

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN MEDICINA VETERINARIA.....	1
1.1. CONSIDERACIONES PREVIAS.....	1
1.2. PROPIEDADES GENERALES DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	4
1.2.1. Conceptos generales y clasificación.....	4
1.2.2. Principales grupos de antimicrobianos en medicina veterinaria.....	5
1.2.2.1. Antibióticos betalactámicos.....	5
1.2.2.2. Tetraciclinas.....	10
1.2.2.3. Sulfonamidas.....	12
1.2.2.4. Otros grupos de antimicrobianos.....	13
1.3. ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS EN VACUNO LECHERO.....	15
2. PRESENCIA Y CONTROL DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE	19
2.1. CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	19
2.1.1. Origen de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	19
2.1.2. Efectos de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	21
2.1.2.1. Salud pública.....	22
2.1.2.2. Industria láctea.....	23
2.1.2.3. Productor de leche.....	24
2.2. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	25
2.2.1. Medidas de control.....	25
2.2.1.1. Límites Máximos de Residuos.....	25
2.2.1.2. Planes de control.....	26
2.2.2. Sistema de detección de residuos de antimicrobianos en la leche.....	29
2.2.2.1. Generalidades.....	29
2.2.2.2. Métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche.....	31
3. DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE POR HPLC.....	32
3.1. GENERALIDADES.....	32
3.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN.....	34
3.2.1. Consideraciones previas.....	34
3.2.2. Detectores convencionales.....	36
3.2.3. Espectrometría de masas.....	38
3.2.3.1. Generalidades.....	38
3.2.3.2. LC-ESI-MS/MS (triple cuadrupolo).....	39
3.3. TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	41
3.3.1. Antibióticos betalactámicos.....	41
3.3.2. Tetraciclinas.....	45
3.3.3. Sulfonamidas.....	48
4. TERMOESTABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS.....	50
4.1. GENERALIDADES.....	50
4.1.1. Estabilidad de los medicamentos en disolución.....	50
4.1.2. Factores que afectan a la estabilidad de los medicamentos en disolución.....	51
4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LA LECHE.....	52

4.2.1. Consideraciones previas.....	52
4.2.2. Estabilidad de los antimicrobianos durante el almacenamiento.....	55
4.2.2.1. Antibióticos betalactámicos.....	55
4.2.2.2. Tetraciclinas.....	58
4.2.2.3. Sulfonamidas.....	60
4.2.3. Efecto del calentamiento sobre la estabilidad de los antimicrobianos.....	62
4.2.3.1. Antibióticos betalactámicos.....	62
4.2.3.2. Tetraciclinas.....	67
4.2.3.3. Sulfonamidas.....	70
II. OBJETIVOS.....	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. PRIMER ESTUDIO: Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de antimicrobianos en la leche.....	75
1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	75
1.2. PATRONES Y MUESTRAS FORTIFICADAS.....	76
1.3. EQUIPOS Y MATERIAL.....	77
1.3.1. Equipo cromatográfico LC-MS/MS.....	77
1.3.2. Otros equipos.....	79
1.3.3. Materiales.....	80
1.4. REACTIVOS.....	80
1.4.1. Fase móvil del sistema de análisis cromatográfico.....	80
1.4.2. Otros reactivos.....	81
1.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	81
1.5.1. Análisis cromatográfico de los antibióticos betalactámicos.....	81
1.5.1.1. Extracción y purificación de las muestras.....	81
1.5.1.2. Separación y detección cromatográfica.....	82
1.5.1.3. Interpretación de los cromatogramas.....	83
1.5.2. Análisis cromatográfico de las tetraciclinas.....	85
1.5.2.1. Extracción y purificación de las muestras.....	86
1.5.2.2. Separación y detección cromatográfica.....	86
1.5.2.3. Interpretación de los cromatogramas.....	87
1.5.3. Análisis cromatográfico de las sulfonamidas.....	89
1.5.3.1. Extracción y purificación de las muestras.....	89
1.5.3.2. Separación y detección cromatográfica.....	89
1.5.3.3. Interpretación de los cromatogramas.....	91
1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	93
1.6.1. Estudio de la degradación de antimicrobianos mediante modelos de primer orden.....	93
1.6.2. Estimación de los porcentajes de degradación de los antimicrobianos.....	94
2. SEGUNDO ESTUDIO. Efecto de diferentes tratamientos térmicos de calor sobre la estabilidad de los antimicrobianos en la leche.....	95
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	95
2.2. PATRONES Y MUESTRAS FORTIFICADAS.....	95
2.3. EQUIPOS Y MATERIALES.....	98
2.3.1. Equipos cromatográficos.....	98
2.3.2. Otros equipos.....	100
2.3.3. Materiales.....	100

