



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE ESPINACINA EN QUESOS POR ELECTROFORESIS
CAPILAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA:

LUIS ENRIQUE ROBLES TORAL

ASESORAS:

DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Determinación de Espinacina en Quesos por Electroforesis Capilar

Que presenta el pasante: **Luis Enrique Robles Toral**

Con número de cuenta: **301132837** para obtener el Título de: **Licenciado en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Franco Pérez Arellano	
VOCAL	Dr. José Luis Arias Téllez	
SECRETARIO	Dra. Ma. Gabriela Vargas Martínez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Dalia Bonilla Martínez	
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a dios antes que nada por darme la vida y la oportunidad de compartirla con tanta gente maravillosa, a mis padres María Eugenia y Pedro Javier que siempre me apoyaron y me dieron aliento con cada decisión que tome, a mi hermanito Poncho al cual quiero con todo mi alma, a mis segundos padres Margarita y José Luis quienes me abrieron las puertas de su hogar y me vieron crecer, a mis tíos Edgar, Luz y Juan por motivarme a seguir, a mi tío Memo por su apoyo en tantas y tantas ocasiones, por siempre tenerme un cariño especial desde que era pequeño, a mis primas Diana y Brendy por su amor de hermanas y a mi primo, gemelo y hermano Juanito quien es un chamaco lleno de talento.

Agradezco a mi otra familia que conocí en la universidad, mi hermano del alma Miguel y a mi hijo Said con quienes aprendí que no hay que ser de la misma sangre para ser familia, a mis amigas Alejandra y Dulce a quienes quiero tanto, a mi carnalito Javi de quien sentí un afecto sincero.

A mis tutoras Alma y Gaby que me dieron valiosas enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

A la mi amada universidad, mi alma máter la UNAM que me dio, sigue dando tantas bendiciones y con quien tengo una gran deuda.

Y por último pero no menos importante al amor de mi vida Dulce Carolina Marcos Segoviano con quien aprendí a soñar y a trabajar en equipo en esta aventura llamada vida.

Gracias a todos por hacer esto posible.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. ABREVIATURAS	8
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. Utilización del Formaldehído en la Industria Alimentaria	11
3.2. Definición de Queso	13
3.3. Clasificación de los Quesos	13
3.4. Elaboración de los Quesos	14
3.5. Quesos Utilizados	15
3.5.1. Queso canasto.....	15
3.5.2. Queso doble crema.....	15
3.5.3. Queso Grana Padano.....	16
3.5.4. Queso Provolone.....	16
3.6. Electroforesis Capilar	17
3.7. Separación Electroforética	18
3.8. Detección por Fluorescencia Inducida por Láser	22
3.9. Sistemas de inyección	25
3.10. Isotiocianato de fluoresceína	25
3.11. Validación de Métodos Analíticos	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
6.1. Objetivo general	30
6.2. Objetivos particulares	30
7. PARTE EXPERIMENTAL	31
7.1. Equipos	31
7.2. Reactivos	31
7.3. Metodología general	32
7.4. Metodología para el tratamiento de la muestra	33
7.5. Metodología para la reacción de derivatización	35
7.6. Metodología para el sistema electroforético	37

7.7. Validación del método analítico	37
7.7.1. Especificidad	38
7.7.2. Precisión (adecuación del sistema)	39
7.7.3. Precisión intermedia	39
7.7.4. Linealidad del sistema	40
7.7.5. Precisión del método	41
7.7.6. Exactitud	42
7.7.7. Límite de detección	43
7.7.8. Límite de cuantificación	43
7.7.9. Muestras comerciales	44
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
8.1. Tratamiento de la Muestra	45
8.2. Reacción de derivatización	47
8.3. Avance de la reacción de derivatización	51
8.4. Mejora del sistema electroforético	53
8.4.1. Ácido bórico	54
8.4.2. Carbonato de sodio	55
8.4.3. Tetraborato de sodio	56
8.5. Selección de pH de trabajo	58
8.6. Inyección	61
8.6.1. Presión	63
8.6.2. Tiempo	65
8.7. Estándar interno	67
8.7.1. 1(1Adamantil)etilamina (ADM)	68
.....	68
8.7.2. DL-Metionina (DLM)	70
8.7.3. L-2-Ácido aminobutírico (AAB)	72
8.8. Reacción de derivatización en muestras reales	75
8.9. Validación del método analítico	77
9. CONCLUSIONES	84
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
11. ANEXOS	91

ÍNDICE DE FIGURAS	91
ÍNDICE DE TABLAS	94
ÍNDICE DE ECUACIONES	95

1. RESUMEN

El formaldehído es utilizado como bacteriostático (sustancia que detiene la reproducción de un microorganismo) en la fabricación de algunos quesos italianos, alimentos desecados y pescados. En Italia es aceptado encontrar cantidades de formaldehído entre a 1.5-4.0 mg/100 g muestra en quesos.

No es posible cuantificar el formaldehído directamente en un alimento debido a su alta volatilidad perdiéndose rápidamente. Por lo anterior se aprovecha la rápida reacción que ocurre entre aminoácido histidina que produce un derivado llamado espinacina, el cual permite cuantificar al formaldehído de forma indirecta. El derivado formado absorbe en la región ultravioleta, sin embargo fue necesario su derivatización con un colorante fluorescente con la finalidad de poder detectarlo a nivel de trazas.

Los derivados iónicos fluorescentes de la espinacina fueron separados de los componentes de la matriz por sus diferentes relaciones de carga/masa utilizando la técnica de electroforesis capilar. No se observó interferencia de los componentes de la matriz del queso, gracias al pretratamiento efectivo de la muestra que consistió en una serie de precipitaciones de proteínas, centrifugaciones y finalmente una filtración con una membrana de corte de peso molecular de 10 kilodalton (kDa).

La metodología desarrollada fue validada, con el fin de ser utilizada en el monitoreo rutinario de formaldehído presente para el control de calidad del uso de dicho compuesto en la elaboración de quesos ya que el uso está regulado en la comunidad europea y está prohibido en la elaboración de alimentos en los Estados Unidos de Norte América.

2. ABREVIATURAS

Símbolos y/o abreviaturas	Significado
% DER	Porcentaje de desviación estándar relativa
°C	Grado Celsius
AAB	L-2-Ácido amino butírico
ACN	Acetonitrilo
ADM	1(1-Adamantil)etilamina
AIIC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ANOVA	Análisis de varianza
APA	Agencia de Protección Ambiental E. U. A.
ATA	Ácido tricloroacético
BCO	Blanco
CAS	Caseínas
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
cm	Centímetro
DAD	Detector arreglo de diodos
DE	Desviación estándar
DFIL	Detector de fluorescencia inducida por laser
DLM	DL-Metionina
EC	Electroforesis capilar
Ec.	Ecuación
ECAR	Electroforesis capilar de alta resolución
ECZ	Electroforesis capilar de zona
ESP	Espinacina
EST-AAB	Solución estándar de ácido amino butírico
EST-ESP	Solución estándar de espinacina

EST-ITF	Solución estándar de isotiocianato de fluoresceína
Fig.	Figura
FOR	Formaldehído
<i>h</i>	Constante de Planck
h	Hora
HIS	Histidina
ITF	Isotiocianato de fluoresceína
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
kDa	Kilodalton
MCA	Muestra comercial A
MCB	Muestra comercial B
MCF	Muestra comercial fortificada con AAB y ESP
MCGP	Muestra comercial Gran Padano
MCP	Muestra comercial Provolone
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
PC0.05	Placebo cargado al 0.05 %
PC0.1	Placebo cargado 0.1 %
PCI	Placebo cargado de inyección
PCM	Placebo cargado madre
PROM	Promedio
psi	Libra por pulgada cuadrada
r^2	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SAC	Solución amortiguadora de corrida
SRD1	Solución reactivo de derivatización 1

SRD2	Solución reactivo de derivatización 2
SRD3	Solución reactivo de derivatización 3
Tab.	Tabla
TM	Tiempo de migración
<i>f</i>	Frecuencia
μm	Micrómetro
μg	Microgramo

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Utilización del Formaldehído en la Industria Alimentaria

El formaldehído (FOR) (Figura 1 (Fig. 1)) es un gas incoloro, inflamable a temperatura ambiente y posee un olor penetrante característico. Uno de los usos del formaldehído es como bacteriostático el cual es añadido a algunos quesos italianos, alimentos desecados y pescados, además de conferirle al queso algunas propiedades físicas como textura y consistencia. Se utiliza como desinfectante de alto nivel en la industria alimentaria y hospitales, principalmente en solución acuosa al 37 %, en estas condiciones, posee actividad bactericida, fungicida, virucida y esporicida.^{4,8}

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (AIIC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (APA) han determinado que el FOR es probablemente carcinogénico en seres humanos. Esta determinación fue basada en evidencia limitada de cáncer en seres humanos y evidencia suficiente de cáncer en animales de laboratorio.^{8,20}

En Italia es permitido el uso del FOR en la elaboración de quesos como formalina la cual es una solución acuosa del 37-50 % teniendo una concentración final en el producto de 1.5-4.0 mg/100 g muestra.^{4,22,23}

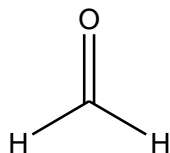


Figura 1. Estructura del formaldehído.

Generalmente es aceptado encontrar cantidades de FOR libre (hasta 4.0 mg/100 g muestra) en quesos italianos después de su maduración. Sin embargo cuantificar formaldehído directamente en leche y quesos no es recomendable ya que el formaldehído reacciona rápidamente con las caseínas (CAS) en un 99.99 % (Tabla 1 (Tab. 1)), principalmente con las γ -CAS (fragmentos de κ -caseína), se ha sugerido que reacciona con el aminoácido terminal histidina (HIS) teniendo como producto de reacción la llamada espinacina (ESP), (ácido-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo [4,5-c]piridina-6-carboxílico), (Figs. 2 y 3) el cual es un marcador indirecto de la utilización del FOR en la producción de quesos.^{2,11,30,39}

Tabla 1. Porcentajes de reacción FOR-CAS para las fracciones de caseínas.

Reacción FOR-CAS	
Fracción de caseínas	% de reacción FOR-CAS
α_s	21.4
β	39.0
γ	39.6

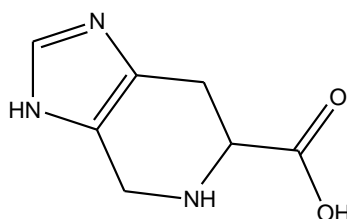


Figura 2. Ácido-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo [4,5-c]-piridina-6-carboxílico (espinacina).

La información anterior muestra que las γ -CAS poseen una alta especificidad al FOR ya que el 7 % de las CAS totales pertenecen a dicha fracción, el 53 % y 40 % representan las fracciones α_s y β respectivamente, el 39.6 % del formaldehído reacciona con las γ -CAS, convirtiendo a la ESP en un marcador adecuado para la cuantificación indirecta de formaldehído en leche y quesos.^{3,14,23}

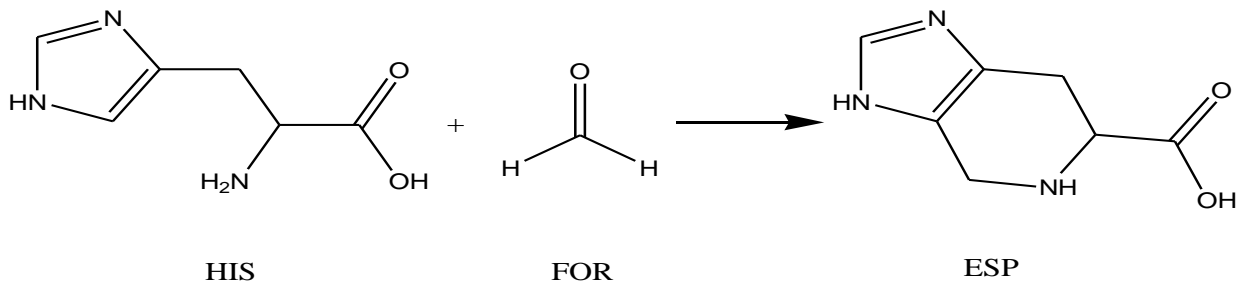


Figura 3. Reacción de la HIS y el FOR la cual produce ESP.

3.2. Definición de Queso

La definición admitida internacionalmente es la siguiente: Queso es el producto fresco o maduro obtenido por la coagulación y separación del suero de cualquiera de los siguientes productos: leche, nata, leche desnatada (total o parcialmente), suero de mantequilla o de una mezcla de cualquiera de ellos.^{4,5}

El Codex Alimentarius lo define como un producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la CAS no sea superior a la de la leche. El queso puede ser definido como un concentrado de la fracción sólida de la leche, constituido principalmente de CAS y grasa.³⁷

3.3. Clasificación de los Quesos

Los quesos (Fig. 4) se pueden clasificar atendiendo a diversas circunstancias: contenido en grasa, dureza, origen, tipo de leche empleada en su elaboración, etc.^{4,5} Según el Codex Alimentarius los quesos se clasifican según tres parámetros (Tab. 2): humedad, contenido de grasas y características de maduración; la siguiente tabla muestra la clasificación de los quesos.³⁷



Figura 4. Diferentes tipos de quesos.

Tabla 2. Clasificación de los quesos con base al Codex Alimentarius.

Tipo	Contenido de humedad en base seca (%)	Características de maduración	Tipo	Contenido de grasas (%)
Extraduro	< 51	Madurado	Extragraso	> 60
Duro	49 – 56	Madurado por mohos	Graso	45 - 60
Semiduro	54 – 69	Fresco	Semigraso	25 - 45
Blando	> 67	En salmuera	Semidescremado	10 -25
			Descremado	< 10

3.4. Elaboración de los Quesos

La transformación de la leche en queso generalmente comprende cuatro etapas:

- La coagulación: Modificaciones fisicoquímicas de las micelas de CASs que bajo la acción de enzimas proteolíticas y/o ácido láctico, llevan a la formación de coágulos.
- El desuerado: Separación del lactosuero (fracción acuosa) tras la rotura mecánica del coagulo, por moldeado, centrifugación y en algunas ocasiones sometándolo a presión, obteniéndose al final de esta etapa la cuajada (fracción sólida).
- El salado: Incorporación de la sal en la masa de cuajada, en la superficie o por inmersión en salmuera.

- El afinado o maduración: Conjunto de transformaciones bioquímicas de los componentes de la cuajada por la acción de enzimas, en gran parte de origen microbiano.

Tomándose en cuenta que existen variantes específicas para la fabricación en diferentes tipos de quesos.^{5,9}

3.5. Quesos Utilizados

3.5.1. Queso canasto

El queso canasto (Fig. 5) es un queso fresco, suave, blanco servido a menudo como parte de una bandeja de aperitivos o como bocado. Este queso se utiliza en México para muchos platos, puede decirse que es menos versátil en su uso que el Chihuahua o el tipo Manchego. Absorbe otros sabores fácilmente, y se reviste en ocasiones con una pasta de ajo y chile.¹⁶



Figura 5. Queso canasto.

3.5.2. Queso doble crema

El queso doble crema (Fig. 6) es un queso fresco no madurado elaborado a partir de leche fresca y ácida. Es un producto de alto contenido de humedad y grasa. Este producto se consume fresco y posee un sabor ligeramente ácido, para su conservación se debe refrigerar.⁴



Figura 6. Queso doble crema.

3.5.3. Queso Grana Padano

El queso Grana Padano (Fig. 7) es un queso de origen italiano, con denominación de origen controlada, se elabora con bajo contenido en grasa a partir de leche parcialmente descremada. Con un periodo de maduración largo (1 a 2 años) para el queso de ralla y 6 meses para el queso de mesa. Su color es amarillo ligero y la corteza es dura y de color amarillo dorado.⁴



Figura 7. Queso Grana Padano.

3.5.4. Queso Provolone

El queso Provolone (Fig. 8) es un queso típico italiano, elaborado con leche de vaca, tiene un 45 % de grasa sobre el extracto seco total. La corteza es suave y de color amarillo dorado. Este queso es duro y compacto, con sabor delicado después de 2-3 meses de maduración, y más picante cuanto más se prolonga dicha maduración (hasta 6 meses).



Figura 8. Queso Provolone.

3.6. Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica de gran importancia, poco conocida en nuestro país con gran auge en el mercado internacional, utilizada en diversas áreas de la investigación para la separación y cuantificación de moléculas pequeñas incluyendo iones metálicos (libres o en forma de complejos), biomoléculas como aminoácidos, proteínas, péptidos, carbohidratos, y macromoléculas tales como fragmentos de ADN, entre otros. La EC comparada con otras técnicas analíticas por ejemplo cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ofrece grandes ventajas en términos de su alta resolución, eficiencia, bajo consumo de disolventes orgánicos y tiempos cortos de análisis. Además, cuenta con distintos modos de separación que pueden utilizarse según las necesidades del analista empleando el mismo instrumento.^{1,15,19}

Parte de la versatilidad y eficiencia de esta técnica se debe a que combina elementos de otras técnicas analíticas; por ejemplo, utiliza detectores de alta sensibilidad como en la CLAR y el uso de capilares de sílice fundida (SiO_2) como en la cromatografía de gases (CG). Estos capilares permiten la aplicación de altos campos eléctricos con una alta eficiencia para la disipación de calor, evitando los efectos adversos del calentamiento de Joule, y permiten la detección *in situ*, debido a la baja absorción de la radiación visible, ultravioleta y a la baja

fluorescencia. Estos capilares están recubiertos de un polímero (poliamidas) que les confiere alta flexibilidad facilitando su manipulación.

Es importante hacer notar que aunque superficialmente este método se parece a la CLAR, los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos con excepción de la cromatografía capilar electrocinética micelar, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más de que las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria.

En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos.

El mecanismo de separación en la EC es el mismo que en la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación masa/carga y con la conformación de los analitos, La EC consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico.

3.7. Separación Electroforética

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidades migratorias de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito puede ser dada por la siguiente relación (Ecuación 1 (Ec. 1)):

Ecuación 1. Velocidad del analito.

$$v = (\mu \pm \mu_{eo})E$$

Dónde:

$v =$ *Velocidad del analito*

$\mu =$ *Movilidad electroforética*

$\mu_{eo} =$ *Movilidad electrosmótica*

$E =$ *Campo eléctrico*

La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito, como se describe en la siguiente relación (Ec. 2).

Ecuación 2. Movilidad electroforética.

$$\mu = \frac{q}{6\pi r\eta}$$

Dónde:

$\mu =$ *Movilidad electroforética*

$q =$ *Carga del analito*

$r =$ *Radio molecular*

$\eta =$ *Viscosidad de la solución*

De la Ec. 2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

Un constituyente fundamental de la EC es el llamado flujo electrosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido presenta carga

negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol a pH mayores a 4 y conjuntamente con sus contraiones formando una doble capa eléctrica.

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H⁺ bajo influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado FEO, dicho flujo está dado por las variables viscosidad, potencial zeta y la constante dieléctrica del medio (Ec. 3).

Ecuación 3. Movilidad electrosmótica.

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta}$$

Dónde:

μ_{eo} = *Movilidad electrosmótica*

ζ = *Potencial zeta*

η = *Viscosidad de la solución*

ε = *Constante dieléctrica de la solución*

La electroforesis realizada en tubos capilares (Fig. 9) ha aumentado el interés en esta técnica desde el punto de vista analítico, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, ampliando increíblemente el campo de aplicación de esta técnica. Sus principales ventajas son: la alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra y separación de un sin número de compuestos, y una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva.⁷

Esta técnica electroforética es conocida como EC, electroforesis capilar de zona (ECZ) o en ocasiones electroforesis capilar de alta resolución (ECAR).

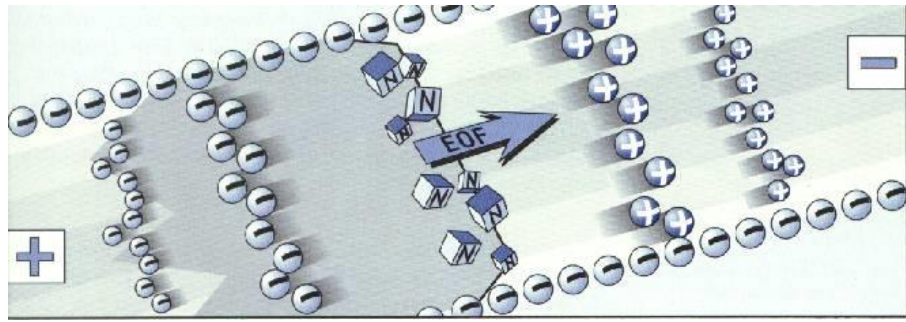


Figura 9. Separación electroforética.

Un sistema de EC (Figs. 10 y 11) consiste básicamente en las siguientes partes básicas:

- Dos electrodos (ánodo y cátodo).
- Fuente de poder.
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte respectivamente.
- Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación).
- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido).
- Un sistema que introduce la muestra.
- Un detector.
- Sistema de adquisición de datos.

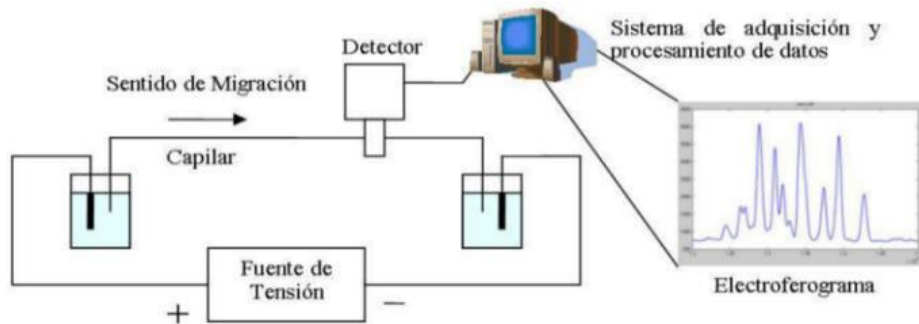


Figura 10. Sistema general de electroforesis capilar.



