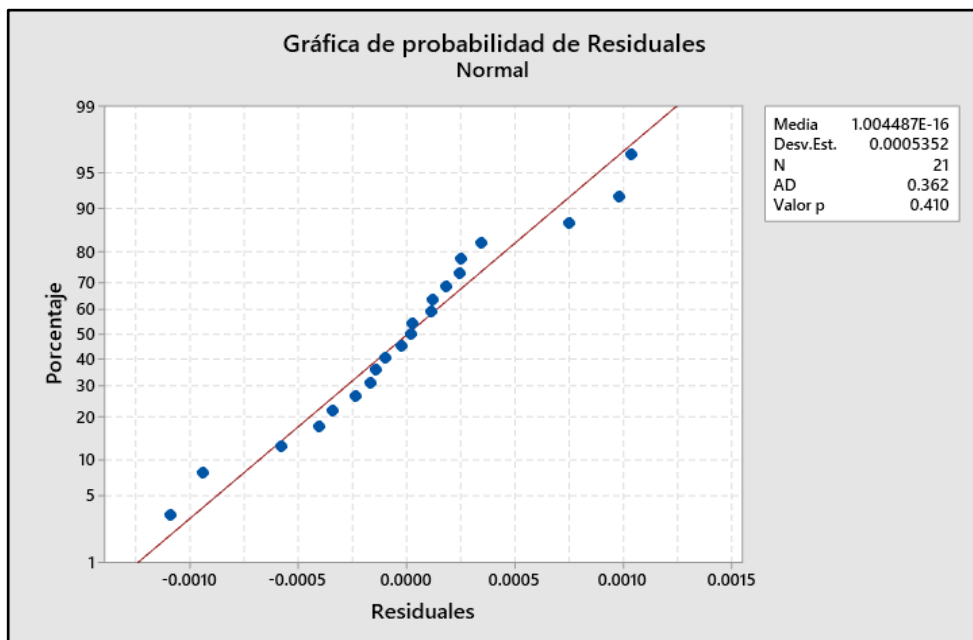


Gráfico de probabilidad de residuos

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Los datos presentan una distribución normal

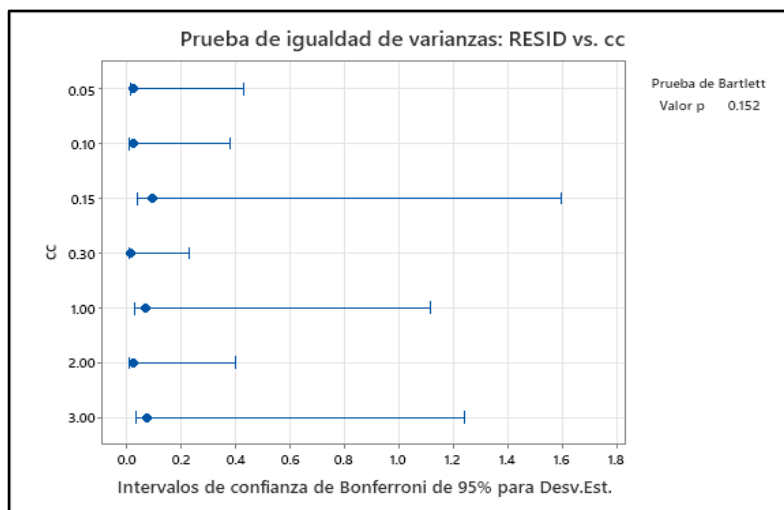
Hipótesis alterna H_1 : Los datos no presentan una distribución normal

Valor de P: 0.410

Como el valor de P es 0.410 entonces se afirma que los datos presentan una distribución normal.