2.4. REACTIVOS.....	101
2.4.1. Fase móvil del sistema cromatográfico “cleanup”.....	101
2.4.2. Fase móvil del sistema cromatográfico de análisis con detector UV.....	101
2.4.3. Fase móvil del sistema cromatográfico de análisis con detector MS/MS.....	102
2.4.4. Otros reactivos.....	102
2.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	103
2.5.1. Determinación cromatográfica de los antibióticos betalactámicos.....	103
2.5.1.1. Preparación y extracción de la muestra.....	104
2.5.1.2. Separación de fracciones por “cleanup”.....	104
2.5.1.3. Análisis cromatográfico.....	106
2.5.1.4. Interpretación de los cromatogramas.....	107
2.5.2. Determinación cromatográfica de las tetraciclinas.....	110
2.5.2.1. Preparación y extracción de la muestra.....	110
2.5.2.2. Análisis cromatográfico.....	111
2.5.2.3. Interpretación de los cromatogramas.....	111
2.5.3. Determinación cromatográfica de las sulfonamidas.....	112
2.5.3.1. Preparación y extracción de la muestra.....	113
2.5.3.2. Separación y detección cromatográfica.....	113
2.5.3.3. Interpretación de los cromatogramas.....	113
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	114
2.6.1. Estudio de la degradación térmica de antimicrobianos mediante modelos de primer orden.....	114
2.6.2. Cálculo de la energía de activación.....	116
2.6.3. Estimación de los porcentajes de degradación de los antimicrobianos para diferentes tratamientos térmicos.....	116
IV. RESULTADOS.....	118
1. PRIMER ESTUDIO. Influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la presencia de antimicrobianos en la leche.....	118
1.1. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS: PENICILINAS.....	118
1.1.1. Influencia de la refrigeración de las muestras y extractos de leche.....	118
1.1.2. Influencia de la congelación de las muestras y extractos de leche.....	124
1.2. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS: CEFALOSPORINAS.....	131
1.2.1. Influencia de la refrigeración de las muestras y extractos de leche.....	131
1.2.2. Influencia de la congelación de las muestras y extractos de leche.....	137
1.3. TETRACICLINAS.....	142
1.3.1. Influencia de la refrigeración de las muestras y extractos de leche.....	142
1.3.2. Influencia de la congelación de las muestras y extractos de leche.....	148
1.4 SULFONAMIDAS.....	154
1.4.1 Influencia de la refrigeración de las muestras y extractos de leche.....	154
1.4.2 Influencia de la congelación de las muestras y extractos de leche.....	157
2. SEGUNDO ESTUDIO. Efecto de diferentes tratamientos térmicos de calor sobre la estabilidad de los antimicrobianos en la leche.....	161
2.1. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS: PENICILINAS.....	161
2.1.1. Estudio de la degradación térmica de las penicilinas mediante modelos de primer orden.....	161
2.1.2. Cálculo de la energía de activación.....	166
2.1.3. Estimación de la degradación de penicilinas para diferentes tratamientos térmicos.....	170

2.2. ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS: CEFALOSPORINAS.....	173
2.2.1. Estudio de la degradación térmica de las cefalosporinas mediante modelos de primer orden.....	173
2.2.2. Cálculo de la energía de activación.....	179
2.2.3. Estimación de la degradación de cefalosporinas para diferentes tratamientos térmicos.....	183
2.3. TETRACICLINAS.....	185
2.3.1. Estudio de la degradación térmica de las tetraciclinas mediante modelos de primer orden.....	185
2.3.2. Cálculo de la energía de activación.....	190
2.3.3. Estimación de la degradación de tetraciclinas para diferentes tratamientos térmicos.....	192
2.4. SULFONAMIDAS.....	194
2.4.1. Estudio de la degradación térmica de las sulfonamidas mediante modelos de primer orden.....	194
2.4.2. Cálculo de la energía de activación.....	202
2.4.3. Estimación de la degradación de sulfonamidas para diferentes tratamientos térmicos.....	204
V. CONCLUSIONES.....	209
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	213

