Erika Rodríguez Cavallo - Darío Mendez Cuadro
Albeiro Marrugo Padilla - Johana Márquez Lázaro

PERSPECTIVA ANALÍTICA Y PROTEÓMICA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS Y PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal

Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

Universidad de Cartagena

Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal

Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

COAUTORES
Albeiro Marrugo Padilla
Johana Márquez Lázaro

Cartagena de Indias, 2021

Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal
Autor(es): Erika Rodríguez Cavallo, Darío Méndez Cuadro
Coautores: Albeiro Marrugo Padilla, Johana Márquez Lázaro
Primera Edición
ISBN: 978-958-5439-43-6

Rector: Édgar Parra Chacón
Vicerrector de Docencia: Federico Gallego Vásquez
Vicerrector de Investigaciones: Leonardo Puerta Llerena
Vicerrector Administrativo: Gaspar Palacio Mendoza
Secretaria General: Katia Joly Villarreal

664.001579 / R696

Rodríguez Cavallo, Erika
Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal / Erika Rodríguez Cavallo y Darío Méndez Cuadro; Albeiro Marrugo Padilla y Johana Márquez Lázaro, coautores; Freddy Badrán Padauí, editor -- Cartagena de Indias: Editorial Universitaria c2021.

279 páginas; 24 x 17 centímetros; Ilustraciones
Incluye referencias bibliográficas
ISBN 978-958-5439-43-6

1. Residuos de Medicamentos Veterinarios 2. Residuos de plaguicidas – Análisis 3. Contaminación de alimentos 4. Residuos peligrosos I. Méndez Cuadro, Darío II. Badrán Padauí, Freddy, editor.

CEP: Universidad de Cartagena. Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación. Biblioteca José Fernández de Madrid.

Editor:
Freddy Badrán Padauí, Jefe de Sección de Publicaciones
Universidad de Cartagena
Derechos
©Editorial Universitaria, Centro, Calle de la Universidad, Cra. 6, N° 36-100,
Claustro de San Agustín, primer piso
Cartagena de Indias, 2021

Realizado el depósito legal
Todos los derechos reservados

Contenido

INTRODUCCIÓN **12**

CAPÍTULO I.
ASPECTOS GENERALES RELACIONADOS CON LOS ANTIBIÓTICOS Y PLAGUICIDAS **19**

1.1. TENDENCIAS DEL CONSUMO EN PRODUCCIÓN ANIMAL **21**

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTIBIÓTICOS **29**

1.2.1. Mecanismos generales de acción antibiótica 30

1.3. USO DE ANTIMICROBIANOS EN MEDICINA VETERINARIA **35**

1.3.1. Fines de su administración 36

1.3.2. Consecuencias de su utilización 37

1.4. LEGISLACIÓN Y CONTROL DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOSVETERINARIOS EN ALIMENTOS Y MEDIO AMBIENTE **40**

1.4.1. Marco Legal en la Unión Europea 41

1.4.2. Límites Máximos de Residuos (LMRs) 46

1.4.3. Situación en países no pertenecientes a la Unión Europea 51

1.5. REFERENCIAS **53**

CAPÍTULO II.
ANTIMICROBIANOS Y SU RETO ANALÍTICO. CASO: FLUOROQUINOLONAS **59**

2.1. GENERALIDADES **61**

2.2. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN **61**

2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA 65

2.4. REVISIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS Y FLUOROQUINOLONAS EN ALIMENTOS 72

2.4.1. Métodos de tratamiento de muestras de alimentos 72

2.4.1.1. Técnicas de extracción automatizadas 73

2.4.1.2. Técnicas de preconcentración y limpieza 76

2.4.2. Métodos de determinación de quinolonas 90

2.4.2.1. Métodos cromatográficos 90

2.4.2.2. Métodos basados en otras técnicas analíticas 94

2.5. RETOS ANALÍTICOS EN EL ABORDAJE DEL ANÁLISIS DE FLUOROQUINOLONAS EN LECHE BOVINA DEL MERCADO COLOMBIANO 96

2.5.1. Componente experimental 101

2.5.1.1. Reactivos y materiales 101

2.5.1.2. Instrumentación 101

2.5.1.3. Retos de la optimización de las condiciones cromatográficas 102

2.5.1.4. Optimización del procedimiento de preparación de muestra 106

2.5.1.5. Validación del método de acuerdo con la Directiva Europea 2002/657/EC 112

2.6. REFERENCIAS 116

CAPÍTULO III.
PLAGUICIDAS Y SU RETO ANALÍTICO 127

3.1. GENERALIDADES 129

3.1.1. Plaguicidas organofosforados 132

3.1.2. Plaguicidas organoclorados 137

3.2. USO DE PLAGUICIDAS EN CRÍA DE ANIMALES 139
3.3. ASPECTOS REGULATORIOS DEL USO DE PLAGUICIDAS 142
3.4. ASPECTOS ANALÍTICOS DE LOS PLAGUICIDAS 144
3.5. COMPONENTE EXPERIMENTAL EMPLEADO EN EL ANÁLISIS DE POPs y POCs 146
3.5.1. Instrumentación y reactivos 146
3.5.2. Optimización de la separación cromatográfica 147
3.5.3. Optimización del tratamiento de muestra 149
3.6. REFERENCIAS 151

CAPÍTULO IV.
PROTEÍNAS ALIMENTARIAS DE ORIGEN ANIMAL: UNA VISIÓN GENERAL DESDE LA PROTEÓMICA REDOX 155

4.1. GENERALIDADES 157
4.2. PROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL: USOS Y APLICACIONES 159
4.3. PROTEÍNAS DE LA CARNE DE BOVINOS Y AVES DE CORRAL 164
4.3.1. Proteínas sarcoplásmicas 167
4.3.2. Proteínas miofibrilares 167
4.4. PROTEÍNAS DE LA LECHE BOVINA 169
4.4.1. Caseínas 171
4.4.2. Proteínas del lactosuero 173
4.5. CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS 174
4.5.1. Métodos de cuantificación de proteínas carboniladas 177
4.6. REFERENCIAS 180

CAPÍTULO V.
RESIDUOS DE PLAGUICIDAS PROMUEVEN LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CARNE DE POLLO 187

5.1. INTRODUCCIÓN 189

5.2. METODOLOGÍA 190

5.2.1. Reactivos y materiales 191

5.2.2. Equipos 192

5.2.3. Soluciones de trabajo 194

5.2.4. Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras de estudio 195

5.2.5. Tratamientos in vitro 197

5.2.6. Extracción de proteínas 199

5.2.7. Cuantificación de proteínas e índice de carbonilos 200

5.2.8. Análisis estadístico 197

5.3. RESULTADOS 201

5.3.1. Carbonilación inducida por Clorpirifós en proteínas insolubles 201

5.3.2. Carbonilación inducida por Diazinón en proteínas insolubles 203

5.3.3. Carbonilación inducida por DDT en proteínas insolubles 205

5.3.4. Análisis comparativo de la carbonilación promovida por CPF, DZN y DDT 206

5.3.5. Efecto del almacenamiento sobre la carbonilación promovida por CPF, DZN y DDT 207

5.3.6. Relevancia de la oxidación de proteínas por residuos de plaguicidas 210

5.4. CONCLUSIONES 212

5.5. REFERENCIAS 212

CAPÍTULO VI.
RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y PLAGUICIDAS PROMUEVEN LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS EN LECHE BOVINA **215**

6.1. INTRODUCCIÓN **217**
6.2. METODOLOGÍA **219**
6.2.1. Obtención y almacenamiento de las muestras de estudio 219
6.2.2. Obtención de las fracciones proteicas 220
6.2.3. Cuantificación de proteínas 221
6.2.4. SDS–PAGE 222
6.2.5. Preparación de las muestras contaminadas 223
6.2.6. Determinación del índice de carbonilos por el método alcalino 224
6.2.7. Análisis estadístico 225
6.3. RESULTADOS **225**
6.3.1. Obtención de las fracciones proteicas 225
6.3.2. Cuantificación de proteínas 231
6.3.3. SDS-PAGE 233
6.3.4. Carbonilación de proteínas 236
6.3.4.1. Carbonilación inducida por las tetraciclinas 237
6.3.4.2. Carbonilación inducida por los β-lactámicos 240
6.3.4.3. Carbonilación inducida por los piretroides 241
6.3.4.4. Comparación de la carbonilación promovida por TCs, β-LTs y PTDs 243
6.4. CONCLUSIONES **246**
6.5. REFERENCIAS **247**

CAPÍTULO VII.
ALTERACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS COMO EFECTO DE LA CARBONILACIÓN INDUCIDA POR CONTAMINANTES AMBIENTALES EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL 251

7.1. INTRODUCCIÓN 253

7.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL 254

7.3. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE PROTEÍNAS 256

7.4. EL PAPEL DE LA DIGESTIBILIDAD SOBRE LA CALIDAD DE LAS PROTEÍNAS ALIMENTARIAS 259

7.5. FACTORES QUE AFECTAN LA DIGESTIBILIDAD DE LAS PROTEÍNAS 261

7.6. EFECTO DE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE SU DIGESTIBILIDAD 263

7.7. MATERIALES Y MÉTODOS 265

7.7.1. Reactivos y materiales 265

7.7.2. Equipos 266

7.7.3. Digestión gastrointestinal simulada 266

7.7.3.1. Digestión gastrointestinal simulada de proteínas aisladas 266

7.7.3.2. Digestión gastrointestinal simulada de proteínas no aisladas 268

7.7.4. Identificación de péptidos digeridos por espectrometría de masas en tándem 270

7.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 270

7.8.1. Efecto de la carbonilación inducida por Enrofloxacina y Danofloxacina sobre la digestión simulada de proteínas asiladas de carne bovina 270

7.8.2. Efecto de la presencia de residuos de clorpirifós en la oxidación de péptidos digeridos 274

7.9. CONCLUSIONES 275

7.10. REFERENCIAS 275

Introducción

En los últimos cincuenta años la población mundial prácticamente se ha duplicado, por lo que se han debido trazar distintas estrategias a fin de asegurar la disponibilidad de alimentos en la mesa de cada familia. Con este crecimiento, también aparecieron consumidores cada vez más conscientes de la importancia de la inocuidad de los alimentos disponibles en el mercado, por lo que la producción de alimentos ha sufrido en los últimos años un giro importante, no solo dirigido a elevar su disponibilidad, sino también hacia la obtención de productos con alta calidad.

Bajo este contexto, la cría intensiva de animales nace como una de las estrategias implementadas a nivel mundial para hacer frente a la creciente demanda, de modo que en pequeños espacios se han confinado grandes cantidades de cabeza de animales destinados a la producción de alimentos para el consumo humano.

No obstante, esta estrategia vino acompañada de retos que los productores de alimentos están experimentando:

- *El mantenimiento del bienestar animal,* desafiado por la propagación de enfermedades que pueden poner en riesgo toda la producción;
- *La competencia por la tierra, el agua y la energía* que demanda este tipo de práctica;
- La necesidad de *reducir los numerosos efectos negativos* que provoca sobre el medio ambiente;
- Garantizar buen ritmo y nivel de producción; y
- Cumplir con las *exigencias regulatorias del mercado alimentario internacional*, de modo que garanticen la producción de alimentos inocuos al consumidor y con alto valor nutricional.

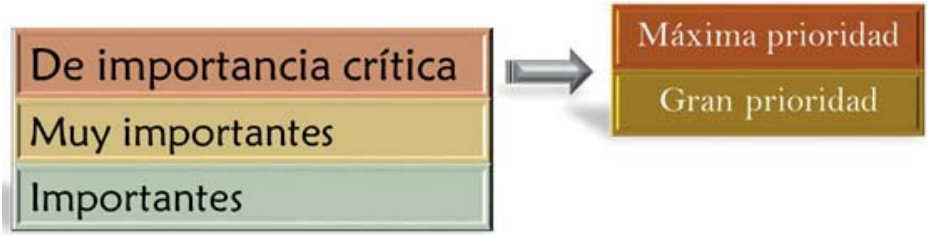
Evidentemente, estos desafíos requieren cambios radicales en la forma en que se produce, procesa, distribuye, almacena y accede a los alimentos, por lo que la *Seguridad Alimentaria* ha llegado a convertirse en un tema de permanente y creciente actualidad. Una amenaza a dicha seguri-

dad proviene de la medicina veterinaria, debido a la necesidad de los productores de mantener el bienestar animal y asegurar la producción. Sin embargo, el uso de medicamentos veterinarios y biocidas en la práctica ganadera puede dar lugar a la presencia de sus residuos en los alimentos de origen animal, como consecuencia de no respetar las indicaciones de administración o los tiempos de retiro recomendados.

Entre los medicamentos más utilizados en la cría intensiva se encuentran los *antimicrobianos*, que se administran a los animales de granja para combatir o prevenir infecciones bacterianas, e incluso para promover el crecimiento animal. Con frecuencia, estas sustancias se añaden al pienso o al agua de bebida, y aunque se trata de una práctica fundamental para garantizar la salud y el bienestar animal, es evidente que su utilización conlleva el uso irracional. De este modo, se pone en riesgo la inocuidad y calidad del alimento, promoviendo la aparición de riesgos en medicina humana, tales como pérdida de la eficacia terapéutica de antimicrobianos de uso común con la medicina veterinaria, la aparición de bacterias multifármaco-resistentes y manifestaciones alérgicas cada vez más severas, entre otras.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han estudiado durante años los problemas de salud relacionados con el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos. La situación actual es que muchos de los antimicrobianos de primera elección en clínica humana han perdido su efecto, y la resistencia bacteriana avanza a un ritmo mayor que aquel con el que lo hace el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas.

Esta condición llevó a que, desde 2005, la OMS actualizara la lista de antimicrobianos disponibles, agrupándolos en tres categorías, según su importancia clínica:



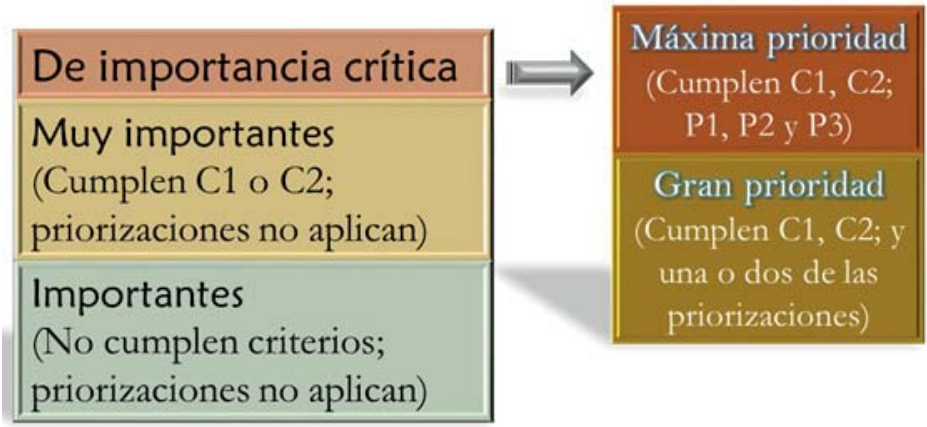
Esta categorización demuestra la importancia que supone la resistencia a los antimicrobianos para los sistemas de salud pública a nivel mundial, y por ende para la preservación del bienestar humano. Con ella, se busca garantizar que estos medicamentos, y en especial los de *importancia crítica* se utilicen de forma prudente, a fin de preservar su eficacia en clínica humana, dadas las consecuencias nefastas que tendría la pérdida de eficacia de los mismos.

El temor manifiesto por los organismos internacionales no es infundado, dado que muchos antimicrobianos autorizados para ser utilizados en medicina veterinaria son moléculas idénticas o muy similares a las indicadas en clínica humana, por lo que su mal manejo o uso irracional en la cría de animales destinados al consumo humano, supone un riesgo para la preservación de su eficacia.

Para la ubicación de los antimicrobianos en cada una de las categorías anteriores, se tomó como base el cumplimiento de los criterios C1 y C2 y las priorizaciones P1, P2 y P3. Donde **C1** hace referencia a las familias de antimicrobianos considerados como la *única o una de las pocas alternativas disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas graves en medicina humana*; **C2** a las familias de antimicrobianos utilizados para *tratar infecciones causadas por bacterias cuya fuente de transmisión no es humana, o que pueden adquirir genes de resistencia a partir de fuente distinta a la humana*; y los criterios de priorización **P1** a **P3**, a los antimicrobianos de frecuente prescripción en pacientes con enfermedades bacterianas graves en entornos de atención sanitaria, para las que se constituyen en la *única o una de las pocas alternativas de tratamiento* (**P1**), que *su*

empleo podría favorecer la selección de resistencias (**P2**) o que, por el contrario, corresponden a alternativas terapéuticas para tratar infecciones resistentes en humanos, cuya fuente de transmisión es no humana (**P3**).

De acuerdo con los criterios y priorizaciones mencionadas, la lista publicada por la OMS, y actualizada en 2017 referente a las exigencias que deben cumplirse en cada categoría, son las siguientes:



Los antimicrobianos disponibles para combatir infecciones en clínica humana quedaron clasificados de la siguiente manera:

Como se puede observar, el panorama del control de bacterias multifármaco-resistentes en medicina humana es un desafío que requiere de la participación y el compromiso de los distintos sectores involucrados en su uso, incluidos el agrícola y el pecuario, considerando que la cadena alimentaria constituye una de las principales fuentes de trasmisión de bacterias y residuos de antimicrobianos.

En forma similar a los antimicrobianos, la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos representa un importante riesgo para la salud humana. Estas sustancias, frecuentemente utilizadas en el control de plagas que atacan a los cultivos, también poseen amplia aplicación en la cría intensiva de animales, donde se utilizan para controlar ectoparásitos que comprometen el bienestar animal. La exposición a estas sustancias, a través de piensos contaminados y/o soluciones tópicas (aspersión, baños y aerosoles), conduce a la presencia de sus residuos en los alimentos. Los daños que pueden causar a la salud humana, van desde diabetes, alteración endocrina, trastornos neurológicos y sensoriales, hasta genotoxicidad y carcinogénesis.

Para proteger la salud del consumidor y garantizar la inocuidad de los alimentos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Codex Alimentarius, Comisión Europea y la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), han establecido el Límite Máximo de Residuos (LMR) permitidos según el tipo de sustancia de uso veterinario, tipo de animal y tejido diana; sin embargo, este valor no garantiza que la presencia del residuo veterinario no ejerza un efecto negativo sobre el alimento, ni cómo tal efecto pueda repercutir en la asimilación por parte del consumidor o en la amenaza a su salud.

Ante la problemática descrita, en los últimos años nuestras investigaciones han tenido dos enfoques: desarrollar y validar métodos analíticos basados en el uso de extracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida (SPE-LC-DAD) para determinar residuos de fluoroquinolonas y

plaguicidas en carne y leche bovinas; y evaluar el efecto de concentraciones en torno al LMR de esas sustancias sobre la carbonilación proteica, valorando su capacidad para afectar la calidad de estas, y su impacto sobre la solubilidad y digestibilidad de las mismas.

En este sentido, en los siguientes capítulos hemos discriminado: los retos que caracterizan el desarrollo de métodos analíticos útiles en la determinación de residuos de fluoroquinolonas y plaguicidas en este tipo de matrices; los desafíos en el desarrollo de modelos *in vitro* para evaluar el efecto de concentraciones próximas al LMR de cada sustancia, sobre la carbonilación de proteínas; y la valoración de la carbonilación inducida, sobre aspectos como la solubilidad y digestibilidad de las proteínas de interés. Esto, considerando que el elevado contenido proteico de estos alimentos y su "aporte a la nutrición humana" son parámetros determinantes en la decisión de compra de un consumidor.

Capítulo 1

Aspectos generales relacionados con los antibióticos y plaguicidas

Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

1.1. Tendencias del consumo en producción animal

Los antibióticos (o antimicrobianos, en sentido general) son sustancias que se utilizan en el tratamiento de patologías infecciosas causadas por microorganismos. Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, estas sustancias han contribuido de manera notable a mejorar la salud, tanto de los seres humanos como de los animales.

Los primeros antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria eran de origen natural, producidos por microorganismos (hongos o bacterias). Hoy en día, se producen de forma sintética o semisintética mediante modificación química de aquellos de origen natural. Así, el término antibiótico hace referencia a cualquier sustancia química, de origen natural o sintético, capaz de frenar el desarrollo de microorganismos patógenos por su acción bacteriostática o de causar la muerte de los mismos por su acción bactericida [1].

La comunidad científica ha manifestado en los últimos años gran preocupación por el alarmante incremento de bacterias patógenas multifármaco-resistentes [2, 3]. A nivel global, la resistencia a los antibióticos se identifica como un problema que amenaza la efectividad de tratamientos en humanos, cría de animales, agricultura, medio ambiente, comercio y, en definitiva, la economía mundial. Se estima que de no tomarse medidas con carácter urgente, en aproximadamente 35 años los decesos por infecciones causadas por este tipo de bacterias pasará a ser la primera causa de muerte, por encima del cáncer [4].

A pesar de este panorama, numerosas publicaciones científicas evidencian la relación entre el uso indiscriminado de antimicrobianos en animales y la aparición de cepas bacterianas resistentes. No es desconocido que desde varios años atrás, la cría intensiva de animales viene haciendo uso de estas sustancias, no solo con el fin de mantener su bienestar, sino también como promotores del crecimiento, especialmente en la cría de ganado bovino, porcino y aves de corral.

Aunque existen diversas hipótesis asociadas al efecto de los antibióticos sobre la promoción del crecimiento animal, que van desde la supresión de enfermedades, supresión de bacterias comensales, promoción de la síntesis de vitaminas y factores de crecimiento hasta reducción de la movilidad intestinal, aún se desconoce claramente el mecanismo por el que estas sustancias actúan cuando se administran con esta finalidad; no obstante, al suministro de dosis subterapéuticas por largos períodos de tiempo se sigue atribuyendo la ganancia acelerada de peso en el animal. Esta práctica es tan marcada entre los sistemas productores, que se ha llegado a establecer que el consumo de antibióticos destinado a la alimentación animal supera significativamente al dirigido a terapia humana.

El uso de antibióticos como promotores de crecimiento se considera ilegal en países miembros de la Unión Europea, pero legal en Estados Unidos y la mayoría de países en vía de desarrollo, despertando la preocupación de organismos internacionales, al punto de recomendar su vigilancia y control, dada la evidente amenaza que esta práctica representa para la medicina humana. Esta situación pone de relieve la necesidad de armonizar las legislaciones y establecer estrategias que se adopten a nivel mundial para reducir el uso de antimicrobianos en medicina humana, veterinaria, producción animal y protección de cultivos, de modo que pueda construirse un cerco que limite la velocidad con que aparecen los problemas de resistencia en clínica humana, en tanto se desarrollan nuevas alternativas terapéuticas.

En consonancia con estas intenciones, algunos autores manifiestan que el impacto positivo de emplear antimicrobianos en la cría de animales es tan bajo, que los beneficios marginales generados no se verían compensados frente al costo que significaba la adquisición de este tipo de sustancias, además estos concluían que mejoras en las condiciones de vida de los animales permitían los mismos beneficios sin incurrir en las implicaciones del uso de antimicrobianos durante la cría [5]. Este ejercicio ha sido realizado en países escandinavos, donde se ha demostrado que es posible reducir hasta en un 58% el empleo de este tipo de sustancias en el sector pecuario, sin que se observen mermas en la producción.

Lamentablemente, este comportamiento no es el generalizado, pues se estima que solo en el año 2010, se consumieron aproximadamente 63.000 toneladas de antibióticos, empleados en la cría de cabezas de ganado a nivel mundial [6]. De este modo, se proyecta que para el año 2030, cuando el crecimiento de la población mundial generará una alta demanda sobre este tipo de productos, asegurar su disponibilidad conllevará el consumo de al menos un 60% más, equivalente a unas 105.000 toneladas [7]. En ese período de observación, se identifica a China, Estados Unidos, Brasil, Alemania, India, México, Indonesia, Myanmar, Nigeria, Perú y Filipinas como los países que seguirán destinando la mayor cantidad de antibióticos en la cría de animales.

Ya sea que la finalidad de uso de antimicrobianos sea terapéutica, profiláctica o como promotor de crecimiento, su administración en la cría intensiva de animales de granja y acuicultura puede dar lugar a la presencia de residuos de estas sustancias, o sus metabolitos, en los alimentos de origen animal. El consumo de alimentos contaminados puede desencadenar procesos alérgicos en las personas u otras patologías, y contribuir a la selección de bacterias fármaco-resistentes en el intestino humano, si no se respetan las indicaciones de administración o los tiempos de espera recomendados para los animales que están siendo medicados. Además, desde el punto de vista ambiental, la bioacumulación de antibióticos en los residuos ganaderos como estiércol, purines, etc. puede originar problemas medioambientales de contaminación de aguas y suelos [8].

En 2017, en el marco de los programas de control de residuos de medicamentos en alimentos de origen animal, llevados a cabo en la Unión Europea, se analizó en total 109.260 muestras para determinar la presencia de residuos de antibióticos, identificándose 284 (0,26%) no conformes [9]. En la mayoría de los casos, la aparición de estos residuos se atribuye al abuso, mala práctica en la administración de estas sustancias o la no observancia de los tiempos de retiro. Por ello, la determinación de residuos de antimicrobianos en alimentos ha despertado un creciente

interés entre los organismos internacionales de salud y la comunidad científica internacional, que a la fecha ha publicado centenares de artículos reportando nuevos métodos analíticos útiles para la determinación de estas sustancias, entre otras.

Los sistemas de salud pública mundiales, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconocen que el problema de la presencia de residuos en alimentos de origen animal se ha agravado por la globalización del mercado alimentario, cuyo comercio precisa la armonización de las leyes que controlan su venta y adquisición, de modo que se garantice la seguridad y calidad de los alimentos a escala mundial [10].

Lamentablemente, la flexibilidad en los sistemas regulatorios de varios países dificulta la esperada armonización, por lo que la situación actual muestra que muchos de los antimicrobianos de primera elección en clínica humana han perdido su efecto y la resistencia bacteriana avanza a un ritmo mayor que la investigación dirigida al descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas. El elevado número de reportes internacionales permite identificar un número creciente de bacterias patógenas resistentes, evidenciando la velocidad con que pierden eficacia los antimicrobianos disponibles para tratarlas. Infecciones frecuentes como las urinarias y aquellas relacionadas con la enfermedad diarreica dan cuenta de ello. Por ejemplo, entre los reportes de 33 países, *ciprofloxacina*, una *fluoroquinolona* de amplio espectro, utilizada en el tratamiento de infecciones urinarias, mostró una tasa de resistencia que varió entre 8,4 y 92,9%. Este panorama es aún más desalentador ante las condiciones de la actual pandemia por COVID-19, ya que se reporta un uso inadecuado de antimicrobianos, bien por inconvenientes relacionados con la automedicación, o por su prescripción como tratamiento o profilaxis, en pacientes con un estado moderado de evolución de la infección, opuesto a lo sugerido por organismos internacionales [11].

Como se muestra en la Tabla 1.1, a pesar de los avances científicos, tecnológicos y a la mejora general de los sistemas de producción y de control alimentarios, la presencia de contaminantes de origen microbiológico o químico en los alimentos sigue planteando numerosos problemas sanitarios en la actualidad, tanto para países desarrollados como en vías de desarrollo.

Tabla 1.1 Ejemplos de algunos agentes microbiológicos y químicos presentes en alimentos.

Microorganismos patógenos
Agentes zoonóticos que pueden entrar en la cadena alimentaria (*Brucella*, *Salmonella sp*, priones)
Transmitidos por alimentos (*Listeria monocytogenes*, *Trichinella*, *Toxoplasma gondii*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *E. Coli* O157:H7, *Vibrio vulnificus*)
Emergentes (*Salmonella enteritidis*, virus de hepatitis A, virus de Norwalk y semejantes)
Resistentes a los antimicrobianos (*Salmonella typhimurium* DT104)
Contaminantes químicos
Sustancias tóxicas presentes de forma natural (biotoxinas marinas, micotoxinas)
Ambientales o industriales (mercurio, plomo, bifenilos policlorados, dioxinas, radionucleidos)
Residuos de plaguicidas, medicamentos veterinarios y agentes desinfectantes
Sustancias tóxicas transmitidas por contacto alimento-envase u otros materiales
Alérgenos, disruptores endocrinos

Paralelo a los inconvenientes derivados del uso de antimicrobianos en cría intensiva animal, se encuentran los proporcionados por el uso de plaguicidas. Como quiera que se trata de sustancias identificadas como

nocivas al hombre, su presencia en el alimento crea una condición aún más crítica que la de los antimicrobianos, haciendo aún más urgente la necesidad de armonizar las leyes del comercio internacional alimentario para este tipo de sustancias. Este es un interés aún mayor, si se considera que grupos sensibles de la población, como los niños, mujeres en embarazo y personas de la tercera edad, se identifican como los mayores consumidores de proteínas de origen animal, dadas sus necesidades nutricionales.

Al igual que con los antimicrobianos, la comunidad científica ha aportado evidencia suficiente sobre la presencia de residuos de plaguicidas, como los organoclorados, organofosforados y piretroides, en alimentos de origen animal. Un análisis de la información disponible permite observar que el nivel de concentración de estos residuos varía en función del tejido animal, tipo de sustancia y lugar de procedencia del alimento, evidenciando los problemas de la falta de armonización y las dificultades para un comercio alimentario seguro.

El uso constante, excesivo e irracional de antimicrobianos y plaguicidas ejerce un impacto en:

- *Salud pública,* al asociarse a patologías como cáncer, alteración endocrina, comportamiento neurológico deficiente en humanos y animales, diabetes y enfermedades inmunológicas;

- *Economía*, al bloquear las transacciones comerciales por incumplimiento aduanero, limitar el comercio y la competitividad de países poco tecnificados, cuya condición empeora gracias a deficientes programas de vigilancia y control gubernamentales, e irónicamente, pérdidas económicas derivadas de la aparición de organismos resistentes que enferman y matan a los animales, disminuyendo la productividad;

- *Medio ambiente,* derivado bien sea de la eliminación de la molécula original y/o sus metabolitos por la orina, heces o secreciones animales

como la leche; o bien de los excesos provocados por su aplicación mediante aspersión, llegando al suelo o fuentes de agua donde pueden persistir o degradarse afectando el ecosistema. Una práctica habitual es la compra de heces obtenidas de la ganadería intensiva, conocida como "gallinaza", para ser utilizada como alimento para el propio ganado o fertilizante de suelo, conduciendo a la contaminación medioambiental y el deterioro de la calidad del alimento animal para consumo humano.

Con el objeto de preservar y garantizar la eficacia de los antimicrobianos en medicina humana, y de controlar el uso de plaguicidas en la producción de alimentos, el *códex alimentario* y los entes regulatorios del comercio internacional, acordaron una concentración máxima a la que es permitido encontrar residuos de estas sustancias en alimentos de origen animal destinados al consumo humano. Este valor se conoce como el Límite Máximo de Residuo (LMR) , establecido por familia de antimicrobianos y plaguicidas, y en función del tipo de animal y tejido diana; asimismo, se establecieron los tiempos de espera que deben observarse entre el tratamiento aplicado al animal y su sacrificio o uso de un derivado (leche) para evitar la presencia de residuos en los alimentos, de modo que se puedan garantizar niveles técnicamente seguros de estas sustancias en los alimentos [12, 13].

En la actualidad, los residuos de antimicrobianos no están regulados para alimentos procesados, como es el caso de los alimentos infantiles. Esta situación es especialmente preocupante en el caso de preparados para lactantes y niños menores de dos años, para los que la leche constituye el único o uno de los principales soportes nutricionales; por lo tanto, es vital garantizar su inocuidad, ya que no es fácil prever las consecuencias de una exposición crónica a un coctel de estas sustancias en una etapa tan sensible de la vida humana.

De momento, solo se ha establecido una regulación para residuos de pesticidas y micotoxinas en leches de fórmula infantil y cereales infantiles [14].

Por otra parte, la presencia de residuos de antibióticos y plaguicidas en aguas residuales, de ríos y otras corrientes superficiales, los categoriza entre los denominados contaminantes emergentes, al ser compuestos que se vierten en el agua y no poseen una regulación que vigile ni controle su presencia en este tipo de muestras ambientales, suponiendo, por tanto, un problema sanitario y ambiental [15, 16]. Los antimicrobianos a diferencia de otros contaminantes prioritarios, presentan efectos farmacológicos incluso a bajas dosis y su concentración en los distintos compartimentos medioambientales puede variar dependiendo de factores como los estacionales [16]. Así, todos los aspectos relacionados con la presencia, transporte y degradación de antibióticos, o sus metabolitos en el medioambiente, se han convertido en prioritarios para la comunidad científica y las autoridades competentes.

Ante este panorama los organismos mundiales han trazado estrategias dirigidas a racionalizar el uso de estas sustancias, tanto en medicina humana como en veterinaria, pues de seguir al ritmo con que aparecen las pérdidas de eficacia, en tiempos donde se han celebrado tantos avances en medicina diagnóstica y de tratamiento, la vida humana se está viendo amenazada por la presencia de microorganismos altamente resistentes que aún pueden ser adquiridos en quirófanos, y ante muchos de los cuales no se cuenta ya con alternativas terapéuticas.

La implementación de programas de vigilancia y control que regulen la presencia de estas sustancias en los alimentos son fundamentales para enfrentar estos inconvenientes. Estos programas requieren disponer de metodologías analíticas sensibles, sencillas y de bajo coste (aspecto muy importante en países en vías de desarrollo), que permitan realizar controles rutinarios de este tipo de sustancias, tanto en alimentos como en el medioambiente. Por tanto, el enfoque de nuestras investigaciones en los últimos años se ha dirigido tanto al desarrollo de estos métodos, como a evaluar el impacto que la presencia de dichos residuos puede provocar sobre la calidad de las proteínas mayoritarias de alimentos de origen animal destinados al consumo humano.

1.2. Características generales de los antibióticos

El origen de la palabra antibiótico viene del griego "*anti*" (contra) y "*bios*" (vida). Un antibiótico es una sustancia producida por un microorganismo (hongos filamentosos, bacterias y actinomicetos), que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos por su acción bactericida. En la actualidad, esta definición se ha extendido con el fin de incluir no solo las sustancias de origen natural sino también los derivados semisintéticos y quimioterápicos que se obtienen por síntesis química, con los que se persigue extender el espectro antimicrobiano, reducir la toxicidad para el paciente y/o combatir la resistencia.

Normalmente, un antibiótico es un agente inofensivo para el huésped, aunque, ocasionalmente, puede producir una reacción adversa al medicamento (alergia) o afectar la microbiota.

La disponibilidad de los antibióticos ha sido uno de los logros más importantes de la medicina moderna, si se considera su papel en la prevención, cura y disminución de la transmisión de determinadas enfermedades infecciosas. Su inclusión dentro del arsenal terapéutico consiguió una disminución significativa de la morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades devastadoras hasta hace algunos años.

La era de los antibióticos comenzó en los años 30 con la introducción de las sulfonamidas, y continuó con la aplicación de la penicilina en los años 40. Al éxito clínico de esta última, siguió una búsqueda intensiva de nuevos compuestos. Así, durante los años 40 y hasta comienzos de los 70, el desarrollo y la producción de nuevos antibióticos se incrementó de forma exponencial. Entre los compuestos con mayor éxito antimicrobiano destacan los β-lactámicos, glicopéptidos, aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos.

A partir de los años 70 se produjo un declive en la búsqueda de nuevos compuestos. De esta forma, pasaron casi 30 años hasta la aparición de

un nuevo grupo de antimicrobianos: las oxazolidinonas, compuestos sintéticos que se empezaron a comercializar en el año 2000 [17].

A modo de resumen, la Figura 1.1 muestra un diagrama con las fechas aproximadas de la introducción en la práctica clínica de diversos grupos de antibióticos.

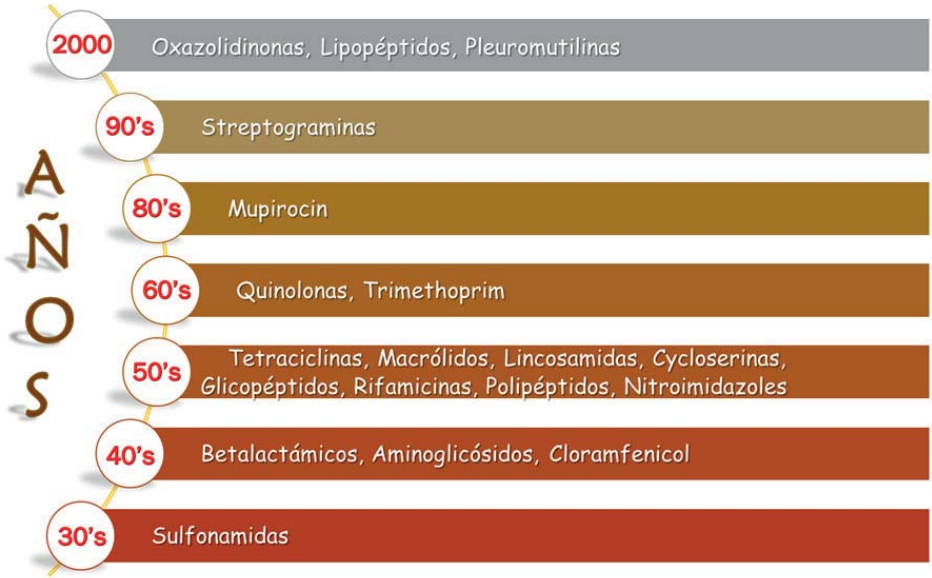


Figura 1.1 Línea de tiempo de los antibióticos. Se muestran las décadas en que se introdujeron las familias de antibióticos utilizados en la práctica clínica.

1.2.1. Mecanismos generales de acción antibiótica

La acción de los antibióticos afecta directamente algunos componentes esenciales de la multiplicación celular, o estructuras celulares necesarias para el mantenimiento de la vida de la bacteria. Dentro del amplio grupo de antibióticos unos en particular inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos), mientras que otros ejercen una acción letal para la bacteria (bactericidas), aunque los límites de ambos conceptos se consideran en la actualidad un tanto difusos. Una de las clasificaciones más utilizadas se basa en la diana molecular sobre

la que actúan. Así, como se muestra en la Tabla 1.2, se establecen cuatro grupos principales [18], cuyas características se resumen a continuación:

1. Inhibidores de la síntesis de la pared celular.
Los antibióticos de este grupo actúan interfiriendo en distintas etapas de la biosíntesis de peptidoglicanos, elementos esenciales de la pared celular bacteriana, bien sea intracelularmente como en el caso de la fosfomicina y la D-cicloserina, o extracelularmente como ocurre con los β-lactámicos, que interaccionan con las proteínas encargadas del ensamblaje del peptidoglicano. En último término, los defectos de la pared celular provocan la lisis celular y muerte bacteriana. Por eso los antibióticos de este grupo son considerados como bactericidas. En la Figura 1.2 se ilustran algunas de las principales estructuras de los β-lactámicos más usados.

Tabla 1.2 Clasificación de los antibióticos según su modo de acción.

Grupo antimicrobiano	**Ejemplos**	**Diana molecular**
Inhibidores de la pared celular		
β-Lactámicos	Penicilina G	Proteínas de unión a penicilinas
	Ceftriaxona	
	Imipenem	
	Aztreonam	
Glicopéptidos	Vancomicina	Precursores de la pared celular
Fosfonatos	Fosfomicina	Enolpiruvato-transferasa
Inhibidores de la síntesis proteica		
Aminoglucósidos	Gentamicina	Subunidad ribosomal 30S
	Estreptomicina	
	Kanamicina	

Tetraciclinas	Doxiciclina	Subunidad ribosomal 30S
Macrólidos	Eritromicina	Subunidad ribosomal 50S
Lincosamidas	Clindamicina	Subunidad ribosomal 50S
Anfenicoles	Cloranfenicol	Subunidad ribosomal 50S
Inhibidores de los ácidos nucleicos		
Sulfonamidas	Sulfonamida	Síntesis de ácido fólico
Trimetoprima	Trimetoprima	Síntesis de ácido fólico
Quinolonas	Ciprofloxacina	ADN-girasa, topoisomerasas
Rifamicinas	Rifampicina	ARN-polimerasa
Antibióticos que afectan a la integridad de la membrana citoplásmica		
Polimixinas	Polimixina E (colistina)	Membrana celular
Ionóforos	Monensina	Membrana celular
	Lasalocida	
	Salinomicina	

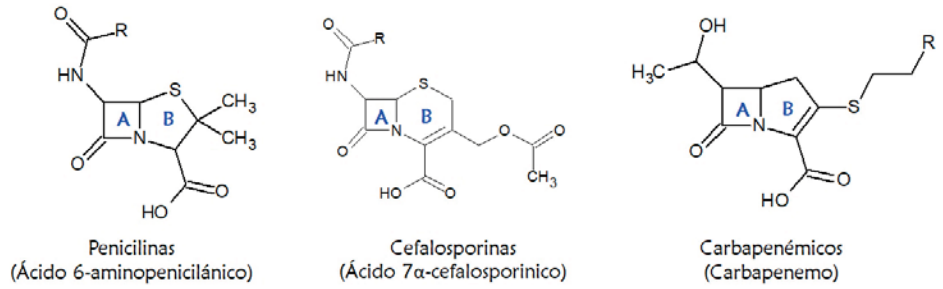


Figura 1.2 Estructuras de algunos antibióticos β-lactámicos. Las imágenes muestran los sistemas bicíclicos para tres tipos de antiobióticos β-lactámicos, con el nombre de su núcleo entre paréntesis. Note que todos contienen un anillo heterocíclico de cuatro átomos **(A)**, denominado β-lactam-azetidinona. El anillo **(B)** fusionado al primero es propio de cada tipo de β-lactámico.

2. Inhibidores de la síntesis proteica.

Se trata de uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos. La diana molecular de estos antibióticos son los ribosomas. La inhibición selectiva de estos macro-complejos supramoleculares de ARN y proteínas es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas.

La unión del antimicrobiano al ribosoma ocasiona una parada en la traducción del ARN mensajero, o inhibición de la transpeptidasa, lo que impide la síntesis de proteínas. La interferencia puede producirse con la subunidad ribosómica 30S (aminoglucósidos y tetraciclinas) o con la subunidad 50S (cloranfenicol, macrólidos, axazolidinonas y lincosamidas). La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas. La Figura 1.3 muestra las estructuras químicas de los principales antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas bacterianas.

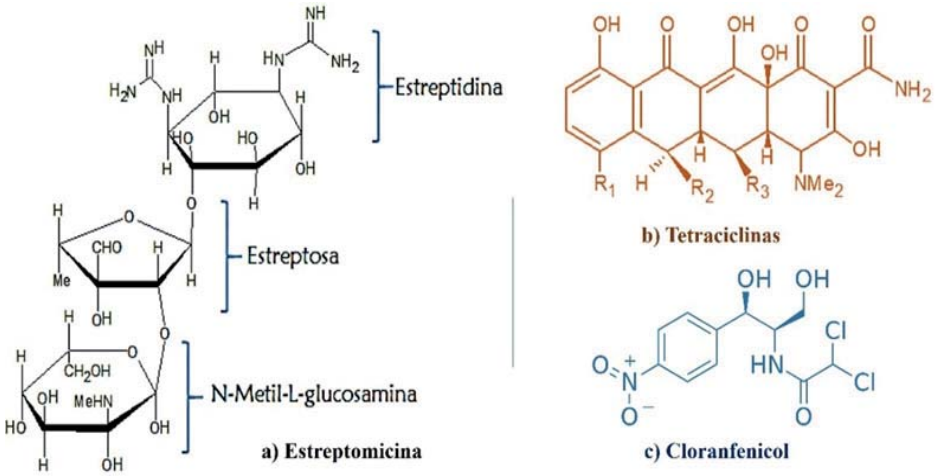


Figura 1.3 Estructuras de algunos antibióticos inhibidores de síntesis proteica. Las imágenes muestran la estructura de: (**a**) el aminoglicósido estreptomicina; (**b**) el núcleo de las tetraciclinas y (**c**) el cloramfenicol. Aunque los tres antibióticos poseen el mismo tipo de efecto sobre la síntesis proteica, su variedad estructural impone retos analíticos al momento de su determinación en los métodos multiclase.

3. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.

Los antibióticos de esta clase inhiben alguno de los componentes esenciales que participan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Dentro de este grupo se incluyen las rifamicinas y quinolonas, que actúan sobre enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, así como los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN. En el caso de las quinolonas (Figura 1.4), estas inhiben la acción de las enzimas topoisomerasas II (ADN girasa) y IV, encargadas de controlar el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN.

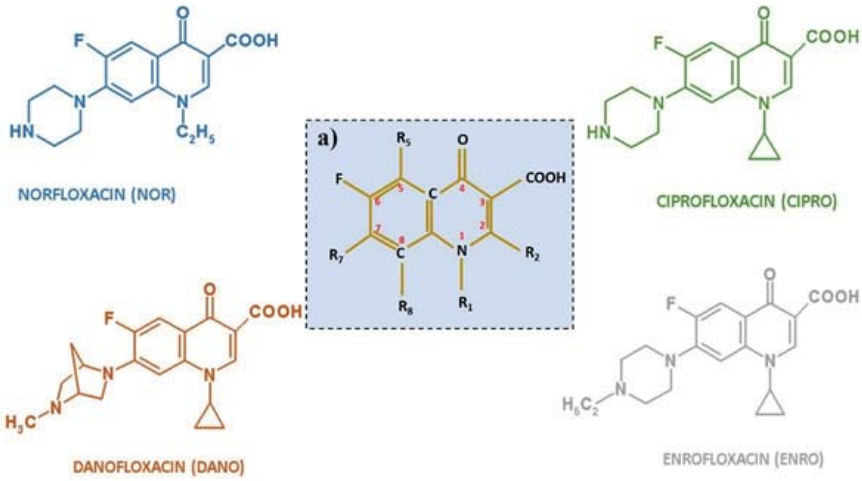


Figura 1.4 Estructuras de algunos antibióticos inhibidores de síntesis de ácidos nucleicos. (a) Núcleo base de las fluoroquinolonas, bactericidas con mayor potencia y amplio espectro antimicrobiano; y la estructura de las principales FQs utilizadas en medicina humana (CIPRO, NOR) y veterinaria (DANO, ENRO).

4. Antibióticos que afectan a la membrana citoplásmica.

La membrana citoplásmica es vital para todas las células ya que controla la composición del medio interno celular. Los antibióticos de este grupo afectan a la organización estructural de la membrana, desorganizándola o aumentando su permeabilidad. A este grupo pertenecen las polimixinas y los ionóforos (Figura 1.5).

En resumen, se consideran bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo en algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos.

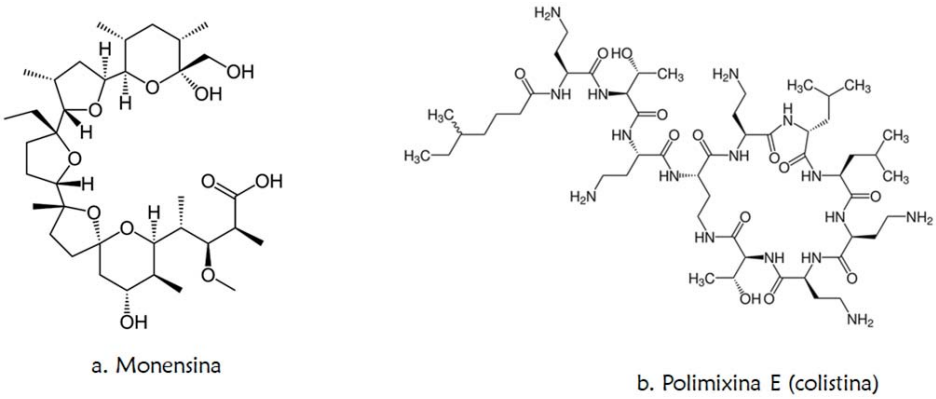


Figura 1.5 Estructuras de algunos antibióticos que afectan la membrana citoplásmica. a. Estructura de la monensina un antibiótico del grupo de los ionoforos. **b**. Estructura de la polimixina E, un antibiótico del grupo de las polimixinas.

1.3. Uso de antimicrobianos en medicina veterinaria

En los últimos 50 años la cría intensiva de animales destinados a la producción de alimentos para consumo humano se ha vuelto más eficiente, gracias a factores como la medicina veterinaria preventiva, la selección genética y las mejoras introducidas en la nutrición y la gestión de las explotaciones ganaderas.

Este modelo de cría aplicado a numerosas explotaciones ganaderas, se caracteriza por concentrar un gran número de animales en un espacio reducido (Figura 1.6). En estas condiciones las infecciones pueden dañar seriamente la productividad de la explotación, gracias a la velocidad con que puede diseminarse entre los animales confinados, provocando precarias condiciones de salud en estos.

En este tipo de explotaciones, en las que tratar a cada individuo por separado es prácticamente imposible, gana mucha importancia la adición de antibióticos y otros medicamentos al pienso o al agua de bebida para prevenir enfermedades o en caso necesario, tratar a toda la población animal. Desde el punto de vista de las "buenas prácticas veterinarias", el uso de antimicrobianos es una cuestión importante, ya que contribuye al bienestar animal, facilitando el control de las enfermedades y la rentabilidad de las explotaciones ganaderas.

Figura 1.6 Modelos de cría intensiva de animales de granja.

1.3.1. Fines de su administración

Los antibióticos se utilizan con diversos fines en medicina veterinaria. En primer lugar, al igual que sucede en medicina humana, se utilizan como agentes terapéuticos para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas, o también pueden ser usados con fines profilácticos para la prevención de enfermedades en animales individuales o grupos de estos, aplicándose dosis subterapéuticas del agente antimicrobiano. Gracias a este tipo de práctica, ha disminuido por ejemplo, la incidencia de la mastitis en el ganado vacuno, sin

embargo, su administración es una de las principales causas de la presencia de residuos antimicrobianos en la leche.

La utilización de antibióticos en las prácticas veterinarias también puede tener una vertiente zootécnica, directamente relacionada con la estimulación de la producción animal (como el aumento del índice de fertilidad y la tasa de reproducción, promoción del crecimiento, etc.), aunque el mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no está claramente establecido [19]. En estos casos, se administran dosis subterapéuticas durante períodos muy prolongados de tiempo, que pueden afectar la estructura de la población de la microbiota intestinal y provocar la ganancia de peso del animal [20].

A este respecto, y desde principios del año 2006, la Unión Europea ha prohibido el empleo de antimicrobianos como promotores del crecimiento (Reglamento 1831/2003/CE) [21]. No obstante, esta práctica está autorizada en Estados Unidos, Australia y países en vías de desarrollo. Estas diferencias en la normativa aplicada en los distintos países pone de manifiesto la importante controversia que gira en torno a este tipo de uso.

En cualquier caso, el empleo de estas sustancias supone un riesgo potencial para la salud pública, en la medida en que pueden aparecer residuos de antimicrobianos (o sus metabolitos) en los alimentos obtenidos de los animales tratados, por lo que se pueden transferir bacterias fármacoresistentes de origen animal a través de la cadena alimentaria.

1.3.2. Consecuencias de su utilización

Los problemas asociados a la utilización de antimicrobianos en las prácticas veterinarias pueden surgir a distintos niveles:

1. Sanitarios.
Clásicamente asociados a reacciones alérgicas que afectan a individuos sensibles. Las bajas concentraciones de antibióticos alergénicos no alcan-

zan para sensibilizar pacientes, pero sí para desencadenar reacciones que, aunque en general no son graves, eventualmente pueden llegar a serlo (anafilaxia).

La toxicidad de los antibióticos es difícil de demostrar debido a las bajas concentraciones de este tipo de sustancias. Una clara excepción es el cloramfenicol, que a dosis muy bajas es capaz de producir anemia aplásica irreversible en individuos potencialmente susceptibles. Esta es la razón por la cual el empleo de este antimicrobiano se ha prohibido en algunos países. Sin embargo, el riesgo sanitario mayor que implica la utilización de antibióticos en animales es el desarrollo de resistencias bacterianas, debido a la selección de formas resistentes en el ecosistema huésped, que una vez transmitidas al hombre, resultan más resistentes dado que los humanos consumimos antibióticos similares a los de uso veterinario.

La ruta principal de transmisión de estos microorganismos patógenos resistentes es el contacto directo con los animales que están siendo tratados (veterinarios, granjeros, etc.). No obstante, otra vía alternativa más general es el consumo o manipulación de productos de origen animal contaminados con flora resistente a los antimicrobianos. Si bien la antibióticorresistencia proviene principalmente del uso clínico incorrecto, existen pruebas significativas de la diseminación de ciertos géneros de bacterias resistentes desde los animales a los seres humanos (ej. Salmonella, Campilobacter, Enterococcus) [2].

2. Tecnológicos.

La presencia de residuos de antimicrobianos puede afectar las propiedades tecno-funcionales de los alimentos; así por ejemplo, se puede inhibir o retardar el crecimiento de las bacterias lácticas necesarias para la fabricación de queso y yogur durante su proceso de fermentación (por ejemplo, *Bifidobacterias, Lactobacillus*, etc.). Ello ocasiona mayores costos de elaboración y una alteración del programa de producción, que implica una pérdida de rentabilidad para las empresas. Las bacterias lácticas son sensibles a los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la masti-

tis, particularmente a la penicilina, la cual solo pierde el 8% de su actividad tras la pasteurización de la leche y el 50% con la esterilización [22].

Entre los principales problemas que se presentan al procesar leche con residuos de antimicrobianos están: la formación de una cuajada inadecuada durante la elaboración del queso, lo que induce una maduración inadecuada del mismo; la disminución de la producción de acidez durante el proceso de elaboración de productos fermentados; y la disminución del crecimiento de los cultivos lácticos, cuando se propagan en leche en polvo reconstituida [23].

3. Analíticos.
Los residuos de antibióticos pueden inhibir el desarrollo de la flora microbiana que ha contaminado un alimento, y cuando se realiza el análisis bacteriológico, la presencia de patógenos puede pasar desapercibida. Así, se produciría un alimento potencialmente peligroso o de mala calidad bacteriológica, cuyos patógenos se desarrollarán una vez suprimido el efecto inhibidor de los antibióticos.

4. Medioambientales.
Actualmente, los antimicrobianos se incluyen dentro del grupo de los denominados "contaminantes farmacéuticos y productos de higiene personal" o PPCPs (siglas del inglés: Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants) [24].

Estudios realizados en los últimos años en distintos países han confirmado la presencia de antibióticos a bajos niveles de concentración en el medioambiente ($ng.L^{-1}$ - $\mu g.L^{-1}$) [25]. Su origen puede atribuirse a distintas fuentes que incluyen: la excreción en la orina y heces de humanos o animales tratados; el empleo en acuicultura; el uso de estiércol de animales tratados como fertilizantes en agricultura; el reciclaje de aguas previamente empleadas en el riego de cultivos agrícolas o la eliminación de medicamentos no utilizados o caducados, entre otras [8, 15, 21].

Existen evidencias de que muchos antibióticos no se eliminan completamente en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), cuyos efluentes contaminados se descargan posteriormente a las aguas superficiales, lo que podría dar lugar a la aparición de residuos de antimicrobianos en agua potable y subterránea [26, 27]. El potencial contaminante de los antimicrobianos es evidente, ya que se trata de sustancias concebidas para inducir efectos biológicos, por lo tanto, cabe esperar que tengan algún tipo de repercusión sobre los organismos acuáticos, especialmente si consideramos que se trata de contaminantes pseudo-persistentes. De hecho, investigaciones recientes apuntan a los efectos de los agentes antimicrobianos sobre la eliminación de microorganismos beneficiosos, así como sobre la selección genética de bacterias dañinas presentes en el ambiente.

Sin embargo, a pesar de su importancia aún son muy escasos los estudios realizados para establecer el impacto medioambiental de los antibióticos y, en especial, su persistencia en los ecosistemas acuáticos [28]. Si tenemos en cuenta la naturaleza polar y no volátil de muchos de ellos (como por ejemplo, el caso de las Quinolonas), es interesante determinar las peculiaridades de adsorción y degradación de cada tipo de antibiótico para poder evaluar su persistencia en el medioambiente.

1.4. Legislación y control de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos y medio ambiente

En los últimos años se ha producido una creciente preocupación a causa del empleo de antimicrobianos en la cría de animales destinados a la producción de alimentos y su presencia continuada como contaminantes en el medioambiente.

Tal preocupación está relacionada principalmente con su potencial para favorecer la proliferación de bacterias fármaco-resistentes. La resistencia bacteriana es un problema muy grave y de gran interés mundial, y aunque se produce por múltiples causas, algunas de ellas inevitables, se debe

enfrentar de forma multidisciplinar con el fin de limitar su propagación y paliar sus efectos. Este panorama indica la necesidad de ejercer controles sobre la presencia de residuos de este tipo de sustancias, tanto en alimentos de origen animal como en el medioambiente.

Por este motivo, se han elaborado procedimientos para evaluar el riesgo para la salud humana de los residuos de medicamentos veterinarios administrados a los animales productores de alimentos y en consecuencia, establecer normas que regulen la utilización de los mismos y controlen su cumplimiento mediante los correspondientes sistemas de vigilancia.

A tal efecto, en algunos países como España se desarrolló el Plan Nacional de Investigación de Residuos (RD 1749/1998) [29], cuyo objetivo es controlar la presencia de residuos de productos zoosanitarios, plaguicidas y contaminantes ambientales en los alimentos de origen animal, junto con la verificación de la conformidad con los niveles permitidos en la legislación. Los resultados de los planes son comunicados anualmente a las autoridades de la Unión Europea por las autoridades nacionales de los diferentes Estados Miembros.

1.4.1. Marco legal en la Unión Europea

La creación del mercado único europeo y la supresión de todas las barreras comerciales han impulsado el desarrollo de una política de Seguridad Alimentaria más restrictiva y de los correspondientes programas de vigilancia.

Uno de los instrumentos más eficaces de los que dispone la Unión Europea para garantizar la Seguridad Alimentaria es el sistema de alerta rápida, de forma que cuando se produce un incidente relacionado con la Seguridad Alimentaria, el país afectado debe notificarlo inmediatamente a la Comisión y a los demás Estados Miembros. Ello permite tomar medidas como la interrupción de las exportaciones o la retirada de la venta de los productos afectados.

Toda la reglamentación de la Unión Europea referente a los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal ha sido objeto de un esfuerzo importante de armonización, con objeto de asegurar un mismo nivel de protección de la salud en el conjunto de la Unión Europea y, por otra parte, eliminar los obstáculos sanitarios para liberalizar el comercio de alimentos de origen animal.

Uno de los principales documentos legislativos con respecto al empleo de medicamentos veterinarios es el Reglamento 726/2004/CE [30] que establece la creación de la *Agencia Europea de Medicamentos* (EMEA), cuya función principal es proporcionar recomendaciones científicas en relación con la autorización y supervisión de productos medicinales para uso humano y veterinario. Específicamente, su comité sobre medicamentos de uso veterinario es el responsable de elaborar los documentos relativos a la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos veterinarios y recomendar los Límites Máximos de Residuos de los mismos en productos alimenticios de origen animal.

Esta legislación está estrechamente relacionada con el Reglamento 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo [31]"por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal", derogándose el reglamento que le precedía (2377/90/CE) y dando lugar a la creación del Reglamento 37/2010/CE, "relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal" [32] y clasifica los medicamentos de uso veterinario en dos grupos:

- Sustancias autorizadas, que a su vez se discriminan en:
  - *Sustancias para las que se ha establecido un Límite Máximo de Residuo definitivo* (Anexo I);
  - *Sustancias que no requieren un Límite Máximo de Residuo, dado que sus residuos no suponen riesgo para la salud humana* (Anexo II);

- *Sustancias con un Límite Máximo de Residuo provisional* (Anexo III); y

- Sustancias prohibidas:
  - *Sustancias para las que no puede establecerse límite máximo alguno porque sus residuos, sea cual sea su límite, constituyen un riesgo para la salud humana* (Anexo IV).

A partir del 1 de enero de 2000, la Unión Europea prohibió la utilización de cualquier sustancia no incluida en los Anexos I, II y III en animales destinados al consumo humano.

Otro documento importante es el Reglamento 2017/625 "relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios" [33], cuyo objetivo principal es establecer normas sobre la realización de controles oficiales y su financiación; las condiciones que deberán adoptarse en la UE y que serán mandatorias para terceros países que esperan comercializar allí animales y mercancías; y la sistematización de la información que permita la gestión oportuna de esta y de datos relacionados con los controles oficiales.

Este sistema de información es eficiente y su utilidad resalta para el manejo de los siguientes aspectos, relacionados con animales y mercancías sujetos a ciertos controles oficiales de la Unión:

- Permitir que autoridades gubernamentales responsables del lugar de expedición y aquellas responsables de realizar controles oficiales de animales o mercancías intercambien en tiempo real datos, información y documentos relacionados con estos y que circulan entre los Estados. Como se mencionó antes, esto, solo para aquellos productos cuya comercialización dentro de la Unión estén sujetas a requisitos o procedimientos específicos preestablecidos en sus normas.

- Permitir que autoridades gubernamentales responsables del lugar de expedición y aquellas responsables de realizar controles oficiales de animales o mercancías intercambien en tiempo real datos, información, documentos relacionados con estos y resultados de controles realizados en los animales y mercancías exportados, en los que apliquen las normas de la Unión en relación con expedición de certificado de exportación.