Figura 11. Equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ

3.8. Detección por Fluorescencia Inducida por Láser

Debido a que la ESP es un derivado de FOR a nivel de trazas en el queso, es necesario utilizar un detector con mejores límites de detección como el detector de fluorescencia inducida por láser (DFIL) que el tradicional detector arreglo de diodos (DAD).⁴⁰

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en que los átomos o moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. Después la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. La característica más atractiva de la fluorescencia molecular es su sensibilidad inherente, habitualmente uno a tres órdenes de magnitud mayor que con la espectroscopia de absorción. Sin embargo, los métodos de fluorescencia tienen menos aplicaciones que los métodos de absorción, dado el número relativamente limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable. Además, esta última se ve sujeta a muchos más efectos de interferencia ambiental que los métodos de absorción.^{15,28}

El proceso de fluorescencia es el resultado de tres pasos (Fig. 12):

- Excitación: Un fotón de energía $h\nu_{ex}$ es suministrado por una fuente externa (lámpara incandescente o un láser) y absorbido por un fluoróforo (especie química que posee fluorescencia), creando un estado de excitación (S_1').

Este proceso distingue la fluorescencia de la quimioluminiscencia en la cual el estado de excitación es producido por una reacción química.

- Tiempo de vida del estado excitado: el estado de excitación existe por un tiempo finito (1-10 nanosegundos). Existen dos mecanismos de relajación por los cuales el estado de mayor energía S_1' de un fluoróforo retorna a un estado de menor energía. Primero los fluoróforos interactúan con el medio y estas interacciones transfieren energía al mismo el cual experimenta un incremento de temperatura. Este mecanismo produce un estado de excitación S_1 el cual posee menor energía que el estado S_1' . El segundo mecanismo es la emisión de luz el cual se le conoce como emisión fluorescente.
- Emisión fluorescente. Un fotón de energía $h\nu_{em}$ es emitido regresando el fluoróforo al estado original de mínima energía S_0 . La energía de este fotón es menor y por lo tanto de mayor longitud de onda que la del fotón de excitación. La diferencia de energía o la diferencia de longitudes de onda representada por $(h\nu_{ex} - h\nu_{em})$ se le conoce como desplazamiento de Stokes. Un solo fluoróforo puede emitir miles de fotones, gracias a esto las técnicas de fluorescencia poseen una alta sensibilidad de detección.^{12,24,29}

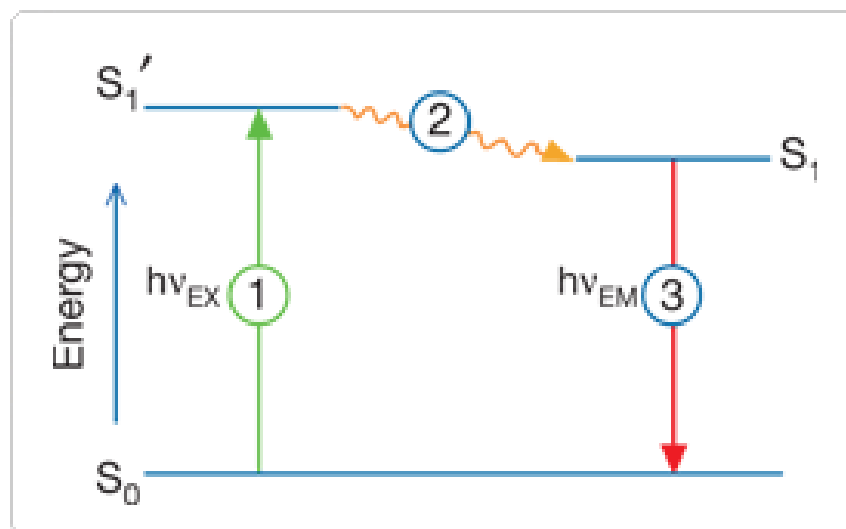


Figura 12. Diagrama de Jablonski el cual ilustra el proceso de la fluorescencia.

La utilización del láser como fuente de excitación (Fig. 13) está reconocida como una de las técnicas más sensibles de análisis cualitativo y cuantitativo de átomos y moléculas fluorescentes, en condiciones óptimas la técnica ha permitido detectar hasta un solo átomo en fase gaseosa y moléculas individuales en solución.⁷

El láser produce un haz de luz de forma coherente, es decir fotones ordenados los cuales poseen una dispersión mínima aumentando la energía del haz a diferencia de las lámparas incandescentes, las cuales, producen fotones dispersos generando menor energía.

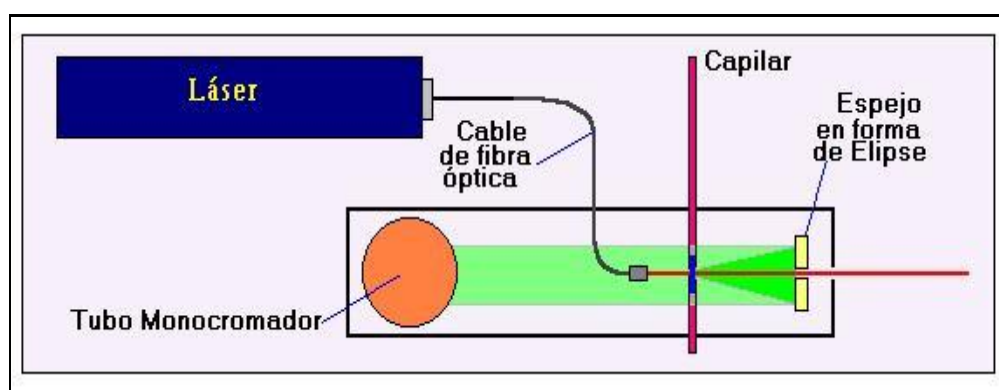


Figura 13. Diagrama para un DFIL.

La sensibilidad de la fluorescencia inducida por láser deriva de la excelente relación señal/ruido que esta técnica exhibe, y es debida principalmente a que la señal es una medida directa de la especie analizada, contrario a lo que se hace en las técnicas de absorción, donde la determinación de una especie dada se hace por la medida de pequeñas diferencias en la intensidad de la señal fuente y se pueden detectar absorbancias muy débiles, en estos casos la sensibilidad depende de la estabilidad de la fuente y de la alta sofisticación de los instrumentos ópticos y electrónicos.^{31,32}

La selectividad de este método es debida al hecho que se observa una señal solo si hay absorción, es decir solo si la longitud de onda coincide con una línea o una banda de absorción del producto y una alta eficiencia fluorescente, es decir, que la molécula se desexcite mediante emisión de radiación.^{19,34}

3.9. Sistemas de inyección

Dentro de la técnica CE la inyección de la muestra se puede lograr por varios métodos, los más utilizados son la inyección hidrodinámica y la electrocinética.

La inyección hidrodinámica o neumática, se lleva a cabo mediante diferencia de presión por bombeo, o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar. Este es un sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de la introducción se logran resultados altamente reproducibles.

Se puede utilizar la presión de un gas para forzar que la solución de la muestra entre en el capilar. La introducción por vacío se logra, como su nombre lo indica, provocando vacío que arrastra la solución de la muestra dentro del capilar. La introducción de la muestra por efecto sifón se obtiene levantando el reservorio de la muestra de 5 a 10 cm relativo a la salida del reservorio, esta modalidad de inyección hidrodinámica es poco reproducible.

Con la inyección hidrodinámica, la cantidad de muestra introducida es independiente a la matriz de la muestra. El volumen de la muestra introducida estará en función de los capilares, la viscosidad del electrolito soporte, la presión aplicada y el tiempo.

La inyección electrocinética se realiza mediante la migración de los presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico, por lo que el flujo electrosmótico es un factor que afecta esta modalidad de inyección.

3.10. Isotiocianato de fluoresceína

Debido a que la ESP no posee fluorescencia propia es necesario crear un derivado fluorescente.^{17,21}

El isotiocianato de fluoresceína (ITF) (Fig. 14) un derivado reactivo de la fluoresceína ha sido uno de los fluoró cromos que más habitualmente se han

unido químicamente a otras moléculas no fluorescentes para generar nuevas moléculas fluorescentes para las más diversas aplicaciones.¹²

El ITF tiene la característica de reaccionar con compuestos que contengan grupos amino de tipo primario y secundario por medio del grupo Isotiocianato.^{11,12} En tanto que la (Fig. 15) muestra el espectro de absorción y fluorescencia del ITF.²⁷

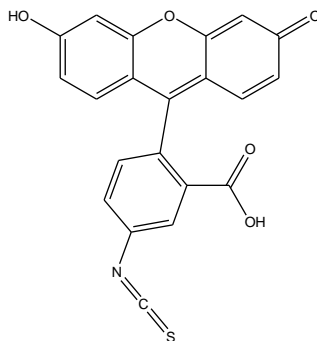


Figura 14. Estructura de ITF.

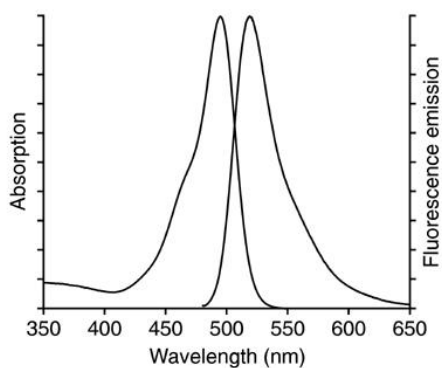


Figura 15. Espectro de fluorescencia del ITF (absorción máxima 495 nm y emisión máxima 525 nm).

3.11. Validación de Métodos Analíticos

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.⁶ A través de la validación se confirma que el método es consistente en la aplicación para la que fue desarrollada. El principal objetivo de la validación de un método analítico es obtener un método confiable. Para obtener estos resultados todas las variables del método deben ser consideradas, incluyendo el procedimiento de muestreo, los pasos para la preparación de la muestra, todas las condiciones de separación, el tipo de detección, etc. El alcance de la validación va a depender del propósito del método.^{10,25,38}

Los parámetros de desempeño evaluados son diferentes dependiendo del tipo de método analítico (Tab. 3). Para un método que se enfoca en cuantificar el analito se indican los siguientes parámetros de desempeño a estudiar.^{6,26,36}

Tabla 3. Parámetros a evaluar de acuerdo con el Colegio Nacional de QFB's.

Parámetro de desempeño	Contenido/potencia /valoración	Contenido/potencia	Límite	Identificación
Precisión/adecuabilidad del sistema	Sí	Sí	Sí	Puede ser requerido
Linealidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Exactitud/repetibilidad	Sí	Sí	No	No
Precisión del método	Sí	Sí	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	Puede ser requerido	Puede ser requerido	No	No
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Robustez	Puede ser requerido	Puede ser requerido	Puede ser requerido	No
Tolerancia	Puede ser requerido	Puede ser requerido	Puede ser requerido	No

Los parámetros de desempeños para la validación del método analítico son los siguientes:

- Especificidad: es la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente estos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.
- Precisión (precisión del sistema ó adecuación del sistema): expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos (soluciones de referencia) bajo condiciones establecidas.
- Precisión intermedia: precisión obtenida dentro del mismo laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.
- Linealidad: capacidad del método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.
- Precisión de método: expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas.
- Exactitud: es la proximidad de los valores obtenidos por el método analítico y los valores reales.
- Límite de detección: cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificado con un valor exacto.
- Límite de cuantificación: cantidad más pequeña del analito en la muestra que puede ser cuantificada de manera aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El formaldehído es un gas ampliamente utilizado en la industria alimentaria como inhibidor microbiol3gico, adem1s de otorgarle ciertas propiedades organol3pticas y mejorar la textura, en la elaboraci3n de quesos, aun cuando la Agencia internacional para la Investigaci3n del C1ncer y la Agencia de Protecci3n Ambiental han determinado que el formaldehído es probable carcin3geno en seres humanos. En Estados Unidos de Norteam3rica as3 como en algunos pa3ses de la Comunidad Europea est1 prohibido el uso de formaldehído en la elaboraci3n de alimentos as3 como en alimentos importados.

Sin embargo cuantificar formaldehído directamente en alimentos como leche y quesos no es recomendable, ya que el 99 % del formaldehído reacciona r1pidamente con las case3nas de la matriz dando como producto de reacci3n a la espinacina. Debido a que la espinacina es un derivado del formaldehído en el queso encontr1ndose a niveles de trazas, es necesario utilizar un detector con mejores l3mites de detecci3n como el detector de fluorescencia inducida por l1ser que el convencional detector arreglo de diodos.

Lo anterior plantea un problema interesante ya que la espinacina no es una especie fluorescente, por lo consiguiente, se propone adicionar a la espinacina un grupo fluorescente creando un derivado que pueda ser cuantificado por medio de un detector de fluorescencia inducida por l1ser con el fin de contar con un m3todo anal3tico que se emplee en los sistemas de control de calidad en la industria alimentaria.

5. HIP3TESIS

Si la espinacina es un compuesto que es producido solamente cuando se utiliza formaldehído en la fabricaci3n de quesos, entonces el monitoreo de espinacina al ser derivatizada con isotiocianato de fluoresce3na, producir1 un derivado fluorescente i3nico viable para ser medido en electroforesis capilar–detecci3n de fluorescencia inducida por l1ser, que nos permitir1 la detecci3n de trazas. Adem1s

de que el método desarrollado puede posteriormente ser validado, para ser utilizado en el control de calidad rutinario de la adición de formaldehído en la fabricación de quesos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología analítica que permita la identificación y posterior cuantificación de la espinacina utilizando electroforesis capilar con detector arreglo de diodos y detección de fluorescencia inducida por láser. Todo esto con la finalidad de utilizar a la espinacina como marcador indirecto de la utilización de formaldehído durante el proceso de producción de quesos y así poder realizar su adecuado control de calidad.

6.2. Objetivos particulares

- Desarrollar un tratamiento para diferentes tipos de quesos que minimice las interferencias en la reacción de derivatización y el método de separación por electroforesis capilar de la espinacina.
- Establecer las condiciones adecuadas para la reacción de derivatización de la espinacina con isotiocianato de fluoresceína utilizando detector arreglo de diodos.
- Establecer las condiciones para la identificación y cuantificación del derivado del isotiocianato de fluoresceína–espinacina en electroforesis capilar con detector arreglo de diodos y su posterior transferencia al detector de fluorescencia inducida por láser.
- Llevar a cabo la validación del método desarrollado por electroforesis capilar con detector de fluorescencia inducida por láser.
- Cuantificar el producto de reacción isotiocianato de fluoresceína–espinacina en diferentes tipos de quesos por medio de una curva de calibración

utilizando electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser.

- Aplicar la metodología analítica desarrollada en la determinación de espinacina en diferentes tipos de quesos comerciales.

7. PARTE EXPERIMENTAL

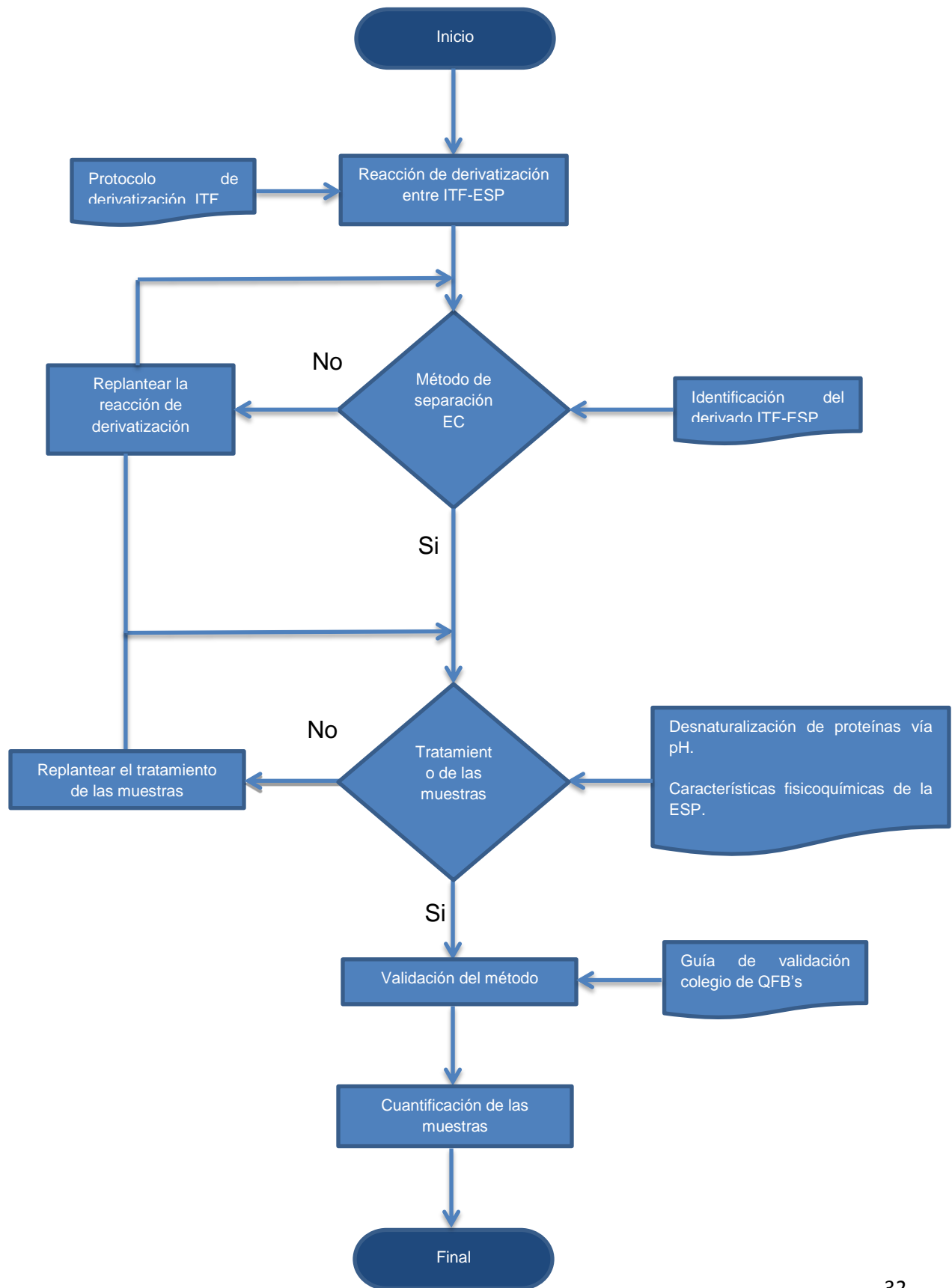
7.1. Equipos

- Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, (Beckman Coulter), con detector de arreglo de diodos DAD, detector de fluorescencia inducida por láser DFIL acoplado a una computadora mediante el software 32 Karat (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).
- Desionizador de agua tipo 1, (milliQ Plus Millpore, USA).
- Potenciómetro HI 931401, (Hanna Instruments).
- Agitador magnético MIRAKTM, (Termolyne).
- Vortex Barnstead, (Termolyne).
- Turbovap LV, (Caliper Life Science)
- Balanza analítica, (BOECO).
- Espectrofotómetro UV-VIS Lamda, (Perkin Elmer).
- Centrifugadora Alegria 21, (Beckman Coulter).4
- TermobathPrecision 2825, (Thermo)

7.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico grado reactivo analítico, (JK Baker).
- Hidróxido de sodio grado reactivo analítico (JK Baker).
- Ácido tricloroacético grado reactivo analítico, (Meyer).
- Acetonitrilo grado HPLC, (JK Baker).
- Agua desionizada, (milliQ Plus Millpore, USA).
- Espinacina grado reactivo analítico, (Zerenex).
- Isotiocianato de fluoresceína isómero I grado reactivo analítico, (Aldrich).

7.3. Metodología general



7.4. Metodología para el tratamiento de la muestra

El tratamiento de la muestra es un paso crítico en el desarrollo de un método analítico ya que esta permite remover parcial o total los componentes interferentes presentes en la muestra.

- a. Tomar una muestra de queso y formar una macilla uniforme empleando un mortero y un pistilo (Fig. 16).
- b. Pesar 5 g de la macilla de queso y adicionar agua destilada (mL) en una proporción (1:2) queso:agua destilada.
- c. Homogenizar la solución anterior por medio de un agitador magnético por 30 minutos (min).
- d. Filtrar a vacío empleando papel filtro poro fino (Fig. 17).
- e. Adicionar 1 mililitro (mL) de ATA al 15 % p/v a la fracción acuosa.
- f. Agitar por 30 min empleando el agitador magnético.
- g. Reposar por una hora (h).
- h. Trasvasar el sobrenadante a tubos de centrifuga de teflón con tapa de 10 mL.
- i. Centrifugar por 10 min a 14 000 revoluciones por minuto (rpm).
- j. Enfriar por 15 min a 4 °C en el congelador.
- k. Separar el sobrenadante del tubo colocándolo en un vaso de precipitado y ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 0.1 M por medio de tiras indicadoras de pH.
- l. Dejar reposar por 1 h a temperatura ambiente.
- m. Trasvasar el sobrenadante a tubos de centrifuga de teflón con tapa de 10 mL (Fig. 18).
- n. Centrifugar por 10 min a 14 000 rpm.
- o. Enfriar por 15 min a 4 °C.
- p. Decantar el sobrenadante a tubos de vidrio de 25 mL.
- q. Concentrar en el evaporador a 50 °C y 20 libras sobre pulgada cuadrada de presión (psi) de nitrógeno aproximadamente a la mitad del volumen inicial.

- r. Trasvasar el contenido de los tubos de vidrio a cartuchos de centrifuga de 10 kilodalton (kDa) (Fig. 19).
- s. Centrifugar por 30 min a 14 000 rpm.
- t. Trasvasar la fase acuosa a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar a volumen de aforo con solución amortiguadora de corrida $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 40 mM, pH 9.2 (SAC).



Figura 16. Formación de una macilla.



Figura 17. Filtrado a vacío.

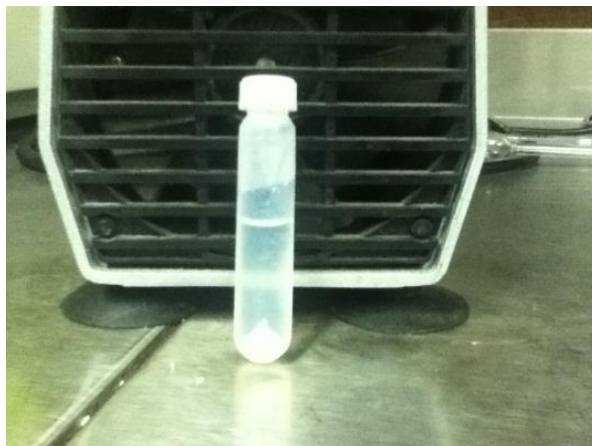


Figura 18. Tubo de centrifuga de teflón conteniendo la muestra tratada.