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Gasto mundial y europeo de medicamentos en sanidad animal.....	2
Cuadro 2. Distribución mundial del gasto en medicamentos en sanidad animal por especies.....	2
Cuadro 3. Consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria en Europa.....	3
Cuadro 4. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos.....	6
Cuadro 5. Frecuencia de utilización de antimicrobianos en los tratamientos antimaméticos.....	18
Cuadro 6. Límites Máximos de Residuos en leche de vaca.....	27
Cuadro 7. Métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes.....	36
Cuadro 8. Técnicas de cromatografía líquida con detectores convencionales para el análisis de antibióticos betalactámicos en la leche.....	42
Cuadro 9. Técnicas de cromatografía líquida con espectroscopia de masas para el análisis de antibióticos betalactámicos en la leche.....	44
Cuadro 10. Técnicas de cromatografía líquida con detectores convencionales para el análisis de tetraciclinas en la leche .....	46
Cuadro 11. Técnicas de cromatografía líquida con espectroscopia de masas para el análisis de tetraciclinas en la leche.....	47
Cuadro 12. Técnicas de cromatografía líquida con detectores convencionales y de masas para el análisis de sulfonamidas en la leche.....	49
Cuadro 13. Parámetros relativos a los órdenes de reacción.....	51
Cuadro 14. Efecto de los tratamientos térmicos sobre los antibióticos betalactámicos en leche y otras matrices líquidas.....	63
Cuadro 15. Efecto del tratamiento térmico sobre las tetraciclinas en la leche y otras matrices líquidas.....	68
Cuadro 16. Efecto del tratamiento térmico sobre las sulfonamidas en la leche y otras matrices líquidas.....	71
Cuadro 17. Antimicrobianos, concentraciones y disolventes utilizados.....	78
Cuadro 18. Condiciones del espectrómetro de masas para la identificación y cuantificación de antibióticos betalactámicos.....	84
Cuadro 19. Ecuaciones de las rectas de calibrado de los antibióticos betalactámicos.....	84
Cuadro 20. Condiciones del espectrómetro de masas para la identificación y cuantificación de las tetraciclinas.....	88
Cuadro 21. Ecuaciones de las rectas de calibrado de las tetraciclinas.....	88
Cuadro 22. Condiciones del espectrómetro de masas para la identificación y cuantificación de sulfonamidas.....	91
Cuadro 23. Ecuaciones de las rectas de calibrado de las sulfonamidas.....	91
Cuadro 24. Temperaturas y tiempos empleados en el estudio de diferentes tratamientos térmicos sobre la estabilidad de los antimicrobianos en la leche.....	96
Cuadro 25. Antimicrobianos y disolventes utilizados.....	97
Cuadro 26. Fracciones relativas a las penicilinas.....	106
Cuadro 27. Ecuaciones correspondientes a las rectas de calibrado de los antibióticos betalactámicos.....	109

