



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN SANGRE DE  
BOVINO, MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA REVERSA**

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniero Biotecnólogo

**AUTORES:      ÁNGEL PAUL AGUILAR MARTÍNEZ**

**CARLOS IVÁN PICÓN ILLESCAS**

**TUTORA:       DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D**

Cuenca - Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Nosotros, Ángel Paul Aguilar Martínez con documento de identificación N° 0707006110  
y Carlos Iván Picón Illescas con documento de identificación N° 0105578066;  
manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de  
lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de  
manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 07 de agosto del 2024

Atentamente,



Ángel Paul Aguilar Martínez

0707006110



Carlos Iván Picón Illescas

0105578066

## **CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Ángel Paul Aguilar Martínez con documento de identificación N° 0707006110 y Carlos Iván Picón Illescas con documento de identificación N° 0105578066, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Determinación de antibióticos betalactámicos en sangre de bovino, mediante cromatografía líquida reversa”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 07 de agosto del 2024

Atentamente,



Ángel Paul Aguilar Martínez

0707006110



Carlos Iván Picón Illescas

0105578066

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN SANGRE DE BOVINO, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA REVERSA, realizado por Ángel Paul Aguilar Martínez con documento de identificación N° 0707006110 y por Carlos Iván Picón Illescas con documento de identificación N° 0105578066, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 07 de agosto del 2024

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D

0102291044

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres Juan y Denice por acompañarme en cada paso que doy en la búsqueda de ser mejor persona y profesional, por sus oraciones y bendiciones, por sus consejos y enseñanzas, por su apoyo y compañía, a mis abuelitos Ángel y María un abrazo y beso hasta el cielo.

A mi hermana Karolina, por ayudarme siempre que pudo y aconsejarme.

A Jhon, por la ayuda que me brindo en el transcurso de este escrito y por todas las conversas y risas que hubo.

A mis amigos que hice desde el principio y aún siguen conmigo, y a los amigos que conocí en el transcurso y se volvieron importantes.

A mis profesores, gracias por guiarme y forjar la persona que soy, a mi directora de tesis la Doctora Inés Malo, por ser un pilar fundamental y gran amiga en todo este proceso.

A mis compañeros Carlos, Accel, Gaby, Andy por crear un grupo bastante memorable.

A D. Soto por sus palabras de aliento, su apoyo y por alegrarme el corazón por más de dos años y los que aún quedan por vivir.

Ángel Aguilar

A Dios, a mis padres, Iván y Janeth, dedico este trabajo, su amor incondicional, su apoyo constante y su fe inquebrantable en mis capacidades han sido la brújula que me ha guiado a lo largo de este camino. Por cada consejo sabio que me dio y cada abrazo que me reconfortó en los momentos difíciles. Ustedes son mi inspiración y mi mayor orgullo.

A mis hermanos, Christian y Christopher, mi más sincero agradecimiento por su amistad, compañerismo y complicidad. Juntos hemos compartido innumerables momentos de alegría y hemos superado juntos los desafíos. Ustedes han sido mi apoyo incondicional y mi mayor fuente de diversión. Los quiero mucho.

A mi abuelita Lucy, aunque ya no esté físicamente conmigo, su recuerdo vive en mi corazón. Su sabiduría, su calidez y su amor desinteresado me acompañan en cada paso que doy. Sé que estaría muy orgullosa de mí y me llena de emoción dedicarle este trabajo.

A Rocio y Andrés, y demás seres queridos, gracias por formar parte de mi vida. Su cariño y apoyo han sido fundamentales para mi crecimiento personal y profesional. Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi corazón.

A mis profesores, cuyo conocimiento y guía han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Un agradecimiento especial a mi tutora, Doctora Inés Malo, por su paciencia, dedicación y valiosas enseñanzas.

A mis amigos Accel, Paul, Gaby, Andy, Gustavo, Dailenis y Leslie, esos compañeros de viaje que han compartido conmigo alegrías, tristezas, éxitos y fracasos. Gracias por

escucharme, por animarme y por celebrar conmigo cada logro. Ustedes son mi segunda familia y los quiero con todo mi corazón.

Carlos Picón

### **AGRADECIMIENTOS**

Es un inicio no me imagine estar justo donde estoy, terminando una etapa muy importante en mi vida, terminando la senda y abriéndome camino a otro mundo lleno de desafíos, en este lapso de mi vida logre muchas cosas de las que estoy orgulloso y feliz de haberlas hecho, otras de las que no tanto, perdí sueños, estabilidad, y gane experiencias, historias que recordaré por siempre, entendí que equivocarse es parte de aprender y hoy estoy orgulloso de la persona en la que me convertí, seguro mi niño interior está contento, que aunque hoy ya no me encuentre jugando con papeles o creando juguetes, siendo callado y algo rebelde, está feliz de quien soy hoy porque está lleno de sueños por cumplir. Agradezco a los medios que me hicieron llegar a donde estoy, a las personas, a las decisiones, a la ambición y determinación que siempre me hizo querer llegar más arriba, al amor y apoyo incondicional, porque estoy seguro de que, sin todo aquello, no cumpliría una de mis ilusiones más anheladas.

Ángel Aguilar

Es un sueño encontrarme aquí, al final de una etapa que me abre las puertas hacia algo completamente nuevo. A lo largo de este tiempo, he ganado muchas experiencias que me han formado como persona y como futuro profesional. Pero quizás lo más importante es que me encontré a mí mismo en el proceso. Aprendí que equivocarse y cometer errores son parte del proceso, hay que aprender a caer para poder levantarse, y gracias a esto soy una mejor persona. Agradezco a ese niño con grandes sueños, ambiciones y metas por cumplir, los cuales me han permitido llegar hasta aquí, y también agradezco a los medios, las personas por ese apoyo incondicional. Y, por supuesto, a mis padres: esto es su logro tanto como el mío. Me enseñaron a no rendirme, a confiar en Dios y a agradecer. Siempre estarán conmigo, orgullosos de cada paso que dé. A mis hermanos, mis compañeros de risas y momentos inolvidables, gracias por ser mi razón más importante.

Y a mis amigos de la carrera, espero que sigamos compartiendo risas y momentos toda la vida. ¡Familia y amigos, lo logramos juntos!

Carlos Picón



RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	13
CAPÍTULO 1.....	14
INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA .....	18
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	18
1.4 JUSTIFICACIÓN .....	18
1.5 OBJETIVOS .....	20
1.5.1 GENERAL.....	20
1.5.2 ESPECÍFICOS.....	20
1.6 HIPÓTESIS .....	21
CAPÍTULO 2.....	21
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	21
2.1 ANTECEDENTES .....	21
2.2 MARCO TEÓRICO .....	23
2.2.1 BASES TEÓRICAS .....	23
2.2.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS .....	23
2.2.3 USO CORRECTO DE ANTIBIÓTICOS.....	26
2.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN .....	27
2.2.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	28

2.2.6 PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN - HPLC .....	29
2.2.7 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA .....	30
2.2.8 DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS (PENICILINA Y AMPICILINA) EN HPLC:.....	31
2.2.9 MARCO CONCEPTUAL DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	31
2.2.10 NORMATIVAS DEL ECUADOR.....	32
CAPÍTULO 3.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN .....	34
3.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	34
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	35
3.3 VARIABLES.....	36
3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE .....	36
3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS ....	36
3.4.1 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS ....	36
3.5 PROTOCOLO O IMPLEMENTACIÓN.....	37
3.5.1 TOMA DE MUESTRAS .....	37
3.6 PRETRATAMIENTO .....	39
3.6.1 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	39
3.6.2 ALMACENAMIENTO .....	40
3.6.3 FILTRADO .....	41
3.7 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	42
3.8 USO DEL HPLC.....	43
3.8.1 CONDICIONES DEL EQUIPO .....	44
3.8.2 CONDICIONES DEL EQUIPO USADAS PARA DETECCIÓN DE ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS .....	44

3.8.3 ULTRASONIDO .....	46
3.9 DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS MEDIANTE HPLC .....	47
3.10 CORRIDA DE LAS MUESTRAS. ....	47
CAPÍTULO 4.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS .....	48
4.3 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	49
4.4 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	51
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
4.6 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS.....	57
CAPÍTULO 5.....	58
5.1 CONCLUSIONES .....	58
5.2 RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ANEXOS .....	67

## **ABREVIATURAS**

**AM:** antimicrobiano

**ATB:** antibiótico

**CMI:** concentración mínima inhibitoria

**EPPS:** equipos de protección

**FDA:** Food and drug administration

**FSIS:** servicio de inocuidad e inspección de alimentos

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta presión

**MAG:** Ministerio de Agricultura y Ganadería

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PBP:** protein binding penicillin

**PLP:** proteínas ligaduras de penicilina

**TFA:** ácido trofluoroacético

## RESUMEN

El presente estudio pretende determinar antibióticos betalactámicos en la sangre bovina mediante cromatografía líquida reversa para verificar la seguridad alimentaria en productos de consumo humano, según las normativas vigentes del Ecuador en el 2024. En un contexto del aumento de demanda de alimentos de productos ganaderos, el uso de antibióticos se ha convertido en algo común, tanto como promotores de crecimiento como para tratar enfermedades, pero su uso indiscriminado puede aumentar en gran medida la resistencia bacteriana, representando un grave problema para la salud pública, ya que complica el tratamiento de infecciones y expone a la población a efectos indeseados. Esta investigación realizada en la provincia del Azuay incluyó la revisión bibliográfica, pruebas de laboratorio para medir las concentraciones de antibióticos y análisis estadísticos para evaluar el cumplimiento de las normativas. Aunque la **mayoría** de las muestras analizadas estaban dentro de los límites permitidos, los resultados recalcan la necesidad urgente de mejorar el control y la concienciación sobre el uso de antibióticos en la ganadería para resguardar la salud pública y garantizar la calidad de los alimentos cárnicos.

## ABSTRACT

The present study aims to determine beta-lactam antibiotics in bovine blood by reverse liquid chromatography to verify food safety in products for human consumption, according to current regulations in Ecuador in 2024. In a context of increasing food demand for livestock products, the use of antibiotics has become common, both as growth promoters and to treat diseases, but their indiscriminate use

can greatly increase bacterial resistance, representing a serious problem for public health, as it complicates the treatment of infections and exposes the population to unwanted effects. The research, conducted in the province of Azuay, included a literature review, laboratory tests to measure antibiotic concentrations and statistical analysis to assess compliance with regulations. Although most of the samples tested were within the permitted limits, the results highlight the urgent need to improve control and awareness of antibiotic use in livestock farming to safeguard public health and ensure the quality of meat products.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

El objetivo de este estudio es “analizar la presencia de antibióticos betalactámicos en sangre de bovino, mediante cromatografía líquida reversa validando la seguridad alimentaria en productos de consumo humano a través del cumplimiento de normas vigentes” recolectando datos disponibles mediante revisión bibliográfica, para establecer las concentraciones de antibióticos B-lactámicos mediante pruebas de laboratorio y examinando los datos obtenidos con pruebas estadísticas.

La demanda actual de alimentos a nivel mundial se incrementa año tras año, por lo cual, las industrias pecuarias enfrentan el gran desafío de producir alimentos de buena calidad, en las cantidades necesarias, y a un precio asequible para toda la población. Las características de los sistemas productivos actuales implican el uso de sustancias que contribuyen al mejoramiento de la capacidad productiva de los animales (promotores de crecimiento), de igual forma se requiere en las diferentes etapas de la vida del animal combatir enfermedades que requieren el uso de fármacos antibióticos para su tratamiento (Dueñez et al., 2022).

El uso indiscriminado de antibióticos es un problema grave de salud pública con consecuencias importantes. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos promueve el

desarrollo de bacterias resistentes a estos medicamentos. Estas bacterias resistentes son mucho más difíciles de tratar, lo que puede llevar a infecciones más graves y prolongadas, también el uso innecesario de antibióticos expone a las personas a posibles efectos secundarios, como alergias, náuseas, diarrea y alteraciones en la flora intestinal normal (Encalada et al., 2023).