- Permitir que las autoridades gubernamentales competentes, ubicadas en puestos fronterizos y aquellas responsables de realizar controles oficiales de animales o mercancías intercambien en tiempo real datos, información, documentos relacionados con estos y resultados de controles realizados.

- Permitir el intercambio de información y datos con las características ya mencionadas en los anteriores apartados, entre las autoridades ubicadas en puestos fronterizos con autoridades aduaneras y aquellas encargadas de realizar los controles de animales o mercancías que pretenden su ingreso en la Unión y cuyo origen son terceros países.

Las características y validación de los métodos analíticos empleados en la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal se describen en la Decisión 2002/657/CE [34]. Esta incluye algunos requisitos adicionales para los métodos confirmatorios, con el fin de obtener una identificación inequívoca de los residuos analizados.

Además, la Unión Europea tiene la responsabilidad de asegurar que los productos alimenticios importados desde terceros países (generalmente la Unión Europea importa cada año más de un 50% de los productos alimenticios que consume) ofrezcan las mismas garantías de seguridad que los producidos en sus Estados Miembros. La entrada de productos de origen animal procedentes de terceros países dentro del territorio comunitario, comporta entre otros, el cumplimiento de los siguientes requisitos: que el país figure en una lista de países autorizados

previamente por la Unión Europea para la importación [35] y que los productos provengan de un establecimiento autorizado por la Unión Europea en su país de origen.

Con respecto a la legislación disponible para el control de residuos de contaminantes en medioambiente, desafortunadamente a día de hoy, no existe ninguna disponible que establezca los límites máximos recomendables de antimicrobianos en muestras medioambientales.

Por su parte, la presencia de residuos de plaguicidas también posee una serie de Reglamentos que regulan su presencia, no solo en alimentos de origen animal, sino también vegetal, los cuales buscan controlar y evaluar el grado de exposición al que puede estar sometido un consumidor frecuente del alimento.

Entre los principales documentos regulatorios destacan:

- Reglamento de ejecución (UE) 2020/585 de la Comisión de 27 de abril de 2020. Este se encuentra enfocado a la regulación de un programa plurianual coordinado de control de la Unión, cuya finalidad es garantizar el cumplimiento normativo respecto a los límites máximos de residuos permitidos en alimentos de origen animal o vegetal y cuyo destino sea el consumo humano. Asimismo, valorar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos [36].

- Reglamento de ejecución (UE) 2019/533 de la Comisión de 28 de marzo de 2019, relativo a un programa dirigido a garantizar el cumplimiento de los límites máximos de residuos de plaguicidas en y sobre los alimentos de origen vegetal y animal, así como a evaluar el grado de exposición de los consumidores frecuentes del alimento, a estos residuos [37].

- Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015 cuya finalidad es complementar las directivas anteriores,

dirigidas a establecer los requisitos específicos de composición e información dirigidos a alimentos destinados al consumo de lactantes y preparados de continuación, así como requisitos de información que deben cumplir los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad [38].

Contrario a lo que ocurre con la Regulación del LMR de antimicrobianos, para el caso de los plaguicidas, dichos valores se encuentran dispersos en una serie de reglamentos recientemente actualizados y disponibles en la página oficial de la Unión, en lo referente al ámbito legislativo en la misma.

1.4.2. Límites Máximos de Residuos (LMRs)

Con el fin de proteger a los consumidores de la amenaza que representa el problema de la multifármaco-resistencia bacteriana, las autoridades sanitarias europeas han emprendido una serie de acciones que incluyen entre otros, el establecimiento de los Límites Máximos de Residuos y el desarrollo de planes de vigilancia en alimentos producidos en el mercado comunitario, o aquellos importados desde terceros países.

El Límite Máximo de Residuo es, por tanto, la concentración máxima de residuos que se puede aceptar en un determinado alimento, como resultado de la administración de un medicamento veterinario en animales destinados a la producción de alimentos, para que una persona que lo consume en forma normal y abundante no supere la ingesta diaria aceptable (IDA) para el medicamento en cuestión [39].

El establecimiento del Límite Máximo de Residuos posibilita la consecución de dos objetivos fundamentales, de cara a garantizar la salud de los consumidores: permite la definición de los tiempos de espera de los distintos medicamentos de uso veterinario y la ejecución de programas de control que permitan comprobar que el contenido de residuos en los productos de origen animal no supera los correspondientes Límites Máximos de Residuos.

El establecimiento de los LMRs para las distintas especialidades veterinarias supone un proceso previo de evaluación de riesgos, basado en estudios toxicológicos con animales de laboratorio para cada sustancia activa. A partir de esta evaluación se determina en primer lugar, el nivel o dosis sin efecto (NOEL, siglas del inglés: no observed effect level) y la IDA, correspondiente a la cantidad de residuos que puede ser consumida diariamente por una persona sin riesgo apreciable para su salud. Dado que se trata de experimentos que se llevan a cabo en animales, extrapolar dicho valor en humanos posee algunos inconvenientes, por lo que al valor IDA obtenido para el animal de laboratorio se le aplica un factor de seguridad que normalmente es de 100 o 1000, si los riesgos para el ser humano lo justifican. De este modo, se obtiene la IDA para una persona.

Paralelamente, se lleva a cabo la evaluación de la exposición, mediante la que se estima cuantitativamente la ingesta de los residuos en función de una dieta estándar que incluye la totalidad de los alimentos en los que pueda aparecer el residuo de interés.

El Reglamento 2377/90/CE establece los LMRs para medicamentos veterinarios presentes en productos alimenticios de origen animal, entre los que se incluyen los agentes antimicrobianos [40]. En la siguiente tabla se recogen los LMRs establecidos para los antimicrobianos de la familia de las Fluoroquinolonas, la cual ha sido objeto de estudio en distintos alimentos de origen animal, a través de la ejecución de los proyectos de investigación financiados por la Universidad de Cartagena y Colciencias.

De acuerdo con la legislación actual en la Unión Europea debería aplicarse el principio de “tolerancia cero” a aquellos medicamentos cuya utilización está prohibida en animales destinados al consumo humano, o para los que no se ha establecido un Límite Máximo de Residuos en un determinado producto alimenticio [41], como es el caso de muchos alimentos procesados de origen animal, dentro de los que se incluyen los destinados a la alimentación infantil.

Tabla 1.3 LMRs establecidos por la Directiva Europea para Fluoroquinolonas de uso veterinario [28].

Sustancia activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Tejidos diana
Enrofloxacina	**ENRO + CIPRO**	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos y aves	100 100 200 200	Músculo(1) Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos	100 100 300 200 100	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Porcinos y conejos	100 100 200 300	Músculo Grasa(2) Hígado Riñón
		Aves(4)	100 100 200 300	Músculo Piel y grasa(3) Hígado Riñón
Marbofloxacina	**MARBO**	Bovinos	150 50 150 150 75	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Porcinos	150 50 150 150	Músculo Grasa(2) Hígado Riñón

Flumequina	**FLUME**	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves y peces	200 250 500 1000	Músculo Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, porcinos, ovinos, caprinos	200 300 500 1500 50	Músculo Grasa(2) Hígado Riñón Leche
		Aves (4)	400 250 800 1000	Músculo Piel y grasa(3) Hígado Riñón
		Pescado	600	Músculo y piel(1)
Danofloxacina	**DANO**	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos y aves.	100 50 200 200	Músculo(1) Grasa(2) Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos	200 100 400 400 30	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Aves (4)	200 100 400 400	Músculo Piel y grasa(3) Hígado Riñón

Difloxacina	**DIFLO**	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves	300 100 800 600	Músculo (1) Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos (5)	400 100 1400 800	Músculo Grasa Hígado Riñón
		Porcinos	400 100 800 800	Músculo Piel y grasa (2) Hígado Riñón
		Aves (4)	300 400 1900 600	Músculo Piel y grasa(3) Hígado Riñón
Sarafloxacina	**SARA**	Pollo	10 100	Grasa(3) Hígado
		Salmónidos	10	Músculo (1)

(1) En peces está referido a músculo y piel; (2) En porcino está referido a piel y grasa; (3) En aves está referido a piel y grasa; (4) No debe utilizarse en aves que producen huevos para consumo humano; (5) No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano.

De hecho, deberían aplicarse criterios de seguridad más estrictos a este tipo de alimentos, debido a la mayor sensibilidad de la población infantil frente a las sustancias tóxicas y contaminantes y a la elevada relación entre la ingesta de alimento y el peso corporal, en comparación con los adultos.

Un caso que puso de manifiesto la vulnerabilidad infantil ante la falta de controles estrictos fue la alarma alimentaria producida en China en 2008 con respecto a la adulteración de leche de fórmula infantil con melamina [42]. Este hecho suscitó gran preocupación entre las autoridades de salud

pública acerca de la seguridad de los alimentos infantiles disponibles en el mercado y puso de manifiesto la necesidad de establecer programas de control y vigilancia estrictos para dichos productos.

Aunque a través de las Directivas 2006/141/CE [43] y 2005/856/CE [44] se han establecido Límites Máximos de Residuos para ciertos contaminantes como pesticidas y micotoxinas en leches de fórmula infantil y alimentos infantiles procesados basados en frutas, vegetales y cereales, no existe una legislación referente a los niveles de tolerancia de antimicrobianos en alimentos infantiles de origen animal. En consecuencia, la aplicación del concepto de "tolerancia cero" requiere el desarrollo de metodologías analíticas sensibles que permitan determinar la presencia de estas sustancias a niveles de concentración muy bajos.

1.4.3. Situación en países no pertenecientes a la Unión Europea

La importación de alimentos desde terceros países es una práctica cada vez más frecuente en el mercado europeo. Ahora bien, la situación en materia de Seguridad Alimentaria en estos es significativamente distinta y la legislación, en muchos casos es más permisiva.

Así, por ejemplo, en Estados Unidos el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento sigue siendo una práctica permitida. Actualmente están autorizadas con este fin la penicilina, clortetraciclina, eritromicina, estreptomicina, bacitracina, espectinomicina (todos ellos de uso clínico), tilosina y virginiamicina (antibióticos con estructuras similares a otros usados en humanos), entre otros.

En cuanto a los países en vías de desarrollo, la mayoría no cuenta o cuenta con normativas poco específicas; o bien, las normas sanitarias de cada país difieren unas de otras y los niveles máximos permitidos y los tiempos de espera no están armonizados. Tampoco cuentan en muchos casos con planes de vigilancia y control de residuos, a pesar de la presión creciente por parte de los mercados internacionales para producir alimentos más sanos y seguros.

En la mayoría de los casos, la creación y actualización de las reglamentaciones alimentarias nacionales, de acuerdo con las recomendaciones internacionales, no ha sido tan eficaz como en los países desarrollados. De hecho, la mayoría de ellos han necesitado un período de transición y/o asistencia técnica con respecto a la plena aplicación de estos programas, con el fin de mejorar la calidad y seguridad de sus alimentos, tanto para consumo interno como para su exportación.

Una evidencia de este aspecto la constituye el proyecto de "Fortalecimiento de la gestión de los Comités Nacionales del Codex Alimentarius en los Países Andinos" [35], auspiciado por la FAO y ejecutado por los distintos organismos de salud de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.

El objetivo general planteado fue la creación y fortalecimiento de los Comités Nacionales del Codex de cada país y sus subcomités técnicos, asegurando el ejercicio de funciones de asesoría a sus respectivos gobiernos en materias relacionadas con la inocuidad de los alimentos y facilitar el proceso de armonización de las normas nacionales en los países de la región andina de acuerdo a las recomendaciones del Codex Alimentarius.

A pesar de que este proyecto finalizó en el 2004, las autoridades gubernamentales de estos países continúan requiriendo la cooperación internacional para la implementación de sistemas de gestión de calidad más eficaces.

Según los criterios de la OMS y de los especialistas en el tema, uno de los factores que ha contribuido de forma importante al desarrollo de resistencias bacterianas es precisamente la falta de legislación que regule el uso de los antimicrobianos. Algunos países como Argentina, Brasil, Chile, Cuba, Ecuador, México y Uruguay han reconocido este problema y la falta de legislación a este respecto en América Latina, lo cual favorece la distribución y venta libre de los antimicrobianos, tanto para medicina

humana como veterinaria, haciendo que la labor de control y vigilancia sobre este tipo de sustancias sea especialmente difícil.

1.5. Referencias

1. Española, R.A., *Diccionario de la lengua española, 23.ª ed*, in *Diccionario de la lengua española, 23.ª ed*. 2020.
2. OMS, *La contención de la resistencia a los antimicrobianos. Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos*. 2005, OMS: Ginebra. p. 6.
3. OMS, *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. 2016: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 30.
4. O'Neill, J., *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations*, in *Review on Antimicrobial Resistance*. 2016. p. 84.
5. Silbergeld, E.K., J. Graham, and L.B. Price, *Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health.* Annu Rev Public Health, 2008. **29**: p. 151-69.
6. Van Boeckel, T.P., et al., *Global trends in antimicrobial use in food animals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5649-54.
7. WHO, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. 2014, Geneva: OMS. 257.
8. Pruden, L.S.S.a.A., ed. *Hormones and Pharmaceuticals Generated by Concentrated Animal Feeding Operations. Transport in Water and Soil*. 1 ed. Emerging Topics in Ecotoxicology. 2009, Springer-Verlag New York: New York. 138.
9. Authority, E.F.S., *Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products.* EFSA Supporting Publications, 2019. **16**(5): p. 1578E.
10. World Health Organization. Division of, E., S. other Communicable Diseases, and Control, *Use of quinolones in food animals and potential impact on human health : report and proceedings of a WHO meeting, Geneva, Switzerland, 2-5 June 1998*. 1998, World Health Organization: Geneva.

11. OMS. *Un número sin precedentes de países informa tasas preocupantes de resistencia a los antimicrobianos*. Centro de prensa 2020 1 de junio de 2020 [cited 2020 5 de agosto de 2020]; Available from: https://www.who.int/es/news-room/detail/01-06-2020-record-number-of-countries-contribute-data-revealing-disturbing-rates-of-antimicrobial-resistance.

12. Pedersen, K.B., et al., *The need for a veterinary antibiotic policy.* Vet Rec, 1999. **145**(2): p. 50-3.

13. Unión, E.P.E.y.E.C.S.d.l., *Reglamento (CE) No. 396/2005 del Parlamento europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005. Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo*, d.d.f.d. Diario oficial de la Unión Europea L 70, Editor. 2005, Parlamento europeo: Estrasburgo. p. 16.

14. Europeas, L.C.d.l.c., *Directiva 2006/125/CE de la Comisión de 5 de diciembre de 2006 relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad*, d.d.d.d. Diario oficial de la Unión Europea L 339, editor. 2006, Parlamento europeo: Bruselas. p. 20.

15. Kümmerer, K., ed. *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. 3 ed. 2005, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin. 521.

16. Petrovic, D.B.a.M., ed. *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Occurrence, Analysis and Effects*. Water Pollution. 2008, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg. 192.

17. Moellering, R.C., *Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial.* Ann Intern Med, 2003. **138**(2): p. 135-42.

18. Edwards, D., *Antimicrobial Drug Action*. Biomedical and Life Sciences. 1980, Palgrave, London: Macmillan Publishers Limited

19. Viola, C. and S.J. DeVincent, *Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection*

in the United States. Preventive Veterinary Medicine, 2006. **73**(2): p. 111-131.

20. Angelakis, E., *Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals*. Microb Pathog, 2017. **106**: p. 162-170.
21. Unión, E.P.E.y.E.C.d.l., *Reglamento (CE) No 1831/2003 del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal*, d.d.o.d. Diario oficial de la Unión Europea L 268, Editor. 2003, Parlamento europeo: Bruselas. p. 29.
22. Serna C, L., L.J. Valencia H, and R. Campos G, *Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis*. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 2011. **9**: p. 97-104.
23. Marina, C., *Efecto de la presencia de oxitetraciclina en la leche de cabra sobre las características del queso de tronchón*, in *Ingenieria de Alimentos*. 2017, Universitat Politècnica De València. Valencia: Valencia. p. 21.
24. Petrović, M., et al., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*. Journal of chromatography. A, 2005. **1067**(1-2): p. 1-14.
25. Segura, P.A., et al., *Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters*. Environmental health perspectives, 2009. **117**(5): p. 675-684.
26. Díaz-Cruz, M.S. and D. Barceló, *LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(7): p. 645-657.
27. Zwiener, C. and F.H. Frimmel, *Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac*. Sci Total Environ, 2003. **309**(1-3): p. 201-11.
28. Hernando, M.D., et al., *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. Talanta, 2006. **69**(2): p. 334-42.

29. Presidencia, M.d.l., *Real Decreto 1749/1998, de 31 de Julio, por el que se establecen medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos*, in *188*, B.o.d.E.n. 188, Editor. 1998, Boletin oficial del Estado Madrid. p. 26910-26927.

30. Unión, E.P.E.y.E.C.d.l., *Reglamento (CE) No 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos*, d.d.A.d. Diario Oficial de la Unión Europea L 136, Editor. 2004, Parlamento europeo, Estrasburgo. p. 136/1 - 136/33.

31. Unión, E.P.E.y.E.C.d.l., *Reglamento (CE) No 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo*, D.O.d.l.U.E. L152/11, Editor. 2009, Parlamento europeo: Estrasburgo,. p. 12.

32. Europea, L.C., *Reglamento (UE) No 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal*, D.O.d.l.U.E. L15/1, Editor. 2010, Parlamento europeo: Bruselas. p. 72.

33. Europea, E.P.E.y.E.C.d.l.U., *Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.° 999/2001, (CE) n.° 396/2005, (CE) n.° 1069/2009, (CE) n.° 1107/2009, (UE) n.° 1151/2012, (UE) n.° 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los*

Reglamentos (CE) n.° 1/2005 y (CE) n.° 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.° 854/2004 y (CE) n.° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales)Texto pertinente a efectos del EEE, D.O.d.l.U.E. L95/1, Editor. 2017, Parlamento Europeo: Estrasburgo. p. 142.

34. Europeas, L.C.d.l.C., *Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados*, D.O.d.l.C.E.L.d.d.a.d. 2002, Editor. 2002, La Comisión de las Comunidades Europeas: Brucelas. p. 29.

35. Europeas, L.C.d.l.C., *Decisión de la Comisión de 30 de octubre de 2009 que modifica la Decisión 2004/432/CE, por la que se aprueban planes de vigilancia presentados por terceros países relativos a los residuos, de conformidad con la Directiva 96/23/CE del Consejo*, d.d.o.d. Diario oficial de las Comunidades Europeas L 285, Editor. 2009, Diario oficial de la Unión Europea Bruselas. p. 6.

36. Europea, L.C., *Reglamento de ejecución (UE) 2020/585 de la Comisión de 27 de abril de 2020 relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2021, 2022 y 2023 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos*, D.O.d.l.U.E. L135/1, Editor. 2020, la Comisión europea: Bruselas. p. 12.

37. Europea, L.C., *Reglamento de ejecución (UE) 2019/533 de la Comisión de 28 de marzo de 2019 relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2020, 2021 y 2022 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en y sobre los alimentos de origen vegetal y animal y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos*, D.O.d.l.U.E. L88/26, Editor. 2019, la Comisión europea: Bruselas. p. 14.

38. Europea, L.c., *Reglamento delegado (UE) 2016/127 de la Comisión, de 25 de septiembre de 2015, que complementa el Reglamento (UE) n° 609/2013 del Parlamento europeo y del Consejo en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como a los requisitos de información sobre los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad (Texto pertinente a efectos del EEE*, D.O.d.l.U.E. L25/1, Editor. 2016, Bruselas: la Comisión europea. p. 29.

39. Gema Beatriz Montalvo Mimbrero, L.A.O.O., Juan Antonio Gilabert Santos, Antonio Rodríguez Artalejo, *Análisis del riesgo de los medicamentos veterinarios presentes en los alimentos.* Actualidad en farmacología y terapéutica, 2004. **2**(3): p. 168-175.

40. Europeas, E.C.d.l.C., *Reglamento (CEE) No 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal*, d.d.a.d. Diario Oficial de la Unión Europea L 224, Editor. 1990, Parlamento europeo. p. 113.

41. Bohm, D.A., C.S. Stachel, and P. Gowik, *Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC.* J Chromatogr A, 2009. **1216**(46): p. 8217-23.

42. De Benito, E., *6.000 bebés intoxicados y 3 muertos por una leche adulterada en China*, in *El Pais*. 2008, Grupo Prisa: Madrid.

43. europeas, L.C.d.l.c., *Directiva 2006/141/CE de la Comisión de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación.*, d.d.d.d. Diario Oficial de la Unión Europea L 401, Editor. 2006, Parlamento europeo: Bruselas. p. 33.

44. Europeas, L.C.d.l.C., *Reglamento /2005/856/CE de la Comisión de 6 de junio de 2005 que modifica el Reglamento 466/2001/CE en lo que refiere a las toxinas de Fusarium*, d.d.j.d. Diario oficial de la Unión Europea L 143, Editor. 2005, Parlamento Europeo: Bruselas. p. 6.

Capítulo 2
Antimicrobianos y su reto analítico Caso: Fluoroquinolonas

Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

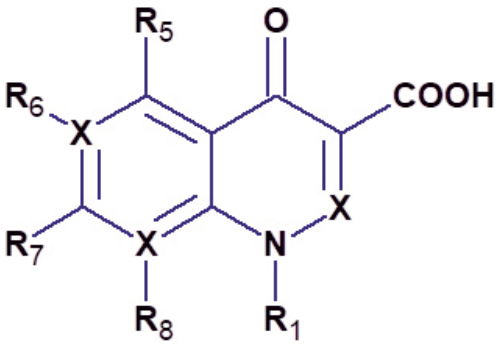
2.1. Generalidades

Las quinolonas constituyen una de las familias de antimicrobianos de mayor aplicación en los últimos 20 años [1, 2]. Se trata de compuestos sintéticos derivados del ácido nalidíxico, descubierto de forma casual a principios de los años 60, y que se utilizan tanto en medicina humana como veterinaria.

A diferencia de otros grupos de antibacterianos (como los macrólidos), las quinolonas presentan un rápido efecto bactericida contra la mayoría de los microorganismos y penetran extremadamente bien en los tejidos y células de los mamíferos, al contrario de lo que ocurre con los antibióticos de la familia de los β-lactámicos. También se utilizan en pediatría como antibióticos de segunda elección cuando todos los demás tratamientos han fracasado.

2.2. Estructura y clasificación

Las quinolonas (Qs) derivan de una estructura básica idéntica, la 4-quinolona, compuesta de dos anillos aromáticos, uno de tipo piridona, con un ácido carboxílico en posición 3 y un átomo de nitrógeno en posición 1 (Figura 2.1).



X: posiciones que pueden contener un átomo de N.

Figura 2.1 Estructura básica de los principales grupos de quinolonas.

La incorporación de más átomos de nitrógeno en la estructura básica ha dado lugar a cuatro grupos principales: naftiridinas u 8-azaquinolonas (posiciones *1 y 8*), cinolinas o 2-aza-4-quinolonas (posiciones *1 y 2*), quinolonas (posición *1*) y piridopirimidinas o 6,8-diaza-4-quinolonas (posiciones *1, 6 y 8*).

La introducción de un átomo de flúor en la posición 6 de la estructura base de las quinolonas dió origen a las *fluoroquinolonas (FQs)*, que permitieron una mejora notable de las propiedades antibacterianas de estas sustancias (mayor espectro antibacteriano y aumento de la actividad), dado que presentan mayor capacidad de penetración en el interior de la célula bacteriana y mayor afinidad por ciertas enzimas implicadas en la replicación celular, tales como la ADN-girasa y topoisomerasa. En la Figura 2.2 se muestra la estructura general de las FQs y su relación con la actividad antimicrobiana.

La diferencia estructural entre las distintas FQs está basada en los diferentes sustituyentes en posiciones 1, 5, 7 y 8 que ha dado origen a las FQs de segunda, tercera, cuarta y quinta generación. En la Tabla 2.1 se muestra la clasificación de las FQs en función de su actividad microbiológica y farmacocinética.

La cronología de aparición de las principales quinolonas, así como la estructura de las FQs de uso más común se muestra en las Figuras 2.3 y 2.4, respectivamente.

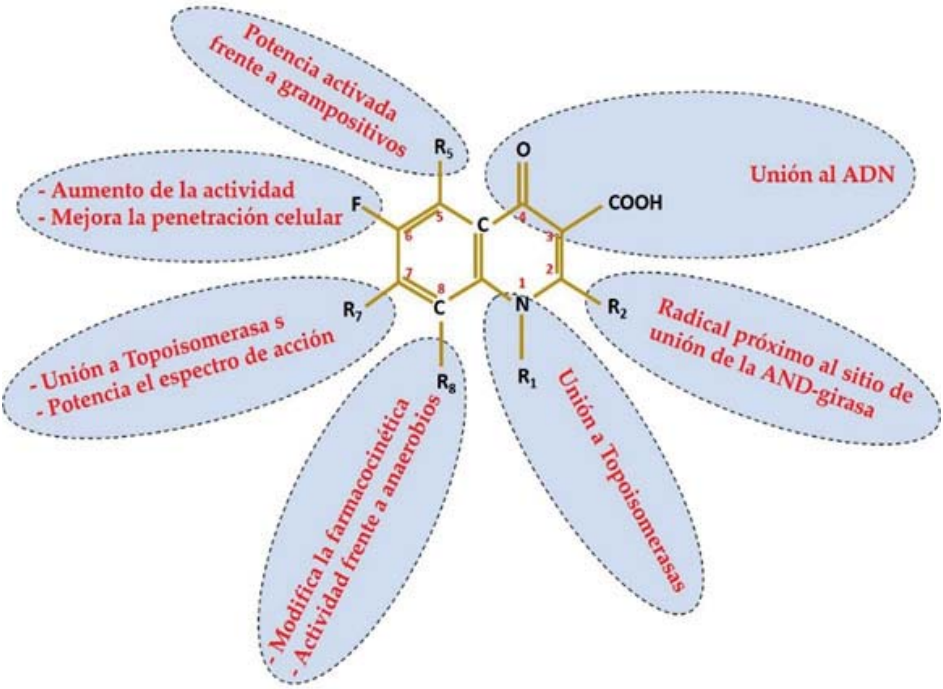


Figura 2.2 Estructura general de las fluoroquinolonas y su relación con la actividad antibacteriana.

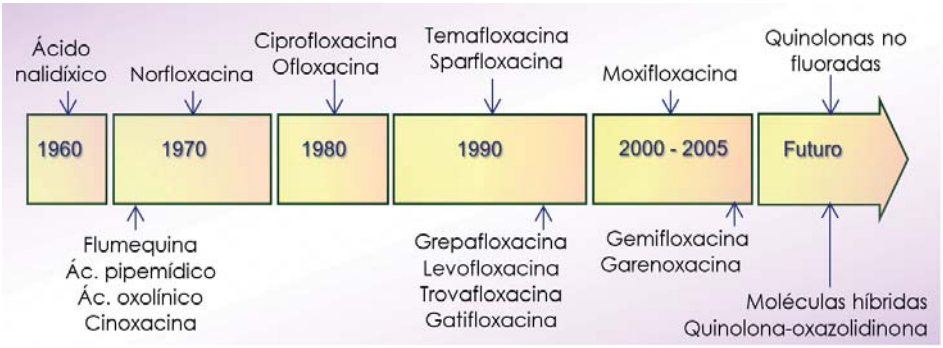
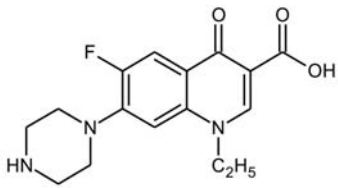
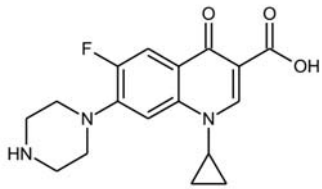


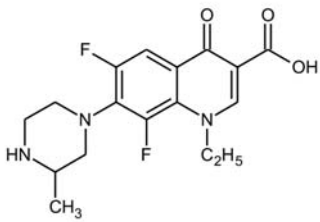
Figura 2.3 Cronología de la aparición de las principales quinolonas.



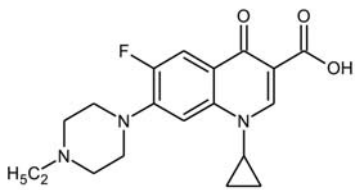
Norfloxacina (**NOR**)



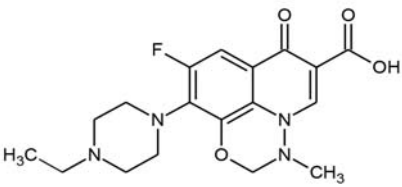
Ciprofloxacina (**CIPRO**)



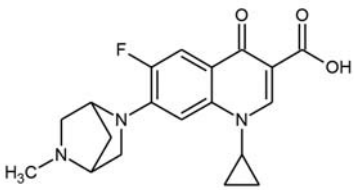
Lomefloxacina (**LOME**)



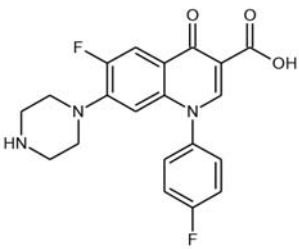
Enrofloxacina (**ENRO**)



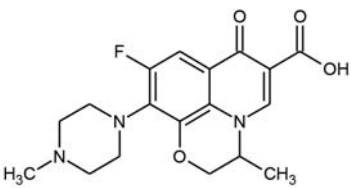
Marbofloxacina (**MARBO**)



Danofloxacina (**DANO**)



Sarafloxacina (**SARA**)



Levofloxacina (**LEVO**)

Figura 2.4 Estructura química de las fluoroquinolonas más utilizadas en el campo clínico y veterinario.

Tabla 2.1 Clasificación de las fluoroquinolonas (FQs) en función de su actividad microbiológica y distribución a tejidos.

Generación		FQ	Actividad microbiológica	Farmacocinética (distribución)
SEGUNDA	Clase I	Lomefloxacina Enoxacina Norfloxacina	Enterobacterias	Baja concentración en plasma y tejido
	Clase II	Ofloxacina Ciprofloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, *Pseudomona aeruginosa*	Alta concentración en plasma y tejido
TERCERA		Esparfloxacina Levofloxacina Gatifloxacina Levofloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, *P. aeruginosa, Staphylococcus aureus*	
CUARTA		Trovafloxacina Moxifloxacina Gemifloxacina Clinafloxacina Sitafloxacina	Enterobacterias, patógenos atípicos, *P. aeruginosa, S. aureus,* patógenos respiratorios, anaerobios	
QUINTA		Garenoxacina PGE-9262932 PGE-9509924 PGE-4175997 T-3912	Enterobacterias, patógenos atípicos, *P. aeruginosa,* anaerobios, mayor actividad frente a Gram-positivos	En desarrollo

2.3. Mecanismos de acción y resistencia

Las quinolonas son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Las enzimas topoisomerasas (I a IV) intervienen en el plegamiento de la doble hélice de ADN, fundamental para la estructura tridimensional del material genético [3]. Dentro de estas, la ADN-girasa (topoisomerasa II) produce el corte de las porciones de la doble hélice. Las Qs forman complejos con la ADN-girasa inhibiendo su acción e interviniendo en la reconfiguración de las cadenas de ADN bacteriano.

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas se pueden resumir principalmente en tres:

- Alteración de la enzima topoisomerasa del ADN bacteriano debido a mutaciones cromosómicas.
- Disminución de la permeabilidad bacteriana por alteración de las porinas.
- Bomba de eflujo. Mediante un mecanismo de eflujo, por el cual las quinolonas se excretan de manera activa hacia el exterior bacteriano.

Aunque hayan transcurrido pocos años desde la introducción de las quinolonas (Qs) en medicina veterinaria (España, por ejemplo, aprobó el empleo de ENRO en 1990), se ha producido un incremento progresivo de los casos de resistencia a estos fármacos para *Escherichia coli* (3-23%), *Enterococcus faecalis* (4.4-28%), *Pseudomona aeruginosa* (4-15%) y *Campylobacter jejuni* (2.3-50%) [4, 5]. De igual forma, se ha descrito el aislamiento de cepas de Salmonella resistentes a Qs asociadas al empleo de estas sustancias en medicina veterinaria [6].

A la vista de estos datos se puede concluir que, si no se restringe el empleo veterinario de las Qs, pueden perderse muy pronto los beneficios de uno de los mejores grupos de antimicrobianos disponibles actualmente para el tratamiento clínico de infecciones severas en humanos. De hecho, un informe del Sistema Europeo de Muestras de Resistencia Antimicrobiana, que describe la evolución de patógenos y su resistencia también demuestra la fuerte asociación que se presenta entre el uso de antibióticos en animales y la aparición de resistencia, incluso a cefalosporinas y fluoroquinolonas de tercera y cuarta generación [7].

A pesar de esto, las condiciones para su empleo entre los distintos países difieren sustancialmente en cuanto a la especie animal autorizada para su administración, como se muestra en la Tabla 2.2.

Este es el aspecto quizá más preocupante en torno a la autorización para uso de estas sustancias en cría intensiva animal. La falta de armonización permite en algunos países el uso de sustancias que están prohibidas en otros, en muchos casos debido a su similitud con la molécula dirigida a terapia humana o porque el metabolismo puede dar origen a moléculas idénticas a las reservadas para clínica humana.

A este grupo de sustancias pertenecen las FQs, que aunque poseen amplio uso en medicina veterinaria, aún se consideran como medicamentos de reserva en casos complejos de infecciones humanas, tales como las infecciones del tracto urinario, gastrointestinal, del tracto respiratorio, osteomielitis crónica e incluso infecciones de transmisión sexual. La importancia del uso de estos agentes antimicrobianos en la consecución del bienestar animal y humano ha llevado a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a clasificar las FQs como de importancia crítica, ya que, si una bacteria desarrolla resistencia a alguna FQ, es muy probable que también desarrolle resistencia a las demás, por el parecido que estas tienen a nivel estructural.

Tabla 2.2 Quinolonas y fluoroquinolonas autorizadas para uso veterinario según la zona geográfica.

Región	Ganado vacuno	Aves de corral	Animales domésticos	Peces
EUROPA	Enrofloxacina Flumequina Marbofloxacina Danofloxacina	Enrofloxacina Difloxacina Flumequina Ác. Oxolínico	Enrofloxacina Difloxacina Marbofloxacina	Sarafloxacina (Ác. Oxolínico)[a]
EE UU	-------	Enrofloxacina Sarafloxacina	Enrofloxacina Difloxacina Orbifloxacina	-----
JAPÓN	Enrofloxacina Danofloxacina Orbifloxacina Difloxacina Ác. Oxolínico	Enrofloxacina Danofloxacina Ofloxacina Vebufloxacina Ác. Oxolínico	Enrofloxacina Orbifloxacina	Ác. Oxolínico

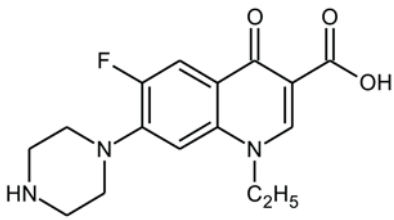
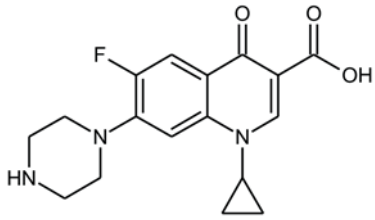
ASIA	Enrofloxacina Ciprofloxacina Danofloxacina	Enrofloxacina Ciprofloxacina Danofloxacina Flumequina Ofloxacina Norfloxacina Ác. Oxolínico (Sarafloxacina)	Enrofloxacina	Ác. Oxolínico Enrofloxacina Flumequina
AMÉRICA LATINA	Enrofloxacina Ciprofloxacina Danofloxacina Norfloxacina (Flumequina)	Enrofloxacina Ciprofloxacina Danofloxacina Norfloxacina (Flumequina) (Ác. oxolínico)	Enrofloxacina	Ác. Oxolínico
CANADÁ		Enrofloxacina	Enrofloxacina	
AUSTRALIA	-----	-----	Enrofloxacina	-----
SUDÁFRICA	Enrofloxacina Danofloxacina	Enrofloxacina Danofloxacina Norfloxacina	Enrofloxacina	

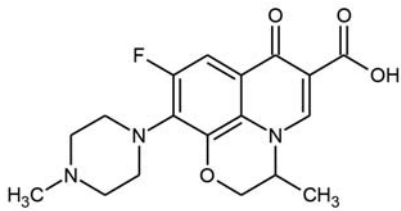
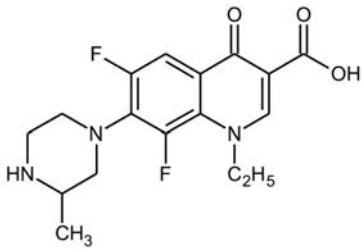
[a] Las sustancias entre paréntesis poseen uso limitado.

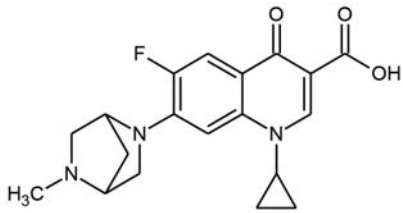
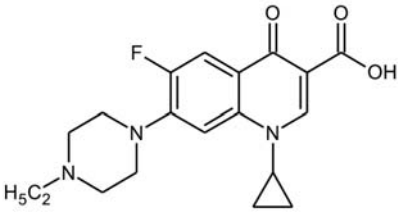
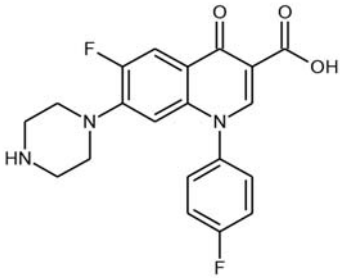
Un resumen de las propiedades fisicoquímicas de las FQs más utilizadas en la práctica veterinaria y que han sido objeto de nuestras investigaciones se lista en la Tabla 2.3; mientras que los métodos analíticos empleados para su determinación se describen en la sección 2.4 de este capítulo.

Las características descritas, según las propiedades fisicoquímicas de cada fluoroquinolona permiten la asertividad en el abordaje metodológico, dirigido bien sea a su tratamiento de muestra, o al desarrollo de métodos de separación cromatográficos. Específicamente la capacidad de estas moléculas para ionizarse en medios de pH controlados son características ampliamente explotadas en el desarrollo de los métodos, pues facilitan su discriminación en medio de los componentes endógenos de una matriz (tratamiento de muestra) o de los contaminantes endógenos persistentes (separación cromatográfica de muestra tratada).

Tabla 2.3 Propiedades físico-químicas de las fluoroquinolonas objeto de estudios en nuestros proyectos de investigación [8].

NORFLOXACINA	
 Ácido 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il-1H-quinolin-3-carboxílico $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ - Pm 319.33 g mol^{-1}	- Sólido cristalino de color blanco amarillento. - pKa_1 5.94; pKa_2 8.42 - Soluble: *ácido acético*. Poco soluble: *agua, acetona, acetonitrilo, etanol.* - Uso clínico - Eliminación: renal y biliar. Dentro de las primeras 24 horas, entre 26-32% de la dosis oral administrada se recupera en forma inalterada. - No se ha establecido su seguridad y eficacia en niños. - Contraindicada en mujeres embarazadas.
CIPROFLOXACINA	
 Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il-quinolin-3-carboxílico $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ - Pm 331.34 g mol^{-1}	- Sólido cristalino ligeramente amarillento. - pKa_1 5.86; pKa_2 8.84 - Soluble: *agua en medio ácido*. - Prácticamente insoluble: *metanol, acetonitrilo, acetona, agua.* - Fotolábil. - Uso clínico. - Eliminación: entre 40-50% de la dosis administrada se excreta en forma inalterada. Un 15% se elimina como metabolitos, menos activos que la sustancia original.

MARBOFLOXACINA	
 Ácido 9-Fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-piridol(3,2,1-ij) (4,2,1)benzoxadiazin-6-carboxílico $C_{17}H_{19}FN_4O_4$ - Pm 362.36 g mol^{-1}	- Sólido cristalino blanco amarillento. - pKa_1 5.51; pKa_2 8.26 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *agua en medio alcalino, acetonitrilo, acetona.* - Uso veterinario - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.
LEVOFLOXACINA	
 Ácido (*S*)-7-fluoro-6-(4-metilpiperazin-1-il)-10-oxo-4-tia-1-azatriciclo[7.3.1.$0^{5,13}$] trideca-5(13),6,8,11-tetraen-11-carboxílico $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ - Pm 361.37 g.mol^{-1}	- Sólido cristalino de color blanco amarillento. - pKa_1 6.05; pKa_2 8.22 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *metanol, acetonitrilo, acetona, agua en medio alcalino.* - Uso clínico - Contraindicada en mujeres embarazadas. - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.
LOMEFLOXACINA	
 Ácido (RS)-1-etil-6,8-difluoro-7-(3-metilpiperazin-1-il)-4-oxo-quinolin-3-carboxílico $C_{17}H_{19}F_2N_3O_3$ - Pm 387.81 g.mol^{-1}	- Sólido cristalino de color blanco a amarillo pálido. - pKa_1 6.0; pKa_2 9.0 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *metanol, acetonitrilo, acetona.* - Uso clínico - Eliminación: 65% de la dosis oral administrada se excreta por la orina en forma inalterada. - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.

DANOFLOXACINA	
 Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-[(1S,4S)-3-metil-3,6-diazabiciclo[2,2,1]heptan-6-il]-4-oxo-quinolin-3-carboxílico $C_{19}H_{20}FN_3O_3$ - Pm 357.38 g mol^{-1}	- Sólido cristalino blanco ligeramente amarillento. - pKa_1 6.07; pKa_2 8.73 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *metanol, acetonitrilo, acetona, agua en medio alcalino.* -Uso veterinario - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.
ENROFLOXACINA	
 Ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxílico $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ - Pm 359.39 g mol^{-1}	- Sólido cristalino ligeramente amarillento - pKa_1 5.88; pKa_2 7.91 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *metanol, acetonitrilo, acetona, agua en medio alcalino*. - Uso veterinario en animales productores de alimentos. - Eliminación: renal y biliar. - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.
SARAFLOXACINA	
 Ácido 6-fluoro-1-(4-fluorofenil)-4-oxo-7-piperazin-1-il-quinolin-3-carboxílico $C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$ - Pm 475.87 g mol^{-1}	- Sólido cristalino blanco o ligeramente amarillento. - pKa_1 5.62; pKa_2 8.48 - Soluble: *agua en medio ácido*. Poco soluble: *metanol, acetonitrilo, acetona, agua en medio alcalino*. - Uso en acuicultura. - Causa artropatía y osteocondrosis en animales jóvenes de distintas especies.

2.4. Revisión de métodos analíticos empleados para la determinación de quinolonas y fluoroquinolonas en alimentos

La presencia de residuos de Qs y FQs tanto en alimentos como en el medioambiente, ha suscitado un creciente interés en el ámbito científico en los últimos años. Aunque existe un amplio número de métodos para su determinación en alimentos, considerados como la fuente más importante de residuos de estas sustancias para los seres humanos, por el contrario, existen pocos métodos descritos para su determinación en muestras medioambientales.

Parte del éxito en el desarrollo de los proyectos de investigación se basa en la revisión exhaustiva de la literatura científica disponible, de modo que nos permita asegurar las estrategias adecuadas en el abordaje analítico, reduciendo con ello la realización de experimentos costosos en términos de recurso humano y financiero. Por ello, a continuación presentamos una revisión de las estrategias de abordaje analítico para este tipo de sustancias en muestras alimentarias, a fin de identificar el estado del arte del mismo y contextualizar el alcance de nuestras investigaciones.

Esta revisión comprende los trabajos publicados en los últimos años con el fin de proporcionar una información actualizada sobre las principales tendencias, tanto en métodos de preparación de muestra como en técnicas analíticas para la determinación de residuos de Qs y FQs en muestras de alimentos y aguas.

2.4.1. Métodos de tratamiento de muestras de alimentos

A pesar de los avances que han experimentado en las últimas décadas las técnicas de separación y detección, en general, la etapa de preparación de muestra continúa siendo una fase crítica en el desarrollo de todo método analítico, ya que resulta esencial para obtener resultados fiables.

Las tendencias actuales en la etapa de tratamiento de muestra están dirigidas hacia el empleo de pequeñas cantidades de muestra, reducción en el consumo de disolventes orgánicos y automatización del proceso [9].

Los alimentos poseen en general matrices de gran complejidad y variabilidad ya que entre su composición incluyen sustancias de naturaleza muy diversa, tales como carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas, aminoácidos y proteínas, entre otros.

Por tanto, en la mayoría de los casos el análisis de residuos de antimicrobianos a los niveles de los Límites Máximos de Residuos establecidos en este tipo de matrices requiere necesariamente la aplicación de procedimientos de tratamiento de muestra adecuados, con el fin de aislar cuantitativamente los analitos de la matriz y eliminar las posibles interferencias que podrían afectar la selectividad del método.

En los últimos años se han publicado varios métodos para la determinación de residuos de Qs y FQs en leche [10-12], huevos [13-16] y diferentes tejidos animales [17-26]. Sin embargo, hasta el momento muy pocos han descrito un método analítico para la determinación de Qs y FQs en alimentos infantiles [27].

2.4.1.1. Técnicas de extracción automatizadas

a) Extracción con disolventes presurizados (PLE)

En los últimos años se han descrito numerosas aplicaciones de esta técnica de extracción dirigidas fundamentalmente al análisis de residuos de antimicrobianos en muestras medioambientales y, en menor medida, en alimentos [28-30].

Se trata de una técnica de extracción adecuada para su empleo en muestras sólidas o semisólidas. Las ventajas de esta técnica residen en dos aspectos:

- Su operación es automatizada y con reducida manipulación de la muestra. Por una parte, esto permite disminuir los tiempos de

preparación de muestra y obtención de los resultados de análisis. Al mismo tiempo, su aplicación también permite reducir la incertidumbre de los resultados analíticos.

- Los volúmenes de solventes requeridos para la extracción de los analitos de interés son menores a los utilizados en las técnicas convencionales de extracción, como en el caso del soxhlet. En algunos casos se utiliza agua como disolvente de extracción [31], lo cual resulta muy atractivo desde el punto de vista medioambiental.

No obstante, a pesar de tratarse de una opción interesante para el análisis de residuos de antimicrobianos, existen muy pocos métodos disponibles para su determinación en alimentos, quizá debido a que desde su desarrollo, la extracción con disolventes presurizados se había enfocado en el análisis de muestras medioambientales, y poco se había explorado sus bondades al análisis de alimentos.

Uno de ellos es el propuesto por Herranz y colaboradores [32] para la extracción selectiva de 3 FQs (enrofloxacina, ciprofloxacina y sarafloxacina) de muestras de huevo. En dicho trabajo se estudió la influencia de las variables críticas que condicionan el éxito de la técnica y, por tanto, la eficacia del proceso de extracción, como son el disolvente, la temperatura, la presión y el número de ciclos de extracción. Los resultados obtenidos demostraron que las recuperaciones de estas FQs dependían básicamente de la composición del disolvente y de la temperatura, mientras que la presión y los ciclos de extracción no afectaban significativamente.

Para la matriz huevo, las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron utilizando como disolvente la mezcla de H_3PO_4 (50 mM, pH 3.0) / MeCN (50:50, %v/v), a 1500 psi, 70 ºC y 3 ciclos de extracción de 5 minutos cada uno. En estas condiciones las recuperaciones medias se situaron entre 67-90% y los extractos obtenidos no requirieron etapas posteriores de limpieza previas al análisis cromatográfico, lo cual reduce considerablemente el tratamiento de muestra y el tiempo de análisis.

Estos son aspectos bien valorados en el desarrollo de métodos analíticos, pues el consumo, de tiempo en el tratamiento de una muestra, define en gran manera la competitividad del laboratorio para el abordaje simultáneo de un alto número de estas.

El método validado se aplicó satisfactoriamente al análisis de enrofloxacina y ciprofloxacina en muestras de huevos obtenidos de gallinas tratadas con el medicamento veterinario Hipralona ENRO-S.

b) Extracción asistida con microondas (MAE)

La técnica de Extracción Asistida con Microondas se basa en la energía proporcionada por las microondas para calentar el disolvente que está en contacto con la muestra, facilitando la extracción de los analitos [33, 34]. Esta técnica se caracteriza por un bajo consumo de disolventes y es posible aplicarla en condiciones de presión atmosférica o alta presión, de forma similar a los sistemas basados en PLE.

Sin embargo, se debe puntualizar que la eficacia de la extracción se ve limitada por el contenido de agua en las muestras, lo que se traduce en bajas recuperaciones de los analitos de interés en muestras de alimentos de origen animal. Este es un inconveniente fundamental en el análisis de muestras de alimentos, para las que sería necesario aplicar una etapa previa de liofilización, que a su vez implica un incremento del tiempo dedicado al tratamiento de la muestra. Por todo ello, la MAE no es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de alimentos en los laboratorios de rutina.

A pesar de ello, Hermo y colaboradores [35] lograron establecer un método para la determinación de 8 quinolonas en músculo de cerdo. En este, la muestra, previamente homogenizada, se extrajo con una mezcla H_3PO_4 (0.3%) / MeCN (75:25, %v/v) durante 4 min empleando el 40% de la potencia total del microondas, con el fin de disminuir la coextracción de interferencias de la matriz y evitar así una etapa posterior de limpieza de los extractos.

La comparación de los rendimientos de extracción obtenidos empleando MAE con los proporcionados por otros métodos clásicos demostró la utilidad de esta técnica que además, proporcionó valores de recuperación similares para la mayoría de los analitos.

2.4.1.2. Técnicas de preconcentración y limpieza

En general, la mayoría de los métodos de determinación de Qs en alimentos incluyen una primera etapa de extracción sólido-líquido o líquido-líquido para, posteriormente, llevar a cabo la preconcentración y limpieza del extracto obtenido mediante extracción en fase sólida (SPE) o microextracción en fase sólida (SPME) [24]. Esta segunda etapa se puede realizar en múltiples formatos, tanto en sistemas "*off-line*" (SPE dispersiva, cartuchos, discos o placas de 96 pocillos) como "*on-line*" en forma de (micro) columnas empaquetadas o fibras recubiertas.

En cuanto al tipo de material sorbente, existe una amplia variedad de materiales disponibles actualmente para su aplicación en SPE que incluyen la fase inversa convencional, fases de intercambio iónico y de mecanismo mixto, materiales de acceso restringido (RAMs), partículas de gran tamaño para cromatografía de flujo turbulento (TFC) y polímeros de impronta molecular (MIPs), entre otros.

a) Extracción en fase sólida (SPE)
Se trata de la técnica de preconcentración y limpieza más frecuentemente empleada en la determinación de Qs en muestras de alimentos.

Como se mencionó antes, la SPE puede realizarse tanto en modo "*off-line*" como "*on-line*", presentando cada sistema las ventajas e inconvenientes que se detallan en la Tabla 2.4. El amplio número de aplicaciones basadas en SPE "*off-line*" indican que es una configuración de uso más común que la "*on-line*".

En la mayoría de los casos, la estrategia aplicada para la determinación de quinolonas incluye una etapa previa de precipitación de proteínas

con ácido trifluoroacético (TFA), ácido tricloroacético (TCA), o mezclas de disolventes orgánicos [11, 17, 24] y a continuación, especialmente en el caso de alimentos ricos en lípidos (leche), la eliminación de la grasa con éter dietílico o n-hexano.

Siguiendo este principio, Tang y colaboradores [36] compararon la eficacia de 6 agentes desproteinizantes (MeOH, MeCN y mezclas de estos con ácidos y bases) para el análisis de 5 FQs en muestras de leche. Tras la desproteinización con ácido acético/MeCN (5:95, v/v) y posterior eliminación de la grasa con n-hexano se aplicó una etapa de Extracción en Fase Sólida (SPE, sigla del inglés) con cartuchos de fase inversa convencionales. Las mejores recuperaciones (85-103%, RSDs < 9%) se obtuvieron cargando los extractos a pH ácido y eluyendo las FQs con una mezcla de $NH_{3(ac)}$ (1M) / MeOH (25:75, %v/v).

El método validado se aplicó al análisis de 22 marcas de leche comerciales del mercado chino, detectando CIPRO en 4 muestras a niveles de concentración superiores al Límite Máximo de Residuos.

Tabla 2.4 Características de SPE en modo "off-line" y "on-line".

SPE off-line	SPE on-line
Se preconcentran volúmenes de muestra relativamente grandes	No requiere preconcentrar volúmenes grandes de muestra
Simplicidad instrumental	Facilidad de automatización de todo el proceso de análisis
Facilidad operacional	Requiere personal cualificado para su operación instrumental
Cartuchos desechables de un solo uso	Posibilidad de contaminación de las muestras por reutilización del sorbente
Posibilidad de realizar extracciones secuenciales mediante el acoplamiento en serie de distintos tipos de cartucho	Menos flexible para llevar a cabo extracciones secuenciales

Procedimiento manual que implica alto grado de manipulación de la muestra, automatizable solo con un sistema tipo robot	Procedimiento automático que implica mínima manipulación de la muestra
Mayor consumo de disolventes orgánicos	Bajo consumo de disolventes orgánicos
Necesidad de evaporar los extractos antes del análisis cromatográfico	No require etapas de evaporación previas
Mayor variabilidad en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad de los resultados	Reutilización del sistema de fase estacionaria
Generación de mayor volumen de residuos de disolventes	Baja generación de residuos de disolventes
Posibilidad de preconcentrar simultáneamente varias muestras	No se pueden preconcentrar varias muestras simultáneamente
Bajo coste y equipamiento sencillo	No es posible la elución fraccionada de los analitos
Imposibilidad de acoplamiento con diversas técnicas instrumentales	Posibilidad de acoplamiento con diversas técnicas instrumentales de separación

Algunos de los agentes desproteinizantes empleados habitualmente en el análisis de alimentos también resultan eficaces para extraer las Qs, como es el caso del MeCN y el tampón McIlvain-EDTA. Así, Sun y colaboradores, han descrito el empleo de estos medios para la extracción de Qs en muestras de cerdo y leche bovina [37, 38]. Posteriormente los extractos obtenidos se preconcentraron empleando cartuchos Oasis HLB, obteniéndose recuperaciones entre el 70 y el 90%.

Por su parte, Galarini y colaboradores [39] emplearon cartuchos Oasis HLB para la determinación de 11 Qs en muestras de pienso por LC-DAD-FLD. La extracción previa de las Qs se realizó empleando una mezcla H_3PO_4/ACN (70:30, %v/v). A continuación, el extracto se diluyó con una disolución de H_3PO_4 con el fin de disminuir la concentración de MeCN y

favorecer la retención de los analitos en los cartuchos. Las recuperaciones obtenidas fueron 69-106% con RSDs < 16%.

Entre los inconvenientes del método destacan el elevado consumo de disolvente empleado en la etapa previa de extracción (50 mL) y la baja sensibilidad por los elevados límites de detección (40-800 $ng.g^{-1}$) y cuantificación (100-2400 $ng.g^{-1}$) obtenidos.

Por otra parte, algunos autores han propuesto el empleo en tándem de cartuchos SPE de diferente naturaleza para evitar las etapas específicas de desproteinización y desengrasado del alimento, originando métodos muy laboriosos que pueden afectar la exactitud de los resultados analíticos. Un ejemplo es el método propuesto por Lara y colaboradores [40], que han descrito la aplicación de cartuchos Oasis MAX y Oasis HLB en tándem para la determinación de 8 Qs en muestras de leche.

Tras la extracción de las muestras con $NH_{3(ac)}$ concentrado y posterior centrifugación, el extracto fue percolado a través de cartuchos de tipo Oasis MAX (fase mixta) para eliminar las proteínas y los lípidos presentes. La fracción obtenida se llevó a sequedad, se redisolvió y se cargó en los cartuchos Oasis HLB (fase polimérica) con el fin de eliminar las sales y preconcentrar las Qs, obteniendo recuperaciones superiores al 81% (RSDs<17%). Estos valores son muy superiores a los obtenidos empleando únicamente cartuchos Oasis HLB (50%) sin el tratamiento previo de desproteinización ni desengrasado de la muestra.

Siguiendo estrategias similares, Christodoulou y colaboradores [41] han desarrollado un procedimiento de extracción de 10 Qs de muestras de huevo y pollo empleando TFA (0.1% v/v en MeOH). Aunque los autores intentaron proponer un método rápido y sencillo, las etapas de agitación, sonicado, centrifugación y evaporación a sequedad que implica cada extracción (2 en total) antes de la purificación del extracto por SPE (LiChroLut RP-18) se traducen en un aumento notable del tiempo de análisis y de la manipulación de la muestra. Además, el disolvente de

extracción propuesto no fue útil para las muestras de huevo, con las que tuvo que emplearse una disolución 0.75 M de NaOH en ACN. Las recuperaciones obtenidas estuvieron entre 96 y 103% (RSDs<4%), con límites de cuantificación entre 15 y 37 $ng.g^{-1}$.

Por otro lado, Hoof y colaboradores [42] han puesto a punto un método basado en SPE-LC-MS/MS para la determinación de 8 Qs y FQs en leche, músculo y productos de acuicultura. Para precipitar las proteínas de la leche se empleó una mezcla TCA/MeOH (20:80, v/v), mientras que en las muestras restantes las Qs se extrajeron con agua sin desproteinización previa.

Una alícuota de los extractos obtenidos se purificó por SPE (Isolute C18), incluyendo una etapa de lavado de los cartuchos con n-hexano para eliminar los lípidos y posterior elución de las Qs con TFA (1% v/v en ACN). Aunque las recuperaciones obtenidas fueron aceptables (82-110%), la baja reproducibilidad del método propuesto (RSDs 16-18%) cuestiona la eficacia del agua como disolvente de extracción, dado el carácter zwitteriónico de las FQs (Figura 2.5) a pH neutro que limita su solubilidad en agua.

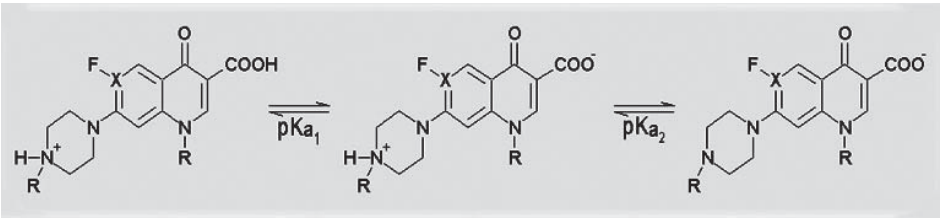


Figura 2.5 Equilibrio ácido base de las fluoroquinolonas.

Los valores del pKa1 (grupo carboxilo) y pKa2 (grupo amino) de las FQs estudiadas se encuentran en el intervalo comprendido entre 5.5-6.0 y 7.5–8.5, respectivamente [43]. De esta forma, es necesario optimizar adecuadamente el pH del disolvente empleado para la extracción de estos compuestos.

Conscientes de la importancia de la etapa de extracción, algunos autores han aplicado programas de diseño experimental con el fin de optimizar las condiciones de extracción con un número mínimo de experimentos.

Esta aproximación permite, además, evaluar las posibles interacciones entre los factores seleccionados. Así, Clemente y colaboradores [44] han aplicado un diseño experimental para optimizar la extracción de 5 Qs en muestras de músculo de pavo. Entre las variables optimizadas se incluyeron el porcentaje de disolvente orgánico (ACN) y de ácido (H_3PO_4) presentes en el disolvente de extracción. Como una condición de compromiso entre la selectividad del método y la retención de las quinolonas en el cartucho de SPE, se seleccionó como disolvente de extracción una mezcla H_3PO_4 (0.4%) / MeCN (70:30, %v/v). A continuación, los extractos se preconcentraron en cartuchos ENV+ Isolute y la elución se llevó a cabo con una mezcla TFA (2% v/v en agua) /ACN (25:75, %v/v) y MeCN para, posteriormente, proceder a su análisis cromatográfico.

Además de los tradicionales cartuchos, últimamente se están empleando otros formatos SPE alternativos. Así, por ejemplo, se ha descrito la utilización de placas de 96 pocillos Oasis HLB para la determinación de Qs en muestras de carne [45]. En este caso, se trata de un método simple y rápido pues el tratamiento de la muestra consistió en una extracción con agua mediante ultrasonidos y posterior transferencia del extracto a las placas, lo cual permite analizar un elevado número de muestras (24 muestras por día). Sin embargo, el inconveniente son las bajas recuperaciones obtenidas (30-55%), por lo que el método solo tiene utilidad como método de cribado.

De igual forma, la SPE en formato dispersivo (d-SPE) está ganando terreno a los tradicionales cartuchos dado que simplifica y acelera la etapa de limpieza y resulta más económica [46]. En este caso el extracto de la muestra se agita en presencia de un sorbente poroso apropiado (C18, aminas primarias y secundarias, grafito) que retiene las sustancias interferentes, pero no los analitos de interés. Así, se han descrito

aplicaciones de la técnica d-SPE a la determinación de residuos de Qs en muestras de diferentes tipos de alimentos empleando sorbentes tipo Bondesil-NH_2 y C18, entre otros [47, 48].