Cuadro 28. Ecuaciones correspondientes a las recta de calibrado de las tetraciclinas.....	112
Cuadro 29. Efecto del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de penicilinas en muestras de leche.....	119
Cuadro 30. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de penicilinas.....	120
Cuadro 31. Porcentajes de degradación de penicilinas en muestras de leche refrigeradas.....	122
Cuadro 32. Porcentajes de degradación de penicilinas en extractos de leche refrigerados.....	122
Cuadro 33. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las penicilinas en muestras de leche y extractos refrigerados.....	123
Cuadro 34. Efecto del tiempo de congelación y de la matriz sobre la concentración de penicilinas.....	125
Cuadro 35. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de congelación y de la matriz sobre la concentración de penicilinas.....	126
Cuadro 36. Porcentajes de degradación de penicilinas en muestras de leche congeladas.....	128
Cuadro 37. Porcentajes de degradación de penicilinas en extractos de leche congelados.....	128
Cuadro 38. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las penicilinas en muestras de leche y extractos congelados.....	129
Cuadro 39. Efecto del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de cefalosporinas.....	132
Cuadro 40. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de cefalosporinas.....	133
Cuadro 41. Porcentajes de degradación de cefalosporinas en muestras de leche refrigeradas.....	135
Cuadro 42. Porcentajes de degradación de cefalosporinas en extractos de leche refrigerados.....	135
Cuadro 43. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las cefalosporinas en muestras de leche y extractos refrigerados.....	136
Cuadro 44. Efecto del tiempo de congelación y de la matriz sobre la concentración de cefalosporinas.....	138
Cuadro 45. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de congelación y de la matriz sobre la concentración de cefalosporinas.....	138
Cuadro 46. Porcentajes de degradación de cefalosporinas en muestras de leche congeladas.....	140
Cuadro 47. Porcentajes de degradación de cefalosporinas en extractos de leche congeladas.....	141
Cuadro 48. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las cefalosporinas en muestras de leche y extractos congelados.....	141
Cuadro 49. Efecto del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de tetraciclinas.....	143
Cuadro 50. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre las concentraciones de tetraciclinas.....	144

Cuadro 51. Porcentajes de degradación de tetraciclinas en muestras de leche refrigeradas.....	146
Cuadro 52. Porcentajes de degradación de tetraciclinas en extractos de leche refrigeradas.....	146
Cuadro 53. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las tetraciclinas en muestras de leche y extractos refrigerados.....	147
Cuadro 54. Efecto del tiempo de congelación y de la matriz sobre la concentración de tetraciclinas.....	149
Cuadro 55. Ecuaciones de regresión lineal múltiple de los efectos del tiempo de congelación y de la matriz sobre las concentraciones de tetraciclinas.....	149
Cuadro 56. Porcentajes de degradación de tetraciclinas en muestras de leche congeladas.....	151
Cuadro 57. Porcentajes de degradación de tetraciclinas en extractos de leche congelados.....	151
Cuadro 58. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de las tetraciclinas en muestras de leche y extractos congelados.....	152
Cuadro 59. Efecto del tiempo de refrigeración y de la matriz sobre la concentración de sulfonamidas.....	156
Cuadro 60. Efecto del tiempo de congelación y de la matriz sobre las concentraciones de sulfonamidas.....	158
Cuadro 61. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la amoxicilina en la leche a diferentes temperaturas.....	161
Cuadro 62. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la ampicilina en la leche a diferentes temperaturas.....	162
Cuadro 63. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cloxacilina en la leche a diferentes temperaturas.....	162
Cuadro 64. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la penicilina G en la leche a diferentes temperaturas.....	162
Cuadro 65. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) estimados para las penicilinas en la leche a diferentes temperaturas de calentamiento.....	165
Cuadro 66. Ecuación de Arrhenius aplicada a la degradación térmica de las penicilinas en la leche.....	167
Cuadro 67. Porcentajes de degradación de las penicilinas en la leche para diferentes tratamientos térmicos.....	171
Cuadro 68. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cefalexina en la leche a diferentes temperaturas.....	173
Cuadro 69. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación del cefalonio en la leche a diferentes temperaturas.....	173
Cuadro 70. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cefapirina en la leche a diferentes temperaturas.....	174
Cuadro 71. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cefoperazona en la leche a diferentes temperaturas.....	174
Cuadro 72. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cefquinoma en la leche a diferentes temperaturas.....	174
Cuadro 73. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la cefuroxime en la leche a diferentes temperaturas.....	175