Es importante abordar el uso de estos medicamentos ya que según un estudio en Lima-Perú del 2023, el Ecuador tiene un abuso de antibióticos sin consulta previa de un 30-40% (CHÁVEZ LÓPEZ et al., 2023) lo que genera una resistencia a los antibióticos siendo una de las mayores amenazas para la salud pública, puesto que, con el continuo aumento de la resistencia, las infecciones comunes se tornarán más difíciles de tratar y potencialmente mortales. Asimismo, la resistencia también afecta la cría de animales y la producción de alimentos, con implicaciones económicas y de seguridad alimentaria.

Esta investigación busca recolectar muestras de una población bovina, para recolectar información relevante sobre el uso de antibióticos. Posteriormente, se analizarán las muestras para determinar las concentraciones de penicilina y ampicilina, y se verificará el cumplimiento de las normativas vigentes. Finalmente, se interpretarán los resultados en el contexto de las prácticas ganaderas.

Los antibióticos penicilina y ampicilina, pertenecientes a la familia de los betalactámicos, se utilizan ampliamente en el ganado bovino para tratar diversas infecciones bacterianas. Se administran comúnmente en casos de mastitis en vacas lecheras, enfermedades respiratorias como la neumonía, infecciones del tracto reproductivo como metritis, pododermatitis y otras lesiones en las pezuñas, así como infecciones sistémicas o localizadas como abscesos o heridas infectadas. La penicilina G es el antibiótico de elección para el tratamiento de la sífilis, para ciertas infecciones

por clostridios y, junto con la gentamicina, para la endocarditis por enterococos sensibles (Werth, 2022).

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La OMS recomienda firmemente reducir el uso de todas las clases de antibióticos de importancia médica en animales, incluyendo la restricción completa de estos fármacos para estimular el crecimiento y prevenir enfermedades sin diagnóstico (Lindmeier, 2017).

La Unión Europea ha prohibido el uso rutinario de antibióticos en animales de granja a partir de 2022. Mientras que en Ecuador se instruye a los médicos veterinarios a mantener una ética profesional en el uso de antibióticos, respetando los tiempos de retiro establecidos (Villa Parra & Vintimilla Rojas, 2016).

La persistencia de la resistencia a los antibióticos sigue siendo un problema de salud muy importante a nivel mundial hasta ahora. En América Latina, esta resistencia representa un desafío significativo para la medicina contemporánea, dada la diversidad de mecanismos de resistencia bacteriana y su creciente prevalencia a escala global. Hasta el año 2018, las tasas de resistencia a nivel mundial alcanzaron un 33%, principalmente debido al incremento de cepas que producen beta lactamasas de espectro extendido, para los cuales los antibióticos de primera línea muestran niveles alarmantes de resistencia (Ross et al., 2020).

Entre los antibióticos comúnmente empleados se encuentran las fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas y aminoglucósidos. Las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, son efectivas contra una amplia gama de bacterias y se utilizan para tratar infecciones del tracto urinario, respiratorias y de la piel. Los macrólidos, como la azitromicina, son útiles en infecciones respiratorias y de la piel, mientras que



las tetraciclinas, como la doxiciclina, son efectivas contra infecciones bacterianas diversas. Por otro lado, los aminoglucósidos, como la gentamicina, se emplean en infecciones graves causadas por bacterias resistentes a otros antibióticos.

En un estudio sobre la determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas del 2019 se concluye que un 26% de la leche cruda de vaca comercializada en los principales mercados de la ciudad de Cuenca (incluidos vehículos transportadores de leche cruda) tiene presencia de residuos de antibióticos, por lo que existe un incumplimiento a las normativas respecto al uso del medicamento. La familia de antibióticos con más presencia en las muestras de la investigación fueron los betalactámicos con un 23% de muestras positivas (Eulalia, 2019). Además, en el 2020 se realiza una tesis sobre el uso de tetraciclinas y betalactámicos, determinando que el 61% de la leche comerciada por pequeños productores en la parroquia de Chorocopte, tiene presencia de residuos de antibióticos (Jhoana, 2020). Por último, en una investigación realizada en Tarqui en el 2023 se concluyó que, en el caso del uso de antibióticos como promotores del crecimiento, un tercio de la población en estudio está de acuerdo con este uso, es por ello por lo que se produce el abuso de antibióticos en los animales (Sigcha Baño & Naula Medina, 2023).

El uso desmedido de antibióticos en la producción de ganado bovino para consumo humano preocupa mucho por su potencial para fomentar la resistencia bacteriana. Pese a las regulaciones establecidas para controlar el uso de estos medicamentos, hay evidencia que sugiere que los productos bovinos pueden contener residuos de antibióticos, especialmente de la clase betalactámicos, en niveles superiores a los permitidos por las normativas vigentes. Esta discrepancia entre la presencia de antibióticos en productos bovinos y el cumplimiento de las normas plantea interrogantes sobre sus repercusiones en la salud pública. Por tanto, surge la necesidad de investigar

sistemática y exhaustivamente la presencia de antibióticos betalactámicos en la sangre de ganado bovino y su relación con cumplir las normativas establecidas en 2024.

## **1.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

La ubicación geográfica de este estudio se encuentra en la provincia del Azuay cantón Cuenca, la investigación se ejecutó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Guayaquil – Campus María Auxiliadora, Ecuador, misma que tuvo una duración de aproximadamente dos meses.

## **1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe la presencia de antibióticos betalactámicos penicilina y ampicilina en sangre bovina respecto al cumplimiento con normas vigentes del Ecuador en el 2024?

## **1.4 JUSTIFICACIÓN**

En las ganaderías de explotación lechera es más común el uso de los antibióticos, debido a la alta incidencia de enfermedades infecciosas, ya sean procesos respiratorios, digestivos, de la glándula mamaria, del sistema respiratorio y otros (Garnica M., 2003).

El enfoque "Una Salud" posiciona a la salud pública como una herramienta fundamental para afrontar desafíos sanitarios que surgen de la compleja interacción entre animales, seres humanos y el medio ambiente. Abarca aspectos como la sostenibilidad de los sistemas productivos, la salud ambiental, la industria procesadora

de alimentos de origen animal, los sistemas de garantía de calidad, la seguridad alimentaria y el comercio internacional de alimentos de calidad (Valencia, 2018).

Los alimentos contaminados con residuos de antibióticos constituyen un problema de salud pública emergente, de ahí la importancia del control de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos para evitar la aparición de resistencia a estos antibióticos en el ser humano (Salas Z. et al., 2013). El consumo de leche y productos lácteos contaminados con residuos de antibióticos puede generar serios problemas de salud en las personas. Un ejemplo claro es la penicilina, responsable de aproximadamente el 10% de las reacciones alérgicas. La sulfonamida, por su parte, está asociada al 3.5% de estas alergias. Además, el cloranfenicol es un antibiótico altamente tóxico que puede causar anemia aplásica en los seres humanos (Torres, 2017). La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en una grave amenaza para la salud humana y animal a nivel global, con un impacto económico considerable. La presencia de residuos de antibióticos en la sangre bovina es un factor que agrava esta problemática y requiere atención urgente. El uso de antibióticos en la medicina humana y la producción animal puede promover la diseminación de genes de resistencia más allá de la esperada por la presión selectiva en el organismo objetivo (Parada, 2014).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), señala que las posibles causas de residuos son: el uso inadecuado de medicamentos (incluyendo la mala selección de antibióticos), la dosis (no seguir las instrucciones etiquetadas), la duración del tratamiento, la vía de administración y el cumplimiento en animales y seres humanos, crean condiciones favorables para el surgimiento y la propagación de microorganismos resistentes (Food And Drug Administration, 2015).

La resistencia a los antimicrobianos se refiere a la capacidad de los microorganismos, como las bacterias, de volverse cada vez más resistentes a un AM al

que antes eran susceptibles y, como resultado, las infecciones pueden persistir en el organismo, aumentando el riesgo de propagación a otras personas (Bennani et al., 2020).

El uso incontrolado de los medicamentos está ocasionando un rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos en los microorganismos causantes de enfermedades. (Edward, s. f.).

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 GENERAL**

Analizar la presencia de antibióticos betalactámicos en sangre de bovino, mediante cromatografía líquida reversa validando la seguridad alimentaria en productos de consumo humano a través del cumplimiento de normas vigentes.

### **1.5.2 ESPECÍFICOS**

1. Recolectar datos disponibles mediante revisión bibliográfica estableciendo la variación del uso de antibióticos en los últimos 10 años.
2. Determinar las concentraciones de antibióticos B-lactámicos mediante pruebas de laboratorio desarrollando una metodología reproducible.
3. Analizar los datos obtenidos mediante pruebas estadísticas verificando el cumplimiento con normativas vigentes.

## **1.6 HIPÓTESIS**

Las muestras de sangre bovina analizadas presentan residuos de antibióticos de penicilina y ampicilina.

## **CAPÍTULO 2**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

#### **2.1 ANTECEDENTES**

La FDA y el Servicio de Inocuidad e Inspección de Alimentos (FSIS) del USDA están a cargo de la regulación y el control de los residuos de antibióticos en la carne de res, de aves de corral y en los productos derivados del huevo. Se emplean estrategias para evitar que los residuos de antibióticos que superan una tolerancia establecida entren en el abastecimiento alimentario, como se presenta en la tabla 1. Quienes manipulen el ganado deben cumplir las regulaciones de la FDA. Incluye tiempo de retractación específico para cada antibiótico utilizado para garantizar que se han eliminado suficientes antibióticos del sistema del animal antes de que su carne o leche entre en el abasto alimentario (Villa Parra & Vintimilla Rojas, 2016).

En una tesis realizada por la médica veterinaria Jhoana Duy en el 2020 que tenía como objetivo “determinar la presencia de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en leche cruda de pequeños productores de la Parroquia Chorocopte, provincia del Cañar” recolectaron un total de 210 muestras de leche desde el 27 de noviembre del 2019 al 02 de enero del 2020, en donde se determinó un resultado de 128 muestras positivas de 210 muestras tomadas, es decir, un 61 por ciento de muestras con antibióticos.

Por otra parte, en una investigación realizada por la médica veterinaria Eulalia Caracundo en el 2019 que tenía por objetivo “determinar la presencia de antibióticos de la familia de betalactámicos y tetraciclinas de la leche cruda comercializada en los principales mercados de la ciudad de Cuenca-Ecuador”, se tomaron 150 muestras de las cuales 39 dieron positivo a residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas, lo que se refiere a que un 26 % de las muestras presentaban residuos de antibióticos.

En comunicados de distintas entidades destinadas a la regulación de los fármacos, se puede destacar que:

La FDA en un plan sobre el uso de antimicrobianos en veterinaria del 2018, el Centro de Medicina Veterinaria de la FDA presentó un plan de acción de cinco años para combatir la resistencia a los antimicrobianos y preservar su efectividad. El plan elimina el uso de antimicrobianos importantes para humanos como promotores de crecimiento en animales productores de alimentos, limita su uso terapéutico restante bajo supervisión veterinaria, aplicará un enfoque basado en riesgos para evaluar nuevos antimicrobianos para animales, colaborará con partes interesadas para promover su uso adecuado, y recopilar datos de resistencia (Estados Unidos, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en un comunicado de prensa del 7 de noviembre de 2017 recomienda reducir drásticamente el uso de antibióticos en animales destinados a la producción de alimentos. En concreto, la OMS insta a prohibir el uso de antibióticos para promover el crecimiento en animales sanos y permitir su administración con fines terapéuticos en enfermedad diagnosticada, priorizando antibióticos menores para la medicina humana. Además, propone restringir totalmente en animales el uso de antibióticos clasificados como de "importancia crítica y máxima prioridad" para tratar infecciones graves (Lindmeier, 2017).