Figura 19. Cartuchos para centrifugación de 10 KDa.

7.5. Metodología para la reacción de derivatización

La metodología para la reacción de derivatización tiene como finalidad establecer una técnica reproducible con la cual se lleve a cabo la síntesis del derivado ITF-ESP

- a. Adicionar a un matraz volumétrico de 50 mL las siguientes alícuotas:
 - 4 mL de solución estándar de espinacina 60 mg/L (EST-ESP) ó 5 mL de muestra

- 10 mL de solución estándar de isotiocianato de fluoresceína 1000 mg/L (EST-ITF).
 - 3 mL de solución estándar de ácido aminobutírico 60 mg/L (EST-AAB).
 - Diluyente: solución amortiguadora de corrida de $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 40 mM pH 9.2 (SAC).
- b. Llevar a volumen de aforo utilizando SAC nombrando esta solución como solución de reacción de derivatización 1 (SRD1) (Fig. 20).
 - c. Trasvasar la SRD1 a un frasco de vidrio ámbar con tapón de plástico y colocarlo dentro de un baño María a 50 °C por 30 min.
 - d. Tomar una alícuota de 0.5 mL de la SRD1 y transferirla a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen de aforo con SAC nombrando esta solución como solución de reacción de derivatización 2 (SRD2).
 - e. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución SRD2 y transferirla a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen de aforo con SAC nombrando esta solución como solución de reacción de derivatización 3 (SRD3).



Figura 20. Reacción de derivatización SRD1.

7.6. Metodología para el sistema electroforético

Debido a que la ESP se encuentra dentro de una matriz compleja es necesario separarla de los diversos componentes de la muestra para su posterior cuantificación.

Las condiciones experimentales para el sistema electroforético se muestran a continuación (Tab. 3).

Tabla 4. Condiciones electroforéticas.

Condiciones electroforéticas	
Longitud total (cm)	34
Longitud efectiva (cm)	22.5
Diámetro interno (μm)	50
Material	Sílice fundida
Temperatura del capilar ($^{\circ}\text{C}$) durante el análisis	20
SAC	Solución amortiguadora de tetraborato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 40mM, pH= 9.2
Voltaje (kV)	20
Tipo de inyección	Hidrodinámica
Parámetros de inyección (presión:tiempo)	0.5 psi:5 seg
Longitud de onda de ex. (nm)	488
Longitud de onda de em. (nm)	510

7.7. Validación del método analítico

Un método analítico debe ser apto para el propósito diseñado, la demostración de esto, se basa en evidencia objetiva la cual, se genera ejecutando un protocolo de validación que contempla los parámetros de desempeño necesarios para la finalidad de dicho método.

La validación de la metodología analítica contempla los siguientes parámetros:

7.7.1. Especificidad

Procedimiento:

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- Blanco (BCO): En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- Placebo: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de la solución final de la metodología para el tratamiento de muestra (7.4), 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- Placebo cargado (ESP): En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de la solución final de la metodología para el tratamiento de muestra (7.4), 10 mL de EST-ITF y 4 mL de EST-ESP, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c). *Concentración ESP aproximada (4.8 µg/L).*
- Placebo cargado (AAB): En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de la solución final de la metodología para el tratamiento de muestra (7.4), 10 mL de EST-ITF y 3 mL de EST-AAB, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c). *Concentración AAB aproximada (3.6 µg/L).*
- Muestra comercial con FOR: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de la solución final de la metodología para el tratamiento de muestra (7.4), 10 mL de EST-ITF y 4 mL de EST-AAB, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).

Inyectar por triplicado los siguientes sistemas: BCO, placebo cargado (ESP), placebo cargado (AAB) utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: La respuesta analítica es debida únicamente al analito de interés.

7.7.2. Precisión (adecuación del sistema)

Procedimiento:

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- SRD2: Preparar de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (7.5).
- SRD3: Preparar 10 sistemas SRD3_1 – SRD3_10 de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (7.5) a partir de la SRD2.

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, SRD3_1 – SRD3_10 utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) \leq 2.0 %.

7.7.3. Precisión intermedia

Procedimiento:

Analista 1 Día 1.

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c)
- SRD2: Preparar de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (hasta el punto 7.5.d).
- SRD3: Preparar 5 sistemas SRD3_1 – SRD3_5 de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (7.5) a partir de la SRD2.

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, SRD3_1 – SRD3_5 utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) \leq 2.0 %.

Analista 2 Día 2.

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- SRD2: Preparar de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (hasta el punto 7.5.d).
- SRD3: Preparar 5 sistemas SRD3_1 – SRD3_5 de acuerdo a la metodología de la reacción de derivatización (7.5) a partir de la SRD2.

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, SRD3_1 – SRD3_5 utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Porcentaje de desviación estándar relativa para ambos analistas (% DER) \leq 2.0 %.

7.7.4. Linealidad del sistema

Procedimiento:

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- Preparar por triplicado los niveles de la linealidad del sistema (Tab. 5). Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c) para cada uno de los niveles de la linealidad del sistema.

Tabla 5. Sistemas para la linealidad del sistema.

Sistema	EST-ITF (mL)	EST-ESP (mL)	EST-AAB (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (mg/mL)
25 %	10	1	3	50	1.2
50 %	10	2	3	50	2.4
75 %	10	3	3	50	3.6
100 %	10	4	3	50	4.8
125 %	10	5	3	50	6.0
150 %	10	6	3	50	7.2
175 %	10	7	3	50	8.4

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, 25 % - 175 % utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$.

7.7.5. Precisión del método

Procedimiento:

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SA.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- Placebo cargado madre (PCM): En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 5 mL de la solución final de la metodología para el tratamiento de muestra (7.4), 10 mL de EST-ITF, 4 mL de EST-ESP y 3 mL de EST-AAB, llevar a volumen de aforo con SAC.
- Placebo cargado de inyección (PCI): Preparar 10 sistemas (PCI_1 – PCI_10) Continuando con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c). empleando la PCM. *Concentración ESP aproximada (4.8 µg/L).*

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, PCI_1 – PCI_10 utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) \leq 5.0 %.

7.7.6. Exactitud

Procedimiento:

- Preparar las siguientes soluciones: EST-ESP, EST-ITF, EST-AAB y SAC.
- BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c).
- Preparar por triplicado los sistemas de la exactitud (Tab. 6). Continuar con la metodología de la reacción de derivatización a partir del punto (7.5.c). para cada uno de los niveles de la linealidad del sistema.

Tabla 6. Sistemas para la exactitud.

Sistema	EST-ESP (mL)	EST-AAB (mL)	Volumen de placebo (mL)*	Volumen final (mL)	Concentración (mg/mL)
25%	1	3	5	50	1.2
50%	2	3	5	50	2.4
75%	3	3	5	50	3.6
100%	4	3	5	50	4.8
125%	5	3	5	50	6.0
150%	6	3	5	50	7.2
175%	7	3	5	50	8.4

Inyectar los siguientes sistemas: BCO, 25% - 175 % utilizando el sistema electroforético (7.6).

Criterio de aceptación: Coeficiente de determinación, $r^2 \geq 0.98$.

7.7.7. Límite de detección

Procedimiento:

Determinar el límite de detección (LD) utilizando la siguiente relación (Ecuación 4).

Ecuación 4. Límite de detección.

$$LD = \frac{3\sigma}{m}$$

Dónde:

σ = Error sistemático de la regresión lineal del parámetro de exactitud

m = Pendiente de la recta

Esto permite utilizar la siguiente expresión (Ec. 5) descrita en la guía de validación del Colegio de QFB's:

Ecuación 5. Límite de detección en base a S y/x

$$LD = \frac{3 S_{y/x}}{m}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ = Desviación estandar de regresión

7.7.8. Límite de cuantificación

Procedimiento:

Determinar el límite de detección (LC) utilizando la siguiente relación (Ec. 6).

Ecuación 6. Límite de cuantificación.

$$LC = \frac{10\sigma}{m}$$

Dónde:

σ = Error sistemático de la regresión lineal del parámetro de exactitud

m = Pendiente de la recta

Esto permite utilizar la siguiente expresión (Ec. 7) descrita en la guía de validación del Colegio de QFB's:

Ecuación 7. Límite de cuantificación en base a S y/x

$$LC = \frac{10 S_{y/x}}{m}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ = Desviación estandar de regresión

7.7.9. Muestras comerciales

Realizar la cuantificación de ESP para las siguientes muestras:

- Queso canasto 0.05 % de formaldehído.
- Queso canasto 0.10 % de formaldehído.
- Queso canasto muestra A.
- Queso canasto muestra B.
- Queso Provolone.
- Queso Gran Padano.

8. RESULTADOS Y ANLIÁSIS DE RESULTADOS

8.1. Tratamiento de la Muestra

Las proteínas son la principal interferencia de la matriz ya que están conformadas por aminoácidos y estos a su vez reaccionan con el reactivo derivatizante ITF. La precipitación de las proteínas es la metodología comúnmente utilizada para removerlas de una matriz.³⁵ Existen diferentes técnicas de precipitación de proteínas de las cuales se probaron:

- a) Cambio en la constante dieléctrica por la adición de Acetonitrilo (ACN) grado high performance liquid cromatography (HPLC).
- b) Cambio en el pH con la adición de H₂SO₄ 0.5 M.
- c) Cambio en el pH con la adición de ácido tricloroacético (ATA) 15 %.

Las muestras a), b) y c) fueron tratadas siguiendo la metodología para el tratamiento de la muestra (7.4) modificando el agente desnaturizante ATA por ACN y H₂SO₄ para las muestras a) y b) respectivamente.

Debido a que algunos aminoácidos absorben a una longitud de onda de 280 nm, esta longitud de onda fue empleada para determinar el porcentaje de proteína removida de la muestra. Para la determinación del % de proteínas removidas por las soluciones desnaturizantes se empleó la siguiente relación (Ec. 8).

Ecuación 8. Porcentaje de proteína removida.

$$\%PR = \left(\frac{S100\% - SRD}{S100\%} \right) \times 100$$

Dónde:

% PR = porcentaje de proteínas removidas.

S100 % = solución al 100 % (sin reactivos precipitantes).

SRD = solución con reactivos precipitantes.

Los resultados de las muestras tratadas con ACN, H₂SO₄ y ATA (Fig. 21 y Tab. 7) fueron comparados con una solución de referencia tratada siguiendo la metodología para el tratamiento de la muestra (7.4) sustituyendo el ATA por agua destilada.

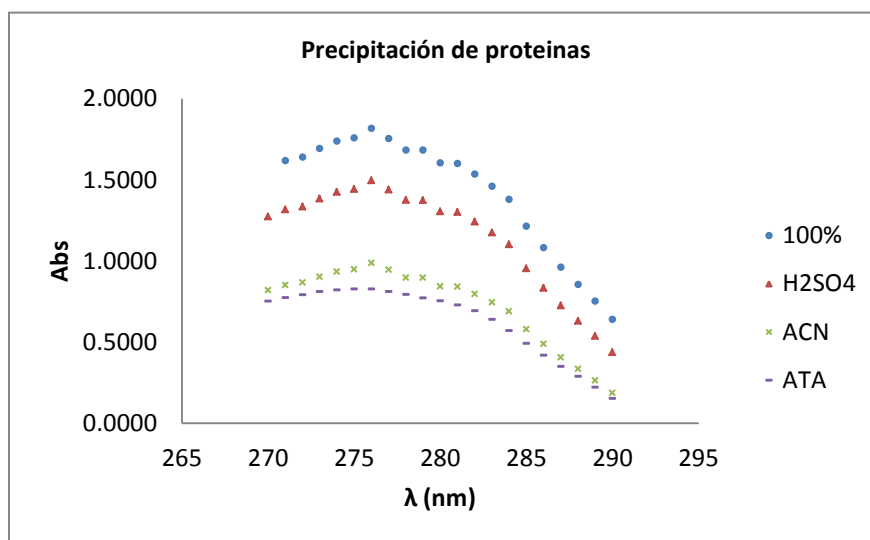


Figura 21. Espectros de absorción para las diferentes soluciones.

Tabla 7. Absorción de las soluciones problemas.

λ (280nm)				
Sistema	100%	H ₂ SO ₄	ACN	ATA
Abs.	1.6048	1.3043	0.8433	0.7524
% PR		18.7251	47.4514	53.1157

Lo anterior muestra que el mejor agente desnaturizante es el ATA ya que proporciona el menor valor de absorbancia y por lo tanto la menor concentración de proteínas.

8.2. Reacción de derivatización

Con el fin de mejorar los límites de detección fue necesario utilizar un detector de fluorescencia. Debido a que la ESP no posee fluorescencia por sí misma, mediante una reacción de derivatización (Fig. 22), es decir, modificando la molécula, fue posible brindarle dicha propiedad.

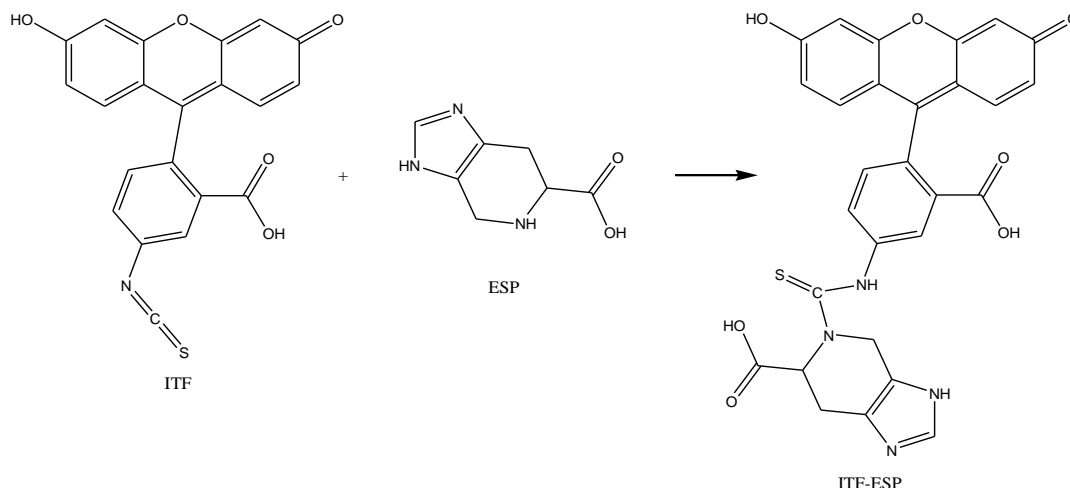


Figura 22. Reacción de de

Las condiciones de la reacción de derivatización fueron tomadas de protocolos de derivatización de Invitrogen.¹³

Se realizó la siguiente secuencia de inyecciones.

BCO: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF, llevar a volumen de aforo con SAC. La reacción de derivatización (reacción de adición nucleofílica a grupo carbotiol) fue colocada en un baño de agua a 25 °C por 6 h. Tomar una alícuota de 5 mL de la solución anterior y transferirla en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen de aforo con SAC.

Sistema 1: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF y 4 mL de EST-ESP, llevar a volumen de aforo con SAC. La reacción de derivatización fue colocada en un baño de agua a 25 °C por 6 h. Tomar una alícuota de 5 mL de la solución anterior y transferirla en un matraz volumétrico de

50 mL, llevar a volumen de aforo con SAC. *Concentración ESP aproximada (0.48 mg/L).*

Sistema 2: En un matraz volumétrico de 50 mL adicionar 10 mL de EST-ITF y 15 mL de EST-ESP, llevar a volumen de aforo con SAC. La reacción de derivatización fue colocada en un baño de agua a 25 °C por 6 h. Tomar una alícuota de 5 mL de la solución anterior y transferirla en un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen de aforo con SAC. *Concentración ESP aproximada (1.8 mg/L).*

Las condiciones electroforéticas iniciales (Tab. 8) se establecieron en base a trabajos de tesis anteriores para la determinación de aminas en matrices biológicas por medio de una reacción de derivatización.

Tabla 8. Condiciones iniciales del sistema electroforético.

Condiciones electroforéticas	
Longitud total (cm)	34
Longitud efectiva (cm)	22.5
Diámetro interno (µm)	75
Material	Sílice fundida
Temperatura del capilar (°C) durante el análisis	20
SAC	Solución amortiguadora de tetraborato de sodio Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, 40mM, pH= 9.2
Voltaje (kV)	20
Tipo de inyección	Hidrodinámica
Parámetros de inyección (presión:tiempo)	0.5 psi:5 seg
Longitud de onda de ex. (nm)	488

El derivado ITF-ESP (Fig. 23) fue generado bajo las condiciones de derivatización establecidas.

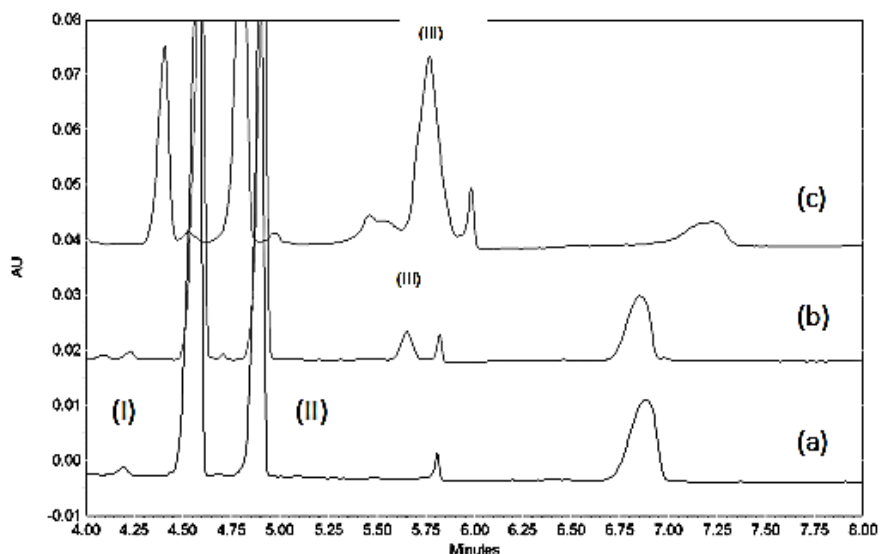


Figura 23. BCO (a), Sistema 1 (b), Sistema 2 (c), ITF (I) ITF (II) e ITF-ESP (III).

Ya que la ESP e ITF poseen varios grupos reactivos, generan más de un producto de reacción. Las siguientes escalas de pH, (Figs. 24 y 25) muestran las especies existentes dentro de la escala de pH. Dichos valores de pka fueron calculados mediante el programa ACD/pka DB: ChemSketch 3.5.

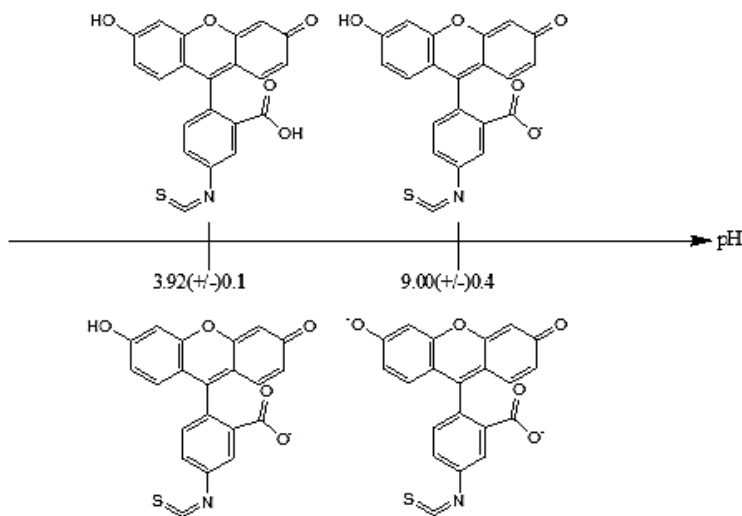


Figura 24. Estructuras para el ITF dentro de la escala de pH.

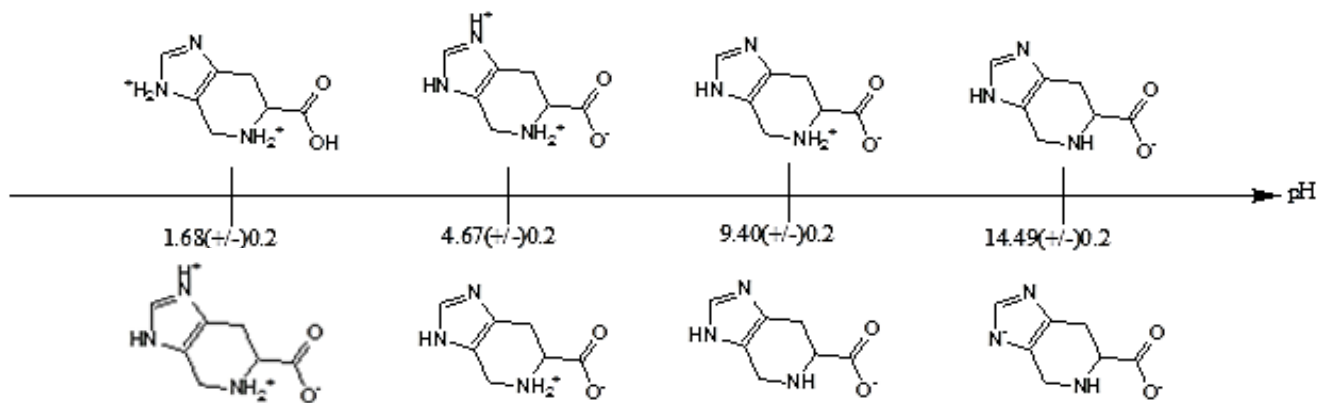


Figura 25. Estructuras para la ESP dentro de la escala de pH.

Debido a que el SAC posee un pH 9.2 se planteó las siguientes estructuras (Fig. 26) involucradas en la reacción de derivatización.

