



Vigilância Sanitária em Debate
ISSN: 2317-269X
INCQS-FIOCRUZ

Zambrano, Pedro Enrique La Rosa; Blanco, Juan Antonio Espinoza;
Conte-Junior, Carlos Adam; la Torre, César Aquiles Lázaro de
Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en
productos de origen animal mediante cromatografía líquida
Vigilância Sanitária em Debate, vol. 6, núm. 2, 2018, Abril-Junio, pp. 122-136
INCQS-FIOCRUZ

DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.00970>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=570562984014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

REVISIÓN

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.00970>

Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida

Determination of veterinary antibiotic residues in foods of animal origin by liquid chromatography

RESUMEN

Pedro Enrique La Rosa Zambrano^I

Juan Antonio Espinoza Blanco^I

Carlos Adam Conte-Junior^{II}

César Aquiles Lázaro de la Torre^{I,*}

Introducción: La presencia de ciertos agentes infecciosos hace necesario el uso de antibióticos para asegurar el bienestar de los animales destinados a consumo humano; sin embargo, hay que considerar y respetar el tiempo de retiro ya que existe la posibilidad de encontrar residuos por encima de los niveles permitidos, hecho que podría constituir un riesgo para la salud pública. **Objetivo:** Presentar una recopilación de información basada en cómo se realiza la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en diversos productos de origen animal mediante métodos cromatográficos. **Método:** Revisión de bases de datos en Elsevier, SciELO, Springer, Hindawi, FAO, EFSA, Senasa y Sanipes, utilizando palabras clave como “cromatografía líquida”, “espectrometría de masas”, “residuos de antibióticos” y “productos de origen animal” en idioma español e inglés. **Resultados:** Se seleccionaron 71 referencias entre artículos, capítulos de libros, normas y reglamentos publicados entre el 2000 al 2017, de las cuales se destaca que las metodologías cromatográficas para el monitoreo de residuos de antibióticos deben ser sensibles, reproducibles, confiables e identificar volúmenes en mg/kg; asimismo, deben cumplir con las exigencias de las normas internacionales para la detección de límites máximos de residuos. **Conclusiones:** La cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas es la técnica más utilizada ya permite la separación de matrices complejas en base del peso molecular del compuesto (antibiótico) o sus fragmentos; sin embargo, es compleja, costosa y requiere personal altamente entrenado.

PALABRAS CLAVE: Antibióticos; Cromatografía Líquida; Espectrometría de Masas; Residuos de Fármacos Veterinarios

ABSTRACT

Introduction: The presence of certain infectious agents makes necessary the use of antibiotics to ensure the welfare of animals destined for human consumption; however, the withdrawal time must be considered and respected since there is the possibility of finding residues above the permitted levels, which could constitute a risk to public health. **Objective:** Present a collection of information based on how is performed the detection and quantification of antibiotic residues in various products of animal origin using chromatography methods. **Method:** Review of databases in Elsevier, SciELO, Springer, Hindawi, FAO, EFSA, Senasa and Sanipes, using keywords such as “liquid chromatography”, “mass spectrometry”, “antibiotic residues” and “products of animal origin” in Spanish and English. **Results:** They were selected 71 references among articles, book chapters, norms and regulations published between 2000 and 2017, which it is emphasized that chromatographic methodologies for antibiotic residues monitoring must be sensitive, reproducible, reliable and identify volumes in mg/kg; likewise, they must follow the requirements of international standards for the maximum residue limits detection. **Conclusions:** Liquid chromatography coupled to a mass spectrometer is the most used technique to allow the separation of complex matrices based on the molecular weight of the compound (antibiotic) or its fragments; however, It is complex, expensive and requires highly trained personnel.

^I Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, San Borja, Lima, Perú

^{II} Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

* E-mail: clazarod@unmsm.edu.pe

Received: 26 mayo 2017

Accepted: 23 ene 2018

KEYWORDS: Antibiotic; Liquid Chromatography; Mass Spectrometry; Veterinary Drug Residues



INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en alimentos de origen animal es uno de los problemas más importantes relacionados con la inocuidad alimentaria¹. Estos productos han sido usados en veterinaria desde 1950 con fines terapéuticos y como promotores de crecimiento, teniendo desde esa época una relación con los residuos alimentos y el medio ambiente, volviéndose un problema de salud pública cuando residuos del fármaco y/o sus metabolitos llega al consumidor en niveles que pueden ser perjudiciales para su salud ocasionando reacciones alérgicas, toxicidad y teratogenicidad². Además de eso, se puede generar resistencia bacteriana e inclusive causar problemas tecnológicos³.

Debido a estas prerrogativas, es de suma importancia el control de los residuos de antibióticos. Para esto organismos como *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) y *World Health Organization* (WHO) han establecido límite máximo de residuos (LMR) en alimentos. Según la Tabla 1, donde se muestran algunos de los LMR de antibióticos para productos de origen animal, se tendría que poner más énfasis en los LMR de productos como músculo (carne) y la leche; sin embargo, estos valores son igual o más bajos si los comparados con otros tejidos como hígado, riñones, grasa. Esto es de suma importancia ya que en diversas partes del mundo estos tejidos se consumen y son parte fundamental de la dieta.

“Métodos screening” como *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (Elisa) el cual tiene la ventaja de ser de bajo costo,

su facilidad operativa, rapidez y el manejo de gran número de muestras, han sido propuestos para la identificación de antibióticos. Sin embargo, muchas veces esta técnica no diferencia entre antibióticos de la misma clase y/o proporciona información semicuantitativa de los residuos por lo que para la necesidad de establecer si los residuos están por encima de los LMR recomendados, Elisa no sería la más adecuada⁴. Por estos motivos y antes de declarar que las muestras analizadas contienen residuos de antibióticos es necesario realizar una adecuada confirmación de la identificación y su cuantificación⁵. Es así que el análisis cromatográfico en fase líquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) o gaseosa (*Gas Chromatography*, GC) acoplados a diferentes tipos de detectores (Ultra-violeta, UV, Arreglo de diodos, DAD, fluorescencia y espectrometría de masas [*mass spectrometry*, MS]) es una técnica que responde a estas exigencias⁶, brindando información sobre el analito en evaluación^{7,8,9}.

A pesar de ser una herramienta confiable, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes como el costo de implementación del equipamiento, capacitación técnica, infraestructura de laboratorios, personal capacitado, costo por análisis, tiempo entre la recolección y el resultado, entre otros. Debido a esto es necesario conocer las diversas técnicas cromatográficas para poder elegir la que mejor se adapte a las necesidades y viabilidad de cada laboratorio.

Tabla 1. Límites máximos permisibles de antibióticos en carne de diversas especies y leche.

Antibiótico	Bovino	Porcino	Ovino	Pollo	Pavo	Conejo	Leche
Amoxicilina	50	50	50	-	-	-	4
Avilamicina	-	200	-	200	200	200	-
Benzilpenicilina	50	50	-	50	-	-	4
Ceftiofur	1.000	1.000	-	-	-	-	100
Colistina	150	150	150	150	150	150	50
Clortetraciclina/Oxitetraciclina/tetraciclina	200	200	200	200	-	-	100
Danofloxacina	200	100	-	200	-	-	-
Estreptomicina	600	600	600	600	-	-	200
Eritromicina	-	-	-	100	100	-	-
Flumequina	500	500	500	500	-	-	-
Gentamicina	100	100	-	-	-	-	200
Lincomicina	-	200	-	200	-	-	150
Neomicina	500	500	500	500	500	-	1.500
Pirlimicina	100	-	-	-	-	-	100
Sarafloxacina	-	-	-	10	10	-	-
Espectinomicina	500	500	500	500	-	-	200
Espiramicina	200	200	-	200	-	-	200
Sulfadimidina	100	-	-	-	-	-	25
Tilmicosina	100	100	100	150	100	-	-
Tilosina	100	100	-	100	-	-	100
Cloranfenicol/Furazolidona/Nitrofurano/Olanquindox	Ausencia						

Valores expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ para carne y $\mu\text{g}/\text{L}$ para leche.

Fuente: FAO/WHO⁷.