A su vez, en un estudio realizado por los médicos Sigcha Baño y Naula Medina en el 2023 en donde buscaban “identificar las características alimentarias, preocupaciones y creencias sobre acciones relacionadas al uso de antibióticos en la crianza de animales en Tarqui” demostraron que existía preocupaciones de la población sobre la resistencia bacteriana en animales de granja. Para la identificación se realizó una encuesta en donde 181 personas (69,35%) refieren estar muy preocupadas, teniendo mayor porcentaje en la población femenina, además, 71 personas (27,2%) se encuentran un poco preocupadas, mientras que a 9 personas (3,45%) no les preocupa.

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 BASES TEÓRICAS**

La ubicación geográfica de este estudio se encuentra en la provincia del Azuay, caracterizada por su gran importancia pecuaria, siendo la tercera provincia con mayor porcentaje de cabezas de ganado vacuno (INEC, 2012), el cual desempeña un papel muy importante en la producción de leche, el consumo anual de productos derivados de bovinos ha incrementado significativamente respecto al año 2022. El consumo anual de carne de res en Cuenca en 2023 fue de 50 kilogramos por persona. La cifra supone un aumento del 2% respecto al año 2022, y el consumo anual de leche en Cuenca en 2023 fue de 150 litros por persona. Esta cifra representa un aumento del 1% en comparación con el año 2022 (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2024).

### **2.2.2 ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS**

Los antibióticos se clasifican según su actividad antimicrobiana, en bactericidas aquellos que producen la muerte del agente infeccioso y bacteriostático aquellos que

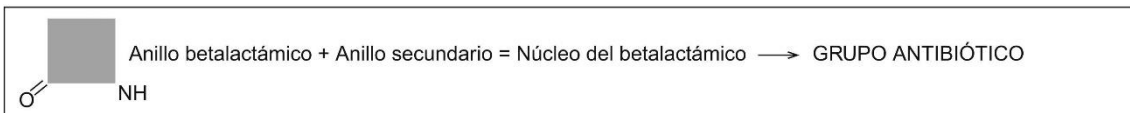
inhiben el crecimiento y desarrollo del agente infeccioso, también se clasifican según su estructura química y su mecanismo de acción (Guamán & Noemi, s. f.).

Su clasificación se basa en un anillo betalactámico, que define químicamente a esta familia de antibióticos, para que el betalactámico sea activo, preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas (Suárez & Gudiol, 2009). En la Tabla 1 se representa de forma esquemática la estructura básica de los diferentes grupos de betalactámicos.

### **Tabla 1**

*Estructura química de los betalactámicos.*





	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 $\alpha$ -cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	CARBAPENEMAS
	Ninguno	Monobactamo	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	ÁCIDO CLAVULÁNICO <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Todos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico.

**Fuente:** (Suárez & Gudiol, 2009)

### 2.2.2.1 AMPICILINA

La ampicilina es una penicilina semisintética, obtenida del núcleo del 6-aminopenicilano, tiene un efecto bactericida. Actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas y gramnegativas (*Neisseria sp.*, *H. influenzae*, no producen beta-lactamasa y algunas bacterias intestinales) y bacterias anaeróbicas. Son particularmente resistentes a los estafilococos productores de penicilinas, *E. Heces* de *P. aeruginosa*. *N. gonorrhoeae* es inicialmente sensible a la ampicilina, pero gradualmente se vuelve resistente. Otros organismos resistentes a la ampicilina incluyen *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus* indol positivo y *Bacteroides fragilis* (Ampicilina | Asociación Española de Pediatría, s. f.).

### 2.2.2.2 PENICILINA

Las penicilinas son antibióticos betalactámicos que son bactericidas por mecanismos desconocidos, pero que posiblemente actúen mediante la activación de enzimas autolíticas que destruyen la pared celular en algunas bacterias (Penicilinas - Enfermedades infecciosas, s. f.)

La penicilina, junto con la cefalosporina, la fosfomicina, la cicloserina, la bacitracina y los glucopéptidos telcoplanina y vancomicina, inhibe selectivamente diferentes etapas de la síntesis del péptido glucano (mureína), una sustancia que da forma, rigidez y estabilidad a las membranas celulares de la mayoría de las células (Lozano, 1998).

### 2.2.3 USO CORRECTO DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos deben seguir las indicaciones de tiempo y dosis especificadas en la etiqueta del producto junto con las instrucciones del veterinario.

Para el uso de **antibióticos intramamarios**, se recomienda seguir estos pasos: primero, ordeñar completamente la ubre y desechar la leche en un pozo séptico; luego, limpiar y desinfectar los pezones utilizando las toallitas incluidas en el empaque de los antibióticos; a continuación, retirar la boquilla del empaque y aplicar el producto suavemente dentro del pezón, masajeando el pezón y la ubre para asegurar una distribución uniforme del medicamento (Flórez Castañeda et al., 2020).

En cuanto al uso de **antibióticos inyectables**, los siguientes pasos son esenciales: preparar los elementos necesarios, como la jeringa y la aguja desechable; limpiar adecuadamente el área de aplicación; medir con precisión la dosis; y aplicar el antibiótico de manera firme, siguiendo las instrucciones de la etiqueta (ya sea intramuscular, subcutánea o intradérmica), utilizando siempre una aguja por animal (Flórez Castañeda et al., 2020).

Para finalizar, según el mismo autor, después de administrar un antibiótico con tiempo de retiro, es crucial identificar de manera diferencial a los animales tratados, lo cual puede hacerse con collares o manillas de colores distintos. Además, es vital llevar un registro detallado de la aplicación de medicamentos veterinarios, especialmente antibióticos, que incluya información como la fecha de aplicación, nombre del producto, registro, dosis, vía de administración, identificación del animal o lote tratado y tiempo de retiro.

#### **2.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN**

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular. Estos ATB se unen a enzimas conocidas como PLP (proteínas ligadora de penicilina), necesarias para la síntesis del peptidoglucano e interrumpen la síntesis de la pared celular. Además, activan enzimas líticas (autolisinas) que llevan a la muerte bacteriana (Treviño & Molina, 2022).

Son bactericidas parciales, ya que sólo actúan en fase de crecimiento celular, y su eficacia es tiempo dependiente ya que su efecto bactericida máximo ocurre a concentraciones del antibiótico libre 4-5 veces por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), por lo que es muy importante respetar o acortar los intervalos entre las dosis (Gómez, García Vázquez, & Hernández Torres, 2015).

Las bacterias ácido-alcohol resistentes tienen una pared similar a la de los microorganismos grampositivos, pero con una capa de peptidoglucano fina y, por fuera, una capa muy rica en lípidos. El peptidoglucano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla, bien directamente

(gramnegativos) o mediante un pentapéptido de glicina (grampositivos). Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión o transpeptidación, última etapa de la síntesis de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que las bacterias se hallen en fase de multiplicación, ya que, durante esta etapa, las bacterias están sintetizando su pared celular, lo que hace que los betalactámicos inhiban la síntesis de su integridad estructural (Marín & Gudiol, 2003).

## **2.2.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA**

La resistencia bacteriana es la capacidad de una bacteria de permanecer inmune a los efectos de bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. El principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en *Enterobacterales* es la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico impidiendo su actividad antibacteriana (Lepe & Martínez-Martínez, 2022).

Debido a que los  $\beta$ -lactámicos fueron los primeros antibióticos utilizados en la práctica clínica, la resistencia bacteriana a estos fármacos ha sido un problema durante más de cuatro décadas. La aparición de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos es un proceso complejo que involucra diversas adaptaciones bacterianas, las cuales se manifiestan a través de un conjunto limitado de mecanismos de resistencia. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos básicamente mediante tres mecanismos diferentes:

- 1. Producción de enzimas (betalactamasas):** representa el principal mecanismo de resistencia frente a los betalactámicos, especialmente en gramnegativos (aunque también pueden producirlas grampositivos y anaerobios). Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo

betalactámico y que, por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión con las PBP (*protein binding penicillin*). Su producción puede estar mediada por plásmidos o puede estar cromosómicamente codificada (Suárez & Gudiol, 2009).

2. **Cambios estructurales de las PBPs:** Las PBPs son proteínas fijadoras de  $\beta$ -lactámicos, las cuales se encuentran en la membrana citoplasmática de las bacterias. Dos  $\beta$ -lactámicos diferentes pueden ejercer sus efectos a través de su afinidad por dos diferentes PBPs y el efecto farmacológico final diferirá. Los cambios en la estructura de las PBPs, resultan en una sensibilidad disminuida a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Martin N, 2002).
3. **Alteraciones en la permeabilidad y bombas de expulsión:** Ante la barrera que supone la presencia de una membrana celular las sustancias poco lipofílicas (como los betalactámicos) precisan proteínas que les faciliten la entrada al espacio periplásmico para poder unirse a las PBP. Con algunas excepciones, los microorganismos gramnegativos suelen ser más resistentes a los antibióticos que los grampositivos (Suárez & Gudiol, 2009).

## **2.2.6 PRINCIPIOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN - HPLC**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica ampliamente utilizada para separar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja. Este método se basa en la interacción diferencial de los analitos entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida o soportada. La selección adecuada de estas fases permite optimizar la separación de los compuestos en función de sus propiedades fisicoquímicas. Aunque sus fundamentos se establecieron hace décadas, la HPLC ha

experimentado avances significativos en términos de instrumentación y aplicaciones, convirtiéndola en una herramienta indispensable en diversos campos científicos (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido (Fallon et ál., 1987).

### **2.2.7 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

Según Snyder y colaboradores, (2009), las razones más usuales por las que la muestra requiere el pretratamiento son:

- Necesita dilución, neutralización o cualquier otro tipo de manipulación volumétrica.
- Es sólida y necesita ser disuelta o extraída.
- Contiene sólidos suspendidos o cualquier otra interferencia o sustancia tóxica que pueda dañar el equipo, por lo que necesitan ser removidos.
- Requiere una separación parcial, ya sea para concentrar los analitos en la muestra o eliminar contaminantes.

### **2.2.8 DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS (PENICILINA Y AMPICILINA) EN HPLC:**

La HPLC es un método analítico que permite separar y medir los componentes de una mezcla con una fase estacionaria selectiva. Para determinar antibióticos betalactámicos en sangre de bovino, la HPLC se utiliza para separar y medir los niveles de penicilina y ampicilina en la sangre, lo que permite evaluar la eficacia del tratamiento y detectar posibles resistencias a antibióticos (Hernández, 2022).

### **2.2.9 MARCO CONCEPTUAL DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS**

Para el término antibiótico según Marín y Gudiol (2003) la principal característica es contar con un anillo betalactámico en su estructura molecular. Esta familia tiene varios grupos en los cuales están: inhibidores de las betalactamasas, monobactamas, carbapenemicos, cefalosporinas y penicilinas. Al mismo tiempo Vásconez y Janeth (2018) comentan que en el Diccionario Médico Doctissimo al antibiótico se lo considera como: “Una sustancia capaz de impedir el desarrollo o crecimiento de ciertos microorganismos, especialmente bacterias, o de causarle la muerte. Cuando su acción incluye numerosas especies de gérmenes diferentes, se habla de antibióticos de amplio espectro, mientras que, si sólo afectan a un número reducido de gérmenes, se habla de antibiótico de espectro reducido”.

En el caso de inocuidad, el gobierno de México (2016) la define como la característica que garantiza que los alimentos que se consumen no causen daño a la salud, es decir, que durante su producción se aplicaron medidas de higiene para reducir el riesgo de que los alimentos se contaminen (Agroalimentaria, 2016).

## **2.2.10 NORMATIVAS DEL ECUADOR**

Según las Resoluciones No. 003, No. 006, No. 034, No. 050 y No. 110 de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario: listado de moléculas prohibidas en productos veterinarios (2024), la república del Ecuador decreta que:

- Resolución 003

Prohibición de uso de Organomercuriales (Cloruro de mercurio, Mercuridin) como diuréticos. Prohibición de uso de Colistina, Isoproterenol, Salbutamol (albuterol) y Clenbuterol como promotor de crecimiento.