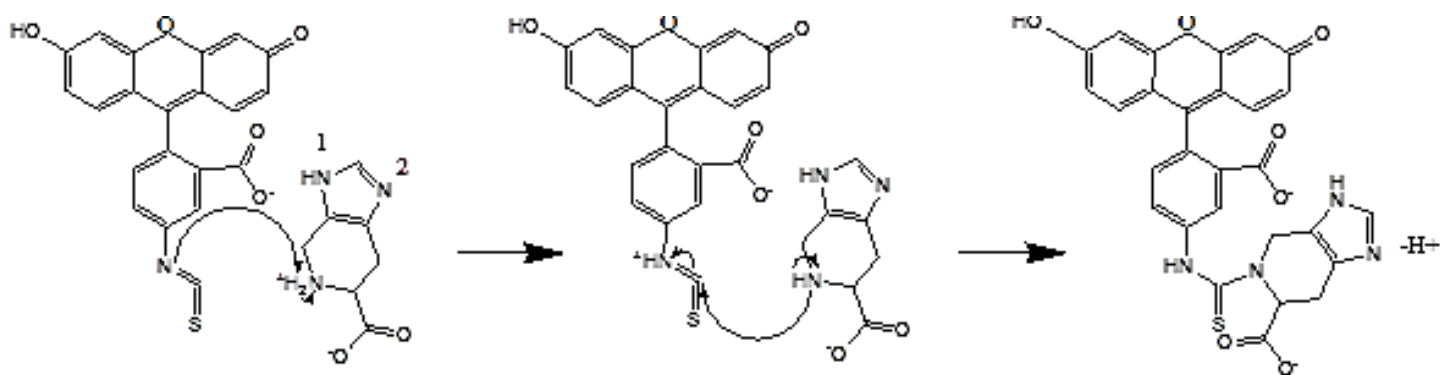


Figura 26. Posible estructura del derivado ITF-ESP.

Los grupos amino 1 y 2 de la ESP comprometerían la aromaticidad del ciclo pentadieno al reaccionar con el ITF, lo que haría incrementar el requerimiento energético para formar el ITF-EST. Debido a esto la estructura más estable sería la propuesta en la (Fig. 26).

8.3. Avance de la reacción de derivatización

Se trazó un perfil del avance de la reacción a 25 °C, (Figs. 27 y 28) para conocer el comportamiento de la reacción de derivatización y encontrar un tiempo óptimo.

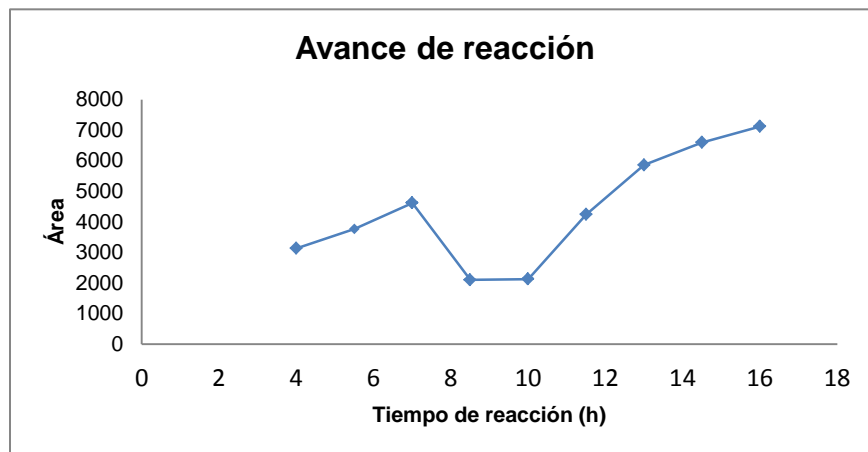


Figura 27. Avance de la reacción de derivatización para ITF-ESP a 25°C para los tiempos 4 h, 5.5 h, 7 h, 8.5 h, 10 h, 11.5 h, 13 h, 14.5 h, y 16 h.

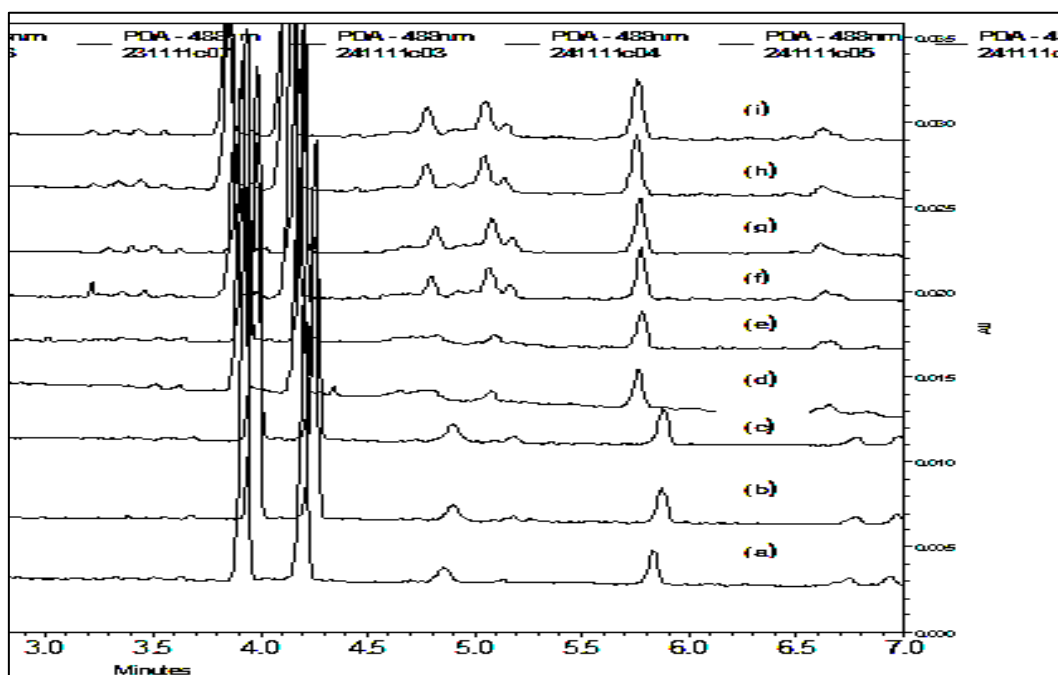


Figura 28. Electroferogramas del avance de la reacción de derivatización para ITF-ESP (4.9 min) a 25 °C para los tiempos 4 h (a), 5.5 h (b), 7 h (c), 8.5 h (d), 10 h (e), 11.5 h (f), 13 h (g), 14.5 h (h), y 16 h (i).

El gráfico del avance de la reacción y los electroferogramas (Figs. 27 y 28) revelaron que existe un decaimiento en la reacción de derivatización a partir de la séptima hora de reacción, al observar los electroferogramas se descubrió que el producto de derivatización ITF-ESP comenzó a degradarse y creando nuevas señales.

El protocolo de derivatización utilizado para desarrollar la metodología de derivatización mencionó que el tiempo mínimo de reacción debe ser de 4 h a temperatura ambiente y es aconsejable no catalizar la reacción de derivatización por incremento de temperatura.¹³ Sin embargo implementar una reacción de derivatización con un tiempo de 4 h como mínimo es poco práctico en un método de análisis para el control de calidad. Tomando a consideración este inconveniente se decidió generar un avance de reacción a una temperatura de 50 °C la cual es señalada como la máxima temperatura de trabajo para la reacción de derivatización.¹³

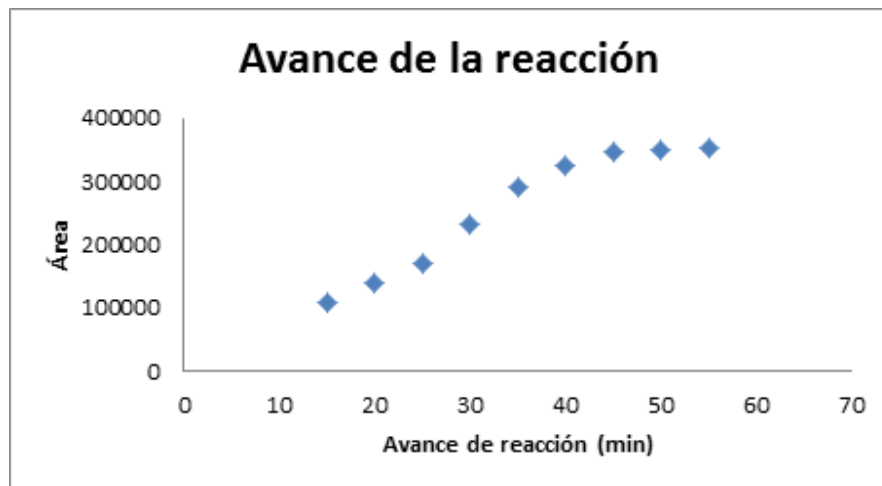


Figura 29. Avance de la reacción de derivatización ITF-ESP a 50 °C para los tiempos 15 min, 20 min, 25, min 30 min, 40 min, 45 min, 50 min y 55 min.

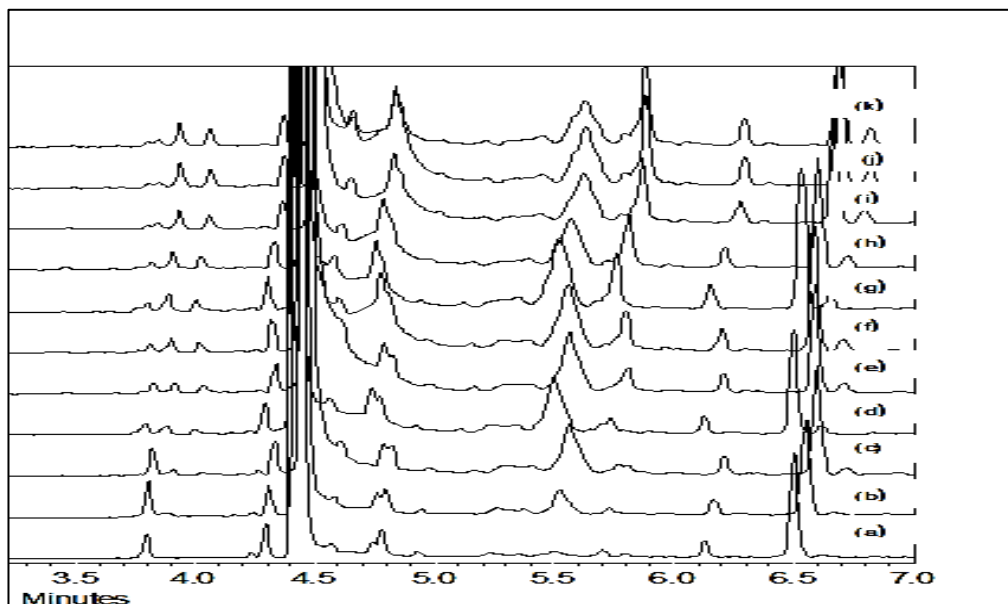


Figura 30. Electroferogramas para el avance de la reacción de derivatización ITF-ESP (5.5 min) a 50°C para los tiempos (a) BCO (b) 15 min, (c) 20 min, (d) 25 min, (e) 30 min, (f) 35 min, (g) 40 min, (h) 45 min, (i) 50 min y (k) 55 min (de abajo hacia arriba).

El perfil a 50 °C mostró que se obtiene un avance de reacción muy diferente al obtenido a 25 °C, este reveló que a partir del tiempo 40 min, la reacción produce una tendencia. Los datos mostraron que el aumento en la temperatura catalizó la reacción de derivatización y generó un comportamiento muy diferente, (Figs. 29 y 30). Se observó que a partir de 40 min el avance de reacción trazó una tendencia constante lo cual, se aprovechó para establecer las condiciones de reacción, las cuales fueron 50 °C y 50 min.

8.4. Mejora del sistema electroforético

Se probaron diferentes soluciones amortiguadoras de corrida utilizando las condiciones iniciales del sistema electroforético (7.6) con la finalidad de mejorar la señal del ITF-ESP. Los buffers utilizados en este estudio fueron:

- Ácido bórico (H_3BO_3): 30 mM, 60 mM y 90 mM.
- Carbonato de sodio ($NaCO_3$): 40 mM y 50 mM.
- Tetraborato de sodio ($Na_2B_4O_7$): 30 mM, 40 mM y 50 mM.

8.4.1. Ácido bórico

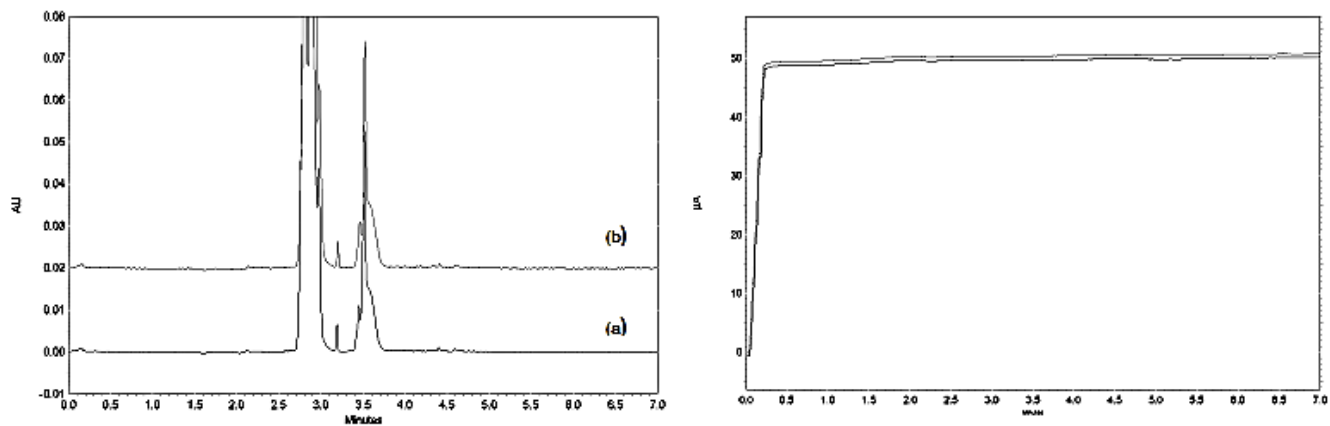


Figura 31. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 30 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

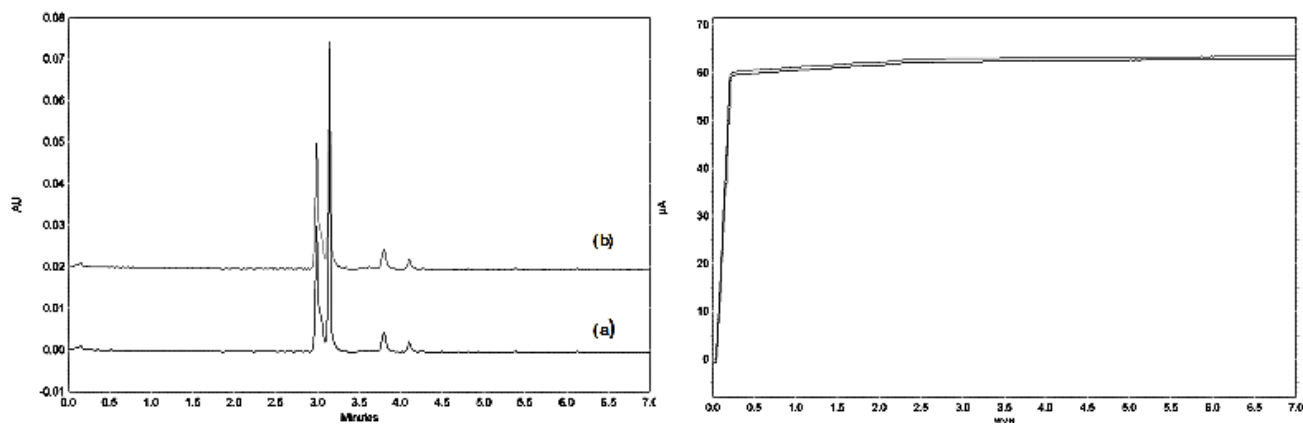


Figura 32. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 60 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

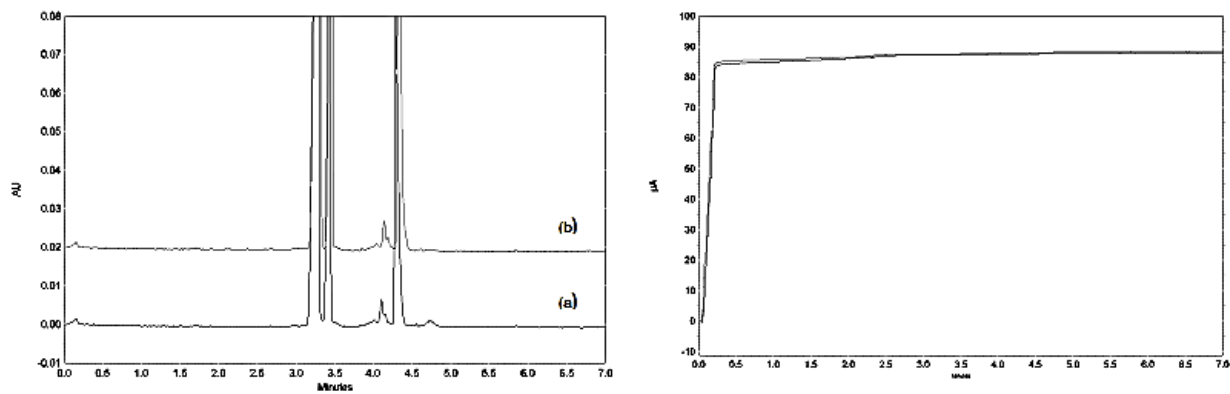


Figura 33. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 90 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

Al comparar el BCO y el sistema ITF-ESP (Figs. 31, 32 y 33) se observó que el ácido bórico no pudo separar el ITF-ESP de los demás componentes de la reacción de derivatización. Los tiempos de migración y la corriente en comparación al sistema original de tetraborato de sodio son menores indicando una fuerza iónica menor.

8.4.2. Carbonato de sodio

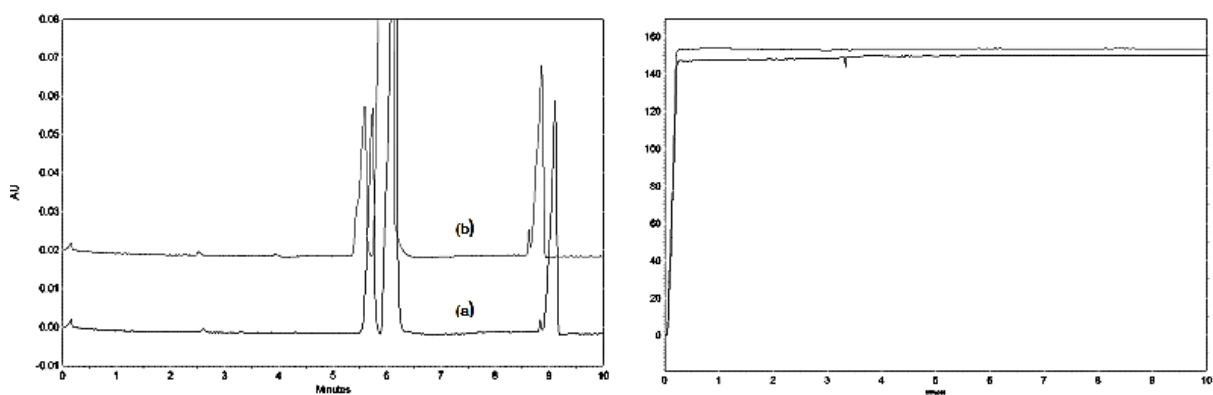


Figura 34. Electroferograma y gráfico de la corriente para carbonato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

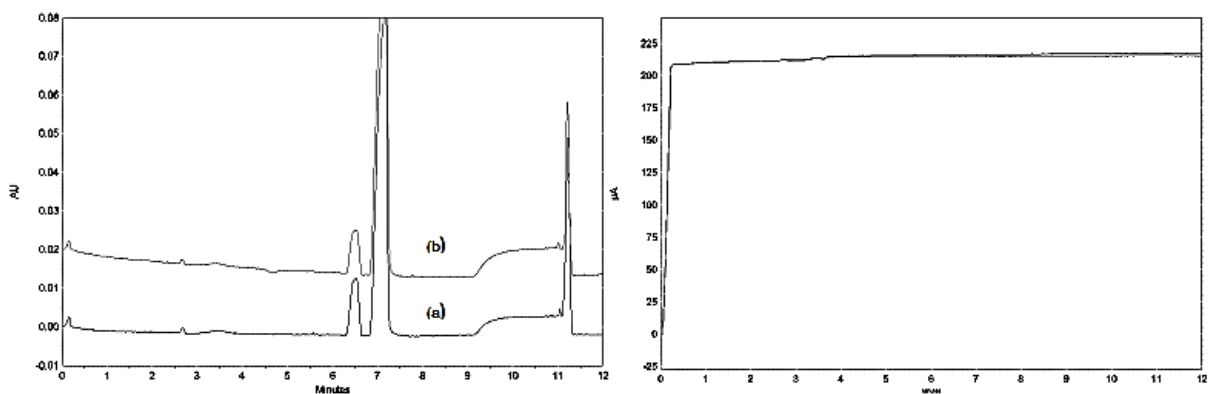


Figura 35. . Electroferograma y gráfico de la corriente para carbonato de sodio 50 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

Al comparar un sistema BCO y el sistema ITF-ESP (Figs. 34 y 35) se determinó que el carbonato de sodio al igual que el ácido bórico no puede separar el IT-ESP, se observó un incremento en la fuerza iónica reflejada en el aumento de los tiempos de migración y la corriente producida por el electrolito soporte. Al aumentar el tiempo de migración de los analitos estos tienen una mayor permanencia en el capilar lo cual produce picos ensanchados debido a la difusión de estos en el electrolito soporte.

El aumento de la corriente genera un incremento de calor dentro del sistema lo cual produce gradientes de temperatura y puede producir la formación de burbujas lo cual provocaría una caída de la corriente. Otro fenómeno producido por el calor de joule es que al crear un aumento de temperatura se producen cambios de viscosidad y estos a su vez producen variación en el tiempo de migración de los analitos.