Aunque las recuperaciones obtenidas fueron buenas, en general se observó un efecto matriz de supresión de la señal para la mayoría de las Qs analizadas en muestras de salmón.

b) Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

Se trata de una estrategia de preparación de muestra que se aplica fundamentalmente a muestras sólidas, semisólidas o viscosas, que van desde tejidos animales hasta alimentos con un alto contenido en lípidos.

Esta técnica combina la homogenización, ruptura de tejidos, extracción y limpieza en un único proceso [49-51]. La muestra se tritura de forma manual en presencia de un agente dispersante para provocar la disgregación de la matriz original e incrementar el área superficial, facilitando de esta forma la posterior extracción de los analitos de interés.

La proporción muestra/dispersante es un aspecto que se optimiza en función de la complejidad de la matriz y de las propiedades físicoquímicas del material dispersante. Una vez triturada la muestra en presencia del agente dispersante, se transfiere a una columna donde se lleva a cabo la extracción y eventual limpieza de la muestra con disolventes adecuados.

Las principales ventajas de esta técnica son la posibilidad de eliminar etapas previas de tratamiento (desproteinización y desengrasado) y la alta eficacia de las etapas de lavado y elución debido al incremento del área superficial de la muestra.

La mayoría de las aplicaciones emplean sorbentes tipo C18 y, menos frecuentemente, C8. Un ejemplo, es el método propuesto por Wang y colaboradores [52] que han determinado 5 FQs en músculo de cerdo empleando una fase C18.

En dicho trabajo se estudió la influencia de la relación muestra/agente dispersante sobre la recuperación de los analitos. El empleo de relaciones 1:1 y 1:2 condujo a recuperaciones bajas e irreproducibles (<57%, RSDs <26%), que se atribuyeron al mal empaquetamiento de la columna debido a la baja cantidad de mezcla obtenida. Al incrementar dicha relación (1:4) se observó un aumento de las recuperaciones y una mejora de la reproducibilidad (64-96%, RSDs <9.6%), por lo que finalmente se seleccionó la relación 1:4.

Adicionalmente, los autores compararon la eficacia del procedimiento MSPD frente a otro basado en SPE, obteniendo recuperaciones del 16-61% con esta última, frente a recuperaciones superiores al 80% para MSPD. Por lo tanto, el empleo de MSPD permitió obtener mejores recuperaciones, menores tiempos de análisis, así como un menor consumo de disolventes orgánicos.

Bogialli y colaboradores [9, 49, 53-55] han publicado diferentes trabajos relacionados con el empleo de MSPD como técnica de preparación de muestra para la determinación de residuos de distintas familias de antimicrobianos en alimentos. Las características más relevantes de dichos trabajos son el empleo de agua caliente como disolvente de extracción y el que esta se lleva a cabo en un instrumento similar a los empleados en PLE, pero no automático. El control de la temperatura de extracción permitió extraer selectivamente los analitos de interés con la mínima coextracción de componentes de la matriz.

Así por ejemplo, han determinado 8 Qs en muestras de huevo y leche bovina [55, 56], obteniéndose recuperaciones entre 65 y 105% en función de la matriz analizada. En el caso particular de las muestras de huevo, la recuperación de las Qs aumentó de forma significativa con la adición de ácido fórmico en el agua e incrementando la temperatura de extracción. En estas condiciones el agua es menos viscosa y polar, por lo que aumenta su poder solubilizante. Las principales ventajas de este procedimiento de extracción son la posibilidad de llevar a cabo la extracción y limpieza de

muestra simultáneamente, el empleo de un disolvente "amigable" con el medioambiente y la escasa manipulación de las muestras.

La incorporación de materiales altamente selectivos como agentes dispersantes de MSPD ha incrementado de forma significativa el potencial de esta técnica.

En este sentido, Yan y colaboradores [57] han empleado un polímero de impronta molecular (MIP) como dispersante para la extracción de 5 FQs de muestras de huevo y músculo animal. Los MIPs poseen cavidades complementarias en tamaño, forma y distribución de grupos funcionales a la molécula plantilla empleada en su síntesis. Así permiten el reconocimiento selectivo de la misma o de compuestos relacionados estructuralmente. Estos autores prepararon un MIP utilizando Ofloxacina como molécula plantilla que resultó compatible con medios acuosos. Mezclando la muestra con el MIP en una relación 1:1 observaron que las recuperaciones obtenidas siempre fueron mejores (>86%, RSDs <7%) que las obtenidas al emplear como dispersante fases convencionales tipo C18, sílice, florisil o arena.

Otro inconveniente que observaron los autores con el empleo de materiales poco selectivos fue la coelución de interferencias de la matriz, que afectaron a la correcta identificación y cuantificación de las Qs. Los límites de detección obtenidos al emplear el MIP estuvieron entre 0.05 y 0.09 $ng.g^{-1}$.

c) Cromatografía de flujo turbulento (TFC)

Se trata de una técnica relativamente nueva de preparación de muestra, que se acopla en línea con la etapa de separación cromatográfica.

Básicamente consiste en una precolumna rellena con un sorbente de tamaño de partícula relativamente grande (típicamente 60 µm) lo cual permite llevar a cabo la extracción en línea trabajando a caudales elevados (4-6 mL min^{-1}). Requiere un mínimo tratamiento de la muestra ya que

esta generalmente se inyecta diluída en disolventes acuosos y en donde las moléculas de pequeño tamaño difunden hacia el interior de los poros del sorbente mientras que las macromoléculas (como las proteínas) son arrastradas por el elevado caudal de la fase móvil hacia el desecho.

Posteriormente, los analitos atrapados en la precolumna se desorben con un disolvente orgánico polar invirtiendo el sentido de bombeo (modo de elución "back-flush"), de manera que el eluato se transfiere mediante el giro de una válvula intercambiadora hacia la columna analítica para su separación.

Entre las ventajas de esta técnica podemos destacar su elevada reproducibilidad debido a la automatización, cortos tiempos de análisis, escasa manipulación de la muestra y buena sensibilidad, y como inconveniente, el elevado consumo de disolvente que suponen los altos caudales de trabajo, lo cual compromete su aplicación en el futuro.

Hasta el momento, se han descrito pocas aplicaciones para la determinación de Qs bajo esta técnica [58, 59]. En ambos casos, los autores desarrollaron sistemas en línea basados en TFC-LC-MS/MS.

En el primer trabajo los autores emplean una columna de TFC basada en un copolímero de estireno-divinilbenceno para preconcentrar y limpiar los extractos procedentes de muestras de miel diluídas y filtradas previamente. No se observaron cambios significativos en los resultados obtenidos con la columna tras más de 400 inyecciones, realizando el análisis completo de una muestra en tan solo 23 minutos con recuperaciones entre 85 y 127% y límites de cuantificación de 5 $ng.g^{-1}$.

En el segundo trabajo también se empleó una columna de TFC (Cyclona®), esta vez para determinar Enrofloxacina y Ciprofloxacina en diferentes tejidos animales. Debido a la complejidad de este tipo de matrices, las muestras se extrajeron con una mezcla MeCN / H_2O / ácido fórmico y se centrifugaron y filtraron justo antes de su inyección en el sistema.

El análisis de una muestra se realizó en solo 4 min. con recuperaciones entre el 72 y 105% y límites de cuantificación de 25 $ng.g^{-1}$ en las distintas matrices evaluadas.

d) Polímeros de impronta molecular (MIPs)

A pesar de las características de los sorbentes convencionales empleados en SPE, su dificultad para eliminar de forma eficaz las interferencias presentes en muestras complejas ha conducido al desarrollo de nuevos materiales basados en un mecanismo de reconocimiento molecular selectivo.

Dentro de este grupo se incluyen los inmunosorbentes, que se basan en la alta afinidad y selectividad de las interacciones antígeno-anticuerpo, permitiendo la extracción selectiva del analito de interés y de los compuestos relacionados estructuralmente. Sin embargo, el desarrollo de estos materiales es un proceso largo y relativamente costoso, dos aspectos poco atractivos para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas.

Estas desventajas han conducido al reciente desarrollo de los MIPs y a su aplicación como sorbentes en procedimientos de extracción en fase sólida (MISPE). Los MIPs compiten con las fases convencionales de SPE y los immunosorbentes en términos de selectividad, estabilidad y coste.

El empleo de los MIPs como sorbentes selectivos en SPE es reciente y, comparado con otras áreas de aplicación, el número de usos de MISPE para la determinación de Qs en alimentos en los últimos años es escasa [60, 61]. Díaz-Álvarez y colaboradores [27] han desarrollado un procedimiento MISPE basado en un MIP que utiliza CIPRO como molécula plantilla para la determinación de 9 Qs en alimentos infantiles.

Tras una extracción previa de las muestras con MeOH en un baño de ultrasonidos, el extracto se purificó, a efectos comparativos, empleando un sorbente basado en intercambio aniónico (SAX) y el MIP. El análisis cromatográfico del extracto procedente de la preconcentración con cartuchos SAX mostró la presencia de interferencias de matriz que

afectaban a la correcta identificación y cuantificación de una de las FQs, en cambio el extracto procedente del MIP proporcionó cromatogramas libres de interferencias, lo que demostró la mayor selectividad de este sorbente.

Por el contrario, el MIP mostró una selectividad preferente para algunos de los analitos, concretamente para el grupo de las FQs, a diferencia del sorbente SAX que, al ser menos selectivo, retuvo un mayor número de analitos.

Entre las principales limitaciones del método propuesto se destacan la limitada capacidad de carga del MIP, el elevado consumo de disolventes orgánicos empleado durante el proceso MISPE y la necesidad de acoplar los dos métodos de SPE para poder determinar las 9 Qs propuestas.

Recientemente, se están comercializando cartuchos MISPE (SupelMIP™) para la determinación de FQs, que se han aplicado con excelentes resultados al análisis de diferentes matrices como miel, leche y riñón [60].

En particular, el tratamiento de muestras de leche para la extracción de fluoroquinolonas ha representado un reto analítico en su abordaje. Estas muestras no pueden ser analizadas sin una preparación preliminar, ya que los contaminantes se diluyen y la matriz es bastante compleja. Una de las principales dificultades relacionadas con la determinación de FQs en la leche es su alto contenido de grasa y proteínas, que a menudo puede interferir en la determinación analítica. Por tanto, los pasos de limpieza y extracción de residuos de medicamentos veterinarios siguen siendo un reto en el campo de la química analítica [62-65].

El procedimiento de preparación de muestra involucra dos subetapas fundamentales y consecuentes una de la otra, una de ellas es el pretratamiento, en el cual se da la extracción cuantitativa de los analitos en simultáneo con la eliminación de los principales interferentes endógenos, y la preconcentración y limpieza, en la cual hay una posterior remoción de interferentes residuales de matriz y preconcentración analítica de los compuestos.

En el pretratamiento de la muestra la precipitación de proteínas de la leche se lleva a cabo empleando disolventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y etanol solos [66, 67] y en combinación con ácidos, como el tricloroacético [68] y acético [62] o con soluciones acuosas de estos [69, 70], mientras que la eliminación de grasa se puede llevar a cabo utilizando hexano [11, 68, 71], MeOH, MeCN, H_2O y ácidos como el fórmico, acético y tricloroacético (TCA).

Para la preconcentracion y limpieza, la SPE sigue siendo el método de elección para la extracción de residuos de antibióticos en matrices complejas como la leche. Dentro de las ventajas se encuentra que el procedimiento analítico es más simple, se utilizan pequeños volúmenes de disolventes, se obtienen extractos más limpios y normalmente mayores recuperaciones.

La retención de analitos puede establecerse mediante interacciones no polares, polares o iónicas y existe una amplia variedad de sorbentes. SPE actualmente ofrecen varias opciones de capacidad de extracción y selectividad. Por lo tanto, la elección del sorbente es un factor clave para el éxito de la preparación de la muestra y depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del analito objetivo y de la composición de la matriz.

En las técnicas SPE para la extracción de las nuevas FQs, se han utilizado dos tipos de sorbentes, los cartuchos de fase inversa basados en sílice y los sorbentes poliméricos de fase inversa. Estos últimos son elegidos en la mayoría de los casos porque da los mejores resultados. Los sorbentes poliméricos utilizados para la extracción de FQs son predominantemente hidrofóbicos, por lo que el mecanismo de retención dominante se basa en interacciones hidrofóbicas; sin embargo, tienen algunos grupos funcionales hidrófilos, una situación ideal para compuestos anfóteros como las FQs que tienen un núcleo aromático y también grupos ionizables.

El procedimiento general que se aborda al emplear la SPE consta de cinco pasos bien diferenciados: acondicionamiento, carga de muestra,

lavado de los contaminantes, secado y elución del analito de interés. Este proceso se representa en la siguiente figura:

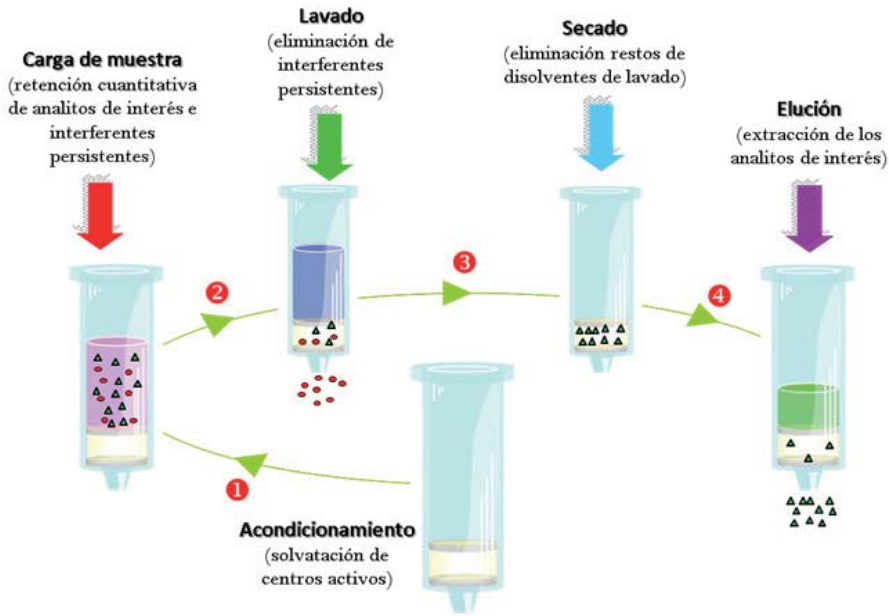


Figura 2.6 Esquema representativo de un proceso de Extracción en Fase Sólida (SPE): Se identifican las cinco etapas características del proceso y el orden en que estas son abordadas.

- ***Acondicionamiento***: Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, con la finalidad de eliminar las impurezas, activar el adsorbente y los grupos funcionales. Generalmente se usa MeOH o MeCN para la activación de adsorbentes hidrofóbicos.
- ***Carga***: El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente a los analitos, consiguiendo así el mayor grado de selectividad posible, los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse, más o menos fuertemente, en la superficie del adsorbente.
- ***Lavado***: En esta etapa se persigue la eliminación selectiva de los analitos considerados como endógenos persistentes de la matriz, cuya pre-

sencia podrían comprometer la calidad del análisis basado en la técnica instrumental. Con ello, evidentemente se podrían ver comprometidos también la exactitud y precisión de cualquier método validado.

- ***Secado***: Con el fin de eliminar las trazas del disolvente de lavado, se deja circular aire a vacío a través de los cartuchos de SPE durante un tiempo breve. Esta etapa mejora el rendimiento de extracción.
- ***Elución***: Constituye la etapa final. Los aspectos críticos de esta son la acertada composición del disolvente de elución, y el uso del menor volumen de dicho disolvente, de modo que revierta la interacción analito-adsorbente. La combinación de estos aspectos conlleva la elución del 100% del contenido de analitos de interés, permitiendo recuperaciones exactas, objetivo fundamental en el desarrollo de este tipo de métodos.

2.4.2. Métodos de determinación de quinolonas

Los métodos de determinación de antimicrobianos han ido evolucionando con el tiempo, de forma paralela al desarrollo de instrumentación cada vez más sensible que permite alcanzar menores límites de detección.

El uso de nuevos equipos más sofisticados, que con los años han ido incorporándose a la plataforma tecnológica disponible en los laboratorios de análisis, ha transformado el panorama del análisis de residuos en alimentos de origen animal. La figura 2.7 representa la línea de tiempo de las técnicas instrumentales más usadas.

2.4.2.1. Métodos cromatográficos

La cromatografía líquida (LC) ha sido la técnica más utilizada en el análisis de Qs. Hasta el momento se han descrito en la bibliografía diferentes métodos cromatográficos con detección de diodos en fila (DAD) [27, 37, 52], fluorescencia (FLD) [17, 39, 61, 72, 73] o espectrometría de masas (MS) [22, 25, 54, 59, 74] para la determinación de residuos de estos antimicrobianos, tanto en muestras de alimentos como medioambientales.

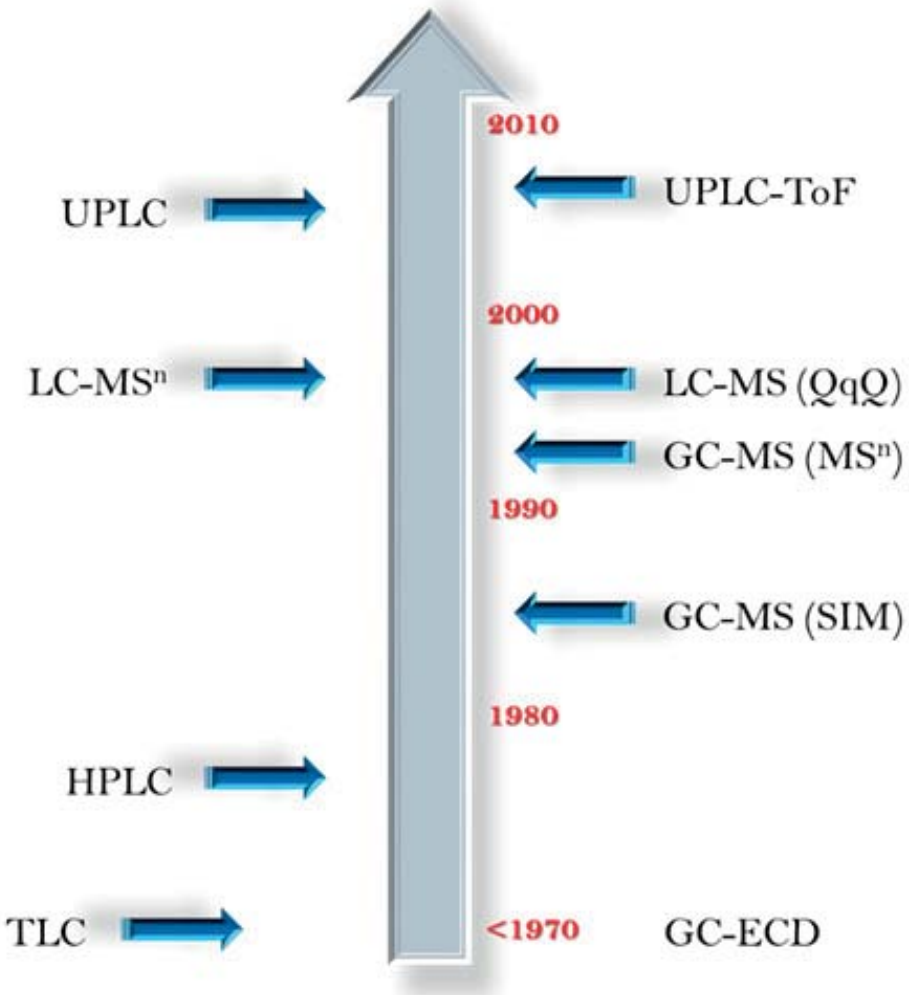


Figura 2.7 Línea de tiempo representando el orden de evolución de las técnicas analíticas instrumentales.

La cromatografía líquida en fase inversa con detector de fluorescencia (RPLC-FLD) se emplea frecuentemente en el análisis de residuos de Qs, debido entre otros aspectos, a su sensibilidad y selectividad, ya que las FQs presentan fluorescencia nativa [75, 76].

Generalmente, las fases móviles empleadas están constituidas por mezclas de MeCN o MeOH y agua. Como se ha mencionado anteriormente,

las Qs son compuestos que presentan un equilibrio ácido-base en disolución acuosa, por lo que resulta fundamental ajustar el pH de la fase móvil (típicamente entre 2 y 3) para llevar a cabo la separación cromatográfica de estos compuestos empleando columnas de fase inversa C8 o C18 y en algunos casos fenol o amida.

De este modo, la naturaleza ácida de la fase móvil no solo favorece la correcta separación de las Qs sino también incrementa la sensibilidad del método, dado que aumenta el rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia de estos compuestos, haciendo de este un sistema de detección mucho más sensible y selectivo que el DAD.

La presencia de grupos silanoles residuales e impurezas metálicas en los materiales que constituyen las fases estacionarias de estas columnas origina la aparición de colas, con el consiguiente ensanchamiento de los picos cromatográficos, pérdida de resolución y comprometiendo la separación de estas sustancias. Por ello, los métodos más recientes proponen el empleo de fases estacionarias con silanoles recubiertos (endcapped) o columnas de sílice de elevada pureza, libres de trazas metálicas.

Sin embargo, la tendencia actual en el análisis de residuos de Qs, al igual que para el resto de antimicrobianos, es el empleo de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS o LC-MS/MS) con fuente de ionización de electrospray (ESI).

Esta técnica ofrece la posibilidad de analizar un amplio número de residuos pertenecientes a distintas familias de modo simultáneo cuando se utiliza combinada con procedimientos de preparación de muestra genéricos [15, 63, 64], como los denominados métodos QuEChERS (siglas del inglés: Quick, Easy, Cheape, Effective, Rugged and Safe) [14]. El empleo de este sistema de detección y sus grandes avances tecnológicos han dado lugar a los métodos multirresiduo y multiclase [10, 65, 77].

Algunos ejemplos de estas nuevas metodologías multiclase en análisis de alimentos son, por ejemplo, el trabajo de Yamada y colaboradores [78],

que han desarrollado un método basado en LC-MS/MS para identificar simultáneamente 130 residuos en diferentes muestras de músculo animal, entre los que se encontraban 61 antimicrobianos de distintas familias. En términos generales, el método de tratamiento de muestra consistió en una extracción con MeCN/MeOH (95:5, v/v), posterior eliminación de lípidos con n-hexano, evaporación y redisolución en MeOH, previo al análisis. Aunque para la mayoría de los analitos la recuperación media estuvo entre 70 y 110%, en el caso de CIPRO y NOR estas no superaron el 70%. A pesar de que no se observó efecto matriz, la reproducibilidad del método fue baja para algunos antimicrobianos (RSD > 20%).

Otro ejemplo representativo de las metodologías multiclase es el desarrollado por Aguilera-Luiz y colaboradores [79], quienes proponen un procedimiento sencillo y rápido para la determinación de sulfonamidas, macrólidos, tetraciclinas y quinolonas en leche. Los compuestos de interés se extrajeron con MeCN acidificado en presencia de EDTA con el fin de mejorar la extracción de las tetraciclinas y macrólidos.

A continuación, se adicionó una mezcla de sulfato magnésico y acetato sódico con el fin de eliminar las trazas de agua y las proteínas presentes en la matriz. La fase orgánica se centrifugó y filtró y los extractos se analizaron directamente sin necesidad de aplicar una etapa de limpieza previa. El tratamiento de la muestra se completó en tan solo 10 minutos y las recuperaciones obtenidas para los distintos antimicrobianos fueron 73-108%, por lo que el método presenta un gran potencial para su aplicación en los laboratorios de control de residuos.

Sin embargo, una de las limitaciones de los métodos LC-MS/MS es que a menudo presentan efecto matriz, ya que la fuente ESI es muy susceptible a las interferencias de la matriz. El efecto matriz se traduce generalmente en una supresión de la señal de los analitos de interés, que afecta tanto a la sensibilidad del método como a la exactitud. Este efecto se ha observado frecuentemente en los métodos LC-MS/MS para la determinación de antimicrobianos tanto en alimentos como en muestras

medioambientales, debido a la complejidad de las matrices analizadas y al empleo de procedimientos de tratamiento de muestra poco eficaces.

Por ello, la eliminación eficaz de los constituyentes de la matriz sigue siendo un aspecto crítico en este tipo de metodologías, debido a los efectos de supresión iónica que pueden presentarse con esta clase de detectores. Un ejemplo es el método propuesto por Stubbings y colaboradores [80] para la determinación de sulfonamidas, quinolonas, fluoroquinolonas, ionóforos y nitroimidazoles en muestras de tejido animal por LC-MS/MS. Considerando las propiedades ácido-base de las FQs, el procedimiento QuEChERS empleado incluye un medio ácido para favorecer la extracción de estos compuestos. Así, las muestras se trataron con MeCN acidificado con ácido acético al 1% (v/v) en presencia de Na_2SO_4 y posterior limpieza del extracto por d-SPE.

Sin embargo, la limpieza insuficiente de los extractos provocó un efecto de supresión iónica sobre algunos analitos.

2.4.2.2. Métodos basados en otras técnicas analíticas

Se trata, por lo general, de métodos de criba sencillos y rápidos que requieren una sensibilidad relativamente alta y un porcentaje muy bajo de falsos negativos. Constituyen una herramienta muy útil en los programas de vigilancia de residuos a pesar de su limitada selectividad.

No obstante, este inconveniente no es crítico, ya que su propósito fundamental es detectar muestras no conformes que posteriormente se someterán a análisis confirmatorios. Por ello, estos métodos deben reducir al mínimo el porcentaje de falsos negativos, ya que únicamente las muestras positivas se evaluarán posteriormente [81]. En su mayoría se trata de bioensayos basados en técnicas inmunoquímicas (ELISA, RIA) y microbiológicas. El principal atractivo de estos métodos radica en el limitado tratamiento que requiere la muestra, tiempos cortos de análisis (entre 2-2.5 h para la mayoría de los kits), alta sensibilidad,

capacidad para analizar un elevado número de muestras y bajo costo, en comparación con otras técnicas de análisis.

El principal inconveniente de estos métodos es que generalmente, solo permiten la identificación de familias de compuestos, pero no de sustancias individuales. Actualmente existe una gran variedad de kits ELISA [18, 82] y microbiológicos [83] para la determinación de residuos de antibióticos de distintas familias en alimentos, piensos y agua de río [84, 85].

En algunos casos, el establecimiento de los LMRs ha obligado a una revisión crítica de los métodos de criba disponibles para incrementar su sensibilidad. Así, por ejemplo, aunque la presencia de ENRO en una muestra de tejido animal puede detectarse con la bacteria *Bacillus subtilis*, se ha sugerido el empleo de una segunda bacteria (*Escherichia coli "14"*) que es más sensible a la presencia de Qs. Sin embargo, esta bacteria no es adecuada para la detección de otras Qs (ej. DIFLO, FLUME, OXO y SARA) a sus LMRs [86]. Otras bacterias utilizadas como alternativa a las anteriores son *E. coli* ATCC11303 [87], *Yersinia spp* [88] y *B. stearothermophilus* [83].

Esta nueva generación de bioensayos mejora significativamente las características analíticas de los anteriores, pero los límites de detección que suelen describirse en bibliografía deben interpretarse con cuidado, ya que con frecuencia corresponden a calibrados basados en disoluciones patrón de los antibióticos, ignorando el hecho de que la matriz de las muestras reales puede tener una influencia significativa sobre la sensibilidad del bioensayo.

Finalmente, otra técnica alternativa empleada, aunque en menor medida, para el análisis de residuos de antimicrobianos es la electroforesis capilar (CE). Los modos más utilizados, especialmente en el análisis multiclase, son la electroforesis capilar en zona (CZE) y la cromatografía micelar electrocinética (MEKC) combinadas con procedimientos de tratamiento de muestra basados principalmente en SPE [89, 90].

2.5. Retos analíticos en el abordaje del análisis de fluoroquinolonas en leche bovina del mercado colombiano

Teniendo en cuenta la importancia de la carne y la leche bovina en la nutrición humana y su amplio consumo en todo el mundo, es muy importante garantizar la calidad de estos productos, siendo deber del productor respetar las especificaciones para la dosificación, días de tratamiento y tiempo de retiro como lo contemplan las buenas prácticas ganaderas (BPG), junto con la producción de alimentos inocuos a los consumidores, mientras que el deber de las entidades competentes es llevar a cabo un control de residuos.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de residuos de fluoroquinolonas en muestras de leche y carne a partir de métodos analíticos validados en el laboratorio y evaluar el posible efecto oxidativo *in vitro* de estos residuos sobre las principales fracciones proteicas a partir de los LMR establecidos por la Unión Europea.

Lo anterior ofrece muchos beneficios entre los cuales están, el aportar conocimientos sobre la exposición humana a estos contaminantes, contribuir a establecer la calidad de estos productos, fortalecer las investigaciones que se han hecho en relación a la utilización de este tipo de métodos en alimentos de origen animal y ofrecer una alternativa para implementar futuros métodos para el control de calidad en la industria de alimentos en Colombia.

Aunque en Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) ha fortalecido su sistema de información y vigilancia, este básicamente se dirige a la recepción de notificaciones de la posible presencia de enfermedades y medidas para su control, y poco ha desarrollado en materia de vigilancia y control de residuos de medicamentos veterinarios u otro tipo de sustancias en alimentos de origen animal como la leche. En el mismo sentido en el año 2005 el Consejo Nacional de Política Económica y Social de Colombia (CONPES) formuló una política sanitaria

y de inocuidad para las cadenas de carne bovina y leche, con la que se pretende mejorar las condiciones de sanidad e inocuidad, aumentar la competitividad y fortalecer la capacidad de comercialización del país.

Sin embargo, tres años después, uno de los informes de Prospectiva y Vigilancia Tecnológica e Inteligencia Competitiva, especialmente diseñado para perfilar las agendas de investigación de las Cadenas Productivas Agroindustriales de Colombia, estableció que en el país la regulación de micotoxinas, residuos de medicamentos, plaguicidas y químicos industriales, que hacen parte de los elementos a regular por parte de los programas de cumplimiento, no tienen LMRs permitidos o niveles de tolerancia, reconociendo la necesidad de definir los avances del Plan Nacional de Residuos para productos lácteos. Para cumplir estos lineamientos se plantea no solo el fortalecimiento institucional, sino también de la capacidad científica y tecnológica en el país, dirigida a tales aspectos.

Con el fin de ofrecer una alternativa que permita la implantación de programas eficientes que garanticen la inocuidad de los alimentos para el consumidor nacional, nuestros trabajos de investigación se han centrado en el desarrollo, puesta a punto y validación de metodologías analíticas útiles para la determinación de residuos de estas sustancias en matrices como leche y carne bovina. Pare ello, se ha empleado técnica de extracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida de alta presión y detección DAD.

Considerando que el objeto de estos análisis es el control y vigilancia de residuos, los métodos desarrollados debían cumplir con detectar la presencia de estas sustancias a niveles del LMR, de acuerdo con los valores que se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por la Directiva Europea para Fluoroquinolonas de uso veterinario

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Tejidos diana
Difloxacina	Difloxacina	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves	300 100 800 600	Músculo (1) Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos (5)	400 100 1400 800	Músculo Grasa Hígado Riñón
		Porcinos	400 100 800 800	Músculo Piel y grasa (2) Hígado Riñón
		Aves (4)	300 400 1900 600	Músculo Piel y grasa (3) Hígado Riñón
Sarafloxacina	Sarafloxacina	Pollo	10 100	Grasa (3) Hígado
		Salmónidos	10	Músculo (1)

(1) Para peces este LMR se refiere a "músculo y piel en proporciones naturales".
(2) Para porcino este LMR se refiere a "piel y grasa en proporciones naturales".
(3) Para aves este LMR se refiere a "piel y grasa en proporciones naturales".
(4) No debe utilizarse en aves que producen huevos para consumo humano.
(5) No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano.

Tabla 2.5 Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por la Directiva Europea para Fluoroquinolonas de uso veterinario

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Tejidos diana
Enrofloxacina	Enrofloxacina + Ciprofloxacina	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, conejos y aves	100 100 200 200	Músculo (1) Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos	100 100 300 200 100	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Porcinos y conejos	100 100 200 300	Músculo Grasa (2) Hígado Riñón
		Aves (4)	100 100 200 300	Músculo Piel y grasa (3) Hígado Riñón
Marbofloxacina	Marbofloxacina	Bovinos (5)	150 50 150 150 75	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Porcinos	150 50 150 150	Músculo Grasa (2) Hígado Riñón

(1) Para peces este LMR se refiere a "músculo y piel en proporciones naturales";
(2) Para porcino este LMR se refiere a "piel y grasa en proporciones naturales";
(3) Para aves este LMR se refiere a "piel y grasa en proporciones naturales";
(4) No debe utilizarse en aves que producen huevos para consumo humano;
(5) No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano.

Tabla 2.5 Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por la Directiva Europea para Fluoroquinolonas de uso veterinario

Fluoroqui-nolona	Residuo marcador	Especie animal	LMR ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Tejidos diana
Flumequina	Flumequina	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves y peces	200 250 500 1000	Músculo Grasa Hígado Riñón
		Bovinos, porcinos, ovinos, caprinos	200 300 500 1500 50	Músculo Grasa (2) Hígado Riñón Leche
		Aves (4)	400 250 800 1000	Músculo Piel y grasa (3) Hígado Riñón
		Pescado	600	Músculo y piel (1)
Danofloxacina	Danofloxacina	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto bovinos, ovinos, caprinos y aves.	100 50 200 200	Músculo (1) Grasa (2) Hígado Riñón
		Bovinos, ovinos, caprinos	200 100 400 400 30	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche
		Aves (4)	200 100 400 400	Músculo Piel y grasa (3) Hígado Riñón

(1) Para peces este LMR se refiere a “músculo y piel en proporciones naturales”.
(2) Para porcino este LMR se refiere a “piel y grasa en proporciones naturales”.
(3) Para aves este LMR se refiere a “piel y grasa en proporciones naturales”.
(4) No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.

2.5.1. Componente experimental

2.5.1.1. Reactivos y materiales

- Metanosulfonato de danofloxacina (DANO, 75.1%), (Pfizer S.A.).
- Hidrocloruro de ciprofloxacina (CIPRO, 99.8%), (Bayer AG).
- Enrofloxacina (ENRO, 99.7%), (Bayer AG).
- Hidrocloruro de sarafloxacina (SARA, 90%), (Fort Dodge Veterinaria S.A.).
- Hidrocloruro de lomefloxacina (LOME), (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de amonio p.a., (Merck).
- Hidróxido sódico (99%), (Merck).
- Metanol y acetonitrilo (HPLC), (SDS).
- Ácido ortofosfórico (HPLC, 85-90%), (Fluka).
- Ácido tricloroacético (TCA, 98%), (Riedel de Haën).
- Agua Milli-Q (Millipore).
- Filtros de nylon 0.45 µm, 47 mm (Phenomenex).
- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE): Strata Screen A (C8/intercambio aniónico, 200 mg, 3 mL) y Strata X (estireno-divinilbenceno, 200 mg, 6 mL), (Phenomenex).

2.5.1.2. Instrumentación

- Cromatógrafo HPLC 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado con bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector automático y detector de fluorescencia (FLD).
- Columna AQUATM C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex).
- Precolumna C18 (4.0 x 3.0 mm, 5 µm) (Phenomenex).
- Columna Synergi MAX–RP (Phenomenex).
- Mezclador de laboratorio (capacidad 2 L), (Filtra Vibración).
- Ultracentrífuga con sistema de enfriamiento (Eppendorf–5804R).
- pHmetro GLP 22 (Crison).
- Sistema de extracción SPE para 20 cartuchos (Varian).
- Vortex IKA®-MS2 Minishaker (IKA, Labortechnik).

2.5.1.3. Retos de la optimización de las condiciones cromatográficas

Las FQs son compuestos que pueden estar presentes en disolución acuosa en forma catiónica, aniónica o zwitteriónica, debido a la presencia del grupo carboxilo y del grupo amino presente en el anillo piperazina de dichas estructuras (Figura 2.5).

El valor del pK_{a1} (para el grupo carboxilo) se encuentra en el intervalo comprendido entre 5.5 - 6.0, mientras el pK_{a2} (para el grupo amino de las FQs estudiadas) se ubica entre 7.5 – 8.5. Por ello, resulta fundamental ajustar el pH de la fase móvil para llevar a cabo la separación cromatográfica de estos compuestos, en la que se emplean habitualmente, columnas de fase inversa de tipo C8 o C18 y, en algunos casos, fenol o amida.

La presencia de grupos silanoles residuales e impurezas metálicas en los materiales que constituyen las fases estacionarias de estas columnas, origina la aparición de colas, con el consiguiente ensanchamiento de los picos cromatográficos, perdiéndose resolución y comprometiendo la separación de estas sustancias. Por ello, los métodos más recientes proponen el empleo de columnas encapadas o columnas de sílice de elevada pureza, libres de trazas metálicas responsables de incrementar las características ácidas de los grupos silanoles.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y nuestra experiencia en la separación de FQs, se decidió utilizar una columna de fase inversa C_{18} modificada con grupos funcionales hidrofílicos (AQUA™ C_{18}), que permite emplear fases móviles con elevada proporción de disolvente acuoso, para la separación de ciprofloxacina, lomefloxacina, danofloxacina, enrofloxacina y sarafloxacina en extractos de muestras de leche de fórmula infantil en polvo. El bajo grado de acidez de los grupos residuales del sorbente empleado como fase estacionaria en esta columna disminuye las interacciones con las FQs, reduciéndose la asimetría de

los picos cromatográficos y mejorando la eficiencia de la columna en el proceso de separación.

Se han evaluado varios factores para optimizar la separación de las FQs en la columna AQUA™ C_{18}: naturaleza de la disolución reguladora, efecto de modificadores orgánicos, composición del gradiente y caudal. Basándonos en el comportamiento de las FQs en medio acuoso, se evaluaron dos tipos de disoluciones reguladoras: a) ácido fórmico/formiato amónico 0.1%, pH 3.0 y, b) dihidrógeno fosfato/monohidrógeno fosfato 25 mM, pH 3.0.

El empleo de estas disoluciones como fase móvil, tiene por objeto protonar el grupo amino de la FQ y reducir así su interacción con los grupos silanoles residuales del sorbente. En cada caso se incluyeron modificadores orgánicos para ajustar el poder de elución y obtener la máxima resolución en un tiempo cromatográfico razonable.

Los resultados obtenidos al emplear mezclas de distintas proporciones de tampón formiato 0.1%, pH 3.0/acetonitrilo (**86:14**; **84:16** y **82:18** *%v/v*;.) en régimen isocrático revelaron la imposibilidad de resolver adecuadamente los analitos de interés de una interferencia de la matriz.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 2.8 (a), ni siquiera el empleo de una fase móvil con bajo poder de elución permitió resolver la interferencia de una de las FQs de mayor interés regulatorio como CIPRO. Adicionalmente, tampoco se consiguió la elución de sarafloxacina en un tiempo de análisis inferior a 25 min.

Por otra parte, al aumentar el poder de elución de la fase móvil, mediante el incremento en el porcentaje del modificador orgánico, disminuye el factor de retención para todos los analitos y, por tanto, el tiempo de cromatografía. No obstante, el sistema cromatográfico pierde selectividad para alcanzar resolución entre el pico cromatográfico correspondiente a danofloxacina y la interferencia, como se puede observar en la Figura 2.8 (b).

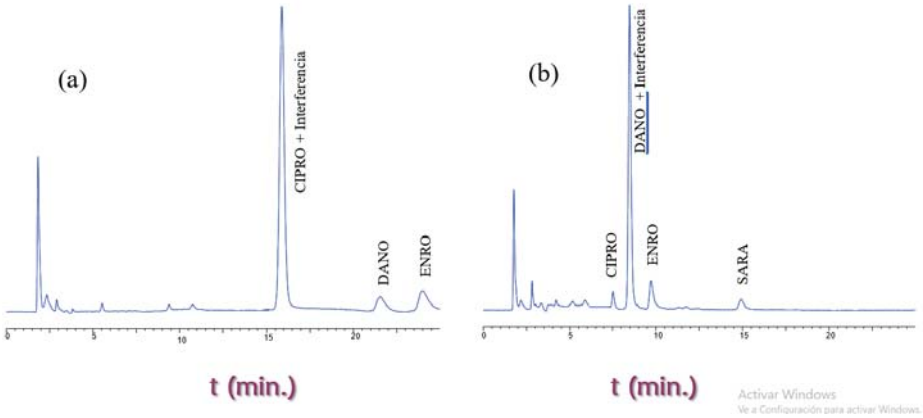


Figura 2.8 Efecto de la variación del modificador orgánico en la fase móvil. Condiciones cromatográficas: columna AQUATM, caudal 1 mL/min, λexc/em 280/450 nm. Fase móvil: (a) tampón formiato 0.1%, pH 3.0/ACN (86:14 v/v); (b) tampón formiato 0.1%, pH 3.0/ACN (82:18, v/v).

Basándonos en los resultados obtenidos anteriormente, y con objeto de resolver la interferencia de los analitos de interés, se decidió ensayar una nueva fase móvil constituida por una disolución amortiguadora de tampón fosfato 25 mM, pH 3.0 y diferentes proporciones de acetonitrilo y metanol hasta llegar a la composición óptima de gradiente que se muestra en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6 Gradiente de elución empleado para la separación de las fluoroquinolonas utilizando una columna AQUATM, λexc/em 280/450 nm.

Tiempo (min.)	%A	%B	%C	Caudal (mL/min.)
8	83	17	0	1
20	19	66	15	2
23	15	66	19	2

(A) tampón fosfato 25 mM, pH 3.0; (B) acetonitrilo; (C) metanol

El empleo de tampón fosfato modificó el comportamiento cromatográfico de la interferencia, disminuyendo su retención sobre la fase estacionaria y eluyendo, por tanto, a un tiempo menor que las FQs. Como se muestra

en la Figura 2.9, estas condiciones de elución permitieron alcanzar una óptima resolución entre la interferencia y el analito adyacente: CIPRO, al tiempo que se obtienen picos cromatográficos sin cola, indicativo de una óptima distribución de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil, dando lugar a una separación con la máxima eficiencia.

Estos aspectos, asociados al bajo tiempo de cromatografía empleado para la separación de las FQs. (<15 min.), nos permitieron establecer esta composición como la ideal para llevar a cabo la separación cromatográfica de las FQs presentes en la matriz de leche de FIP.

El valor de pH ácido seleccionado para la fase móvil (3.0), permite aumentar la sensibilidad en la detección fluorescente de las FQs, ya que las correspondientes formas aniónicas de estos compuestos generalmente no muestran fluorescencia nativa, mientras las especies catiónicas, que prevalecen en el medio ácido, son altamente fluorescentes.

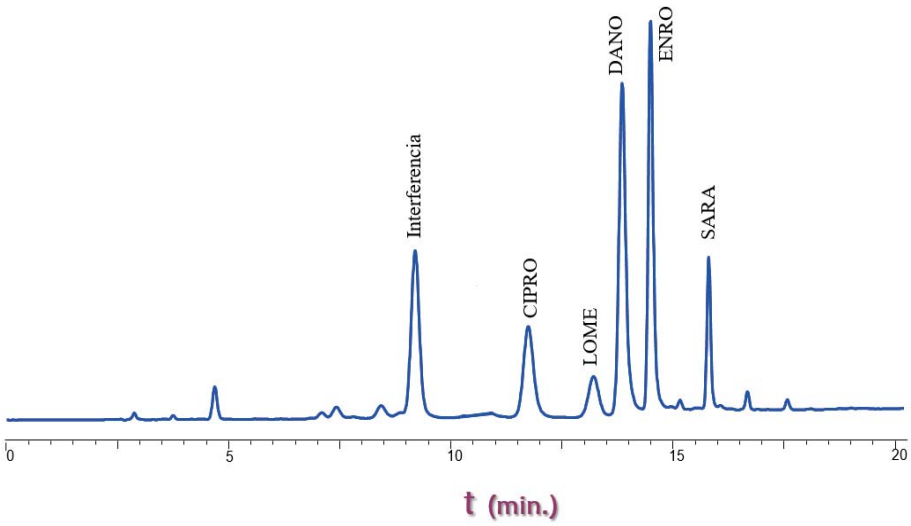


Figura 2.9 Cromatograma obtenido al emplear como fase móvil (**A**) tampón fosfato 25 mM, pH 3.0 / (**B**) MeCN / (**C**) MeOH con elución en gradiente: 17% B, 0%C (8 min, 1 mL/min), 17-66% B, 0-15% C (12 min, 2 mL/min), 66% B, 15-19% C (4 min, 2 mL/min). Columna AQUA™, $\lambda_{exc/em}$ 280/450 nm.

Los tiempos de retención y la resolución obtenidos para cada una de las FQs, al emplear estas condiciones de fase móvil, se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Tiempos de retención y resoluciones cromatográficas obtenidos para las FQs en estudio, empleando como fase móvil disolución reguladora de fosfato 25 mM, pH 3.0, MeCN y MeOH con programa de elución en gradiente.

FQs	Tiempo de retención (min)	Resolución
CIPRO	11.2	7.86
DANO	13.4	3.68
ENRO	14.2	6.56
SARA	14.7	---

2.5.1.4. Optimización del procedimiento de preparación de muestra

De todas las etapas que comprenden un método analítico, se podría decir que la correspondiente al tratamiento de muestra es la más crítica. La eliminación de los interferentes facilita la determinación posterior de los analitos de interés, al mejorar la selectividad y sensibilidad del método.

En este sentido, podemos afirmar que el tratamiento de muestra de leches de FIP para la determinación de FQs se encuentra condicionado principalmente por la alta complejidad de la matriz, constituida por un elevado porcentaje de grasas y proteínas, así como oligoelementos, vitaminas y minerales que se adicionan como complemento nutritivo a dichas fórmulas.

Eliminación de interferentes: grasas y proteínas.
Los métodos que se han descrito para la extracción de FQs, incluyen desde su extracción directa con disolventes orgánicos, hasta aquellos que involucran etapas previas a dicha extracción. No obstante, se ha podido establecer que la extracción directa de analitos como enrofloxacina y ciprofloxacina a partir de muestras de leche no es posible, debido a la seria interferencia que genera la presencia de la grasa.

Dado que la mayoría de las muestras de leche de FIP comercialmente disponibles poseen elevados contenidos de grasa (20-30%) y proteína (10-15%), las etapas de desengrasado y desproteinización son críticas para la extracción efectiva de las FQs.

Con el fin de obtener muestras libres de grasa, se investigó la capacidad desengrasante de distintos disolventes como éter de petróleo, pentano y la mezcla éter etílico/éter de petróleo (50:50, %v/v), encontrándose los mejores resultados al emplear 20 mL de este último, lo cual se puso de manifiesto en la alta reproducibilidad obtenida en los tiempos de retención cromatográficos de los analitos de interés (RSD: 0.007 – 0.614%).

Sin embargo, la inclusión de esta etapa previo al proceso de desproteinización y a la extracción en fase sólida incrementaba de forma considerable el tiempo invertido en la preparación de muestra, así como el volumen de residuos orgánicos generados. Por ello, se decidió eliminarla y ensayar un procedimiento alternativo empleando un agente emulsificante como el NaOH (0.1 M, 6 mL) durante la etapa de lavado de los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) utilizados en la preconcentración y limpieza de la muestra (Strata X), como se muestra en la Figura 2.10.

Figura 2.10 Esquematización del abordaje analítico del pretratamiento de muestras de leche, enfocado en la eliminación de los componentes endógenos mayoritarios de la matriz: grasas y proteínas.

Con respecto al proceso de desproteinización (Figura 2.10), la mayoría de los métodos descritos para determinación de FQs en muestras de leche entera bovina, plasma y tejidos, proponen la precipitación de proteínas con disolventes orgánicos como acetonitrilo, etanol, metanol o acetona. Con el fin de incrementar su capacidad desproteinizante, suelen combinarse con ácidos (ácido fosfórico) o bases (hidróxido de sodio, hidróxido de amonio); sin embargo, esta última combinación ha demostrado ser poco eficaz en este tipo de muestras, efecto que fue confirmado en el presente estudio.

De acuerdo con la experiencia acumulada del grupo de trabajo, se decidió evaluar mezclas de metanol o acetonitrilo con TCA, encontrándose que el empleo de una disolución de TCA al 10% w/v en metanol era altamente efectiva en la precipitación de proteínas presentes en muestras de FIP, ya que se produce la formación de un precipitado que se puede separar con facilidad del sobrenadante, mediante centrifugación.

El volumen empleado de esta disolución (1 mL), se optimizó para alcanzar un valor de pH final en la muestra menor que 2.0 y, de esta forma, minimizar las interacciones de las FQs con las proteínas, favorecer la solubilización completa de los analitos y disminuir los riesgos de pérdida de las FQs durante esta etapa.

Por otra parte, el empleo de mezclas MeCN–TCA dió lugar a la obtención de sobrenadantes muy turbios, por lo que se desestimó su empleo.

Preconcentración y limpieza de los extractos mediante extracción en fase sólida (SPE)

Las concentraciones de las FQs que suelen estar presentes como residuos en muestras de alimentos o medioambientales, generalmente son bajas, de modo que preconcentrar el analito de interés previo a su análisis cromatográfico, cobra gran importancia para no incurrir en falsos negativos.

Basándonos en lo expuesto anteriormente, y considerando la complejidad de las muestras de leche de FIP, se hizo necesaria una etapa de

limpieza de los extractos obtenidos tras su desproteinización y previo al análisis cromatográfico, con el fin de eliminar componentes endógenos que puedan interferir en el análisis de las FQs, al tiempo que se requiere la preconcentración de los analitos con el fin de conseguir límites de detección bajos. Por ello, se hizo necesario poner a punto un método de preparación de muestra basado en SPE.

Con este fin, se evaluaron dos tipos de cartuchos de SPE: Strata Screen A y Strata X. Los primeros están constituidos por una fase estacionaria mixta C8/intercambio aniónico, y cuentan con una capacidad intercambiadora de 0.25 meq g^{-1}; mientras que los segundos, emplean un polímero de estireno-divinilbenceno. Los factores evaluados para establecer las condiciones óptimas en el procedimiento de SPE, incluyeron el estudio del pH de carga y las condiciones de lavado y elución. Para ello, se emplearon muestras blanco de FIP enriquecidas con los analitos de interés: Cipro, Lome, Dano, Enro y Sara a una concentración de 100 µg Kg^{-1}. Las recuperaciones se calcularon empleando como referencia extractos de la matriz enriquecidos con la misma cantidad de las FQs de interés.

a) Evaluación del pH de carga.

Como se ha mencionado antes, las FQs son compuestos que presentan equilibrio protolítico (pK_{a1} 5.5-6.0; pK_{a2} 7.5-8.5) por tanto, el pH del extracto de la muestra puede afectar las recuperaciones de las FQs, principalmente en los cartuchos Strata Screen A. Para ello, se analizaron por triplicado muestras blanco FIP enriquecidas con las FQs a un nivel de concentración de 100 µg·Kg^{-1}. Se sometieron a desproteinización y se ajustó el pH de los extractos obtenidos a distintos valores antes de su carga en el cartucho. Se estudiaron valores de pH de 5.5, 6.5 y 7.5 para los cartuchos Strata X y de 9.0 para los Strata Screen A, con el fin de favorecer el mecanismo de intercambio aniónico en estos últimos.

Los cartuchos Strata Screen A proporcionaron recuperaciones bajas y una elevada irreproducibilidad hecho que puede atribuirse a la baja capacidad intercambiadora del sorbente (0.25 meq·g^{-1}).

Por el contrario, los cartuchos Strata X proporcionaron las mejores recuperaciones con alta reproducibilidad, especialmente a pH 6.5, mostrando una baja influencia del pH de carga de muestra sobre las recuperaciones de los analitos. En este intervalo de pH (5.5-7.5), las FQs se encuentran en forma zwiteriónica, lo cual sugiere que las interacciones hidrofóbicas entre los analitos de interés y el sorbente polimérico de estos cartuchos, constituyen los principales mecanismos de retención que tienen lugar en este caso.

Basándonos en estos resultados, se escogieron los cartuchos Strata X para realizar la limpieza y preconcentración de los extractos obtenidos tras la desproteinización, ajustando el pH de carga a 6.5.

b) Condiciones de lavado.

Con el fin de eliminar los interferentes de la matriz, representados en su mayor parte por las grasas, sin comprometer la retención selectiva de las FQs sobre el sorbente polimérico de los cartuchos Strata X, se evaluó el volumen y la composición de distintas soluciones de lavado.

Debido al elevado contenido graso de las muestras, se ensayaron disolventes orgánicos como diclorometano y pentano; sin embargo, su empleo daba lugar a pérdidas de las FQs, con la consiguiente disminución de las recuperaciones obtenidas.

En consecuencia, se decidió evaluar un procedimiento alternativo de saponificación para la eliminación de las grasas, que consistió en un tratamiento alcalino con NaOH. De este modo, tras la desproteinización inicial de las muestras, se ajustó el pH de los extractos a pH 6.5, y a continuación se cargaron en los cartuchos Strata X, tras lo cual se lavaron con 6 mL de una disolución de NaOH 0.1 M.

El volumen empleado fue previamente optimizado hasta lograr la eliminación completa de los lípidos coextraídos sin comprometer la retención de las FQs. De esta forma, la inclusión del agente emulsificante

en esta etapa, redujo considerablemente el volumen de residuos orgánicos generados durante la preparación de muestra, así como el tiempo requerido para ello. El lavado de los cartuchos se completó empleando 2 mL de una disolución acuosa de metanol al 5% v/v, que permitió eliminar interferentes de naturaleza polar.

c) Condiciones de elución.

La característica más importante del disolvente empleado para tal fin, es su fuerza de elución. Una fuerza de elución elevada requiere el empleo de bajos volúmenes de disolvente para eluir completamente las FQs, permitiendo que el factor de dilución en esta etapa sea bajo.

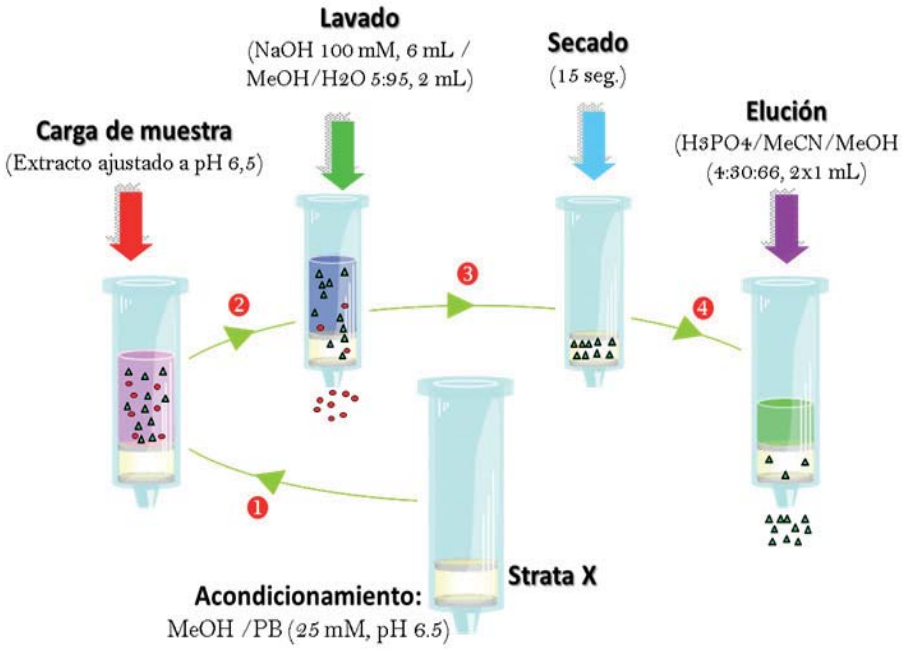


Figura 2.11 Procedimiento de extracción en fase sólida optimizado. Se representan las condiciones optimizadas en cada etapa de este proceso.

Basándonos en la experiencia previa del grupo de investigación, se ensayaron distintas mezclas de disolventes orgánicos en medio ácido, debido a que las FQs presentan alta solubilidad en dichas condiciones. De este

modo, se estudiaron distintas combinaciones de ácido orto-fosfórico (1–4%) en metanol o en mezclas metanol/acetonitrilo, ensayando distintos volúmenes de elución (entre 1 y 5 mL)) (Figura 2.11). Las mejores recuperaciones se obtuvieron utilizando 2 mL de una mezcla H_3PO_4/acetonitrilo/metanol, 4:30:66 (v/v/v) (Figura 2.12).

2.5.1.5. Validación del método de acuerdo con la Directiva Europea 2002/657/EC

En la Unión Europea, la validación de los métodos analíticos para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, debe realizarse de acuerdo con los criterios especificados en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC.

La validación del método incluye los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio y la sensibilidad del método con base en el cálculo del límite de decisión (CCα) y capacidad de detección (CCβ).

En la Decisión mencionada, la cual es la normativa internacional de referencia en nuestras investigaciones, se establecen los criterios estipulados para validar los métodos destinados al análisis de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, a fin de garantizar, con evidencia documentada que estos métodos cumplen con el objetivo para el que han sido diseñados. Usualmente estas metodologías analíticas contemplan la utilización de estándar interno (EI) como método de cuantificación, en el cual se añade una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar antes de realizar con ella cualquier manipulación.

Bajo este precepto, estos métodos pueden ser incluidos en cualquier programa de vigilancia y control alimentario. Los parámetros contemplados en la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea y que son objeto de evaluación son:

Etapa	Strata X	Strata Screen A
Acondicionam.	MeOH (2 x 3 mL)	MeOH (2 x 3 mL)
	PB (25 mM, pH 6.5, pH 7.5	NH_4Cl (25 mM, pH 9.0) (2 x 3 mL)
pH carga	5.5, 6.5, 7.5	pH 9.0
Lavado	NaOH (100 mM, 6 mL) $MeOH/H_2O$ (5:95, v/v, 2 mL)	NH_4Cl (25 mM, pH 9.0) (1 x 2 mL)
Elución	H_3PO_4/ACN/MeOH (4:30:66, v/v, 2x 1 mL)	H_3PO_4/MeOH (4:96, % v/v, 2 x 1 mL)

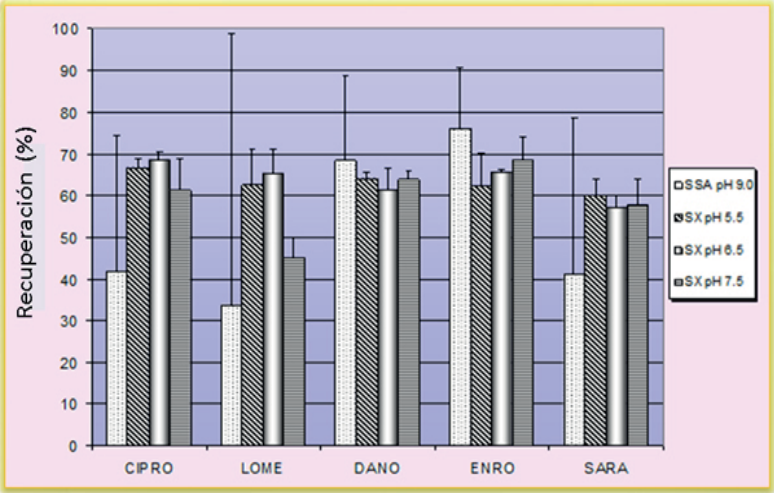


Figura 2.12 Proceso de optimización de las condiciones de limpieza y preconcentración. Dos cartuchos de SPE comerciales se evaluaron en esta etapa el método analítico: Strata screen A y Strata X. Se muestran las condiciones de optimización obtenidas para cada cartucho (arriba) y el análisis comparativo de las recuperaciones obtenidas (%) en función del tipo de FQ, Cartucho y pH de carga de muestra.

- **Especificidad:** capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias.
- **Linealidad:** capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.
- **Precisión:** grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas.
- **Exactitud:** grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado.
- **Límite de detección (LOD):** número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico.
- **Límite de cuantificación (LOQ):** la cantidad más pequeña de un analito que se pueda cuantificar confiablemente por el instrumento.
- **Repetibilidad:** precisión de los resultados obtenidos de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.
- **Reproducibilidad:** precisión de los resultados obtenidos por operadores diferentes de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de ensayo, en laboratorios diferentes y con equipos diferentes.

A este respecto, al no disponer de un material de referencia certificado para FQs en leche de fórmula infantil en polvo, los estudios de exactitud y precisión del método, según la normativa, se realizaron empleando muestras enriquecidas. El enriquecimiento de las muestras de leche de fórmula infantil se realizó empleando dos procedimientos diferentes: a) mediante mezcla directa de la muestra con los patrones de FQs, ambos en estado sólido; y b) mediante la adición de una disolución patrón de FQs sobre una porción de la muestra previamente disuelta en agua.

Un análisis de la bibliografía, relativa a la preparación de muestras sólidas enriquecidas permite concluir que no existe consenso sobre la forma más apropiada para la preparación de estos patrones. Los resultados obtenidos mostraron que las recuperaciones obtenidas al enriquecer las muestras mediante mezcla directa con los patrones, fueron muy poco reproducibles, lo que puede atribuirse a la escasa homogeneidad de las mismas y a la elevada manipulación de muestra asociada a este procedimiento. Sin embargo, la adición de una disolución patrón proporcionó buenos datos de exactitud y precisión a los distintos niveles de enriquecimiento ensayados, seleccionándose esta opción para estudios posteriores.