Cuadro 74. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) estimados para las penicilinas en la leche a diferentes temperaturas de calentamiento.....	178
Cuadro 75. Ecuación de Arrhenius aplicada a la degradación térmica de las cefalosporinas en la leche.....	180
Cuadro 76. Porcentaje de degradación de las cefalosporinas en leche para diferentes tratamientos térmicos.....	182
Cuadro 77. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la clortetraciclina en la leche a diferentes temperaturas.....	185
Cuadro 78. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la doxicilina en la leche a diferentes temperaturas.....	185
Cuadro 79. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la oxitetraciclina en la leche a diferentes temperaturas.....	186
Cuadro 80. Parámetros resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación de la tetraciclina en la leche a diferentes temperaturas.....	189
Cuadro 81. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) estimados para las tetraciclinas en la leche a diferentes temperaturas de calentamiento.....	189
Cuadro 82. Ecuación de Arrhenius aplicada a la degradación térmica de las tetraciclinas en la leche.....	190
Cuadro 83. porcentajes de degradación de tetraciclinas en la leche para diferentes tratamientos térmicos.....	193
Cuadro 84. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfaclopiridazina con el tiempo.....	195
Cuadro 85 Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfadiazina con el tiempo.....	195
Cuadro 86. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfadimetoxina con el tiempo.....	195
Cuadro 87. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfamerazina con el tiempo.....	196
Cuadro 88. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfametazina con el tiempo.....	196
Cuadro 89. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfapiridina con el tiempo.....	196
Cuadro 90. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica de la sulfaquinoxalina con el tiempo.....	197
Cuadro 91. Ecuaciones resultantes de la aplicación del modelo cinético de primer orden a la degradación térmica del sulfatiazol con el tiempo.....	197
Cuadro 92. Tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) estimados para las sulfonamidas en la leche a diferentes temperaturas de calentamiento.....	201
Cuadro 93. Ecuación de Arrhenius aplicada a la degradación térmica de las sulfonamidas en la leche.....	203
Cuadro 94. Porcentajes de degradación de las sulfonamidas en la leche para diferentes tratamientos térmicos.....	206

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencias de uso de antimicrobianos por vía intramamaria empleados en ganado vacuno en lactación.....	16
Figura 2. Frecuencias de uso de antimicrobianos por vía intramamaria empleados en ganado vacuno en el secado.....	17
Figura 3. Causas de la presencia de residuos en la leche debido a tratamientos antimaméticos.....	21
Figura 4. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de trazabilidad.....	28
Figura 5. Controles mínimos exigidos en el Módulo de Calidad Letra Q.....	29
Figura 6. Sistema integrado de control de inhibidores en la leche.....	30
Figura 7. Separación de compuestos en la columna cromatográfica.....	33
Figura 8. Cromatografía de fase inversa.....	33
Figura 9. Esquema general de un sistema de cromatografía líquida.....	34
Figura 10. Detector UV.....	37
Figura 11. Detector PDA.....	37
Figura 12. Fuente de ionización por electrospray (ESI).....	39
Figura 13. Espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo.....	40
Figura 14. Variación de la concentración de penicilina G en muestras y extractos de leche refrigerados.....	58
Figura 15. Porcentaje de inactivación de las penicilinas en la leche tratada térmicamente.....	65
Figura 16. Porcentaje de inactivación de las cefalosporinas en la leche en diferentes tratamientos térmicos .....	66
Figura 17. Porcentaje de inactivación de las tetraciclinas en la leche en diferentes tratamientos térmicos.....	69
Figura 18. Porcentaje de inactivación de las sulfonamidas en la leche a diferentes tratamientos térmicos.....	72
Figura 19. Diseño experimental empleado en el estudio de la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de antimicrobianos en la leche.....	77
Figura 20. Equipo cromatográfico y detector de espectrometría de masas.....	79
Figura 21. Espectro correspondiente al ion precursor de la cloxacilina en leche el primer día de refrigeración.....	85
Figura 22. Cromatogramas correspondientes a los iones primario y secundario de la cloxacilina en leche el primer día de refrigeración.....	85
Figura 23. Espectro correspondiente al ion precursor de la oxitetraciclina en leche el primer día de refrigeración.....	88
Figura 24. Cromatogramas correspondientes a los iones primarios y secundarios de la oxitetraciclina en la leche el primer día de refrigeración.....	89
Figura 25. Espectro correspondiente al ión precursor del sulfatiazol en leche el primer día de refrigeración.....	92
Figura 26. Cromatogramas correspondientes a los iones primario y secundario del sulfatiazol en leche el primer día de refrigeración.....	92