8.4.3. Tetraborato de sodio

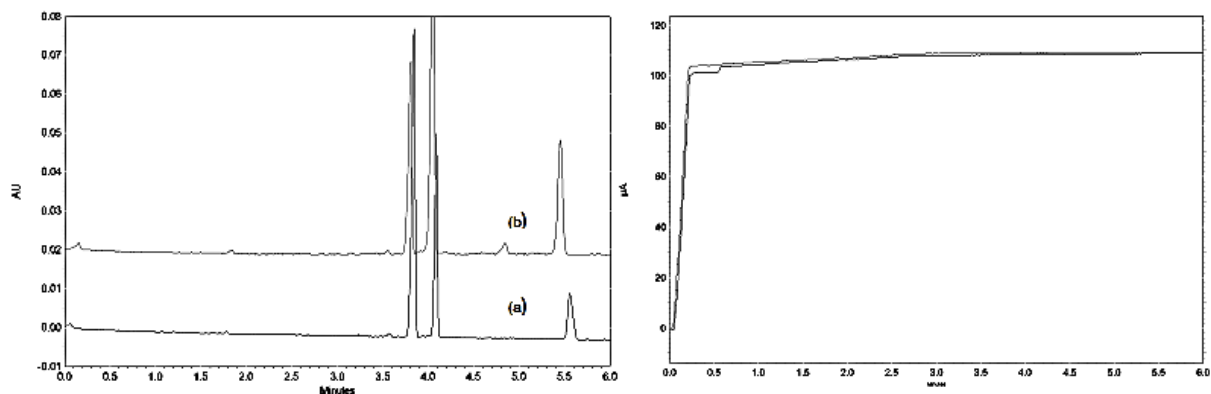


Figura 36. Electroferograma y gráfico de la corriente para tetraborato de sodio 30 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

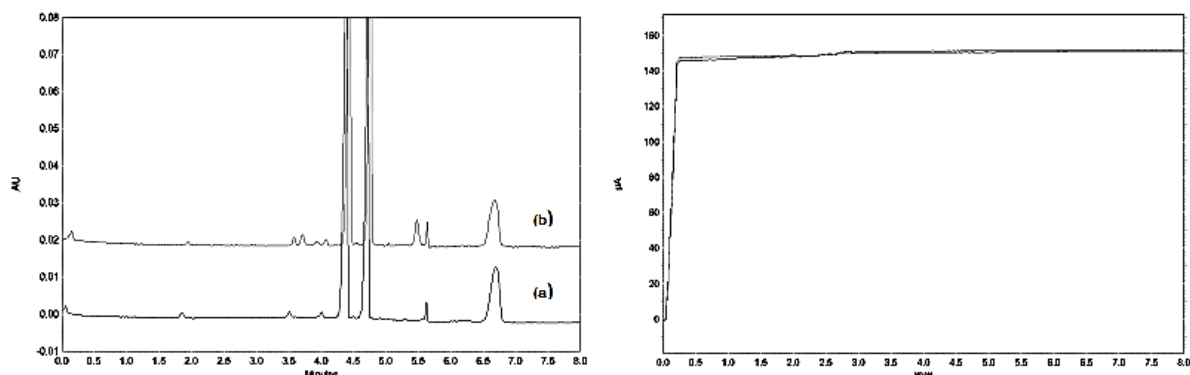


Figura 37. Electroferograma y gráfico de la corriente para tetraborato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

El buffer de tetraborato de sodio tuvo la capacidad de separar la señal ITF-ESP (4.9 min) la cual pudo ser observada al comparar el BCO y el sistema ITF-ESP, (Figs. 36 y 37). El buffer de tetraborato 30 mM produjo un pico ensanchado a diferencia del pico producido por el buffer de tetraborato 40 mM debido a la difusión en el buffer ya que a concentraciones menores es mayor la difusión del analito en el medio conductor. El tetraborato de sodio 40 mM generó un pico más espigado y en adición logró separar dos componentes más (Fig. 37), dicho componente no se pudo observar en el electroferograma del buffer 30 mM. Al aumentar la concentración del tetraborato de sodio se presentaron los mismos inconvenientes que el carbonato de sodio por lo cual se decidió no aumentar la concentración del buffer de tetraboratos.

Se ha observado que ciertos compuestos con grupos OH pueden generar complejos con el tetraborato, en el caso del ITF se cuenta con un grupo OH el cual puede estar interactuando con el tetraborato generando un complejo el cual favorece la separación debido a que la relación carga/masa se modifica (Fig. 38). Esto puede explicar porque el tetraborato tuvo la facultad de separar el compuesto ITF-ESP. Las señales del ITF se resolvieron utilizando tetraborato de sodio a diferencia de las señales ITF obtenidas con los demás buffers utilizados. Esto apoya a la idea de la formación de complejos OH-Tetraboratos. Debido a todo lo

anterior el buffer más adecuado para el sistema electroforético así como la concentración del mismo es tetraborato de sodio 40 mM.

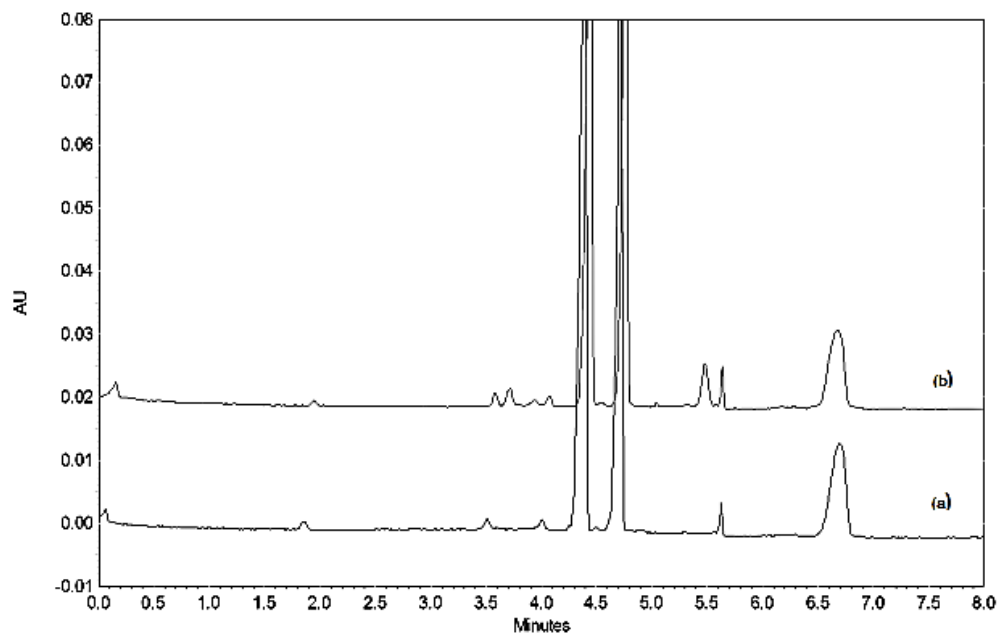


Figura 38. . Electroferograma para tetraborato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).

8.5. Selección de pH de trabajo

El pH juega un papel importante dentro de la electroforesis capilar ya que este determina las estructuras de los compuestos a separar, y tiene un papel crucial en el flujo electrosmótico. Se estudiaron diferentes pH's con el fin de encontrar un pH de trabajo que mejore la separación del ITF-ESP.

Los pH's de trabajo estudiados fueron:

- pH 8.00
- pH 9.20
- pH 9.25
- pH 9.30

- pH 9.35

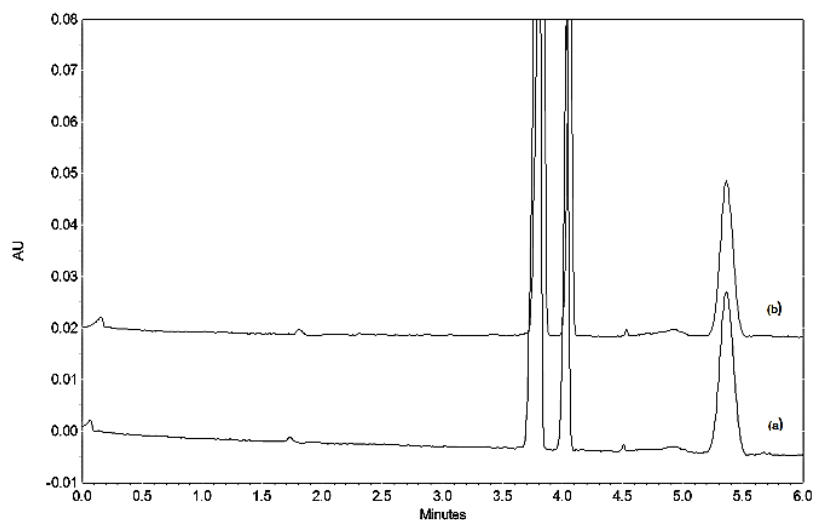


Figura 39. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 8.00 BCO (a) e ITF-ESP (b).

El derivado ITF-ESP no se puede observar al comparar el sistema BCO con el sistema ITF-ESP (Fig. 39). La literatura recomienda realizar las reacciones de derivatización a pH superiores a 9.00.¹³ Particularmente se tiene la idea de que la reacción de derivatización se lleva a cabo sin problema ya que el grupo amino involucrado a pH 8.00 posee la estructura adecuada para la reacción de derivatización, no obstante puede que los complejos OH-Tetraboratos antes mencionados no se formaran y por ende no se lograra separar el ITF-ESP del ITF.

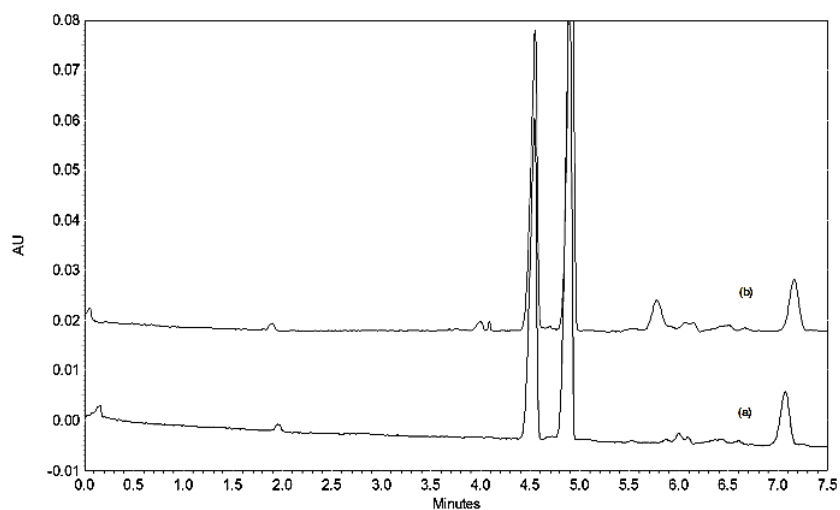


Figura 40. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.20 BCO (a) e ITF-ESP (b).

A pH 9.20 el derivado ITF-ESP pudo diferenciarse entre los electroferogramas a y b (Fig. 40) siendo un pico ancho.

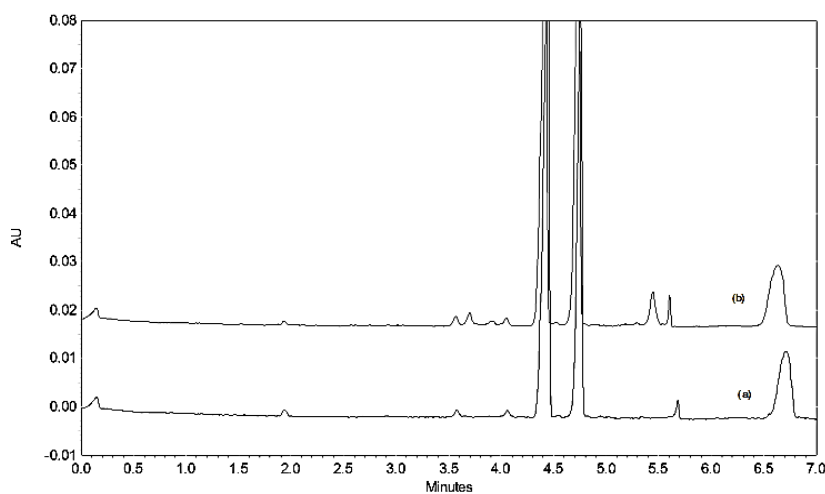


Figura 41. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.25 BCO (a) e ITF-ESP (b).

El electroferograma b (Fig. 41) mostró un pico más simétrico y gaussiano para el ITF-ESP que el observado a pH 9.20, así como para el pico adyacente al ITF-ESP (TM 5.7 min.) y una mejor resolución.

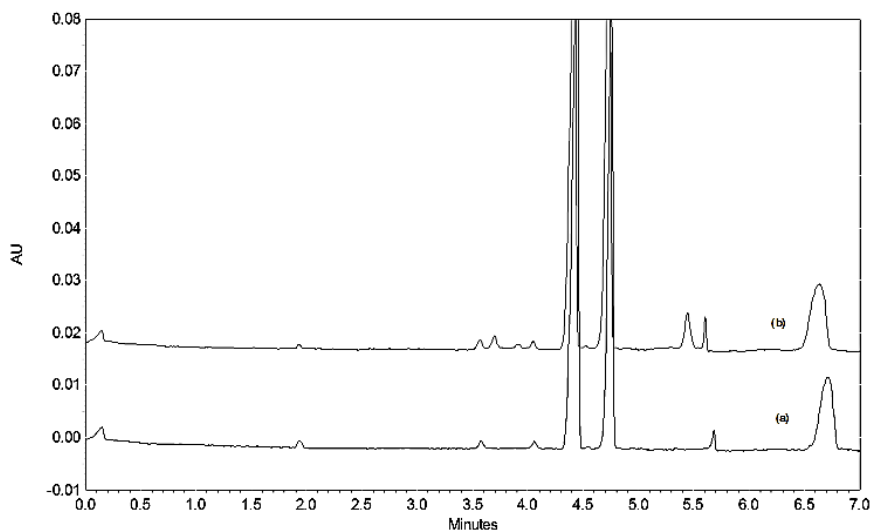


Figura 42. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.30 BCO (a) e ITF-ESP (b).

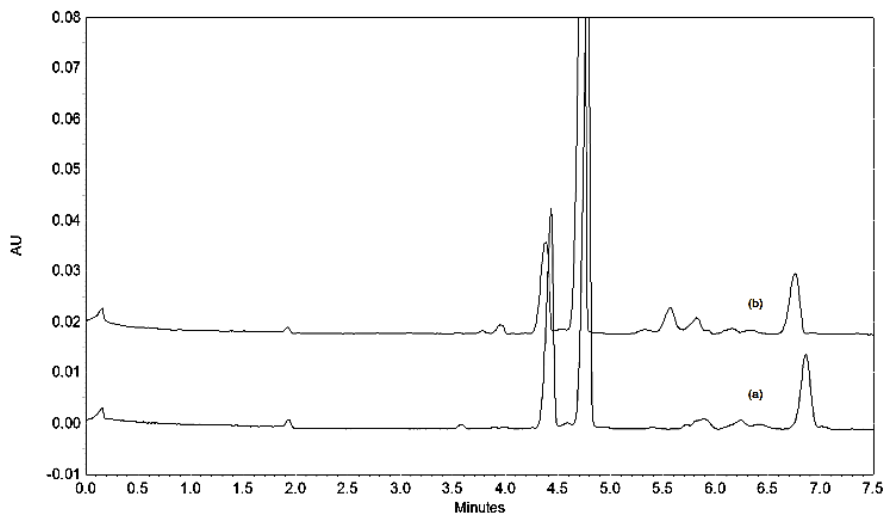


Figura 43. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.35 BCO (a) e ITF-ESP (b).

No se observaron diferencias para las señales ITF, ITF-ESP y demás en los electroferogramas pH 9.25 y 9.30 (Figs. 42 y 43) no obstante, el electroferograma pH 9.35 mostró un ensanchamiento de los picos para el ITF-ESP así como para el pico adyacente (TM 5.7 min).

Con la información anterior se descubrió que el pH juega un papel de capital importancia en el sistema electroforético y se establece el pH 9.25 como el óptimo para SAC.

8.6. Inyección

El volumen de inyección es un aspecto de suma importancia en las técnicas de separación ya que con un volumen de inyección adecuado se puede mejorar o empeorar el electroferograma. Un volumen grande de inyección produce un límite de detección y cuantificación bajos teniendo como desventaja la posible saturación del capilar la cual deformara los picos presentes en el electroferograma perdiendo resolución entre las especies debido al traslape de las mismas, por otro lado un volumen pequeño genera señales que pueden confundirse con el ruido del equipo.

La electroforesis capilar tiene con dos mecanismos de inyección ambos se probaron.

- Hidrodinámico.
- Electrocinético.

El primero (Fig. 44) se basa en la aplicación de una fuerza impulsora (presión) la cual puede ser positiva o negativa (vacío), de esta manera se logra introducir un volumen al capilar. Existe otro mecanismo hidrodinámico el cual se basa en las diferencias de presión, generado por una diferencia de alturas (efecto sifón) el cual es menos utilizado por su baja reproducibilidad.

El mecanismo electrocinético (Fig. 45) se basa en las propiedades eléctricas de la muestra, en donde las especies iónicas son introducidas mediante la aplicación de un voltaje. Este mecanismo tiene el inconveniente de que las especies no son introducidas de manera homogénea ya que depende de la polaridad utilizada.

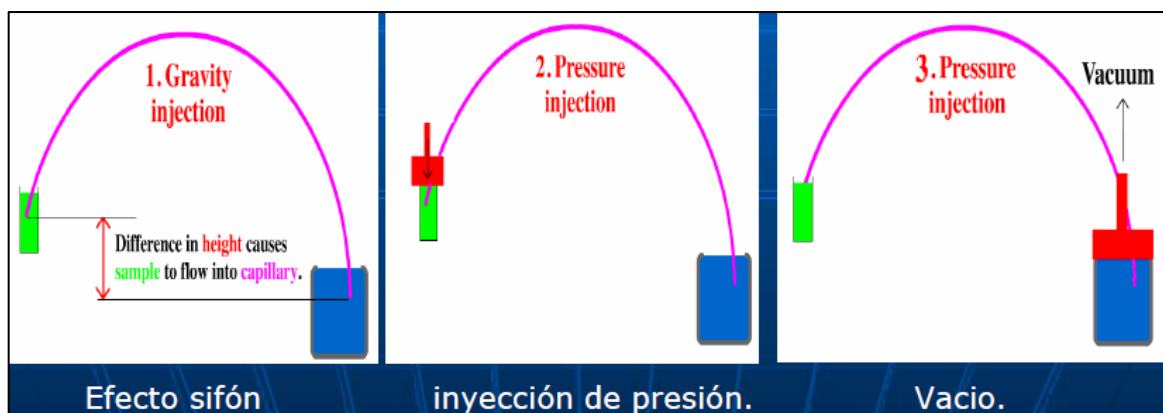


Figura 44. Inyección hidrodinámica.

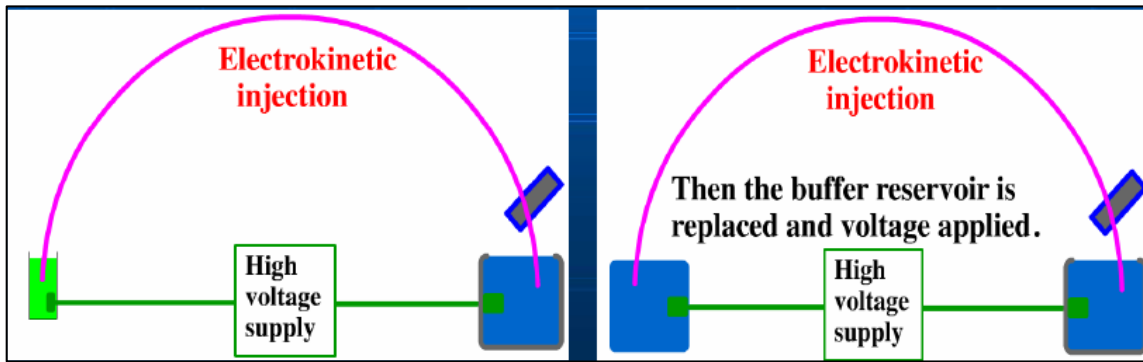


Figura 45. Inyección electrocinética.

La inyección más común es la hidrodinámica por presión ya que produce inyecciones reproducibles. Existen dos variables dentro de la inyección hidrodinámica las cuales son la presión y el tiempo, ambas fueron probadas con el fin de mejorar la forma del pico ITF-ESP.

8.6.1. Presión

La presión se estudió fijando un tiempo de inyección el cual fue de 5 seg. Las presiones en estudio fueron:

- 0.5 psi.
- 1.0 psi.
- 1.5 psi.

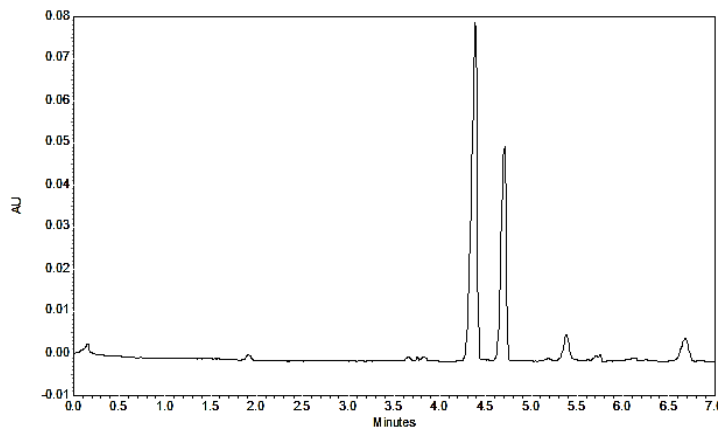


Figura 46. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 5 seg.

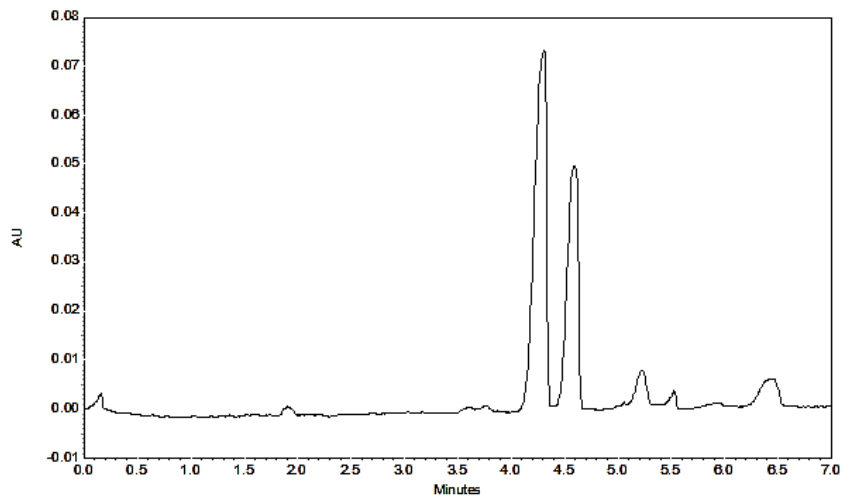


Figura 47. Electroferograma para una inyección 1 psi y 5 seg.