MÉTODO

El presente trabajo narrativo tiene como objetivo brindar información y explorar las diferentes técnicas cromatográficas y su aplicación en determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal a partir de una revisión de literatura de capítulos de libros y artículos científicos indexados, siendo las bases de datos más consultadas Elsevier, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Springer y Hindawi. Además, fueron consultados diversas normas y reglamentos de las bases de datos internacionales como la FAO, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), Unión Europea, Comunidad Andina; y otras nacionales como el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (Senasa) del Perú, Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (Sanipes). Todos ellos están disponibles en internet de forma libre y/o bajo un costo. Es importante señalar que inicialmente la búsqueda *on-line* se basó en términos de referencia mixtos en español involucrando palabras como: productos de origen animal, antibióticos y cromatografía líquida, espectrometría de masas. Esto nos sirvió para conocer un poco la realidad. Sin embargo, la búsqueda no resultó muy actualizada por lo que posteriormente se empezó a utilizar términos en inglés como: "Liquid chromatography" "chromatography", "mass spectrometry", "LC/MS", "antibiotic residues", "meat", "milk", "fish", "food", "animal origin". El periodo de búsqueda bibliográfica fue de enero de 2016 hasta diciembre de 2017. En este tiempo se pudieron encontrar 164 referencias, de las cuales solo se utilizaron 71 para la realización de esta revisión. Dentro de los criterios de inclusión de las referencias seleccionadas se trató en lo posible de usar referencias de los últimos 7 años, sin embargo fue necesario ampliar este rango ya que encontramos referencias que eran interesantes y necesarias, sobre todo algunas normas y reglamentos que vienen desde el año 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Panorama sobre el control y monitoreo de residuos de antibióticos veterinarios

Es bastante conocida la importancia del uso de antibióticos en la crianza de animales de producción. Sin embargo, su uso indiscriminado, la falta de información sobre su cinética en diferentes especies o incluso no respetar los periodos de retiro hace que se incremente el riesgo de residuos por encima de los niveles tolerables. Esto podría conllevar a la aparición de cuadros alérgicos y el desarrollo de resistencia bacteriana trasferida del alimento al hombre¹⁰. Todos los alimentos son susceptibles de contener residuos de fármacos, un ejemplo son los productos provenientes de bovinos (leche, carne y derivados), a los cuales se les asocia la presencia de residuos de antibióticos al tratamiento de enfermedades infecciosas frecuentes como mastitis, neumonía o podofilitis^{11,12}. Aunque los países de la Unión Europea (UE) prohibieron el uso de antibióticos como promotores de crecimiento desde 2006 y los Estados Unidos han planteado su retiro gradual, muchos

países continúan con esta práctica que contribuye a la generación de residuos¹³. En una sociedad que está interconectada globalmente, es necesario que países importadores y exportadores de alimentos estén monitoreando continuamente sus productos. Una de las producciones que más está destacando en los últimos años por la preferencia del consumidor es la de productos acuícolas. En la Tabla 2 se presentan LMR de algunos antibióticos establecidos por diferentes países para productos de acuicultura.

En la UE el Reglamento n° 37/2010, de 22 de diciembre de 2009, describe las sustancias y medicamentos veterinarios monitoreados y los procedimientos para establecer los LMR para productos veterinarios en productos de origen animal¹⁴. Basado en esto el monitoreo realizado en el 2014 por la EFSA evidenció que 0,03% de muestras (n = 736.907) presentó residuos de antibióticos del Grupo A (sustancias prohibidas como cloranfenicol, nitrofuranos, nitroimidazoles) asimismo solo el 0.18% de las muestras analizadas presentó valores por encima de los permisibles para antibióticos del Grupo B (Residuos de antibióticos veterinarios), siendo las muestras de miel las que estaban más implicadas¹⁵.

En el caso de los países miembros de la Comunidad Andina se viene impulsado el desarrollo pecuario y agroindustrial, siendo uno de sus objetivos alcanzar un mayor grado de seguridad alimentaria. Todo esto dentro del marco establecido por el Acuerdo de Cartagena establecido para adoptar normas y programas comunes de sanidad vegetal y animal. Es así que Decisión 483 establece una norma para el registro, control, comercialización y uso de productos veterinarios en todos los países miembros de la Comunidad Andina¹⁶.

En base a esta Decisión, si vemos lo que sucede en el Perú en relación a los residuos de antibióticos, encontramos un Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria y un Programa Nacional de Monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos mediante Decreto Supremo N° 004-2011-AG. Este también establece que los alimentos agropecuarios primarios que se consuman en el mercado nacional, incluyendo los alimentos importados, no deben exceder límites máximos permisibles

Tabla 2. Límites máximos permisibles de antibióticos para productos acuícolas aceptados por diversos países.

Antibiótico	PERÚ	USA	EUROPA	JAPÓN
Cloranfenicol	Ausencia	-	-	-
Nitrofuranos	Ausencia	-	-	-
Amoxicilina	50	Ausencia	50	50
Ciprofloxacina	100	Ausencia	Ausencia	200
Enrofloxacina	100	Ausencia	100	100
Eritromicina	200	Ausencia	200	200
Florfenicol	1.000	1000	1.000	200
Sulfas	100	Ausencia	100	100
Oxitetraciclina	100	2000	100	200

Valores expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Fuente: Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (Sanipes)^{22,23}.



de residuos químicos y otros contaminantes, fijados en la norma nacional, o establecidos por la FAO/WHO¹⁷. Este país cuenta con 3 instituciones encargadas del control y monitoreo de residuos de fármacos: el Senasa, la Dirección General de Salud Ambiental (Digesa) y el Sanipes^{18,19}. Estas establecen planes anuales para realizar muestreos por regiones, definen el tipo de alimento a evaluar, el número de muestra a analizar y los procedimientos analíticos; además, se establecen los procedimientos necesarios para la toma y envío para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios^{20,21}.

La cromatografía en la determinación de residuos veterinarios

Haciendo un poco de historia, encontramos que las primeras experiencias sobre cromatografía fueron llevadas a cabo en el año 1906 por el botánico ruso Mikhail Tswett quien consiguió separar algunos pigmentos (clorofilas y xantofilas) de hojas de plantas utilizando una columna de vidrio empacadas con CaCO₃. Las especies separadas aparecían como bandas coloridas sobre la columna, lo cual explica el nombre de origen griego *chroma* = color y *graphein* = describir, con el cual se nombró el método. Según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Iupac) la cromatografía se define como un método físico de separación en el cual los componentes son separados y distribuidos entre dos fases, una que es fija (fase estacionaria) mientras que la otra se mueve en una dirección establecida (fase móvil), la cual puede ser gas, gel o líquido^{24,25}. Este principio es fundamental para la separación y análisis de moléculas específica en matrices complejas como los alimentos, por lo que su aplicación en la determinación de residuos de fármacos ha sido muy explorada.

En nuestra revisión podemos verificar que la cromatografía y su aplicación en residuos de antibiótico han variado mucho durante los años. En un inicio se empleaba la GC acoplada a detectores de captura de electrones (ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y fotométrico de llama (FPD). Las aplicaciones que se llevaban a cabo mediante LC eran menos habituales debido a que los detectores utilizados como UV, diodos y fluorescencia presentaban una menor sensibilidad y selectividad que los empleados en GC. El desarrollo que ha experimentado la MS, que permiten detectar niveles por debajo de $\mu\text{g}/\text{kg}$ e incluso ng/kg , ha revolucionado este campo a tal punto que hoy en día no puede concebirse la detección y cuantificación de residuos sin el uso de los detectores de MS²⁶. Los detectores MS aportan a los métodos cromatográficos una sensibilidad y poder de confirmación mucho más elevados, que no era posible conseguir con los detectores tradicionales (UV y fluorescencia)²⁷. Teniendo en consideración esto, a continuación vamos a detallar los procedimientos para realizar la LC acoplada a detector MS.

Cromatografía líquida de alta resolución

Mejor conocida como HPLC por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*²⁸, este tipo de cromatografía se basa en una fase móvil líquida donde se usan solventes como agua, acetonitrilo o metanol y una fase estacionaria o columna cromatográfica que puede variar dependiendo del analito.

Al introducir la muestra al sistema cromatográfico, esta hace una interacción con ambas fases y es en la fase estacionaria donde se retienen las sustancias que pretendemos identificar. Las partículas retenidas poseen diferente afinidad por la fase estacionaria, esta propiedad hace que la salida del sistema sea en tiempos diferentes, esto corresponde al tiempo de retención y es fundamental en el proceso de separación. Esto podría realizarse con mayor velocidad y eficacia si incrementamos la presión del flujo de la fase móvil de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado, por lo que son necesarias ciertas condiciones en el equipo que soporte estas variaciones²⁹.

Normalmente, un sistema HPLC cuenta con 6 componentes básicos: un sistema de inyección para introducir la muestra, una bomba que mantiene constante el flujo de la fase móvil, una fase móvil, una fase estacionaria, un detector y el integrador que procesa las señales y las transforma en un lenguaje que podemos interpretar (Figura 1). La elección del sistema de detección para el sistema HPLC es muy importante para la selectividad y sensibilidad del analito a identificar. Entre los detectores más utilizados podemos mencionar el UV y el de DAD⁴. Sin embargo, en la actualidad la asociación del HPLC con la detección por espectrometría de masas (LC-MS) es la más preferida para la determinación de residuos de fármacos veterinarios⁶. Es importante señalar también que los métodos cromatográficos empleados deben ser validados para una correcta aplicación, tratando que cumplan especificaciones como límites de detección/cuantificación, repetitividad, linealidad, robustez, entre otras³⁰.