Figura 27. Colector automático de fracciones.....	99
Figura 28. Inyector y detector UV.....	99
Figura 29. Sistema integrado de análisis.....	99
Figura 30. Detalle de la columna C <sub>18</sub> .....	99
Figura 31. Cromatograma y tabla de resultados de las cefalosporinas recogidas en la fracción 5 (F5) del sistema cromatográfico de “cleanup”.....	108
Figura 32. Cromatograma y tabla de resultados obtenidos en el análisis cromatográfico de las tetraciclinas.....	112
Figura 33. Espectro de masas del ión precursor relativo a la sulfadiazina a los 30 minutos de tratamiento a 70 °C.....	113
Figura 34. Cromatogramas de los iones primario y secundario de la sulfadiazina a los 30 minutos de tratamiento a 70 °C.....	114
Figura 35. Porcentajes de variación de la concentración de penicilinas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de refrigeración.....	118
Figura 36. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de penicilinas en muestras de leche.....	121
Figura 37. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de penicilinas en extractos de leche.....	121
Figura 38. Porcentajes de variación de la concentración de penicilinas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de congelación.....	125
Figura 39. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de penicilinas en muestras de leche.....	127
Figura 40. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de penicilinas en extractos de leche.....	127
Figura 41. Porcentajes de variación de la concentración de cefalosporinas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de refrigeración.....	131
Figura 42. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de cefalosporinas en muestras de leche.....	134
Figura 43. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de cefalosporinas en extractos de leche.....	134
Figura 44. Porcentajes de variación de la concentración de cefalosporinas en los extractos y muestras de leche congelados.....	137
Figura 45. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de cefalosporinas en muestras de leche.....	139
Figura 46. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de cefalosporinas en extractos de leche.....	140
Figura 47. Porcentajes de variación de la concentración de tetraciclinas en los extractos y muestras de leche durante el tiempo de refrigeración.....	143
Figura 48. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de tetraciclinas en muestras de leche.....	145
Figura 49. Efecto del tiempo de refrigeración sobre la concentración de tetraciclinas en extractos de leche.....	145
Figura 50. Porcentajes de variación de la concentración de tetraciclinas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de congelación.....	148
Figura 51. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de tetraciclinas en muestras de leche.....	150

Figura 52. Efecto del tiempo de congelación sobre la concentración de tetraciclinas en extractos de leche.....	151
Figura 53. Porcentajes de variación de la concentración de sulfonamidas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de refrigeración.....	155
Figura 54. Porcentajes de variación de la concentración de sulfonamidas en los extractos y muestras de leche con el tiempo de congelación.....	157
Figura 55. Relación entre la concentración de amoxicilina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	163
Figura 56. Relación entre la concentración de ampicilina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	164
Figura 57. Relación entre la concentración de cloxacilina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	164
Figura 58. Relación entre la concentración de penicilina G en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	164
Figura 59. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para las penicilinas.....	168
Figura 60. Relación entre la concentración de cefalexina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	176
Figura 61. Relación entre la concentración de cefalonio en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	176
Figura 62. Relación entre la concentración de cefapirina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	176
Figura 63. Relación entre la concentración de cefoperazona en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	177
Figura 64. Relación entre la concentración de cefoperazona en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	177
Figura 65. Relación entre la concentración de cefoperazona en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	177
Figura 66. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para las cefalosporinas.....	181
Figura 67. Relación entre la concentración de clortetraciclina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	187
Figura 68. Relación entre la concentración de doxicilina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	187
Figura 69. Relación entre la concentración de oxitetraciclina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	188
Figura 70. Relación entre la concentración de tetraciclina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	187
Figura 71. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para las tetraciclinas.....	191
Figura 72. Relación entre la concentración de sulfaclopiradizina en la leche y el tiempo de calentamiento a distintas temperaturas.....	198
Figura 73. Relación entre la concentración de sulfadiazina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	198
Figura 74. Relación entre la concentración de sulfadimetoxina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	199
Figura 75. Relación entre la concentración de sulfamerazina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	199

Figura 76. Relación entre la concentración de sulfametazina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	199
Figura 77. Relación entre la concentración de sulfapiridina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	200
Figura 78. Relación entre la concentración de sulfaquinoxalina en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	200
Figura 79. Relación entre la concentración de sulfatiazol en la leche y el tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas.....	200
Figura 80. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para la sulfaclopiradizina, sulfadiazina, sulfadimetoxina y sulfamerazina.....	205
Figura 81. Representación gráfica de la ecuación de Arrhenius para la sulfametazina, sulfapiridina, sulfaquinoxalina y sulfatiazol.....	205