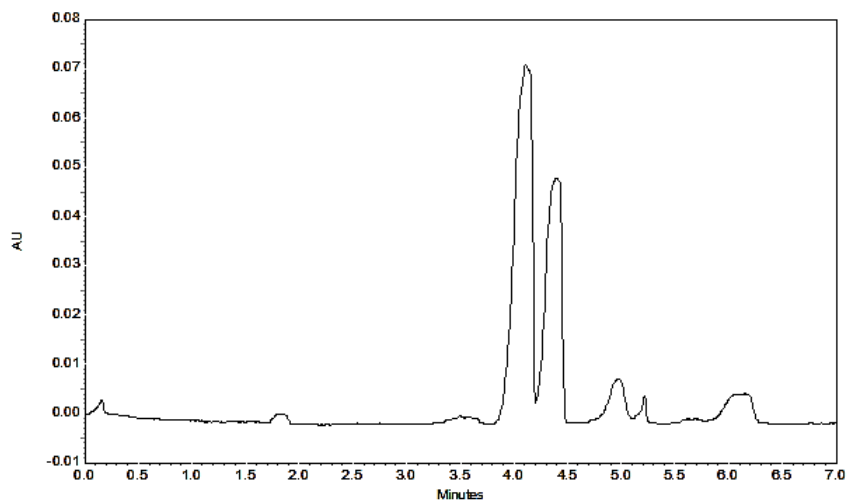


Figura 48. Electroferograma para una inyección 1.5 psi y 5 seg.

El incremento de la presión de inyección produjo un ensanchamiento de todos los picos (Figs. 46, 47 y 48) lo cual produjo pérdida en la simetría y resolución del mismo. La mejor presión de trabajo resulto ser 0.5 psi.

8.6.2. Tiempo

Se fijó una presión de trabajo de 0.5 psi y se varió el tiempo de inyección, los tiempos de inyección realizados fueron:

- 3 seg.
- 7 seg.
- 9 seg.

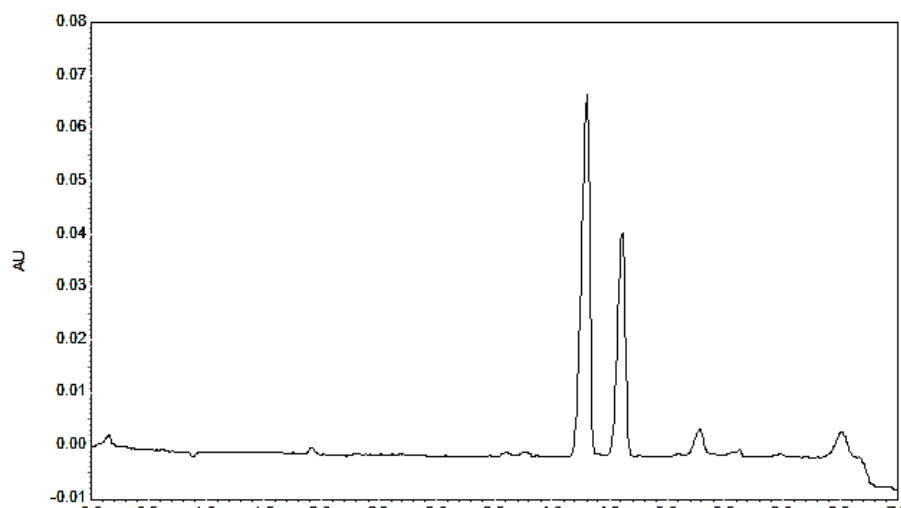


Figura 49. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 3 seg.

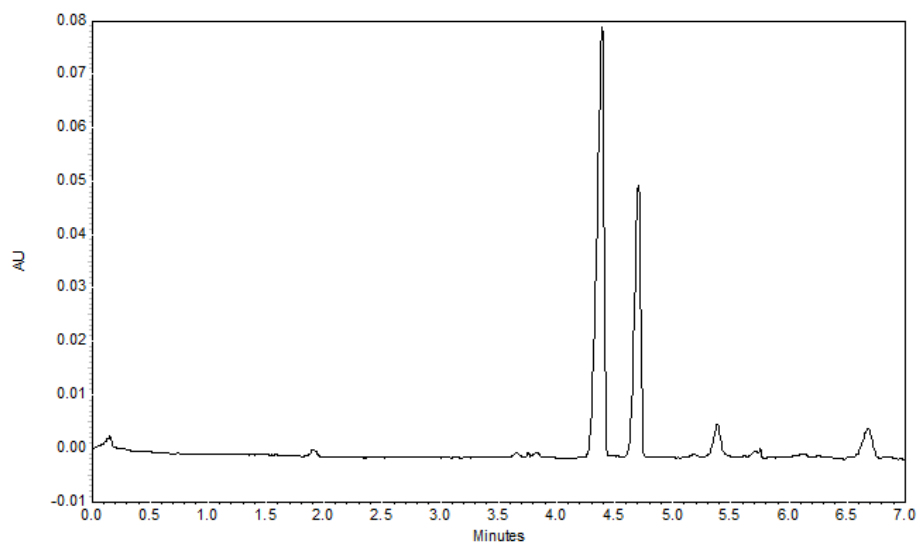


Figura 50. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 7 seg.

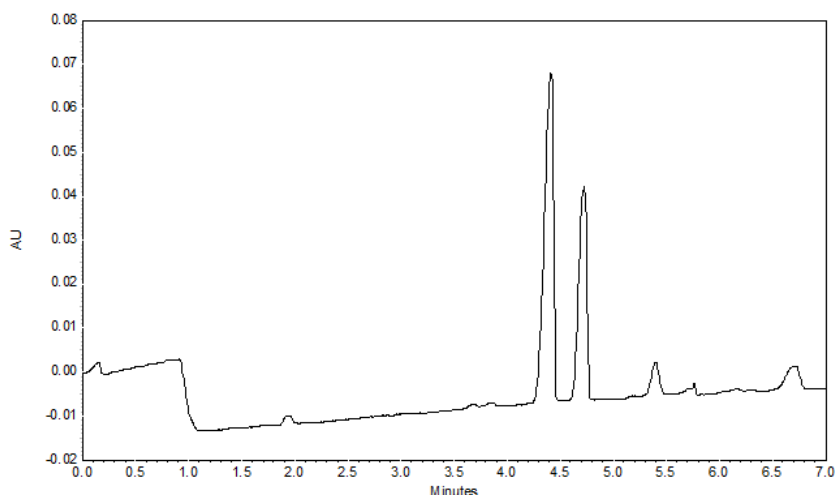


Figura 51. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 9 seg.

El tiempo de inyección no produjo un ensanchamiento considerable en los picos (Figs. 49 y 50) sin embargo el volumen de inyección introducido con 0.5 psi y 9 seg (Fig. 51) produjo una fluctuación en la línea base. Las condiciones finales de la inyección en presión y tiempo se establecieron como 0.5 psi y 5 seg (Figura 46). Al aumentar el tiempo y la presión no se logró mejorar la forma del pico y no se consiguió un aumento de este mismo. Las condiciones del sistema electroforético finales establecidas para la separación del derivado ITF-ESP (Tab. 9) fueron:

Tabla 9. Condiciones electroforéticas para la reacción de derivatización en matriz.

Condiciones electroforéticas	
Longitud total (cm)	34
Longitud efectiva (cm)	22.5
Diámetro interno (μm)	75
Material	Sílice fundida
Temperatura del capilar ($^{\circ}\text{C}$) durante el análisis	20
Buffer de corrida	Ácido bórico, carbonato de sodio o tetraborato de sodio 40mM pH 9.25
Voltaje (KV)	20
Tipo de inyección	Hidrodinámica
Parámetros de inyección (presión: tiempo)	0.5 psi:5 seg
Longitud de onda fluorescencia. (nm)	Ext: 488 Emi: 510

Se implementó el uso de un DFIL para observar el derivado ITF-ESP (4.8 mg/L) ya que las muestras reales poseen ESP a nivel de trazas (Fig. 52)

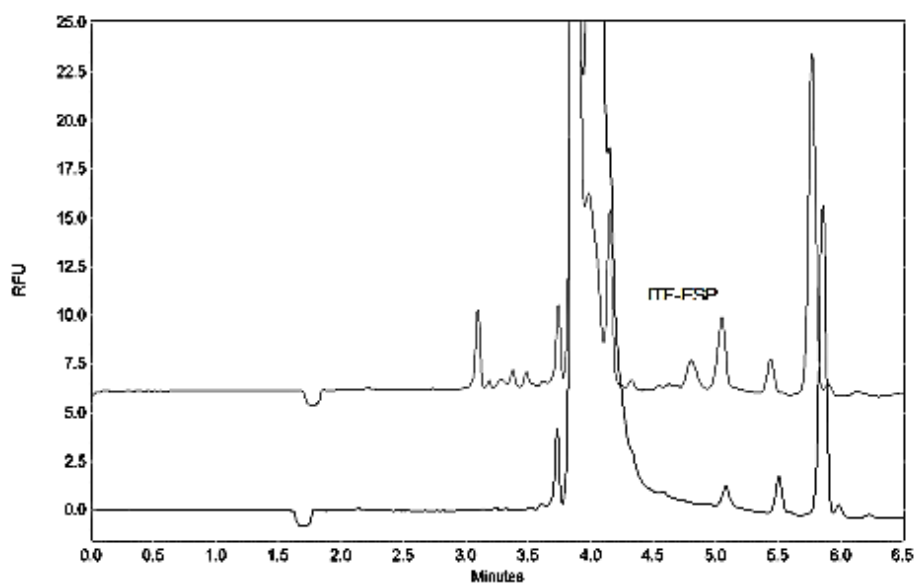


Figura 52. Electroferograma adquirido con DFIL.

8.7. Estándar interno

El uso del estándar interno es frecuentemente utilizado en EC debido a la baja reproducibilidad de la inyección. En matrices complejas se implementa el uso de estándar interno con el fin de reducir la variabilidad al momento de cuantificar los analitos de interés.

Se probaron los siguientes analitos los cuales comparten similitudes estructurales, el estándar interno al igual que el analito debió ser derivatizado para conferirle la propiedad de fluorescencia.

8.7.1. 1(1Adamantil)etilamina (ADM)

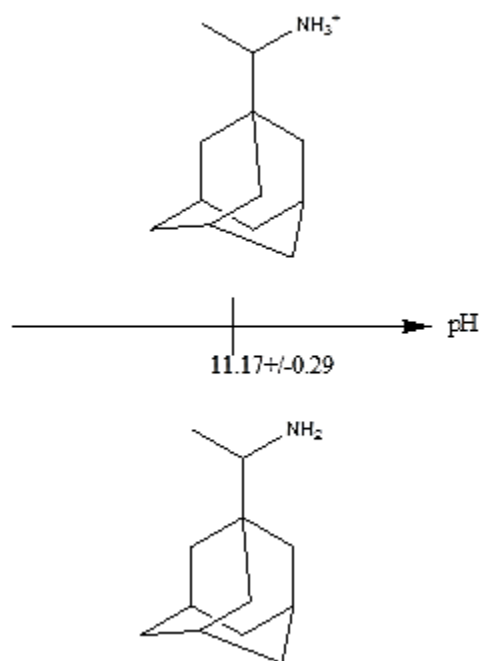


Figura 53. Escala de pka para ADM.

La estructura del ADM (Fig. 53) fue idónea para la reacción de derivatización ya que el grupo amino fue de tipo primario.

La estructura correspondiente a la reacción de derivatización del (ITF-ADM) a las condiciones de derivatización es la siguiente.

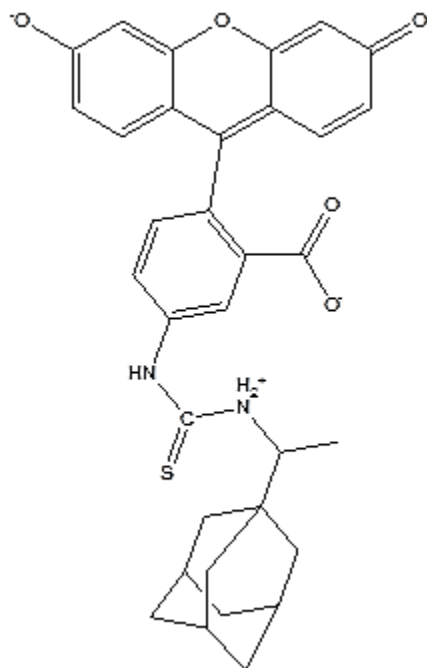


Figura 54. Estructura del producto de reacción de derivatización del ITF-ADM.

El ITF-ADM posee una carga neta 1- (Fig. 54) lo que indica que este analito debe migrar antes que el ITF-ESP el cual posee una carga neta de 2- el peso molecular es un factor pero no es tan relevante ya que la carga tiene mayor influencia en determinar la movilidad electroforética, adicionalmente ambos analitos, ADM y ESP poseen pesos moleculares similares.

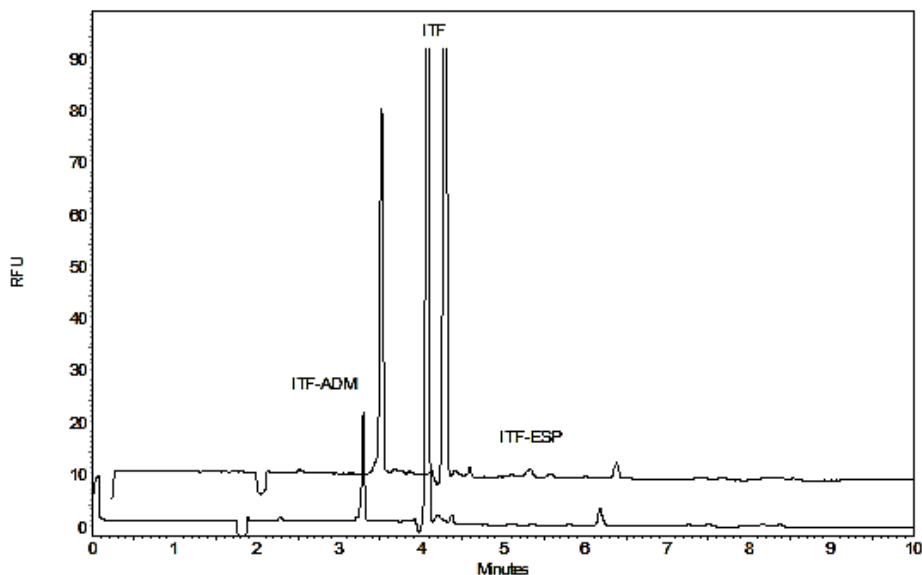


Figura 55. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-AMD (TM 3.4 min.) e ITF-ESP (TM 5.4 min.).

Como se predijo el ITF-ADM migró antes que el ITF-ESP (Fig. 55). No se presentaron problemas de traslape de señales en la región del ITF-ADM lo cual lo convirtió en un candidato para estándar interno.

8.7.2. DL-Metionina (DLM)

Esta molécula posee una estructura de amina primaria (Fig. 56) lo cual facilitó la reacción de derivatización.

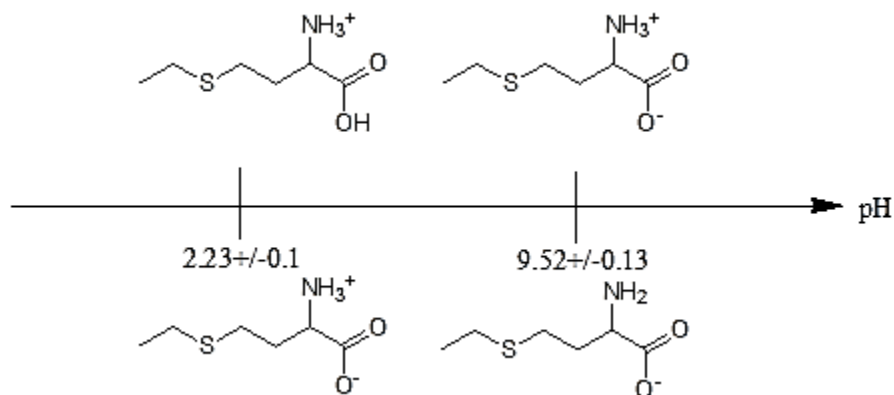


Figura 56. Escala de pka para DLM.

La estructura para el producto de reacción de derivatización ITF-DLM a las condiciones de trabajo fue la siguiente.

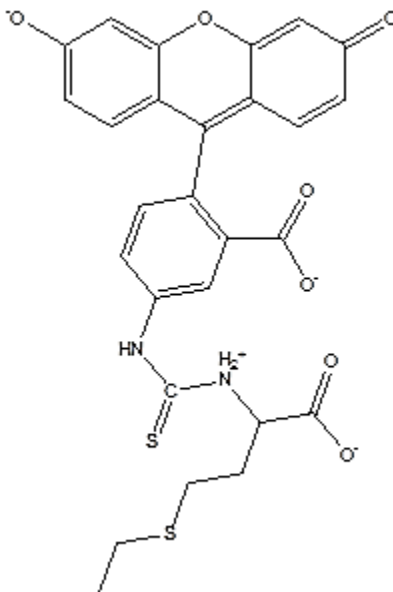


Figura 57. Estructura para el ITF-DLM.

La carga total para el ITF-DLM (Fig. 57) es de 2- la cual es la misma carga total para el ITF-ESP lo cual indica que las movilidades electroforéticas serán similares para ambos únicamente diferenciados por el peso molecular y la forma de la molécula. El peso molecular del ITF-DLM es menor lo que genera una movilidad electroforética mayor y por ende ese pico migró después que el ITF-ESP.

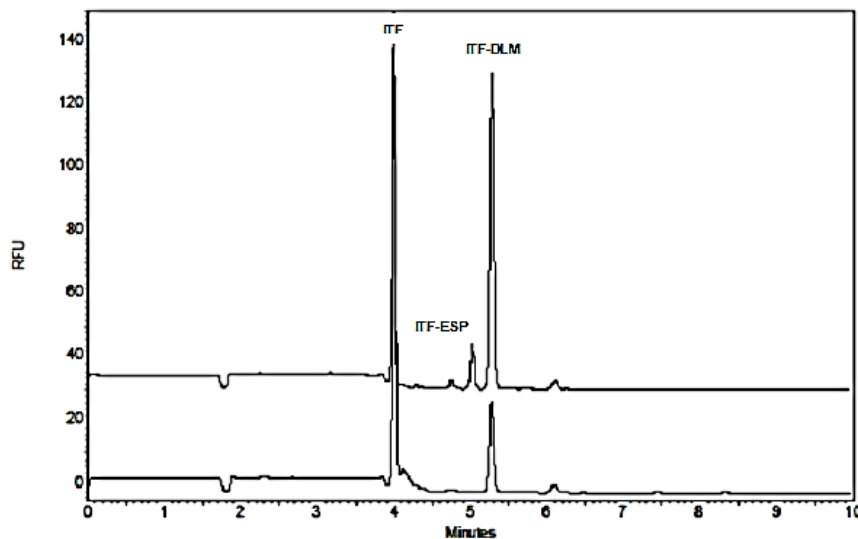


Figura 58. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-DLM (TM 5.3 min.) e ITF-ESP (TM 5.1 min.).

Como se predijo el ITF-DLM migró después que el ITF-ESP (Fig. 58). Las movilidades electroforéticas fueron muy similares como se indicó, se pudo notar que la propiedad que tiene mayor impacto en la movilidad electroforética es la carga.

8.7.3. L-2-Ácido aminobutírico (AAB)

El AAB posee un grupo amino primario (Fig. 59) lo cual facilitó la reacción de derivatización con el ITF. La siguiente escala de pH muestra las especies existentes para AAB.

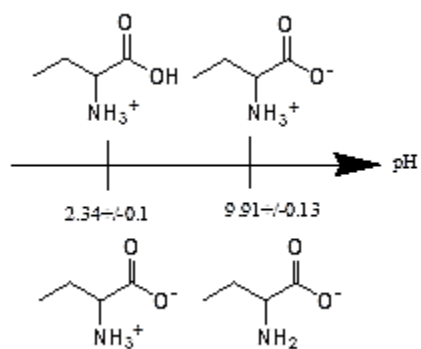


Figura 59. Escala de pka para AAB.

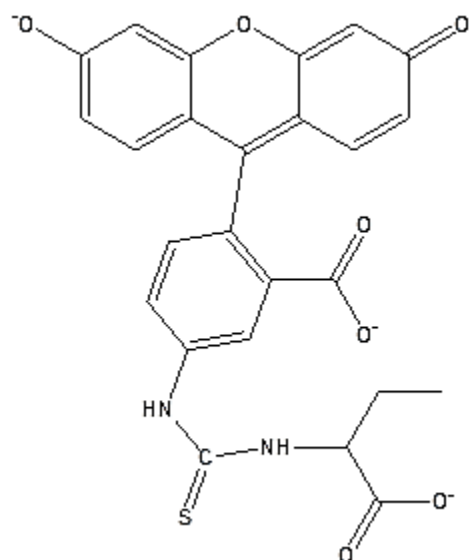


Figura 60. Estructura para el ITF-AAB.

La estructura resultante para el producto de reacción ITF-AAB (Fig. 60) posee tres cargas negativas por lo cual se esperó que la señal para dicho analito migrara después del ITF-ESP. El electroferograma (Fig. 61) mostró que esta predicción fue correcta.