- Resolución 006

Prohibición de productos veterinarios como promotores del crecimiento que contengan los antimicrobianos de máxima prioridad para la salud humana: avoparcina, eritromicina, espiramicina, tilmicosina, tilosina, tiamulina y polimixina B o cualquiera de sus sales en productos de uso y consumo de animales terrestres.

- Resolución 034

Cancelación Cloranfenicol y Nitrofuranos: suspender la fabricación, formulación, importación y comercialización y registro de productos que contengan como ingrediente activo cloranfenicol y nitrofuranos.

- Resolución 050

Cancelación Olaquinox y Carbadox: prohibir la importación, fabricación, comercialización, uso y tenencia del olaquinox y del carbadox, sus sales y sus ésteres, y cualquier producto de uso veterinario o alimento destinado a la alimentación animal que lo contenga.



- Resolución 110

Prohibición del registro de los antimicrobianos de importancia crítica, que se muestran en los anexos 1 en medicina humana como promotores del crecimiento, que no tenían autorización hasta el 06 de junio de 2023.

## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

El desarrollo de este trabajo de titulación consiste en el diseño de campo a nivel descriptivo, debido a que la investigación busca recolectar y analizar los datos estadísticos de los residuos de antibióticos betalactámicos en sangre bovina mediante técnicas de laboratorio que consisten en separar los componentes de una mezcla.

#### **3.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

La característica fundamental de la experimentación radica en la manipulación de una o más variables independientes, con el objetivo de observar su impacto sobre una variable dependiente, manteniendo bajo control otras variables que puedan influir en los resultados. El diseño de investigación es descriptivo donde se analizan documentos recolectados de una base de datos y con el software Zotero. Se analizan los artículos obtenidos y se descartan los que tienen una metodología no replicable. Se prepararía un diseño de investigación de campo utilizando la técnica de investigación de una observación estructurada por medio de equipos de medición de laboratorio y una lista de cotejo como se presenta en la Tabla 3, añadiendo un diseño de un diario de campo, de manera que los datos puedan ser recuperados, procesados, analizados e interpretados posteriormente.

**Tabla 3**

*Lista de cotejo para toma de muestras*

<b>Bovinos</b>	<b>Fecha</b>	<b>Sexo</b>
1	-	-
2	-	-
3	-	-
-	-	-

### **3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA**

El término población se refiere a “...cualquier conjunto de elementos de los que se quiere conocer o investigar alguna o algunas de sus características.” (Alcaide, citado por Balestrini, 2001). Así se puede delimitar como población de estudio finita a un conjunto de bovinos en un momento determinado.

La muestra es un “subconjunto representativo de un universo o población”, (Morles, 1994, p. 54). El muestreo por conglomerados, también conocido como muestreo por racimos, es un procedimiento de muestreo probabilístico en que los elementos de la población son seleccionados al azar en forma natural por agrupaciones (*clusters*). Los elementos del muestreo se seleccionan de la población de manera individual, uno a la vez (Muguira, 2016).

El tamaño de la muestra se define con tablas de Harvard, que indican que para 500 cabezas de ganado se necesitan 46 muestras, con un nivel de confianza del 94 %.

### **3.3 VARIABLES**

#### **3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE**

Antibióticos betalactámicos, cumplimiento con normas vigentes.

### **3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Los instrumentos son los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información. Ejemplo: fichas, formatos de cuestionario, guía de entrevista, lista de cotejo, escalas de actitudes u opinión, grabador, cámara fotográfica o de video, etc. En este aparte se indicarán las técnicas e instrumentos que serán utilizados en la investigación.

Este proyecto se caracteriza por una estructura organizada y sistemática, la cual se materializa en la aplicación de metodologías específicas para la recolección de datos. En el contexto del campo, se empleará la técnica de observación, mientras que en el ámbito del laboratorio se combinarán la experimentación y la observación. Cabe destacar que en ambos escenarios se considerarán parámetros definidos según la naturaleza del estudio. Considerando que los datos son cuantitativos, estos serán recolectados en listas, en las cuales constarán las variables consideradas.

#### **3.4.1 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Se elaborará una tabla con el registro de las muestras de los bovinos A través de los datos obtenidos, se realiza la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos, para luego llevar a cabo una comparación con pruebas estadísticas entre las dos réplicas existentes.

En este punto se describen las distintas operaciones a las que serán sometidos los datos que se obtengan: clasificación, registro, tabulación y codificación si fuere el caso.

En lo referente al análisis, se definirán las técnicas lógicas (inducción, deducción, análisis-síntesis), o estadísticas (descriptivas o inferenciales), que serán empleadas para descifrar lo que revelan los datos recolectados.

### **3.5 PROTOCOLO O IMPLEMENTACIÓN**

Se procederá conforme a lo expuesto a continuación.

#### **3.5.1 TOMA DE MUESTRAS**

Se tomarán las muestras de sangre del bovino, un grupo a través de técnica de goteo y otro con vacutainer llevando los EPPs necesarios, botas, overol desechable blanco (tipo TYVEK), guantes, cofia, mascarilla, acogiéndonos al reglamento de seguridad de la empresa, como materiales para la toma de muestras se utilizaron agujas de N.18 de ½ pulgada, algodón, alcohol, toallas desechables, fundas desechables para residuos hospitalarios, guardián de cortopunzantes, y, tubos al vacío de tapa lila (EDTA), los cuales se deben homogenizar para evitar la coagulación, estos se registrarán en una hoja Excel y una lista de cotejo, como se observa en el anexo 2. De las que se utilizarán como producto de análisis 46 muestras de sangre.



**Figura 1:** *Toma de muestras de sangre bovina.*

**Fuente:** *Propia autoría.*

Se tomaron 90 muestras de bovinos el 16 de julio del 2024, de estas el 70 % de los bovinos fueron hembras y el 30 % restantes machos.

Las muestras serán guardadas en una caja térmica de poliuretano provista con baterías de hielo para conservarlas. Se debe considerar que la asepsia y los procedimientos adecuados son importantes al recolectar muestras, buscando garantizar la seguridad personal de técnicos y asistentes. Las muestras deben estar adecuadamente etiquetadas, conservadas, embaladas y transportadas técnicamente para ser remitidas al laboratorio antes de realizar el pretratamiento.



**Figura 2:** *Caja térmica de poliuretano provista con batería de hielo para conservación.*

**Fuente:** *Propia autoría.*

Para el transporte, las muestras se deben refrigerar a una temperatura de 2 a 8 °C (Agrocalidad, 2018), las muestras se llevaron a los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana el mismo día de ser tomadas. Estas se podrían almacenar en un ambiente estéril a una temperatura de 4 °C durante un periodo máximo de 24 horas.



**Figura 3:** *Conservación con pilas de hielo las muestras de sangre bovina, respectivamente numeradas.*

**Fuente:** *Propia autoría.*

### **3.6 PRETRATAMIENTO**

Se procedió conforme a lo expuesto a continuación.

#### **3.6.1 PRETATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

A las muestras se las centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm con el objetivo de separar el plasma, para la desproteinización se mezcló 75  $\mu$ L de plasma con 450  $\mu$ L de acetonitrilo, se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se evaporó, después de aproximadamente 40 minutos, los extractos secos se obtuvieron. Los extractos secos se reconstituyen con 150 $\mu$ L de 0,1 M tampón fosfato con 5% de acetonitrilo el cual fue sometido a agitación durante 5 minutos a 200 rpm. La preparación será llevada al HPLC (Greibe et al., 2022).



**Figura 3:** *Muestras del plasma bovino después de centrifugación y pretratamiento.*

**Fuente:** *Propia autoría.*

### **3.6.2 ALMACENAMIENTO**

Para su almacenamiento y posterior transporte, la muestra pretratada se almacenó en un congelador de temperatura ultra baja de la marca Thermo Scientific™ Ultracongeladores de la serie TSX en un ambiente estéril a una temperatura de 80 °C bajo cero. Para mantener su composición química y permitir su conservación por 5 años (Palma, 2018). En este paso quince tubos de muestras con EDTA se encontraban coagulados, y de los 75 restantes, 25 muestras se descartaron aleatoriamente, para quedar con cincuenta muestras para el análisis.





**Figura 4:** Congelador de temperatura ultra baja.

**Fuente:** Propia autoría.

### 3.6.3 FILTRADO

Para el uso de HPLC se colocaron las muestras de plasma bovino en viales rosca de 1,5 mL ámbar, 11,6 x 32mm PK100 marca QUZHOU LAB, que previamente fluyeron por filtros de jeringa SCA de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 25 mm.



**Figura 5:** Viales QUZHOU LAB.



**Figura 6:** Filtros de jeringa SCA.

**Fuente:** Propia autoría.

### 3.7 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se realizaron los cálculos correspondientes teniendo en consideración los parámetros para los viales de los antibióticos. Los cuales fueron de 1 gramo en 10 mL para ampicilina y 2,4 millones de U.I. o 1,9 gramos en 10 mL para penicilina.



**Figura 7:** Ampicilina de 1 gramos y penicilina benzatínica de 2,4 millones de U.I.

**Fuente:** Propia autoría.

La preparación de la curva de calibración permite la cuantificación de los analitos, creando una relación entre la concentración y la señal, como se comenta en Ararat, 2013. Así, se obtuvieron dos curvas de calibración de cuatro puntos ajustados en relación con los modelos de distintas librerías y de Merchán y colaboradores 2020 con coeficiente de determinación próximos a 1, para tetraciclina.

Las concentraciones de soluciones estándar se realizaron a través de un escalado de 1 en 10 por cada serie para la curva de calibración de penicilina y ampicilina, siendo de 0 ug, 2 ug, 20 ug, 200 ug, y, 0 ug, 1 ug, 10 ug, 100 ug, respectivamente.



**Figura 8:** Preparación por método de seriado 1 entre 10 para penicilina y ampicilina.

**Fuente:** *Propia autoría.*

### 3.8 USO DEL HPLC

Los análisis se realizaron en la Universidad Politécnica Salesiana Sede Guayaquil – Campus María Auxiliadora. El equipo que se utilizó es Vanquish HPLC de marca Thermo Scientific.



**Figura 9:** *Cromatografía Líquida Alta Resolución de la marca Vanquish Flex / Vanquish Horizon.*

**Fuente:** *Propia autoría.*

### **3.8.1 CONDICIONES DEL EQUIPO**

1. Verificar que el software del HPLC se conecte correctamente con el computador.
2. Programar y seleccionar el método de análisis adecuado para la muestra.
3. Ajustar las condiciones del equipo (flujo de fase móvil, temperatura, etc.) según los requisitos del método seleccionado.
4. Verificar que la fase móvil esté en el canal correspondiente y que haya suficiente volumen para el análisis.
5. Purgar el equipo HPLC durante 5 a 10 minutos para eliminar cualquier gas o contaminante del sistema.
6. Estabilizar el equipo HPLC durante 45 minutos para asegurar condiciones de operación óptimas.

### **3.8.2 CONDICIONES DEL EQUIPO USADAS PARA DETECCIÓN DE ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS**

Los mililitros usados para cada fase se calcularon considerando 4 muestras y un flujo de corrida de 1,1mL. Las fases móviles utilizadas son:

Fase móvil A: agua tipo 1 HPLC, la sustancia más pura utilizada en un laboratorio, y su uso garantiza la obtención de resultados exactos (Martinez, 2020). Ácido trifluoroacético (TFA) aditivo de fase móvil cuando se utiliza la detección UV debido a su gran solubilidad y poder de resolución como ácido fuerte (Waters Blog, 2019). Estos reactivos se mezclan en una proporción de 85% de la cantidad total, en agua tipo 1 HPLC junto con ácido trifluoroacético al 1%.