Al no disponer de una legislación referente a la presencia de residuos de FQs en muestras de leche en polvo o fórmula infantil, se adoptaron los LMRs establecidos por la Comisión para leche bovina (30 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ para Dano y 100 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ para la suma de Enro y Cipro), y en el caso de SARA, que no se encuentra legislada en esta matriz, se empleó como valor de referencia su límite de cuantificación (80 $\mu g \cdot Kg^{-1}$), de acuerdo a lo establecido por la Decisión 2002/657/CE.

Finalmente, el método desarrollado y validado se aplicó al análisis de 100 muestras de LFI, tanto de inicio como de continuación, del mercado latinoamericano y español. Solo dos muestras de leche, procedentes del mercado latinoamericano, mostraron un pico que coincidía con el tiempo de retención de Sara. A pesar de que los espectros de absorción y emisión de dicho pico no coincidían con los del antimicrobiano, se realizó un análisis confirmatorio empleando LC-MS/MS, tal como señala la Decisión 2002/657/CE. Los resultados confirmaron la ausencia de SARA en las dos muestras.

Esta investigación dio paso a la publicación de artículos en el área (8), en los cuales se detallan los resultados específicamente obtenidos para la validación del método dirigido a la determinación de residuos de fluoroquinolonas en muestras de leche de fórmula infantil.

La experiencia adquirida ha permitido el desarrollo de nuevos métodos analíticos dirigidos a la evaluación de residuos de estas sustancias en muestras de carne bovina y pollo. Estos resultados se encuentran en preparación para publicación en revistas especializadas del área.

2.6 Referencias

1. Drlica, K. and X. Zhao, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. 61(3): p. 377-92.
2. Kampranis, S.C. and A. Maxwell, The DNA gyrase-quinolone complex. ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. J Biol Chem, 1998. 273(35): p. 22615-26.
3. Calvo, J. and L. Martínez-Martínez, Antimicrobial mechanisms of action. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009. 27(1): p. 44-52.
4. Andreu, V., C. Blasco, and Y. Picó, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. 26(6): p. 534-556.
5. Fábrega, A., et al., Quinolone resistance in the food chain. Int J Antimicrob Agents, 2008. 31(4): p. 307-15.
6. Rotimi, V.O., et al., Emergence of multidrug-resistant Salmonella spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. 60(1): p. 71-7.
7. European Centre for Disease, P., et al., ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. EFSA J, 2017. 15(7): p. e04872.
8. Rodríguez-Cavallo, E., Nuevas metodologías analíticas basadas en cromatografía líquida para la determinación de residuos antimicrobianos tipo fluoroquinolonas en alimentos infantiles y

aguas, in Química Analítica. 2010, Universidad Complutense de Madrid: Madrid.

9. Marazuela, M.D. and S. Bogialli, A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. Anal Chim Acta, 2009. 645(1-2): p. 5-17.
10. Li, J., et al., Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 2018. 257: p. 259-264.
11. Zhu, W.-x., et al., Rapid determination of 88 veterinary drug residues in milk using automated TurborFlow online clean-up mode coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Talanta, 2016. 148: p. 401-411.
12. Du, B., et al., Presence of tetracyclines, quinolones, lincomycin and streptomycin in milk. Food Control, 2019. 100: p. 171-175.
13. Gaudin, V., et al., Strategies for the screening of antibiotic residues in eggs: comparison of the validation of the classical microbiological method with an immunobiosensor method. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2017. 34(9): p. 1510-1527.
14. Fang, C., et al., Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Se Pu, 2018. 36(11): p. 1119-1131.
15. Lu, Z., et al., A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Microchemical Journal, 2019. 151: p. 104213.
16. Yang, M., et al., Development of a whole liquid egg certified reference material for accurate measurement of enrofloxacin residue. Food Chem, 2020. 309: p. 125253.
17. Pagani, A.P. and G.A. Ibánez, Analytical approach for the simultaneous determination of quinolones in edible animal products. Modeling pH-modulated fluorescence excitation-emission matrices four-way arrays. Talanta, 2019. 192: p. 52-60.

18. Acaroz, U., et al., Development of a Generic Enzyme-Immunoassay for the Detection of Fluoro(quinolone)-Residues in Foodstuffs Based on a Highly Sensitive Monoclonal Antibody. Food Analytical Methods, 2020. 13(3): p. 780-792.
19. Yang, Y., et al., Antibiotic residues in poultry food in Fujian Province of China. Food Additives & Contaminants: Part B, 2020: p. 1-8.
20. Mashak, Z., et al., Detection of quinolones residues in beef and chicken meat in hypermarkets of Urmia, Iran using ELISA. Iran Agricultural Research, 2022. 36(1): p. 73-77.
21. Daeseleire, E., et al., Chapter 6 - Veterinary Drug Residues in Foods, in Chemical Contaminants and Residues in Food (Second Edition), D. Schrenk and A. Cartus, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 117-153.
22. Guidi, L.R., et al., Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. Food Chemistry, 2018. 245: p. 1232-1238.
23. Tajabadi, F., et al., Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin. Talanta, 2016. 160: p. 400-409.
24. Zhang, Z. and H. Cheng, Recent Development in Sample Preparation and Analytical Techniques for Determination of Quinolone Residues in Food Products. Crit Rev Anal Chem, 2017. 47(3): p. 223-250.
25. Braga, P.A.C., M.N. Eberlin, and F.G.R. Reyes, Applicability of MALDI-TOF MS for determination of quinolone residues in fish. J Mass Spectrom, 2019. 54(12): p. 1008-1012.
26. Anzardi, M.B. and J.A. Arancibia, Chemometrics-assisted liquid chromatographic determination of quinolones in edible animal tissues. Microchemical Journal, 2020. 158: p. 105138.
27. Díaz-Álvarez, M., E. Turiel, and A. Martín-Esteban, Selective sample preparation for the analysis of (fluoro)quinolones in baby food: molecularly imprinted polymers versus anion-exchange resins. Anal Bioanal Chem, 2009. 393(3): p. 899-905.

28. Carabías-Martínez, R., et al., Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. J Chromatogr A, 2005. 1089(1-2): p. 1-17.

29. Andreu, V. and Y. Picó, Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. 118: p. 709-721.

30. Khan, Z., et al., Analysis of pesticide residues in tuber crops using pressurised liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 2018. 241: p. 250-257.

31. Teo, C.C., et al., Pressurized hot water extraction (PHWE). Journal of Chromatography A, 2010. 1217(16): p. 2484-2494.

32. Herranz, S., M.C. Moreno-Bondi, and M.D. Marazuela, Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. J Chromatogr A, 2007. 1140(1-2): p. 63-70.

33. Chen, L., et al., Application of on-line microwave sample-preparation techniques. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. 27(2): p. 151-159.

34. Xia, L., et al., Recent Progress in Fast Sample Preparation Techniques. Anal Chem, 2020. 92(1): p. 34-48.

35. Hermo, M.P., D. Barrón, and J. Barbosa, Determination of residues of quinolones in pig muscle: Comparative study of classical and microwave extraction techniques. Analytica Chimica Acta, 2005. 539(1): p. 77-82.

36. Tang, Q., et al., Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem, 2009. 57(11): p. 4535-9.

37. Sun, H.W., et al., Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 852(1-2): p. 145-51.

38. Sun, H., W. Zhao, and P. He, Effective Separation and Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by CE with SPE. Chromatographia, 2008. 68(5): p. 425-429.

39. Galarini, R., et al., Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. Journal of chromatography. A, 2009. 1216(46): p. 8158-8164.

40. Lara, F.J., et al., In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction. Electrophoresis, 2008. 29(10): p. 2117-2125.

41. Christodoulou, E.A., V.F. Samanidou, and I.N. Papadoyannis, Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. Journal of Chromatography B, 2007. 859(2): p. 246-255.

42. Hoof, N.V., et al., Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. Analytica Chimica Acta, 2005. 529(1): p. 265-272.

43. Liang, H., M.B. Kays, and K.M. Sowinski, Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. 772(1): p. 53-63.

44. Clemente, M., et al., Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography-UV, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. J Chromatogr A, 2006. 1135(2): p. 170-8.

45. Rubies, A., et al., Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography

with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection. Talanta, 2007. 72(1): p. 269-276.

46. Anastassiades, M., et al., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int, 2003. 86(2): p. 412-31.
47. Islas, G., et al., Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. International Journal of Analytical Chemistry, 2017. 2017: p. 8215271.
48. He, X., et al., Magnetic graphene dispersive solid phase extraction combining high performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones in foods. Food Chemistry, 2017. 221: p. 1226-1231.
49. Bogialli, S. and A. Di Corcia, Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. J Biochem Biophys Methods, 2007. 70(2): p. 163-79.
50. Wang, G.N., et al., Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat. Journal of Chromatography B, 2017. 1065-1066: p. 104-111.
51. Yu, H., et al., Water-dispersible pH/thermo dual-responsive microporous polymeric microspheres as adsorbent for dispersive solid-phase extraction of fluoroquinolones from environmental water samples and food samples. Journal of Chromatography A, 2019. 1601: p. 27-34.
52. Wang, S., et al., Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD. Journal of Chromatography B, 2009. 877(27): p. 2961-2966.
53. Bogialli, S. and A. Di Corcia, Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. 395(4): p. 947-966.

54. Bogialli, S., et al., A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. 21(2): p. 237-246.

55. Bogialli, S., et al., A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. Food Chemistry, 2008. 108(1): p. 354-360.

56. Bogialli, S., et al., Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC. J Chromatogr A, 2009. 1216(5): p. 794-800.

57. Yan, H., F. Qiao, and K.H. Row, Molecularly Imprinted-Matrix Solid-Phase Dispersion for Selective Extraction of Five Fluoroquinolones in Eggs and Tissue. Analytical Chemistry, 2007. 79(21): p. 8242-8248.

58. Mottier, P., et al., Quantitative High-Throughput Analysis of 16 (Fluoro) quinolones in Honey Using Automated Extraction by Turbulent Flow Chromatography Coupled to Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. 56(1): p. 35-43.

59. Krebber, R., F.J. Hoffend, and F. Ruttmann, Simple and rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in edible tissues by turbulent flow chromatography/tandem mass spectrometry (TFC-MS/MS). Anal Chim Acta, 2009. 637(1-2): p. 208-13.

60. Anna-Karin Wihlborg, O.S., and An Trinh, The Selective Extraction of Fluoroquinolones in Veterinary Samples using Molecularly Imprinted Polymer SPE, in Technical Report, S. Aldrich, Editor. 2009, Sigma-Aldrich Co: Bellefonte.

61. Lombardo-Agüí, M., et al., Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced

fluorescence detection. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. 396(4): p. 1551-1557.

62. Martins, M.T., et al., A simple, fast and cheap non-SPE screening method for antibacterial residue analysis in milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Talanta, 2014. 129: p. 374-383.
63. Moudgil, P., et al., Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. Food Analytical Methods, 2019. 12(2): p. 338-346.
64. Chen, J., G.-G. Ying, and W.-J. Deng, Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. 67(27): p. 7569-7586.
65. Sachi, S., et al., Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. Journal of advanced veterinary and animal research, 2019. 6(3): p. 315-332.
66. Chiavelli, L.U.R., et al., Optimization of Milk Sample Cleanup Using Response Surface Methodology. Food Analytical Methods, 2020. 13(1): p. 166-175.
67. Bagheri, A.R. and M. Ghaedi, Magnetic metal organic framework for pre-concentration of ampicillin from cow milk samples. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020.
68. Meng, Z., et al., Residues investigation of fluoroquinolones and sulphonamides and their metabolites in bovine milk by quantification and confirmation using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 2015. 174: p. 597-605.
69. Cepurnieks, G., et al., The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole – Orbitrap mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. 102: p. 184-192.

70. Ruiz-Viceo, J.A., et al., Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine milk using capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. Journal of Food Composition and Analysis, 2012. 28(2): p. 99-106.

71. Dasenaki, M.E. and N.S. Thomaidis, Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 2015. 880: p. 103-121.

72. Rodriguez, E., M.C. Moreno-Bondi, and M.D. Marazuela, Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. Food Chem, 2011. 127(3): p. 1354-60.

73. Rodriguez, E., et al., Multiresidue determination of ultratrace levels of fluoroquinolone antimicrobials in drinking and aquaculture water samples by automated online molecularly imprinted solid phase extraction and liquid chromatography. Anal Chem, 2011. 83(6): p. 2046-55.

74. Díaz-Cruz, M.S. and D. Barceló, LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. 24(7): p. 645-657.

75. Verdon, E., Antibiotic Residues in Muscle Tissues of Edible Animal Products, in Safety Analysis of Foods of Animal Origin, L.M.L.N.a.F. Toldrá, Editor. 2011, CRC Press. Taylor & Francis Group: Boca Raton. p. 249 -349.

76. García, I., et al., Usefulness of D-optimal designs and multicriteria optimization in laborious analytical procedures: Application to the extraction of quinolones from eggs. Journal of Chromatography A, 2005. 1085(2): p. 190-198.

77. Moreno-Bondi, M.C., et al., An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. Anal Bioanal Chem, 2009. 395(4): p. 921-46.

78. Yamada, R., et al., Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. 70(1): p. 54-65.

79. Aguilera-Luiz, M.M., et al., Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, 2008. 1205(1-2): p. 10-6.

80. Stubbings, G. and T. Bigwood, The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHeap, Effective, Rugged and Safe) approach. Anal Chim Acta, 2009. 637(1-2): p. 68-78.

81. Toldrá, F. and M. Reig, Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Trends in Food Science & Technology, 2006. 17(9): p. 482-489.

82. Jiang, W., et al., Simultaneous Determination of 13 Fluoroquinolone and 22 Sulfonamide Residues in Milk by a Dual-Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Analytical Chemistry, 2013. 85(4): p. 1995-1999.

83. Tumini, M., et al., Microbiological assay with Bacillus licheniformis for the easy detection of quinolones in milk. International Dairy Journal, 2017. 64: p. 9-13.

84. Savin, M., et al., Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. Science of The Total Environment, 2020. 727: p. 138788.

85. Kim, C., et al., A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. Journal of Environmental Management, 2018. 217: p. 629-645.

86. Okerman, L., et al., Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. Food Addit Contam, 2007. 24(3): p. 252-7.

87. Kalunke, R.M., et al., Detection of ciprofloxacin residues in cow milk: A novel and rapid optical β-galactosidase-based screening assay. Microchemical Journal, 2018. 136: p. 128-132.

88. Navratilova, P., J. Vyhnalkova, and L. Vorlova, Detection of Fluoroquinolone Residues in Milk using Yersinia Spp. Strains: Towards Better Sensitivity for Flumequine Determination. J Vet Res, 2017. 61(4): p. 467-472.

89. Colombo, R. and A. Papetti, Advances in the Analysis of Veterinary Drug Residues in Food Matrices by Capillary Electrophoresis Techniques. Molecules, 2019. 24(24).

90. Islas, G., et al., Solid-Phase Extraction and Large-Volume Sample Stacking-Capillary Electrophoresis for Determination of Tetracycline Residues in Milk. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2018. 2018: p. 5394527.

Capítulo 3
Plaguicidas y su reto analítico

Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

3.1. Generalidades

Los plaguicidas constituyen uno de los principales soportes utilizados para el mantenimiento del bienestar animal bajo los modelos actuales de cría intensiva de ganado. De acuerdo con organismos internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estos se definen como sustancias o mezclas de sustancias destinadas a [1]:

- Prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga, incluyendo insectos, roedores y malezas, identificados como nocivos para el cultivo y comercio de productos de origen vegetal o animal;
- Favorecer o regular la cadena de producción de alimentos de origen vegetal y animal, a fin de asegurar su calidad en el consumidor final, buscando, especialmente, proteger el producto contra el deterioro causado por almacenamiento y transporte;
- Facilitar el almacenamiento de grandes cantidades de productos de origen vegetal, destinados al consumo humano o a la explotación comercial, como el caso de la madera.

En cuanto a su clasificación, esta puede seguir diversos aspectos, como [2] pueden ser los relacionados con el destino de aplicación; organismo al que dirigen su acción; forma de presentación; grado de toxicidad; forma de acción; y naturaleza. La Tabla 3.1 muestra las categorías de cada una de estas clasificaciones.

En cuanto a la clasificación basada en la toxicidad, específicamente la toxicidad aguda se entiende como la capacidad del plaguicida para producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. Se mide a través de la dosis letal media (DL50) o de la concentración letal media (CL50). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. [3].

Respecto a su clasificación basada en la capacidad de estas sustancias para permanecer presentes en un sustrato del ambiente, en particular, aún después de transcurridos varios períodos desde su administración, estos se han categorizado en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Tabla 3.2). Esta categorización sigue como criterio fundamental para la clasificación, el tiempo de vida media de la molécula en el medio ambiente. Este periodo hace referencia a un lapso de tiempo que debe transcurrir para lograr la degradación de la mitad del compuesto o mezcla de compuestos aplicada.

Tabla 3.1. Clasificación de los plaguicidas en función de siete criterios principales.

Criterio de clasificación	Tipos
Destino de aplicación	Fitosanitarios
	Ganadería
	Industria alimentaria
	Ambiental
	Higiene personal
	Doméstico
Organismo al que dirigen su acción	Insecticidas
	Acaricidas
	Fungicidas
	Nematicidas
	Molusquicidas, rodenticidas y otros
	Nerbicidas
	Fitorreguladores y afines
	Postcosecha y simientes
	Producción moderna, fibras y relacionados
Según su presentación	Gases o gases licuados
	Fumigantes y aerosoles
	Polvos ultrafinos

	Sólidos
	Líquidos
	Cebos
Grado de toxicidad	Extremadamente peligrosos
	Altamente peligrosos
	Moderadamente peligrosos
	Ligeramente peligrosos
Forma de acción	De acuerdo a su espectro de acción: Selectivos y no selectivos
	De acuerdo a su vía de penetración vegetal: Sistémicos, transmisibles, penetrantes.
	De acuerdo a su vía de penetración animal: Ingestión, contacto, inhalación
	Herbicidas aplicados según el momento de aplicación: Preemergentes, postemergentes
Naturaleza	***Químicos:*** Sintéticos y orgánicos (de fórmula basada en sustancias de origen animal) - Arsenicales - Carbamatos - Derivados de la cumarina - Derivados de la urea - Dinitrocompuestos - Organoclorados - Organofosforados - Organometálicos - Piretroides - Tiocarbamatos - Triazinas
	Biológicos *(Bacillus thuringiensis)*
Vida media de efectividad	No persistentes
	Moderadamente persistentes
	Persistentes
	Permanentes

Tabla 3.2 Clasificación de los plaguicidas en función de su capacidad para estar presentes en un sustrato o ambiente, tiempo después del objetivo de su administración.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
Permanentes	Indefinida	Derivados del mercurio, plomo o arsénico
Persistentes	Mas de 18 meses y hasta por 20 años	DDT, Aldrin, Dieldrin
Moderadamente persistentes	Entre 1 año y 18 meses	Paratión, Iannate
No persistentes	Entre días y hasta 12 semanas	Malatión, Diazinón, Carbarillo, Diametrin

Asimismo, como puede verse en la Figura 3.1, de acuerdo con la estructura química que estos posean, se han clasificado en varias familias, de las cuales no todas poseen la misma relevancia en cuanto a la magnitud del daño que puede ocasionar su presencia en el ser vivo o el medio ambiente. Los plaguicidas en los que centramos nuestras investigaciones, ya fuera del ámbito analítico y/o proteómico, fueron los clasificados como organofosforados, organoclorados y piretroides. Específicamente del primer grupo se consideraron Fentión, Diazinón y Clorpirifós; del segundo grupo, Endrín y p,p´- DDT; y del tercer grupo, Cipermetrina, Fenvalerato y Flumetrina.

3.1.1. Plaguicidas organofosforados

Dentro de la amplia gama de familias de plaguicidas existentes se encuentran los compuestos organofosforados, considerados como ésteres, amidas o tioles sintéticos derivados del ácido fosfórico, fosfónico y fosforotioico. Debido a la diversidad estructural de los plaguicidas organofosforados (POPs), se le confieren características fisicoquímicas como alta volatilidad, solubilidad y propiedades toxicológicas. Estas sustancias se caracterizan por ser sólidos cristalinos o líquidos traslúcidos de color amarillo parduzco, de olor desagradable y facilidad para hidrolizarse en medio alcalino o en medio ácido.

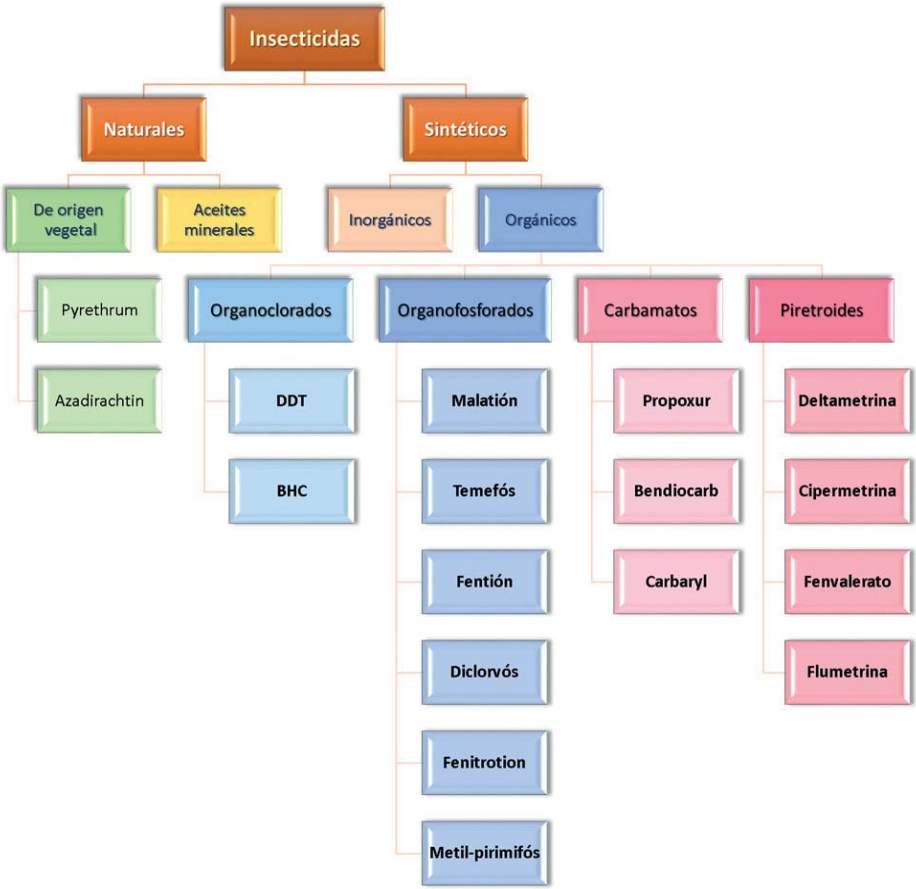
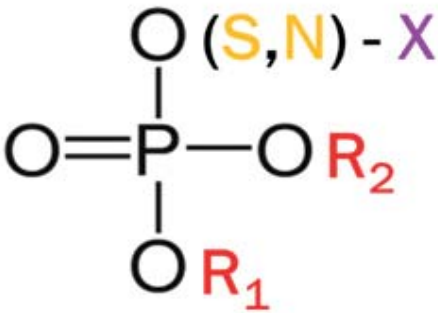


Figura 3.1 Clasificación de los plaguicidas en función de la familia de compuestos del que procede.

Ventajas como una menor estabilidad en el ambiente, en comparación con los compuestos organoclorados, y una alta eficacia contra diferentes especies de insectos los hace predilectos para su aplicación; sin embargo, esta bondad contrasta contra el inconveniente de la alta toxicidad para los mamíferos.

En la Figura 3.2 y Tabla 3.3 se muestran la estructura general de los POPs y las estructuras químicas de los plaguicidas que han sido objeto de estudio en algunas de nuestras investigaciones, respectivamente.



Clasificación	
Según carácter químico de X	I. X contiene un nitrógeno cuaternario
	II. X es flúor
	III. X es un grupo CN, OCN, SCN u otro halogenado distinto a flúor
	IV. X es otra molécula

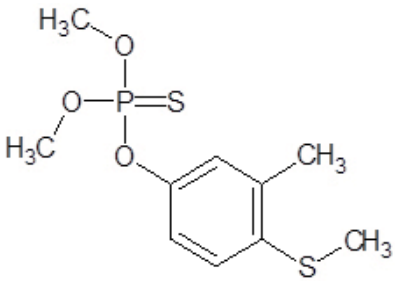
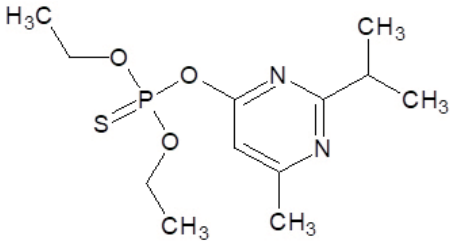
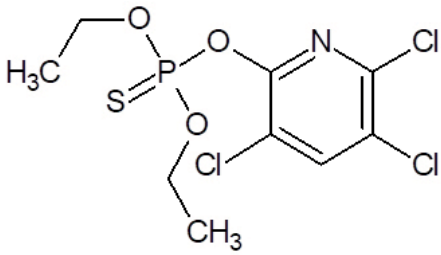
Figura 3.2 Estructura general de los plaguicidas organofosforados.

Estos compuestos se caracterizan por atravesar fácilmente las barreras biológicas como la piel y mucosas, y una vez superados, poseen fácil penetración a nivel de sistema nervioso central, lo que habla de su capacidad para almacenarse en tejido graso y llegar a bioacumularse con facilidad [4].

La elevada toxicidad atribuida a estas moléculas obedece a su capacidad para inhibir de forma irreversible a la enzima acetil-colinesterasa, situada en las hendiduras sinápticas, la cual es responsable de terminar el efecto neurotransmisor de la acetilcolina [5].

Como se ha mencionado, los POPs considerados como ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados comparten como característica farmacoló-

Tabla 3.3 Estructura química y propiedades físicoquímicas de plaguicidas organofosforados objeto de estudio en algunas de nuestras investigaciones.

Plaguicida organofosforado	Propiedades
 **FENTION (FTN)** ***O, O-dimetil fosforotioato***	MW: 278.32 g/mol Log Kow = 4.09 **Insecticida y acaricida**
 **DIAZINÓN (DZN)** ***O,O-Dietil O-[4-metil-6-(propan-2-il) pirimidina-2-il] fosforotioato***	MW: 304.34 g/mol Log Kow = 3.81 **Insecticida**
 **CLORPIRIFÓS (CPF)** ***O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato***	MW: 350.586 g/mol Log Kow = 4.96 **Insecticida y acaricida**

gica la acción de inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, lo que genera una acumulación de acetilcolina, y como consecuencia, se altera el funcionamiento del impulso nervioso.

La liposolubilidad y volatilidad que les caracteriza facilitan su absorción y en función de las variaciones de radicales en su estructura varía su toxicidad (extremadamente peligrosos, altamente peligrosos y ligeramente peligrosos)[5]. Hasta cierto punto, la aparición de efectos tóxicos mediados por POPs dependerá de la proporción en que se absorbe el plaguicida. En el caso específico de ciertos organofosforados, cuya degradación es lenta, puede ocurrir un almacenamiento temporal significativo en la grasa corporal.

Una vez que un POPs es absorbido, la molécula original y sus metabolitos poseen la capacidad de permear con rapidez hacia órganos y tejidos, principalmente hígado y riñón, antes de alcanzar su eliminación mediante orina y heces. Evidentemente, aquellos POPs con mayor carácter lipofílico tenderán a bioacumularse en tejido graso y nervioso.

Particularmente, Diazinón se caracteriza por no acumularse significativamente en suelo, de modo que solo llega a absorberse de forma moderada en sedimentos, y definitivamente no posee tendencia a la bioacumulación en organismos acuáticos.

En contraste, Clorpirifós (CPF) se considera entre moderadamente y muy persistente en suelos, en los que puede llegar a permanecer hasta por más de 200 días y tiende a bioacumularse en el tejido adiposo. La alta lipofilicidad de CPF, combinado con su facilidad para adherirse al material orgánico, son aspectos que facilitan su pérdida por evaporación, trasladando el problema a un nuevo compartimento ambiental: el aire. Aunque se considera moderadamente tóxico, la exposición relacionada con los ambientes laborales, se ha identificado como una causa frecuente de intoxicaciones, caracterizadas por presentar desde síntomas subclínicos

hasta intoxicaciones severas. Un problema recientemente identificado a nivel de salud humana se relaciona con la posibilidad de desarrollar problemas de infertilidad, alteraciones del comportamiento neurológico o el riesgo de padecer linfoma de Hodgkin [6-9].

3.1.2. Plaguicidas organoclorados

Paralelamente, otro grupo abundantemente utilizado en el control de plagas son los conocidos compuestos organoclorados (POCs), los cuales presentan estructuralmente sustituciones de átomos de cloro, grupos alifáticos o anillos cíclicos aromáticos, otorgándole características fisicoquímicas como la poca solubilidad en agua y alta lipofilicidad, responsables de su alta persistencia (poco biodegradables) y toxicidad. Estas sustancias se utilizan con fines insecticidas, herbicidas y fungicidas.

Los POCs se diferencian en cuatro grupos principales de sustancias en función de su origen. Así, encontramos: los derivados del clorobenceno, entre los que destaca el DDT, DDD, Pertane y Metoxicloro; los derivados del Indano, entre los que se encuentran Clordano, Heptacloro, Aldrín, Dieldrín, Endríne Isodrín; los derivados del ciclohexano, como el caso de Lindano, y finalmente, los derivados de la esencia de terbentina, como Toxafeno y Endosulfán [10].

Gracias a características como su estabilidad a la luz solar, humedad, aire, calor y ataque por microorganismos, estas sustancias se consideran como de elevada persistencia en el medio ambiente, representando un importante problema medioambiental, al acumularse en suelo y corrientes de agua subterránea. Estas características les convierte en importantes problemas de contaminación medioambiental persistente, de modo que han venido a ser, en su mayoría, sustancias prohibidas, restringiéndose su uso solo para combatir vectores de relevancia epidemiológica y bajo estrictos controles de las entidades gubernamentales en salud. Ejemplo de este tipo de uso, hace referencia al control de los vectores responsables de la propagación de enfermedades de relevancia en salud pública, como

dengue y malaria, siendo por tanto efectivo para combatir a los mosquitos de los géneros Anopheles y Aedes.

En general, se ha considerado que los POCs actúan sobre el sistema nervioso de los insectos, aunque poco se sabe si la ruta de acción obedece a un mecanismo dependiente de la ingestión o el contacto.

Sin embargo, respecto a su toxicología se conoce que estos pueden ingresar y ejercer su efecto a través de las vías digestiva, respiratoria o dérmica. Evidentemente, dado que el carácter lipofílico depende de la estructura química de la sustancia, la penetrabilidad de estos plaguicidas a través de la piel depende de su grado de permeabilidad transdérmica, el cual se afecta directamente por el carácter lipofílico de la molécula. De este modo, se conoce que DDT se absorbe poco a través de la piel, mientras que Endrín, por ejemplo, lo hace con mayor velocidad y eficiencia. En conclusión, la elevada lipofilicidad de los POCs favorece que su presencia en el tejido adiposo se incremente, favoreciendo su bioacumulación [11].

Con base en lo antes descrito, estas sustancias poseen elevada toxicidad a nivel del sistema nervioso central. A diferencia de los POPs, que actúan sobre la acetil-colinesterasa, los POCs ejercen su acción a través de su capacidad de interacción con las ATP-asas relacionadas con la fosforilación oxidativa, bloqueando la respiración celular.

Las intoxicaciones por POCs son muy frecuentes debido a su afinidad por tejido graso, su velocidad de eliminación por vía renal o heces es baja, llegando a bioacumularse, especialmente en leche materna, por lo que su presencia persistente en el organismo puede involucrar síntomas de intoxicación crónica. La ruta de eliminación de POCs involucra inicialmente la transformación metabólica por vía hepática y posterior excreción por vía biliar o urinaria, también afectan a los riñones e hígado, de modo que se conocen por su daño hepático y renal [12].

En la Figura 3.3 se muestra la estructura general de los POCs junto con las estructuras químicas de los plaguicidas que han sido objeto de estudio en algunas de nuestras investigaciones.

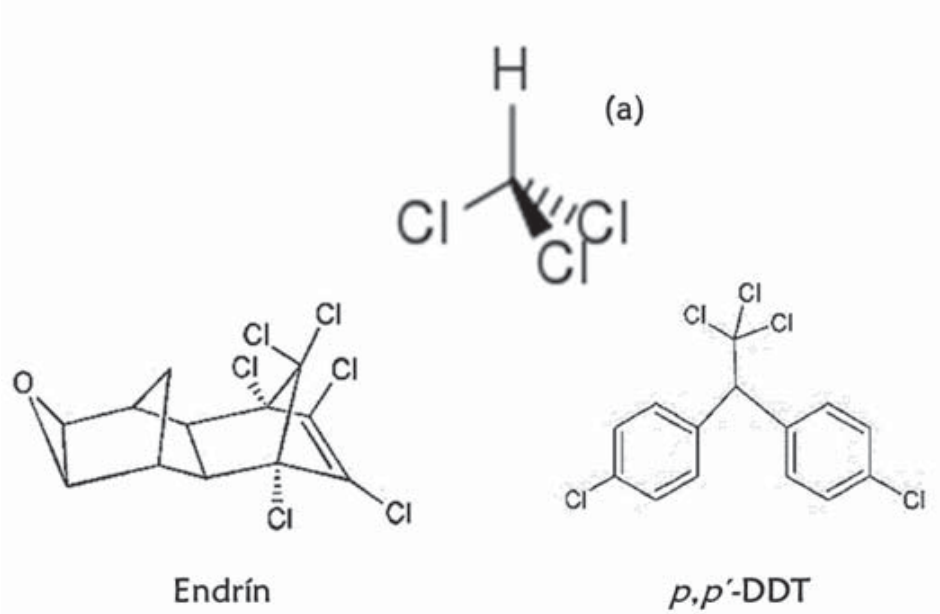


Figura 3.3 Estructuras general de los plaguicidas organoclorados (POCs) (a) y estructura química de aquellos que se han estudiado en nuestras investigaciones.

3.2. Uso de plaguicidas en cría de animales

Idealmente, un pesticida debe ser letal para las plagas blanco, pero no para las especies no objetivo, incluido el hombre. Desafortunadamente, este no es el caso, por lo que ha surgido la controversia sobre el uso y abuso de pesticidas, ante los estragos producidos en los seres humanos, otras formas de vida y el ambiente en general.

Estas sustancias se utilizan a nivel mundial en el cultivo de alimentos y protección de la salud humana y animal frente a vectores de riesgo endémico. Para que ejerzan su efecto biocida, específicamente estas sustancias pueden ser administradas a los animales o esparcidas sobre sus cuerpos, provocando la presencia de sus residuos en el tejido animal

comercializado para consumo humano, y también aparecer diseminados en el suelo y corrientes de agua, como producto de su aplicación por aspersión o baños en el animal [12].

En cualquier caso, el empleo de plaguicidas en ganadería supone un riesgo potencial para la salud pública, en la medida en que pueden aparecer residuos de estas sustancias o sus metabolitos en los alimentos obtenidos de los animales tratados; en especial si no se han respetado las indicaciones de administración y/o tiempos de retiro. Así, aunque importantes desde el punto de vista de las Buenas Prácticas Ganaderas (BPGs), el empleo no controlado de estas sustancias puede generar una amplia gama de riesgos para la salud humana, que dependerán de la frecuencia y grado de exposición.

Dada la amplia identificación de riesgos a la salud humana y el medio ambiente, el comercio de leche y carne contaminadas puede:

- Desencadenar procesos alérgicos en el consumidor;
- Contribuir al desarrollo de resistencias por selección de formas resistentes en el ecosistema huésped, que una vez transmitidas al hombre, resultan más resistentes;
- Afectar a los procesos de fermentación láctica necesarios en la obtención de derivados de la leche a escala industrial;
- Inhibir el crecimiento de la flora microbiana que contamina un alimento durante su control de calidad, de modo que su presencia no se detecta y se corre el riesgo de aprobar su comercialización;
- Inducir la actividad enzimática mediante radicales libres;
- Alterar la reproducción y la respuesta inmune;
- Inducir cambios en el comportamiento hormonal; y
- Provocar mutagenia, teratogenia o carcinogenia no solo en la especie humana sino en las comunidades bióticas con diferente nivel de sensibilidad.

Este panorama muestra la necesidad de ejercer controles sobre la presencia de estas sustancias en alimentos de origen animal. Dentro de los plaguicidas, los organoclorados (POCs), organofosforados (POPs), los derivados del ácido carbámico, piretrinas y piretroides han sido los más aplicados, aunque estos últimos de modo más limitado debido a sus elevados costes. Su aplicación va dirigida especialmente como ectoparasiticidas para el control de moscas y garrapatas en el ganado. Adicionalmente, los POPs también se emplean en el control de plagas y enfermedades de cultivos destinados a la alimentación del ganado lechero, como pastos, alfalfa, sorgo y maíz, entre otros.

La creciente demanda de productos alimenticios de origen animal ha dado lugar a la intensificación de los sistemas de producción agropecuarios y en particular, la ganadería. El mantenimiento de estos sistemas requiere el empleo de plaguicidas para controlar, prevenir o destruir plagas que afectan al animal y a los cultivos a partir de los cuales se les provee alimento [13].

El empleo de estas sustancias con tales fines, así como el contacto de los animales con potreros tratados con plaguicidas, conlleva su acumulación en diferentes tejidos del animal, independientemente de la vía de contacto empleada. El consumo de alimentos obtenidos de animales tratados pone en riesgo la salud del consumidor y el alimento pierde la condición de inocuidad exigida para su comercio.

Actualmente, el control de residuos de plaguicidas en alimentos de origen bovino constituye una de las prioridades del sistema de salud pública a nivel mundial, a fin de evitar riesgos en el consumidor asociados a efectos toxicológicos por exposición crónica, tales como cáncer, leucemia, malformaciones congénitas, enfermedades del sistema inmune, deterioro cognitivo, entre otros [14, 15].

En particular, se ha identificado que la exposición a plaguicidas organofosforados (POPs) y organoclorados (POCs) son causales de disrupción

endocrina, asociándose a trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes e inducción de patologías neurológicas como la demencia o la enfermedad de Parkinson [16, 17]. Asimismo, se asocian con retraso en el desarrollo neurológico en el período prenatal y aumento en el riesgo de cáncer durante la primera infancia.

3.3. Aspectos regulatorios del uso de plaguicidas

El panorama expuesto hace de la inocuidad alimentaria uno de los mayores retos que afronta nuestro país en la expansión de su mercado alimentario a nivel internacional, y de no atender las directrices mundiales que lo regulan, en poco tiempo se constituirá en una amenaza importante para el sector agropecuario. Así, oportunidades como los Tratados de Libre Comercio firmados con Estados Unidos (US) y la Unión Europea (UE), en lugar de representar una excelente oportunidad de crecimiento del sector agropecuario nacional, ha venido a transformarse en una amenaza, aún para el comercio interno de los productores nacionales, debido a la dificultad para cumplir con las normas internacionales referidas a vigilancia y control de residuos de plaguicidas en carne.

Este panorama se debe a la poca tecnificación del sector agropecuario, la abundancia de fincas multipropósitos, los bajos y escasos apoyos gubernamentales para impulsar la competitividad del agro colombiano, entre otros.

En otras palabras, aunque necesarios para el bienestar animal, el empleo de plaguicidas en la cría intensiva de ganado debe ser vigilado y controlado en nuestro país, mediante programas gubernamentales que optimicen el rendimiento de los sistemas ganaderos, mejoren la evolución alimentaria y de salubridad, al tiempo que permitan afianzar los intereses económicos de los productores nacionales ante la posibilidad de acceder exitosamente a los mercados alimentarios de otros países.

Un ejemplo de los criterios regulatorios internacionales que el sector ganadero nacional debe cumplir es el Reglamento 396/2005 de la Comi-

sión Europea, por el cual se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMRs) de plaguicidas en los productos de origen vegetal o animal destinados al consumo humano o animal [18]. Definido como "el contenido máximo de residuo permitido (expresado en $mg \cdot Kg^{-1}$ o $\mu g \cdot Kg^{-1}$) de plaguicidas presentes en diferentes matrices alimenticias", la determinación de los LMRs en derivados de origen animal ha requerido el desarrollo de metodologías analíticas sensibles y selectivas dirigidas a su estudio en alimentos como leche bovina, hígado bovino, tejido porcino, etc., empleando técnicas de cromatografía líquida acopladas a sistemas de detección como UV-Vis, DAD y MS.

Bajo este contexto, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) han reglamentado algunos aspectos sobre el uso de plaguicidas en animales para consumo humano, como los establecidos por la Resolución 2906 de 2007 [19], fijando LMRs según lo establecido por el Codex Alimentarius, pero la urgente necesidad de implementar más programas de vigilancia y control gubernamentales, impide garantizar alimentos con concentraciones de residuos de plaguicidas inocuos para el consumidor.

Recientemente, el ICA actualizó el listado de productos y medicamentos veterinarios autorizados para uso en el país, dentro del que se encuentran 46 productos aprobados para su uso generalizado en bovinos, ya sea con fines ectoparasiticidas, larvicidas o antisépticos, y cuya composición incluye los plaguicidas considerados en el presente trabajo.

A pesar de la existencia de documentos como el CONPES 3676 de 2010, referido a la consolidación de la política sanitaria y de inocuidad de las cadenas láctea y cárnica en relación a aditivos, residuos de plaguicidas y medicamentos de uso veterinario en alimentos, se carece de una estrategia integral de inocuidad alimentaria y una regulación estricta que asegure productos inocuos al consumidor [20].

Si bien nuestra capacidad productora ha aumentado considerablemente, el compromiso de implementar la Buenas Prácticas Ganaderas no lo ha hecho en igual medida, de forma que se hace necesario aportar elementos científicos que evidencien la necesidad de constituir un verdadero sistema regulatorio en el país.

Para ello, se hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas sencillas, selectivas, sensibles y de bajo coste, que permitan el desarrollo de programas masivos de vigilancia y control de plaguicidas en carne bovina, de modo que se garantice la calidad e inocuidad de los alimentos que consumen los colombianos y con los que se espera expandir nuestro mercado internacional.

3.4. Aspectos analíticos de los plaguicidas

En las últimas décadas la comunidad científica internacional ha dirigido su atención al desarrollo de métodos analíticos exactos y robustos que viabilicen su determinación en derivados alimenticios de origen animal con matrices complejas, como es el caso de la carne bovina. Los métodos para la determinación de plaguicidas han evolucionado con el tiempo, de forma paralela al desarrollo de instrumentación cada vez más sensible que permite alcanzar menores límites de detección. La cromatografía líquida y de gases constituyen las técnicas más utilizadas en el análisis de estos residuos, siendo los detectores de diodos en fila (DAD), fluorescencia (FLD), espectrometría de masas (MS), captura de electrones, y nitrógeno-fósforo (NPD) los comúnmente empleados.

En la actualidad, la cromatografía de gases (GC) es la técnica más utilizada para el análisis multiresiduo de plaguicidas en diversas matrices, incluyendo la carne bovina, dada su elevada sensibilidad y selectividad en la detección de este tipo de compuestos. Dichos aspectos son conferidos por la incorporación de detectores como el de detección en llama (FID), microcaptura de electrones (μ-ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y espectrometría de masas (MS). Entre las ventajas que presenta esta técnica

cabe destacar una alta sensibilidad y selectividad, una elevada eficiencia en la separación, versatilidad y sencillez.

Los inconvenientes de la GC en el análisis de plaguicidas radican en la incompatibilidad de algunos plaguicidas con esta, debidos principalmente a su inestabilidad térmica, elevado peso molecular, baja volatilidad y/o alta polaridad. A pesar de que el acoplamiento GC-MS es muy común y que permite la confirmación e identificación de la estructura química de los plaguicidas, la dificultad práctica y los costes de análisis, asociados al empleo de esta técnica limitan actualmente su aplicación en el análisis de rutina.

A pesar de que inicialmente la LC se aplicó a plaguicidas cuyo análisis por GC no era viable, en la década de los 80 se comenzó a potenciar el uso de la LC y, desde entonces, su aplicación en el campo del análisis de residuos de plaguicidas se ha extendido considerablemente, incluyendo a los POPs y POCs. La diversidad de detectores como UV, hilera de diodos (DAD), fluorescencia (FLD), MS, etc., así como la variedad de columnas disponibles y la posibilidad de llevar a cabo gradientes de elución más o menos complejos han incrementado la cantidad de estudios relacionados con el análisis de plaguicidas mediante esta técnica. Además, el acoplamiento de la LC con la MS (CL-MS) proporciona un aumento de sensibilidad y de selectividad con respecto a los detectores universales, contribuyendo adicionalmente a la elucidación estructural, que resulta de gran utilidad en la identificación y confirmación de los plaguicidas analizados.

Por su parte, el tratamiento de las muestras requiere cumplir con características de elevada sensibilidad y selectividad, así como la posibilidad de analizar simultáneamente un amplio número de residuos de distintas familias, por lo que el tratamiento de muestras suele combinarse con procedimientos genéricos de preparación de muestras, como los QuEChERS (sigla del inglés: Quick, Easy, Cheape, Effective, Rugged and Safe), haciendo de esta las opción analítica más empleada en análisis confirmatorio de residuos de contaminantes [21].

Otras técnicas analíticas utilizadas son los métodos de criba sencillos y rápidos que requieren una sensibilidad alta y un porcentaje muy bajo de falsos negativos. Estos a pesar de su limitada selectividad constituyen una herramienta útil en los programas de vigilancia de residuos. Su importancia reside en reducir al mínimo el porcentaje de falsos negativos, ya que solo las muestras positivas se evaluarán posteriormente. En su mayoría, se trata de bioensayos inmunoquímicos y microbiológicos, cuyos inconvenientes se cifran en una limitada sensibilidad; solo permiten la identificación de familias de compuestos pero no de sustancias individuales; y sus límites de detección corresponden a calibrados basados en disoluciones patrón de los antibióticos ignorando el hecho de que la matriz de las muestras reales puede tener una influencia significativa sobre la sensibilidad del bioensayo [22].

3.5. Componente experimental empleado en el análisis de POPs y POCS

3.5.1. Instrumentación y reactivos

- Equipo HPLC Lachrom Elite, compuesto por: bomba cuaternaria Hitachi L-2130, automuestreador Hitachi L-22, sistema de adquisición de datos EZChrom Elite y detector DAD
- Columna Gemini C18 - Phenomenex (25cm x 4.6 mm D.I); 5µm
- Sistema de purificación de agua Direct-Q UV - Merck Millipore
- Viales para HPLC
- Vórtex Mixer - Velp Scientifica
- Sonicador Elmasonic - Elma GmbH & Co KG
- Balanza de precisión - Precisa
- Balanza semi-micro - Precisa
- Equipo de extracción en fase sólida
- pH metro HI 2221 - Hanna Instrument
- Cartuchos SPE StrataX®, 200 mg / 6mL - Phenomenex
- Material volumétrico clase A
- Micropipetas: 10-100; 20-200 y 100-1000 µL
- Centrífuga con sistema de enfriamiento - Hettich Lab. Technology

- Procesador manual de alimentos - Enaxxion Electro
- Baño térmico – Indulab

Reactivos
- Acetonitrilo para HPLC (grado gradiente) - J.T. Baker
- Metanol para HPLC (grado gradiente) - J.T. Baker
- Ácido o-fosfórico 85% (grado analítico) - Scharlaub
- Hidróxido de sodio (grado analítico) - Scharlaub
- Fentión (FNT)
- Diazinón (DZN)
- Clorpirifós (CPF)
- p,p´-DDT
- Endrín (END) (Patrón Interno)

3.5.2. Optimización de la separación cromatográfica

Teniendo en cuenta la solubilidad y el carácter de baja y mediana polaridad de los dos grupos de plaguicidas estudiados (POPs y POCs), en nuestras investigaciones se procede a la optimización de las condiciones cromatográficas para lograr la mejor separación de los analitos buscando el desarrollo de un método óptimo para su determinación.

Por lo general estos grupos de compuestos presentan una buena solubilidad con disolventes de baja y mediana polaridad como hexano, diclorometano, acetato de etilo y acetonitrilo.

La separación se ha realizado habitualmente empleando columnas de fase reversa de tipo C8 o C18 y, en algunos casos, funcionalizadas con sistemas fenol o amida. La presencia de grupos silanoles residuales e impurezas metálicas en los materiales de empaquetamiento de las columnas origina la aparición de colas y un ensanchamiento de los picos cromatográficos, perdiéndose resolución y comprometiendo la separación de estas sustancias. Por ello, al igual que en la separación de fluoroquinolonas, los métodos más recientes tienden a emplear columnas con bloqueo de los sistemas residuales (o encapadas) o columnas de sílice de elevada pureza.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, se ha utilizado una columna Gemini C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) de alta pureza y sistema end-capping, para la separación de Fentión, Diazinón, Clorpirifós, Endrín y p,p´-DDT en extractos de muestras de carne bovina.

Con el fin de optimizar la separación cromatográfica de los plaguicidas en esta columna, y tomando en cuenta su comportamiento en medio orgánico, se ha utilizado como fase móvil la mezcla MeCN/H_2O, evaluando la influencia de la composición (90:10 y 80:20 %v/v) y la sensibilidad del sistema de detección. El empleo del componente orgánico contribuyó al ajuste del poder elutrópico y la resolución cromatográfica en un tiempo de separación razonable; en tanto que el componente acuoso permitió la disminución del poder elutrópico de la fase móvil y con ello mejorar la selectividad del sistema de separación. La composición 90:10 %v/v evidenció la influencia de la alta participación del modificador orgánico sobre la retención cromatográfica, conllevando a una significativa disminución en el tiempo total de cromatografía (12 min), debido al elevado poder elutrópico de esta fase. Esto conlleva que la transferencia de masa sea de menor tiempo de residencia en la fase estacionaria que en la móvil, a pesar de utilizar un menor caudal (0.7 mL·min-1), por lo que el ensanchamiento de banda columnar se hace más bajo. Esta combinación de aspectos condujo a una disminución en la retención analítica y por tanto en la eficiencia cromatográfica (N).

En contraste, la composición 80:20 %v/v se caracterizó por proporcionar la mayor eficiencia en la separación cromatográfica del grupo de plaguicidas (N = 19227), al igual que bajo factor de colaje en los picos cromatográficos de cada analito (F < 1.1) y valores de RSDs inferiores a 2% en el cálculo del valor medio de áreas bajo la curva de cada sustancia.

Es de resaltar que la obtención de estos valores óptimos en cada parámetro suelen ser los exigidos en el desarrollo de métodos cromatográficos destinados al empleo en muestras con matrices sencillas, condición exactamente opuesta a la que caracteriza a la matriz de la muestra bajo estudio. En la siguiente figura se muestra un cromatograma representativo de la separación de los plaguicidas evaluados.

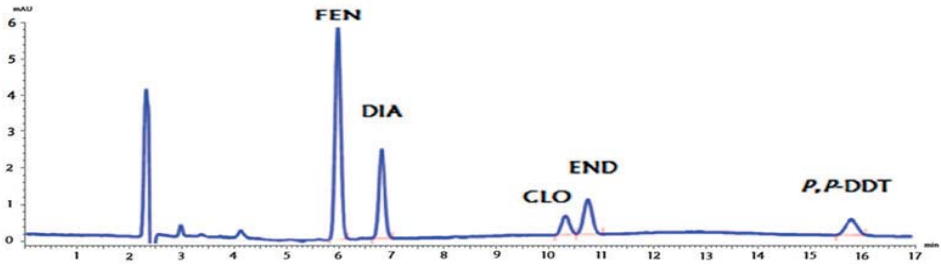


Figura 3.4 Separación cromatográfica obtenida al inyectar 20 µL de la mezcla de pesticidas POPs y POCs, empleando ACN/H_2O 80:20, %v/v, caudal de 1 mL min-1, en la columna Phenomenex GEMINI C18 y detección DAD (λ242nm). Nivel de concentración: FEN, DIA, CLO: 50 ppb; END: 10 ppm; p,p´-DDT: 200 ppb.

3.5.3. Optimización del tratamiento de muestra

Este método fue aplicado al análisis de muestras de carne bovina, que contiene entre 21-24% en proteínas, 3.1-5.0% de grasa total, carbohidratos, vitaminas y minerales necesarios para la formación de tejidos en el organismo humano. Esta elevada concentración y variada composición, incrementan la complejidad del análisis, constituyéndose en un importante reto analítico garantizar la recuperación completa de los residuos de POPs y POCs presentes, a fin de evitar que un alimento contaminado llegue a ser consumido por la población.

Entre los principales inconvenientes relacionados con la determinación de POPs y POCs en esta matriz se encuentran: el empleo de altos volúmenes de disolvente de extracción, dado que la mayoría se basa en la aplicación del método Soxhlet; la formación de emulsiones; coextracción de interferentes lipídicos, gracias a la baja polaridad del disolvente de extracción generalmente utilizado (diclorometano, acetato de etilo); y disminución de la vida útil de la columna cromatográfica de separación, debido al empleo de disolventes agresivos con el sistema de fase estacionaria.

Si bien las técnicas instrumentales de análisis son cada vez más sofisticadas tecnológicamente, la preparación de muestra continúa siendo la etapa crítica en el desarrollo de estos métodos, dado que errores analí-

ticos cometidos en esta conducen al comercio de muestras no conforme, poniendo en riesgo la salud del consumidor.

La etapa de preparación de la muestra comprende dos subetapas de gran relevancia y secuenciales la una de la otra, como se pueden presentar: pretratamiento en el cual se presenta la extracción cuantitativa de los analitos de interés, paralelo a la eliminación de los interferentes endógenos mayoritarios; y preconcentración y limpieza, en la cual se lleva a cabo la remoción de los interferentes residuales de la matriz y preconcentración de los compuestos a analizar.

Pretratamiento

El análisis de POPs y POCs en muestras de alimentos como la carne bovina implica un paso de homogenización previo a la etapa de pretratamiento. Con ello se persigue reducir el tamaño de partícula para así aumentar el área superficial y mejorar el poder de extracción del agente utilizado para disolver los analitos de interés. Usualmente para tal fin se emplean procesadores manuales de alimentos y molinos eléctricos, los cuales proporcionan un tamaño de partícula pequeño y buena uniformidad de las muestras.

Una vez homogeneizada, se utilizan disolventes orgánicos de alta afinidad por los analitos de interés, de modo que se asegure una extracción cuantitativa de estos en la etapa. El uso de disolventes de mediana o poca afinidad podría llevar a métodos poco útiles, debido a la pérdida de analitos de interés durante el proceso de extracción. Así, los disolventes que solemos emplear en esta etapa son acetonitrilo y acetato de etilo.

Preconcentración y limpieza

Entre las diversas técnicas existentes, la Extracción en Fase Sólida (SPE) es la de mayor aplicación en el campo de la vigilancia y control de residuos de sustancias de uso veterinario en alimentos de origen animal destinados al consumo humano, gracias a características como robustez, simplicidad, bajo tiempo de análisis, especificidad, sensibilidad y costes [23, 24].

Esta técnica ha demostrado ser muy eficaz para la limpieza, extracción y preconcentración de residuos de plaguicidas desde muestras de carne, y dado que involucra pocos volúmenes de disolventes durante su procedimiento, es considerada una técnica amigable con el medio ambiente.

La puesta a punto de una de nuestras metodologías, basada en SPE para la extracción de POPs y POCs desde muestras de carne bovina, ha implicado el uso de cartuchos con lechos de fase estacionaria de fase reversa C18. Con base en la literatura los sistemas que más frecuentemente hemos utilizado son Oasis, ENV Isolute, Bond Elut y Strata X®, entre otros.

Recientemente, la introducción de diversos tipos de copolímeros adsorbentes ha ayudado a hacer de la SPE una técnica de extracción más robusta con un intervalo más amplio de aplicación.

Considerando las etapas involucradas en la SPE, el empleo del tipo de cartuchos mencionados, permite el acondicionamiento de los mismos con el uso de MeOH y posterior reacondicionamiento con el mismo sistema disolvente en el que se encuentra el extracto de la muestra, luego de su pretratamiento. El lavado de contaminantes endógenos persistentes de la matriz ha llegado a involucrar el uso de NaOH (agente desengrasante), MeOH y MeCN; y finalmente la elución de los analitos de interés suele ser muy eficiente con el uso de extracciones secuenciales basadas en el uso de mezclas MeCN/CH_2Cl_2 y CH_2Cl_2.

3.6. Referencias

1. FAO/OMS, Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo. 1996, FAO: Roma.
2. Trabajo, I.N.d.S.e.H.e.e., NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales. 1987, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España.: Barcelona.
3. Ramírez, J.A.y.L., M., Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor, 2001. 4(2): p. 67 - 75.

4. Sánchez-Chávez G, S.R., Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. Revista de Educación Bioquímica, 2008. 27(2): p. 44 - 51.
5. Fernández A., D.G., L.C. Mancipe G., and D.C. Fernández A., Intoxicación por organofosforados. Revista Med, 2010. 18: p. 84-92.
6. Latifovic, L., et al., Pesticide use and risk of Hodgkin lymphoma: results from the North American Pooled Project (NAPP). Cancer Causes Control, 2020. 31(6): p. 583-599.
7. Kudavidanage, E.P., et al., Commercial Formulation of Chlorpyrifos Alters Neurological Behaviors and Fertility. Biology (Basel), 2020. 9(3).
8. K, M.K., et al., Residential Proximity to Agricultural Fields and Neurological and Mental Health Outcomes in Rural Adults in Matlab, Bangladesh. Int J Environ Res Public Health, 2019. 16(18).
9. Lee, W.J., et al., Mortality among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. Environmental health perspectives, 2007. 115(4): p. 528-534.
10. Gobierno, P.d., Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Comercialización y Utilización de Plaguicidas, d.d.e.d. BOE núm. 20, Editor. 1984, Presidencia del Gobierno: Madrid. p. 20.
11. Bolaños, P.P., A.G. Frenich, and J.L.M. Vidal, Application of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in the quantification-confirmation of pesticides and polychlorinated biphenyls in eggs at trace levels. Journal of Chromatography A, 2007. 1167(1): p. 9-17.
12. Chung, S.W. and B.L. Chen, Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities. J Chromatogr A, 2011. 1218(33): p. 5555-67.
13. Tsiplakou, E., et al., Pesticides residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece. Chemosphere, 2010. 80(5): p. 504-12.
14. Weichenthal, S., C. Moase, and P. Chan, A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. Environ Health Perspect, 2010. 118(8): p. 1117-25.

15. Voorhees, J.R., et al., Neurotoxicity in Preclinical Models of Occupational Exposure to Organophosphorus Compounds. Front Neurosci, 2016. 10: p. 590.

16. Baltazar, M.T., et al., Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. Toxicol Lett, 2014. 230(2): p. 85-103.

17. Zaganas, I., et al., Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence? Toxicology, 2013. 307: p. 3-11.

18. Unión, E.P.E.y.E.C.S.d.l., Reglamento (CE) NO 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005. Relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo, d.d.f.d. Diario Oficial de la Unión Europea L 70, Editor. 2005, Parlamento Europeo: Estrasburgo. p. 16.

19. Colombia, R.d., Resolución 2906 de 2007 Por la cual se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas, LMR, en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes, D.O.A.C.N.d.d.a.d. 2007, Editor. 2007, Ministro de la Protección Social y Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural: Bogotá.

20. Social, C.N.d.P.E.y., Documento Conpes 3676. Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica, D.N.d. Planeación, Editor. 2010, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Ministerio de la Protección Social; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; Ministerio de Comercio, Industria y Turismo; Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA y DNP – Dirección de Desarrollo Rural Sostenible: Bogotá. p. https://www.ica.gov.co/getattachment/3b31038a-72ba-40f9-a34d-cecd89015890/2010cp3676.aspx.

21. Singh, S., A. Srivastava, and S.P. Singh, Inexpensive, effective novel activated carbon fibers for sample cleanup: application to multipesticide residue analysis in food commodities using a QuEChERS method. Anal Bioanal Chem, 2018. 410(8): p. 2241-2251.

22. Toldrá, F. and M. Reig, Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Trends in Food Science & Technology, 2006. 17(9): p. 482-489.
23. Monteiro, S.H., et al., High-Throughput Mega-Method for the Analysis of Pesticides, Veterinary Drugs, and Environmental Contaminants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Robotic Mini-Solid-Phase Extraction Cleanup + Low-Pressure Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, Part 1: Beef. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020.
24. Islas, G., et al., Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. International Journal of Analytical Chemistry, 2017. 2017: p. 8215271.