b. Matriz Huevo de gallina

Prueba de Homocedasticidad



Intervalos de confianza de Bonferroni de 95% para desviaciones estándar

cc	N	Desv.Est.	IC
0.05	3	0.0255860	(0.0107786; 0.427775)
0.10	3	0.0226513	(0.0095423; 0.37869)
0.15	3	0.0954769	(0.0402216; 1.59621)
0.30	3	0.0137902	(0.0058094; 0.23055)
1.00	3	0.0666922	(0.0280955; 1.11498)
2.00	3	0.0238917	(0.0100649; 0.39943)
3.00	3	0.0742156	(0.0312649; 1.24076)

Nivel de confianza individual = 99.2857%

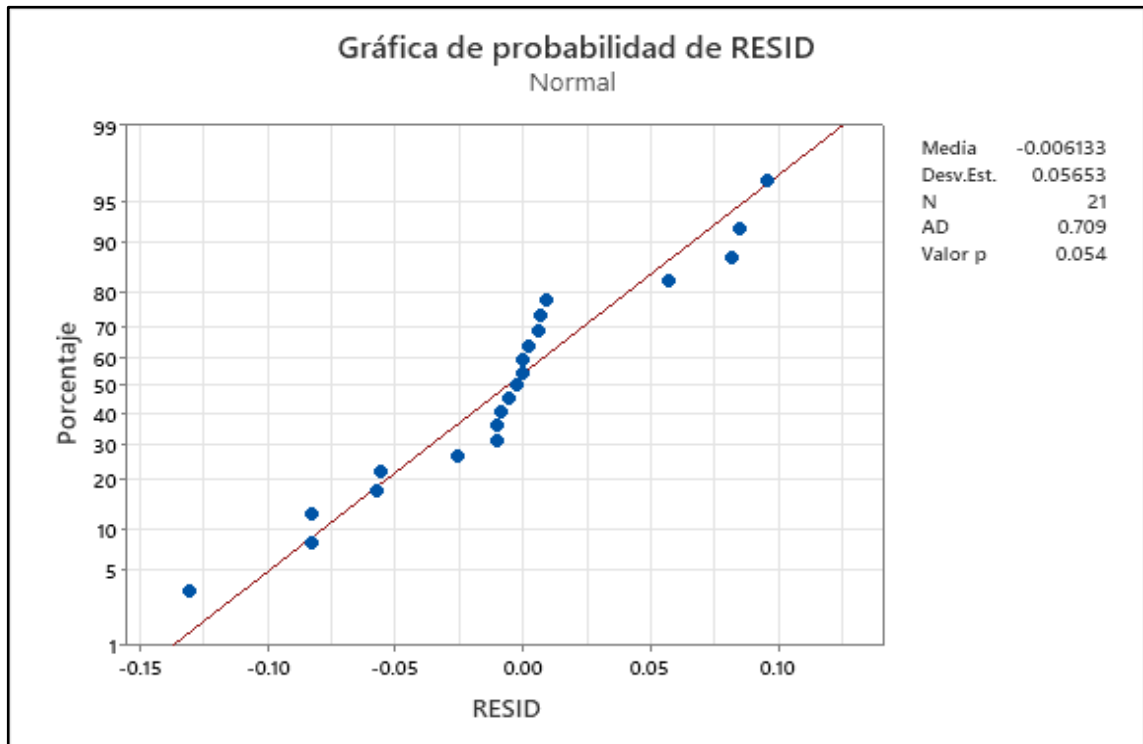
Hipótesis nula H_0 : Todas las varianzas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Por lo menos una varianza es diferente

Valor de P	Criterio de aceptación
0.152	$P > 0.05$

Como el valor de P es mayor que 0.05, se acepta la hipótesis nula y se concluye que las varianzas son iguales.

Asimismo, se realizó la prueba de distribución normal de los residuos para establecer si los datos se distribuyen de manera uniforme.



Prueba

Hipótesis nula H_0 : Los datos presentan una distribución normal

Hipótesis alterna H_1 : Los datos no presentan una distribución normal

Valor de P: 0.054

Como el valor de P es 0.054 entonces se afirma que los datos presentan una distribución normal.

**ANEXO 9. EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A UN
DETECTOR DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO**