**Figura 10:** *Fase móvil A, agua tipo 1 HPLC + ácido tricloroacético /TFA).*

**Fuente:** *Propia autoría.*

Fase móvil B: acetonitrilo de grado HPLC el cual es un solvente polar que se mezcla con otros solventes para crear la fase móvil, que arrastra los compuestos a través de la columna cromatográfica (PanReac AppliChem, s. f.). El metanol se utiliza como compuesto de referencia en el análisis cuantitativo. Dado que su tiempo de retención es bien conocido y estable, ayuda a corregir la variabilidad del instrumento y garantiza una cuantificación precisa de los analitos de la muestra (Merck, s. f.). Para esta fase se utiliza acetonitrilo y metanol en una relación de 90/10 respectivamente. Esto debido a que son las máximas proporciones de cantidades llegadas en el proceso de detección. La Tabla 4 resume las condiciones cromatográficas empleadas en la fase móvil.

**Tabla 4***Condiciones cromatográficas*

<i>Fase estacionaria</i>	Columna C18 Hypersil GOLD Dim (mm) 150 * 4.6
<i>Fase móvil A</i>	Agua tipo 1 (85%) con TFA (15%)
<i>Fase móvil B</i>	Acetonitrilo (90%) con Metanol (10%)
<i>Flujo</i>	1.1mL/ min
<i>Volumen de inyección</i>	50uL
<i>Presión</i>	1350-1500psi
<i>Horno</i>	25 °C
<i>Detector</i>	UV 240 nm

**Fuente:** (Aveiga, s. f.)

### 3.8.3 ULTRASONIDO

Las fases móviles se colocaron en un Digital Ultrasonic Cleaner de marca GNATUS por 15 minutos. De esta forma nos aseguramos de eliminar todos los gases disueltos (Hielscher Ultrasonics, s. f.).

**Figura 11.** *Fase móvil A y B en la máquina de ultrasonido.***Fuente:** Propia autoría.

### 3.9 DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS MEDIANTE HPLC

La separación de los betalactámicos examinados se realizó en una columna C18 Hypersil GOLD Dim (mm) 150 \* 4.6, operada a temperatura de 25°C. El efluente de la columna se monitoriza a 240 nm. La fase móvil se suministra a la columna analítica utilizando un programa de gradiente, comenzando con una composición de 85% en A = TFA (0,1% v/v) y 15% en B = una mezcla de CH<sub>3</sub>CN - CH<sub>3</sub>OH (90:10 v/v), cambiando a 50:50 A/B después de 5 min y finalmente cambiando a 30:70 A/B después de 10 min (Samanidou et al., 2009). El caudal será de 1,1 mL/min. Se requiere un tiempo de equilibrado de 5 min entre series. El volumen de muestra inyectado será de 50 uL.

### 3.10 CORRIDA DE LAS MUESTRAS.

Se colocaron los viales con las muestras en la gradilla del auto muestreador del equipo. El tiempo total de corrida para el análisis de cada muestra fue de 15 minutos.



**Figura 12.** *Se ubicaron los estándares y las muestras en cada ranura correspondiente en orden lineal.*

**Fuente:** Propia autoría.

## CAPÍTULO 4

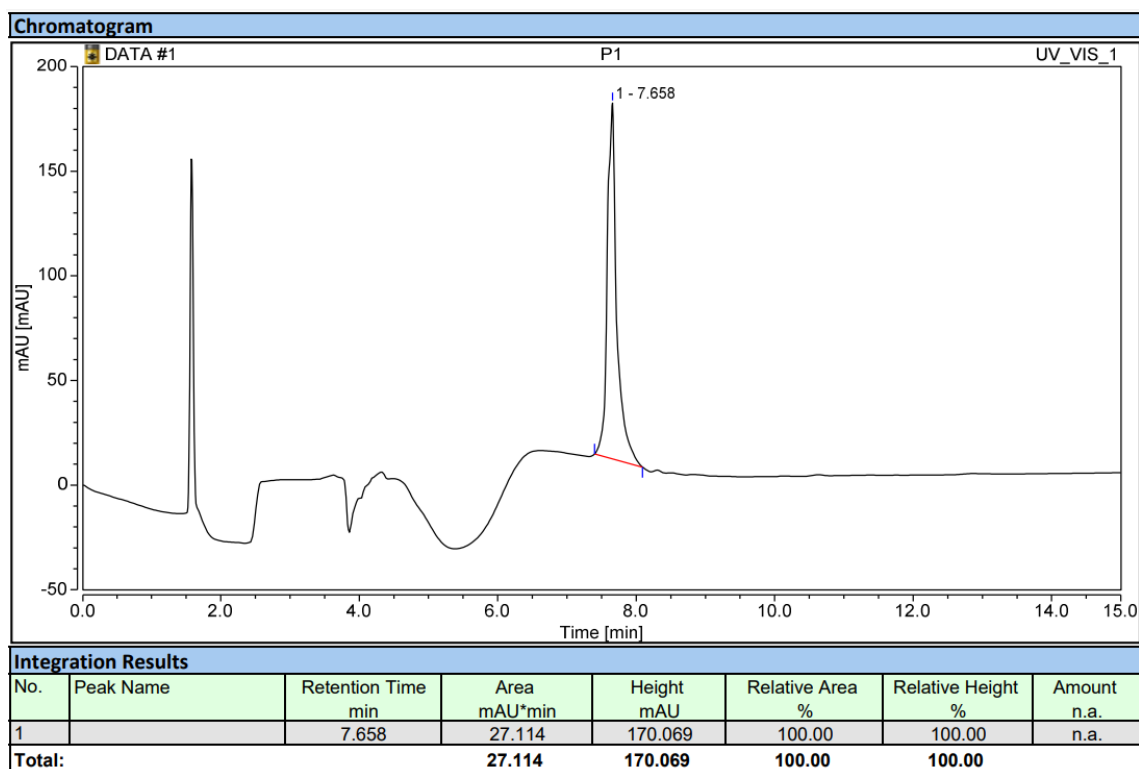
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se analizaron 46 muestras de plasma bovino para determinar la presencia de ampicilina y penicilina. De las cuales 8 muestras resultaron positivas para penicilina y ampicilina, 14 para ampicilina, y en 24 no se detectaron antibióticos.

#### 4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

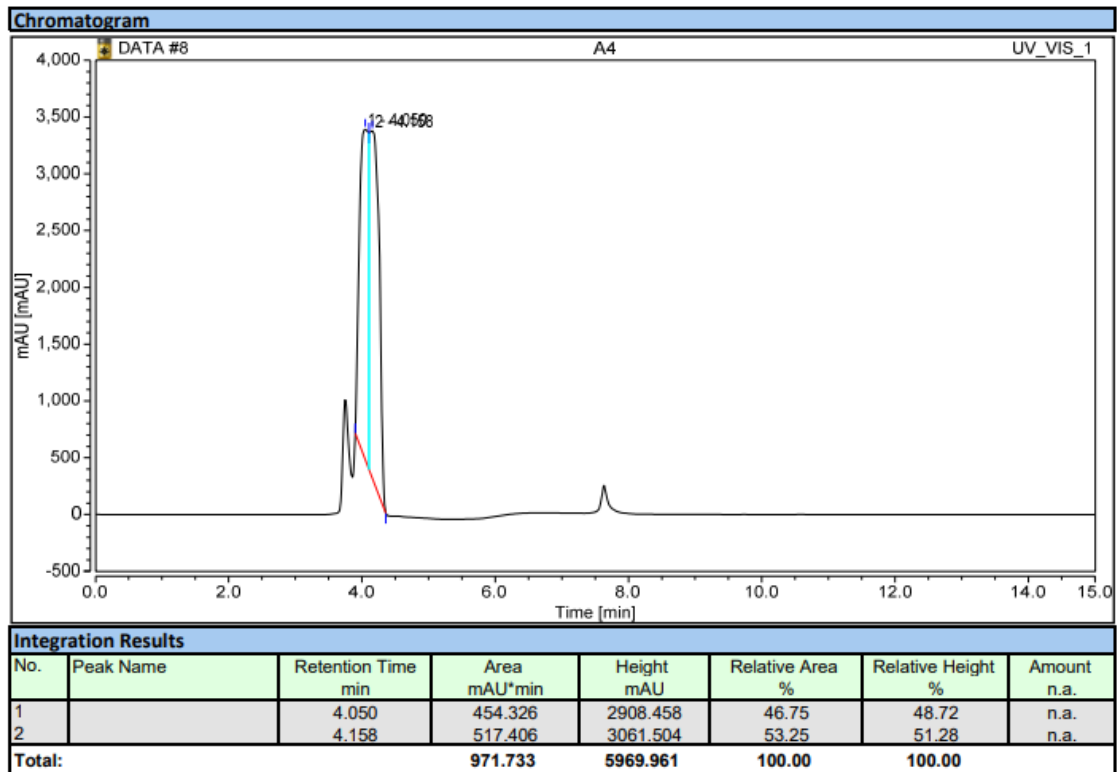
El análisis realizado en modo de elución en gradiente produjo una separación óptima de los B-lactámicos estudiados en un tiempo total de corrida de 15 minutos. Los tiempos de retención medios fueron 7,658 min para penicilina y 4,75 para amoxicilina, como se observa en las figuras a continuación.



**Figura 13:** *Tiempo de retención para penicilina*

**Fuente:** Propia autoría





**Figura 14:** *Tiempo de retención para ampicilina*

**Fuente:** Propia autoría

### 4.3 CURVA DE CALIBRACIÓN

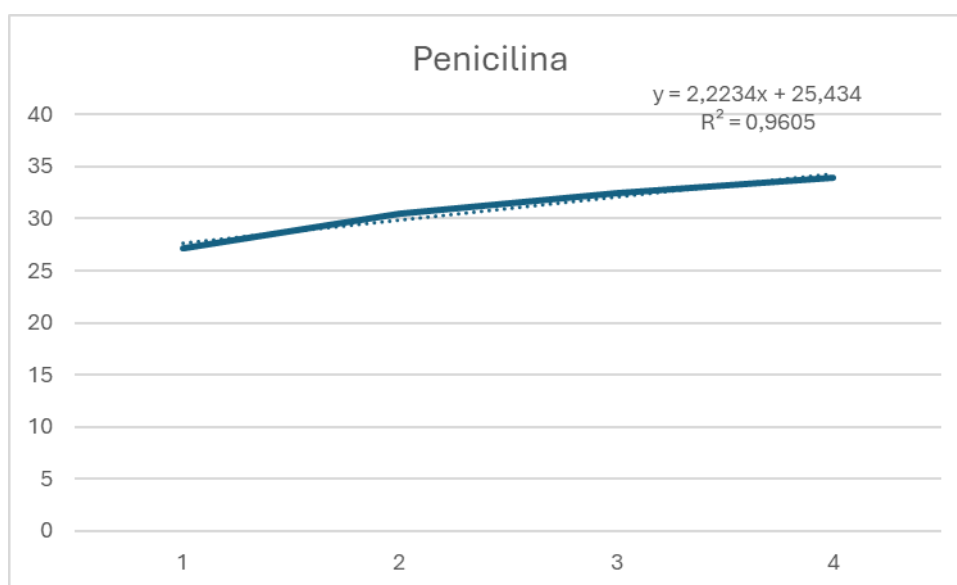
A los datos del área de pico del analito obtenido con los patrones utilizados para las curvas de calibración se les realizó un análisis de regresión lineal.

Los resultados obtenidos para la curva de calibración en la penicilina muestran un  $R^2$  de 0,9605 con las concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 ug/mL como se observa en la tabla 5 y figura 15.