Capítulo 4
Proteínas alimentarias de origen animal: una visón general desde la proteómica redox

Albeiro Marrugo Padilla
Johana Márquez Lázaro
Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

4.1 Generalidades

En la actualidad, la foodómica o alimentómica se ha convertido en una rama de la investigación en alimentos muy versátil y capaz de ofrecer las herramientas para los ensayos de inocuidad que se requieren hoy día. En foodómica, el análisis de los alimentos se realiza desde una perspectiva de la composición molecular de sus nutrientes y las modificaciones químicas que pueden sufrir a lo largo de la cadena de producción y comercialización. Además, permite obtener un conocimiento detallado del valor nutricional y funcional del alimento, así como de los riesgos toxicológicos asociados a las modificaciones químicas y las alteraciones deliberadas en su composición [1, 2]. Dentro de las técnicas empleadas en foodómica se encuentran la genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica [2]. Siendo esta última ampliamente usada en el estudio de las modificaciones oxidativas en alimentos de origen animal [3], como resaltaremos en este capítulo.

El daño oxidativo causado a proteínas de origen animal es una de las alteraciones más evaluadas en matrices alimentarias, ya que este puede repercutir negativamente en su valor nutricional. El biomarcador más utilizados para evaluar la oxidación proteica es la formación de grupos carbonilos (carbonilación) en sus residuos de aminoácidos, los cuales gracias a su estabilidad química constituyen dianas adecuadas para su medición en el laboratorio. Es importante recordar que el término residuo de aminoácido hace referencia a cada uno de los aminoácidos que constituyen la cadena polipéptidica y no guarda relación alguna con la presencia de niveles trazas de contaminantes en los alimentos (también denominados residuos).

Los residuos de aminoácidos de una proteína poseen cadenas laterales que le permite interactuar con otro tipo de biomoléculas. Así, por ejemplo, su reacción con aldehídos y cetonas provenientes de la oxidación de lípidos presentes en los alimentos puede conducir a la formación de aductos que se caracterizan por su estabilidad

química. Estas uniones irreversibles conducen a la aparición de grupos carbonilos en la cadena lateral de los aminoácidos involucrados en la reacción, como se describe más adelante en este capítulo. Un aumento de la carbonilación proteica se ha relacionado ampliamente con la pérdida del valor nutricional de los alimentos, debido a la disminución que produce sobre propiedades funcionales como la solubilidad y digestibilidad de la proteína [3].

En términos comerciales, la carbonilación de proteínas tiene repercusiones negativas sobre los productos cárnicos porque favorece la pérdida de propiedades tecnológicas del alimento como sabor, color, terneza y capacidad de retención de agua. Características que son importantes en la fabricación de productos derivados y el mantenimiento de la competitividad en el mercado [3]. Adicionalmente, las proteínas oxidadas pueden tener repercusiones en la salud del consumidor, al promover alteración de la flora intestinal y cambios en el estado redox de intestino, siendo este último clave para la iniciación de procesos carcinogénicos [4].

Bajo este contexto, en este capítulo consideraremos dos aspectos fundamentales para el estudio de las proteínas alimentarias de origen animal. El primero, dirigido a la revisión de sus características usos y propiedades nutricionales. El segundo, dirigido a los aspectos básicos de la oxidación de las proteínas, los mecanismos de formación de los grupos carbonilos y los métodos proteómicos que se utilizan actualmente para su estudio. Todo esto como un preámbulo necesario a los subsiguientes capítulos de este texto, donde se describen los resultados de algunos trabajos de investigación que los autores han realizado a escala de laboratorio y bajo condiciones in vitro para evaluar el impacto de la presencia de plaguicidas y antibióticos de uso veterinario sobre las principales fracciones proteicas de la carne de pollo y leche bovina.

4.2 Proteínas de origen animal: usos y aplicaciones

Las proteínas se pueden definir como biopolímeros constituidos por aminoácidos (polipéptidos) que están unidos por enlaces peptídicos. Estas biomoléculas se sintetizan en los ribosomas y representan aproximadamente la mitad del peso de los tejidos del organismo [5]. Las proteínas constituyen una parte muy importante para los seres vivos al participar en prácticamente todos los procesos biológicos [6, 7]. Son esenciales para el crecimiento, gracias a su contenido de nitrógeno, que no está presente en otras biomoléculas como los lípidos o glúcidos. Asimismo, desempeñan un amplio número de funciones a nivel celular incluidas la formación estructural de las células y tejidos, el mantenimiento de la integridad celular, defensa ante agentes externos, reparación de daños, control y regulación de las funciones celulares, transporte de determinados gases a través de la sangre, como el oxígeno y el dióxido de carbono, y funcionan a modo de amortiguadores para mantener el equilibrio ácido-base y la presión oncótica del plasma, entre otras (Tabla 4.1) [6, 7].

Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas, hasta la fecha se han descrito más de 300 aminoácidos, pero solo 20 participan en la síntesis de proteínas, de los cuales solo 11 pueden sintetizarse en el cuerpo humano a partir de otros aminoácidos, y los otros nueve se consideran aminoácidos esenciales que deben ser suministrados a través de los alimentos [8]. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden producirse en el cuerpo humano, o lo hacen en cantidades insuficientes para satisfacer las necesidades fisiológicas en ciertas etapas de la vida, especialmente durante la infancia; mientras que los aminoácidos no esenciales son producidos por el cuerpo a partir de los aminoácidos esenciales o a través del metabolismo normal de las proteínas. El cuerpo humano necesita un gran número de aminoácidos en cantidades suficientemente grandes para mantener un buen estado de salud, por lo que una dieta equilibrada es de vital importancia [9].

Tabla 4.1 Tipo y funciones de las proteínas en los sistemas biológicos.

Tipo de proteína	Función	Ejemplo
Estructurales	Dan soporte, confieren elasticidad y resistencia a los tejidos.	Colágeno, elastina, queratina, proteínas de membranas, histonas.
Enzimáticas	Biocatalizadores de las reacciones metabólicas.	Pepsina, tripsina, lactasa, gastrina, lipasas.
Reguladoras	Dirigir y controlar procesos a nivel celular.	Cíclicas, factores de transcripción.
Transporte	Transportar sustancias	Hemoglobina, mioglobina, citocromos, lipoproteínas, albumina.
Defensa	Defender el organismo de patógenos externos.	Inmunoglobulinas (anticuerpos), citoquinas, fibrinógeno, mucinas.
Hormonal	Servir como segundos mensajeros para regular y controlar funciones celulares.	Insulina, glucagón, somatotropina, gonadotropina coriónica humana, angiotensina.
Almacenamiento	Almacenar aminoácidos u otro tipo de sustancias.	Ovoalbúmina (huevo), caseínas, lactoalbúminas (leche)
Contráctil	Favorecer el movimiento	Actina, miosina, dineína (cilios y flagelos).

Fuente: Tabla construida por los autores con la información suplementada por Alberts et al. (2002)

A nivel fisiológico, el recambio regular de los tejidos y proteínas corporales en el humano es posible gracias a la presencia de las proteínas en la dieta [10]. Para mantener un aporte apropiado de aminoácidos, especialmente de los esenciales, una persona promedio necesita alrededor de 7.0 g de proteína por día, por cada 9.1 Kg de peso corporal, por lo que se recomienda una ingesta diaria de 0.8 g de proteínas por cada Kg de peso corporal por día [10].

Una dieta pobre en proteínas genera una deficiencia de aminoácidos que se traduce en una disminución de la formación de proteínas endógenas.

Un estado prolongado de deficiencia de aminoácidos finalmente conduce a la aparición de enfermedades como kwashiorkor y marasmo [11, 12].

El término deficiencia de proteínas se puede definir como un estado de insuficiencia relativa o absoluta de proteínas a nivel corporal, o de deficiencia de uno o más de uno de los aminoácidos esenciales, es considerado con un balance negativo de nitrógeno y puede ser el resultado de una dieta deficiente en proteínas, del déficit global de alimentos o la presencia de algunas enfermedades. Este fenómeno también puede ocurrir a pesar de la ingesta adecuada de proteínas, si esta última es de baja calidad (es decir, el contenido de uno o más aminoácidos es inadecuado) [9, 12].

Aunque la calidad nutricional de una proteína está determinada en mayor parte por su contenido de aminoácidos esenciales y su capacidad para cubrir los requisitos del cuerpo; los aminoácidos no esenciales también tienen funciones importantes en el cuerpo que van más allá de ser simples componentes proteicos [13]. Por ejemplo, algunos de ellos sirven como precursores para la síntesis de otros aminoácidos, tales como la prolina y el glutamato para la arginina. Los aminoácidos cuya producción depende de la disponibilidad de sus precursores se consideran condicionalmente indispensables (por ejemplo, tirosina a partir de fenilalanina). Además, un desequilibrio entre los aminoácidos prescindibles e indispensables a favor de estos últimos daría como resultado el uso de aminoácidos indispensables para la síntesis de aminoácidos prescindibles a un costo metabólico sustancial. Esto se evita mediante una ingesta equilibrada de aminoácidos esenciales y no esenciales [12, 14, 15].

Además del papel crucial que juegan las proteínas en el aporte nutricional de los alimentos, las industrias alimentarias modernas han explotado sus propiedades tecno-funcionales con el fin de producir una amplia variedad de productos alimenticios a base de proteínas (yogurt, queso, aislado de proteínas lácteas como suplementos dietarios, embutidos, carnes frías entre otros), representando también un papel importante

en el desarrollo económico. De acuerdo con la cifras y proyecciones de crecimiento demográfico a nivel mundial, se espera que la población humana global esté alrededor de 9.500 millones para 2050, lo cual indica que la demanda per cápita de carne y sus derivados se duplicará durante este período (Figura 4.1) [16].

Actualmente la leche, los huevos, la carne y los mariscos representan las fuentes más importantes de proteínas utilizadas por las industrias alimentarias para la fabricación de productos alimenticios, seguido de las fuentes vegetales como las legumbres y los frutos secos. Algunas fuentes de proteínas emergentes como los insectos, las algas y la carne in vitro (basadas en células cultivadas) todavía tienen un uso limitado por las industrias alimentarias [17].

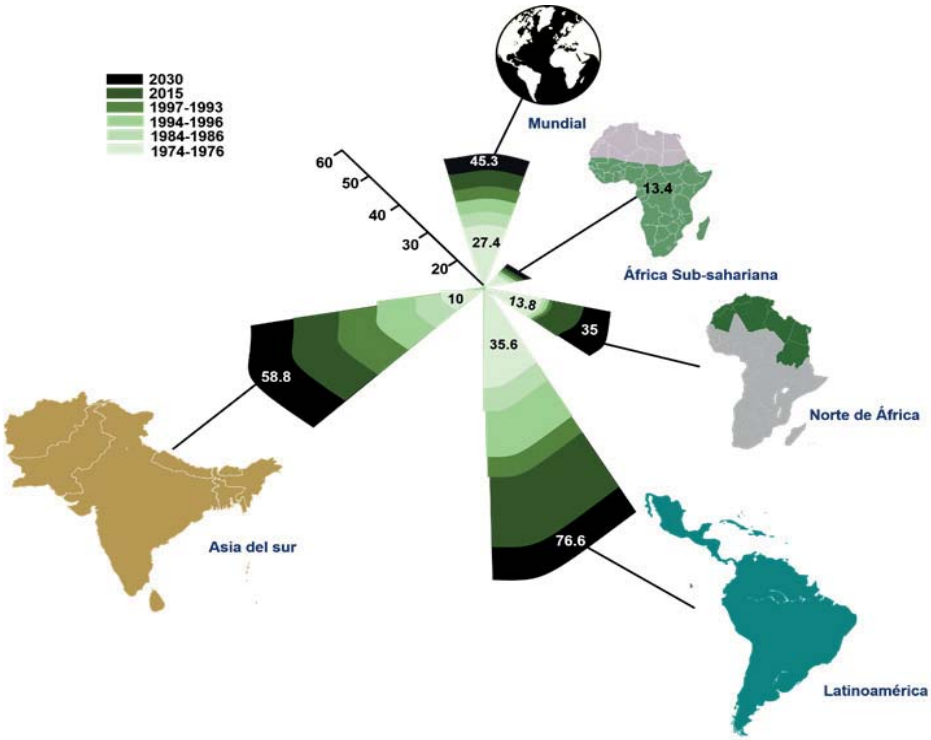


Figura 4.1 Consumo per cápita de carne y sus derivados. Expresado como (Kg per cápita, equivalente de peso en canal). Fuente: (OCDE-FAO, 2019) - http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e05b.htm#TopOfPage

En la actualidad, la producción de proteínas de origen animal (POA) es uno de los objetivos más importantes de los sistemas de producción agropecuarios modernos, en este orden de ideas, los sistemas multipropósitos, enfocados en la producción de más de un producto agropecuario son los más utilizados desde hace más de una década en todo el mundo [18, 19].

A nivel mundial están claramente definido que la leche, los huevos y la carne bovina y de aves de corral como las principales fuentes de POA, gracias a su alto contenido de aminoácidos esenciales [10, 13, 15]. De acuerdo con Elmadfa y Meyer (2017), las POA poseen un patrón de aminoácidos más cercano a los requeridos para el adecuado funcionamiento del cuerpo humano, en comparación con las fuentes vegetales [13]. En este sentido, las POA suministran los nueve aminoácidos esenciales en cantidades aproximadamente adecuadas (Tabla 4.2), además estas proteínas son más fáciles de digerir y, por lo tanto, sus aminoácidos se encuentran más disponibles para ser absorbidos a nivel intestinal [13].

Otra de las razones para el alto consumo de POA es su considerable valor de disfrute, de hecho, en la cultura occidental el consumo regular de carne se considera un indicador del nivel y estilo de vida. En los últimos años, de acuerdo con las cifras de la OCDE, muchos países latinoamericanos en vías de desarrollo consumen más productos de origen animal de los que producen, lo cual ha impulsado el incremento de la demanda mundial de alimentos de origen animal [20].

Tabla 4.2 Concentración de aminoácidos esenciales presentes en proteínas de origen animal y vegetal de la dieta occidental, en comparación con la proteína de referencia FAO/OMS.

Fuente de proteína	Aminoácidos[1]								
	Val	Leu	Ileu	Trp	Lys	His	Thr	AA	AS
Leche	66.7	97.3	60.0	44.8	78.8	27.0	44.8	95.8	33.9
Huevo	68.2	86.3	53.3	44.1	72.5	24.5	44.1	93.7	51.7
Carne de res	49.6	79.6	45.5	39.9	84.5	31.9	39.9	71.4	39.0

Pechuga de pollo	49.6	75.0	52.8	42.2	84.9	31.0	42.2	73.3	40.5
Harina de trigo	40.2	64.6	33.7	11.6	26.8	20.3	27.2	54.2	40.5
Soja	55.6	90.7	54.0	48.4	74.1	30.1	48.4	100.3	32.9
WHO/FAO[2]	40.0	61.0	30.0	25.0	48.0	16.0	25.0	71.0	23.0

[1]La concentración de los aminoácidos se expresa en $mg.g^{-1}$ de proteína. [2] Obtenido de la Food Agricultural Organization (http://www.fao.org/home/es/). **Fuente**: La tabla fue construida por los autores basados en la información reportada por *Elmadfa y Meyer (2017*) [13]. Abreviaturas: **AA**: aminoácidos aromáticos (es decir, fenilalanina y tirosina); **His**: histidina; **Ile**: isoleucina; **Leu**: leucina; **Lys**: lisina; **AS**: aminoácidos azufrados (es decir, metionina y cisteína); **Thr**: treonina; **Trp**: triptófano; **Val**: valina.

4.3 Proteínas de la carne de bovinos y aves de corral

La carne bovina representa la fuente más importante de proteínas de alta calidad para la nutrición humana, siendo sus características organolépticas, el valor nutricional y las condiciones higiénico-sanitarias los factores que determinan su calidad.

A razón de 20 Kg / habitante / año, constituye uno de los productos de mayor consumo para la población colombiana, del que se prevé una solicitud anual de 10.000 toneladas para exportación a US en los próximos años [21, 22]. Los mercados internacionales pactados bajo TLCs con nuestro país (US, UE, Japón, entre otros) exigen carne bovina de calidad certificada, lo que incluye aspectos como procedencia, procesos y trazabilidad. Mercados como los latinoamericanos y del Caribe son menos exigentes, pero representan precios de comercialización más bajos [23].

La carne bovina concentra entre 21-24% en proteínas, 3.1-5.0% de grasa total, carbohidratos, vitaminas y minerales necesarios para la formación de tejidos en el organismo humano [24, 25]. Esta elevada concentración y variada composición incrementa la complejidad del análisis, constituyéndose en un importante reto analítico garantizar la recuperación completa de los residuos de pesticidas organofosforados

(POPs) y organoclorados (POCs) presentes, a fin de evitar que un alimento contaminado llegue a ser consumido por la población.

Para comprender los cambios post mortem asociados a la conversión del músculo a carne, así como sus propiedades y utilidad, se debe estudiar la estructura, composición y funciones de la musculatura en el animal vivo. Existen tres tipos de músculos en el cuerpo del animal; músculo cardiaco, liso y esquelético. En este caso es de nuestro interés el estudio de la conformación del músculo esquelético.

El músculo esquelético tiene dos componentes fundamentales, que son el tejido conectivo y las fibras musculares. El tejido conectivo protege, sostiene y le da la firmeza necesaria. La capa más externa de tejido conectivo que rodea al músculo recibe el nombre de epimisium [26].

Los músculos están formados por la unión de numerosas fibras musculares que están separadas en haces o fascículos, mediante tejido conectivo en forma de septos denominado perimisium. Estos septos parten de la superficie interna del epimisium y contienen los vasos sanguíneos y nervios de mayor tamaño. Una delicada extensión de tejido conectivo, denominada endomisium, rodea cada fibra individual. Independientemente de la clasificación del tejido conectivo, su composición será la misma en todos los casos: colágeno, elastina, glucoproteínas y proteoglicanos. Además del endomisium, las fibras musculares están cubiertas por una bicapa de lipoproteínas denominada sarcolema [26, 27].

El sarcolema, es una delicada membrana que se encuentra inmediatamente debajo del endomisium. La apariencia estriada característica de la fibra es debida a la presencia de series de delgadas unidades conocidas como miofibrillas, que están embebidas en el citoplasma de las células, denominado sarcoplasma. Este último contiene además de los orgánulos celulares otras sustancias como lípidos, glucógeno, ribosomas y proteínas [26, 27].

Las miofibrillas son el elemento más notable en las miofibras esqueléticas y constituyen alrededor del 60% de la proteína de las miofibras. Una miofibrilla está compuesta de muchas unidades estructurales conocidas como sarcómeras, las cuales están organizadas de manera continua de extremo a extremo. Las proteínas de unión entre los sarcómeros forman la línea Z y por ende una sarcómera se extiende a lo largo de una miofibrilla desde una línea Z hasta la siguiente línea Z. Los sarcómeros están compuestos principalmente de filamentos delgados de actina y filamentos gruesos de miosina y representan la unidad funcional del músculo. La acción contráctil del músculo esquelético resulta de la coordinación entre la contracción y elongación de millones de sarcómeras (Figura. 4.2) [27]

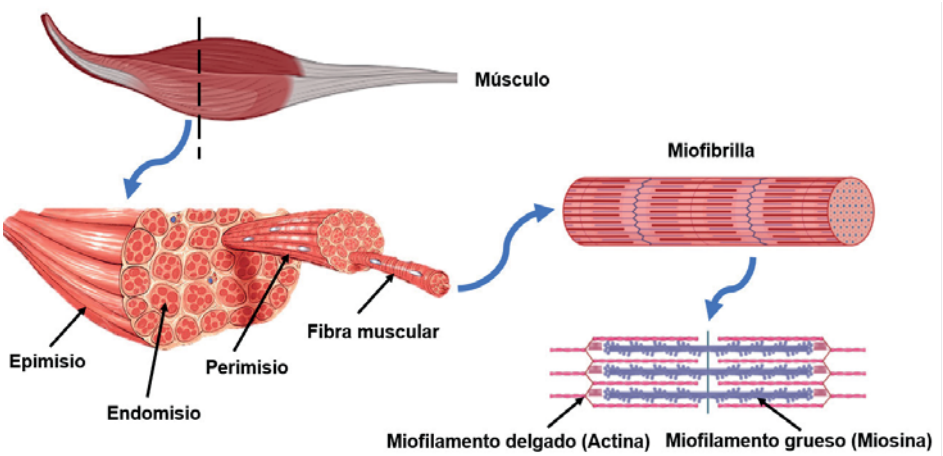


Figura 4.2 Composición del tejido esquelético de músculo de mamíferos. En la imagen se puede apreciar, la organización estructural de la proporción de mayor tamaño, a los microfilamentos.

El músculo esquelético tiene una composición de entre 71-76% de agua, 17-21% de proteínas, 1-7% de grasas y de 2.5-3% de sustancias solubles no nitrogenadas. Una de las mayores razones para el elevado consumo de carne de pollo es su alto contenido proteico, por lo que es de importancia mencionar los principales grupos de proteínas que conforman el músculo blanco o pechuga de pollo. De acuerdo con su procedencia, las proteínas

del músculo se clasifican en: Sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conectivo [26].

4.3.1 Proteínas sarcoplásmicas

En este grupo se incluyen enzimas solubles involucradas en el metabolismo anaeróbico, que juegan un papel importante en los cambios que se producen tras la muerte del animal durante su transformación en carne; por ejemplo, las proteasas y pigmentos musculares que influyen notablemente en la calidad de la carne en la fase post mortem. En general son proteínas endocelulares, solubles en agua y en soluciones salinas neutras de baja fuerza iónica [27].

Componen una masa fluida que baña a las miofibrillas y a su vez le proporcionan energía y capacidad de sintetizar proteínas, lo cual, hace posible la eliminación de ciertos productos metabólicos. Aunque estas proteínas no tienen muchas propiedades funcionales, si cabe resaltar su actividad enzimática, de almacenamiento y transporte de oxígeno [27]. Ejemplos de ellas son la mioglobina y la hemoglobina.

La mioglobina, junto con la hemoglobina proporciona el color rojo a la carne, y son responsables del transporte y almacenamiento del oxígeno en el organismo del animal. La capacidad que tiene el músculo de almacenar oxígeno depende del contenido de mioglobina. La formación de mioglobina se incrementa con la edad y cuando el esfuerzo del músculo es mayor [28].

4.3.2 Proteínas miofibrilares

Constituyen del 55 al 60 % del total de la proteína en el músculo y están muy relacionadas con el rigor mortis, la ternura y la capacidad de retención de agua de la carne. Son solubles en soluciones salinas neutras de alta fuerza iónica (⩾0,50M) [29]. De acuerdo a sus funciones fisiológicas en él, se clasifican en proteínas reguladoras, contráctiles y del citoesqueleto.

Las reguladoras son importantes en el ciclo contracción-relajación y se dividen en reguladoras mayores y menores. Dentro de las reguladoras mayores se encuentran la tropomiosina y la troponina. La primera, con un peso molecular aproximado de 38 kDa, es la segunda proteína más abundante del filamento delgado y constituye un 7 % del total de las miofibrilares, mientras que la troponina es una proteína globular con alto contenido de prolina, con un peso molecular de 80 kDa y constituye de un 8 a 10 % de las miofibrilares. Por su parte, las reguladoras menores se asocian a los filamentos de actina y miosina y por eso se ha postulado que tienen conexión con la estructura de los filamentos miofibrilares.

El grupo de proteínas miofibrilares del citoesqueleto están involucradas en el mantenimiento de la forma y función de la miofibrilla. Estas proteínas desempeñan un papel estructural en la conformación de la conformación de la miofibrilla, la célula muscular y adicionalmente proporciona elasticidad a la fibra.

Por último, las proteínas miofibrilares contráctiles son aquellas que participan del ciclo de contracción-relajación del músculo. Entre ellas se encuentran la miosina y actina. La miosina constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, por lo tanto, es la más abundante de todas las miofibrilares. Tiene un peso molecular de 500 kDa y un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.4. En la molécula de miosina se encuentran cerca de 500 restos de aminoácidos, entre ellos todos los esenciales.

La segunda proteína pero no menos importante es la actina; comprende un 20 % del total de las proteínas musculares, su peso molecular es de 42 kDa. Es el principal componente de los filamentos delgados y es rica en el aminoácido Prolina. Durante la contracción muscular in vivo se forma un complejo entre la actina y miosina llamado actomiosina, que también está presente en el rigor mortis y es el principal responsable de la rigidez que se origina en este proceso [30].

Luego de haber hablado en términos generales de la composición del músculo, miraremos las modificaciones que ocurren en la conversión de

este, a carne. Durante este proceso ocurre una serie de cambios continuos en el metabolismo de las células musculares, así como en la estructura de sus proteínas, que se producen en un período de varias horas o días luego del sacrificio del animal y que se caracterizan por una disminución del pH, agotamiento de ATP, decrecimiento de la temperatura del músculo y establecimiento de la rigidez cadavérica o rigor mortis [29].

Una vez sacrificado el animal, con la interrupción del riego sanguíneo inician los cambios post mortem. Al cesar el flujo de sangre disminuye el suministro de oxígeno al músculo, con lo que deja de funcionar la vía aerobia del metabolismo energético y se activan las vías anaerobias, principalmente la glucólisis, lo que lleva a un descenso en el pH por acumulación de ácido láctico. El valor de pH "in vivo" es cercano a la neutralidad de 7.0-7.2 pero llega a valores cercanos a 5.70 en pechuga de pollo a las 24 horas postmortem [27, 29].

El descenso en el pH inactiva las enzimas implicadas en el glucólisis con lo que disminuyen los niveles de ATP, dificultando la relajación muscular debido a un aumento de Ca+2 en el retículo sarcoplásmico. Además, el descenso en la temperatura del músculo limita la eficiencia en la bomba de Ca+2, dando como consecuencia el establecimiento de las uniones actina-miosina, iniciando así el estado de rigidez muscular o rigor mortis que caracteriza la etapa final de los cambios post mortem. Hacia las ocho horas postmortem, el rigor mortis va desapareciendo por acción de las enzimas proteolíticas, iniciando el proceso de maduración de la carne [27, 29].

4.4 Proteínas de la leche bovina

La leche bovina y sus derivados culturalmente son componentes muy importantes de la dieta humana a nivel mundial. Según los datos reportados por la OMS / FAO, más de seis mil millones de personas consumen leche y sus derivados, la mayoría de estos en países desarrollados [31]. Su composición química compleja determina el valor nutricional y las propiedades tecnológicas asociadas, las cuales se deben en mayor proporción a las proteínas que la constituyen [32].

La leche es una mezcla compleja de proteínas, lípidos, glúcidos, minerales, vitaminas y otros componentes menores dispersos, suspendidos o disueltos en agua [33]. La leche bovina es considerada como una fuente importante de proteínas para la dieta humana, ya que proporciona aproximadamente 32 g por cada litro. Las proteínas lácteas se consideran con frecuencia la mejor fuente de proteína animal, gracias a su alto contenido de aminoácidos esenciales [34].

Estas se clasifican en dos grandes grupos, constituidos por las caseínas (CAS) y proteínas del lactosuero (PLs) en función de su solubilidad en agua. En este sentido, las CAS hacen parte de la fracción insoluble y representan el 80% del contenido total de proteínas lácteas (aproximadamente 2.7 g por cada 100 g de leche), mientras que el otro 20% corresponde a las PLs, constituyentes de la fracción soluble (aproximadamente 0.6 g por cada 100 g de leche) [35, 36]. La Tabla 4.3 describe las concentraciones y funciones principales de las proteínas lácteas.

Tabla 4.3 Concentraciones y funciones biológicas de las principales fracciones proteicas de la leche bovina.

Proteínas lácteas		**Concentración ($g \cdot L^{-1}$)**	**Función**
Caseínas	α-Caseína	13.0	Almacenamiento y transporte de minerales (Ca^{+2}, $PO4^{-3}$, Fe^{+2}, Zn^{+2}, Cu^{+2}).
	β-Caseína	9.3	
	κ-Caseína	3.3	
Lactosuero	β-Lactoglobulina	3.2	Unión a ácidos grasos y el retinol
	α-Lactoalbúmina	1.2	Transporte de Ca^{+2} y producción de lactosa
	Inmunoglobulinas	0.7	Protección inmunológica
	Albumina sérica	0.4	Transporte de fármacos y xenobióticos
	Lactoferrina	0.1	Efecto antimicrobiano en sinergia con las inmunoglobulinas
	Lactoperoxidasa	0.03	
	Lisozima	0.0004	

Fuente: La tabla fue construida por los autores basados en la información reportada por *Pereira (2014)* [34].

Ambos grupos de proteínas se clasifican como de alta calidad, teniendo en cuenta los requisitos de aminoácidos humanos, la digestibilidad y la biodisponibilidad. De acuerdo con Pereira (2014), el perfil de aminoácidos es bastante diferente entre las dos fracciones, en las PLs el suero es especialmente rico en aminoácidos de cadena ramificada, es decir, leucina, isoleucina y valina, así como lisina; mientras que las CAS tiene una mayor proporción de histidina, metionina y fenilalanina [34]. A continuación, se describen las características de ambos grupos proteicos.

4.4.1 Caseínas

Las CAS son proteínas pleiotrópicas, cuya función original es la biomineralización de la glándula mamaria a través de la absorción de calcio mediante la interacción de este ion con los aminoácidos fosforilados presentes en las estructuras de las CAS. Por otro lado, la función mejor conocida de estas biomoléculas es servir como proteínas nutricionales de la dieta humana. Las CAS como ya se había mencionado son proteínas insolubles, las cuales se encuentran suspendidas en el seno de la leche bovina debido a un estrecho equilibro dinámico de suspensión - precipitación [37, 38].

Las CAS se consideran proteínas intrínsecamente no estructuradas, es decir sin estructuras secundarias específicas [38, 39], a pesar de la abundancia de estudios encaminados a su elucidación, a la fecha, no existe una teoría unificada acerca de esta, sin embargo, lo que sí está claro, es que todas las CAS se encuentran íntimamente relacionadas en la leche como partículas coloidales heterogéneas asociadas al fosfato de calcio, dichos coloides se denominan micelas de CAS [39].

Las micelas de CAS son estructuras sólidas y esponjosas dispersas en un medio acuoso, donde alcanzan un diámetro promedio de 160 nm, un peso molecular de 105 kDa y un punto isoeléctrico de 4.6 [35]. La función principal de las micelas es fluidificar las moléculas de CAS y solubilizar el fosfato de calcio. Mediante ensayos proteómicos que combinan

estudios cromatográficos, electroforéticos y de espectrometría de masas, se ha demostrado que la fracción proteica de las micelas representa aproximadamente el 93% de su masa seca, y está compuesta por cuatro componentes individuales, denominados αs1-, αs2-, β- y κ-caseína en una relación molar aproximada de 4:1:4:1 [35].

A estos cuatro tipos de CAS se les puede añadir varios grupos de proteínas minoritarias como la γ-caseína, que es un fragmento procedente de la proteólisis de la β-caseína. El resto de los sólidos micelares consiste en material inorgánico, denominado como fosfato cálcico coloidal o fosfato cálcico micelar. La mayoría de los modelos estructurales publicados indican que la κ-caseína se halla localizada mayoritariamente en la superficie de la micela, jugando un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento de la suspensión de las caseínas en la leche (Figura 4.3) [37, 39, 40].

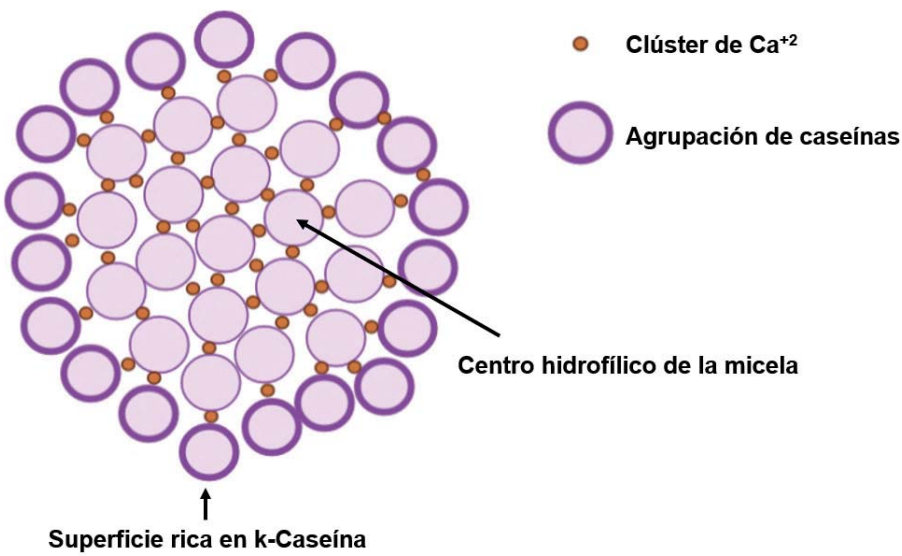


Figura 4.3 Representaciones del modelo de micelas de caseína propuesto por Schmidt [40].

Las CAS también son proteínas reomórficas ácidas, es decir no mantienen una estructura plegada estable, con puntos isoeléctricos en el intervalo

de 4.9-5.6 y peso molecular entre 19 y 24, las cuales presentan un alto contenido de residuos de fosfoserina y prolina y un número pobre de residuos de aminoácidos azufrados y precipitan al acidificar la leche hasta un pH de 4.6. El proceso de formación de las micelas de CAS consiste en la unión de las cuatro CAS por interacciones hidrofóbicas y especialmente por nanoclusters de fosfato de calcio (Figura.4.3). Una vez formada la micela es térmicamente estable, solo se agrega a temperaturas superiores a 140°C en pH normal de la leche y ambiente iónico. Sin embargo, son muy sensibles a los agentes quelantes, que pueden inducir su interrupción. La industria alimentaria emplea las CAS como ingredientes de productos alimenticios para mejorar su viscosidad y estabilizad y para mejorar las propiedades nutricionales de estos productos [36].

4.4.2 Proteínas del lactosuero

El lactosuero se define como un producto obtenido de la separación de la grasa y las CAS de la leche, mediante la acción de sustancias de carácter ácido o de enzimas digestivas como la renina, los cuales rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones, una sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles y lípidos ocluidos (CAS) y una fracción líquida, correspondiente al lactosuero en sí, en cuyo interior se encuentran solubilizados proteínas y demás componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la CAS [41].

La β-lactoglobulina (β-Lg) y la α-lactoalbúmina (α-La) son las principales proteínas del suero bovino, representan alrededor del 50% y el 20% de su contenido total de proteínas, respectivamente (Tabla 4.3) [36]. La β-Lactoglobulina es una pequeña proteína globular presente en la leche de muchos mamíferos excepto en la leche humana, de roedores o lagomorfos. Esta proteína contiene162 residuos de aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 18.3 kDa. Su punto isoeléctrico varía entre 5.1 y 5.2, y a pH neutro aparece principalmente como un dímero no covalente, pertenece a la familia de las lipocalinas, dada su capacidad para unirse y transportar pequeñas moléculas hidrófobas,

principalmente especies relacionadas con el ácido retinoico (vitamina A) en una cavidad lipofílica [42].

Por otro lado, la α-Lactoalbúmina también es una proteína globular producida por las células epiteliales de la glándula mamaria, en donde se combina con la enzima β-1,4-galactosiltransferasa para formar lactosa sintasa, un complejo enzimático que cataliza la transferencia de la galactosa a la glucosa, para formar lactosa, el principal carbohidrato en la leche [43]. Esta proteína tiene un peso molecular de 14.2 kDa, 123 residuos de aminoácidos y un punto isoeléctrico entre 4.3 y 4.7, es una metaloproteína con un sitio de alta afinidad para la fijación de calcio [36]. Las proteínas de suero bovino son usadas ampliamente en varios alimentos, primero gracias a su valor nutricional y funcional y segundo, a sus propiedades gelificantes y emulsificantes [42]. Los geles de proteína de lactosuero pueden ser usados como agentes retenedores de agua y grasa en el alimento, así como agentes promotores de espuma [44].

4.5 Carbonilación de proteínas

La carbonilación es una modificación postraduccional oxidativa, irreversible y no enzimática de las proteínas, que se caracteriza por la aparición de grupos carbonilos (C=O) reactivos en la cadena lateral de los residuos de aminoácidos. Dicha modificación está normalmente asociada con la pérdida permanente de la función y puede producir eliminación o acumulación de las proteínas dañadas.

Los grupos carbonilo pueden ser introducidos en las proteínas en diferentes sitios y por medio de diferentes mecanismos. Químicamente, este tipo de oxidación se lleva a cabo por tres rutas principales:

- *Oxidación directa por reacción con EROs*. Este tipo de modificaciones se producen habitualmente por el ataque del radical hidroxilo (·OH), que puede ser originado por radiación ionizante o por la reacción de

cationes metálicos con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2, reacción de Fenton). Los productos de la oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α-aminoadípico a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. Recientemente se demostró que los productos carbonilados que representan cuantitativamente la mayor parte de una medición de carbonilación son el semialdehído glutámico y en menor grado, el semialdehído α-aminoadípico (Figura 4.4)[45].

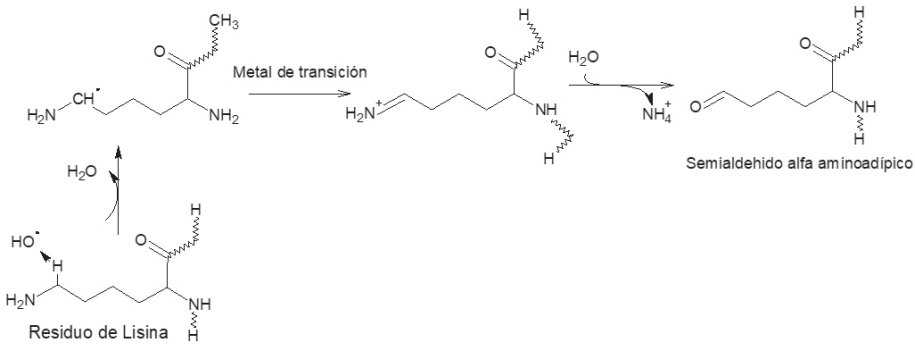


Figura 4.4 Ruta de carbonilación directa de proteínas causada por metales de transición. El esquema muestra la formación de semialdehído α-aminoadípico a partir de la oxidación de la cadena lateral del aminoácido lisina en presencia metales de transición.

- *Reacción indirecta con productos finales de la oxidación de azúcares y lípidos.* Los grupos carbonilo reactivos pueden ser generados por reacciones del grupo amino de los residuos de lisina, arginina e histidina con productos finales de la oxidación de lípidos y azúcares (Figura 4.5) [45, 46]. Dentro de esta ruta se forman productos de adición como los aductos de Michel; así por ejemplo, el grupo amino de los aminoácidos básicos puede reaccionar con aldehídos como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) proveniente de derivados de la peroxidación de los lípidos [47]. Otros derivados como el malondialdehído (MDA) y la acroleína también se describen con frecuencia en la oxidación de proteínas alimentarias de origen animal [48].

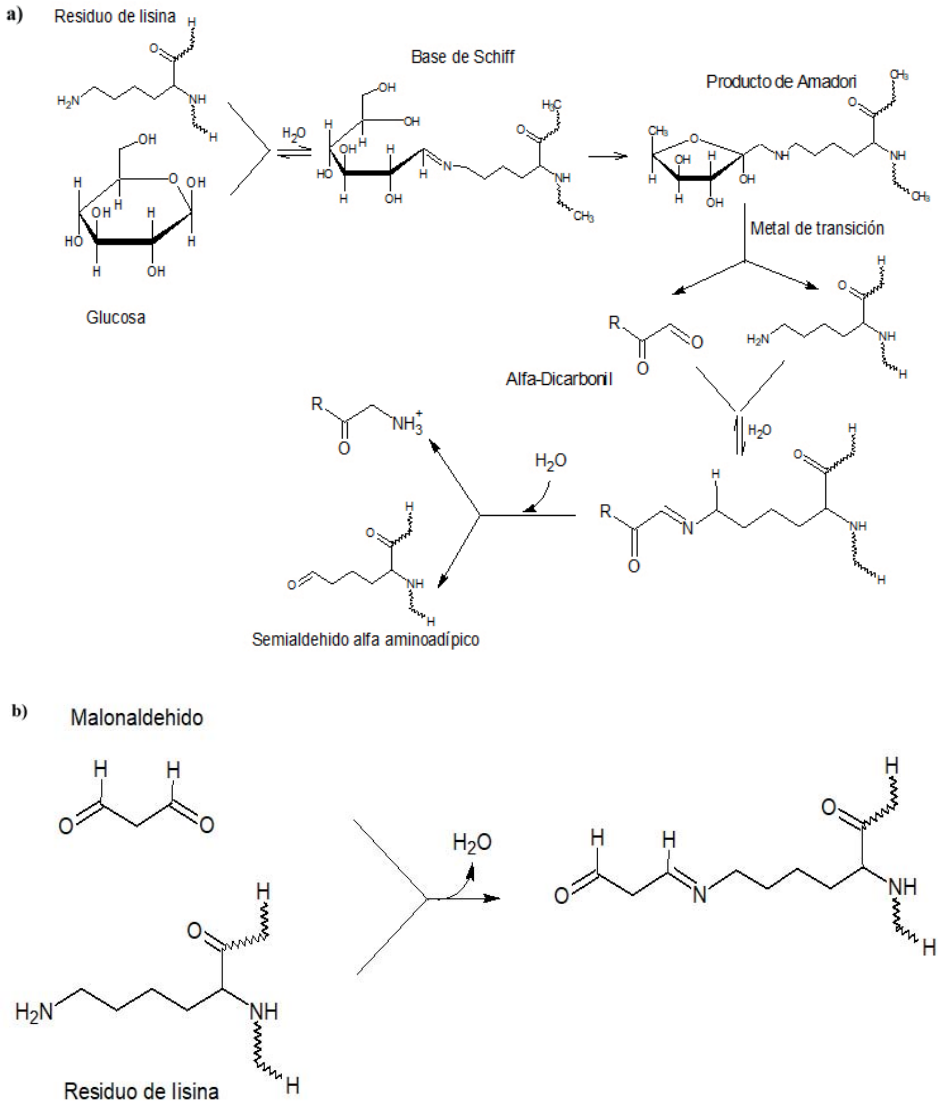


Figura 4.5 Rutas de carbonilación indirecta de proteínas. El esquema muestra la formación de productos de adición a partir de la oxidación de la cadena lateral del aminoácido lisina con a) Azúcares y b) Lípidos.

- *Ruptura de la cadena polipeptídica.* En este caso, la carbonilación se da por medio de la ruta de α-amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en

los cuales el amino-N-terminal está bloqueado por un derivado α-cetoacilo (Figura 4.6). En esta ruta, mediante radiación ionizante se produce la radiólisis del agua y se generan radicales hidroxilo que al reaccionar con los hidrógenos de los carbonos ∝ de la estructura central de las proteínas, forman nuevos radicales en carbonos relativamente estables (por deslocalización con los electrones en las funciones amida adyacentes) [45].

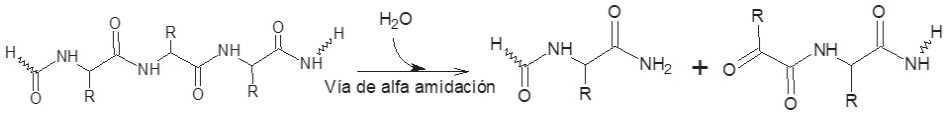


Figura 4.6 Ruta de carbonilación de proteínas mediante ruptura del esqueleto carbonado.

Dentro de las consecuencias de la carbonilación proteica se ha descrito una disminución de la solubilidad, aumento de la agregación y pérdida de la digestibilidad, lo cual repercute en las propiedades tecnológicas, sensoriales, funcionales y nutricionales de alimentos como la carne y la leche [3, 49-51].

Además, se ha descrito un aumento fisiológico de los niveles de proteínas carboniladas en diversos trastornos humanos, como la enfermedad de Alzheimer, insuficiencia renal crónica y diabetes colitis ulcerosa [52, 53]. Asimismo, se consideran factores de riesgo de cáncer de colon por sus efectos en la microbiota intestinal [4, 51], y en algunos casos particulares se ha planteado que también podrían incitar la aparición de reacciones alergénicas mediante la formación de nuevos epítopos o por el contrario prevenir la respuesta alérgica mediante su enmascaramiento [50].

4.5.1 Métodos de cuantificación de proteínas carboniladas

Diversos ensayos de laboratorio han sido desarrollados para la determinación de proteínas carboniladas durante los últimos treinta años. El método más utilizado consiste en la marcación o derivatización de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), seguido de su

detección por métodos espectrofotométricos, fluorimétricos o con anticuerpos específicos en diferentes formatos de inmuno-ensayos.

La cuantificación mediante ensayos espectrofotométricos fue propuesta por Levine y se fundamenta en la capacidad que tiene la sonda de DNPH para reaccionar con los grupos carbonilos y formar un aducto (hidrazona) que presenta un máximo de absorbancia a los 370 nm [54]. El método se caracteriza por ser simple y económico frente a los otros ensayos. Dentro de las ventajas de este ensayo están su facilidad de implementación en términos de accesibilidad y bajo costo. Sin embargo, es muy laborioso y requiere de mucho tiempo para el procesamiento de la muestra, puesto que se debe realizar la precipitación de las proteínas, lavado de muestras con una mezcla de disolvente orgánico (tres veces), y resuspensión de la proteína marcada. Un procesamiento deficiente de la muestra en alguno de estos pasos puede conducir a la sobreestimación de los niveles de carbonilos, como, por ejemplo, cuando la etapa de lavado es deficiente y queda junto con la muestra DNPH libre que también absorbe a 370 nm. Por el contrario, la resuspensión de la proteína marcada puede ser parcial y conducir a la pérdida de muestra, situación que podría conducir a una subestimación de los niveles de carbonilos y obligaría a la inclusión de un nuevo paso de cuantificación de proteínas [55, 56].

Más recientemente, otros investigadores han introducido modificaciones al método original de Levine, que elimina la interferencia del DNPH libre, reduce significativamente el tiempo de procesamiento de la muestra al eliminarse las etapas de precipitación, lavado y resuspensión. Este método es conocido como método alcalino del DNPH, porque la hidrazona se forma en medio básico y genera un desplazamiento en la longitud de onda de máxima absorción de 370 nm hasta 450 nm. Sin embargo, dada la inestabilidad de la dinitrofenilhidrazona en medio alcalino el tiempo de incubación de las muestras luego de la alcalinización con NaOH debe ser controlado rigurosamente [55].

La cuantificación mediante inmunoensayos implica la inmovilización sobre membranas de las proteínas derivatizadas y la utilización de

anticuerpos específicos. Dentro de los diferentes soportes sólidos en los que se puede inmovilizar la proteína se encuentran las membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) y nitrocelulosa (NC). Dependiendo del método de inmovilización utilizado, entonces el ensayo puede ser de Dot-blot o Western-blot [56]. Un tercer soporte sólido, lo constituyen las placas multipocillos utilizados en los ensayos Elisa; sin embargo, su implementación no ofrece mayores ventajas sobre los métodos con membranas y por el contrario requiere de mayores tiempos de análisis [57, 58]. Por estas razones, solo haremos referencia de manera sucinta a los ensayos de Dot-blot y Western-blot.

En el ensayo de Dot-blot, la muestra de proteína es cuantificada, marcada con sonda de DNPH y una alícuota de esta es aplicada directamente en forma de una pequeña gota la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'dot' (es el caso del 'Dot-blot'). Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión con bomba de vacío que facilita la penetración de la solución, y reciben los nombres de 'Dot-blot' o 'Slot-blot' en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea. La visualización de las manchas de proteínas se realiza con ayuda de anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen de manera selectiva a la sonda de DNPH. Cuando en el procedimiento se incluye un segundo anticuerpo que reconoce al primero, el método gana en sensibilidad y diversidad en la forma de visualización de las manchas de proteínas. En el caso de anticuerpos secundarios modificados con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés Horseradish peroxidase) es posible la detección de la señal quimioluminiscente de las proteínas carboniladas a partir de unos pocos nanogramos. Adicionalmente, es importante resaltar que la siembra directa de la muestra de proteína en la membrana permite que la técnica resulte útil para ensayos cuantitativos [56, 59-62].

Finalmente, el Dot-blot se destaca también por su formato simple y rápido, que permite el estudio de varias muestras en simultáneo, puede

realizarse con sondas marcadas con haptenos o radioactivamente y es un método económico en comparación a otras técnicas de hibridación [59-62].

Por su parte, el Western-blot, también llamado inmunoblot, es una técnica utilizada para identificar una proteína o grupo de proteínas de otras presentes en una muestra compleja. Para ello, las proteínas de la muestra se someten primero a un proceso de separación mediante electroforesis en gel. El SDS-PAGE es el método más ampliamente utilizado para esta etapa de separación, que se realiza en función del peso molecular de las proteínas presentes en la mezcla. Luego de la separación, las proteínas son transferidas del gel a una membrana de NC o PVDF, principalmente.

Este paso resulta limitante porque la eficiencia de la transferencia se puede ver afectada por diversos factores, intrínsecos y extrínsecos para cada tipo de muestra. De ahí que la técnica solo se considera en términos generales como una prueba semicuantitativa. Luego de transferidas a las membranas, estas son procesadas de manera similar a lo descrito arriba para el ensayo de Dot-blot, es decir, se utilizan anticuerpos específicos para detectar las proteínas de interés. A diferencia del Dot-blot, el resultado del Western-blot aporta información sobre el peso molecular de la proteína detectada y permite calcular su cantidad relativa en la muestra. Entre sus ventajas también se encuentra una alta sensibilidad debido a su capacidad para detectar tan poco como 0.1 nanogramos de proteína en una muestra y su especificidad. Esta última, también se ve favorecida por el proceso de electroforesis que puede separar las proteínas en función de su tamaño y/o carga [46, 57, 63].

4.6 Referencias

1. Bevilacqua, M., et al., *Recent chemometrics advances for foodomics.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **96**: p. 42-51.
2. Ferranti, P., *The future of analytical chemistry in foodomics.* Current Opinion in Food Science, 2018. **22**: p. 102-108.

3. Estévez, M., *Protein carbonyls in meat systems: a review.* Meat Sci, 2011. **89**(3): p. 259-79.

4. Estévez, M., et al., *Health Risks of Food Oxidation.* Adv Food Nutr Res, 2017. **82**: p. 45-81.

5. Kuhlman, B. and P. Bradley, *Advances in protein structure prediction and design.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(11): p. 681-697.

6. Ur Rehman, H., et al., *A three-way approach for protein function classification.* PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0171702.

7. Joye, I., *Protein Digestibility of Cereal Products.* Foods, 2019. **8**(6).

8. Anitha, S., M. Govindaraj, and J. Kane-Potaka, *Balanced amino acid and higher micronutrients in millets complements legumes for improved human dietary nutrition.* Cereal Chemistry, 2020. **97**(1): p. 74-84.

9. Wolfe, R.R., *Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality?* J Int Soc Sports Nutr, 2017. **14**: p. 30.

10. Lonnie, M., et al., *Protein for Life: Review of Optimal Protein Intake, Sustainable Dietary Sources and the Effect on Appetite in Ageing Adults.* Nutrients, 2018. **10**(3).

11. Bringas Vega, M.L., et al., *An Age-Adjusted EEG Source Classifier Accurately Detects School-Aged Barbadian Children That Had Protein Energy Malnutrition in the First Year of Life.* Front Neurosci, 2019. **13**: p. 1222.

12. Bhutta, Z.A. and K. Sadiq, *Protein Deficiency*, in *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*, B. Caballero, Editor. 2013, Academic Press: Waltham. p. 111-115.

13. Elmadfa, I. and A.L. Meyer, *Animal Proteins as Important Contributors to a Healthy Human Diet.* Annual Review of Animal Biosciences, 2017. **5**(1): p. 111-131.

14. Lonnie, M., et al., *Protein for Life: Review of Optimal Protein Intake, Sustainable Dietary Sources and the Effect on Appetite in Ageing Adults.* Nutrients, 2018. **10**(3): p. 360.

15. Sousa, R., et al., *Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model.* Food Res Int, 2020. **130**: p. 108996.

16. Henchion, M., et al., *Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium*. Foods, 2017. **6**(7).

17. Cappellozza, S., et al., *A First Attempt to Produce Proteins from Insects by Means of a Circular Economy*. Animals (Basel), 2019. **9**(5).

18. Agostinho, F., et al., *Emergy accounting as a support for a strategic planning towards a regional sustainable milk production*. Agricultural Systems, 2019. **176**: p. 102647.

19. Passetti, R.A.C., et al., *Intensive dairy farming systems from Holland and Brazil: SWOT analyse comparison*. Acta Scientiarum. Animal Sciences, 2016. **38**: p. 439-446.

20. Flachowsky, G., U. Meyer, and K.H. Sudekum, *Land Use for Edible Protein of Animal Origin-A Review*. Animals (Basel), 2017. **7**(3).

21. Bianchi, F., et al., *Interventions targeting conscious determinants of human behaviour to reduce the demand for meat: a systematic review with qualitative comparative analysis*. International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity, 2018. **15**(1): p. 102.

22. Blanco-Murcia, L.a.R.-M., M, *Sustainable Diets and Meat Consumption Reduction in Emerging Economies: Evidence from Colombia*. Sustainability 2019. **11**(23): p. 6595.

23. Richani, N., *The agrarian rentier political economy: Land concentration and food insecurity in Colombia*. Latin American Research Review, 2012. **47**(2): p. 51-78.

24. Lenighan, Y.M., et al., *A modelling approach to investigate the impact of consumption of three different beef compositions on human dietary fat intakes*. Public Health Nutr, 2019: p. 1-11.

25. Jung, E.-Y., Y.-H. Hwang, and S.-T. Joo, *The Relationship between Chemical Compositions, Meat Quality, and Palatability of the 10 Primal Cuts from Hanwoo Steer*. Korean journal for food science of animal resources, 2016. **36**(2): p. 145-151.

26. Astruc, T., *Connective tissue: structure, function, and influence on meat quality*, in Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition), M.

Dikeman and C. Devine, Editors. 2014, Academic Press: Oxford. p. 321-328.

27. Velleman, S.G. and D.C. McFarland, *Chapter 16 - Skeletal Muscle*, in *Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition)*, C.G. Scanes, Editor. 2015, Academic Press: San Diego. p. 379-402.
28. Everse, J., *Heme Proteins*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, W.J. Lennarz and M.D. Lane, Editors. 2013, Academic Press: Waltham. p. 532-538.
29. Huff-Lonergan, E., *Tenderizing Mechanisms | Enzymatic*, in *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*, M. Dikeman and C. Devine, Editors. 2014, Academic Press: Oxford. p. 438-442.
30. Hamill, R. and C. Botineştean, *Meat: Structure*, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 701-710.
31. Rodríguez, M., et al., *Improvements in the conception rate, milk composition and embryo quality of rabbit does after dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids.* animal, 2018. **12**(10): p. 2080-2088.
32. Roncada, P., et al., *Farm animal milk proteomics.* J Proteomics, 2012. **75**(14): p. 4259-74.
33. Hamad, M.N.E. and A.A. Baiomy, *Physical properties and chemical composition of cow's and buffalo's milk in qena governorate.* Journal of Food and Dairy Sciences, 2010. **1**(7): p. 397-403.
34. Pereira, P.C., *Milk nutritional composition and its role in human health.* Nutrition, 2014. **30**(6): p. 619-27.
35. Atamer, Z., et al., *Bovine β-casein: Isolation, properties and functionality. A review.* International Dairy Journal, 2017. **66**: p. 115-125.
36. Silva, D.A., et al., *Chemical and fatty acid composition of milk from crossbred cows subjected to feed restriction.* Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2019. **54**.
37. Wusigale, L. Liang, and Y. Luo, *Casein and pectin: Structures, interactions, and applications.* Trends in Food Science & Technology, 2020. **97**: p. 391-403.

38. Holt, C., *Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species.* International Dairy Journal, 2016. **60**: p. 2-13.

39. de Kruif, C.G., et al., *Casein micelles and their internal structure.* Advances in Colloid and Interface Science, 2012. **171-172**: p. 36-52.

40. Ferrandini, E., et al., *Modelos estructurales de la micela de caseína.* Anales de Veterinaria de Murcia, 2008. **22**(0).

41. Poveda E, E., *Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad.* Revista chilena de nutrición, 2013. **40**: p. 397-403.

42. Corrochano, A.R., et al., *Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways.* Journal of Dairy Science, 2018. **101**(6): p. 4747-4761.

43. Brew, K., *Milk Proteins | α-Lactalbumin*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, J.W. Fuquay, Editor. 2011, Academic Press: San Diego. p. 780-786.

44. Adolfo, P.H.y.R., *Lactosuero : importancia en la industria de alimentos.* Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, 2009. **62**(1): p. 4967-4982.

45. Bachi, A., I. Dalle-Donne, and A. Scaloni, *Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises.* Chem Rev, 2013. **113**(1): p. 596-698.

46. Rogowska-Wrzesinska, A., et al., *Analysis of protein carbonylation — pitfalls and promise in commonly used methods.* Free Radical Research, 2014. **48**(10): p. 1145-1162.

47. Alviz-Amador, A., et al., *Effect of 4-HNE Modification on ZU5-ANK Domain and the Formation of Their Complex with beta-Spectrin: A Molecular Dynamics Simulation Study.* J Chem Inf Model, 2020. **60**(2): p. 805-820.

48. Fritz, K.S. and D.R. Petersen, *Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation.* Chem Res Toxicol, 2011. **24**(9): p. 1411-9.

49. Fenaille, F., et al., *Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions.* , 2005. **5**(12): p. 3097-3104.

50. Milkovska-Stamenova, S., R. Mnatsakanyan, and R. Hoffmann, *Protein carbonylation sites in bovine raw milk and processed milk products.* Food Chem, 2017. **229**: p. 417-424.

51. Soladoye, O.P., et al., *Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015. **14**(2): p. 106-122.

52. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.* Clinica Chimica Acta, 2003. **329**(1): p. 23-38.

53. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.* Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2006. **10**(2): p. 389-406.

54. Levine, R.L., et al., *[37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins*, in *Methods in Enzymology*. 1994, Academic Press. p. 346-357.

55. Mesquita, C.S., et al., *Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins.* Anal Biochem, 2014. **458**: p. 69-71.

56. Wehr, N.B. and R.L. Levine, *Quantification of Protein Carbonylation*, in *Cell Senescence: Methods and Protocols*, L. Galluzzi, et al., Editors. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 265-281.

57. Alomari, E.a., et al., *Protein carbonylation detection methods: A comparison.* Data in Brief, 2018. **19**: p. 2215-2220.

58. Uehara, H. and V.A. Rao, *Metal-Mediated Protein Oxidation: Applications of a Modified ELISA-Based Carbonyl Detection Assay for Complex Proteins.* Pharmaceutical Research, 2015. **32**(2): p. 691-701.

59. Márquez-Lázaro, J.P., et al., *In vitro oxidation promoted by chlorpyrifos residues on myosin and chicken breast proteins.* Food Chem, 2020. **326**: p. 126922.

60. Márquez-Lázaro, J., D. Mendez-Cuadro, and E. Rodriguez-Cavallo, *Residues of Fluoroquinolone Antibiotics Induce Carbonylation and Reduce In vitro Digestion of Sarcoplasmic and Myofibrillar Beef Proteins.* Foods, 2020. **9**(2).

61. Salas-Moreno, M., et al., *Protein Carbonylation As a Biomarker of Heavy Metal, Cd and Pb, Damage in Paspalum fasciculatum Willd. ex Flugge*. Plants (Basel), 2019. **8**(11).
62. Diaz-Castillo, A., et al., *Sickle Cell Trait Induces Oxidative Damage on Plasmodium falciparum Proteome at Erythrocyte Stages*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
63. Rodríguez-Cavallo, E., et al., *Protein carbonylation is a mediator in larvicidal mechanisms of Tabernaemontana cymosa ethanolic extract.* Journal of King Saud University - Science, 2019. **31**(4): p. 464-471.

Capítulo 5
Residuos de plaguicidas promueven la carbonilación de proteínas en carne de pollo

Albeiro Marrugo Padilla
Johana Márquez Lázaro
Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

5.1 Introducción

Con el continuo crecimiento de la población mundial, los sistemas de producción alimentarios en especial los de origen animal como aves y ganado, han recurrido al uso de modelos de cría intensiva, a fin de suplir la demanda de estos productos. Bajo este sistema, los animales son confinados en áreas reducidas para promover su engorde y rápido crecimiento [1]. Sin embargo, estas condiciones favorecen la colonización de plagas en los animales, las cuales generan enfermedades que repercuten en la productividad y promueven el uso de insecticidas tipo organoclorados y/o organofosforados para su control y erradicación [2].

No obstante, el empleo continuo e irracional de estas sustancias puede conllevar a la aparición de sus residuos en productos como la carne de pollo representando un riesgo para la salud del consumidor frecuente, debido a la alta toxicidad de estas sustancias [3]. Por ello, se hace necesario contar con metodologías analíticas que permitan monitorizar la presencia de residuos de estos contaminantes en matrices alimentarias, como un mecanismo de control de calidad, en aras de garantizar la inocuidad del alimento como ya describimos en los capítulos anteriores. Sin embargo, la monitorización de los contaminantes debe ser complementada con la evaluación de los efectos que tiene la presencia de residuos químicos sobre los principales componentes nutricionales de los alimentos antes mencionados, aún a concentraciones establecidas legalmente como seguras.