La clasificación de la LC puede ser realizada en base a la composición químicas de los tipos de relleno de la columna cromatográfica, las cuales tienen características físico-químicas que producen diferentes mecanismos de separación. En el caso de antibióticos el más utilizado es la LC en fase reversa la cual se adecua al análisis de analitos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos. El tipo de material apolar con que se llenan las columnas de fase reversa suele ser sílice químicamente modificada (cadenas de C8, C18), las cuales interactúan con una fase móvil polar (combinaciones de agua con solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo). El porcentaje y tipo de modificador orgánico en la fase móvil es el factor más determinante en la retención de los analitos polares, pero no iónicos. Las interacciones entre el analito y el solvente son las que determinan la especificidad de la cromatografía en fase reversa, ya que las interacciones del analito con la fase estacionaria son relativamente débiles, interacciones de Van der Waals no específicas³¹.

Procedimientos utilizados para realizar la cromatografía líquida de alta resolución

Acondicionamiento de las muestras

Las condiciones y procedimientos empleados van a depender del tipo de material a ser analizado (carne, leche, huevos, entre otros). En el caso de muestras sólidas como la carne, es necesario realizar un proceso de cortes, molido y homogenización³². Una desventaja de esto es que el muestreo es destructivo y se realiza luego de que el animal ha sido faenado⁶.

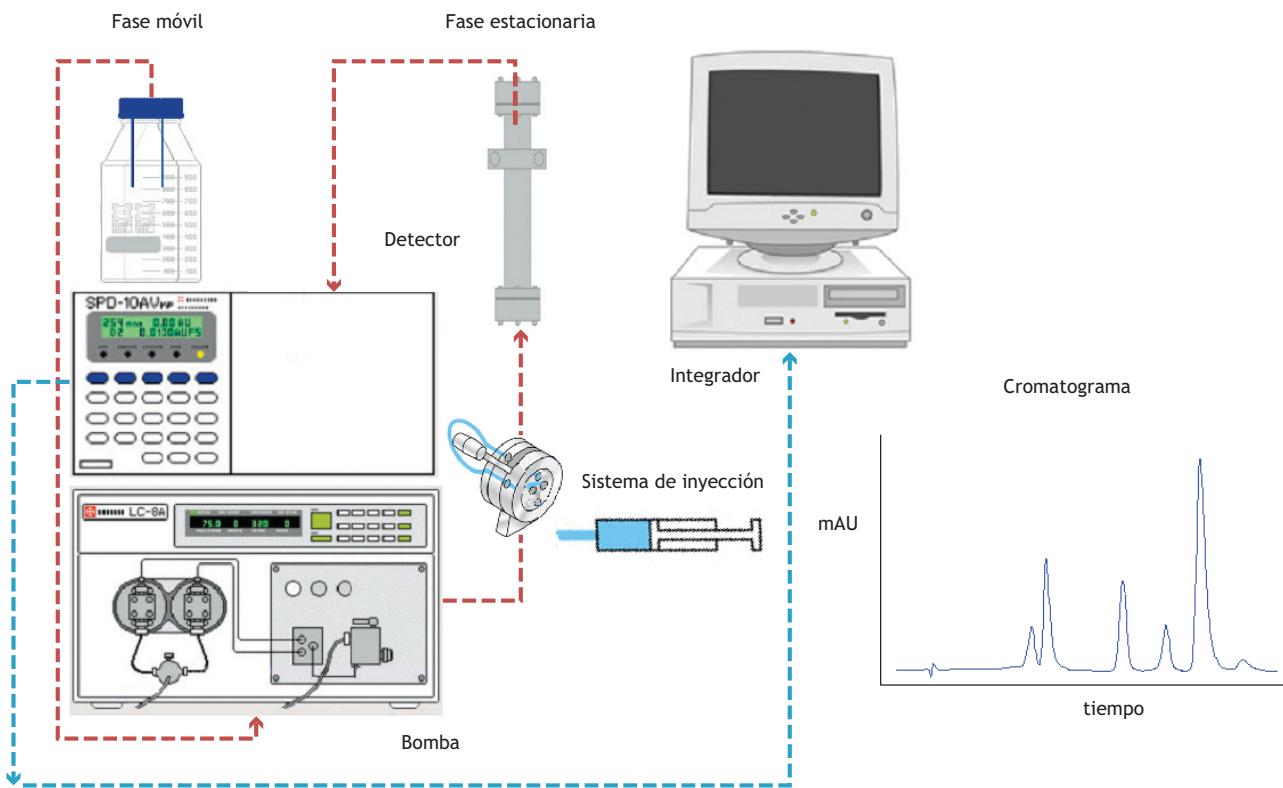


Figura 1. Esquema de un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de ultravioleta.

Extracción de analitos de la muestra

Luego de su acondicionamiento, deben eliminarse elementos como proteínas, lípidos u otros que puedan interferir en la lectura de los analitos. La mayoría de metodologías usan solventes orgánicos (acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, acetona o éter de petróleo). El uso de estos solventes va acompañado de proceso de agitación, homogeneización o ultrasonificación que permite una mejor interacción con las muestras³³.

Posterior a este procedimiento, es recomendable utilizar una técnica de purificación o limpieza denominada extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*). En esta parte se somete la muestra más el solvente orgánico a un cartucho (jeringa) que contiene internamente las mismas propiedades de la fase estacionaria (C18) y sirve para retener los analitos de interés (residuos de antibióticos). Para recuperar estos residuos se realiza el lavado del cartucho con solventes (acetonitrilo/metanol y agua) para luego ser inyectado en el cromatógrafo³³. La SPE es muy efectiva para la detección de compuestos con propiedades no muy diferentes; sin embargo, esta técnica inicialmente concebida con la fase estacionaria fija en un cartucho demandaba un tiempo de preparación, uso bombas de vacío y limpieza para su reutilización. Por este motivo comenzaron a presentarse variaciones a la SPE inicial³⁴.

La extracción en fase sólida dispersa (SPE-d) es una de estas variaciones, la cual consiste en la adición de un material adsorbente al extracto crudo seguido de agitación, centrifugación y posterior aislamiento del adsorbente. En la actualidad este método

es el denominado QuEChERS, acrónimo de las palabras en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*. Esta técnica, la cual se caracteriza por ser rápida, fácil de realizar, económica, eficaz, robusta y segura, consta de dos etapas: 1) extracción líquida con solventes (agua y acetonitrilo) y soluciones hipertónicas (cloruro de sodio, sulfato de magnesio, agentes tampón) y 2) SPE-d en la que una alícuota de la fase orgánica de la primera etapa se trata con diversos adsorbentes para eliminar los interferentes de la matriz que pudieran dificultar el posterior análisis instrumental^{33,35}. Recientemente se ha experimentado con diversos materiales para mejorar la extracción y purificación utilizando SPE. Columnas con polímeros impresos molecularmente (PIM) que reconocen selectivamente moléculas para lo que fueron sintetizados hacen que la adsorción sea más selectiva³⁶.

El proceso de extracción es fundamental para asegurar la vida media de las columnas y optimizar los tiempos de mantenimiento y limpieza del sistema cromatográfico. Sin embargo, si se abusa de los solventes en los procesos de filtrado y purificación, podemos perder parte de los analitos (residuos de antibióticos). Por este motivo se debe elegir juiciosamente el método a utilizar de acuerdo al alimento como el tipo de molécula³⁵.

Instrumentación

Las partes fundamentales del sistema cromatográfico constan de una bomba, la cual suministra un flujo constante (entre 10 μ L/min y 2 mL/min) y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna. A parte de la capacidad de la bomba, la



velocidad del flujo depende del diámetro y del material de la columna cromatográfica. Asimismo, la bomba debe ser fabricada con materiales químicamente inertes, soportar altas presiones y proporcionar un flujo libre de pulsaciones²⁴. Otra parte fundamental del sistema es la columna, lugar donde se realiza la separación de los analitos. La mayoría de las columnas consisten en estructuras cilíndricas de acero rellenas de sílice químicamente modificada (C8 ó C18). Existen variaciones de la columna en base al diámetro interno, longitud, tipo de relleno y tamaño de partícula de relleno. La evolución de la columna ha priorizado la disminución del tamaño de partícula de relleno, lo cual se ha traducido en un incremento de la selectividad y mejora de la resolución de los cromatogramas³¹.