**Tabla 5**

*Datos de la curva de calibración para penicilina 2.4 millones de U.I.*

Concentración (ug/mL)	Área bajo la curva	Tiempo de retención
0,2	27,1139	7,658
2	30,533	7,658
20	32,4304	7,658
200	33,8928	7,658



**Figura 15:** *Curva de calibración para penicilina 2,4 millones U.I.*

**Fuente:** Propia autoría

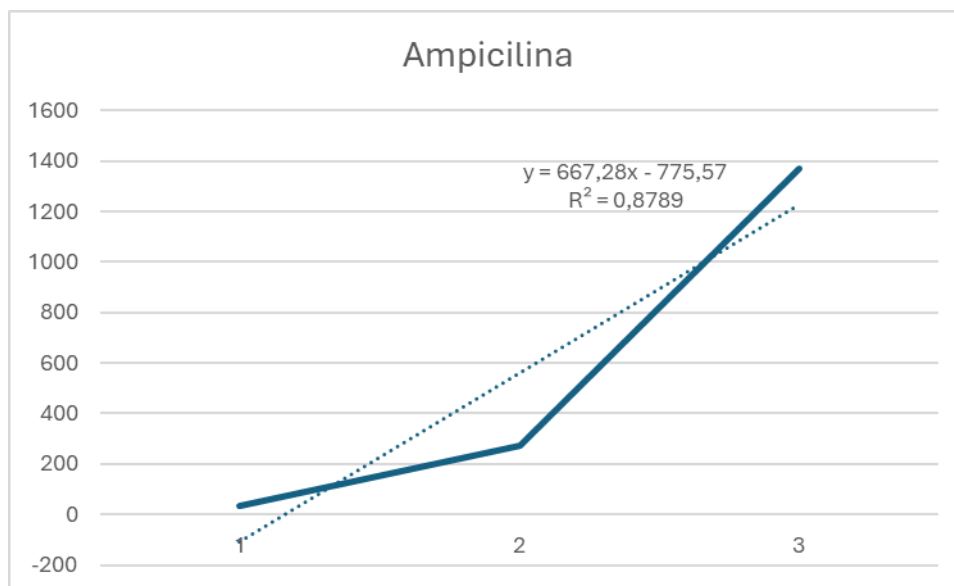
Para la curva de calibración de ampicilina los resultados de  $R^2$  fueron de 0,8789, como se muestra en la figura 16 y tabla 6, con concentraciones de 1 ,10 y 100 ug/mL.

**Tabla 6**

*Datos de la curva de calibración para ampicilina 1g.*

Concentración	Área bajo la curva	Tiempo de
---------------	--------------------	-----------

(ug/mL)		retención
1	34,7491	4,05
10	272,9303	4,05
100	1369,3113	4,05



**Figura 16:** Curva de calibración para ampicilina 1g.

**Fuente:** Propia autoría

#### 4.4 PROCESAMIENTO DE DATOS

En la tabla 7 se interpretan los datos para área de pico del antibiótico ampicilina, obteniendo un mínimo de 0,438, una media de 35,406 y un máximo de 304,694.

**Tabla 7:**

*Procesamiento de los datos área de pico para ampicilina:*

Ampicilina	
Min.:	0,438
1st Qu.:	1,053
Median:	4,142
Mean:	35,406
3rd Qu.:	41.169
Max.	304.694

En la tabla 8 se interpretan los datos para área de pico del antibiótico penicilina, obteniendo un mínimo de 1,87, una media de 6,305 y un máximo de 97,65.

**Tabla 8:**

*Procesamiento de los datos área de pico para penicilina:*

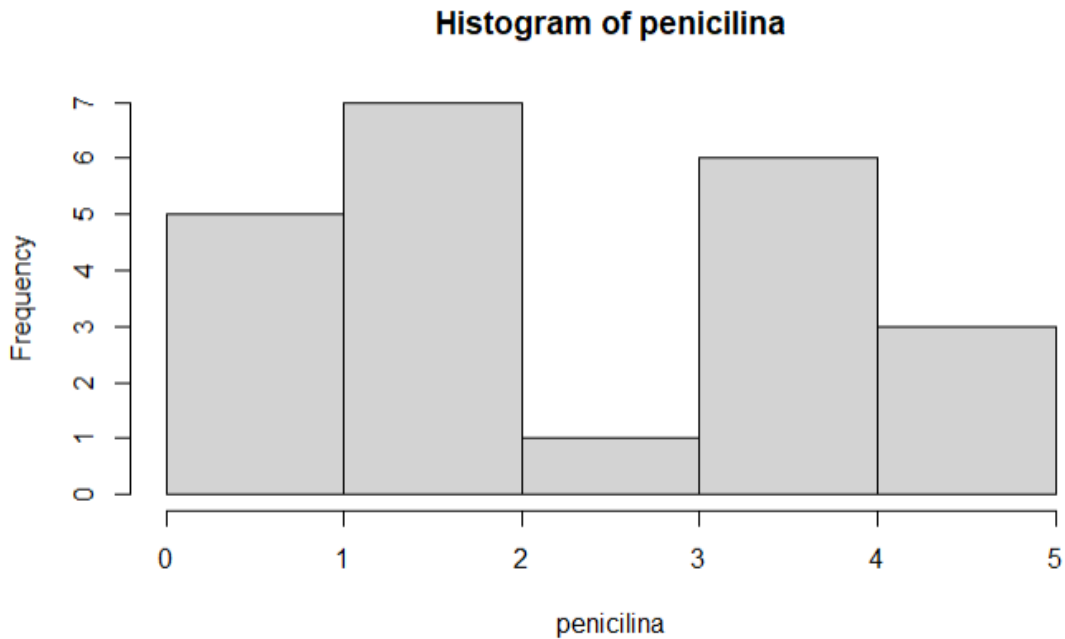
Penicilina	
Min.:	1,087
1st Qu.:	2,73
Median:	6,305
Mean:	23,668
3rd Qu.:	36,6
Max.	97,649

**4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el *software* RStudio para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Se desarrolló un histograma con el fin de conseguir la frecuencia de los valores que se observan más cantidad de veces, obteniendo así la mayor frecuencia de siete datos con resultados entre 1 y

2.



**Figura 17:** *Histograma de la penicilina que describe la frecuencia de diferentes valores que se repiten.*

Se plantearon las siguientes hipótesis con relación a la Penicilina, sobre el cumplimiento de la resolución 110.

H0: la media poblacional va a ser igual a cero.

H1: la media poblacional va a ser diferente de cero.

Para validar las hipótesis planteadas se debe determinar la prueba a utilizar, paramétrica o no paramétrica. Se procedió a determinar la normalidad de los datos con la prueba Shapiro-Wilk, estableciendo las siguientes hipótesis:

H0: los datos tienen un comportamiento normal.

H1: los datos no tienen un comportamiento normal.

### Shapiro-Wilk normality test

---

data: penicilina

---

W = 0.9166

p-value = 0.06465

---

Corrida la prueba se alcanzó un valor de p de 0.06465 lo que establece su comportamiento de distribución normal.

Se desarrolla una prueba de hipótesis de una muestra, utilizando el estadístico t-test.

### Tabla 9

*Desarrollo del t-test para penicilina.*

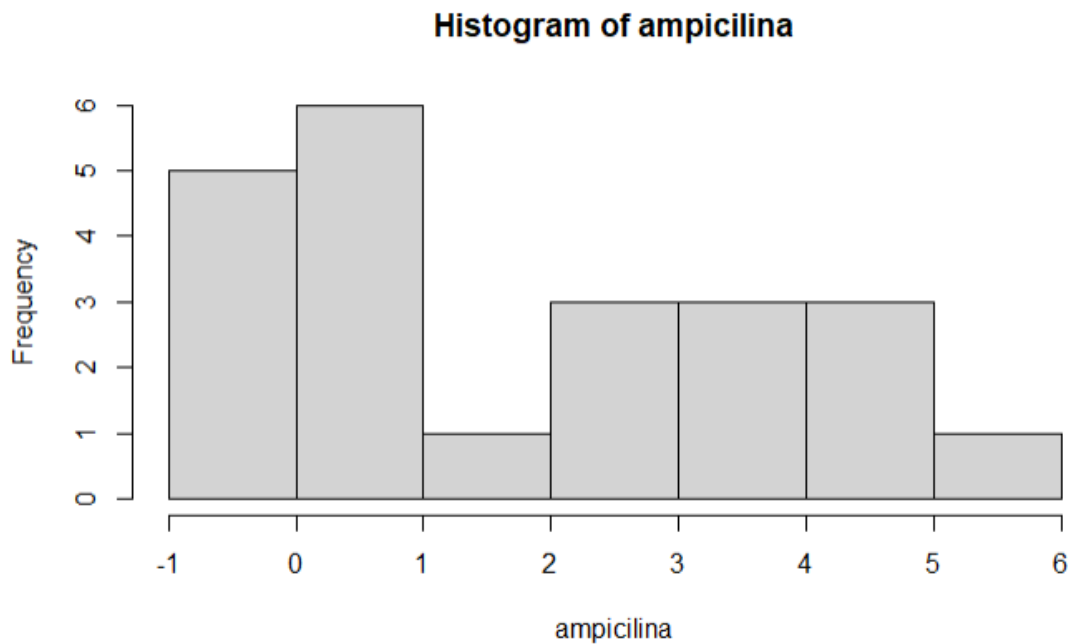
---

One Sample t-test		
data: penicilina		
t = 7.0466	df = 21	p-value = 5.915e-07
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0		
95 percent confidence interval:		
1.577862 2.899133		
sample estimates:		
mean of x		
2.238498		

---

Luego de corrida la prueba se obtuvo un valor de p menor a 0.05 estableciendo que se cumple la hipótesis alternativa.

Se elabora un histograma para el antibiótico ampicilina, figura 18, para obtener una frecuencia de los valores que se repiten, obteniendo así la mayor frecuencia de seis resultados entre 0 y 1.



**Figura 18:** *Histograma de la ampicilina que describe la frecuencia de diferentes valores que se repiten.*

Se planteó estas hipótesis sobre la ampicilina en consideración con el cumplimiento de la resolución 110.

H0: la media poblacional va a ser igual a cero.

H1: la media poblacional va a ser diferente de cero.

Para validar las hipótesis planteadas se debe determinar la prueba a utilizar, paramétrica o no paramétrica. Se procedió a utilizar la prueba Shapiro-Wilk, estableciendo las hipótesis:

H0: los datos tienen un comportamiento normal.

H1: los datos no tienen un comportamiento normal.

### Shapiro-Wilk test de normalidad.

---

Datos: ampicilina

---

W = 0.90266                      p-value = 0.03361

---

Corrida la prueba se alcanzó un valor de p de 0.03361 lo que establece su comportamiento de distribución normal.

Se desarrolla una prueba de hipótesis de una muestra, utilizando el estadístico t-test.

### Tabla 10

*Desarrollo del t-test para ampicilina.*

---

### One Sample t-test

---

data: ampicilina

t = 4.194                      df = 21                      p-value = 0.0004086

alternative hypothesis: true mean is not equal to 0

95 percent confidence interval:

0.9250622    2.7447990

sample estimates:

---



---

mean of x

1.834931

---

Luego de corrida la prueba se obtuvo un valor de p igual a 0.0004086 estableciendo que se cumple la hipótesis alternativa.

#### **4.6 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS**

Los resultados de las muestras demostraron que, de las 46 muestras de plasma bovino, el 17,39 % mostraron penicilina y ampicilina en sangre con un valor de área máximo de 62,3265 y un valor mínimo de 11,2967. Ampicilina demostró un porcentaje de 30,43% con valores de área desde 97,6491 a 1,0873 y 52,17% de las muestras no mostraron ningún tipo de antibiótico en plasma bovino. Por lo que se podría interpretar que más de la mitad de las muestras cumplen con las normativas vigentes actuales del Ecuador, mientras que menos del 50% de muestras no las cumplen.

## **CAPÍTULO 5**

### **5.1 CONCLUSIONES**

Se generó una propuesta metodológica utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta presión o HPLC, mediante un método de gradiente y un detector UV, sin embargo, la reproducibilidad de la técnica deberá evaluarse en futuras investigaciones.

Se utilizó una técnica de tratamiento de las muestras acoplada a las condiciones de laboratorio existentes.

Con el análisis de los datos obtenidos se estableció un valor promedio de 0.1 ug/mL para penicilina y 0.5 ug/mL para ampicilina. Con base en el número de muestras de plasma analizadas, se determinó que no se cumple con los parámetros establecidos en la normativa vigente, ya que cerca del 50 % presentaron antibióticos betalactámicos.