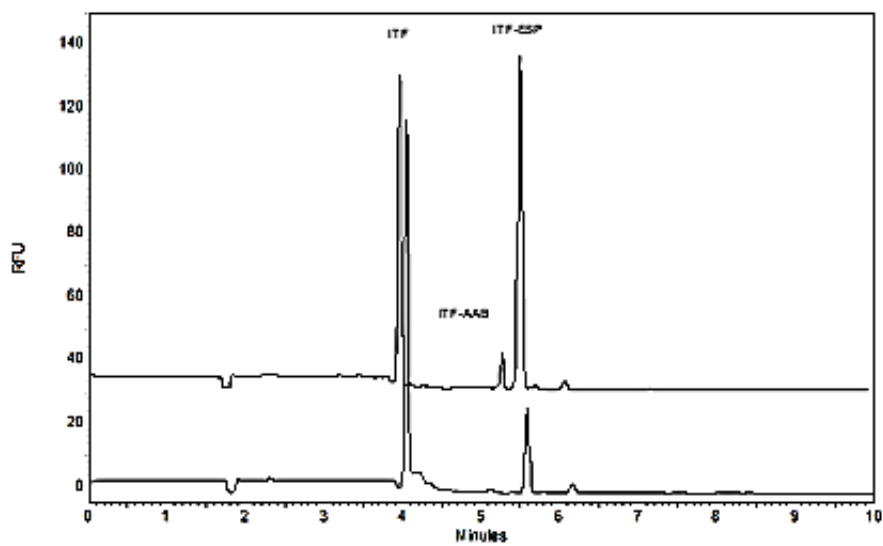


Figura 61. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-AAB (TM 5.6 min.) e ITF-ESP (TM 5.3 min.).

Las reacciones de derivatización entre los posibles estándares internos y la ESP no son igualmente cuantitativas, las reacciones de derivatización de los posibles estándares internos fueron más cuantitativas a las condiciones de reacción establecidas para la ESP, esto pudo explicarse por las estructuras. Las estructuras de los estándares internos fueron aminas primarias, la ESP posee sistemas amino secundarias, al tener una amina disustituida hay un cierto impedimento estérico que dificultó la reacción de derivatización. Una amina primaria no presenta este inconveniente al momento de la derivatización.

La estructura del AAB es la más parecida a la ESP y consecuentemente mostró una migración electroforética similar, sin embargo dicha migración fue lo suficientemente distinta para resolver ambas estructuras. El AAB se eligió como estándar interno.

8.8. Reacción de derivatización en muestras reales

Para conocer el comportamiento de los estándares en una muestra real se realizaron las reacciones de derivatización utilizando placebos y placebos cargados. Los placebos obtenidos fueron para los quesos frescos (Canasto y Crema). La reacción de derivatización se llevó a cabo, utilizando las mismas condiciones usadas en los estándares.

Los placebos preparados fueron los siguientes:

- Blanco (BCO).
- Placebo cargado ESP 0.05 % ESP (PC0.05)
- Placebo al 0.1% ESP (PC0.1).

Se realizó la derivatización con muestras comerciales de queso canasta y quesos maduros (Provolone y Gran Padano) y muestra cargada con exceso de AAB Y ESP.

- Muestra comercial A (MCA).
- Muestra comercial B (MCB).
- Muestra comercial Provolone (MCP).
- Muestra comercial Gran Padano (MCGP).
- Muestra comercial fortificada con AAB y ESP (MCF).

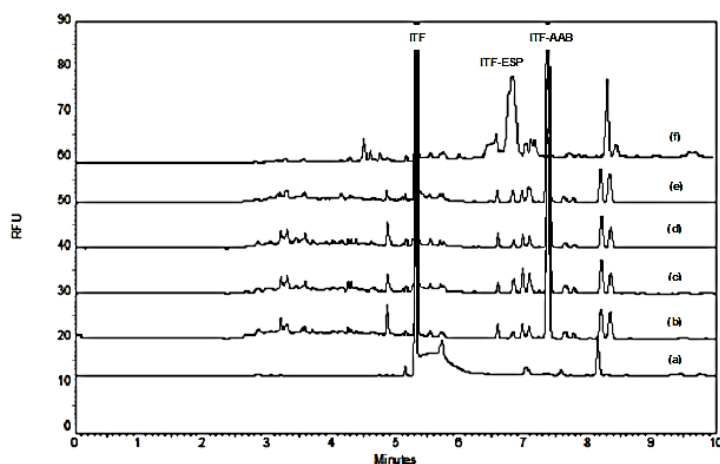


Figura 62. Electroferograma con los productos de reacción ITF-AAB (TM 7.4 min) e ITF-ESP (6.8 min.) para BCO (a), PC0.05 (b), PC0.1 (c), MCA (d) y MCB (e) e MCF (f).

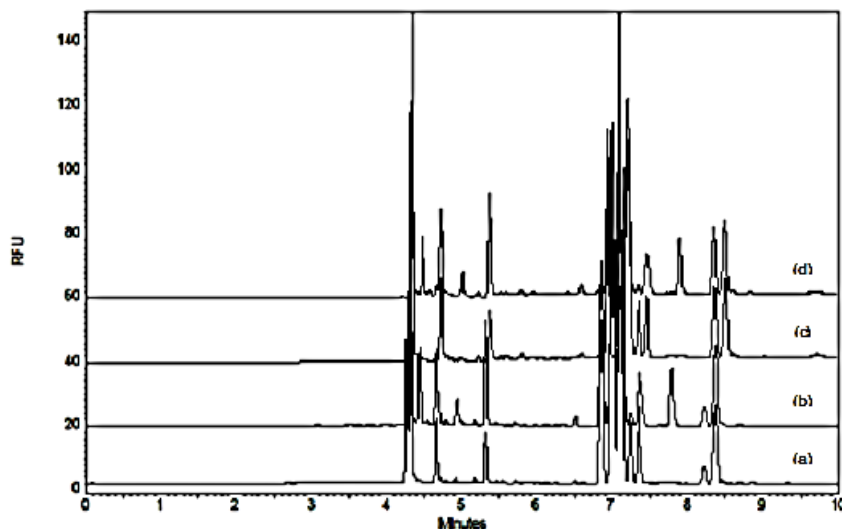


Figura 63. Electroferograma con los productos de reacción ITF-AAB (TM 7.8 min) e ITF-ESP (5.4 min.) para MCP (a), MCPF (b), MCGP (c), MCGPF (d).

Los electroferogramas de las muestras de quesos frescos (Fig. 62) mostraron el producto de reacción ITF-ESP el cual tiene un tiempo de migración de 6.8 min y se confirmó su identidad mediante el electroferograma (f) el cual es un sistema de reacción con ESP en exceso que produjo una señal analítica evidente. El producto de la reacción de derivatización ITF-AAB produjo una señal intensa con un tiempo de migración de 7.4 min la cual fue más evidente al comparar el sistema BCO debido a su intensidad y forma característica. No se presentaron problemas entre la reacción de derivatización y los componentes de la matriz, no hubo ningún traslape entre las señales ITF-ESP, ITF-AAB y las demás especies químicas pertenecientes a las muestras.

Las reacciones de derivatización en muestras de quesos maduros (Fig. 63) mostraron un perfil electroforético diferente al presentado por las muestras de quesos frescos, esto debido a la variabilidad en la composición química entre los dos tipos de quesos (frescos y maduros). Se pudo observar la señal analítica del producto de derivatización ITF-ESP el cual tuvo un tiempo de migración de 5.4 min (electroferogramas a y c) la cual se pudo corroborar fortificando las muestras de quesos con ESP produciendo mayor intensidad en la respuesta analítica (electroferogramas b y d). El producto de reacción de derivatización ITF-AAB produjo una señal evidente la cual mostro un tiempo de migración de 7.8 min, la

cual pudo ser identificada ya que solo fue añadida a los sistemas fortificados (electroferogramas b y d) esta derivatización fue menos cuantitativa que en los quesos maduros quizá debido al consumo de derivatizante (ITF) con las especies químicas presentes en la matriz.

8.9. Validación del método analítico

Se realizaron las mediciones especificadas en el apartado 7.7, correspondientes a cada uno de los parámetros de la validación del método analítico desarrollado. Todo esto con la finalidad de demostrar que el método es confiable (Tab. 10) y que cumple con los criterios de aceptación del desempeño para lo que fue creado.

El modelo propuesto fue lineal y se expresa mediante la ecuación $y = mX \pm b$, donde “y” es la propiedad medida, que en para el caso de ésta tesis fue la relación de áreas (área del derivado de espinacina/área del estándar interno), “m” es la pendiente de modelo lineal y “b” es la ordenada al origen (intercepto). Además la validez del modelo propuesto se aseguró mediante el análisis de los residuales y la prueba de ANOVA.

Tabla 10. Validación del método analítico.

Validación del método analítico			
Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado: Relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB	Veredicto
Especificidad	Respuesta debido únicamente al analito de interés	Respuesta debido únicamente al analito de interés	Cumple
Precisión de sistema	% DER \leq 2.0 %	0.1557	Cumple
Precisión intermedia	% DER \leq 2.0 %	0.3935	Cumple
Linealidad del sistema	$r^2 = 0.98$ $y = mx + b$	0.9976 A (ITF-ESP/ITF-AAB) = $(0.0180 \pm 0.0002)([ESP \mu\text{g/L}]) + (0.0097 \pm 0.0011)$	Cumple
Precisión de método	% DER \leq 5.0 %	0.5622	Cumple
Exactitud	$r^2 = 0.98$ $y = mx + b$	0.9973 A (ITF-ESP/ITF-AAB) = $(0.0158 \pm 0.0002)([ESP \mu\text{g/L}]) + (0.0023 \pm 0.0010)$	Cumple
Recobro %	Informativo	100.5433 ± 4.9763	Cumple
LD	Informativo	0.3987 $\mu\text{g/L}$	Cumple
LC	Informativo	1.3291 $\mu\text{g/L}$	Cumple

Especificidad

El método fue específico para la cuantificación de ESP como ITF-ESP, ya que no se observó ninguna otra señal interferente al tiempo de migración de la ESP tanto en sistemas de reacción con estándares de referencia así como en muestras problemas.

Precisión del sistema

El método fue preciso para la cuantificación de ESP ya que produjo un % DER de 0.1557 % que es menor al establecido el cual es \leq 2.0 % (7.7.2).

Precisión intermedia

El método cumplió con el criterio de aceptación para la precisión intermedia ya que (7.7.3) el % DER total fue de 0.3935 % que es menor al límite establecido de que es \leq 2.0%.

Linealidad del sistema

El método fue lineal para la cuantificación de ESP como ITF-ESP en el intervalo de 1.2 – 8.4 µg/L (Fig. 64) obteniendo un coeficiente de determinación r^2 de 0.9976, la dispersión de los residuales no mostró tendencia, probándose que la varianza es homogénea, es decir los datos son homocedástico (Fig. 65) y con un % DER para cada sistema de la curva de calibración menor a 2.0 %, lo cual cumple con el criterio de aceptación (7.7.4).

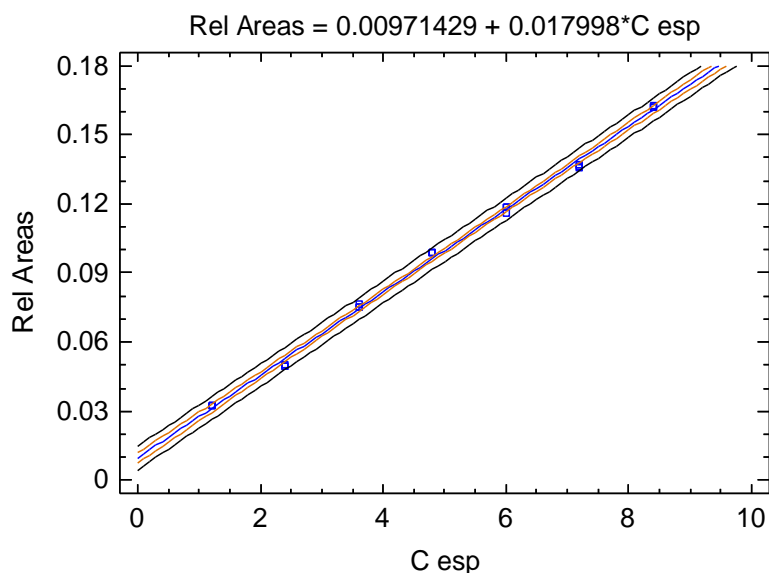


Figura 64. Linealidad del sistema para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.

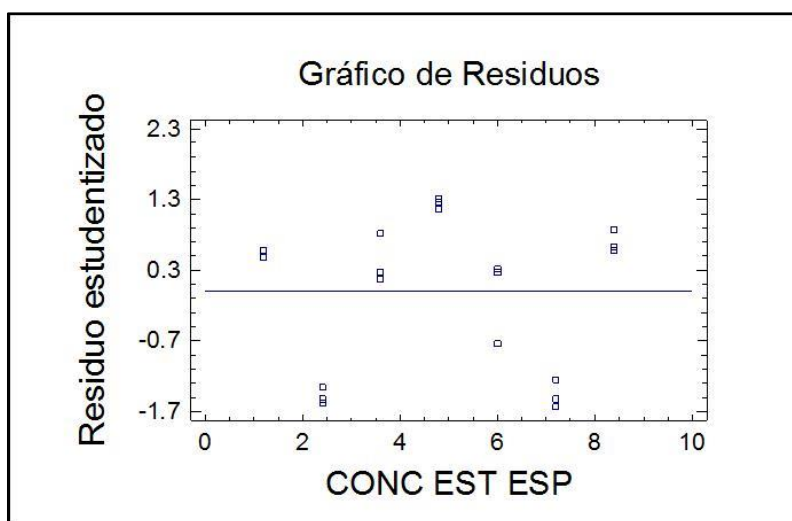


Figura 65. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.

Precisión del método

El método fue preciso para la cuantificación del derivado de ESP en la matriz utilizada, ya que produjo un -% DER de 0.5622 que es menor al límite establecido de $\leq 2.0\%$ (7.7.5).

Linealidad del método

El método fue lineal para la cuantificación de ESP en el intervalo de 1.2 – 8.4 $\mu\text{g/L}$ en la muestra (Fig. 66) obteniendo un coeficiente de determinación r^2 de 0.9973. La dispersión no mostró tendencia, es decir, los residuales son homocedásticos (Fig. 67) y con un % DER para cada sistema de la curva de calibración, menor al 2.0 %, lo cual cumple con el criterio de aceptación (7.7.6). Se obtuvo un recobro global en el rango mencionado de 100.5433 %.

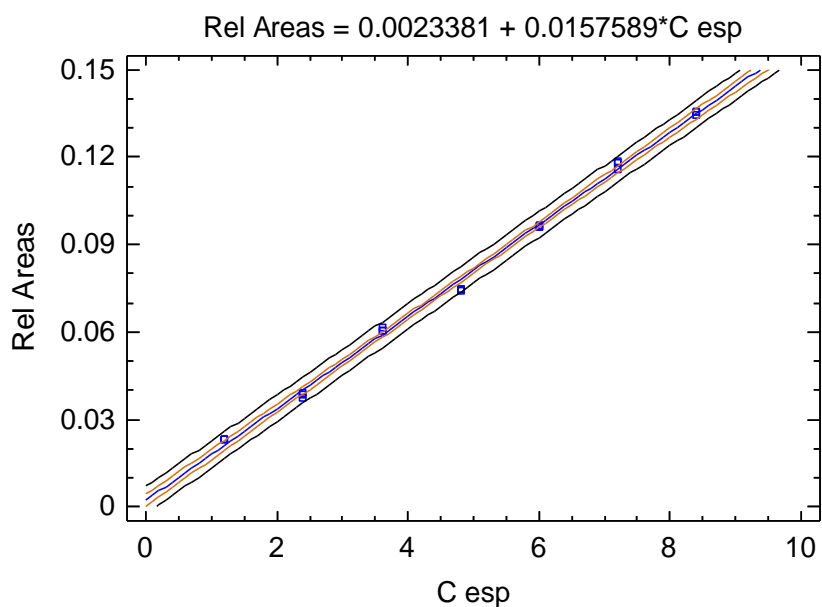


Figura 66. Exactitud para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.

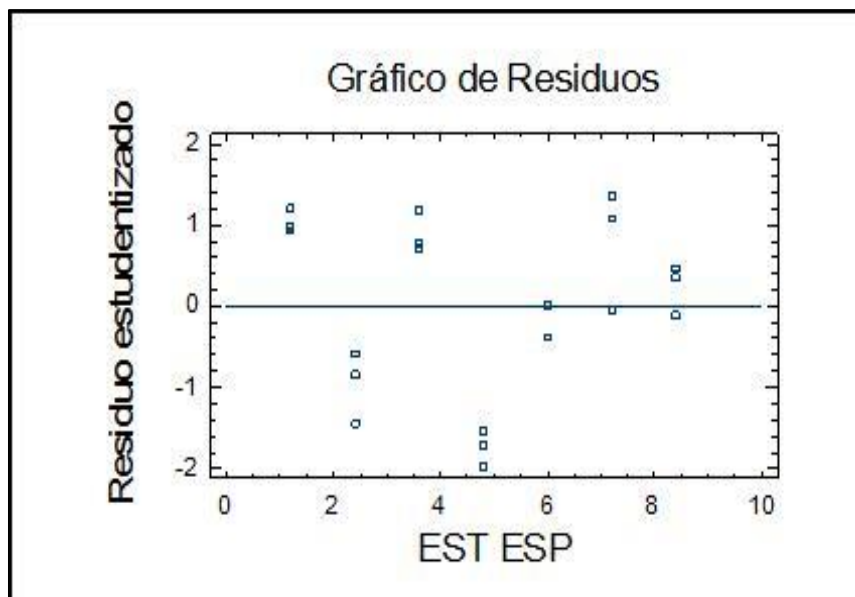


Figura 67. Gráfico de residuales de la exactitud para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.

Límites de detección y cuantificación

El LD fue calculado como se indicó en el apartado 7.7.7, obteniéndose un valor de 0.3987 µg/L así como el LC, el cual fue calculado como se indicó en el apartado 7.7.8, obteniéndose un valor de 1.3291 µg/L.

8.9.1. Estudio del efecto de matriz en las pendientes obtenidas

Se comparan las pendientes obtenidas en los modelos de linealidad del sistema y linealidad del método, con la finalidad de identificar si existe un efecto de matriz en la medición de la serie de estándares cargados con ESP a) preparados en disolvente y b) en placebos.

Para lo anterior se planteó la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_1: m_1 \neq m_2$$

Donde m_1 es la pendiente del modelo obtenido en la linealidad del sistema y m_2 es la pendiente del modelo obtenido en la linealidad del método

Se acepta H_0 si la $t_{exp} < t_{tab,(38) 0.05}$,

Para contrastar la hipótesis se tiene que averiguar si las varianzas de ambas curvas se pueden considerar iguales o no y esto se realiza mediante una prueba F encontrándose que las varianzas pueden ser consideradas iguales, estimándose una varianza promedio $8.24698E-05$. Con esto se calculó la t_{exp} como sigue:

Ecuación 9. Calculo de la t experimental

$$t_{exp} = \frac{m1 - m2}{\sqrt{S_{exp}^2 \left(\frac{1}{\sum x_{i1} - \bar{x}_1} \right) + \left(\frac{1}{\sum x_{i2} - \bar{x}_2} \right)}}$$

Dónde:

$m1 =$ Pendiente de la linealidad del sistema

$m2 =$ Pendiente de la linealidad del método

$S_{exp}^2 =$ Varianza promedio

$$t_{exp} < t_{tab(38)0.05}$$

$1.92 < 2.02$ por lo que se acepta H_0 concluyendo que no hay efecto de matriz por lo que puede cuantificarse tanto en la linealidad de sistema como en linealidad de método.

8.9.2. Muestras comerciales.

Se realizó la cuantificación de FOR para las muestras mencionadas en el apartado 7.7.9, interpolando la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB en la curva de calibración del parámetro de exactitud.

- Queso canasto 0.05 % de formaldehido: 1.1004 mg/100 g FOR en muestra.
- Queso canasto 0.10 % de formaldehido: 2.5323 mg/100 g FOR en muestra.
- Queso canasto MA: 1.1583 mg/100 g FOR en muestra.
- Queso canasto MB: 1.7505 mg/100 g FOR en muestra.

Para la cuantificación de quesos maduros se utilizó la curva de calibración de ITF-ESP sin ITF-AAB ya que la relación de áreas de dichas muestras no pertenece al rango de la curva ITF-ESP/ITF-AAB.

- Queso Provolone: 3.1821 mg/100 g FOR en muestra.
- Queso Gran Padano: 3.2261 mg/100 g FOR en muestra.

9. CONCLUSIONES

Se logró exitosamente desarrollar y validar un método analítico para la determinación de Espinacina en los diferentes tipos de muestras (quesos frescos y quesos maduros) utilizando la técnica de electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser. Esto hará posible la cuantificación del uso de formaldehído en la fabricación de quesos, monitoreando a la espinacina formada.

Durante el desarrollo del método, se logró obtener las condiciones óptimas tanto para el tratamiento de la muestra, como para la reacción de derivatización. El pretratamiento óptimo consistió en una serie sucesiva de precipitación de proteínas, centrifugaciones y filtraciones, para finalmente utilizar una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa que nos permitió obtener una matriz sin interferencias para el derivado fluorescente de la espinacina. Por otro lado, las condiciones óptimas para la formación del derivado fluorescente de la espinacina, fueron 50°C y 50 min. Se observaron variables importantes en el sistema electroforético como el tipo de electrolito de corrida ya que únicamente el buffer de boratos pudo separar el derivado ITF-ESP de las demás especies químicas, el pH también jugó un papel importante mostrando que en solo determinado valor se lograron formar las señales analíticas, se tiene la idea de que a ciertos valores de pH se forman los complejos de boratos y grupos hidroxilo que quizá sean los responsables lograr la separación electroforética. El método de inyección fue evaluado y reveló que la variación en la presión de inyección produjo un ensanchamiento en las señales analíticas, por otro lado el tiempo no produjo dicho comportamiento.

La metodología desarrollada permite cuantificar ESP como ITF-ESP a niveles trazas gracias al uso del DFIL. El tiempo de análisis en la detección del derivado de espinacina por electroforesis capilar fue de 8 min, con lavados de 5 min entre inyecciones. De la misma forma la validación analítica fue satisfactoria ya que se cumplieron con cada uno de los parámetros de validación planteados (especificidad, precisión de sistema, precisión intermedia linealidad del sistema, precisión de método, exactitud, recobro % LD y LC), con lo que se demostró que

el método es confiable para su propósito, por lo que puede ser utilizado como método de rutina para el monitoreo de formaldehído en la fabricación de quesos.

La prueba de hipótesis mostró que no existe un efecto de la matriz en las pendientes obtenidas en el presente estudio.

Las muestras comerciales analizadas en el presente trabajo mostraron que la concentración de FOR son menores a lo permisible en Italia, ninguna de ellas sean quesos frescos o maduros excedió dicho valor. Se observó que los quesos maduros de origen Italiano (Provolone y Gran Padano) poseen mayores cantidades de FOR.