El detector del sistema cromatográfico debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura la corrida cromatográfica. Además, debe ser capaz de resistir presión, flujo y porcentajes de la fase móvil (gradiente). Algunos de los detectores más usados son los espectrofotómetros que miden la absorbencia a una o varias longitudes de onda en el espectro UV o en el visible; los de fluorescencia, que miden la emisión fluorescente por parte de los analitos inducida mediante un reactor situado antes o después de la separación; y otros más complejos como la MS pueden proporcionar información específica que permite la determinación inequívoca de compuestos en base a su peso molecular²⁹. En la siguiente sección se detalla las partes y funcionamiento del detector de MS.

El volumen de muestra aplicada al sistema cromatográfico debe ser preciso y no debe perturbar la circulación de la fase móvil. Debido a esto es necesario contar con un sistema de inyección el cual consta de válvulas rotatorias de alta presión de varias vías las cuales pueden ser manuales o automatizadas. Estas válvulas poseen dos posiciones. En la posición de llenado, la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce en un pequeño depósito de forma tubular (bucle) con ayuda de una microjeringa. El bucle puede escogerse de diferente volumen (5-500 μ L). En la posición de inyección, gracias a la rotación de la válvula, la muestra se arrastra por el flujo de la fase móvil y se introduce en la columna²⁹. Por otro lado, es necesario que los solventes que ingresen al sistema estén libres de aire. Esto hace preciso el uso de un desgasificador, el cual puede funcionar por un sistema de bombeo al vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los solventes o sistemas de difusión que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Por ejemplo, una forma conveniente de tratar los solventes antes de ser usados como fase móvil es filtrarlos al vacío a través de un filtro de poro muy pequeño.

En la actualidad, los diversos métodos favorecen la interacción de la fase móvil y estacionaria lleva más tiempo por lo que se tuvo que aumentar la velocidad del flujo para no afectar el tiempo de retención. Esto trajo como consecuencia la aparición de una nueva línea de cromatógrafos con capacidad de trabajar en altas presiones, utilizar inyectores más rápidos, flujos de alta velocidad y detectores de mayor velocidad

de captura lo que conllevó a reducir el tiempo de la corrida cromatográfica. Es así como aparece la Cromatografía Líquida de Ultra Presión (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) y la Cromatografía Líquida Ultra Rápida (*Ultra Fast Liquid Chromatography*, UFC)³⁷.

Espectrometría de masas

La MS acoplada a LC (Figura 2) es una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas para la confirmación de residuos de antibióticos en productos de origen animal. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación por LC y la capacidad de detección por espectro de masas. La MS se ha presentado como una técnica analítica de elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L. Además, es capaz de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución muy altos^{37,38}.

La MS está basada en la detección de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a la relación masa a carga (m/z), y finalmente se detectan por medio de un detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. Estos analizadores, pueden detectar sólo los iones y por lo tanto las moléculas deben ser ionizadas en una fuente de iones antes de su separación y detección.

Métodos de ionización

La clave que asegura el éxito de la detección por MS es conseguir que los compuestos neutros se conviertan, dependiendo de la fuente de iones, en iones moleculares, moléculas protonadas, cationizadas, desprotonadas, anionizadas o fragmentos en estado gaseoso mediante la aplicación de campos eléctricos

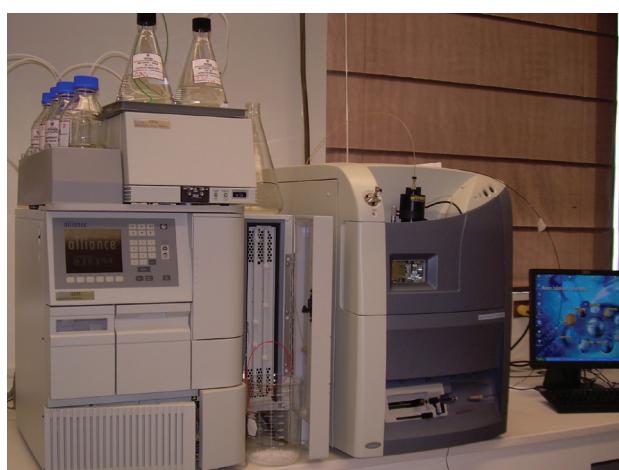


Figura 2. Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem. (Cortesía Senasa).



y magnéticos. La ionización es la una propiedad en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, este estado se consigue adicionando o eliminando un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento²⁴.

Las primeras interfases que se desarrollaron tenían como objetivo la eliminación del disolvente (fase móvil) e intentar conseguir moléculas de analito en fase gaseosa antes de llegar a la fuente de ionización. Posteriormente, durante el desarrollo de estas fuentes se comprobó que era posible favorecer la ionización de los analitos en presencia del solvente y a presión atmosférica sin perturbar al analizador de masas. A partir de estos principios físicos básicos se comenzó a desarrollar las interfases a presión atmosféricas (*Atmospheric Pressure Interface*, API), incluyendo la de ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI) que son los más utilizados en la detección de residuos de antibióticos por LC-MS³⁷.

La ESI se produce por la aplicación de un alto voltaje (3-6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado positivamente (modo positivo) o negativamente (modo negativo). Estas gotas de solvente se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas. El flujo óptimo proveniente de la LC debe ser del orden de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo se han aplicado flujos mayores, de hasta 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando diseños de fuentes con energía adicional, temperatura o flujo del gas, lo que permitir una mejor dispersión de las gotas a partir del capilar³⁷.

Por otro lado, la Ionización Química a Presión Atmosférica (*Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) es una interfase que primero vaporiza la fase móvil y luego somete a las partículas a una descarga para cargarlas al analito en fase gaseosa. Esta técnica es usada en compuestos que no se ionizan bien con la ESI (frecuentemente más estables, compuestos con pesos moleculares bajos y compuestos no polares) pero en condiciones más complejas es probable que ESI cause la degradación de la muestra, especialmente en compuestos termolábiles. Al parecer APCI tiene menos problemas para la ionización que ESI. Debido a que tanto ESI como APCI tienen diferentes mecanismos de ionización, la respuesta y la selectividad pueden variar entre ambas interfases³⁹.

Separación de iones

Al analizador de masas es la parte más importante del espectrómetro, el principio físico se basa en la dispersión y focalización de los iones en función de la relación masa/carga (indicado comúnmente como m/q o m/z), siendo las variantes de este proceso la diferencia entre los distintos instrumentos de

espectrometría de masa. Entre los más utilizados tenemos: cuadrupolo (*Quadrupole*, Q), trampa de iones cuadrupolares (*Quadrupole Ion Trap*, QIT) y tiempo de vuelo (*Time of flight*, TOF).

El cuadrupolo es el más usado ya que ofrece un amplio rango de masas (40 a 4000 u), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad. Un cuadrupolo consiste en cuatro barras dispuestas en paralelo con una alta precisión, los polos se encuentran espaciados alrededor de unos ejes centrales. Las barras situadas en posición opuesta se les aplican una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF)³⁸. Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación m/z permitiendo realizar un análisis completo de todos los elementos de la muestra (*Full scan*). Sin embargo, de forma específica, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta que es dirigida hacia el detector, descartando aquellas relaciones m/z mayores o menores a la seleccionada (*Selected Ion Monitoring*). El cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de forma que, de todos los iones provenientes de la fuente, sólo se van transfiriendo al detector los seleccionados, perdiéndose el resto por el camino. En ese sentido, para obtener un barrido total de masas debe ir acoplando una a una las m/z mediante la creación de campos eléctricos selectivos de cada una de ellas^{37,38}.

La trampa iónica cuadrupolar es un dispositivo formado por tres electrodos, dos de ellos hiperbólicos, y entre estos un electrodo en forma de anillo toroidal. El sistema tiene el mismo fundamento que el analizador de cuadrupolo. Se aplican, simultáneamente, una corriente continua y un potencial de radiofrecuencia, de tal forma que los iones generados quedan confinados dentro del anillo toroidal. Los iones son expulsados de la cámara tras la aplicación de rampas de radiofrecuencia. Conforme aumenta el voltaje, aumenta la amplitud de su movimiento oscilatorio hasta ser expulsados. Los iones de mayor masa se desestabilizan conforme va aumentando el voltaje de radiofrecuencia, de tal forma que los iones se detectan de forma secuencial, obteniendo así el espectro en función del voltaje y la masa²⁴.

El triple cuadrupolo (QqQ o TQ), donde el primer cuadrupolo (Q1) actúa como un filtro que selecciona y separa las moléculas cargadas del resto de componentes que eluyen del cromatógrafo. El tercer cuadrupolo (Q3) actúa también como filtro, pero en este caso de los fragmentos producidos por disociación que llegan del segundo cuadrupolo (Q2), dejando pasar hacia el detector solo aquellas masas de los fragmentos seleccionados. El proceso de disociación que ocurre en el Q2, es inducido por un gas ionizado y acelerado, de forma que colisiona con las moléculas de analito provocando su fragmentación²⁴.