El antibiótico más utilizado respecto a los betalactámicos analizados en este estudio es la ampicilina, duplicando el porcentaje usado para penicilina. Esto seguramente debido a su bajo costo y facilidad de administración.

### **5.2 RECOMENDACIONES**

En el ámbito de detección de antibióticos betalactámicos en sangre bovina, es necesario seguir avanzando con metodologías más sensibles, específicas y replicables.

Se recomendaría buscar y comparar las condiciones para el uso de HPLC, con el objetivo de encontrar el procedimiento óptimo. También es necesario que las condiciones sean replicables y el método sea validado.

Para el transporte se recomienda usar dispositivos que conserven la temperatura a 4 grados centígrados, manteniendo así la temperatura ideal de conservación de las muestras hasta llegar al laboratorio.

Para garantizar la salud alimentaria y pública, se puede proponer un programa que monitoree temprano la presencia de antibióticos en la sangre de bovinos faenados para el consumo humano, según las normativas vigentes.

Concientizar a los pequeños y grandes ganaderos respecto al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades, de esta manera se podría disminuir el número de muestras contaminadas con ampicilina y/o penicilina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Acetonitrilo 99,9% CAS 75-05-8—PanReac AppliChem.* (s. f.). Recuperado 2 de agosto de 2024, de <https://itwreagents.com/iberia/es/product/221881/221881>
2. Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario: Listado de moléculas prohibidas en productos veterinarios (2024). <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2024/02/Listado-de-moléculas-prohibidas-en-productos-veterinarios-1.docx.pdf>
3. Agroalimentaria, S. N. de S., Inocuidad y Calidad. (2016). Una definición clara de Inocuidad. gob.mx. <https://www.gob.mx/senasica/articulos/una-definicion-clara-de-inocuidad-70674?idiom=es>
4. Agrocalidad. (2018). TOMA DE MUESTRAS PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR-DIAGNÓSTICO ANIMAL. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/ht12.pdf>
5. *Agua grado HPLC ¿Qué es y para qué se utiliza?* (s. f.). Recuperado 2 de agosto de 2024, de <https://es.linkedin.com/pulse/agua-grado-hplc-qu%C3%A9-es-y-para-se-utiliza-laura-salas-martinez>
6. Ararat, C. S. (2013). DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPICILINA EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA OBTENIDA EN ENSAYOS DE PERMEABILIDAD IN VITRO.
7. Bennani, H., Mateus, A., Mays, N., Eastmure, E., Stärk, K. D. C., & Häsler, B. (2020). Overview of Evidence of Antimicrobial Use and Antimicrobial

- Resistance in the Food Chain. *Antibiotics*, 9(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020049>
8. CHÁVEZ LÓPEZ, J. C., VILLANUEVA HUAMÁN, F., & ACARO CHUQUICAÑA, F. E. (2023). NIVEL DE CONOCIMIENTO Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA AUTOMEDICACIÓN CON ANTIBIÓTICOS EN USUARIOS QUE ASISTEN A LAS OFICINAS FARMACÉUTICAS DE LA AVENIDA PRÓCERES DE LA INDEPENDENCIA, SAN JUAN DE LURIGANCHO, JULIO 2022.
  9. Dueñez, J. J., Villamizar, L. H. R., Díaz, C. A. B., Cárdenas, E., & Bayona, J. V. N. (2022). Revisión: Residuos de antibióticos en la carne, un problema de salud pública en Colombia. *Spei Domus*, 18(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.16925/2382-4247.2022.01.06>
  10. Edward, A. (s. f.). A MI TÍA GREGORIA QUISPE BORDA POR BRINDARME SU APOYO DURANTE LA ESTADÍA EN AREQUIPA.
  11. Encalada, M., Vivanco, L., Zapata, H., Prado, S., & Tadazo, C. (2023). Análisis del Uso de Antibióticos en un Centro de Atención Médica Ambulatoria en Ecuador.  
<https://revistacodigocientifico.itslosandes.net/index.php/1/article/view/209>
  12. *Estados Unidos: La FDA lanza un plan sobre el uso de antimicrobianos en veterinaria.* (2018, octubre 24). [https://www.3tres3.com/latam/ultima-hora/estados-unidos-la-fda-lanza-un-plan-sobre-el-uso-de-antimicrobianos-e\\_7551/](https://www.3tres3.com/latam/ultima-hora/estados-unidos-la-fda-lanza-un-plan-sobre-el-uso-de-antimicrobianos-e_7551/)
  13. Eulalia, C. (2019). Determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda comercializada.  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17391/1/UPS-CT008305.pdf>

14. Flórez Castañeda, D. C., Bernal Morales, J. F., & Donado Godoy, M. del P. (2020). Guía de uso prudente de antibióticos en la producción de leche a partir del modelo de salud de hato. Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA.  
<https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7403299>
15. Garnica M., P. (2003). Presencia de residuos antibióticos en la leche.  
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8641>
16. Gómez, J., García Vázquez, E., & Hernández Torres, A. (2015). *seq.es*. Obtenido de <https://seq.es/seq/0214-3429/28/1/gomez.pdf>
17. Greibe, E., Moser, C. E., Bruun, N. E., & Hoffmann-Lücke, E. (2022). New methods for quantification of amoxicillin and clindamycin in human plasma using HPLC with UV detection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(9), 2437-2440. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac195>
18. Guamán, C., & Noemi, E. (s. f.). Determinación de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda comercializada.
19. Hernández, V. O. F. (2022). Estudio del efecto interactivo entre colistina, amoxicilina y el complejo lincomicina-espectinomicina para su uso en la terapia y prevención de enfermedades de porcinos y aves en medicina veterinaria / Estudo do efeito interativo entre colistina, amoxicilina y complexo lincomicina-espectinomicina para uso na terapia e prevenção de doenças de suínos e aves na medicina veterinária. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(2), 1912-1930. <https://doi.org/10.34188/bjaerv5n2-037>
20. Jhoana, D. (2020). Determinación de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en la leche cruda de pequeños productores.

21. Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392-402.  
<https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
22. Lindmeier, C. (2017). Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos.  
<https://www.who.int/es/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>
23. Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42-55.  
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
24. Marín, M., & Gudiol, F. (2003). *Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Bellvitge. Universidad de Barcelona. Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.* Obtenido de [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwji\\_ouz\\_N2GAxVwgIQIHVbwDScQFnoECBYQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.elsevier.es%2Findex.php%3Fp%3Drevista%26pRevista%3Dpdf-simple%26pii%3DS0213005X03728730%26r%3D28&usg=AOvVaw1Hq9463djmbALPT](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwji_ouz_N2GAxVwgIQIHVbwDScQFnoECBYQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.elsevier.es%2Findex.php%3Fp%3Drevista%26pRevista%3Dpdf-simple%26pii%3DS0213005X03728730%26r%3D28&usg=AOvVaw1Hq9463djmbALPT)
25. Martin N, G. (2002). Resistencia Bacteriana a  $\beta$ -lactámicos: Evolución y Mecanismos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(1), 107-116.
26. Merchán, N., Aguilera, A., & Edilberto, W. (2020). DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE TETRACICLINA EN QUESOS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).

27. *Metanol*. (s. f.). Recuperado 2 de agosto de 2024, de <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/products/analytical-chemistry/analytical-chromatography/solvents/methanol>
28. *Mobile Phase Additives for Peptide Characterization—Waters Blog*. (2019, octubre 2). <https://www.waters.com/blog/es/mobile-phase-additives-for-peptide-characterization/>
29. *Modificación ultrasónica de partículas para columnas de HPLC*. (s. f.). Hielscher Ultrasonics. Recuperado 4 de agosto de 2024, de <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-particle-modification-for-hplc-columns.htm>
30. Muguira, A. (2016, septiembre 22). Muestreo por conglomerados. ¿Cuándo utilizarlo? *QuestionPro*. <https://www.questionpro.com/blog/es/muestreo-por-conglomerados/>
31. Ospina, D. S., & Hernández, Y. M. (2018). *PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS*. 4.
32. Palma, B. (2018). Aspectos generales de la transfusión de sangre y sus componentes. [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/06/998918/rc\\_01.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/06/998918/rc_01.pdf)
33. Parada, L. R. (2014). Evaluación del uso de antibióticos en vacas lecheras de un grupo de fincas de la sabana de Bogotá. 61.
34. Plaza de Ganado | EMURPLAG - EMPRESA PÚBLICA MUNICIPAL DE SERVICIOS DE RASTRO Y PLAZAS DE GANADO. (s. f.). Recuperado 8 de mayo de 2024, de <http://www.emurplag.gob.ec/content/plaza-de-ganado>



35. Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1), Article 1. <https://practicafamiliarrural.org/index.php/pfr/article/view/144>
36. Salas Z., P., Calle E., S., Falcón T., N., Pinto J., C., & Espinoza B., J. (2013). DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS MEDIANTE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN LECHE DE VACAS TRATADAS CONTRA MASTITIS. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 252-255. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i2.2519>
37. Samanidou, V. F., Giannakis, D. E., & Papadaki, A. (2009). Development and validation of an-HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. *Journal of Separation Science*, 32(9), 1302-1311. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800758>
38. Sigcha Baño, T. S., & Naula Medina, D. E. (2023). Características alimentarias, preocupaciones y creencias sobre acciones relacionadas al uso de antibióticos en la crianza de animales en Tarqui 2023. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/42260>
39. Suárez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (7 de Septiembre de 2018). *Fundación Universidad de América, Revista semilleros*. Obtenido de <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
40. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

41. Torres, I. C. S. (2017). TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO “MAGÍSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”.
42. Treviño, N., & Molina, N. (2022). *Microbiología y Parasitología*. Obtenido de [https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/136280/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
43. Valencia, D. H. E. (2018). Prevalencia de antibióticos residuales en leche cruda de bovino en finca en el departamento de Chiquimula.
44. Vásconez, K. N. N., & Janeth, M. J. T. (2018). ESTUDIO DEL USO RACIONAL DE ANTIBIÓTICOS EN EL SERVICIO DE EMERGENCIA DEL CENTRO DE SALUD DEL CENTRO HISTÓRICO DURANTE EL AÑO 2017.
45. Villa Parra, M. G., & Vintimilla Rojas, A. E. (2016). Detección de la presencia de antibióticos en canales bovinas faenadas en el camal municipal de la ciudad de Azogues mediante la prueba microbiana premi test [bachelorThesis]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/24628>
46. Werth, B. J. (2022). Penicilinas—Enfermedades infecciosas. Manual MSD versión para profesionales.

## ANEXOS

### Anexo 1. Antimicrobianos de importancia crítica.

#### ANTIMICROBIANOS DE IMPORTANCIA CRÍTICA

FAMILIAS	Aminogluc ósidos	Carbapené micos	Monobactá micos	Penicilinas(antipseud omonales)	Penicilinas (Aminopenic ilinas)
<b>ANTIMICROB IANOS</b>	Netilmicina	Imipenem	Aztreonam	Ticarcilina	Ampicilina
	Paromomic ina	Meropene m	Oxazolidon onas	Carbenicilina	-
	Kanamicina	Ertapenem	Cicloserina	mezlocilina	-
	Framicetin a	Feropene m	Linezolid	azlocilina	-
	Dibekacina	Doripenem	Posizolid	piperacina	-
	Sisomicina	Biapenem	Torezolid	-	-
	Isepamicin a	Panipenem	-	-	-
	Plazomicin a	Glicilciclina s	-	-	-
	Trospecto micina	Tigeciclina	-	-	-
	Ansamicina s	Lipopéptid os	-	-	-
	Rifampina	Bacilomici na	-	-	-
	Rifabutina	Equinocan dinas	-	-	-

Rifampicin as	Caspofungi na	-	-	-
-	Iturin A	-	-	-
-	Micosubtili na	-	-	-
-	Sufactina	-	-	-

*Corresponden a las familias de antimicrobianos del listado de la Organización Mundial de la Salud. La prohibición de registro aplica para los antimicrobianos descritos dentro de cada familia, no aplica a toda la familia*

**Fuente:** (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario: Listado de moléculas prohibidas en productos veterinarios, 2024).