Para la cuantificación de FOR en los quesos maduros se utilizó una curva de calibración sin estándar interno debido a que los cocientes arrojados por ambos derivados (ITF-ESP y ITF-AAB) no pertenecen al rango establecido.

El tiempo estimado para el análisis de una cantidad pequeña de muestras es de aproximadamente 6 h, lo cual muestra que es un método viable para su implementación en la industria.

La determinación de formaldehído es de capital importancia ya que su uso en la industria alimenticia se encuentra regulado por varias organizaciones a nivel mundial.

Finalmente la electroforesis capilar resulta ser un método alternativo y/o complementario de las técnicas tradicionales que se utilizan con mayor frecuencia en los laboratorios de control de calidad.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aidé, Castillo Rodríguez Miriam, Alma Luisa Revilla Vázquez, Raquel López Arellano, y Patricia Rivera García. *Fundamentos de electroforesis capilar*. México: UNAM, 2005.
2. Bachem. «Material Safety Data Sheet. Bachem.» *Bachem website*. 2011. <http://shop.bachem.com/amino-acid-derivatives-resins-linkers-and-reagents/spinacine/f-3665-1.html> (último acceso: 16 de Enero de 2012).
3. Boreisha, I, A Dolzhenko, S Komissarov, y O Yutilov. «Spinacine an Inhibitor of γ -aminobutyric acid uptake.» *Pharmaceutical Chemistry Journal* 22 (1988): 15-17.
4. Cenzano, I. *Los quesos*. Madrid: Antonio Madrid Vicente, Ediciones, 1992.
5. Chamorro, María Concepción. *El análisis sensorial de los quesos*. Mundi-Prensa Libros, 2002.
6. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. *Guía de validación de métodos analíticos*. Distrito Federal: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C., 2002.
7. Couderc, F, E Caussé, y C Bayle. «Drug analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence.» *Electrophoresis* 19 (1998): 2777-2790.
8. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. «Resumen de salud pública formaldehído.» *sitio web de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades*. Julio de 1999. (último acceso: 21 de Agosto de 2012).
9. Federación Panamericana de Lechería. *Aula de productos lacteos*. 26 de Septiembre de 2012. <http://www.redleche.org/index.php?m=203&id=30> (último acceso: 2 de Enero de 2013).

10. Fernández Ruiz, Anagela Adriana. *Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de sibutramina en parches dermatológicos por electroforesis capilar*. Cuautitlán Izcalli: Tesis de Licenciatura QFB UNAM, 2010.
11. Galli, C. L., P. Allevi, D. Colombo, E. Corsini, y P. Marinelli. «Evaluation of the oral toxicity of spinacine hydrochloride in a 13-week study in rats.» *Food and Chemical Toxicology* 27 (1989): 651-656.
12. Haugland, Richard P. *Handbook of fluorescent probes and research products*. United States of America: Molecular Probes Inc., 2002.
13. Invitrogen. «Protocols.» *Invitrogen*. 15 de Octubre de 2012. www.invitrogen/site/us/en/home.html.
14. Jakob P. Ley, Martin G. Peter. «Synthesis of L-Histidine and (-)-Spinacine Chitooligosyl Amides.» *Journal of Carbohydrate Chemistry* 15 (1996): 51-64.
15. Jan Preisler. «Jan Preisler page.» *Jan Preisler page*. 11 de Julio de 2012. bart.chemi.muni.cz/courses/Lab%20CELIF%202012%20ENG.pdf (último acceso: 7 de Septiembre de 2013).
16. La Página del Queso. *Queso canasta: La Página de Bredi Queso*. 27 de Septiembre de 2012. http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Queso/Quesos_del_mundo/Mejico/Que-so_Panela.htm (último acceso: 16 de Marzo de 2013).
17. Lalljie, S. P. D., y Sandra P. «Practical and quantitative aspects in the analysis of FITC and DTAF amino acid derivatives by capillary electrophoresis and LIF detection.» *Chromatographia* 40 (1995): 519-526.
18. Life Technologies. *Life Technologies*. 2014. www.lifetechnologies.com/contents/sfs/manuals/ANZO109%20Rev%200309.pdf (último acceso: 14 de Enero de 2014).

19. Mort, A, y X Wu. «Capillary Electrophoresis with Detection by Laser-Induced Fluorescence.» *The Plant Cell Wall Methods in Molecular Biology* 715 (2011): 93-102.
20. National Toxicology Program. *Report on Carcinogens*. Official monograph, USA Government, 2011.
21. P., Resmini, Pellegrino L., Saracchi S., y Chiodi J. «A sensitive method to determine spinacine-6-carboxy-1,2,3,4-tetrahydroimidazopyridine in ripened cheese by hplc.» *Italian Journal Of Food Science* 1 (1989): 35-44.
22. Pellegrino, L, y Resmini P. «Evaluation of the stable reaction products of histidine with formaldehyde or with other carbonyl compounds in dairy products.» *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 202 (1996): 66-71.
23. Restani, P., P. Campagner, A. Fiecchi, P. Resmini, y C. L. Galli. «Identification of spinacine as the principal reaction product of γ -casein with formaldehyde in cheese.» *Food and chemical toxicology*, 1988: 441-446.
24. Riddick, L, y W Brumley. «Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Enviromental Applications.» *Caillary Electrophoresis Methods and Protocols* 384 (2008): 119-134.
25. Rodriguez, P. *Desarrollo y Validación de una Técnica Analítica por Electroforesis Capilar para Tabletas Efervecetes con Multiactivos*. México Distrito Federal: UNAM, 2007.
26. Secretaria de Salud. «Cofepris.» *Cofepris*. 2010. www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/.../cvfq032011.pdf (último acceso: 18 de Febrero de 2013).
27. Sigmaaldrich. *Sigmaaldrich sitio web*. 2013. www.sigmaaldrich.com (último acceso: 28 de Diciembre de 2013).

28. Skoog, Douglas A., Donald M. West, F. James Holler, y Stanley R. Crouch. *Fundamentos de química analítica*. México Distrito Federal: Cengage Learning, 2010.
29. Smadja, C, I Le Potier, P Chaminade, C Jacquot, J H Trouvin, y H Taverna. «Comparison of On-line Preconcentration Methods for Determination of Derivatized Serotonin by CE–LIF.» *Chromatographia* 58 (2003): 79-85.
30. Springer Remelli, Maurizio. «Synthesis of spinacine and spinacine derivatives: crystal and molecular structures of N π -hydroxymethyl spinacine and N α -methyl spinaceamine.» *Journal of Chemical Crystallography* 27 (1997): 507-513.
31. Swearingen, K, W Loom, B Kehimkar, B Cookson, y N Dovichi. «Quantification of green fluorescent protein in cellular supernatant by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for measurement of cell death.» *Talanta* 81 (2010): 948-953.
32. T, Tabí, Z Lohinai, y M Pálfi. «CE–LIF determination of salivary cadaverine and lysine concentration ratio as an indicator of lysine decarboxylase enzyme activity.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008): 647-651.
33. Unicen. «Unicen Veterinaria.» *sitio web de Unicen Argentina*. 15 de Agosto de 2011. http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/Limpieza_desinfeccion_y_esterilizacion.pdf (último acceso: 09 de Julio de 2013).
34. Universidad Autónoma de Madrid. «Un lugar para la tecnología: Madri+d.» *Madri+d*. 16 de Diciembre de 2013. www.madrimasd.org.
35. Universidad Autónoma Metropolitana UAM-Iztapalapa. «Planta piloto de fermentaciones.» *Departamento de biotecnología*. 16 de Enero de 2013. <http://docencia.izt.uam.mx/sgpe/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>.

36. Validación de Métodos Analíticos. «Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.» *Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo*. 01 de Octubre de 2011. www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf (último acceso: 18 de Febrero de 2013).
37. Virtualplant. Queso: *Virtualplant*. 26 de Septiembre de 2012. http://www.virtualplant.net/vptd/includes/proceso.php?id_proceso=L-02 (último acceso: 24 de Abril de 2013).
38. Wang, S, y L Fan. «Sensitive Analysis of 5-(4,6-Dichloro-s-triazin-2-ylamino)fluorescein-Labeled Catecholamines by Mixed ME.» *Chromatographia* 72 (2010): 1121-1128.
39. Wiley, Klutchko. «4,5,6,7-Tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acids (spinacines).» *Journal of Heterocyclic Chemistry* 28 (1991): 97-108.
40. Yang-Wei, Lin, Chiu Tai-Chia, y Chang Huan-Tsung. «Laser-induced fluorescence technique for DNA and proteins separated by capillary electrophoresis.» *Journal of Chromatography B* 793 (2003): 37-48.

11. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del formaldehído.	11
Figura 2. Ácido-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo [4,5-c]-piridina-6-carboxílico (espinacina).....	12
Figura 3. Reacción de la HIS y el FOR la cual produce ESP.	13
Figura 4. Diferentes tipos de quesos.....	14
Figura 5. Queso canasto.	15
Figura 6. Queso doble crema.	16
Figura 7. Queso Grana Padano.	16
Figura 8. Queso Provolone.....	17
Figura 9. Separación electroforética.....	21
Figura 10. Sistema general de electroforesis capilar.....	21
Figura 11. Equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ	22
Figura 12. Diagrama de Jablonski el cual ilustra el proceso de la fluorescencia... 23	
Figura 13. Diagrama para un DFIL.....	24
Figura 14. Estructura de ITF.....	26
Figura 15. Espectro de fluorescencia del ITF (absorción máxima 495 nm y emisión máxima 525 nm).....	26
Figura 16. Formación de una macilla.	34
Figura 17. Filtrado a vacío.....	34
Figura 18. Tubo de centrifuga de teflón conteniendo la muestra tratada.	35
Figura 19. Cartuchos para centrifugación de 10 KDa.....	35
Figura 20. Reacción de derivatización SRD1.	36
Figura 21. Espectros de absorción para las diferentes soluciones.....	46
Figura 22. Reacción de de	47
Figura 23. BCO (a), Sistema 1 (b), Sistema 2 (c), ITF (I) ITF (II) e ITF-ESP (III). .	49
Figura 24. Estructuras para el ITF dentro de la escala de pH.	49
Figura 25. Estructuras para la ESP dentro de la escala de pH.	50
Figura 26. Posible estructura del derivado ITF-ESP.	50

Figura 27. Avance de la reacción de derivatización para ITF-ESP a 25°C para los tiempos 4 h, 5.5 h, 7 h, 8.5 h, 10 h, 11.5 h, 13 h, 14.5 h, y 16 h.....	51
Figura 28. Electroferogramas del avance de la reacción de derivatización para ITF-ESP (4.9 min) a 25 °C para los tiempos 4 h (a), 5.5 h (b), 7 h (c), 8.5 h (d), 10 h (e), 11.5 h (f), 13 h (g), 14.5 h (h), y 16 h (i).	51
Figura 29. Avance de la reacción de derivatización ITF-ESP a 50 °C para los tiempos 15 min, 20 min, 25, min 30 min, 40 min, 45 min, 50 min y 55 min.	52
Figura 30. Electroferogramas para el avance de la reacción de derivatización ITF-ESP (5.5 min) a 50°C para los tiempos (a) BCO (b) 15 min, (c) 20 min, (d) 25 min, (e) 30 min, (f) 35 min, (g) 40 min, (h) 45 min, (i) 50 min y (k) 55 min (de abajo hacia arriba).	53
Figura 31. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 30 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	54
Figura 32. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 60 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	54
Figura 33. Electroferograma y gráfico de la corriente para ácido bórico 90 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	54
Figura 34. Electroferograma y gráfico de la corriente para carbonato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	55
Figura 35. . Electroferograma y gráfico de la corriente para carbonato de sodio 50 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	55
Figura 36. Electroferograma y gráfico de la corriente para tetraborato de sodio 30 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	56
Figura 37. Electroferograma y gráfico de la corriente para tetraborato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	57
Figura 38. . Electroferograma para tetraborato de sodio 40 mM BCO (a) e ITF-ESP (b).	58
Figura 39. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 8.00 BCO (a) e ITF-ESP (b).	59
Figura 40. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.20 BCO (a) e ITF-ESP (b).	59

Figura 41. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.25 BCO (a) e ITF-ESP (b).	60
Figura 42. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.30 BCO (a) e ITF-ESP (b).	60
Figura 43. Electroferograma para tetraborato de sodio 40 Mm, pH 9.35 BCO (a) e ITF-ESP (b).	61
Figura 44. Inyección hidrodinámica.	62
Figura 45. Inyección electrocinética.	63
Figura 46. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 5 seg.	63
Figura 47. Electroferograma para una inyección 1 psi y 5 seg.	64
Figura 48. Electroferograma para una inyección 1.5 psi y 5 seg.	64
Figura 49. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 3 seg.	65
Figura 50. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 7 seg.	65
Figura 51. Electroferograma para una inyección 0.5 psi y 9 seg.	66
Figura 52. Electroferograma adquirido con DFIL.	67
Figura 53. Escala de pka para ADM.	68
Figura 54. Estructura del producto de reacción de derivatización del ITF-ADM.	69
Figura 55. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-AMD (TM 3.4 min.) e ITF-ESP (TM 5.4 min.).	70
Figura 56. Escala de pka para DLM.	70
Figura 57. Estructura para el ITF-DLM.	71
Figura 58. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-DLM (TM 5.3 min.) e ITF-ESP (TM 5.1 min.).	72
Figura 59. Escala de pka para AAB.	73
Figura 60. Estructura para el ITF-AAB.	73
Figura 61. Electroferograma para los productos de derivatización ITF-AAB (TM 5.6 min.) e ITF-ESP (TM 5.3 min.).	74
Figura 62. Electroferograma con los productos de reacción ITF-AAB (TM 7.4 min) e ITF-ESP (6.8 min.) para BCO (a), PC0.05 (b), PC0.1 (c), MCA (d) y MCB (e) e MCF (f).	75

Figura 63. Electroferograma con los productos de reacción ITF-AAB (TM 7.8 min) e ITF-ESP (5.4 min.) para MCP (a), MCPF (b), MCGP (c), MCGPF (d).	76
Figura 64. Linealidad del sistema para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB. ...	79
Figura 65. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.....	79
Figura 66. Exactitud para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.....	80
Figura 67. Gráfico de residuales de la exactitud para la relación de áreas ITF-ESP/ITF-AAB.	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de reacción FOR-CAS para las fracciones de caseínas.....	12
Tabla 2. Clasificación de los quesos con base al Codex Alimentarius.	14
Tabla 3. Parámetros a evaluar de acuerdo con el Colegio Nacional de QFB's.	27
Tabla 4. Condiciones electroforéticas.	37
Tabla 5. Sistemas para la linealidad del sistema.....	41
Tabla 6. Sistemas para la exactitud.	42
Tabla 7. Absorción de las soluciones problemas.	46
Tabla 8. Condiciones iniciales del sistema electroforético.	48
Tabla 9. Condiciones electroforéticas para la reacción de derivatización en matriz.	66
Tabla 10. Validación del método analítico.	78

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Velocidad del analito.....	18
Ecuación 2. Límite de detección.....	43
Ecuación 3. Límite de detección en base a $S y/x$	43
Ecuación 4. Límite de cuantificación.	43
Ecuación 5. Límite de cuantificación en base a $S y/x$	44
Ecuación 6. Porcentaje de proteína removida.....	45
Ecuación 7. Calculo de la t experimental	82

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Precisión de sistema.

Sistema	TM (min) ITF-ESP	ABC ITF- ESP	TM (min) ITF-AAB	ABC ITF-AAB	ABC ITF- ESP / ITF- AAB
1	5.171	440432	5.687	4433095	0.0994
2	5.205	446630	5.696	4482179	0.0996
3	5.183	453199	5.693	4557920	0.0994
4	5.222	450732	5.714	4521081	0.0997
5	5.219	439690	5.706	4419631	0.0995
6	5.171	454901	5.688	4560183	0.0998
7	5.220	441196	5.711	4441345	0.0993
8	5.203	452105	5.694	4540024	0.0996
9	5.177	438695	5.691	4409115	0.0995
10	5.213	441936	5.706	4449635	0.0993
PROM	5.1984	445951.6000	5.6986	4481420.8000	0.0995
DE	0.0209	6279.2957	0.0098	58747.4359	0.0002
DER %	0.4016	1.4081	0.1720	1.3109	0.1557

Precisión intermedia.

Sistema	ABC ITF- ESP	ABC ITF- AAB	ABC ITF- ESP/ITF-AAB
1	443674	4423689	0.1003
2	442160	4380369	0.1009
3	453045	4521379	0.1002
4	433851	4355114	0.0996
5	442526	4436012	0.0998
PROM	443051.2000	4423312.6000	0.1002
DE	6818.6815	63784.0832	0.0005
DER %	1.5390	1.4420	0.5200

Sistema	ABC ITF- ESP	ABC ITF- AAB	ABC ITF- ESP/ITF-AAB
1	446941	4474526	0.0999
2	454702	4532014	0.1003
3	447805	4482441	0.0999
4	460198	4593552	0.1002
5	446614	4478935	0.0997
PROM	451252.0000	4512293.6000	0.1000
DE	5998.1453	51044.5572	0.0002
DER %	1.3292	1.1312	0.2487

Total			
PROM	447151.6000	4467803.1000	0.1001
DE	7438.7982	71871.6992	0.0004
DER %	1.6636	1.6087	0.3935

Linealidad del sistema.

Sistema	Conc. EST-ESP (ppb)	ABC ITF-ESP / A ITF-AAB
1	1.2	0.0323
2	1.2	0.0325
3	1.2	0.0325
4	2.4	0.0501
5	2.4	0.0497
6	2.4	0.0498
7	3.6	0.0763
8	3.6	0.0751
9	3.6	0.0749
10	4.8	0.0986
11	4.8	0.0988
12	4.8	0.0989
13	6	0.1184
14	6	0.1161
15	6	0.1183
16	7.2	0.1362
17	7.2	0.1360
18	7.2	0.1367
19	8.4	0.1621
20	8.4	0.1622
21	8.4	0.1627

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9988
Coefficiente de determinación R ²	0.9976
R ² ajustado	0.9975
Error típico	0.0022
Observaciones	21

	Coefficientes	Error típico
Intercepción	0.0097	0.0011
Variable X 1	0.0180	0.0002

$$y = (m \pm S_m)x + (b \pm S_b)$$

Dónde:

y = Relación de áreas de ESP y AAB

m = Pendiente de la recta

S_m = Desviación estandar de la pendiente

x = Concentracion de ITF – ESP ($\mu\text{g}/\text{L}$)

b = Ordenada al origen

S_b = Desviación estandar de la ordenada al origen

Sustituyendo los valores obtenidos en la linealidad del sistema.

$$A \frac{ITF - ESP}{ITF - AAB} = (0.0180 \pm 0.0002)([ESP \mu/L]) + (0.0097 \pm 0.0011)$$

Precisión de método.

ABC ITF-ESP	TM (min) ITF-AAB	ABC ITF-AAB	ABC ITF-ESP / ITF-AAB
230710	7.278	3308721	0.0697
239637	7.392	3480709	0.0688
223480	7.436	3264605	0.0685
228472	7.399	3325460	0.0687
207639	7.300	3001341	0.0692
231564	7.329	3351396	0.0691
225590	7.414	3266040	0.0691
229827	7.326	3299458	0.0697
218364	7.422	3155678	0.0692
226475	7.311	3279521	0.0691
226175.8000	7.3607	3273292.9000	0.0691
8574.7469	0.0577	125494.8763	0.0004
3.7912	0.7833	3.8339	0.5622

Linealidad de método.

Sistema	Conc. EST-ESP (ppb)	ABC ITF-ESP / ABC ITF-AAB
1	1.2	0.0230
2	1.2	0.0235
3	1.2	0.0231
4	2.4	0.0390
5	2.4	0.0374
6	2.4	0.0385
7	3.6	0.0614
8	3.6	0.0606
9	3.6	0.0605
10	4.8	0.0743
11	4.8	0.0747
12	4.8	0.0750
13	6	0.0961
14	6	0.0961
15	6	0.0969
16	7.2	0.1184
17	7.2	0.1179
18	7.2	0.1157
19	8.4	0.1356
20	8.4	0.1354
21	8.4	0.1345

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9986
Coefficiente de determinación R ²	0.9973
R ² ajustado	0.9972
Error típico	0.0021
Observaciones	21

	Coefficientes	Error típico
Intercepción	0.0023	0.0010
Variable X 1	0.0158	0.0002

$$y = (m \pm S_m)x + (b \pm S_b)$$

Dónde:

y = Relación de áreas de ESP y AAB

m = Pendiente de la recta

S_m = Desviación estandar de la pendiente

x = Concentración de ITF – ESP ($\mu\text{g}/\text{L}$)

b = Ordenada al origen

$S_b = \text{Desviación estándar de la ordenada al origen}$

Sustituyendo los valores obtenidos en la linealidad del sistema.

$$A \frac{ITF - ESP}{ITF - AAB} = (0.0158 \pm 0.0002)([ESP^{\mu}/L]) + (0.0023 \pm 0.0010)$$

Recobro.

Sistema	Conc. EST-ESP (ppb)	ABC ITF-ESP / ABC ITF-AAB	Porcentaje de recobro
1	1.2	0.0230	109.2168
2	1.2	0.0235	111.5514
3	1.2	0.0231	109.8041
4	2.4	0.0390	96.6628
5	2.4	0.0374	92.5850
6	2.4	0.0385	95.4494
7	3.6	0.0614	103.8682
8	3.6	0.0606	102.4798
9	3.6	0.0605	102.3318
10	4.8	0.0743	94.9548
11	4.8	0.0747	95.4374
12	4.8	0.0750	95.8061
13	6	0.0961	98.9167
14	6	0.0961	98.9148
15	6	0.0969	99.7755
16	7.2	0.1184	102.0362
17	7.2	0.1179	101.6350
18	7.2	0.1157	99.7030
19	8.4	0.1356	100.4336
20	8.4	0.1354	100.2516
21	8.4	0.1345	99.5948

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9987
Coefficiente de determinación R ²	0.9973
R ² ajustado	0.9972
Error típico	0.1301
Observaciones	21

	Coeficientes	Error típico
Intercepción	-0.1346	0.0650
Variable X 1	63.2896	0.7499