El TOF, se basa en la separación de los iones en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida. Este tiempo depende de la relación m/z porque los iones menos pesados llegarán más rápidamente al detector



que aquellos que presentan una relación m/z de valor más alto. Una de las dificultades más importantes de este tipo de instrumentos al acoplarlos con LC es que los iones que llegan continuamente de la interfase tienen que ser enviados al TOF mediante un pulso. Para obtener una buena medida del tiempo de vuelo de los iones, el tiempo al que comienza el vuelo de los iones debe estar muy bien controlado. TOF trabaja de forma discontinua al contrario que el analizador de cuadrupolo, ya que los iones que llegan al analizador son pulsados al tubo de vuelo teniendo que esperar el tiempo necesario para que todos alcancen al detector antes de volver a lanzar otro pulso^{37,38}.

Tradicionalmente se había trabajado con cuadrupolos simples acoplados a GC, debido a que se obtenía gran cantidad de información estructural bajo una ionización por impacto electrónico. Ante la aparición de las fuentes de ionización API, que permiten el acoplamiento entre LC y MS, se vio un primer inconveniente relacionado a la poca fragmentación de las moléculas ionizadas, lo cual genera escasa información estructural. Por este motivo surge la idea de acoplar dos analizadores de espectrometría de masa (MS/MS) para aumentar considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece el LC-MS. De este modo, la MS en tandem (MS/MS) conlleva dos etapas: En la primera, se produce la selección de un ion precursor seguida de una ionización de las moléculas mediante un proceso de disociación o por medio de una reacción química. En la segunda etapa se lleva a cabo el análisis de los iones producto obtenidos del proceso de fragmentación. Esta técnica ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado^{37,38}.

Detección de iones

Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación m/z de cada uno de ellos. Una vez realizada la adquisición, el procesamiento de los datos es una de las partes más importantes para identificar y cuantificar la cantidad de analitos presentes en la muestra. Hay que tener en cuenta que de una muestra eluyen miles de compuestos, incluyendo los de interés, siendo la determinación de todos casi imposible debido en parte a la cantidad de compuestos presentes y a las bases de datos insuficientes para los compuestos³⁵.

La mayoría de los proveedores de instrumentos ofrecen herramientas de software quimiométricos para analizar sus propios formatos de datos. Sin embargo, la determinación de los compuestos en análisis se realiza mediante comparación con estándares. Además, la creación de bases de datos (bibliotecas) con información acerca de fragmentos, fórmula molecular, etc., para el análisis es de vital importancia. La mayoría de los programas proporcionados por los fabricantes permiten la generación de varias fórmulas moleculares a partir de un m/z particular y su patrón isotópico³⁵.

La cuantificación utilizando la detección MS/MS no difiere de las cuantificaciones utilizadas por otras técnicas cromatográficas. Básicamente se compara la intensidad de la señal generada por un analito en una muestra con un estándar con cantidades y concentraciones conocidas. En base a esto se puede crear una relación entre la señal y la concentración del estándar, obteniendo una ecuación lineal (Figura 3). La MS en tandem presenta grandes ventajas prácticas frente a MS simple, ya que la calidad y la cantidad de información proporcionada por MS/MS, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para la elucidación estructural. En la mayoría de equipos MS, la cuantificación y determinación de los compuestos puede ser dirigida con diferentes formas de análisis³⁷.

- **Barrido de todos los iones (Full Scan)**, en este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QQQ, tanto la celda de colisión (q) como el segundo cuadrupolo (Q2) no actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones en alguno de los cuadrupolos y obteniendo un espectro de full scan.
- **Adquisición de un ión seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)**, la adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión, que es seleccionado en el primer cuadrupolo. Este tipo de adquisición deriva del uso de Q simple, y su aplicación en instrumentos QQQ no suele ser muy frecuente.
- **Barrido de iones producto (Product Ion Scan)**, el barrido de iones producto se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo (Q1) una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía adecuada en la celda de colisión; el segundo analizador adquiere en modo full scan de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor. A estos fragmentos se les denomina iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ión precursor.

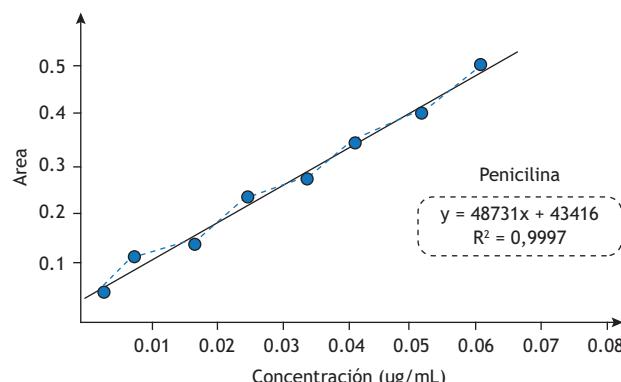


Figura 3. Representación de la Linealidad. Relación entre señal (área) y concentración del estándar para la cuantificación cromatográfica. En este caso se presentan ocho concentraciones diferentes del estándar de penicilina.



- **Adquisición de la reacción seleccionada (Selected Reaction Monitoring, SRM)**, en el modo de adquisición SRM, se selecciona un ión en el primer cuadrupolo (Q1) denominado ión precursor; el ión precursor se fragmenta en la celda (q) de colisión en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima; uno de los iones fragmento obtenido en q se selecciona en el segundo cuadrupolo (Q2) etiquetándose como ión producto. La adquisición en SRM es la más utilizada en las aplicaciones analíticas cuantitativas mediante QQQ, ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad.
- **Barrido de iones precursor (Precursor Ion Scan)**, en este modo de adquisición, el primer cuadrupolo (Q1) hace un barrido de todos los iones que provienen de la interfase en el primer cuadrupolo, fragmentándose en la celda de colisión a una energía concreta, de todos los fragmentos obtenidos sólo se selecciona uno por el segundo cuadrupolo (Q2). El barrido de iones precursores tiene sentido en instrumentos de QQQ, debido a que se debe seleccionar un ión fragmento proveniente de la celda de colisión en el segundo analizador (Q2). La aplicación a la que viene asociado este modo de adquisición es a un grupo de compuestos de la misma familia o a metabolitos provenientes de un mismo analito, pues el barrido de iones precursores a un ión producto común está directamente ligado a una estructura química común.
- **Barrido de pérdidas neutras (Neutral Loss Scan)**, es un modo de adquisición muy específico de QQQ debido a que es necesario que dos analizadores trabajen coordinadamente. El primer cuadrupolo (Q1) y el segundo cuadrupolo (Q2) realizan un barrido en desfase, fijando un valor de masa que diferencia los iones barridos en Q1 y los barridos en Q2, una vez han sido fragmentados en la celda de colisión a una energía concreta. De esta forma, solo aquellos analitos que presenten la pérdida neutra seleccionada serán detectados. Al igual que en el barrido de iones precursores, este modo de adquisición es idóneo para la búsqueda de analitos de la misma familia o de metabolitos que comparten una estructura química común.

Aplicación de la cromatografía en la determinación de antibióticos

Basados en la naturaleza polar y baja volatilidad de los residuos de antibióticos veterinarios, la LC es la técnica de elección para su identificación y cuantificación; sin embargo, hay tener en cuenta puntos importantes como la diversidad de antimicrobianos usados en la crianza de animales; la baja concentración de residuos de antimicrobianos en los alimentos, muchas veces en $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la complejidad de las matrices alimentarias las cuales pueden contener elementos que interfieren en la lectura cromatográfica, esto hace que se desarrollen diversos métodos de extracción^{2,40,41}. La Figura 4 muestra las estructuras químicas de los principales antimicrobianos usados en veterinaria.

Como se mencionó anteriormente en la sección extracción de analitos de la muestra, los antibacterianos se unen a diversos componentes de la matriz alimentaria (proteínas) por lo que las muestras deben sufrir un primer proceso de desproteinización. Esto puede ser realizado con solvente como acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano o metanol. La SPE es otro de los pasos fundamentales en la extracción ya que permite retener diversos componentes de la matriz alimentaria que puedan interferir en el sistema cromatográfico^{2,42}. A continuación presentamos un resumen de los métodos de separación y detección en diferentes técnicas cromatográficas usadas para el monitoreo de algunos antibióticos (Tabla 3).

Aminoglucósidos

Lo más representativos de esta clase son la gentamicina, neomicina y estreptomicina⁴³. Aunque es sabido que estos fármacos pueden causar nefro y ototoxicidad, aún son utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas⁶. Diversos factores hacen difícil su determinación. Su naturaleza polar impide su extracción y separación cromatográfica, asimismo no poseen propiedades de cromóforos o fluoróforos y la mayoría de fármacos de este grupo poseen estructuras similares^{6,43}. Para su determinación se prefiere la extracción por intercambio iónico en pH alto o bajo, también puede ser utilizada el pareamiento iónico en solución acuosa o metanólica⁶. Por otro lado, para facilitar su visualización uno de los agentes de derivatización que más se utiliza es el heptaldehido (OPA) y un detector de fluorescencia. Dentro del protocolo de extracción las muestras pueden pasar por desproteinización con ácido tricloroacético ó ácido clorhídrico. Debido a su naturaleza polar la purificación es realizada con columnas C8 ó C18, se usa una fase móvil de acetonitrilo/metanol y agua y se prefiere un sistema de cromatografía líquida de intercambio iónico^{6,43}.