#### **Anexo 2. Toma de las 90 muestras de sangre bovina.**

<b>BOVINOS</b>	<b>DIA T.M.</b>	<b>SEXO</b>
1	16/07/2024	FEMENINO
2	16/07/2024	FEMENINO
3	16/07/2024	MASCULINO
4	16/07/2024	FEMENINO
5	16/07/2024	MASCULINO
6	16/07/2024	FEMENINO
7	16/07/2024	FEMENINO
8	16/07/2024	MASCULINO
9	16/07/2024	MASCULINO
10	16/07/2024	FEMENINO
11	16/07/2024	FEMENINO
12	16/07/2024	FEMENINO
13	16/07/2024	MASCULINO
14	16/07/2024	FEMENINO

15	16/07/2024	MASCULINO
16	16/07/2024	FEMENINO
17	16/07/2024	FEMENINO
18	16/07/2024	MASCULINO
19	16/07/2024	MASCULINO
20	16/07/2024	FEMENINO
21	16/07/2024	FEMENINO
22	16/07/2024	FEMENINO
23	16/07/2024	MASCULINO
24	16/07/2024	FEMENINO
25	16/07/2024	FEMENINO
26	16/07/2024	FEMENINO
27	16/07/2024	FEMENINO
28	16/07/2024	FEMENINO
29	16/07/2024	MASCULINO
30	16/07/2024	FEMENINO
31	16/07/2024	FEMENINO
32	16/07/2024	MASCULINO
33	16/07/2024	FEMENINO
34	16/07/2024	FEMENINO
35	16/07/2024	FEMENINO
36	16/07/2024	MASCULINO
37	16/07/2024	FEMENINO
38	16/07/2024	FEMENINO
39	16/07/2024	FEMENINO
40	16/07/2024	FEMENINO
41	16/07/2024	MASCULINO
42	16/07/2024	FEMENINO

43	16/07/2024	FEMENINO
44	16/07/2024	FEMENINO
45	16/07/2024	FEMENINO
46	16/07/2024	MASCULINO
47	16/07/2024	FEMENINO
48	16/07/2024	MASCULINO
49	16/07/2024	FEMENINO
50	16/07/2024	FEMENINO
51	16/07/2024	FEMENINO
52	16/07/2024	FEMENINO
53	16/07/2024	FEMENINO
54	16/07/2024	FEMENINO
55	16/07/2024	MASCULINO
56	16/07/2024	FEMENINO
57	16/07/2024	FEMENINO
58	16/07/2024	FEMENINO
59	16/07/2024	FEMENINO
60	16/07/2024	MASCULINO
61	16/07/2024	FEMENINO
62	16/07/2024	FEMENINO
63	16/07/2024	FEMENINO
64	16/07/2024	FEMENINO
65	16/07/2024	MASCULINO
66	16/07/2024	FEMENINO
67	16/07/2024	FEMENINO
68	16/07/2024	MASCULINO
69	16/07/2024	FEMENINO
70	16/07/2024	FEMENINO

71	16/07/2024	MASCULINO
72	16/07/2024	FEMENINO
73	16/07/2024	MASCULINO
74	16/07/2024	FEMENINO
75	16/07/2024	MASCULINO
76	16/07/2024	FEMENINO
77	16/07/2024	FEMENINO
78	16/07/2024	MASCULINO
79	16/07/2024	FEMENINO
80	16/07/2024	FEMENINO
81	16/07/2024	FEMENINO
82	16/07/2024	FEMENINO
83	16/07/2024	MASCULINO
84	16/07/2024	MASCULINO
85	16/07/2024	FEMENINO
86	16/07/2024	MASCULINO
87	16/07/2024	FEMENINO
88	16/07/2024	MASCULINO
89	16/07/2024	FEMENINO
90	16/07/2024	FEMENINO

*Se tomaron 90 muestras de sangre de bovinos, 63 muestras (70%) fueron hembras y 27 muestras (30%) machos el 16/07/2024.*

**Fuente:** De propia autoría.

## **ANEXOS PROCEDIMIENTO.**

### **Anexo 1. Toma de las 90 muestras de sangre bovina.**



*Fig 1. Toma de muestras de sangre bovina sección 1.*



*Fig 2. Toma de muestras de sangre bovina sección 2.*

## **Anexo 2. Almacenamiento y transporte.**



*Fig 3. Almacenamiento y transporte.*

## **Anexo 3. Centrifugación y obtención de plasma bovino.**



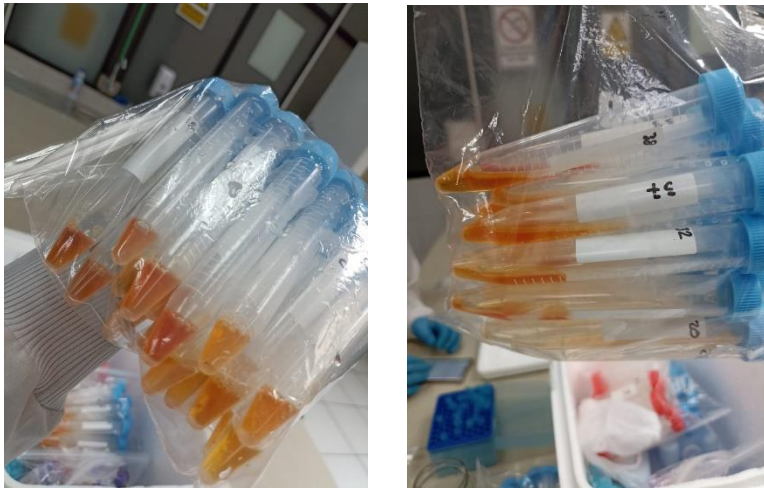


Fig 4. Plasma bovina en tubos falcón de 15 mL.



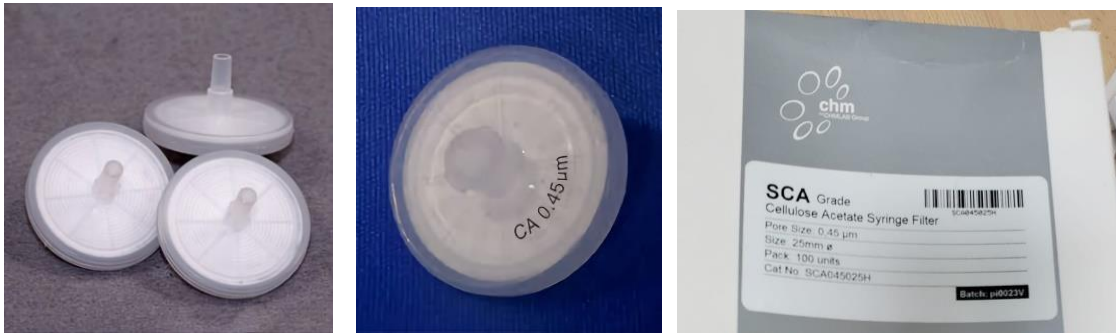
Fig 5. Plasma bovina en tubos falcón de 50 mL.

#### Anexo 4. Antibióticos.



Fig 6. Antibióticos, penicilina de 2,4 millones de U.I. y ampicilina de 1 gramo.

#### Anexo 4. Pretratamiento para uso de HPLC.



*Fig 7. Filtración por filtros de jeringa de 45 micras.*



*Fig 8. Viales de 2 mL con sus respectivas tapas.*



*Fig 9. Máquina de ultrasonido.*

## **Anexo 5. HPLC**



*Fig 10. Columna C18 para HPLC.*



*Fig 11. Gradilla del auto muestreador del equipo.*



*Fig 12. HPLC.*

## Anexo 6. Cromatogramas.

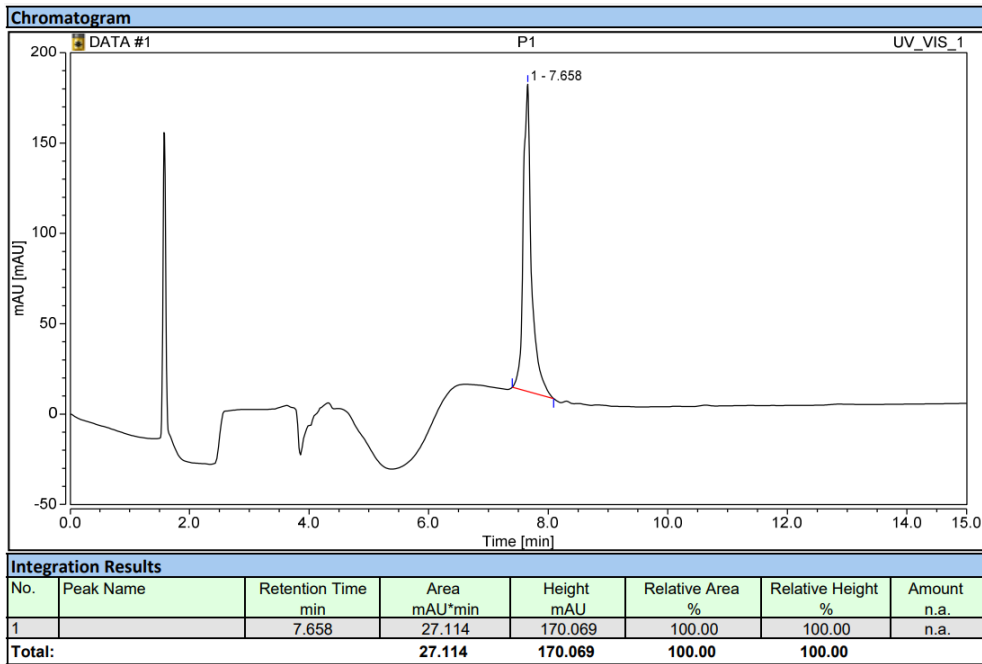


Fig 13. Cromatograma para penicilina concentración 0.1 ug/mL.

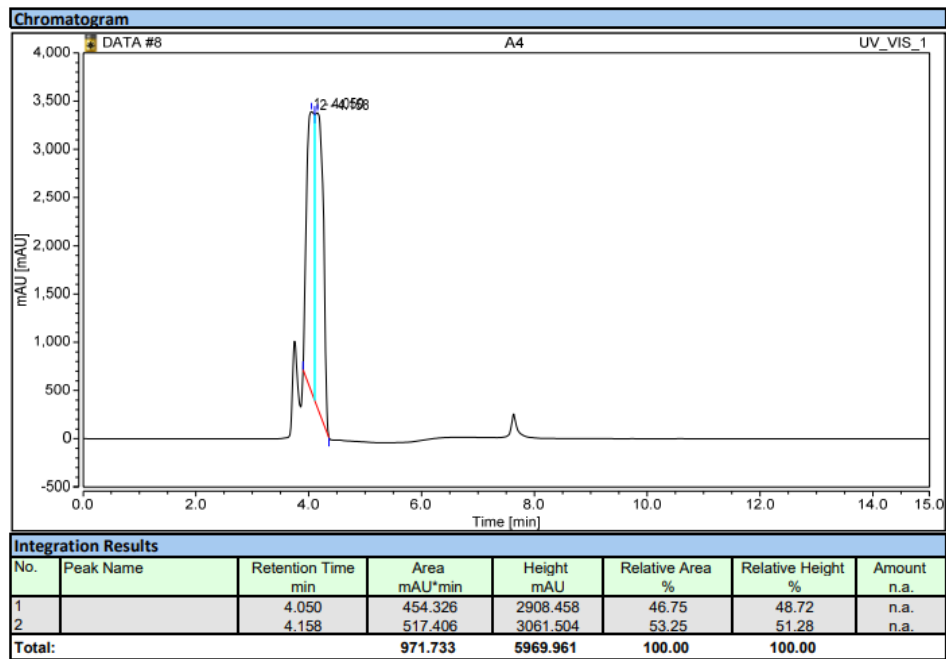


Fig 14. Cromatograma para ampicilina concentración 0.2 ug/mL.