En particular, el estudio de los efectos de los plaguicidas sobre las proteínas concentra la atención de buena parte de la comunidad científica porque estas macromoléculas son definitorias de muchas de las propiedades tecno-funcionales y valor nutricional de los productos cárnicos [1]. Así, por ejemplo, la oxidación de las proteínas es una de las alteraciones más evaluadas en matrices alimentarias, ya que esta puede repercutir en su valor nutricional y propiedades organolépticas [1].

Bajo este contexto, consideramos en este capítulo la capacidad que poseen los insecticidas POCs y POPs de promover estrés oxidativo en sistemas biológicos, aún a niveles traza de contaminación. En particular, presentaremos los resultados obtenidos en ensayos de laboratorio dirigidos a demostrar que la presencia de residuos de DDT, CPF y DZN induce un daño oxidativo irreversible en proteínas musculares de la carne de pollo a niveles de concentración próximos a sus valores de límites máximos de residuos (LMRs). Para esto, muestras homogenizadas de pechuga de pollo se contaminaron de forma individual con CPF, DZN y DDT, a cuatro valores de concentración. Posteriormente, las muestras se incubaron en oscuridad por una hora, seguido de la extracción de proteínas y su cuantificación por método de Bradford. La carbonilación proteica se cuantificó por método alcalino de 2,4-DNPH. Adicionalmente se evaluó el efecto de la contaminación de las muestras y el almacenamiento a -20°C por un intervalo de 15 días.

Los resultados obtenidos se detallan para cada plaguicida a los diferentes niveles de contaminación y demuestran que el modelo experimental utilizado resulta útil para la medición del daño oxidativo causado por estas sustancias.

5.2 Metodología

5.2.1 Reactivos y materiales

- Metanol grado analítico, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido de sodio, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de sodio grado biotecnológico, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de potasio, Merck (Darmstadt, Alemania)
- 2- mercaptoetanol, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Coomassie blue brillant G250, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Ácido tricloroacético, Merck (Darmstadt, Alemania)
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina, PanReac AppliChem (Barcelona, España)
- Fosfato de potasio 1.5 hidratado, PanReac AppliChem (Barcelona, España)
- Azida de sodio, PanReac AppliChem (Barcelona, España)

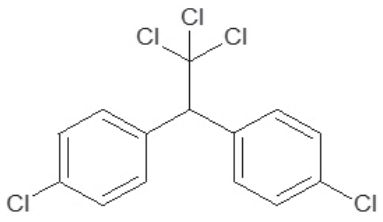
- Ácido clorhídrico, PanReac AppliChem (Barcelona, España)
- Dodecil sulfato de sodio grado proteómico, Amresco® (Fountain Pkwy, USA)
- Tris base grado biología molecular, Amresco® (Fountain Pkwy, USA)
- Glicerol grado proteómico, Amresco® (Fountain Pkwy, USA)
- Ácido ortofosfórico grado cromatográfico, Scharlab (Barcelona, España)
- DDT, Sigma Aldrich® (San Luis, USA)
- Diazinón, Sigma Aldrich® (San Luis, USA
- Clorpirifós, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Ausburg, Alemania)

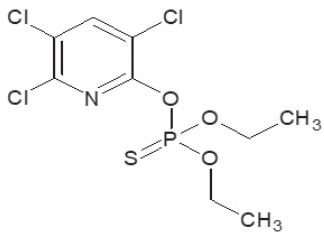
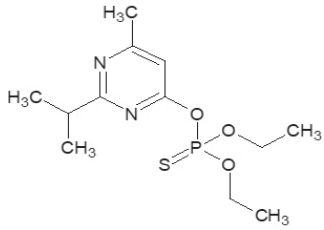
En la Tabla 5.1 se muestra la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas a utilizar en este estudio.

5.2.2 Equipos

Los equipos empleados en el desarrollo de la investigación fueron:
- Balanza de precisión (BJ 1000C),
- Balanza semimicro (ES 225-SM-DR, Precisa),
- Shaker (FinePCR, Korea),
- Potenciómetro (Thomson,)
- Vortex (Clasic Vortex mixer, VELP Scientífica, USA)
- Procesador de alimentos (Cusinart, China)
- Lector de microplacas (Labtech, Inglaterra)
- Centrífuga refrigerada (Labtechnologies, Alemania).

Tabla 5.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas evaluados.

Plaguicida	Propiedades
 **DDT** *1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano*	PM: 354.486 g/mol Log Kow = 6.91 Prohibido su uso Resistente a la destrucción por la luz y la oxidación Solubilidad: Grasa, acetona, éter, benceno, tetracloruro de carbono, dioxano y piridina. Insoluble en ácidos diluidos y agua

 ***CLORPIRIFÓS*** *O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato*	PM: 350.586 g/mol Log Kow = 4.96 Uso: Insecticida -acaricida Solubilidad: Acetona, benceno, tetracloruro de carbono, metanol, tricloroetano. Insoluble en agua
 ***DIAZINÓN*** *O,O-Dietil O-[4-metil-6-(propan-2-il) pirimidina-2-il]-fosforotioato*	PM: 304.34 g/mol Log Kow = 3.81 Uso: Moscas y garrapatas en la práctica veterinaria. Solubilidad: Benceno, tolueno, hexano, ciclohexano, alcholes. Insoluble en agua. Sensible a la oxidación por encima de 100 °C

Fuente: Tomado de la base de datos Pubchem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ [4]

5.2.3 Soluciones de trabajo

Soluciones patrón de plaguicidas. Se prepararon disoluciones acuosas de DZN (0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 µg·mL-1), CPF (0.125, 0.25, 0.375 y 0.5 µg·mL-1) y DDT (2.5, 5.0, 7.5 y 10 µg·mL-1) a partir de diluciones seriadas de las soluciones stock de100µg·mL-1. Los solventes empleados para la preparación de las soluciones stock fueron metanol para el caso de CPF y DZN y acetonitrilo para el DDT. Una vez preparadas las soluciones fueron almacenadas a 4°C en oscuridad hasta su uso, por un período no superior a un mes (Figura 5.1).

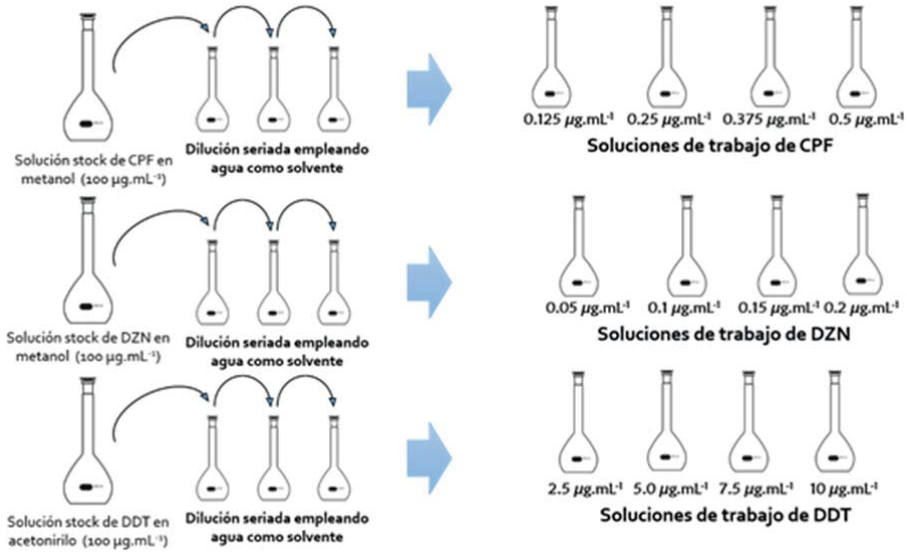


Figura 5.1 Esquema que ilustra la preparación de las soluciones de trabajo de los plaguicidas Clorpirifós (CPF), Diazinón (DZN) y DDT, empleadas para la contaminación de las muestras. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas del siguiente link: https://commons. wikimedia.org/wiki/ File:Volumetric_flask.svg.

Soluciones para la extracción de proteínas. Para la extracción de proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares e insolubles de la pechuga de pollo, se emplearon los tres tipos de soluciones descritas a continuación. Estas fueron utilizadas de manera secuencial para la obtención de las diferentes fracciones proteicas musculares, así:

Solución amortiguadora de baja fuerza iónica (SBFI). Esta solución fue preparada pesando con exactitud 6.58 g de K_3PO_4 .$3H_2O$, 32.5 mg de NaN_3 y 292.2 mg de EDTA, los cuales fueron disueltos en agua Milli-Q y ajuste de pH a 7.3 con una solución de HCl 5 N y aforado a un volumen de 500 mL. Con esta solución se realizó la extracción de las proteínas sarcoplásmicas.

Solución amortiguadora de alta fuerza iónica (SAFI). Esta solución fue preparada pesando con exactitud los mismos valores de K_3PO_4 .$3H_2O$, NaN_3 y EDTA usados en la preparación de la SBFI, y adicionalmente 20.5 g de KCl, la mezcla resultante se disolvió en agua Milli-Q, luego se ajustó el pH a 7.3 con HCl 5 N y, por último, se completó volumen a 500 mL. Con esta solución se realizó la extracción de las proteínas miofibrilares.

Solución de KCl 0.15 M. Para su preparación se pesaron con exactitud 5.59 g del reactivo, los cuales fueron disueltos en 500 mL de agua Milli-Q. Con esta solución se realizó la extracción de la fracción de proteínas insolubles.

Soluciones para la cuantificación de grupos carbonilos. La carbonilación de proteínas se cuantificó empleando el método espectrofotométrico basado en el marcaje de los grupos carbonilos con la sonda de 2,4-DNPH, descrito en la sección 4.5.1 del capítulo 4 [5]. Las soluciones empleadas fueron:

Solución de 2,4-DNPH 10 mM. Esta fue preparada por disolución de 19.9 mg de 2,4-Dinitrofenilhidrazina al 67%, en 50 mL de una solución de ácido fosfórico 0.5M. La mezcla resultante se mantuvo almacenada en oscuridad y a temperatura ambiente de laboratorio (25°C).

Solución de NaOH 6N. Para su preparación se pesaron con exactitud 9.6 g de reactivo, los cuales fueron disueltos en 40 mL de Agua Milli-Q.

5.2.4 Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras de estudio

Las muestras de pechuga de pollo (músculo pectoral mayor y menor) fueron adquiridas en expendios mayoristas de la ciudad de Cartagena de Indias (Colombia), una vez transcurridas 24 horas del sacrificio del animal. Para el proceso de muestreo se seleccionó una marca de pollo comercial cuyo fabricante garantizaba la ausencia de residuos de pesticidas durante su proceso de cría. Las muestras se colocaron en bolsas

de plástico resellables y se almacenaron en una cava de poliestireno con geles refrigerantes, con el fin de mantener la cadena de frío durante su transporte hasta el laboratorio.

En el laboratorio, las muestras fueron sometidas a un proceso de limpieza, retirando la piel, huesos y restos visibles de tejido graso y conectivo. Posteriormente estas se cortaron en pequeños cubos, los cuales fueron homogenizados en un procesador de alimentos. Las muestras homogeneizadas fueron alicuotadas en tubos Falcon, tomando como masa de la alícuota un gramo de pechuga homogenizada (Figura 5.2), quedando listas para el proceso de tratamiento. Estas muestras se identificaron como muestras blanco.

5.2.5 Tratamientos *in vitro*

Para obtener muestras tratadas, se procedió a contaminar alícuotas de muestras blanco con cada plaguicida (CPF, DZN y DDT), hasta obtener cuatro niveles de concentración por contaminante para un total de 12 muestras tratadas (ver Tabla 5.2). Para ello, a alícuotas individuales de muestra blanco se agregaron 200 µL de cada disolución de trabajo de contaminante; posteriormente se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por una hora para permitir la interacción de los contaminantes con la matriz de pechuga de pollo. Como control negativo se utilizaron alícuotas de muestras blanco a las que se agregaron 200 µL del disolvente utilizado en la preparación de las disoluciones de trabajo.

Tabla 5.2 Concentraciones de pesticidas en las muestras tratadas.

Plaguicida	**Concentración de contaminación (µg·Kg^{-1})**			
	C1	**C2**	**C3**	**C4**
CPF	50	100	150	200
DDT	500	1000	1500	2000
DZN	10	20	30	40

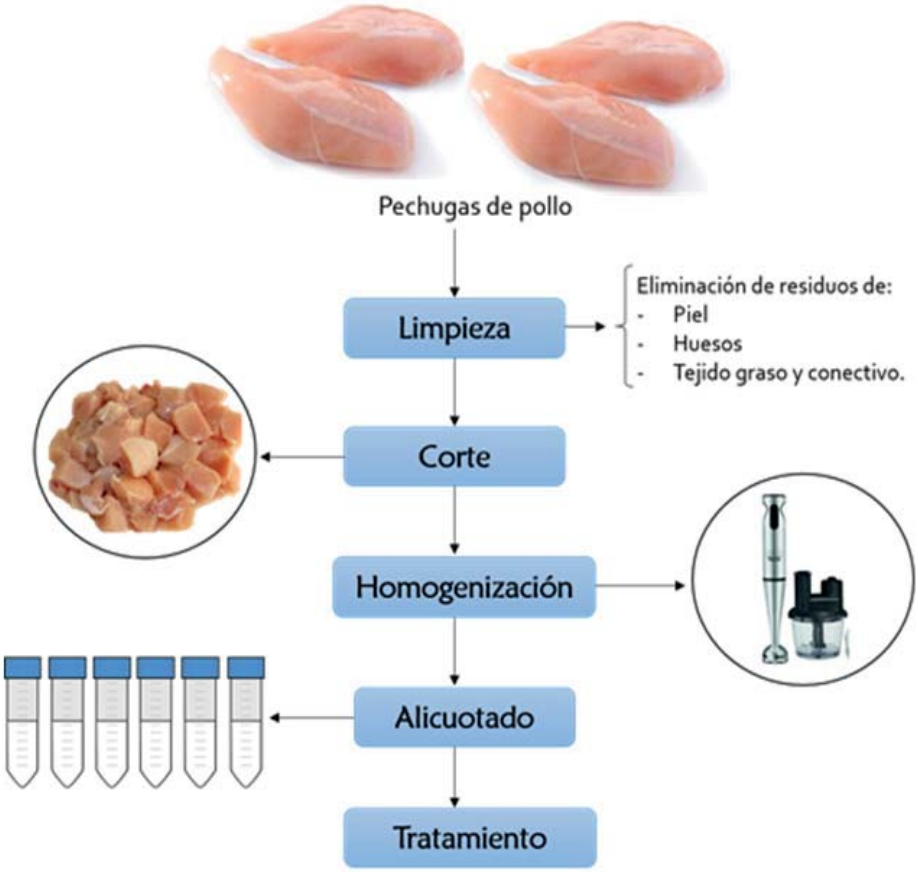


Figura 5.2 Esquema que ilustra el proceso de preparación y almacenamiento de las muestras de estudio. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas de los siguientes links: https://www.dietasdeportivas.com/beneficios-de-la-pechuga-de-pollo; https://www.sel eccionganadera.cl/producto/16-cubos-de-pechuga-de-pollo; http://www.clker.com/clipart- centrifuge-tube-falcon-1.html

Adicionalmente, se evaluó el efecto del almacenamiento a -20°C sobre la carbonilación de las proteínas insolubles. Para ello, alícuotas de las muestras recién homogenizadas fueron contaminadas a las concentraciones mencionadas y junto con alícuotas de los blancos fueron almacenadas a -20 °C y monitorizadas en periodos de siete (t=1) y quince días (t=2) a -20°C (Figura 5.3). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

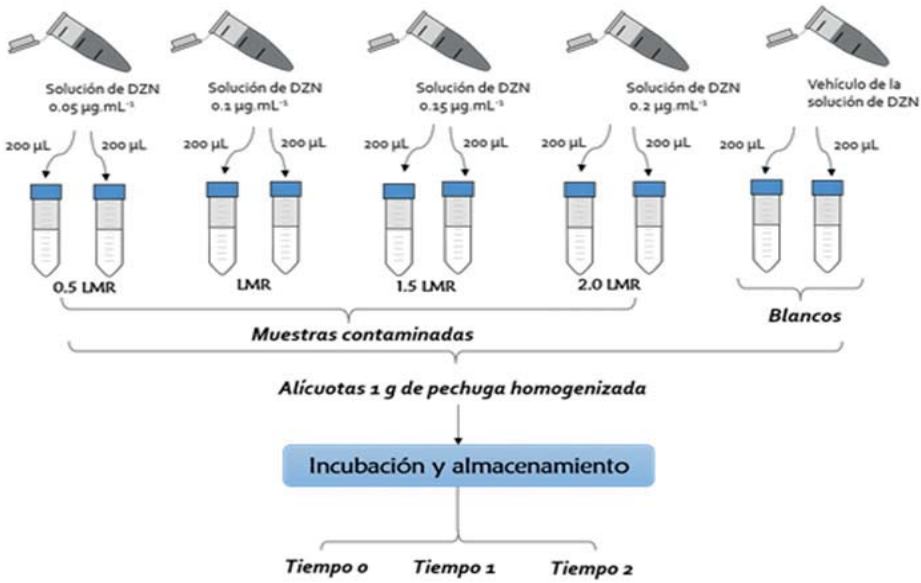


Figura 5.3. Flujograma del proceso de tratamiento de las muestras de estudio.
Fuente: Construida por los autores con imágenes de: http://www.clker.com/clipart-centrifuge-tube-falcon-1.html

5.2.6 Extracción de proteínas

Se empleó el procedimiento reportado por Molette C y col [6] y Soglia y Col [7], con algunas modificaciones, para la extracción de las diferentes fracciones de proteínas presentes en los músculos pectorales del pollo, tanto en las muestras blanco como en las contaminadas con los pesticidas de interés.

Esta etapa del procedimiento fue previamente validada en términos de la repetitividad y reproducibilidad de los porcentajes de recuperación proteica (rendimiento) obtenidos en diferentes ensayos y bajo nuestras condiciones de laboratorio. Los datos que presentamos en este capítulo corresponden a los obtenidos para la fracción insoluble, dado que para el tiempo en que se redactó este libro, aquellos correspondientes a las fracciones sarcoplásmicas y miofibrilares se encuentran sometidos a una revista científica y se encuentran en fase de evaluación.

Para la obtención de la fracción insoluble fue necesario la extracción inicial de las otras proteínas constitutivas de la pechuga de pollo, como son las sarcoplásmicas y miofibrilares. Para ello, a cada muestra evaluada se le agregó un volumen de SBFI seguido de vórtex y centrifugación, obteniéndose un sobrenadante (proteínas sarcoplásmicas) y un pellet. Este último fue tratado con SAFI y centrifugado, obteniéndose un sobrenadante (proteínas miofibrilares) y un pellet que se resuspendió en KCl 0.15 M y se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos y 4°C. El sobrenadante resultante contenía la fracción de proteínas insolubles (Figura 5.4), las cuales fueron mantenidas en frío hasta los subsiguientes ensayos.

Figura 5.4 Esquema del proceso de extracción de proteínas. SBFI: Solución amortiguadora de baja fuerza iónica. SAFI: Solución amortiguadora de alta fuerza iónica. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas del siguiente enlace http://www.clker.com/clipart-centrifuge-tube-falcon-1.html

5.2.7 Cuantificación de proteínas e índice de carbonilos

Una vez extraídas las proteínas de la fracción insoluble se procedió a su cuantificación a través de la aplicación del método descrito por Bradford [8]. Para esto, 5µL de la disolución de las fracciones proteicas se sembraron por triplicado en una microplaca, seguido de la adición de 200 µL del reactivo de Bradford. Posteriormente, se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras se calculó mediante la construcción de una curva de calibración construída con disoluciones patrón de BSA en un intervalo lineal de 0.0125 a 2.0 mg L^{-1} (Figura 5.5).

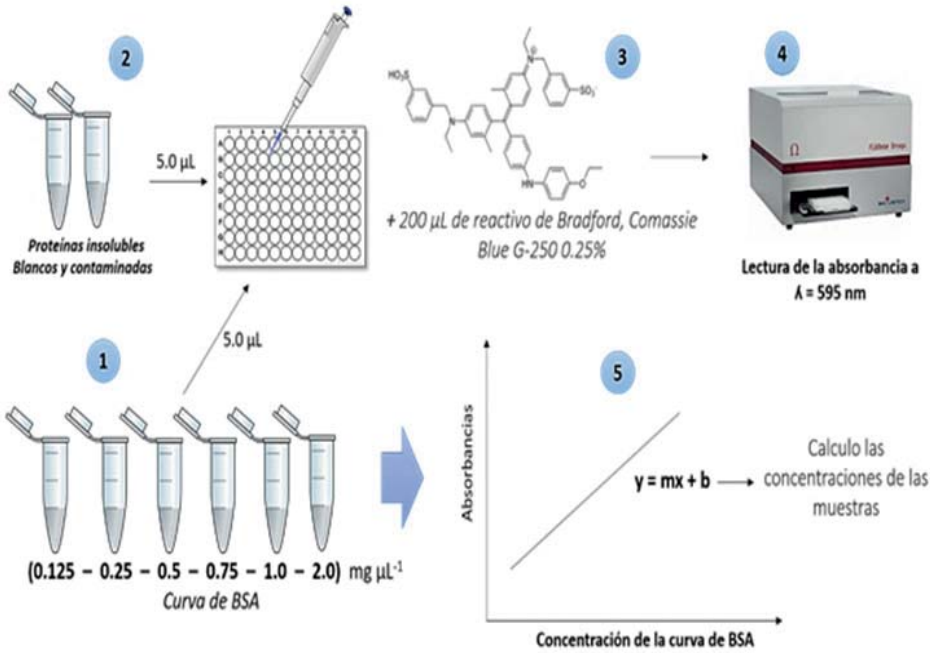


Figura 5.5 Representación esquemática del protocolo de cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas de: http://www.clker.com/clipart-centrifuge-tube-falcon-1.html y http://www.insbal.com/ index.php?cat=Lector%20de%20Placas%20para%20Fluoresc

La carbonilación proteica fue medida a través de la técnica de espectrofotometría de absorción molecular, empleando el método alcalino basado en el uso de 2,4-DNPH propuesto por Mesquita y Col [5], con algunas modificaciones descritas a continuación. Inicialmente, se adquirió una masa de proteínas insolubles equivalente a 150 µg de muestras contaminadas y blancos, las cuales fueron ajustadas a un volumen final de 200 µL en un tubo eppendorf.

Las soluciones resultantes fueron derivatizadas, añadiéndoles 200 µL de DNPH 10mM en H_3PO_4 0.5M, seguido de incubación en oscuridad a 25°C durante 10 minutos. Posteriormente, 80 µL de las soluciones derivatizadas fueron sembrados por triplicado en una microplaca junto con 20 µL de NaOH 6N. Después de 10 minutos de incubación de la mezcla resultante (25°C y oscuridad), la absorbancia de la solución fue leída en un espectrofotómetro a 450 nm. El contenido de carbonilos fue calculado usando el coeficiente de extinción molar del DNPH corregido para microplacas (ε=11154 $\mu M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Los resultados fueron expresados como nmoles de carbonilo.mg-1 de proteínas. Debido a la inestabilidad de la hidrazona en medio básico fue necesario el estricto control de tiempo una vez se añadió el hidróxido de sodio (Figura 5.6).

5.2.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como la media ± la desviación estándar. Los valores de carbonilación de las muestras evaluadas se graficaron usando el paquete estadístico GraphPad Prisma versión 8.01 para Windows. En el análisis del efecto de los contaminantes y tiempo de almacenamiento sobre la formación de grupos carbonilos en las proteínas insolubles de la pechuga de pollo se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con post test de Tukey.

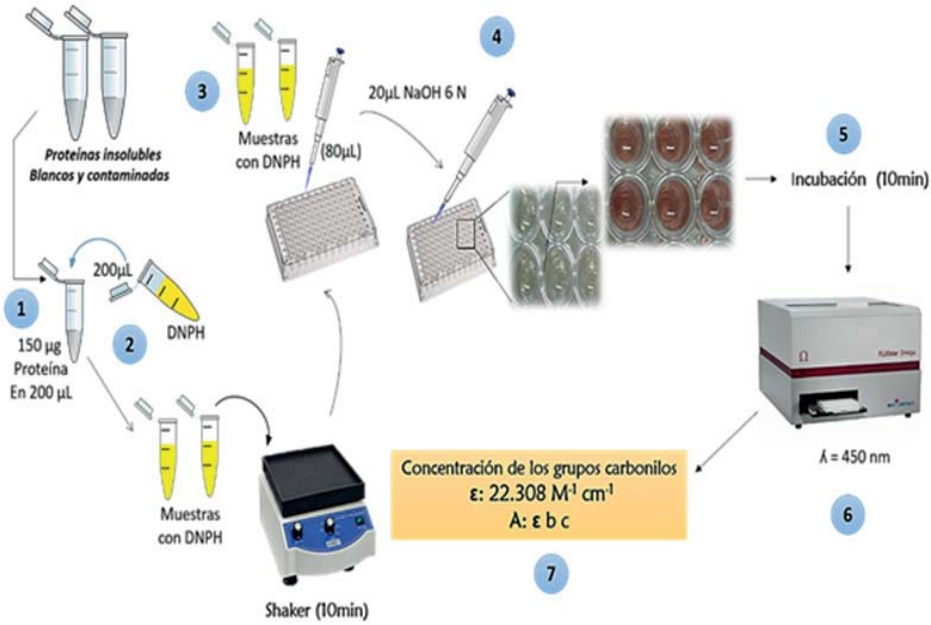


Figura 5.6 Representación esquemática del protocolo de cuantificación de grupos carbonilos por el método espectrofotométrico basado en el uso de 2,4-DNPH. La cuantificación de los grupos carbonilos a través de la ley de Beer-Lambert, utiliza el coeficiente de extinción molar del DNPH corregido para microplacas (ε=11154 $\mu M^{-1}.cm^{-1}$). Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas de: http://www.clker.com/clipart-centrifuge-tube-falcon-1.html y http://www.insbal.com/ index.php?cat=Lector%20de%20Placas%20para%20Fluoresc

5.3 Resultados

Todos los contaminantes indujeron oxidación a sus diferentes niveles de exposición en las proteínas de la fracción insoluble de pechuga de pollo (tiempo 0), exceptuando a DZN, a la concentración de 40 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ y DDT a los valores de 500 y 1000 $\mu g.Kg^{-1}$ ($p>0.05$) (Figuras 5.7 a 5.11). A continuación, se describen los resultados obtenidos por cada contaminante.

5.3.1 Carbonilación inducida por Clorpirifós en proteínas insolubles

Los datos obtenidos se presentan de manera de análisis comparativo de las muestras tratadas con aquellos obtenidos en los controles y que

denominamos de aquí en adelante como oxidación o carbonilación basal, o simplemente basal.

En la Figura 5.7 se muestra el gráfico de barras para la carbonilación inducida por CPF sobre las proteínas insolubles de pechuga de pollo en muestras recién homogenizadas (t= 0). En esta se puede observar que todas las concentraciones ensayadas promovieron carbonilación significativa con respecto al basal ($p<0.05$). Además, se encontró que la carbonilación inducida por los valores de contaminación de 50, 100 y 150 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ no tuvieron diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$), mostrando un valor promedio de 1.06 ± 0.129 $nmol \cdot mg^{-1}$ de proteína, el cual fue 8.2 veces mayor al observado para el control.

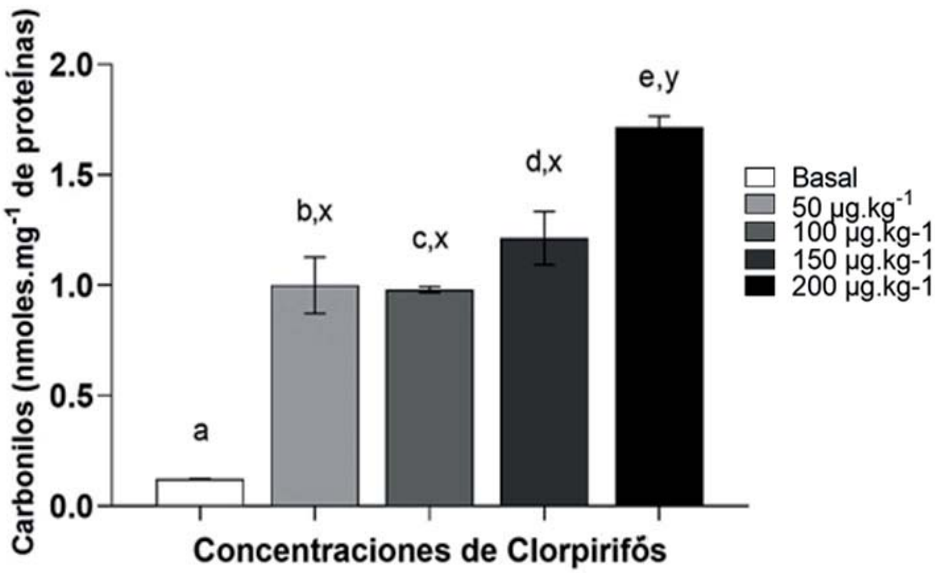


Figura 5.7 Valores de carbonilación inducida por Clorpirifós sobre las proteínas insolubles de la pechuga de pollo. Se grafican la media de contenido de carbonilo en las muestras contaminadas y el blanco (n = 2). Las barras de error indican la desviación estándar. [a-e] Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p <0.05$) entre la carbonilación basal y la promovida por las concentraciones de Clorpirifós. [x,y] Superíndices indican diferencia significativa ($p <0.05$) entre la carbonilación promovida por las concentraciones de Clorpirifós.

En tanto que la carbonilación promovida a 200 µg·Kg^{-1} fue 13.9 veces mayor al basal (1.72 ± 0.049 nmol·mg^{-1} de proteína) y 1.6 veces mayor respecto a las demás concentraciones, siendo esta por tanto la máxima oxidación generada por Clorpirifós sobre la fracción insoluble de las proteínas de pechuga de pollo.

Estos resultados suministran evidencias de la capacidad de CPF para promover estrés oxidativo sobre las proteínas en estudio, comportamiento que concuerda con lo observado en modelos con animales, como ratas y peces [9-11]. El efecto oxidante exhibido por CPF puede estar asociado con su facilidad de atravesar la membrana celular y sistemas de baja polaridad como el caso de las proteínas insolubles, debido a su alto coeficiente, Kow: 4.96 [4]. De esta forma puede atravesar las barreras anatómicas que le imponen el sarcoplasma y las miofibrillas que recubren a la fracción de proteínas insolubles.

5.3.2 Carbonilación inducida por Diazinón en proteínas insolubles

La carbonilación promovida por DZN en las proteínas insolubles de la pechuga de pollo se muestra en la Figura 5.8. Todas las concentraciones evaluadas de este contaminante a excepción de 40 µg·Kg^{-1} promovieron carbonilación significativa respecto al basal ($p<0.05$). Las oxidaciones inducidas por las concentraciones 10 y 20 µg·Kg^{-1} no tuvieron diferencia significa ($p>0.05$) así como 20 y 30 µg·Kg^{-1}, siendo en promedio 0.18 ± 0.011 nmol·mg^{-1} de proteína y 0.20±0.01 nmol·mg^{-1} de proteína, respectivamente, ambas fueron 1.6 veces mayor respecto al basal.

A diferencia de CPF, DZN a valor máximo de contaminación (40 µg·Kg^{-1}) no promovió carbonilación en las proteínas de la fracción insoluble, evento que podría estar relacionado con una baja distribución dentro de la muestra, mediada quizá por el alto contenido de moléculas que podrían saturar y limitar el paso a través de la membrana, si se tiene en cuenta que el músculo al estar en un estado post mortem tiene limitada sus actividades metabólicas [12].

Al igual que CPF, DZN fue capaz de promover estrés oxidativo en el intervalo de concentraciones de 10 a 30 µg·Kg^{-1}, como ha sido evidenciado en modelos in vivo [13, 14]. Sin embargo, el poder oxidante fue menor que aquel mostrado por CPF, de forma que no se encontró un aumento de la carbonilación significativo respecto a la concentración más alta. Comportamiento que podría estar asociado a su menor Kow: 3.8 [4] y al microambiente de la célula muscular en estado post mortem que podrían dificultar el proceso de difusión. Adicionalmente, DZN evidenció una carbonilación similar a los valores de 10 y 30 µg·Kg^{-1}, evento que favorecería la hipótesis de la baja difusión a concentraciones más altas.

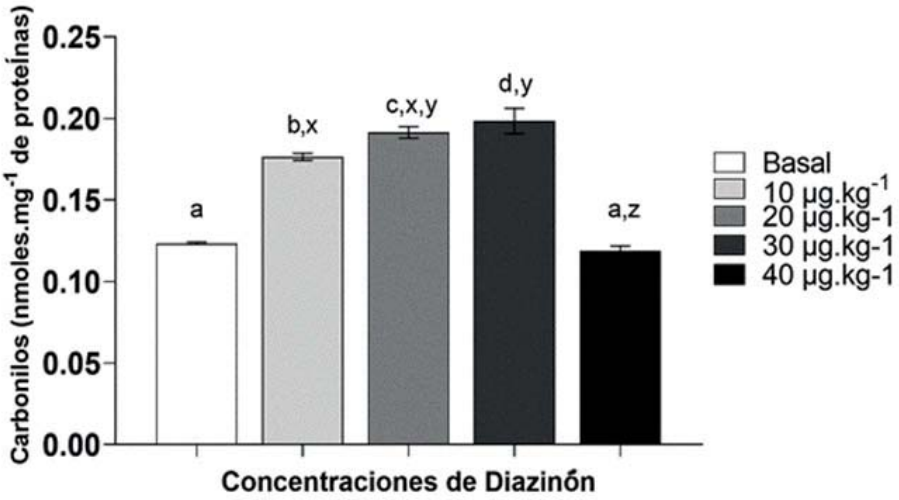


Figura 5.8 Valores de carbonilación inducidos por Diazinón en proteínas insolubles de la pechuga de pollo. Se grafican la media de contenido de carbonilo en las muestras contaminadas y el blanco (n = 2). Las barras de error indican la desviación estándar. [a-e] Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la carbonilación basal y la promovida por las concentraciones de Diazinón. [x,y] Superíndices indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la carbonilación promovida por las concentraciones de Diazinón.

5.3.3 Carbonilación inducida por DDT en proteínas insolubles

La carbonilación inducida por DDT en las proteínas insolubles se muestra en la Figura 5.9. A diferencia de CPF y DZN, DDT solo indujo carbonilación significativa respecto al basal a las concentraciones de 1000 y 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ ($p<0.05$). Así mismo, la oxidación promovida por estas concentraciones también mostró diferencia significativa ($p<0.05$), siendo el contenido de carbonilos 0.17 ± 0.006 $nmol \cdot mg^{-1}$ de proteína y 0.14 ± 0.003 $nmol \cdot mg^{-1}$ de proteína, respectivamente. Valores que respecto al basal fueron 1.4 y 1.1 veces mayor.

El poder oxidante de DDT en esta fracción fue altamente variable en el intervalo de concentraciones evaluadas, de forma que, el valor máximo fue alcanzado a 1000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ y el mínimo a 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$, siendo este último 1.2 veces menor.

A pesar de que DDT tiene un Kow más alto (6.91) [4] que los plaguicidas antes mencionados, su daño oxidativo fue menor, aun a la concentración más alta evaluada, comportamiento que podría estar asociado con la forma o mecanismo de inducir estrés oxidativo a nivel celular.

Su actividad oxidante se deriva del efecto inductivo que tiene sobre la actividad de enzimas tipo citocromo P450, que durante su actividad metabólica generan especies reactivas de oxígeno por desacoplamientos de la reacción [15, 16]. No obstante, este mecanismo requiere del funcionamiento óptimo de la célula, el cual no es proporcionado en una célula en estado post mortem [12], donde las reservas energéticas son escasas y los sistemas enzimáticos pueden estar en un proceso de desacople. De ahí, que el daño oxidativo promovido en las condiciones in vitro , resulten menores a aquellos obtenidos por otros investigadores en modelos biológicos in vivo, como ratones, líneas celulares y/o moluscos [17-19].

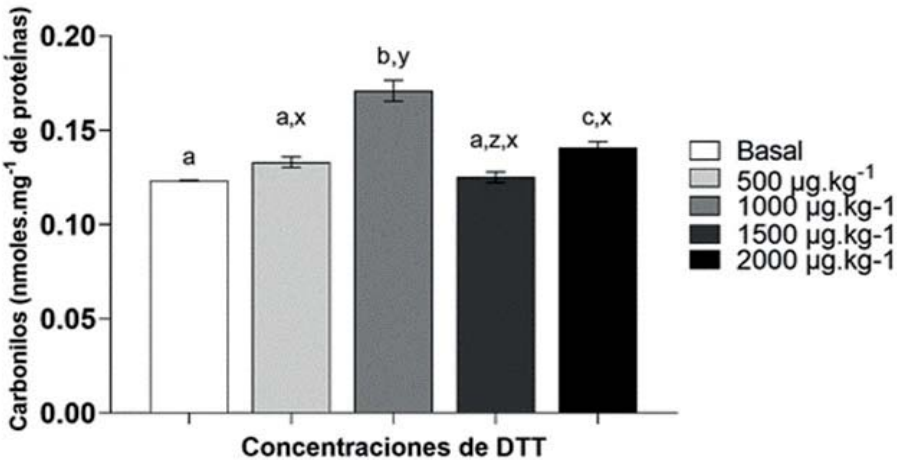


Figura 5.9 Valores de carbonilación inducidos por DDT en las proteínas insolubles de la pechuga de pollo. Se grafican la media de contenido de carbonilo en las muestras contaminadas y el blanco (n = 2). Las barras de error indican la desviación estándar. [a-e] Superíndices diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la carbonilación basal y la promovida por las concentraciones de DDT promovida por las concentraciones de DDT.

5.3.4 Análisis comparativo de la carbonilación promovida por CPF, DZN y DDT

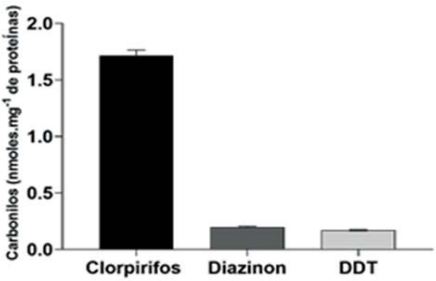
Para comparar la carbonilación inducida por los plaguicidas en estudio se calculó la relación entre los valores de carbonilación de las muestras contaminadas frente a la de los blancos (IC de muestras contaminadas /IC basal). Como se observa en la Tabla 5.3, CPF fue el plaguicida que mayor daño oxidativo ocasionó a las proteínas insolubles a todas las concentraciones ensayadas, siendo en promedio 7.2 y 1.2 veces mayor con respecto a la carbonilación promovida por DZN y DDT, respectivamente.

Por otro lado, al comparar las carbonilaciones máximas inducidas por CPF, DZN y DDT, independientemente de su concentración (Figura 5.10), se observó que no existió diferencia significativa entre las promovidas por esos dos últimos contaminantes ($p>0.05$). En lo que respecta a CPF su poder oxidante fue notorio, siendo en promedio 9.3 veces mayor a

DZN y DDT. De ahí, que se sugiera que la capacidad oxidante *in vitro* de los plaguicidas en estudio sobre proteínas insolubles de pollo sea el siguiente: CPF>DZN≥DDT.

Tabla 5.3 Relación del índice de carbonilo en muestra contaminada en función del índice de carbonilo basal.

Nivel de contaminación (LMR)	Relación IC/IC basal		
	CPF	DZN	DDT
0.5	8.1	1.4	1.1
1.0	7.9	1.6	1.4
1.5	9.8	1.6	1.0
2.0	13.9	1.0	1.1
Promedio	9.4	1.4	1.2



Plaguicida	Media ± DE (nmoles/mg proteína)
CPF-1.5LMR	1.7±0.05
DZN-1.5LMR	0.2±0.01
DDT-LMR	0.2±0.01

Figura 5.10. Comparación entre los niveles de los plaguicidas que promovieron la máxima carbonilación en las proteínas insolubles de la pechuga de pollo, bajo las condiciones estudiadas. La carbonilación es expresada como nmoles de carbonilos.mg^{-1} de proteína. Al comparar los grupos se encontró diferencias significativas entre ellas (p=0.0010), siendo la carbonilación inducida por CPF superior a las demás. DE: Desviación estándar.

5.3.5 Efecto del almacenamiento sobre la carbonilación promovida por CPF, DZN y DDT

La congelación es uno de los métodos de preservación más importantes para la carne y sus productos derivados, debido a que genera una mínima pérdida de su calidad durante el almacenamiento a largo plazo. Por

ello, se evaluó el efecto del almacenamiento de las muestras a 7 y 15 días (tiempo 1 y 2 respectivamente) sobre la capacidad oxidante de los plaguicidas en estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que CPF presentó una carbonilación variable en función del tiempo de almacenamiento, siendo los picos máximos de carbonilación inducidos por los valores de contaminación equivalentes a 200, 50 y 100 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ a los días cero, siete y quince, respectivamente. Además, la carbonilación promovida por todas las concentraciones en los tiempos evaluados fue significativa con respecto a la basal ($p<0.05$) (Figura 5.11a).

En lo que respecta a DZN, se observó que la carbonilación inducida tuvo un comportamiento similar al observado en las curvas dosis-respuesta al día séptimo de almacenamiento, siendo la máxima carbonilación la inducida a 40 $\mu g \cdot Kg^{-1}$, sin embargo, al día 15 este comportamiento se pierde, obteniéndose valores de oxidación por debajo y similares al basal.

Además, se observó que la más alta oxidación fue promovida por la concentración de 20 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ (Figura 5.11b). Es importante resaltar que solo a los tiempos cero y siete la carbonilación inducida por Diazinón difirió significativamente con respecto al blanco a excepción de la promovida por 40 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ en tiempo cero.

Para el caso de DDT, la carbonilación fue variable en el tiempo, observándose que la concentración equivalente a 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ promovió la más baja oxidación a siete y quince días de almacenamiento. En adición, la carbonilación generada a los días siete y quince por DDT difirió significativamente con respecto al basal, con excepción de la promovida por 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ al día quince. De hecho, en el intervalo de 500 y 1500 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ se observó una respuesta oxidativa dependiente de la concentración (Figura 5.11c).

De forma general, se pudo observar que la carbonilación inducida por DZN y DDT fue aumentando con el tiempo del almacenamiento, al igual

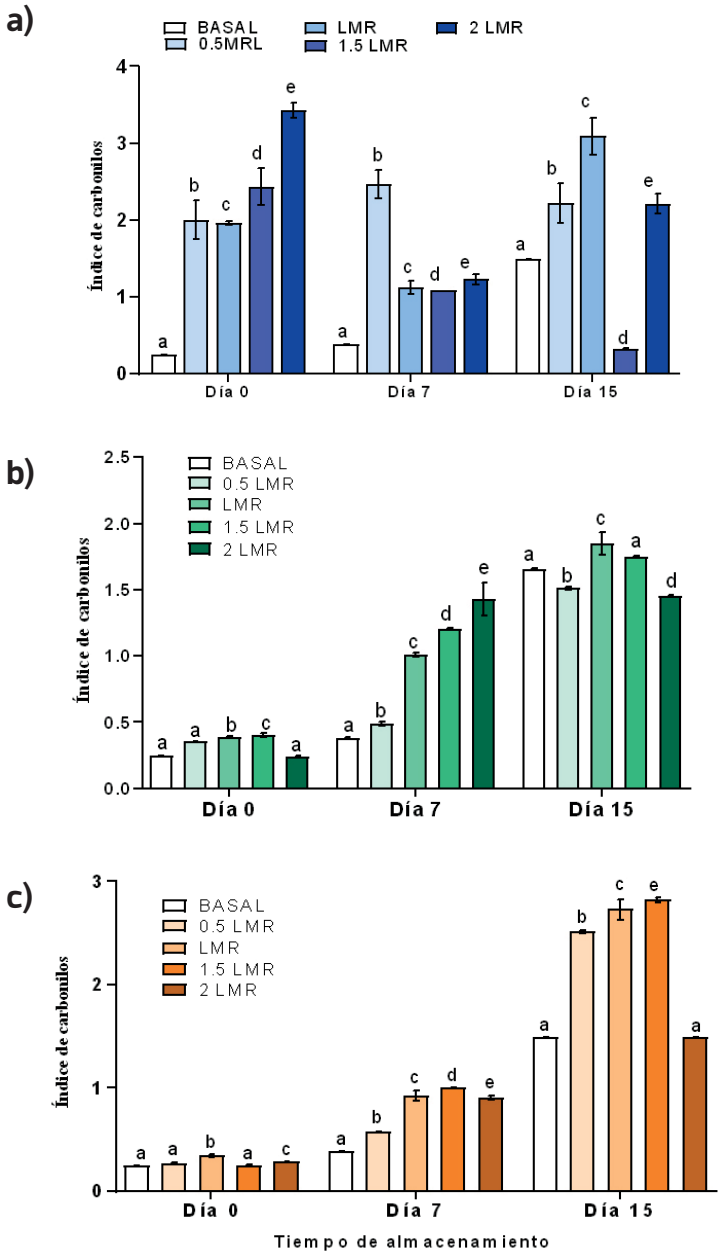


Figura 5.11. Cambios en la carbonilación inducida por Clorpirifós (a), Diazinón (b) y DDT (c) en las proteínas insolubles de la pechuga en función del tiempo de almacenamiento. Se grafican la media de contenido de carbonilo en las muestras contaminadas y el blanco (n = 2). Las barras de error indican la desviación estándar.

que el blanco, comportamiento que es concordante con lo observado por autores como Soyer y col [84] en proteínas de pechuga y pata de pollo almacenadas a -7, -12 y -18°C. Adicionalmente, estos dos plaguicidas evidencian un posible efecto oxidante que se incrementa con el almacenamiento, altamente notorio en el día séptimo.

Sin embargo, al día quince de almacenamiento la oxidación generada por DZN es equiparable a la del blanco, no obstante, DDT sigue con la tendencia hasta la carbonilación promovida a 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$.

CPF por su parte, a todos los tiempos de almacenamiento y a excepción de 150 $\mu g.Kg^{-1}$ en el día 15, siempre indujo una carbonilación significativamente mayor a la basal, sugiriendo que el poder oxidante de este plaguicida se mantiene en el tiempo y que además posee un comportamiento independiente de la concentración, de forma que los valores más altos de oxidación fueron promovidos a concentraciones 200, 50 y 100 $\mu g.Kg^{-1}$ al día cero, siete y quince, respectivamente.

5.3.6 Relevancia de la oxidación de proteínas por residuos de plaguicidas

Los glúcidos, lípidos y proteínas son las principales biomoléculas continuativas de los alimentos de origen animal, las cuales son susceptibles de oxidación por diferentes agentes ya sean físicos o químicos. Dentro de este grupo de biomoléculas, las proteínas constituyen uno de los blancos principales de oxidación, debido a su abundancia relativa y al papel crucial que representan en la catálisis de las reacciones biológicas [20].

Los grupos carbonilo se producen en las cadenas laterales de aminoácidos como la prolina, arginina, lisina y treonina al oxidarse, conduciendo a una modificación irreversible que no puede ser reparada por las enzimas celulares, alterando así elementos estabilizadores de proteínas, como los puentes salinos y los pliegues de prolina, traducido en la alteración de la estructura cuaternaria de la proteína, promoción de la agregación proteica y pérdida de la funcionalidad [21, 22].

La carbonilación de proteínas genera cambios en sus propiedades fisicoquímicas, incluidos la modificación química de sus aminoácidos, disminución de la solubilidad producto de la agregación, pérdida de la actividad enzimática y la digestibilidad, junto con alteraciones de la viscosidad, gelación y emulsificación. Las proteínas juegan un papel decisivo en las propiedades tecnológicas, funcionales, nutricionales y sensoriales de los alimentos. Modificaciones de la estructura nativa y/o la integridad de proteínas de la pechuga de pollo como resultado de la carbonilación afectan la calidad de la carne, incluidos los rasgos de textura, color, aroma, sabor, capacidad de retención de agua y funcionalidad biológica [23].

Actualmente, el consumo de proteínas oxidadas ha sido relacionado con el aumento del riesgo de cáncer de colon, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa [24]. Así mismo estudio realizados en ratas y ratones han evidenciado que la ingesta de proteínas oxidadas aumenta los marcadores de oxidación proteica en sangre y órganos internos, contribuyendo de esta forma a la promoción de oxidación proteica in vivo. Adicionalmente, tanto aminoácidos y péptidos oxidados pueden inducir un deterioro en la homeostasis y toxicidad celular a través de diversos mecanismos, entre ellos la incorporación de aminoácidos oxidados a enzimas y proteínas estructurales; evento que puede finalmente contribuir al mal funcionamiento y apoptosis celular [25].

Con base en los resultados obtenidos, la presencia de residuos de Clorpirifós, Diazinón y DDT en la carne de pollo a concentraciones reportadas mundialmente como inocuas (LMR), e inclusive por debajo de estas (0.5 LMR), podrían representar un factor de riesgo importante para el consumidor frecuente, al ser capaces de promover la carbonilación de las proteínas insolubles de la pechuga de pollo a todos los tiempos evaluados (excepto por DZN al día 15 de exposición y DDT al día 0 de exposición).

Estos resultados representan a su vez un punto de partida, como una plataforma de lanzamiento para el desarrollo de estudios a nivel biológico

(in vivo), que evalúen los efectos producidos por el consumo de proteínas insolubles carboniladas por los residuos de estos contaminantes.

5.4 Conclusiones

- Se demostró que la presencia de Clorpirifós, Diazinón y DDT a las concentraciones evaluadas inducen un daño oxidativo irreversible en las proteínas insolubles de la pechuga de pollo, al incrementar significativamente sus valores de carbonilación bajo el modelo de contaminación ensayado.
- Clorpirifós se identificó como el plaguicida que indujo el mayor daño oxidativo en las proteínas insolubles, incluso a concentraciones equivalentes a 0.5 y 1.0 LMR, consideradas como inocuas por los organismos regulatorios. En promedio, la carbonilación inducida fue 7.2 y 1.2 veces mayor que la promovida por Diazinón y DDT, respectivamente.
- DDT fue el contaminante que indujo la menor carbonilación observada en las proteínas insolubles. Solo concentraciones de 1000 y 2000 $\mu g.Kg^{-1}$ promovieron un daño oxidativo significativo ($p<0.05$).

5.5 Referencias

1. Estévez, M., *Oxidative damage to poultry: from farm to fork.* Poult Sci, 2015. **94**(6): p. 1368-78.
2. Márquez-Lázaro, J.P., et al., *In vitro oxidation promoted by chlorpyrifos residues on myosin and chicken breast proteins.* Food Chem, 2020. **326**: p. 126922.
3. Reeves, W.R., et al., *Assessing the Safety of Pesticides in Food: How Current Regulations Protect Human Health.* Adv Nutr, 2019. **10**(1): p. 80-88.
4. Kim, S., et al., *PubChem 2019 update: improved access to chemical data.* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D1102-D1109.

5. Mesquita, C.S., et al., *Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins.* Anal Biochem, 2014. **458**: p. 69-71.

6. Molette, C., H. Remignon, and R. Babile, *Maintaining muscles at a high post-mortem temperature induces PSE-like meat in turkey.* Meat Sci, 2003. **63**(4): p. 525-32.

7. Soglia, F., M. Petracci, and P. Ertbjerg, *Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat.* Food Chem, 2016. **197**(Pt A): p. 670-5.

8. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

9. Mansour, S.A. and A.-T.H. Mossa, *Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc.* Pesticide Biochemistry and Physiology, 2010. **96**(1): p. 14-23.

10. Rodríguez-Fuentes, G., et al., *Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (Danio rerio) following Chlorpyrifos exposure.* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2015. **172-173**: p. 19-25.

11. Spodniewska, A., D. Barski, and A. Gizejewska, *Effect of enrofloxacin and chlorpyrifos on the levels of vitamins A and E in Wistar rats.* Environ Toxicol Pharmacol, 2015. **40**(2): p. 587-91.

12. Paredi, G., et al., *"Muscle to meat" molecular events and technological transformations: the proteomics insight.* J Proteomics, 2012. **75**(14): p. 4275-89.

13. Shah, M.D. and M. Iqbal, *Diazinón-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats.* Food Chem Toxicol, 2010. **48**(12): p. 3345-53.

14. Colovic, M.B., et al., *In vitro evaluation of neurotoxicity potential and oxidative stress responses of Diazinón and its degradation products in rat brain synaptosomes.* Toxicol Lett, 2015. **233**(1): p. 29-37.

15. Kitamura, S., et al., *Reductive metabolism of p,p'-DDT and o,p'-DDT by rat liver cytochrome P450.* Drug Metab Dispos, 2002. **30**(2): p. 113-8.
16. Veith, A. and B. Moorthy, *Role of Cytochrome P450s in the Generation and Metabolism of Reactive Oxygen Species.* Curr Opin Toxicol, 2018. **7**: p. 44-51.
17. Song, Q., et al., *Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel Perna viridis revealed by proteomic and metabolomic approaches.* Chemosphere, 2016. **144**: p. 214-24.
18. Pérez-Maldonado, I.N., et al., *DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells.* Environ Res, 2005. **98**(2): p. 177-84.
19. Marouani, N., et al., *p,p'-DDT induces testicular oxidative stress-induced apoptosis in adult rats.* Reprod Biol Endocrinol, 2017. **15**(1): p. 40.
20. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.* Clinica Chimica Acta, 2003. **329**(1): p. 23-38.
21. Rodríguez-Cavallo, E., et al., *Protein carbonylation is a mediator in larvicidal mechanisms of Tabernaemontana cymosa ethanolic extract.* Journal of King Saud University - Science, 2019. **31**(4): p. 464-471.
22. Alviz-Amador, A., et al., *Effect of 4-HNE Modification on ZU5-ANK Domain and the Formation of Their Complex with beta-Spectrin: A Molecular Dynamics Simulation Study.* J Chem Inf Model, 2020. **60**(2): p. 805-820.
23. Estévez, M., *Protein carbonyls in meat systems: a review.* Meat Sci, 2011. **89**(3): p. 259-79.
24. Lund, M.N., et al., *Protein oxidation in muscle foods: a review.* Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(1): p. 83-95.
25. Estévez, M. and C. Luna, *Dietary protein oxidation: A silent threat to human health?* Crit Rev Food Sci Nutr, 2017. **57**(17): p. 3781-3793.

Capítulo 6
Residuos de antibióticos y plaguicidas promueven la carbonilación de proteínas en leche bovina

Albeiro Marrugo Padilla
Johana Márquez Lázaro
Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

6.1 Introducción

La seguridad alimentaria es un concepto moderno que está siendo desafiado hoy en día, gracias a las dimensiones globales de las cadenas de suministro de alimentos, las cuales buscan incrementar los rendimientos de producción al menor costo posible [1]. El objetivo de la seguridad alimentaria es garantizar la inocuidad de los alimentos y salvaguardar la vida del consumidor frecuente, a través de la adopción de políticas que garanticen la ausencia de residuos de sustancias potencialmente peligrosas (antibióticos y pesticidas) en los alimentos de elevada rotación como la leche [1,2].

Una de las estrategias desarrolladas por organismos internacionales como el Consejo Europeo y la Comisión del Codex Alimentarius para garantizar la seguridad alimentaria y el comercio internacional, es el establecimiento de concentraciones máximas permitidas de antibióticos y pesticidas en los alimentos, las cuales no representan un riesgo para el consumidor frecuente, estas concentraciones son denominadas como Límites máximos de residuos (LMRs) estos se obtienen para cada sustancia individualmente a partir de modelos animales experimentales y luego se extrapolan por homología a los humanos [3].

En el caso particular de la leche, las regulaciones internacionales se centran en el control de residuos de antibióticos como las tetraciclinas (TCs) y los β-lactámicos (β-LTs), al ser los medicamentos de primera elección para la profilaxis y el tratamiento de infecciones comunes en el ganado lechero, debido a su bajo costo, accesibilidad y diversidad de modos de administración [4,5]. Independientemente de la ruta de administración utilizada (intramuscular, oral, intramamaria o intrauterina), las TCs y los β-LTs pueden provocar la aparición de sus residuos en los alimentos de origen animal, especialmente cuando se aplican de forma incorrecta e indiscriminada.

En la última década el uso tópico de pesticidas de la familia de los piretroides (PTDs) ha tomado un auge importante en los sistemas de

producción lácteos, estas sustancias se usan en el ganado lechero para el control de plagas que parasitan a los animales, gracias a sus bajos efectos toxicológicos en comparación con los organofosforados y carbamatos [2]. El aumento en el uso de PTDs ha generado su monitorización y control en la leche, ya que sus residuos pueden depositarse en los tejidos del animal gracias a su naturaleza lipofílica y rápida distribución.

A pesar de la regulación existente, diferentes investigaciones han informado niveles de TC, β-LTs y PTDs superiores a sus LMRs en muestras de leche comercial, utilizando HPLC-FLD o DAD como técnica de cuantificación [6–9].

Dado el alto consumo de leche a nivel mundial y la problemática asociada a la presencia de residuos de antibióticos y pesticidas en este alimento, el grupo de Química Analítica y Biomedicina de la Universidad de Cartagena ha desarrollado una línea de investigación enfocada en evaluar los efectos de la presencia de residuos de TC, β-LTs y PTDs sobre las principales proteínas constitutivas de la leche.

El estudio de los efectos de residuos de antibióticos y plaguicidas sobre las proteínas de alimentos representa una línea de investigación muy reconocida por la comunidad científica a nivel mundial, dado que estas biomoléculas son definitorias de muchas de las propiedades funcionales y nutricionales de los alimentos; en este sentido, la evaluación de la oxidación de las proteínas es una de las alteraciones más investigadas en matrices alimentarias, ya que esta puede repercutir en su valor nutricional y propiedades organolépticas.

Bajo este contexto, en el presente capítulo se considera la capacidad que poseen las TCs, β-LTs y plaguicidas PTDs de promover estrés oxidativo en sistemas biológicos, aún a niveles traza de contaminación (LMRs). Particularmente se presentan los resultados obtenidos en ensayos de laboratorio dirigidos a demostrar que la presencia de residuos de clortetracilina (CTC), tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC), doxiciclina

(DXC), ampicilina (AMP), penicilina benzatínica (PBEN), oxacilina (OXA), dicloxacilina (DICL), cipermetrina (CIP), fenvalerato (FEN) y flumetrina (FLU), inducen un daño oxidativo irreversible sobre caseínas (CAS) y proteínas del lactosuero (PLs) de la leche bovina.

Para ello, muestras homogenizadas de leche entera bovina se contaminaron de forma individual con CTC, TC, OTC, DXC, AMP, PBEN, OXA, DICL, CIP, FEN y FLU a dos valores de concentración. Posteriormente, las muestras se incubaron en oscuridad por una hora, seguido de la extracción de proteínas y su cuantificación por el método de Bradford. La carbonilación proteica se cuantificó por método alcalino de 2,4-DNPH.

Los resultados obtenidos se detallan para antibiótico y plaguicida a los diferentes niveles de contaminación y demuestran que el modelo experimental utilizado resulta útil para la medición del daño oxidativo causado por estas sustancias.

6.2 Metodología

6.2.1 Obtención y almacenamiento de las muestras de estudio

Las muestras de leche cruda empleadas en el análisis se obtuvieron a partir de una vaca de ordeño ubicada en una finca ganadera del municipio de Arjona (Bolívar), la cual estaba libre de la administración de antibióticos y del uso de plaguicidas del grupo de los PTDs, al menos dos meses previos a su muestreo. Se tomaron de forma manual cinco litros de leche directamente desde el reservorio inicial de almacenamiento después de ser extraída del animal. El volumen de muestra adquirido se soportó en los cálculos volumétricos trazados para el desarrollo de todos los experimentos, y posibles inconvenientes a encontrar durante la optimización de los métodos usados para la cuantificación de los índices de carbonilo, garantizando así la homogeneidad en términos de muestra usada para el desarrollo de todos los ensayos. La toma de la muestra se hizo garantizando las condiciones de asepsia tanto de los instrumentos empleados como del personal encargado

de la recolección, para lo que se utilizaron guantes de látex, se corroboró la esterilidad del reservorio de la leche y se usaron recipientes plásticos estériles para su trasvasado y almacenamiento.

El transporte de la muestra desde el sitio de recolección hasta el laboratorio se hizo empleando una cava de poliestireno expandido para su almacenamiento, la cual se cargó previamente con geles refrigerantes para mantener su temperatura interna por debajo de los 4ºC. Dicha temperatura fue monitorizada durante el periodo de transporte desde el sitio de obtención de la muestra hasta las instalaciones del laboratorio. Una vez allí, el volumen total de muestra fue alicuotado, empleando recipientes esterilizados de 50 mL de capacidad, con el objetivo de evitar procesos continuos de descongelación-congelación durante el desarrollo progresivo de los ensayos, los cuales pudieran alterar la estabilidad de las proteínas y promover la formación de grupos carbonilo. Los recipientes obtenidos se almacenaron a una temperatura -20°C hasta su análisis.