Tetraciclinas

Producidas por *Streptomyces* spp. y con actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunas anaerobias. Tienen afinidad sobre el ribosoma 30S y por lo tanto inhibe la síntesis de proteínas, produciendo un efecto bacteriostático. Los fármacos más representativos de este grupo son la oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, demeclociclina; siendo asociados a problemas gastrointestinales, hipersensibilidad y pobre desarrollo fetal en humanos con un consumo subcrónico⁴⁴. Como se vio anteriormente, los LMR para carne de diversas especies y leche de este grupo son de 200 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente; sin embargo, se acepta 400, 600 y 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en huevos, hígado y riñones⁷. Por otro lado, para miel no debe encontrarse, aunque algunos países europeos aceptan LMR entre 15 a 50 ng/g ⁴⁵. Las técnicas de extracción para la determinación de residuos de tetraciclinas por HPLC prefieren el uso de SPE, detección por ultravioleta y diferentes soluciones dependiendo del alimento. Cinquina et al.⁴⁶ usaron ácido tricloroacético en leche y carne mientras que Andersen et al.⁴⁷ utilizaron ácido succínico en camarones. Por otro lado, para la miel Viñas et al.⁴⁸ y Li et al.⁴⁵ realizaron propusieron usar un buffer de Na_2EDTA .

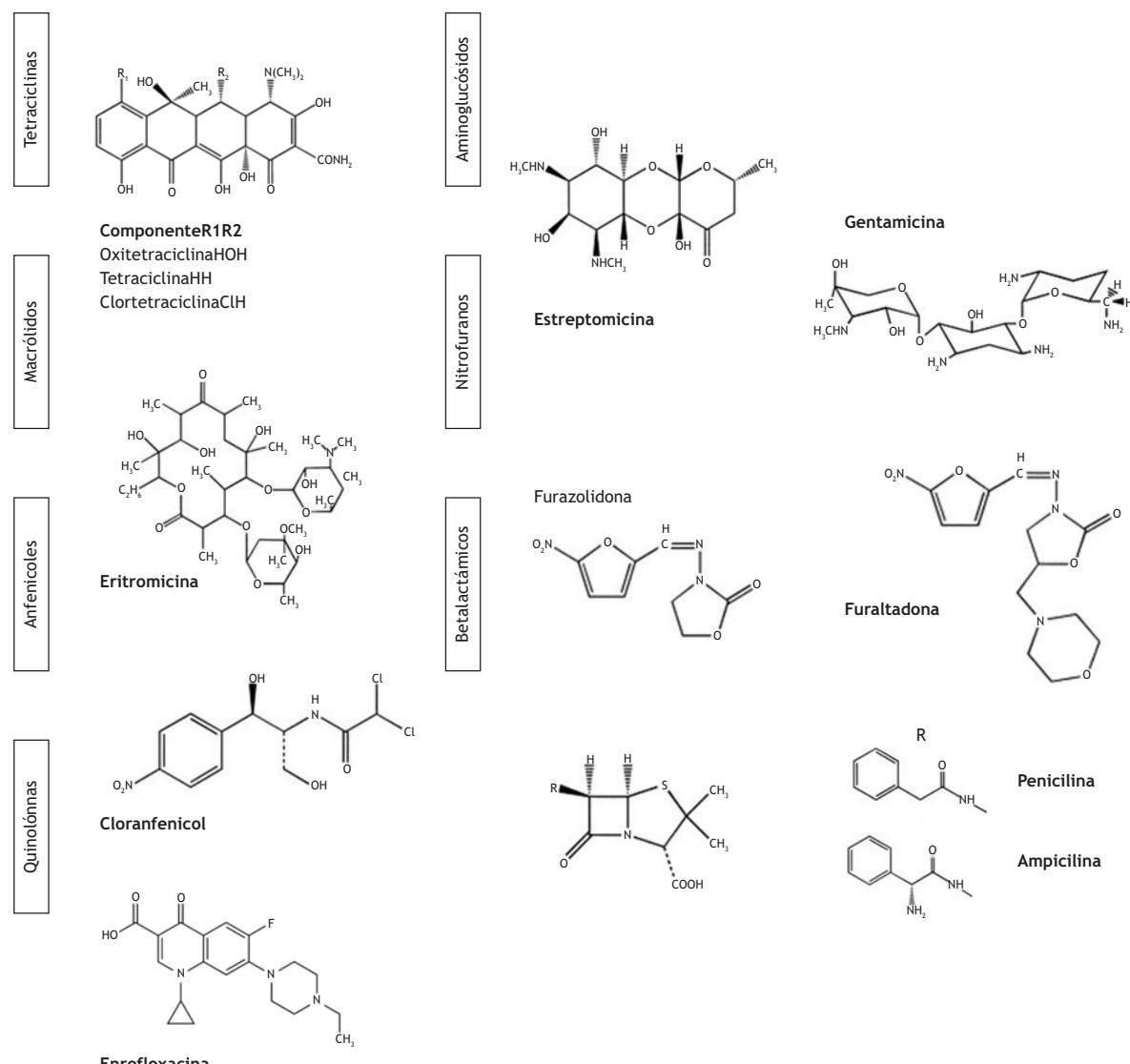


Figura 4. Estructura química de los principales antibióticos veterinarios de importancia en salud pública.

Betalactámicos

Este grupo de antibióticos son ampliamente utilizados en bovinos. Básicamente están divididos en dos clases las penicilinas y las cefalosporinas¹⁰. Dentro de la metodología cromatográfica la parte de extracción y purificación es uno de los pasos más complicados pues requiere una gran cantidad de sales buferadas y solventes orgánicos (acetato de sodio, acetato de amonio, cloruro de tetraetilo amonio, tungsteno de sodio, citrato de sodio, ácido tricloroacético, ácido sulfúrico o acetonitrilo); asimismo, se indica el uso de SPE (C18) y la detección en base a MS^{49,43}. Los LMR varían de 4µg/L para la ampicilina en leche hasta 300 µg/Kg para oxacilina, cloxacilina en tejido como músculo, hígado y riñones¹⁰.

Macrólidos

Son un grupo de fármacos con efectos sobre bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y micoplasma. Actúan

inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles, al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. No se unen a ribosomas de células de mamíferos. Los métodos cromatográficos se basan en la extracción con acetonitrilo ó metanol. La fase móvil está compuesta de agua, acetonitrilo/metanol y ácido fórmico/acetato en diferentes proporciones. Asimismo, se prefiere el uso de columnas C18 acoplada a espectrómetro de masas. La forma de ionización más utilizada es la ESI debido a que los macrólidos son moléculas que contienen átomos de nitrógeno que son fácilmente protonadas positivamente⁵⁰.

Quinolón

Es un compuesto heterocíclico aromático que muestra una excelente actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas inhibiendo la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano. Es usado a menudo en la industria ganadera y en la acuicultura para combatir cuadros infecciosos de tipo pulmonar,



Tabla 3. Técnicas cromatográficas para la determinación de residuos de antibióticos veterinarios.

Antibiótico	Muestra	Extracción	Fase estacionaria	Fase Móvil	Detección	Referencia
Tetraciclinas						
	Carne	Metanol/diclorometano/Fase líquida dispersiva	C18	ACE, FOR, AG	MS/MS	Mookantsa, Dube y Nindi ⁴⁴
	Carne, leche, huevos	Acetonitrilo, Ácido trifluoroacético/Fase sólida con polímero impreso molecularmente	C18	ACE, TFA, AG	UV	Feng et al. ⁵⁹
	Miel, leche	Acetonitrilo, ácido acético/Fase sólida miniaturizada	C18	FOR, MET	TOF/MS	Xu et al. ⁶⁰
B-lactámicos						
	Carne	Acetonitrilo/Fase líquida	C18	ACE, AAC, AG	MS/MS	Li et al. ⁶¹
	Leche, huevos	Acetonitrilo/Fase líquida	C18	ACE, ACA, AG	UV	Shao et al. ⁴⁹
	Carne (cerdo)	Acetonitrilo/Fase sólida dispersiva	C18	ACE, FOR, AG	MS/MS	Huang et al. ⁶²
Macrólidos						
	Carne (cerdo, pollo, bovino)	Borato de sodio y acetato de etilo/Fase sólida con polímero impreso molecularmente	C18	ACE, FOR, AG	MS/MS	Song et al. ⁶³
	Carne (cerdo, pollo, bovino), leche	Acetonitrilo/Fase líquida	C18	ACE, AG	MS/MS	Jank et al. ⁶⁴
Quinolón						
	Carne, huevos	Metanol, ácido metafosfórico/Fase sólida	C18	ACE, FOR, AG	MS/MS	Annunziata et al. ⁶⁵
	Leche	Acetonitrilo, metanol/Fase sólida dispersiva	C18	MET, FOR	MS/MS	Dorival-García et al. ⁶⁶
Cloranfenicol						
	Leche, miel	Acetonitrilo, ácido acético/Fase sólida	C18	MET, ACE	MS/MS	Liu, Lin y Fuh ⁶⁷
	Carne (pollo, bovino, pescado)	Acetato de etilo, hidróxido de sodio	C18	ACE, ACA, AG	MS/MS	Barreto et al. ⁶⁸
Nitrofuranos						
	Pescado (diversos)	Ácido clorhídrico/Fase sólida	C18	ACE, ACA, AG	MS/MS	Zhang et al. ⁶⁹
	Carne (pollo, pescado), leche, miel	Ácido clorhídrico/Fase líquida	C18	MET, AG	MS/MS	Alkan, Kotan y Ozdemir ⁷⁰
	Carne (pollo)	Ácido clorhídrico/Fase sólida	C18	ACE, ACA, MET, AG	MS/MS	Kim et al. ⁷¹

C18, Columna cromatográfica de carbono octadecil ligado a silice; MS, Espectrómetro de masa; UV, Ultravioleta; TOF, Tiempo de vuelo, ACE, Acetonitrilo; FOR, ácido fórmico; TFA, ácido trifluoroacético; MET, metanol; AAC, ácido acético; ACA, acetato de amónio, AG, agua

urinario y digestivo. Dentro de las técnicas cromatográficas, la extracción del analito con acetonitrilo a diferentes pH y la identificación y cuantificación con el HPLC y el detector de fluorescencia fueron los más usados. Sin embargo, en años recientes se está empleando más la LC-MS/MS⁴.

Anfenicos

El cloranfenicol se ha utilizado durante más de 60 años en veterinaria debido a su actividad antibiótica de amplio espectro contra una variedad de patógenos. Sin embargo, en 1994 se clasificó como medicamento de riesgo para la salud y desde entonces se ha prohibido su uso en la producción ganadera. Los métodos de extracción más utilizados involucran el uso de acetato de etilo ó acetonitrilo, una purificación con SPE (C18), separación en columnas C18 y detección por ultravioleta⁴³.

Nitrofuranos

Son un grupo particular de antibióticos que fueron usados como promotores de crecimiento en diversos sistemas de producción animal y utilizados fundamentalmente para tratar la histomoniasis y coccidiosis en aves, tricomoniasis en ganado vacuno o la disentería porcina; sin embargo fueron prohibidos debido a la implicancia de sus residuos en matrices alimentares y la generación de carcinogénesis y mutagénesis en humanos. Nitrofurantoina (NFT), furazolidona (FZD), nitrofurazona (NFZ), nifursol (NFS) y furaltadona (FTD) son alguno de los fármacos que fueron utilizados. Estos rápidamente eran metabolizados y se generaban ciertos metabolitos como 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 3,5-dinitro-ácido salicílico hidracina (DNSAH), semicarbazida (SEM), y 1-aminohidantoina (AHD)^{51,52}. El proceso de extracción cuenta con el uso de soluciones ácidas



como el HCl (0.125 M), fase móvil con mezclas de agua y metanol, SPE y detección por espectrometría de masa

Múltiples residuos de antibióticos

En la actualidad, diversas técnicas cromatográficas han sido desarrolladas y validadas orientadas a la determinación simultánea de fármacos de diferentes grupos. Esto ha sido posible debido al enorme progreso de la MS⁵³. El objetivo es desarrollar una técnica que sea fácil, económica y rápida en la determinación y cuantificación de residuos de antibióticos. El análisis simultáneo de residuos de antibióticos veterinarios ha sido realizado en diversas matrices alimentarias de origen animal como huevos⁵³, miel^{54,55} y leche^{56,57,58}.

CONCLUSIONES

Después de la revisión realizada podemos definir que la técnica más eficiente para detectar y cuantificar residuos de

antibióticos en productos de origen animal es la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la MS en tandem (LC-MS/MS). Esta técnica es compleja ya que involucra una serie de pasos, procedimientos y equipos además de un nivel de especialización del personal a cargo. Sin embargo, se ha convertido en una herramienta esencial ya permite la separación de matrices complejas e información estructural a base del peso molecular del compuesto o sus fragmentos. Esto la hace ideal para los planes de control y monitoreo en diversos países. Es evidente que en los últimos años se han producido avances en resolución, rendimiento y automatismo en esta técnica con lo cual se ha conseguido tener mayor sensibilidad y precisión. Siendo así, nuestra revisión trata de dar alcances de las metodologías aplicadas en la detección de residuos de diferentes grupos de antibióticos, sobre todo los que tienen una implicancia directa en salud pública.

REFERENCIAS

1. Mastovska K. Multiresidue analysis of antibiotics in food of animal origin using liquid chromatography: mass spectrometry. In: Zweigenbaum J, editor. Mass spectrometry in food safety: methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2011. p. 267-307.
2. Blasco C, Picó Y, Torres CM. Progress in analysis of residual antibacterials in food. Trends Analyt Chem. 2007;26(9):895-913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.001>
3. Pacheco-Silva É, Souza JRD, Caldas ED. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. Quim Nova. 2014;37(1):111-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100020>
4. Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. Univ Sci. 2013;19(1):18. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>
5. Verdon E. Antibiotic residues in muscle tissues of edible animal products. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Safety analysis of foods of animal origin. New York: CRC Press; 2010. p. 249-347. 6.
6. Stolker AAM, Brinkman UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals: review. J Chromatogr A. 2005;1067(1-2):15-53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.037>
7. World Health Organization. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2017 Updated up to the 40th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2017) 2017[acceso 5 ago 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BMRL%2B2%252FMRL2e.pdf>
8. European Union. 2002/657/EC: Decisión 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 (Texto pertinente a efectos del EEE) [notificada con el número C(2002) 3044]. 2002[acceso 12 dez 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32002D0657>
9. Romero González R, Fernández Moreno JL, Plaza Bolaños P, Garrido French A, Martínez Vidal JL. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev Esp Salud Publica. 2007;81(5):461-74.
10. Bogianni S, Di Corcia A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. Anal Bioanal Chem. 2009;395(4):947-66. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2930-6>
11. Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. Detección de antibióticos en leches: Un problema de salud pública. Rev Salud Publica. 2009;11:579-90. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400009>
12. Reig M, Toldrá F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. Meat Science. 2008;78(1-2):60-7. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>
13. Baynes RE, Dedonder K, Kissell L, Mzyk D, Marmulak T, Smith G, et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. Food Chem Toxicol. 2016;88:112-22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>
14. European Union. Commission Regulation (EU) 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Communities. 2010[acceso 1 nov 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037>