6.2.2 Obtención de las fracciones proteicas

Alícuotas de 2 mL de leche se centrifugaron empleando una centrífuga refrigerada Hettich (Alemania) (3000 rpm, 2°C, 30 min), obteniendo la grasa constituyente de la matriz láctea, a partir de la cual se extrajo la fracción de proteínas de la membrana del glóbulo graso (PMG). Con el fin de eliminar residuos de proteínas del lactosuero adheridas al glóbulo graso, se realizaron lavados con 1,5 mL de PBS pH 7,4 (tampón fosfato salino, NaCl 146 mM, Na_2HPO_4 64 mM y NaH_2PO_4 23mM) a 9000 rpm, 4°C y 15 min.

A los glóbulos lavados se les adicionó 4mL de metanol, 1 mL de diclorometano y 3 mL de agua, centrifugando la mezcla resultante a 6000 rpm, 4°C por 10 min, obteniendo del proceso un sobrenadante orgánico-acuoso y un precipitado equivalente a las PMG, este último es lavado con 3 mL de metanol y centrifugado a 6000 rpm, 4°C por 10 min, separándose así la fracción correspondiente a las PMG, listas para reconstituirse en un disolvente apropiado.

A la leche desengrasada obtenida anteriormente, se le aplicó un proceso de fraccionamiento guiado por mecanismos fisicoquímicos de extracción. En este orden de ideas, el siguiente paso de la metodología fue la acidificación de la leche desengrasada con una disolución de ácido acético al 25 %v/v, alcanzando un pH de 4.6, en el cual las caseínas son insolubles. La suspensión obtenida se sometió a centrifugación (3000 rpm, 4°C y 5 min), obteniendo un precipitado equivalente a la fracción de caseínas y un sobrenadante constituido por la fracción del lactosuero. Estos últimos fueron separados mecánicamente.

El pellet de caseínas obtenido se sometió a lavado con una solución diluida de ácido acético pH 4.5, para eliminar impurezas coprecipitadas, la suspensión resultante es centrifugada a 3000 rpm, 4°C y 5 minutos, obteniendo la fracción lavada de caseínas lista para su reconstitución en un solvente apropiado. Se precipitaron las proteínas del sobrenadante con la fracción del lactosuero añadiendo ácido tricloroacético al 50% v/v, la mezcla resultante se centrifugó a 3000 rpm, 4°C y 5 min, generando un pellet constituido por la fracción proteica y un sobrenadante equivalente al lactosuero desproteinizado, finalmente las masas proteicas de las fracciones se disolvieron en un solvente apropiado (Figura 6.1) [10–12].

6.2.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó aplicando el método descrito por Bradford en el año 1976 [13], el cual consiste en cuantificar la absorción de luz absorbida a la longitud de onda de 595nm, por parte del complejo coloreado formado entre las proteínas y el colorante Comassie Blue G-250. La metodología empleada para la cuantificación consistió en colocar por triplicado 5uL de la disolución de las fracciones proteicas en los pozos de una microplaca, a los que secuencialmente se agregaron 200 µL de la solución denominada reactivo de Bradford, constituida por el colorante Comassie Blue G-250 (0,25% p/v en un vehículo alcohólico acidificado).

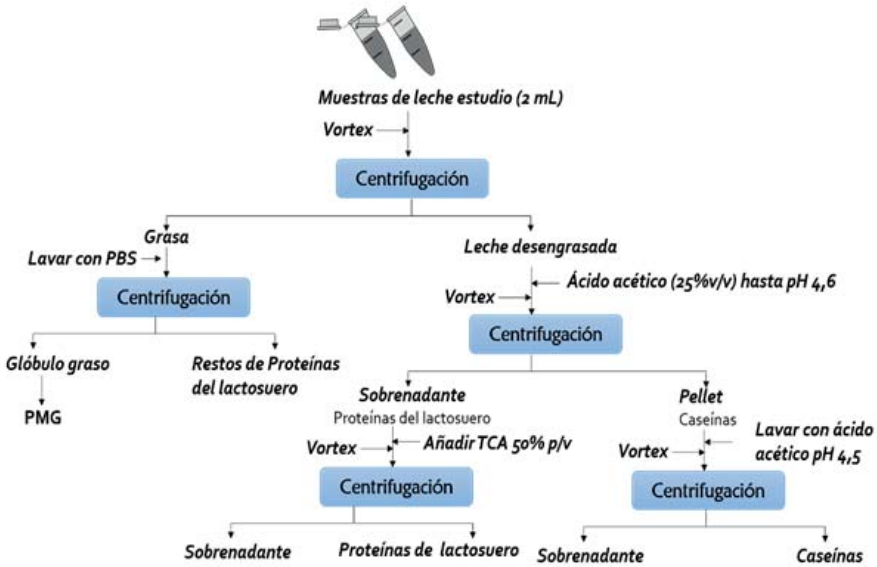


Figura 6.1 Representación esquemática del proceso de extracción fraccionada de las principales fracciones proteicas de la leche bovina. TCA: ácido tricloroacético; PMG: Proteínas de la membrana del glóbulo graso. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes tomadas del siguiente enlace http://www.clker.com/clipart-centrifuge-tube-falcon-1.html

Los pozos con la mezcla final son leídos en un espectrofotómetro, determinando su absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas es calculada por extrapolación, soportado en la ecuación lineal de los valores de absorbancia de una curva de calibración, construida con patrones de proteínas de albumina sérica bovina de concentración conocida (Quick StartTM, BSA Estándar de BIO-RAD), usando un intervalo dinámico lineal de patrones entre 0,125 y 0,75 mg de proteínas·mL de solución [13].

6.2.4 SDS–PAGE

La electroforesis unidimensional en geles de proliacrilamida dodecilsulfato de sodio, fueron desarrolladas con el objeto de corroborar la eficiencia del protocolo de extracción para separar selectivamente las proteínas de interés. Para esto se emplearon geles de resolución (Resolving) al 15%

de poliacrilamida y de apilamiento (Stacking) al 4%. La metodología desarrollada se basó en la descrita por Jovanovic y col [89] en la cual se siembran 5µg de proteínas en los pozos del gel, junto con 4 µL del tampón de carga 2 X (disolución que contiene SDS, glicerol, β-mercaptoetanol y el colorante azul de bromofenol) y 1,6 µL de una disolución del reactivo β-mercaptoetanol al 20% v/v, hasta completar un volumen final de 10 µL. La separación electroforética es realizada inicialmente a 90 voltios los primeros 30 minutos y a 130 voltios el resto del ensayo (90 – 120 minutos) (89). De este modo se consiguió contar en el laboratorio con un protocolo optimizado para la obtención de proteínas de leche bovina [14].

6.2.5 Preparación de las muestras contaminadas

Las muestras de leche se enriquecieron individualmente con los antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas: clortetracilina (CTC), tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) y doxiciclina (DXC); junto con los β-lactámicos: ampicilina (AMP), penicilina benzatínica (PBEN), oxacilina (OXA), dicloxacilina (DICL); y los herbicidas piretroides: cipermetrina (CIP), fenvalerato (FEN) y flumetrina (FLU).

Para ello, a 2 mL de leche se le añadió, la alícuota de la disolución patrón del contaminante correspondiente, obteniendo una concentración final equivalente al valor establecido como su LMR y 1.5 veces este. Los valores específicos de contaminación se seleccionaron con base en lo reportado por el Reglamento de la Unión Europea (UE) No. 37/2010 del 22 de diciembre del 2009. Los valores de contaminación usados se muestran en la Tabla 6.1.

Previo a su análisis proteómico, las muestras contaminadas se almacenaron en oscuridad a 4°C durante 40 min. Considerando la naturaleza del disolvente empleado en la preparación de las disoluciones patrón, a las muestras blanco se añadió una alícuota de dicho disolvente, equivalente a la empleada en el enriquecimiento de muestras contaminadas. En todos los casos, se prepararon triplicados para el análisis.

Tabla 6.1 Valores de concentración empleados para la contaminación de las muestras de leche bovina.

Contaminante	Molécula	Concentración evaluada ($\mu g \cdot L^{-1}$)	
		LMR	1.5 LMR
β-Lt	AMP	4	6
	PBEN		
	DICL	30	45
	OXA		
TCs	OTC	100	150
	TC		
	CTC		
	DXC		
PTDs	CIP	20	30
	FEN	40	60
	FLU	30	45

LMR: Límite máximo de residuos

6.2.6 Determinación del índice de carbonilo por el método alcalino

La oxidación proteica de las muestras medida como el índice de carbonilo, se determinó empleando el método espectrofotométrico descrito por Mesquita y col [15]. Para esto, en un tubo eppendorf se depositó una cantidad equivalente a 200 µg de cada fracción proteica (caseínas y lactosuero), extraídas tanto de las muestras blanco como de las enriquecidas. Esta masa fue ajustada llevándola a un volumen equivalente a 400 µL, empleando como diluyente el tampón de disolución de las proteínas. La mezcla obtenida es diluida posteriormente a 800 µL, agregándole 400 µL de una disolución de DNPH (10mM en H_3PO_4 0,5 M), la solución diluida resultante se incuba por 10 minutos en agitación constante en un shaker orbital y a temperatura ambiente. De la solución

final, se toman volúmenes triplicados de 160 µL cada uno, depositándolos en una microplaca de 96 pozos y añadiéndoles secuencialmente 40 µL de NaOH 6N.

Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a una longitud de onda de 450nm en un periodo de tiempo inferior a 10 minutos. La concentración de los grupos carbonilo en las disoluciones es calculada partiendo de la ecuación de Beer-Lambert, empleando una absortividad corregido para microplacas (ε=11154 $\mu M^{-1}.cm^{-1}$), correspondiente a los derivados de hidrazona de los grupos carbonilo producidos en el ensayo, y tomando como referente los valores de absorbancias obtenidos por cada fracción proteica de las muestras analizadas [15].

6.2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como la media ± la desviación estándar. Los valores de carbonilación de las muestras evaluadas se graficaron usando el paquete estadístico GraphPad Prisma versión 8.01 para Windows. En el análisis del efecto de los contaminantes y tiempo de almacenamiento sobre la formación de grupos carbonilo en las CAS y PLs se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con post test de Tukey.

6.3 Resultados

6.3.1 Obtención de las fracciones proteicas

Las actividades desarrolladas en torno a la optimización del proceso de extracción selectiva de las proteínas de la leche bovina arrojó como resultado un protocolo sencillo, reproducible y amigable con el ambiente, desde el punto de vista de la reducción del consumo de solventes orgánicos y el uso racional de los recursos. Para la puesta a punto de la metodología de extracción fueron ensayados en total cinco protocolos, los cuales diferían en los valores de temperaturas, velocidades y tiempos

de centrifugación de sus subprocesos metodológicos (Tabla 6.2). Los ensayos fueron realizados por duplicado. La Tabla 6.2 resume las características de los protocolos ensayados.

Dentro de los procesos críticos ensayados estuvieron: 1) **Desengrasado**: En este proceso se evaluó el efecto de la velocidad de centrifugación (9000 – 3000 rpm), el tiempo (15, 30 y 60 minutos) y la temperatura (-15, 2 y 4 °C) para los cinco protocolos. 2) **Lavado de glóbulos grasos**: La eficiencia del lavado en términos de separación y extracción de proteínas coprecipitadas se evaluó mediante modificaciones en las velocidades de centrifugación ensayando los valores de 3000 y 9000 rpm. 3) **Extracción de las PMG**: En este proceso solo se evaluó el efecto de la velocidad de centrifugación ensayado los valores de 6000 y 3000 rpm. 4) **Extracción de caseínas y lactosuero**: En estos procesos se evaluó también el efecto de la velocidad de centrifugación la cual para el caso de caseínas fueron 5110 y 3000 rpm, mientras que para el lactosuero fueron evaluadas las velocidades de 3000 y 9000. Los resultados obtenidos en los cinco ensayos se resumen en la Tabla 6.3. Los parámetros evaluados para determinar la escogencia de un protocolo sobre otro fueron las concentraciones de proteínas extraídas y sus respectivos porcentajes de recuperación.

Tabla 6.2 Consolidados de las variables constitutivas de los protocolos ensayados para la extracción selectiva de las principales fracciones proteicas de la leche cruda bovina.

		Protocolos ensayados				
Subproceso del protocolo	**Variables**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
	Volumen de leche cruda empleado	15	15	15	15	15
Desengrasado (Extracción de glóbulos grasos)	Velocidad de centrifugación (rpm)	9000	9000	3000	3000	9000
	Temperatura (°C)	4	2	2	-15	2
	Tiempo (minutos)	60	30	15	15	30

Lavado de los glóbulos grasos	Volumen de PBS empleado (mL)	15	15	15	15	15
	Velocidad de centrifugación (rpm)	9000	9000	3000	3000	9000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	15	15	15	15	15
Extracción de las PMG	Volumen de metanol (mL)	4	4	4	4	4
	Volumen de diclorometano (mL)	1	1	1	1	1
	Volumen de agua (mL)	3	3	3	3	3
	Tiempo de agitación (seg)	10	10	10	10	10
	Velocidad de centrifugación (rpm)	6000	6000	3000	3000	6000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	10	10	10	10	10
Extracción de las caseínas	Volumen de ácido acético usado (µL)	≈ 400	≈ 400	≈ 400	≈ 400	≈ 400
	Velocidad de centrifugación (rpm)	5110	5111	3000	3000	3000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Lavado acuoso de las caseínas	Volumen de agua (mL)	5	5	5	5	5
	Velocidad de centrifugación (rpm)	5110	5111	3000	3000	3000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Lavado de las caseínas con acetona	Volumen de acetona (mL)	2	2	2	2	2
	Velocidad de centrifugación (rpm)	5110	5111	3000	3000	3000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	5	5	5	5	5

Extracción de las proteínas del lactosuero	Volumen de TCA (mL)	≈ 2.0	≈ 2.0	≈ 2.0	≈ 2.0	≈ 2.0
	Velocidad de centrifugación (rpm)	9000	9000	3000	3000	3000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Lavado de las proteínas del lactosuero con acetona	Volumen de acetona (mL)	1	1	1	1	1
	Velocidad de centrifugación (rpm)	3000	3000	3000	3000	3000
	Temperatura (ºC)	4	4	4	4	4
	Tiempo (min)	5	5	5	5	5

Tabla 6.3 Concentración de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir de leche cruda bovina, tras aplicar los protocolos A, B, C, D y E.

PROTOCOLO A					
Muestra	**R1 (mg·mL^{-1})**	**R2 (mg·mL^{-1})**	**Promedio**	**Desv. Est.**	**Recuperación (%)**
Leche entera	33.65	-	-	-	-
PMG*	0.04	0.03	0.035	0.007	9.8 5 (16.20)
Caseína	27.32	23.42	25.37	2.756	94.25 (10.88)
ß-Lg/α-La**	0.66	0.62	0.64	0.028	18.97 (3.72)

PROTOCOLO B					
Muestra	**R1 (mg·mL^{-1})**	**R2 (mg·mL^{-1})**	**Promedio**	**Desv. Est.**	**Recuperación (%)**
Leche entera	32.97	-	-	-	-
PMG*	0.13	0.13	0.13	0.01	9.39 (4.40)
Caseína	32.81	26,73	29.78	4.19	120.49 (13.18)
ß-Lg/α-La**	0.32	0.33	0.325	0.01	9.97 (2.40)

PROTOCOLO C					
Muestra	**R1 (mg·mL^{-1})**	**R2 (mg·mL^{-1})**	**Promedio**	**Desv. Est.**	**Recuperación (%)**
Leche entera	32.70	-	-	-	-
PMG*	0.11	0.09	0.10	0.02	30.40 (15.86)
Caseína	22,36	24,91	24.63	2.19	93.38 (8.89)
ß-Lg/α-La**	3.90	3.67	3.79	0.16	64.31 (4.29)

PROTOCOLO D					
Muestra	**R1 (mg·mL^{-1})**	**R2 (mg·mL^{-1})**	**Promedio**	**Desv. Est.**	**Recuperación (%)**
Leche entera	40,89	-	-	-	-
PMG*	0,21	0,22	0,215	0,0071	5.25 (3.28/)
Caseína	6,94	8,11	7,525	0,8273	23.00 (10.90)
ß-Lg/α-La**	3,30	1,58	2,44	1,2162	29.83 (49.85)

PROTOCOLO E					
Muestra	**R1 (mg·mL^{-1})**	**R2 (mg·mL^{-1})**	**Promedio**	**Desv. Est.**	**Recuperación (%)**
Leche entera	49.98	-	-	-	-
PMG*	0.77	0.86	0.815	0,0636	19.99 (7.81)
Caseína	13.94	16.08	15.01	1,5132	45.89 (8.89)
ß-Lg/α-La**	0.66	0.49	0.575	0,1202	20.07 (20.91)

Las tablas anteriores desglosan los resultados obtenidos durante el desarrollo de los protocolos de extracción, en ellas se compilan los valores de concentración proteica en mg de proteína/mL de solución. En la columna que expone los resultados de % de recuperación se detallan entre paréntesis los coeficientes de variación obtenidos. A continuación, se describen las siglas empleadas *PMG: Proteínas de la membrana del glóbulo graso, **proteínas de la fracción del lactosuero: ß-Lg: ß-lactoglobulina, α-La: α-lactalbumina.

Como se puede observar en los resultados descritos en la Tabla 6.3, los protocolos A y B a pesar de tener buenas recuperaciones para la fracción de CAS, en las PLs solo se obtuvieron porcentajes de recuperación inferiores al 19%, mientras que en los protocolos D y E solo llegaron a extraerse un 30% del total de PLs. Por lo anterior, fue seleccionado el protocolo C como el más adecuado, al presentar los más altos porcentajes de recuperación para CAS (93.38) y PLs (64.31%), por mostrar un comportamiento adecuado en el bandeado electroforético de cada fracción, y al presentar disminuciones en términos de tiempo y velocidad de centrifugación empleados en los procesos particulares de extracción de las principales fracciones proteicas.

Es pertinente recalcar como punto de cierre de los resultados finales del protocolo de extracción, la importancia que tiene combinar en una misma metodología diferentes procesos, que en conjunto permiten separar selectivamente tres grupos de proteínas con propiedades distintas, constituyentes de leche bovina. No existe evidencia científica que exponga algún protocolo con características similares al antes descrito, puesto que en las investigaciones consultadas los autores centran sus esfuerzos en la extracción de una sola fracción, según su interés de investigación.

A su vez, el protocolo optimizado mejora considerablemente las metodologías descritas por la literatura científica para extraer fracciones proteicas puntuales, ya sea en la reducción de las velocidades de centrifugación y en el uso se agentes precipitantes, resultando evidente al contrastar procesos como el planteado por Arena y col. para el desengrasado de las muestras lácteas, en el cual emplean velocidades de centrifugación hasta de 12000 rpm [12], en comparación con las 9000 rpm empleadas en el protocolo diseñado.

En el caso particular de los procesos de extracción de caseínas y lactosuero, el protocolo mostró la capacidad de evitar el uso de solventes orgánicos, como sí lo estipula el Reglamento (CE) No. 273/2008 propuesto

por la Unión Europea, en el que emplean particiones líquidas a base de solventes como diclorometano y acetona, superando los 25 mL, en aras de extraer las dos fracciones proteicas mencionadas [10]. En contraposición, el protocolo diseñado emplea disoluciones de ácidos inorgánicos como agentes precipitantes, sumado a procesos de centrifugación para extraer dichas proteínas, actividades mucho más sostenibles y amigables con el ambiente.

6.3.2 Cuantificación de proteínas

El método descrito por Bradford usado para cuantificar las proteínas extraídas, utiliza como marcador el colorante Coomassie Blue G-250 (rojizo/marrón), el cual posee una absorbancia máxima a la longitud de onda 465 nm. En condiciones ácidas, el colorante reacciona principalmente con la arginina y en menor grado con residuos de lisina, histidina, tirosina, triptófano y fenilalanina de las proteínas, produciendo un color azul, con un máximo de absorbancia a 595 nm (el intervalo de absorción está entre 575 y 615 nm), pudiendo detectar de 0.2 - 20 µg de proteína.

Soportados en lo anterior, uno de los puntos críticos identificados en la optimización de los ensayos de cuantificación proteica, fue el volumen empleado de alícuota como vehículo de transporte de las proteínas, debido a que el tampón de disolución usado para disolverla posee dodecil sulfato de sodio (SDS), reactivo que promueve una tonalidad verdosa en la mezcla formada al agregar el reactivo de Bradford a la disolución proteica en el pozo de la microplaca, la cual no coincidía con las reportadas por la curva de calibración, interfiriendo así con la lectura trazada.

Para resolver el problema fue necesario ensayar factores de dilución en las disoluciones de las proteínas, que permitieran reducir considerablemente la concentración de SDS final, sin comprometer de tal forma la concentración final de las proteínas, pudiendo generar salidas del intervalo dinámico lineal.

Con el objetivo de reducir el volumen de leche empleado en los análisis, los procesos de extracción desarrollados en los ensayos previos a la cuantificación del índice de carbonilo de las muestras se hicieron a partir de 2 mL de leche cruda, usando el protocolo C, descrito en la Tabla 6.2, en estos ensayos se descartó la extracción de PMG, por no ser objeto de estudio en la determinación de su oxidación producto de los contaminantes empleados. Los valores de concentración de proteínas obtenidos se describen en la Tabla 6.4. En estos se puede observar que el rango de concentraciones estuvo entre 16.0 – 18.3 y 3.3 – 4.3 mg de proteínas·mL^{-1} de leche procesada para CAS y PLs, respectivamente. Estos valores se emplearon para el desarrollo de los cálculos previos a la cuantificación de grupos carbonilo en las proteínas.

Tabla 6.4 Concentración de proteínas de las fracciones de caseínas y proteínas de lactosuero expuestas a residuos de TCs, β-LTs y PTDs.

Contaminante		Concentración	Concentración[1]	
			Caseínas	Lactosuero
TCs	OTC	LMR	18.7 ± 0.15	1.9 ± 0.19
		1.5 LMR	19.3 ± 0.73	2.0 ± 0.04
	TC	LMR	18.2 ± 0.16	1.8 ± 0.04
		1.5 LMR	21.4 ± 0.55	1.8 ± 0.03
	CTC	LMR	15.6 ± 0.11	2.1 ± 0.01
		1.5 LMR	17.5 ± 0.83	2.4 ± 0.02
	DXC	LMR	19.1 ± 0.46	3.3 ± 0.17
		1.5 LMR	18.9 ± 0.47	1.9 ± 0.11
Blanco			20.6 ± 1.63	2.0 ± 0.01
β-LTs	AMP	LMR	11.1 ± 0.87	3.4± 0.07
		1.5 LMR	11.3 ± 0.01	3.3 ± 0.12
	PBEN	LMR	15.0 ± 0.02	3.5 ± 0.09
		1.5 LMR	11.2 ± 0.08	3.3 ± 0.22

	OXA	**LMR**	12.0 ± 0.13	3.3 ± 0.27
		1.5 LMR	9.20 ± 1.04	3.9 ± 0.03
	DICL	**LMR**	12.2 ± 0.30	3.1 ± 0.15
		1.5 LMR	11.2 ± 0.92	3.1 ± 0.03
Blanco			13.0 ± 0.13	4.0 ± 0.17
PTDs	**CIP**	**LMR**	16.2 ± 0.28	3.7 ± 0.11
		1.5 LMR	16.0 ± 0.14	3.5 ± 0.07
	FEN	**LMR**	16.3 ± 0.17	3.6 ± 0.11
		1.5 LMR	16.0 ± 0.43	3.6 ± 0.02
	FLU	**LMR**	16.4 ± 0.39	3.9 ± 0.16
		1.5 LMR	17.3 ± 0.48	4.1 ± 0.13
Blanco			17.4 ± 0.12	4.0 ± 0.07

[1]Expresada como mg de proteínas·mL^{-1}de leche procesada. (Media ± SD, n = 3). AMP: Ampicilina; PBEN: Penicilina benzatínica; OXA: Oxacilina; DICL: Dicloxacilina; OTC: Oxitetraciclina; TC: Tetraciclina; CTC: Clortetraciclina; DXC: Doxiciclina; CIP: Cipermetrina; FEN: Fenvalerato; FLU: Flumetrina.

6.3.3 SDS-PAGE

Los resultados obtenidos en las separaciones electroforéticas realizadas a las fracciones proteicas obtenidas en los ensayos de optimización del protocolo de extracción se desglosan en la Figura 6.2. El análisis electroforético de las fracciones extraídas en los protocolos ensayados (A, B, C, D y E) mostró buen comportamiento en términos de separación, obteniendo fracciones proteicas individuales con bandas definidas y reproducibles. La comparación de las bandas proteicas obtenidas por fracción en los distintos protocolos, frente a aquellas publicadas en la literatura, evidencian la calidad del proceso de extracción. Por ejemplo, en el caso particular de la fracción de caseínas, todos los protocolos ensayados mostraron buena separación de la fracción (α, β y k- caseínas), obteniéndose bandas separadas y diferenciadas, en contraste con la presencia de bandas solapadas en los geles publicados en literatura científica [16].

Como se puede observar en la Figura 6.2, los perfiles de proteína obtenidos por SDS-PAGE mostraron un comportamiento característico para cada fracción de proteína, de acuerdo con lo informado en la literatura [16]. El patrón de bandas de CAS mostró las cuatro bandas de proteínas típicas de esta fracción, correspondientes a la caseína αs1, αs2, β y κ respectivamente, en un rango de peso molecular entre 34 y 17 kDa. La ausencia de bandas diferentes a las reportadas para CAS en estos carriles nos permite afirmar que la metodología de extracción fue adecuada, separando el CAS del resto de las fracciones de proteínas de la leche bovina.

Para la fracción del lactosuero fue posible distinguir sus componentes principales, como las bandas de β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina, en el rango de 18 a 14 kD, a pesar de la presencia de bandas tenues debidas a la presencia de residuos de CAS. Ambos perfiles de proteínas (CAS y PLs) fueron similares a los reportados previamente por Costa [16]. Los resultados finales se muestran en la Figura 6.2, y la Tabla 6.5.

Tabla 6.5 Resumen de intensidad de bandas constitutivas de las fracciones extraídas al aplicar los cinco protocolos de extracción.

PROTOCOLOS					
Fracción proteica	**A*** **	**B**	**C**	**D**	**E**
PMG*	4.03 (7.39)	4.30 (4.92)	2.87 (10.68)	2.34 (26.62)	1.29 (18.99)
Caseína	4.48 (1.85)	4.54 (1.18)	4.37 (0.69)	4.73 (1.35)	4.39 (3.31)
ß-Lg/α-La**	3.05 (2.63)	2.70 (8.71)	2.74 (2.07)	1.33 (4.14)	1.82 (8.45)

*PMG: Proteínas membrana del glóbulo graso; **proteínas fracción lactosuero: ß-Lg: ß-lactoglobulina, α-La: α-lactalbumina; ***Unidades de intensidad de bandas medidas en términos de volúmenes (int) y ajustadas dividiéndolas entre $1x10^6$, en paréntesis RSD de réplicas.

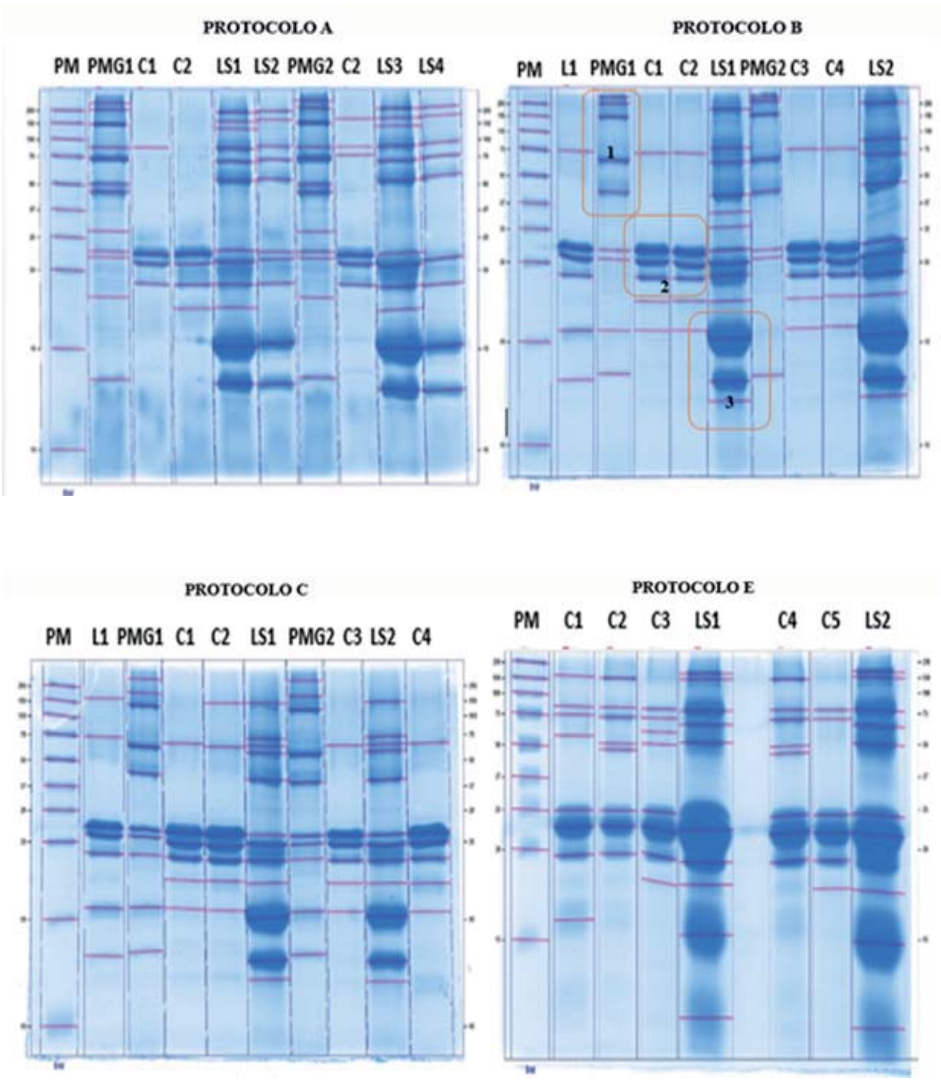


Figura 6.2 Comportamiento del bandeo electroforético de las principales fracciones proteicas (1: PMG, 2: Caseínas, 3: Lactosuero) extraídas de la muestra de leche cruda bovinas, mediante los protocolos A, B, C y E. Los geles empleados en los ensayos tenían una concentración de acrilamida del 15%, en estos se puede apreciar los carriles correspondientes al marcador de peso molecular (PM) con diez bandas que van desde los 250 kDa a los 10 kDa, a su vez ilustra el carril con las proteínas de la leche entera (L1, L2), caseínas (C1, C2, C3, C4 y C5), lactoglobulinas y lactalbúminas (LS1, LS2, LS3 y LS4) y las proteínas de membrana del glóbulo graso (PMG1 y PMG2).

6.3.4 Carbonilación de proteínas

La formación de grupos carbonilo en las cadenas laterales de los aminoácidos de proteínas en alimentos se reconoce actualmente como uno de los principales biomarcadores para la evaluación del estrés oxidativo [17], esta es una modificación irreversible y no enzimática de los aminoácidos, inducida por factores intrínsecos como el estrés oxidativo y extrínsecos como la exposición de los alimentos a diferentes tipos de radiación electromagnética, altas temperaturas y condiciones no controladas de almacenamiento y transporte [18,19].

Las muestras blanco evaluadas tuvieron valores de carbonilación de (2.0 ± 0.02; 4.26 ± 0.16; 5.7 ± 0.47) nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas y (4.5 ± 0.01; 6.0 ± 0.57; 10.6 ± 1.33) nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas en las fracciones de CAS y PLs, respectivamente (Tabla 6.6, Fig. 6.3-6.5). Al comparar estos valores con los ICs de las muestras enriquecidas con las TCs, β-LTs y PTDs, se puede observar que en CAS el 95.4% (21/22) de los tratamientos indujeron un daño oxidativo irreversible, al presentar ICs significativamente superiores a los de la muestra blanco ($p<0.05$), excepto por TC al 1.5 LMR (5.2 ± 0.13 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas).

Respecto a la fracción del lactosuero, los ICs de las muestras de leche contaminadas con TC al 1.5 LMR y CTC al LMR no fueron estadísticamente diferentes al de sus respectivos blancos (10.0 ± 0.36; 9.4 ± 0.17 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas), el resto de los tratamientos (90.9%) promovieron la carbonilación de esta fracción, respecto a su muestra blanco (Tabla 6.6, Figura 6.3).

Estos resultados sugieren que la presencia de residuos de TCs, β-LTs y PTDs en los alimentos como la leche, incluso a valores de LMR, reportados como seguros para el consumidor frecuente, podrían promover un daño oxidativo irreversible sobre sus principales fracciones proteicas. A continuación, se describen los resultados obtenidos por cada grupo de contaminantes evaluados.

6.3.4.1 Carbonilación inducida por las tetraciclinas

Los valores de ICs promovidos por los residuos de las TCs evaluadas se describen en la Tabla 6.6 y se muestran en el gráfico de barras de la Figura 6.3. El daño oxidativo inducido por las TCs tuvo un comportamiento diferente en ambas fracciones de proteicas (CAS y PLs). Al comparar la carbonilación neta inducida por estos contaminantes (obtenida al restar los ICs promovidos por los tratamientos menos el de la muestra blanco) (Tabla 6.6), se puede observar que el 62.5% de los tratamientos (5/8) promovieron una carbonilación superior en la fracción del lactosuero, en comparación con OTC al 1.5 LMR y CTC al LMR (25%), los únicos tratamientos que indujo una mayor carbonilación en CAS ($p<0.05$).

Tabla 6.6 Índices de carbonilo calculados en las principales fracciones proteicas de la leche bovina expuestas a TCs, β-LTs y PTDs.

Contaminante		Caseínas			Lactosuero		
		ICs[1]	Ratio[2]	CN[3]	ICs	Ratio	CN
OTC	1.0	5.8 ± 0.37+	1.4	1.5 ± 0.37	14.5 ± 0.79^{+}	1.4	3.9 ± 0.79
	1.5	9.0 ± 0.11^{+}	2.1	4.7 ± 0.11	12.4 ± 1.20^{+}	1.2	1.8 ± 1.20
TC	1.0	5.6 ± 0.11^{+}	1.3	1.3 ± 0.11	16.5 ± 0.05^{+}	1.6	5.9 ± 0.05
	1.5	5.2 ± 0.13	1.2	0.9 ± 0.13	10.0 ± 0.36	0.9	-0.6 ± 0.36
CTC	1.0	9.0 ± 0.24^{+}	2.1	4.8 ± 0.24	9.4 ± 0.17	0.9	-1.2 ± 0.17
	1.5	7.0 ± 0.26^{+}	1.6	2.7 ± 0.26	16.1 ± 0.21^{+}	1.5	5.6 ± 0.21
DXC	1.0	9.2 ± 0.87^{+}	2.2	4.9 ± 0.87	25.1 ± 0.23^{+}	2.4	14.5 ± 0.23
	1.5	7.7 ± 0.57^{+}	1.8	3.4 ± 0.57	16.2 ± 1.28^{+}	1.5	5.6 ± 1.28
Blanco		4.26 ± 0.16			10.6 ± 1.33		
AMP	1.0	2.4 ± 0.26^{+}	1.2	0.5 ± 0.26	10.7 ± 4.58^{+}	2.4	6.2 ± 4.58
	1.5	2.7 ± 0.23^{+}	1.4	0.7 ± 0.23	12.2 ± 6.69^{+}	2.7	7.7 ± 6.69
PBEN	1.0	3.2 ± 0.28^{+}	1.6	1.3 ± 0.28	18.7 ± 6.69^{+}	4.2	14.2 ± 6.69
	1.5	4.9 ± 0.31^{+}	2.5	2.9 ± 0.31	29.5 ± 2.64^{+}	6.6	25.0 ± 2.64

OXA	**1.0**	3.4 ± 0.30⁺	1.7	1.4 ± 0.30	25.7 ± 1.06⁺	5.7	21.2 ± 1.06
	1.5	4.2 ± 0.18⁺	2.1	2.3 ± 0.18	25.1 ± 1.69⁺	5.6	20.6 ± 1.69
DICL	**1.0**	2.6 ± 0.06⁺	1.3	0.6 ± 0.06	51.4 ± 4.23⁺	11.5	46.9 ± 4.23
	1.5	8.7 ± 0.16⁺	4.4	6.7 ± 0.16	54.1 ± 2.11⁺	12.1	49.6 ± 2.11
Blanco		2.0 ± 0.02			4.5 ± 0.01		
CIP	**1.0**	12.8 ± 1.72 ⁺	2.2	7.0 ± 1.72	17.3 ± 0.67⁺	2.9	11.2 ± 0.67
	1.5	17.9 ± 0.70⁺	3.1	12.1 ± 0.70	6.5 ± 0.68	1.1	0.40 ± 0.68
FEN	**1.0**	27.7 ± 1.66⁺	4.7	20.5 ± 1.66	21.7 ± 1.26⁺	3.6	15.6 ± 1.26
	1.5	23.6 ± 0.57⁺	4.1	17.8 ± 0.57	17.1 ± 2.00⁺	2.8	11.0 ± 2.00
FLU	**1.0**	24.8 ± 0.28⁺	4.3	19.0 ± 0.28	13.8 ± 0.08⁺	2.3	7.7 ± 0.08
	1.5	74.9 ± 0.68⁺	13.0	69.1 ± 0.68	73.1 ± 0.07⁺	12.0	67.0 ± 0.07
Blanco		5.7 ± 0.47			6.0 ± 0.57		

[1] ICs: índices de carbonilo, expresado como nmoles de carbonilo. mg^{-1} de proteínas. (Media ± SD, n=3). [2] calculado de la siguiente manera: Índice de carbonilo de las muestras enriquecidas con las TCs, β-LTs y PTDs / Índice de carbonilo de la muestra blanco. [3] calculado de la siguiente manera: Índice de carbonilo de las muestras enriquecidas con TCs, β-LTs y PTDs / Índice de carbonilo de la muestra blanco. (Media ± SD, n=3). ⁺ Valores estadísticamente diferentes del blanco ($P < 0.05$). AMP: Ampicilina; PBEN: Penicilina benzatínica; OXA: Oxacilina; DICL: Dicloxacilina; OTC: Oxitetraciclina; TC: Tetraciclina; CTC: Clortetraciclina; DXC: Doxiciclina; CIP: Cipermetrina; FEN: Fenvalerato; FLU: Flumetrina.

En CAS, a excepción de las muestras contaminadas con OTC, se encontró que no hubo diferencias entre los valores de carbonilación promovido por estos antibióticos a los valores de LMR (100 µg· L^{-1}) y 1.5 veces el LMR (150 µg·L^{-1}) estos ICs fueron para TC, CTC y DXC, 1.3, 1.9 y 2.0 veces mayor al observado en la muestra blanco, respectivamente. DXC al LMR fue el tratamiento que indujo la mayor carbonilación en CAS, con un IC de 9.2 ± 0.87 nmoles de carbonilo· mg^{-1} de proteínas, el cual fue 2.2 veces superior al de la muestra blanco (4.26 ± 0.16 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas). Por otro lado, TC al 1.5 LMR fue el contaminante que indujo la menor carbonilación en esta fracción (5.2 ± 0.13 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas) la cual no fue diferente estadísticamente a la de la muestra blanco (Tabla 6.6, Figura 6.3).

En el lactosuero por su parte, todos los tratamientos indujeron un ICs inferior al aumentar su concentración a 150 µg·L^{-1} ($p<0.05$), excepto en las muestras tratadas con OTC, en donde no hubo diferencia entre los ICs inducidos en ambas concentraciones evaluadas. La máxima y mínima carbonilación en esta fracción fue inducida por DXC y CTC al LMR, con ICs de 25.1 ± 0.23 y 9.4 ± 0.17 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas, respectivamente, valores que estuvieron 2.4 y 0.9 veces superiores a los de la muestra blanco (Figura 6.3).

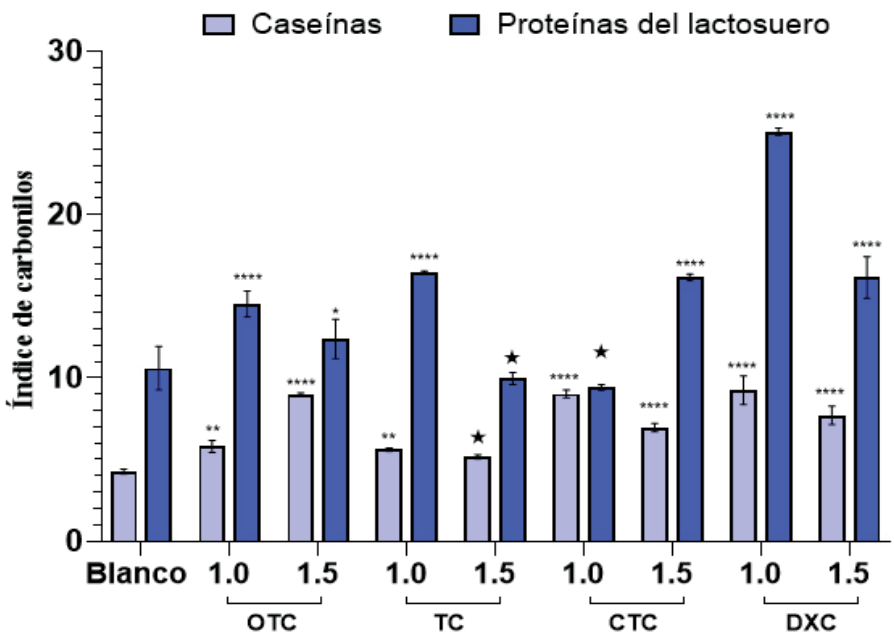


Figura 6.3 Comportamiento de los índices de carbonilo de las caseínas y proteínas del lactosuero de muestras de leche contaminadas con residuos de tetraciclinas. Los datos se expresan como la media ± DS (n: 3). Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos sobre las barras describen el nivel de significancia estadística obtenido al comparar el ICs de cada tratamiento vs el blanco (*****p <0.0001, ***p <0.005, **p <0.01 y *p <0.05*). El símbolo de la estrella sobre las barras denota ausencia de diferencias significativas entre el ICs del blanco y los tratamientos. OTC: Oxitetraciclina; TC: Tetraciclina; CTC: Clortetraciclina; DXC: Doxiciclina.

En la literatura científica se han demostrado los efectos prooxidantes (formación de radicales libres) y antioxidantes (absorción de especies

reactivas al oxígeno) *in vitro* de las TCs, los cuales están fuertemente relacionados con la capacidad quelante de estas moléculas [20]. El efecto fual de las TCs explica por qué moléculas como DXC pueden promover la mayor oxidación en una fracción, y en otros muestran incluso efectos reductores (TC y CTC al LMR y 1,5 LMR en CAS y PLs, respectivamente).

Las diferencias encontradas en el comportamiento oxidativo de los TC en función del tipo de fracción proteica (CAS y PLs) sugieren cuán importante llegan a ser las interacciones químicas entre los residuos de estos contaminantes con las proteínas objetivo. Las TCs, al tener una estructura química común (farmacóforo), comparten propiedades fisicoquímicas y una reactividad similar, la cual puede variar en función de los sustituyentes, los cuales pueden conferirle características distintivas a cada una de las moléculas.

6.3.4.2 Carbonilación inducida por los β-lactámicos

La carbonilación promovida por los β-LTs evaluados se muestra en la Figura 6.4. Los resultados obtenidos mostraron que todas las concentraciones evaluadas de estos antibióticos promovieron la carbonilación irreversible y significativa de las fracciones de CAS y PLs respecto al blanco ($p<0.05$). En ambas fracciones, DICL al 1.5 LMR y AMP al LMR indujeron la mayor y menor carbonilación, con ICs de (8.7 ± 0.16; 2.4 ± 0.26) y (54.1 ± 2.11; 10.7 ± 4.58) nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas en CAS y PLs, respectivamente.

Al comparar la carbonilación neta inducida por estos antibióticos (Tabla 6.6), se puede observar que el 100% de los β-LTs promovieron una carbonilación superior en la fracción del lactosuero ($p<0.05$), a las dos concentraciones evaluadas, las cuales fueron aproximadamente el doble en las muestras contaminadas con AMP y PBEN, y más del triple en las muestras enriquecidas con OXA y DICL. El daño oxidativo inducido por las TCs tuvo un comportamiento diferente en ambas fracciones de proteicas (CAS y PLs). A diferencia del comportamiento presentado por

las TCs, los β-LTs por su parte, indujeron ICs superiores al aumentar su concentración a 150 µg·L^{-1} en las muestras de leche bovina (p>0.05).

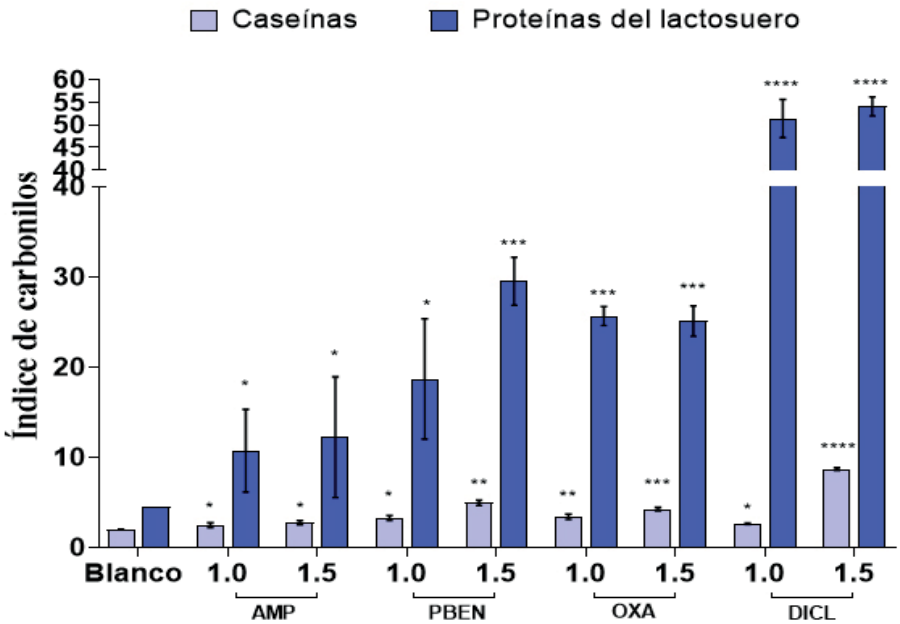


Figura 6.4 Comportamiento de los índices de carbonilo de las caseínas y proteínas del lactosuero de muestras de leche contaminadas con residuos de β-lactámicos. Los datos se expresan como la media ± DS (n: 3). Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos sobre las barras describen el nivel de significancia estadística obtenido al comparar el ICs de cada tratamiento vs el blanco (***** p <0.0001, *** p <0.005, ** p <0.01 y * p <0.05*). Una estrella sobre las barras denota ausencia de diferencias significativas entre el ICs del blanco y los tratamientos. AMP: Ampicilina; PBEN: Penicilina benzatínica; OXA: Oxacilina; DICL: Dicloxacilina.

6.3.4.3 Carbonilación inducida por los piretroides

Los valores de ICs promovidos por los residuos de los PTDs evaluados se describen en la Tabla 6.6 y se muestran en el gráfico de barras de la Figura 6.5. El daño oxidativo inducido por las PTDs tuvo un comportamiento diferente en ambas fracciones de proteicas (CAS y PLs). Al comparar la carbonilación neta inducida por estos contaminantes (Tabla 6.6), se puede observar que a diferencia de los antibióticos (TCs y β-LTs), el

83.3% (5/6) de los tratamientos indujo una mayor carbonilación en la fracción de CAS, solo la muestra contaminada con CIP al LMR presentó una mayor carbonilación en PLs ($p<0.05$).

En CAS, FLU al 1.5 LMR fue el tratamiento que indujo la mayor, con un IC de 74.9 ± 0.68 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas, el cual fue 13.0 veces superior al de la muestra blanco (5.7 ± 0.47 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas). Por otro lado, CIP al LMR fue el contaminante que indujo la menor carbonilación en esta fracción (12.8 ± 1.72 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas) la cual fue 2.2 veces superior al de la muestra blanco (Tabla 6.6, Figura 6.5).

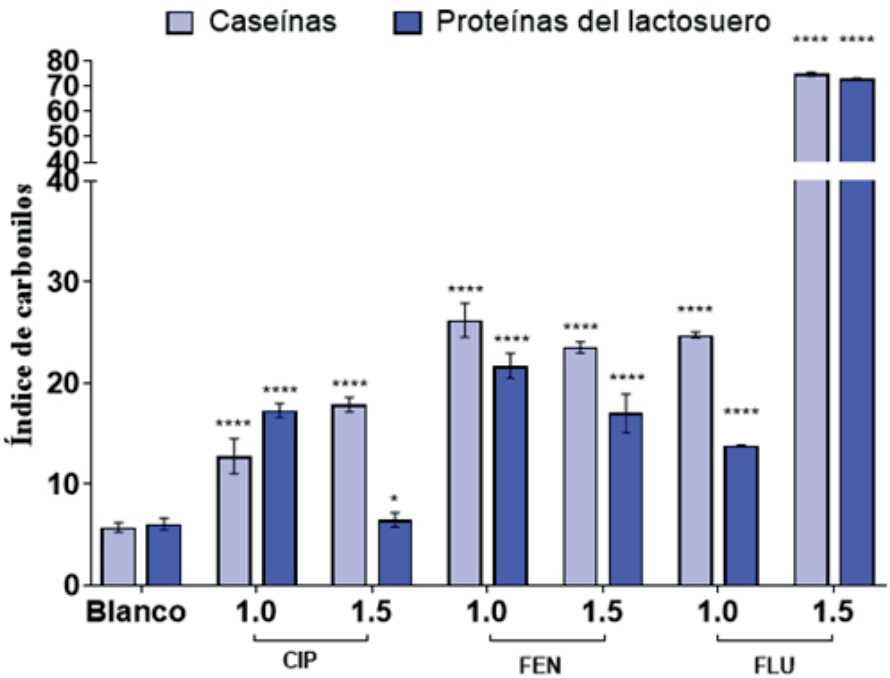


Figura 6.5 Comportamiento de los índices de carbonilo de las caseínas y proteínas del lactosuero de muestras de leche contaminadas con residuos de tetraciclinas**.** Los datos se expresan como la media ± DS (n:3). Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos sobre las barras describen el nivel de significancia estadística obtenido al comparar el ICs de cada tratamiento vs el blanco (***** p <0.0001, *** p <0.005, ** p <0.01 y * p <0.05*). Una estrella sobre las barras denota ausencia de diferencias significativas entre el ICs del blanco y los tratamientos. CIP: Cipermetrina; FEN: Fenvalerato; FLU: Flumetrina.

En el lactosuero por su parte al igual que en CAS, FLU al 1.5 LMR fue el tratamiento que indujo la mayor carbonilación en la fracción, seguido por FEN al LMR con ICs de 73.1 ± 0.07 y 21.7 ± 1.26 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas, los cuales fueron 12.0 y 3.6 veces superiores al de la muestra blanco. Por otro lado, CIP al 1.5 LMR fue el contaminante que indujo la menor carbonilación en esta fracción (12.1 ± 0.70 nmoles de carbonilo·mg^{-1} de proteínas) la cual fue 2.2 veces superior al de la muestra blanco.

6.3.4.4 Comparación de la carbonilación promovida por TCs, β-LTs y PTDs

Para comparar la carbonilación inducida por los contaminantes evaluados se calculó la relación entre los valores de carbonilación de las muestras contaminadas frente a la de los blancos (IC de muestras contaminadas /IC basal). Como se observa en la Tabla 6.6, en CAS los PTDs fueron los contaminantes que indujeron la mayor carbonilación (FLU 1.5 LMR> FEN LMR> DICL1.5 LMR> FLU LMR> CIP 1.5 LMR), con ICs que fueron 13, 4.7, 4.4, 4.3 y 3.1 veces superior al de la muestra blanco, respectivamente (Tabla 6.6). Al hacer un análisis entre el comportamiento oxidativo promovido por los contaminantes en esta fracción y sus propiedades fisicoquímicas, se pudo observar una tendencia creciente del ICs en función del coeficiente de partición octanol-agua (logP), el cual indica el carácter hidrofílico o hidrofóbico de una sustancia química. Se realizó un análisis de regresión lineal, bajo la hipótesis: el nivel de lipofilia de los contaminantes evaluados está directamente relacionado con su capacidad para promover la carbonilación de CAS y PLs, para esto, el logP de las TCs, β-LTs y PTDs obtenido de la base de datos ChemAxon se utilizó como independiente variable, y la carbonilación neta promovida por ellos en las proteínas analizadas fue la variable independiente.

Los resultados obtenidos en la regresión lineal mostraron una correlación positiva y significativa entre el logP y el ICs promovido por los contaminantes (r^2 = 45.42 P<0.0001), el valor del coeficiente de determinación ajustado (r^2) demostró que el 45.421% de la variabilidad observada en el

ICs es un producto del efecto del grado de lipofilia de los contaminantes (Figura 6.6). Las CAS constituyen la fracción insoluble de la leche bovina y están presentes en este fluido biológico, en forma de agregados coloidales heterogéneos (micelas de caseína), compuestos por sus cuatro componentes individuales (αs1-, αs2-, β- y κ-caseína) e iones calcio [21,22]. Esta disposición espacial optada por las CAS podría representar un impedimento estérico importante para el contacto de los residuos de aminoácidos de las cadenas laterales con los contaminantes, restringiendo el efecto oxidante de estos. De acuerdo con los modelos estructurales de las caseínas publicados actualmente, se conoce que solo la κ-caseína reside en la superficie de la micela, y en el interior se encuentran fracciones ricas en aminoácidos apolares [23], por ende, moléculas de una polaridad similar como los PTDs tendrán una mayor capacidad de interactuar con el núcleo de la micela, explicando así porque estos contaminantes fueron los que presentaron mayores valores de carbonilación en esta fracción.

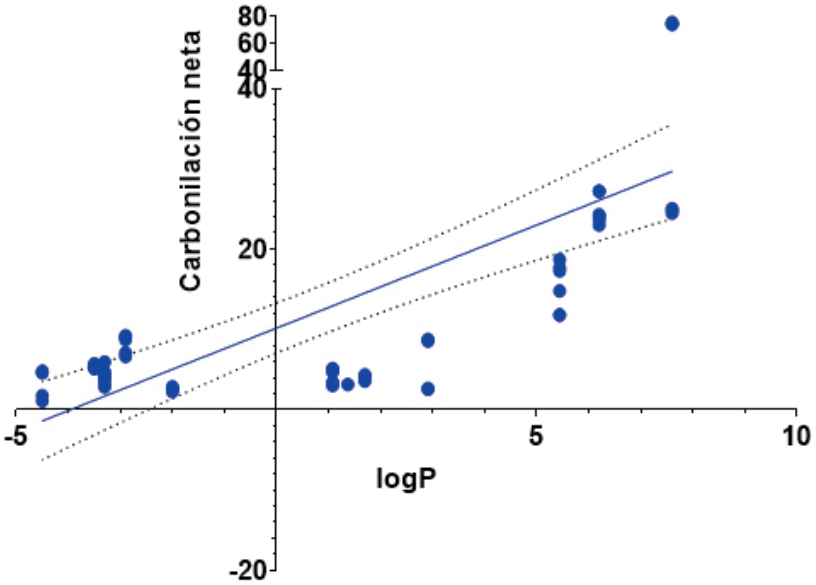


Figura 6.6 Análisis de regresión lineal realizado entre el índice de carbonilo promovido por residuos de Tetraciclinas, β-Lactámicos y piretroides sobre caseínas vs el LogP de estas sustancias. El modelo fue significativo para un valor de p<0,0001.

En las PLls también se observó una correlación entre logP y carbonilación de esta fracción (r^2 = 33.37, P = 0.008), esta fue menos significativa que la encontrada en CAS, es decir solo el 33.37% de la variabilidad observada en el ICs fue producto del grado de lipofilia de los contaminantes (Figura 6.7).

Según los resultados del análisis de regresión, el efecto del logP de los contaminantes evaluados sobre su capacidad oxidante es más marcado en CAS que en PLs, lo que respalda la hipótesis de la importancia de la lipofilia de estas moléculas, para interactuar con los aminoácidos internos en las micelas de CAS, y así promover su carbonilación, por el contrario, dado que los residuos de minoácidos de las PLs están más accesibles a los contaminantes, sin importar el nivel de lipofilia de los TC, todas las moléculas tendrán una capacidad similar para interactuar y ejercer su efecto oxidante.

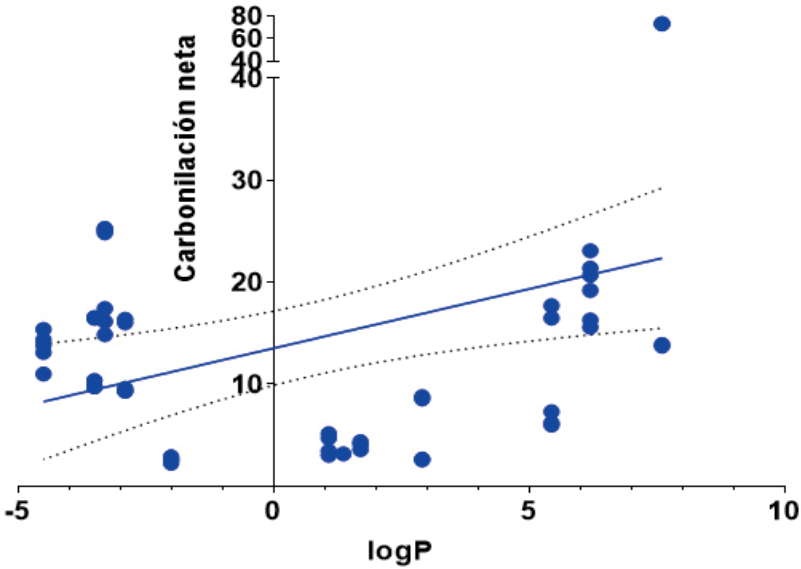


Figura 6.7 Análisis de regresión lineal realizado entre el índice de carbonilo promovido por residuos de Tetraciclinas, β-Lactámicos y piretroides sobre caseínas vs el LogP de estas sustancias. El modelo fue significativo para un valor de p<0,0001.

La carbonilación de proteínas es irreversible, de modo que no puede ser reparada por la maquinaria enzimática presente en los sistemas vivos que producen alimentos como la leche. Así, la carbonilación altera las propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales de las proteínas, ya que al alterar su estructura pueden modificar el metabolismo y por ende, el grado de absorción de sus aminoácidos a nivel intestinal. De igual manera el consumo de aminoácidos oxidados en la dieta se ha correlacionado con la incidencia de patologías inflamatorias a nivel intestinal.

6.4. Conclusiones

En el presente capítulo se demostró que la presencia de residuos de tetraciclinas (OTC, TC, CTC, DXC), β-lactámicos (AMP, PBEN, OXA, DICL) y piretroides (CIP, FEN Y FLU) a las concentraciones evaluadas inducen un daño oxidativo irreversible en las caseínas y proteínas del lactosuero de la leche bovina, al aumentar significativamente sus valores de índice de carbonilo, bajo el modelo de contaminación *in vitro* ensayado.

Los valores de ICs obtenidos demostraron que, incluso niveles de exposición aceptados como inocuos (LMR) estos contaminantes, promueven la carbonilación in vitro de caseínas y proteínas del lactosuero bovino. El comportamiento oxidativo inducido fue dependiente del tipo de fracción.

Por su parte, los piretroides flumetrina y fenvalerato indujeron la mayor carbonilación en caseínas, con índices de carbonilo que estuvieron 13 y 4.7 veces por encima del de la muestra blanco, respectivamente. Mientras que concentraciones equivalentes a 1.5 veces el LMR de dicloxacilina y flumetrina al 1.5 LMR indujeron la mayor carbonilación en la fracción del lactosuero.

En ambas fracciones proteicas se evidenció correlación positiva entre el índice de carbonilo promovido por los contaminantes vs su grado de lipofilia (logP), sin embargo, esta fue más marcada en la fracción de caseínas ($r^2 = 33.37$, $P = 0.008$).

Dado que los valores de concentración reportados como inocuos para estos contaminantes en la leche bovina (LMR), promovieron la carbonilación de caseínas y proteínas del lactosuero, se generan nuevas preocupaciones sobre la verdadera inocuidad de los LMRs de estas sustancias, en torno a los posibles efectos biológicos que resulten de la carbonilación de proteínas.

6.5 Referencias

1. Uyttendaele M, Franz E, Schlüter O. *Food Safety, a Global Challenge*. 2016, p. 2–7.
2. Marrugo, A., Méndez, D and Rodríguez, E. *Combined tetracycline and pyrethroid residues increases protein carbonylation in bovine milk*. International Dairy Journal, 2020; https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104708.
3. Commission THEE. Official Journal of the European Union L 15/1. 2010;(2377).
4. Bahmani K, Shahbazi Y, Nikousefat Z. *Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin*. Food Sci Biotechnol. 2019; Available from: https://doi.org/10.1007/s10068-019-00665-x.
5. Sachi S, Ferdous J, Sikder MH, Azizul Karim Hussani SM. *Antibiotic residues in milk: Past, present, and future*. J Adv Vet Anim Res. 2019;**6**(3): p. 315–32.
6. Sahebi H, Konoz E, Ezabadi A, Niazi A, Ahmadi SH. *Simultaneous determination of five penicillins in milk using a new ionic liquid-modified magnetic nanoparticle based dispersive micro-solid phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Microchem J. 2020;**154**, https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104605.
7. Jalili R, Khataee A, Rashidi MR, Razmjou A. *Detection of penicillin G residues in milk based on dual-emission carbon dots and molecularly imprinted polymers*. Food Chem. 2020; **314**: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126172.

8. Abbasi MM, Babaei H, Ansarin M, Nourdadgar A, Nemati M. *Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL*. Method S. 2011.

9. Das YK, Yavuz O, Atmaca E, Aksoy A, Office PM, Management P. *Tetracycline antibiotics in raw cow's milk produced in samsun tetracycline antibiotics in raw cow's milk produced in samsun province, Turkey*. Fresenius Environmental Bulletin. 2019; **28**(8): p. 5982- 5988.

10. Commission THE, The OF, Communities E. made exclusively from ewes' milk , goats' milk or buffalos' Cows' milk casein shall be held to be present , if the appa rent cows ' milk casein content of the sample to be whereas the import of cheeses made from ewes ' milk , goats ' milk or buffalos ' milk or mixtures of ewes ', goats ' provisions concerning cheeses made from ewes ' milk , goats' milk or buffalos' milk or mixtures of ewes ', goats '. 1996;(1081):15–25.

11. Alonso-Fauste I, Andrés M, Iturralde M, Lampreave F, Gallart J, Álava MA. *Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals*. J Proteomics. 2012;**75**(10): p. 3015–30.

12. Arena S, Renzone G, Novi G, Scaloni A. *Redox proteomics of fat globules unveils broad protein lactosylation and compositional changes in milk samples subjected to various technological procedures*. J Proteomics. 2011;**74**(11): p. 2453–75.

13. Bradford MM, Dong Y, Xu L, Liu S, Bai X, Bradford M, et al. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1976;**72**(1–2): p. 248–54.

14. Jovanovic S, Barac M, Macej O, Vucic T, Lacnjevac C. *SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments*. Sensors. 2007;**7**: p. 371–83.

15. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues J V., Marcos JC. *Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins*. Anal Biochem. 2014;**458**: p. 69–71.

16. Costa FF, Vasconcelos Paiva Brito MA, Moreira Furtado MA, Martins MF, Leal de Oliveira MA, Mendonça de Castro Barra P, et al. *Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching*. Anal Methods. 2014;**6(**6): p. 1666.

17. Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. J. Cell. Mol. Med. 2006, **10**(2): p. 389-4062006.

18. Milkovska-Stamenova S, Mnatsakanyan R, Hoffmann R. *Protein carbonylation sites in bovine raw milk and processed milk products*. Food Chem. 2017;**229**: p. 417–24.

19. Estévez M. *Protein carbonyls in meat systems: A review*. Meat Sci. 2011;**89(**3): p.259–79.

20. Wen B, Liu Y, Wang P, Wu T, Zhang S, Shan X, et al. *Toxic e ff ects of chlortetracycline on maize growth , reactive oxygen species generation and the antioxidant response*. J Environ Sci. 2012;**24**(6): p.1099–105.

21. De Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov A V. *Casein micelles and their internal structure.* Adv Colloid Interface Sci. 2012; p. 171–172.

22. Holt C. *Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species*. 2016;**60**: p. 2–13.

23. Ranadheera CS, Liyanaarachchi WS, Dissanayake M, Chandrapala J, Huppertz T, Vasiljevic T. *Impact of shear and pH on properties of casein micelles in milk protein concentrate*. Lwt. 2019; p. 108:370.

Capítulo 7
Alteración de la digestibilidad de proteínas como efecto de la carbonilación inducida por contaminantes ambientales en alimentos de origen animal

Albeiro Marrugo Padilla
Johana Márquez Lázaro
Erika Rodríguez Cavallo
Darío Méndez Cuadro

7.1 Introducción

La calidad y el valor biológico de las proteínas está descrita en la literatura como la capacidad de aportar aminoácidos en las proporciones adecuadas y necesarias para satisfacer los requerimientos del cuerpo humano, incluidas la síntesis de proteínas, el balance positivo de nitrógeno y el control de las funciones a nivel celular entre otras [1].

Dentro de las diferentes fuentes de proteínas encontradas actualmente en el mercado, las de origen animal como la carne, la leche y el huevo están clasificadas dentro del grupo de mayor calidad, en comparación con las proteínas vegetales (soja, trigo y arroz), esto se debe no solo al score de aminoácidos y a la abundancia relativa de aminoácidos esenciales, sino también por su alta digestibilidad, un proceso en el que el sistema digestivo las convierte a través de las enzimas en sus unidades fundamentales (aminoácidos) y oligopéptidos absorbibles en los enterocitos que conforman el intestino delgado [2].

La digestibilidad es una propiedad funcional que sin duda alguna repercute considerablemente en la calidad proteica, dado que, aunque la proteína posea un contenido adecuado de aminoácidos esenciales, si estos no poseen una buena digestibilidad, no podrán ser hidrolizados por las enzimas y por ende no se podrán absorber a nivel intestinal. Por ello organizaciones internacionales establecieron los métodos de puntuación de calidad de proteínas como el PDCAAS y el DIAAS [3]. Estos permiten comparar diferentes tipos de proteínas en función del cómputo químico (score) de aminoácidos esenciales y su respectiva digestibilidad. Alimentos de origen animal como la leche y el huevo la carne de res y pollo han sido reconocidos con los valores más altos en ambos puntajes [4-6].

Dada la importancia de la digestibilidad en la calidad de nutricional de las proteínas, resulta interesante evaluar si modificaciones irreversibles como la carbonilación, pueden ejercer algún impacto negativo sobre esta

propiedad funcional en alimentos de origen animal como la carne de res y músculo de pollo.

En capítulos anteriores de este libro se demostró que residuos de contaminantes ambientales como los antibióticos y pesticidas inclusive a valores de sus límites máximos de residuos (LMRs), son capaces de promover la carbonilación de proteínas insolubles del músculo de pollo y de las principales proteínas de la leche.

Por ello, en este capítulo mostraremos los resultados de experimentos dirigidos a evaluar las alteraciones en la digestibilidad *in vitro* de proteínas de la carne de res y el músculo de pollo como efecto de la carbonilación inducida por residuos de Enrofloxacino, Danofloxacino y Clorpirifós. Con el fin de brindar al lector el contexto bajo el cual se ubican los resultados obtenidos, revisaremos primero algunos aspectos fundamentales de funcionalidad de las proteínas alimentarias.

7.2. Propiedades funcionales de las proteínas de origen animal

Las propiedades de una proteína están determinadas en gran medida por su estructura tridimensional, la cual está especificada a su vez por su estructura primaria, es decir por la secuencia de aminoácidos que la constituyen. Existe en la actualidad numerosas propiedades descritas para las proteínas, estas van desde las propiedades biológicas, asociadas a las funciones ejercidas y/o reguladas en el organismo que las produce (solubilidad, especificidad, polaridad, carácter ácido-básico, estabilidad, regulación de pH entre otras), hasta las propiedades funcionales, relacionadas con el aporte nutricional de las proteínas en la dieta [7, 8].

En términos generales, las propiedades funcionales de las proteínas denotan cualquier atributo fisicoquímico capaz de afectar el comportamiento y característica de estas en los sistemas alimentarios, y por ende en los atributos de calidad del producto final. Estas propiedades guardan

interacciones estrechas con la composición, estructura, conformación y propiedades fisicoquímicas de las proteínas per se [9, 10]. La aplicación práctica que una proteína pudiese tener depende en gran medida de sus propiedades funcionales, ya que, en función de estas se le catalogará como una proteína de alta funcionalidad o no, jugando así un papel crucial en su aceptación por parte del consumidor. De acuerdo con algunos autores, las propiedades funcionales de las proteínas pueden agruparse en cinco grupos [11], así:

Grupo 1- Propiedades de hidratación. Estas se definen de acuerdo con la capacidad de la proteína para interactuar con el agua e incluyen propiedades como la sorción de agua, absorción y retención de agua, solubilidad, dispersabilidad, hinchamiento y viscosidad [12].

Dentro de las propiedades de hidratación, la solubilidad es una de las más importantes desde el punto de vista funcional, es definida termodinámicamente como la concentración de proteína presente en un disolvente en estado de equilibrio en un sistema de una o dos fases, a una temperatura y presión dadas [13].

De hecho, uno de los requisitos más importantes para la aplicación exitosa de aislados de proteínas en los alimentos es su alta solubilidad y depende de su punto isoeléctrico (PI) y del pH del medio. La solubilidad de una proteína es mínima en su PI, ya que en este la carga global es cero y la repulsión electrostática es baja, sin embargo, en todos los demás valores de pH, la repulsión electrostática entre las moléculas de proteínas individuales es alta y se mantienen en solución siempre que conserven su conformación nativa. Algunas proteínas de origen animal como la β-lactoglobulina y la ovoalbúmina, poseen alta solubilidad incluso alrededor de su PI, debiéndose a otras propiedades como el tamaño. Adicionalmente, factores externos como la fuerza iónica y componentes anexos en el alimento pueden influir también en la solubilidad de las proteínas [9, 12, 13].

Grupo 2- Propiedades que dependen de la interacción proteína-proteína. Estas propiedades son aquellas como la gelificación, coagulación, elasticidad, cohesividad, dureza y adhesividad, importantes principalmente para la elaboración de productos alimenticios a bases de proteínas [9, 12].

Grupo 3- Propiedades de superficie. Este grupo de propiedades dependen principalmente de la interacción de las proteínas con dos fases inmiscibles: agua/aceite, agua/aire, e incluyen la capacidad emulsificante, espumante y de formación de películas lipoproteínicas [12, 14].

Grupo 4- Propiedades estructurales. Estas propiedades se subclasifican a su vez en cuatro grupos. A) Tamaño, forma molecular, flexibilidad molecular y contenido de grupos azufrados B) Hidrofobicidad superficial y total, y el balance hidrofóbico/hidrofílico C) Los parámetros eléctricos, como son la carga neta y superficial y D) Parámetros termodinámicos, tales como la entalpía de desnaturalización y la temperatura de desnaturalización [12, 14].

Grupo 5- Propiedades nutricionales. Se refieren a la capacidad de aporte de aminoácidos esenciales por parte de las proteínas, entre ellas se incluyen el score de aminoácidos y digestibilidad de las proteínas [4].

7.3 Digestión y absorción de proteínas

La digestión de proteínas es un proceso complejo, cuyo fin último es la asimilación adecuada de los aminoácidos proporcionados en la dieta, comienza en el estómago y finaliza en el intestino grueso [4, 11]. Investigaciones recientes demuestran que este proceso es altamente eficiente cuando se trata de aminoácidos individuales o proteínas aisladas, puesto que restan solo de 10 a 20 minutos para observar aminoácidos en el torrente sanguíneo después de su ingestión, mientras que el consumo de proteínas presentes en los productos alimenticios, como la carne de res, huevos o productos lácteos, pueden requerir más de dos horas para que los aminoácidos se presenten en la sangre [3].

El proceso de digestión se inicia en el estómago con la hidrólisis de las proteínas en péptidos pequeños y eventualmente en aminoácidos que luego pueden ser fácilmente asimilados por el cuerpo humano, todo el proceso en si es orquestado por proteínas especializadas en la hidrólisis de los enlaces peptídicos que reciben el nombre de peptidasas. Este grupo de enzimas actúan en el estómago, el páncreas y el intestino delgado, en donde son secretadas como zimógenos que se activan por la escisión de una pequeña secuencia peptídica por parte de las enterocinasas secretadas en el líquido intestinal [4, 5].

La peptidasa pepsina es la enzima que actúa a nivel estomacal, activada gracias al pH ácido característico de este órgano. Otras enzimas importantes en el proceso son la tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxi-

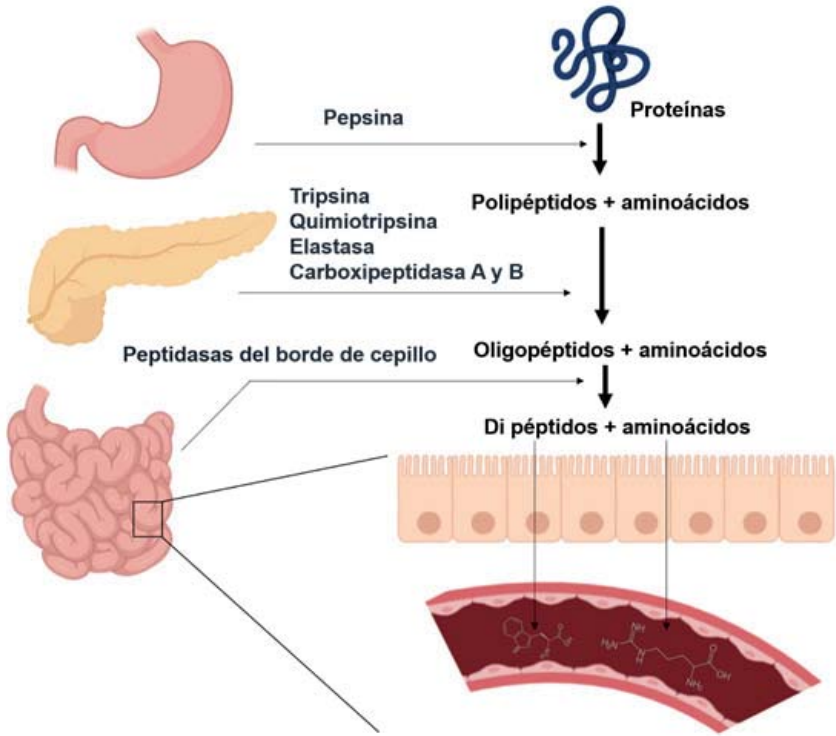


Figura 7.1 Proceso de digestión y absorción de proteínas.

peptidasa A y B, las cuales reconocen aminoácidos muy específicos a lo largo de la estructura primaria de sus sustratos y su complementariedad asegura la hidrólisis adecuada de las proteínas para liberar aminoácidos y oligopéptidos pequeños [4, 5].

Posterior a la hidrólisis gástrica, los péptidos y los aminoácidos se trasladan al intestino delgado en donde se convierten en sustrato de las aminopeptidasas que hidroliza los oligopéptidos cortos mediante la eliminación secuencial de aminoácidos N-terminales, estas enzimas son altamente específicas para los péptidos que contienen prolina. El yeyuno es la parte media del intestino delgado, donde se absorben más rápida y eficientemente los aminoácidos y oligopéptidos finales de la digestión a través de los enterocitos que constituyen los bordes de cepillo de este órgano (Figura 7.1) [4, 5].

Las proteínas, oligopéptidos e incluso aminoácidos libres que no hayan sido digeridos y absorbidos en el intestino delgado, eventualmente terminan en el intestino grueso, donde serán metabolizados por el microbiota intestinal [4, 5].

Tabla 7.1 Principales enzimas digestivas**.**

Órgano productor	Enzima	Sustrato
Estómago	Pepsina	Proteínas
	Renina	Caseínas
Páncreas	Tripsina	Proteínas
	Quimiotripsina	
	Carboxipeptidasas	
Intestino delgado	Enterocinasa	Polipéptidos
	Aminopeptidasa	
	Polipeptidasa	
	Dipeptidasa	Dipéptidos

7.4 El papel de la digestibilidad sobre la calidad de las proteínas alimentarias

La calidad y el valor biológico teórico de una proteína se establece principalmente mediante la puntuación de aminoácidos (PA), definida como la relación entre el contenido de aminoácidos esenciales y la cantidad total de aminoácidos presentes en la misma [1]. Sin embargo, en términos prácticos, la calidad de la proteína no solo depende de su composición de aminoácidos, sino también de la digestibilidad y la absorción de los productos de la hidrólisis enzimática. En este sentido una proteína puede tener un perfil de aminoácidos muy bueno, es decir, contener todos los aminoácidos esenciales y a su vez, no poseer una adecuada digestibilidad y asimilación de estos [3].

Por lo anterior, los organismos rectores y reguladores como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han establecido diferentes metodologías de puntuación de calidad de proteínas, las cuales tienen en cuenta ambos factores, tanto la composición de aminoácidos como la digestibilidad. La puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de la proteína (PDCAAS) es uno de los métodos recomendados por la FAO, este método fue propuesto en 1991 y compara el perfil de aminoácidos de una proteína en estudio con las necesidades del niño mayor a un año, al representar los requerimientos más exigentes de los diferentes grupos etarios a excepción de los lactantes que se comparan con la leche humana [1, 15]. El PDCAAS es recomendado por los comités de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Universidad de las Naciones Unidas (UNU) y el Comité del Codex sobre Proteínas Vegetales (CCVP), así como por las agencias reguladoras de varios países, para la evaluación rutinaria de la calidad de las proteínas en humanos [16, 17].

Las proteínas de la leche y del huevo, al contener proporciones adecuadas de los nueve aminoácidos esenciales y poseer una alta digestibilidad, ha recibido el PDCAAS máximo (1.0), mientras que la soja y la carne de res

tienen valores de 0.91 y 0.92, respectivamente, el trigo al ser deficiente en aminoácidos esenciales como la lisina, tiene un PDCAAS de solo 0.42 (Tabla 7.2) [1, 15, 18].

Aunque el PDCAAS ha demostrado ser útil, ha sido criticado en varios aspectos, el primero de ellos por utilizar estimaciones fecales en lugar de ileales de la digestibilidad de las proteínas, dado que la digestibilidad ileal es más precisa en comparación con las estimaciones de la digestibilidad fecal. En segundo lugar, los valores de digestibilidad de proteínas son menos precisos que los valores de digestibilidad de aminoácidos, en tercer lugar, el nitrógeno fecal metabólico no tiene en cuenta con precisión las proteínas endógenas que se pierden en la luz intestinal y están presentes en el íleon y las heces, y en cuarto lugar, se ha cuestionado el uso de los requisitos de aminoácidos del niño de 1 a 2 años para estimar los valores de PDCAAS para todos los humanos y la precisión de esas estimaciones de requisitos [15].

Dada las limitaciones descritas anteriormente, la FAO ha propuesto que el PDCAAS se reemplace por la puntuación de aminoácidos indispensables digeribles (DIAAS, por sus siglas en ingles), que se basa en la verdadera digestibilidad del aminoácido ileal determinada para cada aminoácido individualmente, y la disponibilidad de Lys estimaciones, utilizando puntajes no truncados para ingredientes alimenticios [3, 15, 19].

El DIAAS compara el contenido de todos los aminoácidos esenciales digeribles en una proteína con el nivel de estos aminoácidos digeribles en una proteína de referencia. La proteína de referencia tiene una secuencia de aminoácidos indispensable similar al perfil requerido por un niño de 0.5 a 3 años. Este puntaje más reciente se considera superior al PDCAAS ya que utiliza la verdadera digestibilidad ileal en lugar de la digestibilidad fecal de las proteínas [16, 17]. El uso de DIAAS para la evaluación de la aptitud de una proteína revela la calidad superior de las proteínas animales, por ejemplo, la leche entera en polvo tiene un DIAAS de 122, en comparación con 64 y 40 para los guisantes y el trigo, respectivamente [19].

7.5 Factores que afectan la digestibilidad de las proteínas

En general, la digestibilidad y el resto de las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por numerosos factores que se pueden clasificar en dos grupos: intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos están relacionados con la composición y secuencia de aminoácidos de las proteínas, junto con su forma, tamaño, relación entre hidrofobicidad/hidrofilia, conformación y reactividad. Por otro lado, los factores extrínsecos que pueden afectar las propiedades funcionales de la proteína incluyen el pH, la fuerza iónica, temperatura, conformación, la relación entre hidrofobicidad/hidrofilia, el método de extracción y los procesos asociados al procesamiento de los alimentos [20, 21].

Tabla 7.2 Valores de PDCAAS y DIAAS para proteínas de alimentos y proteínas aisladas.

Alimento	PDCAAS	DIAAS	AA limitante
CPL	1.00	1.18	Met + Cys
APLS	1.00	1.09	Val
APS	0.98	0.90	Met + Cys
CPG	0.89	0.82	Met + Cys
CPA	0.42	0.37	Lys
Leche entera	1.00	1.14	Met + Cys
Pechuga de pollo	1.00	1.08	Trp
Huevo	1.00	1.13	His
Guisante cocido	0.60	0.58	Met + Cys
Arroz cocido	0.62	0.59	Lys
Almendras	0.39	0.40	Lys
Garbanzos	0.74	0.83	Met + Cys

CPL: Concentrado de proteína de leche; APLS: Aislado de proteína de suero; APS, aislado de proteína de soja; CPG: Concentrado de proteína de guisante; CPA: Concentrado de proteína de arroz.

Fuente: Tabla construida con la informacion reportada por Phillips, 2017 [18]

Factores intrínsecos. La composición y secuencia de aminoácidos de las proteínas es un factor determinante en su digestibilidad. Las peptidasas responsables del metabolismo de las proteínas a menudo muestran una alta especificidad para hidrolizar los enlaces peptídicos que están cerca de un tipo específico de aminoácido. La pepsina, por ejemplo, actúa hidrolizando los enlaces peptídicos en el extremo amino terminal de aminoácidos no polares como leucina, fenilalanina, tirosina y triptófano, mientras que la tripsina, escinde los enlaces peptídicos en el extremo del carboxilo terminal de los aminoácidos básicos: lisina y arginina [22], por ende los perfiles de aminoácidos de las proteínas dictan la susceptibilidad a la digestión de la misma [14].

Por otro lado, la estructura tridimensional de la proteína representa a su vez un factor importante en el grado de digestibilidad de esta, el plegamiento y/o la agregación de proteínas, generalmente estos restringen el acceso a los sitios catalíticos de las enzimas impidiendo su hidrólisis; proteínas lácteas como la β-lactoglobulina y la α-lactoalbúmina son resistentes a la digestión por factores asociados a su tamaño, composición de aminoácidos y estructura cuaternaria. Además del score de aminoácidos, los enlaces peptídicos deben ser fácilmente accesibles a las peptidasas, que son proteínas ricas en prolina, reducen la flexibilidad de la cadena de proteínas y son conocidos por su alta resistencia contra la hidrólisis enzimática [3].

Factores extrínsecos. Sin duda alguna, factores relacionados con el medio en el que se encuentren las proteínas influirán drásticamente en su digestibilidad. El pH, la fuerza iónica y la temperatura por ejemplo influyen en la conformación adoptada por la proteína, y su capacidad de interacción con otras moléculas presentes en el medio que pueden influir la accesibilidad adecuada de las enzimas [3]. El procesamiento de alimentos es un factor extrínseco que ejerce un efecto sustancial en la alteración de la digestibilidad proteica. Diferentes investigaciones han demostrado que los métodos de producción de alimentos modifican las propiedades funcionales de las proteínas que la constituyen, incluidas las solubilidad y digestibilidad [23-26].

El ultrasonido, por ejemplo, es una técnica nueva, usada en la tecnología alimentaria como método de procesamiento no térmico, que utiliza ondas de sonido con frecuencias superiores al umbral del oído humano. Este método se puede aplicar en diferentes modalidades de alta y baja intensidad, y frecuencia, de modo que se promuevan mejores tiempos, así como una mejor transferencia de energía para aumentar la producción de los alimentos. Es empleado a su vez en los procesos de esterilización de alimentos como la leche, sin embargo, pese a la evidencia existente que respalda la efectividad de la sonicación, diferentes estudios han demostrado que estas condiciones operativas son capaces de influir en las propiedades tecnológicas y funcionales de las proteínas, incluida su digestibilidad [27].

Los procesos térmicos tradicionales usados para la esterilización y control del crecimiento de microrganismos patógenos en alimento procesados, recientemente se han asociado con la formación de productos resultantes de la reacción de Maillard, que sucede entre los azúcares y proteínas de los alimentos. Los conjugados de proteína-sacárido tipo Maillard son inevitables durante el procesamiento de alimentos y los métodos de fabricación, y se han relacionado con la alteración de las propiedades funcionales de las proteínas, incluidas nuevamente la solubilidad y la digestibilidad [3, 28].

7.6 Efecto de la carbonilación de proteínas sobre su digestibilidad

La carbonilación es uno de los principales biomarcadores de estrés oxidativo en proteínas alimentarias [29, 30]. Como se describió en los capítulos 5 y 6, los residuos de plaguicidas y antibióticos promueven la aparición de grupos carbonilo en las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en proteínas musculares de la carne de pollo y las caseínas y lactoglobulinas de la leche bovina, respectivamente.

El incremento de grupos carbonilo en las proteínas de alimentos da como resultado la alteración estructural y metabólica de estas, conduciendo

a varios problemas sensoriales, tecnológicos y nutricionales. Resultados recientes de trabajos de investigación han planteado la hipótesis de si la aparición de grupos carbonilo en los sistemas cárnicos puede no solo afectar los atributos sensoriales o tecnológicos de la carne, sino también la salud y la seguridad del público consumidor [31-33].

La carbonilación de proteínas también puede estar asociada con la formación de agregados moleculares y con la reticulación de proteínas, en las cuales la cisteína juega un papel crucial. Una de las propiedades más afectadas por la formación de agregados proteicos es la digestibilidad y solubilidad, lo cual repercute en las propiedades tecnológicas, sensoriales, funcionales y nutricionales de alimentos como la carne y la leche [31, 34].

De acuerdo con las investigaciones desarrolladas por Utrera et al (2012), la carbonilación de proteínas desempeña un papel importante en la calidad sensorial de los jamones cocidos [35]. A su vez, la oxidación de proteínas en alimentos a base de músculo de aves y bovinos se ha relacionado con la pérdida de la funcionalidad de las proteínas, incluida la solubilidad, la viscosidad, la gelificación, la emulsión y las capacidades de retención de agua, dando como resultados una disminución importante en la calidad tecnológica y funcional de la carne. Múltiples cambios fisicoquímicos en la proteína pueden ser inducidos por la oxidación, incluida la destrucción de aminoácidos, la polimerización de proteínas, la pérdida de la actividad enzimática y la digestibilidad de proteínas alterada [31]. Del mismo modo, la oxidación de proteínas en la carne y los productos cárnicos puede conducir a una disminución de la calidad sensorial debido a la reducción de la ternura y la jugosidad, el deterioro del sabor y la decoloración [31, 33, 36].

7.7. Materiales y Métodos

7.7.1 Reactivos y materiales

- Danofloxacina (DANO, 75.1%), Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU)
- Enrofloxacina (ENRO, 99.7%), (Bayer AG)
- Clorpirifós (CPF), Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Pepsina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- α-quimotripsina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Tripsina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- α-amilasa salival de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Pepsina porcina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- α-amilasa pancreática porcina, de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Lipasa pancreática porcina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Bilis porcina de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.)
- Fosfato de potasio
- Azida de sodio
- Ácido clorhídrico
- Bicarbonato de sodio
- Cloruro de calcio, PanReac® (Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- 2-mercaptoetanol
- Azul brillante Coomassie G250
- Ácido tricloroacético (TCA) de Merck® (Darmstadt, Alemania)
- Dodecilsulfato de sodio
- Tris Base y Glicerol, Amresco® (West Chester, PA, EE. UU.)
- Ácido ortofosfórico, Scharlab (Barcelona, España)
- Marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range, Thermo Scientific (Waltham, MA, EE. UU.)

La Figura 7.2 muestra la estructura química de sustancias bajo estudio.

7.7.2 Equipos

- Balanza de precisión (BJ 1000C)
- Balanza semimicro (ES 225-SM-DR, Precisa)
- Shaker (FinePCR, Korea)
- Vórtex (Clasic Vortex mixer,VELP Scientífica, USA)
- Procesador de alimentos (Cusinart, China)
- Centrífuga refrigerada (Labtechnologies, Alemania)
- Cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Sistema fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Digestor Carousel 6 Plus Reaction Station (Radleys, UK).

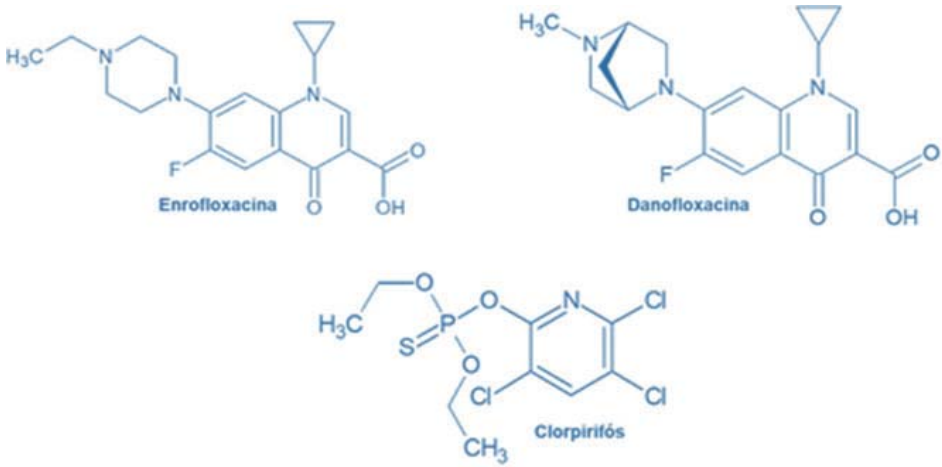


Figura 7.2 Estructura química de las sustancias bajo estudio

7.7.3 Digestión gastrointestinal simulada

El ensayo de digestión simulada fue realizado en dos variantes, como se describe a continuación:

7.7.3.1 Digestión gastrointestinal simulada de proteínas aisladas

Para este ensayo fueron empleadas proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares extraídas de muestras de carne blanco y contaminadas con Enro-

floxacina y Danofloxacina a 100 y 200 µg·Kg^{-1}, respectivamente. En la fase gástrica, soluciones individuales de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares a concentraciones de 1.4 µg·$µL^{-1}$ y volumen final de 1,1 mL fueron acidificadas con HCl 0,01N hasta pH: 3,0. Seguido, fue añadido pepsina a concentración final de 0.0027 U·mL^{-1} y la solución obtenida fue incubada en baño de María a 37°C con agitación constante. La fase gástrica fue detenida al ajustar la solución a pH: 7,0 con $NaHCO_3$ 200 mM / $CaCl_2$ 50 mM. En este último paso fueron tomadas alícuotas de ambas fracciones para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 15% (SDS-PAGE).

En la fase intestinal fue añadida a la solución proteica alcalinizada, tripsina y quimiotripsina a concentraciones finales de 0,50 U·mL^{-1} y 0,25 U·mL^{-1}, respectivamente. La mezcla final fue incubada en baño de María a 37°C con agitación constante. La reacción de digestión fue detenida por calentamiento a 80°C durante cinco minutos y al finalizar alícuotas de cada fracción fueron tomadas para ser monitorizadas por electroforesis SDS-PAGE al 15%. Los ensayos de digestión de ambas fracciones proteicas fueron realizados por duplicado (Figura 7.3) [37].

Las fracciones digeridas procedentes de las fases gástricas e intestinales fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE al 15%. Para esto, alícuotas de 10 µL de las fases gástrica e intestinal de cada fracción proteica fueron cargadas en geles de 15%. Los geles fueron discriminados por tipo de proteína y al inicio de estos fue cargada proteínas blanco digerida y marcador de peso molecular. Los geles fueron corridos por espacio de una hora y media a 1.5 V en una cámara de electroforesis. Al finalizar los geles fueron teñidos con azul de Comassie y digitalizados en el sistema ChemiDoc.

Las bandas obtenidas fueron analizadas densitométricamente con ayuda del software Image Lab y por cada contaminante fueron seleccionadas aquellas que correspondían a bandas oxidadas de acuerdo con los resultados de ensayos de western blot/espectrometría de masas, realizados previamente [37]. Por cada banda fue calculado el porcentaje

de digestibilidad y porcentaje de restricción a la digestibilidad, de acuerdo a la siguiente ecuación [37]:

$$\%\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Intensidad de la banda digerida}}{\text{Intensidad de la banda no digerida}} \times 100$$

Las bandas no digeridas hacen referencia a aquellas procedentes de las muestras blanco de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares que no fueron sometidas al proceso de digestión.

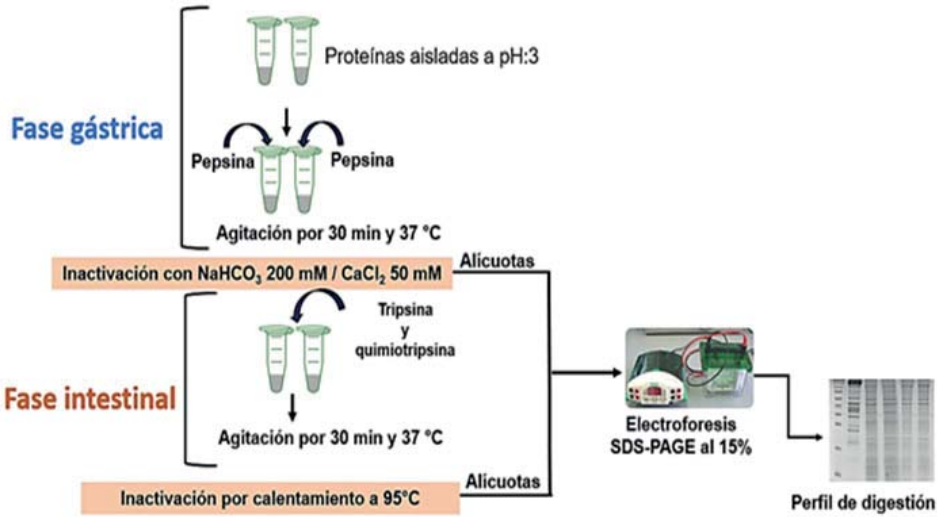


Figura 7.3 Esquema del procedimiento de digestión de proteínas aisladas.
Fuente: Construida por los autores a través de imágenes propias y tomadas del link https://www.labicons.net/microcentrifuge-tubes/conical-eppendorf/doc/conical-eppendorf-v3.html

7.7.3.2 Digestión gastrointestinal simulada de proteínas no aisladas

Para este ensayo no se realizó el fraccionamiento de las muestras de pechuga de pollo suplementadas y no suplementadas con Clorpirifós a concentración 100 µg·Kg^{-1}. Aquí un único extracto total de proteínas se obtuvo con ayuda de un tampón de alto poder de disolución (50 mM Tris-HCl, 6M Urea y 1M Tiourea, pH 8.0) fueron obtenidas y sometidas al ensayo de digestión en un aparato digestor. En la fase gástrica, las muestras fueron resuspendidas en 10 mL de HCl 0,01 N, pH 3,0. Seguido,

se añadió la pepsina hasta alcanzar una concentración final de 2000 $U{\cdot}mL^{-1}$ y a la solución resultante fueron adicionados 15 µL de $CaCl_2$ 50 mM. Después de 30 minutos de agitación a 37°C y constante agitación, la pepsina fue inactivada al ajustar el pH de la mezcla a 7,0 empleando NaOH 1,0 M.

La fase intestinal fue simulada por adición de tripsina (100 $U{\cdot}mL^{-1}$), quimiotripsina (25 $U{\cdot}mL^{-1}$), α-amilasa pancreática (200 $U{\cdot}mL^{-1}$), lipasa pancreática (2000 $U{\cdot}mL^{-1}$), extracto de bilis (10 mM) y 70 µL de $CaCl_2$ 50 mM. Seguido, esta mezcla fue incubada a 37°C con agitación constante durante 30 minutos. La reacción de digestión fue terminada por calentamiento a 95 °C durante dos minutos. Con el propósito de obtener los péptidos digeridos, fueron adicionados tres volúmenes de etanol y la mezcla resultante fue incubada a 4°C por 20 horas. Después la mezcla fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue secado, liofilizado y almacenado a -20°C para su posterior uso en los ensayos de espectrometría de masa en tándem. Cada experimento fue realizado por duplicado (Figura 7.4).

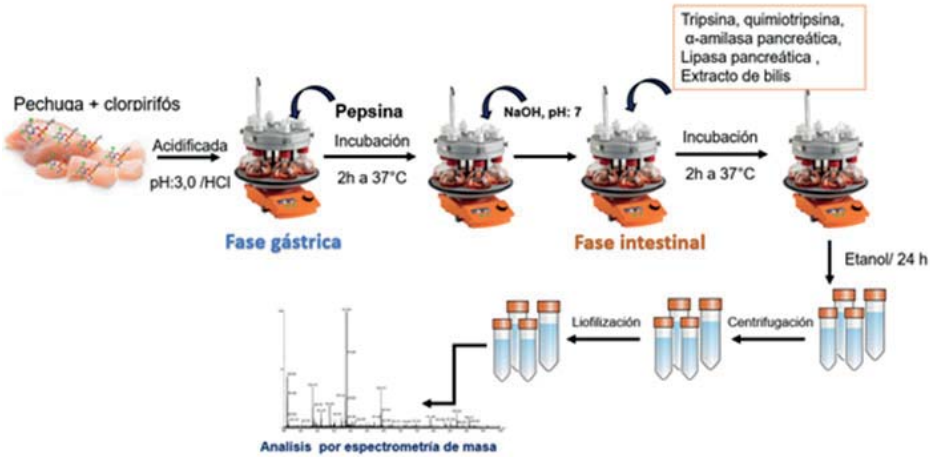


Figura 7.4 Esquema del procedimiento de digestión simulada de proteínas no aisladas. Fuente: Construida por los autores a través de imágenes propias y tomadas de los links:https://okdiario.com/recetas/pechuga-pollo-salsa-agridulce-3311213 https://heidolphna.com/en_US/products/Carousel-6-Plus-Reaction-Station~c24816 http://es.gofreedownload.net/free-vector/vector-clip-art/falcon-tube-clip-art-123386/

7.7.4 Identificación de péptidos digeridos por espectrometría de masas en tándem

Los péptidos obtenidos de la digestión GI simulada se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). Para esto fueron cargados en una columna analítica (columna LC, 3 µm, C18-CL, 75 µm x 12 cm, Nikkyo) equilibrada en ACN 5% FA 0.1% (ácido fórmico). La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de 5 a 35% de B en A durante 60 minutos. (A: FA 0.1%; B: ACN, 0.1% FA) a una velocidad de flujo de 300 $nL{\cdot}min^{-1}$. La muestra se ionizó aplicando 2,8 kV al emisor de pulverización. El análisis fue realizado en modo DDA. Los scans obtenidos en MS1fueron de 350–1250 m/z durante 250 ms. La resolución cuadrupolo fue establecida en "UNIDAD" para los experimentos de MS2, donde los scans fueron obtenidos entre 100 y 1500 m/z durante 50 ms en modo de "alta sensibilidad". Los criterios de cambio fueron la carga de 1+ a 5+, y una intensidad mínima de 70 recuentos por segundo (cps). Fueron seleccionados hasta 25 iones por fragmentación después de cada scan. La exclusión dinámica fue establecida en 15 segundos. La sensibilidad del sistema fue controlada a 2 fmol de 6 patrones de proteína (LC Packings) [37].

Los datos de todos los ensayos se presentan con la media ± desviación estándar.

7.8 Resultados y Discusión

7.8.1 Efecto de la carbonilación inducida por enrofloxacina y danofloxacina sobre la digestión simulada de proteínas aisladas de carne bovina

Con el propósito de evaluar el efecto de la carbonilación inducida por residuos de Danofloxacina y Enrofloxacina sobre la digestibilidad *in vitro* de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares de carne bovina se seleccionaron bandas representativas en ambas fracciones (Figuras 7.5 y 7.6). Estas bandas fueron escogidas de acuerdo a ensayos de western blot

y espectrometría de masa realizados por Marquez y Col (2020), donde estas bandas mostraron estar carboniladas [37, 38].

En el caso de las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares expuestas a Danofloxacina se encontró una disminución en las intensidades de las bandas seleccionadas tanto en la fase gástrica como intestinal (Figura 7.5).

El análisis cuantitativo de estas bandas mostró que las proteínas sarcoplásmicas expuestas a DANO (Figura 7.5a) tuvieron un porcentaje de digestión en fase gástrica entre 11,8% y 38,7%, mientras que el blanco no contaminado se situó entre 63,8% y 91,1%.

Dentro de las bandas seleccionadas, la 1 (piruvato quinasa) y 2 (creatina quinasa) fueron las que presentaron los menores porcentajes de digestión (11,8% y 17,3%, respectivamente). En la fase intestinal, el porcentaje de digestibilidad de las proteínas sarcoplásmicas varió entre 64,0 y 81,4% para las expuestas y entre 79,4 a 96,9% para el blanco. Las bandas 1, 4 y 6 presentaron los porcentajes más bajos de digestión (64,0, 64,1 y 67,8 %, respectivamente). Estas bandas corresponden a las proteínas piruvato quinasa, creatina quinasa y la mezcla creatina quinasa M + actina.

En el caso de las proteínas miofibrilares expuestas a Danofloxacina solo la fase gástrica mostró un decremento en la digestibilidad (1b), siendo las bandas 3, 7 y 8 las más afectadas y cuyos porcentajes de digestión fueron de 36,5, 10,1 y 41,1%, respectivamente. Las bandas antes mencionadas corresponden a fructosa bisfosfato de aldolasa (banda 3), piruvato quinasa (banda 7) y la mezcla del dominio Wh2-actina + beta-enolasa (banda 8).

En lo que respecta a las proteínas expuestas a Enrofloxacina el análisis de digestibilidad fue realizado sobre cuatro bandas, como lo muestra la Figura 7.6. En la fase gástrica (7.6a), las proteínas sarcoplásmicas tuvieron bajos porcentajes de digestibilidad (3,9 a 38,0%) con respecto al blanco (63, 8 a 91, 1%). Dentro de las bandas seleccionadas, fructosa bisfosfato aldolasa (banda 5) fue la proteína con el menor porcentaje de digestión (13,9%); comportamiento que se mantuvo en la fase intestinal. En el caso

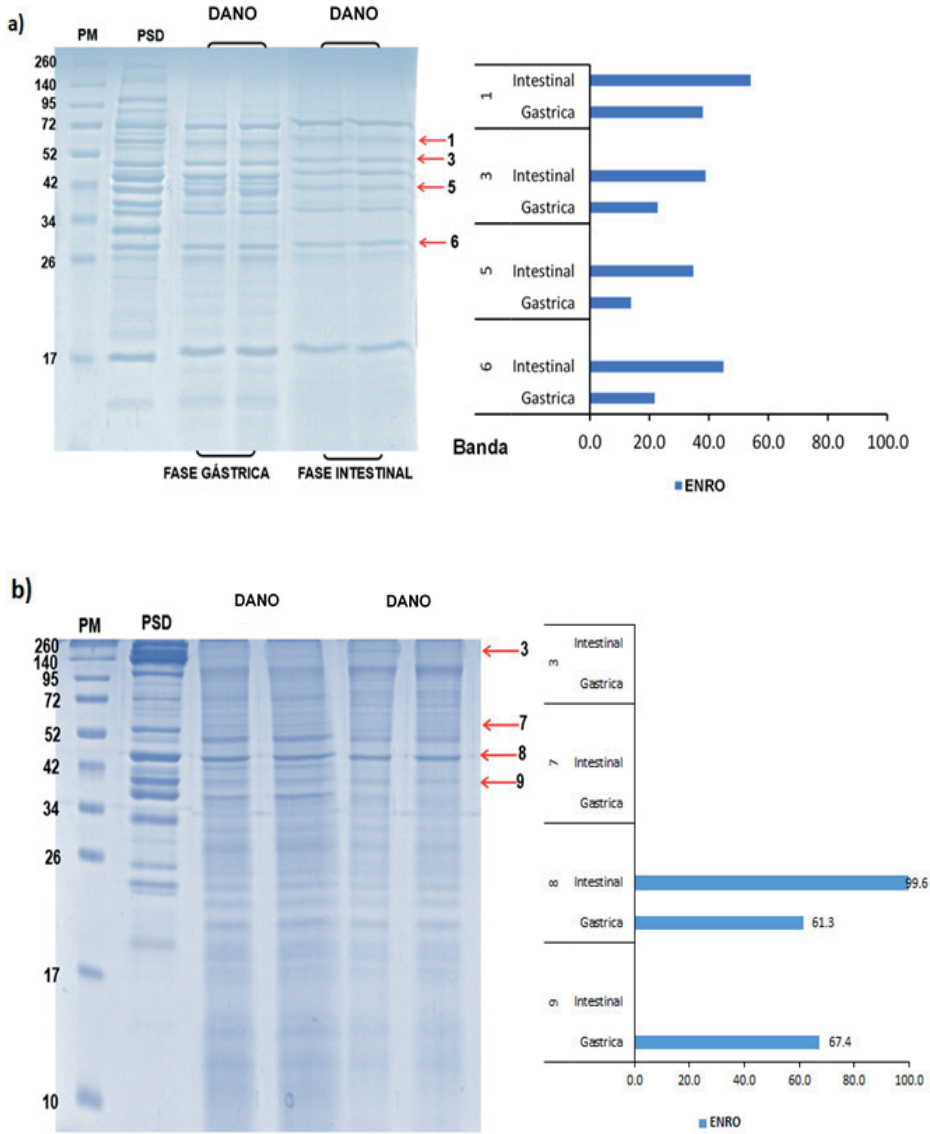


Figura 7.5 Digestión simulada de proteínas de carne bovina expuestas a 200 µg·Kg^{-1} de Danofloxacina. (a) proteínas sarcoplasmáticas y (b) miofibrilares sometidas a digestión gástrica e intestinal. Los perfiles electroforéticos de digestión se realizaron por SDS-PAGE al 15%. Las flechas rojas indican bandas seleccionadas para el seguimiento de su digestión. PM: marcador de peso molecular; PSD: proteína sin digerir.

de las proteínas miofibrilares solo la banda 8 mostró una leve disminución en el porcentaje de digestión en ambas fases de (61,3%) [37, 38].

Al comparar los efectos inducidos por DANO y ENRO sobre la digestión de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares se observó una menor digestibilidad en las primeras; comportamiento asociado a los altos niveles de carbonilación experimentados por estas al estar en contacto con las fluoroquinolonas [37, 38], demostrando de esta forma la influencia de la carbonilación en la digestión proteica.

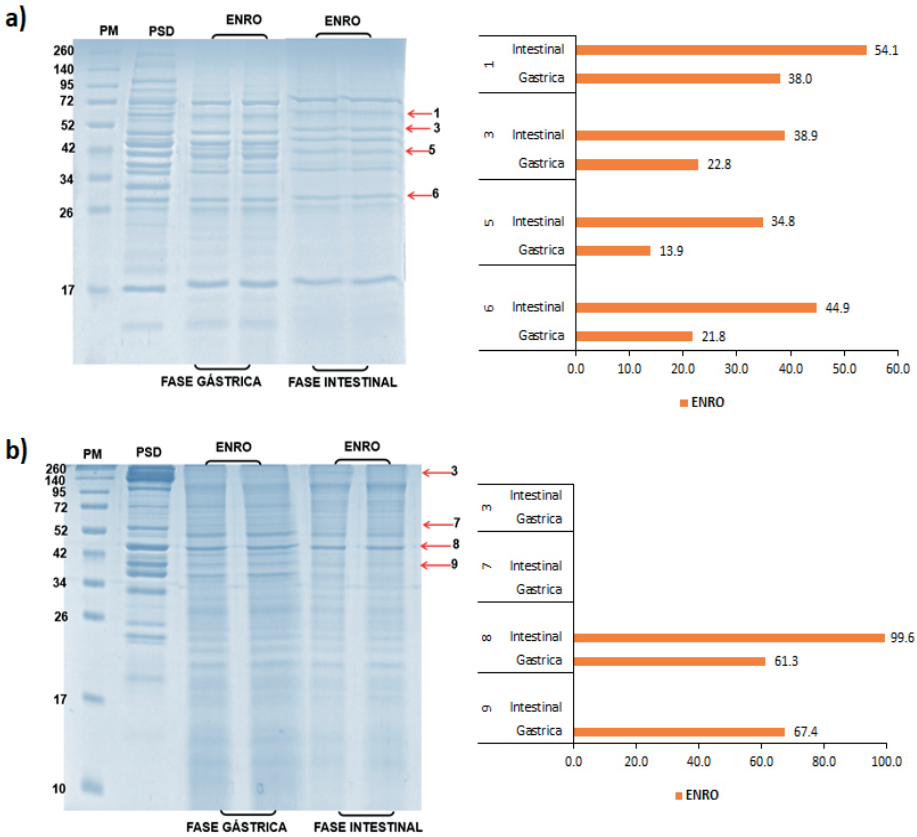


Figura 7.6 Digestión simulada de proteínas de carne bovina expuestas a 100 µg·Kg-1 de Enrofloxacina. (a) proteínas sarcoplasmáticas y (b) miofibrilares sometidas a digestión gástrica e intestinal. Los perfiles electroforéticos de digestión se realizaron por SDS-PAGE al 15%. Las flechas rojas indican bandas seleccionadas para el seguimiento de su digestión. PM: marcador molecular; PSD: proteína sin digerir.

7.8.2 Efecto de la presencia de residuos de Clorpirifós en la oxidación de péptidos digeridos

Los efectos oxidativos de la presencia de Clorpirifós en proteínas totales de pechuga de pollo fue evaluado en la cantidad de péptidos oxidados obtenidos después de la digestión simulada y su posterior análisis por espectrometría de masa (Figura 7.7). En esta se puede observar que, las muestras expuestas a Clorpirifós tuvieron un mayor número de péptidos oxidados que el control, evidenciándose el poder oxidante de este contaminante.

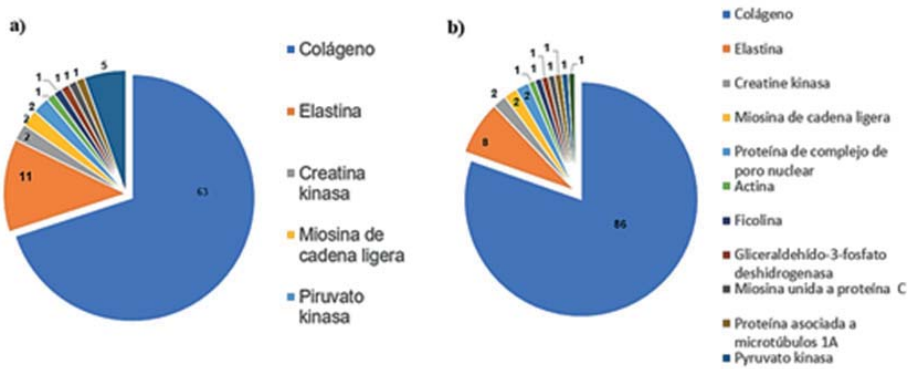


Figura 7.7 Distribución de los péptidos oxidados identificados por nLC-MS / MS después de la digestión según su proteína de origen: a) control y b) muestras expuestas.

Este hecho reviste importancia, dado que la ingesta de proteínas oxidadas ha sido relacionada con la alteración en las vías de señalización celular, flora intestinal, estado redox del tejido intestinal y la formación de aductos con ADN, lo cual conduce a la modificación de la expresión génica, así mismo podría influir en la biodisponibilidad de los aminoácidos esenciales presentes en las proteínas de la carne [37].

Tanto en las muestras como el control, el mayor número de péptidos oxidados fueron derivados del colágeno, proteína que representa aproximadamente el 10% del volumen del músculo esquelético y cuya función está asociada con la matriz extracelular (MEC).

A nivel de músculo, la MEC organiza las fibras y participa como mecanismo de retención durante la deformación. En este sentido, la oxidación del colágeno promovida por los residuos de Clorpirifós podría disminuir la ternura de la carne, debido a que la oxidación de este ha sido relacionada con dicho fenómeno [39].

7.9 Conclusiones

La carbonilación de proteínas inducida por los antibióticos Danofloxacina y Enrofloxacina, junto con la promovida por el plaguicida Clorpirifós reduce *in vitro* la digestibilidad de las proteínas musculares presentes en la pechuga de pollo.

La disminución de la digestibilidad de las bandas de proteínas carboniladas ensayadas, ocurre tanto en la fase gástrica como intestinal para ambas fracciones proteicas aisladas (sarcoplásmicas y miofibrilares).

El plaguicida organofosforado Clorpirifós incrementa significativamente el número de péptidos oxidados en muestras de carne de pollo contaminadas.

7.10 Referencias

1. Suárez López, M.M., A. Kizlansky, and L.B. López, *Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad.* Nutrición Hospitalaria, 2006. **21**: p. 47-51.
2. Millward, D.J., et al., Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am J Clin Nutr, 2008. 87(5): p. 1576S-1581S.
3. Joye, I., Protein Digestibility of Cereal Products. Foods, 2019. 8(6).
4. Bhutia, Y.D. and V. Ganapathy, Chapter 47 - Protein Digestion and Absorption, in Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition), H.M. Said, Editor. 2018, Academic Press. p. 1063-1086.3

5. Segura-Campos, M., L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona, Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Revista chilena de nutrición, 2010. 37: p. 386-391.
6. Schetz, M., M.P. Casaer, and G. Van den Berghe, Does artificial nutrition improve outcome of critical illness? Critical Care, 2013. 17(1): p. 302.
7. Pali-Scholl, I., et al., The Effect of Digestion and Digestibility on Allergenicity of Food. Nutrients, 2018. 10(9).
8. Gorska-Warsewicz, H., et al., Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. Nutrients, 2019. 11(8).
9. Lin, D., et al., Effects of ultrasound on functional properties, structure and glycation properties of proteins: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020: p. 1-11.
10. Kinsella, J.E. and N. Melachouris, Functional properties of proteins in foods: A survey. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1976. 7(3): p. 219
11. Li-Chan, E.C.Y. and I.M.E. Lacroix, 1 - Properties of proteins in food systems: An introduction, in Proteins in Food Processing (Second Edition), R.Y. Yada, Editor. 2018, Woodhead Publishing. p. 1-25.
12. Shin, S. and A.P. Willard, Characterizing Hydration Properties Based on the Orientational Structure of Interfacial Water Molecules. Journal of Chemical Theory and Computation, 2018. 14(2): p. 461-465.
13. Ejike, C.E.C.C., et al., Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. Trends in Food Science & Technology, 2017. 59: p. 30-36.
14. Nooshkam, M., M. Varidi, and D.K. Verma, Functional and biological properties of Maillard conjugates and their potential application in medical and food: A review. Food Research International, 2020. 131: p. 109003.
15. Rutherfurd, S.M., et al., Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially

describe protein quality in growing male rats. J Nutr, 2015. 145(2): p. 372-9.

16. Abelilla, J.J., Y. Liu, and H.H. Stein, Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) in oat protein concentrate measured in 20- to 30-kilogram pigs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. 98(1): p. 410-414.
17. Mathai, J.K., Y. Liu, and H.H. Stein, Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). British Journal of Nutrition, 2017. 117(4): p. 490-499.
18. Phillips, S.M., Current Concepts and Unresolved Questions in Dietary Protein Requirements and Supplements in Adults. Front Nutr, 2017. 4: p. 13.
19. Elmadfa, I. and A.L. Meyer, Animal Proteins as Important Contributors to a Healthy Human Diet. Annual Review of Animal Biosciences, 2017. 5(1): p. 111-131.
20. Yousefi, M. and S.M. Jafari, Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. Trends in Food Science & Technology, 2019. 88: p. 468-483.
21. Pérez-Andrés, J.M., et al., Effect of cold plasma on the techno-functional properties of animal protein food ingredients. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019. 58: p. 102205.
22. Zhang, X., et al., Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity. International Dairy Journal, 2020. **102**: p. 104584.
23. Egger, L., et al., *Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data.* Food Research International, 2019. **118**: p. 32-39.

24. Hernández-López, S.H., et al., *Avocado waste for finishing pigs: Impact on muscle composition and oxidative stability during chilled storage.* Meat Sci, 2016. **116**: p. 186-92.

25. Ahmad, M.I., et al., *The Role of Meat Protein in Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Metabolic Syndromes.* Food Sci Anim Resour, 2020. **40**(1): p. 1-10.

26. Lorido, L., et al., *Effect of protein oxidation on the impaired quality of dry-cured loins produced from frozen pork meat.* Food Chem, 2016. **196**: p. 1310-4.

27. Téllez-Morales, J.A., B. Hernández-Santo, and J. Rodríguez-Miranda, *Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review.* Ultrasonics Sonochemistry, 2020. **61**: p. 104787.

28. Semagoto, H.M., et al., *Effects of UV induced photo-oxidation on the physicochemical properties of milk protein concentrate.* Food Research International, 2014. **62**: p. 580-588.

29. Rogowska-Wrzesinska, A., et al., *Analysis of protein carbonylation — pitfalls and promise in commonly used methods.* Free Radical Research, 2014. **48**(10): p. 1145-1162.

30. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression.* Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2006. **10**(2): p. 389-406.

31. Estévez, M., *Protein carbonyls in meat systems: a review.* Meat Sci, 2011. **89**(3): p. 259-79.

32. Milkovska-Stamenova, S., R. Mnatsakanyan, and R. Hoffmann, *Protein carbonylation sites in bovine raw milk and processed milk products.* Food Chem, 2017. **229**: p. 417-424.

33. Soladoye, O.P., et al., *Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2015. **14**(2): p. 106-122.

34. Fenaille, F., et al., *Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions.* PROTEOMICS, 2005. **5**(12): p. 3097-3104.

35. Utrera, M., et al., *Fluorescent HPLC for the detection of specific protein oxidation carbonyls - alpha-aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes - in meat systems.* Meat Sci, 2011. **89**(4): p. 500-6.

36. Leygonie, C., T.J. Britz, and L.C. Hoffman, *Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review.* Meat Science, 2012. **91**(2): p. 93-98.

37. Márquez-Lázaro, J., D. Mendez-Cuadro, and E. Rodríguez-Cavallo, *Residues of Fluoroquinolone Antibiotics Induce Carbonylation and Reduce In Vitro Digestion of Sarcoplasmic and Myofibrillar Beef Proteins.* Foods, 2020. **9**(2).

38. Márquez-Lázaro, J.P., D. Mendez-Cuadro, and E. Rodríguez-Cavallo, *In vitro oxidation promoted by chlorpyrifos residues on myosin and chicken breast proteins.* Food Chem, 2020. **326**: p. 126922.

39. Purslow, P.P., A.C. Archile-Contreras, and M.C. Cha, *Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue.* J Anim Sci, 2012. **90**(3): p. 950-9.

La impresión de este libro se realizó en papel bond blanco 90 grs. para páginas interiores y propalcote de 280 grs. para la portada con plastificado mate. Con un tiraje de 200 ejemplares.

El libro, Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal de los autores Erika Rodríguez Cavallo y Darío Méndez Cuadro y los coautores Albeiro Marrugo Padilla y Johana Márquez Lázaro se diseñó y diagramó en la Editorial Universitaria - Sección de Publicaciones de la Universidad de Cartagena y se terminó de imprimir en el año 2021 en la empresa Alpha Group, en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.

El importante crecimiento de la población mundial ha llevado a la necesidad de asegurar la disponibilidad de alimentos, por lo que los sistemas clásicos debieron evolucionar hacia sistemas más eficientes de producción. Estos implicaron el uso de sustancias como los antibióticos y plaguicidas para salvaguardar el bienestar animal y asegurar la rentabilidad de la producción. No obstante, su uso en los animales conlleva la presencia de sus residuos en el alimento destinado al consumo humano, suscitándose un interrogante: ¿Son inocuos estos alimentos para el consumidor? Distintos tipos de organismos internacionales se convocaron para dar una respuesta, resultando el concepto de Límite Máximo de Residuos (LMR) para referirse a la concentración permitida por tipo de sustancia, en función de la especie animal y tejido diana, cuya presencia en el alimento no representa un riesgo para el consumidor. Como se observa, tal concentración poco dice respecto al efecto que estas sustancias podrían ejercer sobre las proteínas constitutivas del alimento, tras la exposición a esas concentraciones.

Cuestionarnos sobre tales efectos nos condujo a cinco años de investigaciones, en los que desarrollamos métodos analíticos para determinación de antibióticos y plaguicidas en alimentos de origen animal; y proporcionado evidencia científica, basada en el uso de técnicas proteómicas (foodómica), conducentes a establecer que concentraciones en torno al LMR de estas sustancias promueven pérdida de solubilidad, alteración de la digestibilidad y carbonilación irreversible en las principales fracciones proteicas de la leche bovina (caseínas y lactosuero) y del músculo de pollo y bovino (sarcoplásmicas y miofibrilares). En este libro recopilamos y ampliamos aspectos fundamentales y metodológicos de los principales hallazgos obtenidos en nuestras investigaciones y que complementan los ya publicados en revistas internacionales indexadas, como Foods, Food Chemistry, Data in Brief, Science of the Total Environment (STOTEN), International Dairy Journal y Food Analytical Methods; y diversos congresos internacionales en el área. En su construcción participaron dos de nuestros estudiantes de doctorado, sin embargo, los resultados de investigación compilados en esos cinco años son producto del trabajo de estudiantes del pregrado en Química Farmacéutica, la maestría en Ciencias Farmacéuticas y el doctorado en Toxicología Ambiental.

Los Autores

Universidad de Cartagena
Fundada en 1827

Editorial Universitaria
Universidad de Cartagena

ISBN: 978-958-5439-43-6
9 789585 439436