15. European Food Safety Authority - EFSA. Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. 2016[acceso 25 jan 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-923/epdf>
16. Comisión de la Comunidad-Andina. Decision 483: Normas para el registro, control, comercialización y uso de productos veterinarios. [s.L.]: Sistema de Informacion sobre Comercio Exterior; 2000[acceso 18 maio 2016]. Disponible en: <http://www.sice.oas.org/Trade/Junac/decisiones/dec483as.asp>
17. Perú. Decreto Supremo N° 004-2011- AG. Aprueba el reglamento de inocuidad alimentaria. El Peruano. 2001[acceso 19 maio 2016]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/SECCION_NOR_AGROA/DS%20004%202011%20AG%20Reglamento%20de%20Inocuidad%20Agroalimentaria.pdf
18. Perú. Resolución Directoral N° 0041-2016-MINAGRI-SENASA-DIAIA. Aprueban plan anual de monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos, periodo abril - diciembre 2016. El Peruano. 21 abr 2016[acceso 19 maio 2016]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/11/RD-0041-2016-MINAGRI-SENASA-DIAIA.pdf>
19. Perú. Decreto Supremo N° 034-2008-AG. 2008. Reglamento del Decreto Legislativo 1062. Ley de Inocuidad de los Alimentos. El Peruano. 17 dic 2008[acceso 20 maio 2016]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/SECCION_NOR_AGROA/D.S.%20034-2008-AG%20Reglamento%20de%20la%20Ley%20de%20INOCUIDAD.pdf
20. Perú. Resolución Jefatural N° 0207-2012-AG-SENASA. Programa Nacional de Contaminantes. El Peruano. 7 set 2012[acceso 20 maio 2016]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2016/08/RJ-0207-2012-AG-SENASA.pdf>
21. Perú. Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria. PRO-SIAG-07. Procedimiento: Toma y envío de muestras de alimentos agropecuarios primarios y piensos. 2015[acceso 3 jun 2016]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2015/10/PRO-SIAG-07.-PROCEDIMIENTO-TOMA-Y-ENVÍO.pdf>
22. Perú. Dirección del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. División de Control Sanitario del Medio Acuático. SGC-MAI/ SANIPES. Manual: Indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos y piensos de origen pesquero y acuícola. 2010[acceso 5 jun 2016]. Disponible en: http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13_ManualIndicadorescriteriosdeseguridadalimentaria-rev02-2010.compressed.pdf
23. Perú. Dirección del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. División de Control Sanitario del Medio Acuático. PR-DSANIPES/CSMAA - 02. Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura. 2008[acceso 11 maio 2016]. Disponible en: http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13_ControldeResiduosdemedicamentoseterinariosssustanciasprohibidasylaguicidasenlaacuicultura.compressed.pdf
24. Ardrey RE. Liquid chromatography: mass spectrometry: an introduction. Wiltshire: John Wiley & Sons; 2003. Chapter 2, Liquid chromatography; p. 7-31.
25. Ette LS. Unified nomenclature for chromatography. J High Resolut Chromatogr. 1993;16(4):258-61. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240160411>
26. Koester CJ, Moulik A, editors. Trends in environmental analysis. Livermore: Lawrence Livermore National Laboratory; 2005.
27. Balizs G, Hewitt A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2003;492(1-2):105-31. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00890-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00890-0)
28. Shi J, Xue SJ, Ye X, Jiang Y, Ma Y, Li Y, et al. Separation technology in food processing. In: Simpson BK, editor. Food biochemistry and food processing. Iowa,: Wiley-Blackwell; 2012. p. 764-84.
29. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Equipment. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 87-145.
30. European Union. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Communities. 2002[acceso 20 jun 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32002D0657>
31. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. The Column. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 199-252.
32. Reig M, Toldrá F. Growth promoters. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Safety analysis of foods of animal origin. New York: CRC Press; 2010. p. 229-48.
33. Mayor R. Preparative separations. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 725-55.
34. Abd-Talib N, Mohd-Setapar S, Khamis AK. The benefits and limitations of methods development in solid phase extraction: Mini review. Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering). 2014;69(4):69-72. <https://doi.org/10.11113/jt.v69.3177>
35. León N, Roca M, Igualada C, Martins CPB, Pastor A, Yusá V. Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. J Chromatogr A. 2012;1258:55-65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.031>
36. Sarafraz-Yazdi A, Razavi N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. Trends Anal Chem. 2015;73:81-90. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.004>
37. Dass C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. 610 p. <https://doi.org/10.1002/9780470118498>



38. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: Principles and applications*. 3rd ed. Wiltshire: Wiley & Sons; 2013.
39. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Detection*. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. *Introduction to modern liquid chromatography*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 147-197.
40. Niessen WMA. *LC-MS in food safety analysis*. In: Niessen WMA, editor. *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 3rd ed. *Chromatographic Science Series*. New York: CRC Press; 2006. p. 381-412.
41. Susanne R, RicardoMathias O. *Antimicrobial residues*. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. New York: CRC Press; 2012. p. 567-90.
42. Kennedy DG, McCracken RJ, Cannavan A, Hewitt SA. *Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk*. *J Chromatogr A*. 1998;812(1-2):77-98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00048-X)
43. Schenck FJ, Callery PS. *Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk*. *J Chromatogr A*. 1998;812(1-2):99-109. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01291-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01291-0)
44. Mookantsa SOS, Dube S, Nindi MM. *Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry*. *Talanta*. 2016;148:321-8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.006>
45. Li J, Chen L, Wang X, Jin H, Ding L, Zhang K, et al. *Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography*. *Talanta*. 2008;75(5):1245-52. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.027>
46. Cinquini AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. *Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle*. *J Chromatogr A*. 2003;987(1-2):227-33. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01446-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01446-2)
47. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. *Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*. 2005;529(1-2):145-50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.012>
48. Viñas P, Balsalobre N, López-Erroz C, Hernández-Córdoba M. *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey*. *J Chromatogr A*. 2004;1022(1-2):125-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.066>
49. Shao Y-X, Chen G-H, Fang R, Zhang L, Yi L-X, Meng H-L. *Analysis of six β -lactam residues in milk and egg by micellar electrokinetic chromatography with large-volume sample stacking and polarity switching*. *J Agric Food Chem*. 2016;64(17):3456-61. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00482>
50. Wang J. *Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices*. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(1):50-92. <https://doi.org/10.1002/mas.20189>
51. Lázaro CA, Espinoza J, Silva JT, Paschoalini VMF, Conte Júnior CA. *Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin*. *Arq Inst Biol*. 2015;82:1-9. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000532013>
52. Walker M, Wong Y-c. *Protection of the agri-food chain by chemical analysis*. In: Bhat R, Gómez-López VM, editors. *Practical food safety*. Chichester: John Wiley & Sons; 2014. p. 125-44. <https://doi.org/10.1002/9781118474563.ch8>
53. Jiménez V, Rubies A, Centrich F, Company R, Guiteras J. *Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*. 2011;1218(11):1443-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.021>
54. Hammel Y-A, Mohamed R, Gremaud E, LeBreton M-H, Guy PA. *Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*. 2008;1177(1):58-76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.112>
55. Bargańska Ź, Namieśnik J, Ślebioda M. *Determination of antibiotic residues in honey*. *Trends Analys Chem*. 2011;30(7):1035-41. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014>
56. Martins MT, Barreto F, Hoff RB, Jank L, Arsand JB, Motta TMC, et al. *Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis*. *Int Dairy J*. 2016;59:44-51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.048>
57. Han RW, Zheng N, Yu ZN, Wang J, Xu XM, Qu XY, et al. *Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS*. *Food Chem*. 2015;181:119-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.041>
58. Aguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González R, Frenich AG. *Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*. 2008;1205(1-2):10-6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.066>
59. Feng MX, Wang GN, Yang K, Liu HZ, Wang JP. *Molecularly imprinted polymer-high performance liquid chromatography for the determination of tetracycline drugs in animal derived foods*. *Food Control*. 2016;69:171-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.050>
60. Xu JJ, An M, Yang R, Tan Z, Hao J, Cao J, et al. *Determination of tetracycline antibiotic residues in honey and milk by miniaturized solid phase extraction using chitosan-modified graphitized multiwalled carbon nanotubes*. *J Agric Food Chem*. 2016;64(12):2647-54. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00748>
61. Li W, Shen H, Hong Y, Zhang Y, Yuan F, Zhang F. *Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*. 2016;1022:298-307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.026>



62. Huang Z, Pan X-D, Huang B-f, Xu J-J, Wang M-L, Ren Y-P. Determination of 15 β -lactam antibiotics in pork muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*. 2016;66:145-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.037>
63. Song X, Zhou T, Liu Q, Zhang M, Meng C, Li J et al. Molecularily imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2016;208:169-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.070>
64. Jank L, Martins MT, Arsand JB, Campos Motta TM, Hoff RB, Barreto F et al. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). *Talanta*. 2015;144:686-95. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.078>
65. Annunziata L, Visciano P, Stramenga A, Colagrande MN, Campana G, Scorticchini G et al. Development and validation of a method for the determination of quinolones in muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods*. 2016;9(8):1-13. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0407-8>
66. Dorival-García N, Junza A, Zafra-Gómez A, Barrón D, Navalón A. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*. 2016;60:382-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.008>
67. Liu H-Y, Lin S-L, Fuh M-R. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk and honey using modified QuEChERS extraction coupled with polymeric monolith-based capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2016;150:233-9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.045>
68. Barreto F, Ribeiro C, Barcellos Hoff R, Dalla Costa T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016;1449:48-53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.024>
69. Zhang Y, Qiao H, Chen C, Wang Z, Xia X. Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2016;192:612-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.035>
70. Alkan F, Kotan A, Ozdemir N. Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofuran metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography-mass spectrometry. *Mac Vet Rev*. 2016;39(1):15. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2015-0060>
71. Kim D, Kim B, Hyung S-W, Lee CH, Kim J. An optimized method for the accurate determination of nitrofurans in chicken meat using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *J Food Composit Anal*. 2015;40:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.005>

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), número de proceso E-26/201.185/2014. C.A. Conte-Junior agradece el apoyo del Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número de proceso 311422/2016-0.

Conflicto de Interese

Los autores informan que no existe conflicto de interes con pares e instituciones, políticos ó financieros para este estudio.



Esta publicación está bajo la licencia Creative Commons Asignación 3.0 no adaptada. Para ver una copia de esta licencia, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.