

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
PROGRAMA PARA MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD, PRODUCTIVIDAD Y
LOGISTICA EN LA INDUSTRIA REGIONAL I



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

4F04 PROGRAMA PARA MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD,
PRODUCTIVIDAD Y LOGISTICA EN LA INDUSTRIA REGIONAL I
Verificación de un método inmunoenzimático para el análisis de clenbuterol

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología. Alejandro Flores Arias

Profesor PAP: Dra. Sarah Ratkovich González

Tlaquepaque, Jalisco, noviembre de 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	0
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	0
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	0
1.2 Caracterización de la organización.....	3
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	4
1.4. Planeación de alternativa(s).....	5
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	7
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	10
1.7. Bibliografía y otros recursos	11
1.8. Anexos generales.....	13
2. Productos	23
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	26
3.1 Sensibilización ante las realidades	26
3.2 Aprendizajes logrados	27

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP Verificación de un método inmunoenzimático para el análisis de clenbuterol se realizó en la empresa CENEBA Bioprocess con el objetivo de realizar la prueba de aptitud de SADER para éste método de prueba, y así ser reconocidos como un laboratorio tercero autorizado ante SADER; la empresa busca este reconocimiento ya que se detectó la necesidad en el estado. Para esto se redactó el protocolo de verificación del kit RIDASCREEN® Clenbuterol, que es un kit para la detección de la molécula mediante ELISA competitiva, y el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) de la prueba. Se realizó la verificación con orina de bovino fortificada con clenbuterol, ya que es la misma matriz de las muestras que fueron enviadas para la prueba de aptitud. Posteriormente, se hizo el análisis estadístico de los resultados para verificar que se cumplieran con los criterios de aceptación. Para la prueba de aptitud se recibieron las muestras enviadas de orina de bovino y se analizaron de acuerdo con lo especificado en el PNO, los resultados fueron analizados con ayuda del software RIDASOFT®. Posteriormente se redactaron los informes de resultados requeridos y se enviaron a CENAPA. Los resultados de la verificación no cumplieron con los requerimientos ya que la muestra de orina proporcionada estaba contaminada, por lo que quedó pendiente su repetición. Los resultados de la prueba de aptitud fueron satisfactorios y se espera que en las semanas posteriores a la conclusión del proyecto se obtenga el reconocimiento como laboratorio tercero autorizado.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El clenbuterol es un agonista β -adrenérgico que tiene un efecto relajante sobre el músculo liso, se utiliza como medicamento para vías respiratorias, como agente antiasmático y tocolítico (Ezquerro-Osorio *et al*, 2019). Este compuesto tiene efectos anabólicos y disminuye la acumulación de grasa en los tejidos, por lo que, se utiliza como droga para incrementar el rendimiento en deportistas, así como para mejorar la producción ganadera, acelerando su crecimiento y aumentando la relación carne/grasa (Hernández *et al*, 2011). Sin embargo, cuando se utiliza como coadyuvante de engorda, el clenbuterol se usa en dosis de 5 a 10 veces mayores que en su uso terapéutico (R-Biopharm, 2019), por lo que los residuos en los productos representan un riesgo para el consumidor, provocando intoxicación con síntomas como taquicardia, ansiedad, temblores o vértigo; en casos más severos: cefalea e infarto al miocardio (Ezquerro-Osorio *et al*, 2019).

Por lo mencionado anteriormente, el uso de clenbuterol en México fue prohibido en 1999 como aditivo para la engorda de ganado por la NOM-061-ZOO-1999, actualmente la NOM-194-SSA1-2004 establece que los productos de ganado bovino deben de estar libres de clenbuterol, esto se evalúa con los kits autorizados.

Actualmente existen diversos kits de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar clenbuterol. El Kit RIDASCREEN[®] de R-Biopharm es una prueba ELISA competitiva con alta sensibilidad capaz de determinar cuantitativamente clenbuterol en muestras de leche, músculo, hígado, riñón, orina, plasma/suero, cabello, globo ocular y alimento para ganado. El kit se basa en la interacción Ag-Ac, donde los pocillos están recubiertos con Ac de captura inmovilizados anti-anti-clenbuterol, la microplaca ya se encuentra funcionalizada con Ac anti-clenbuterol, que están unidos a los anticuerpos de captura. Los estándares, muestras, y el conjugado del clenbuterol son agregados a los pocillos; luego el clenbuterol libre y el conjugado con la enzima compiten por los sitios de unión en los Ac, en este punto todo el conjugado no unido es retirado en un paso de lavado. El conjugado unido convierte un cromógeno en un producto color azul, la adición de la solución de paro provoca un cambio de color azul a amarillo. Posteriormente, la lectura espectrofotométrica se realiza a 450nm donde la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol en la muestra (R-Biopharm, 2019).

Algunas organizaciones que ofrecen servicios de análisis son el CIATEJ, que tiene un laboratorio especializado en analizar muestras para industria alimentaria (USAM), y otro para el análisis de fármacos (UEP); en cuestión de alimentos la Cámara de la Industria Alimenticia de Jalisco ofrece servicios de análisis a través de su laboratorio (DESU Operadora), y en el sector privado, Laboratorios Becar compete en este rubro.

Algunas empresas productoras de fármacos o productos alimentarios tienen la capacidad de analizar sus productos, como Boehringer Ingelheim o Pisa, sin embargo, estas también pueden ser clientes, ya que a veces requieren análisis realizados por externos.

Según la lista de terceros autorizados por COFEPRIS en el 2021, existen 22 laboratorios autorizados para realizar el análisis de clenbuterol, de los cuales sólo el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco está dentro del estado de Jalisco; solamente 6 laboratorios dentro del estado están listados (COFEPRIS, 2021).

Se estima un crecimiento de la industria farmacéutica del 36% durante el 2022 (Congreso Nacional de Farmacias, 2022); a nivel nacional esta tiene un mayor tamaño de unidades económicas que la industria manufacturera y que el promedio a nivel nacional. También ha crecido en la contratación de personal, y está en el cuarto lugar de valor agregado respecto al valor de la producción. Jalisco ocupa el tercer lugar nacional de la producción farmacéutica, debajo de la Ciudad de México y el Estado de México, dentro del estado de Jalisco la fabricación de productos farmacéuticos es el tercer aporte a la producción más importante (INEGI, 2016). Desde el 2013 se reportan tendencias de diversificación de las líneas de negocio y los medicamentos que producen las empresas farmacéuticas en el país, este estudio además afirma que México se ha convertido en un destino atractivo para invertir en la industria farmacéutica (Pérez-Zazueta & Quiroga, 2013).

Hay 104,718 ganaderos registrados ante la Unión Ganadera Regional de Jalisco y ante el gobierno del estado, 16,000 producen exclusivamente leche y el resto la producción de carne, En la Figura 1 se ilustra la distribución de la producción en Jalisco (UGRJ, 2022). La industria de producción de lácteos ocupa el cuarto lugar en la relevancia de la producción manufacturera en Jalisco (INEGI, 2016), el estado tiene una producción importante de lácteos, donde se procesan más de 2 millones de litros diarios. Jalisco también se ubica como

el segundo estado en producción de carne de bovino con alrededor de 200,000 toneladas por año. (UGRJ, 2022)

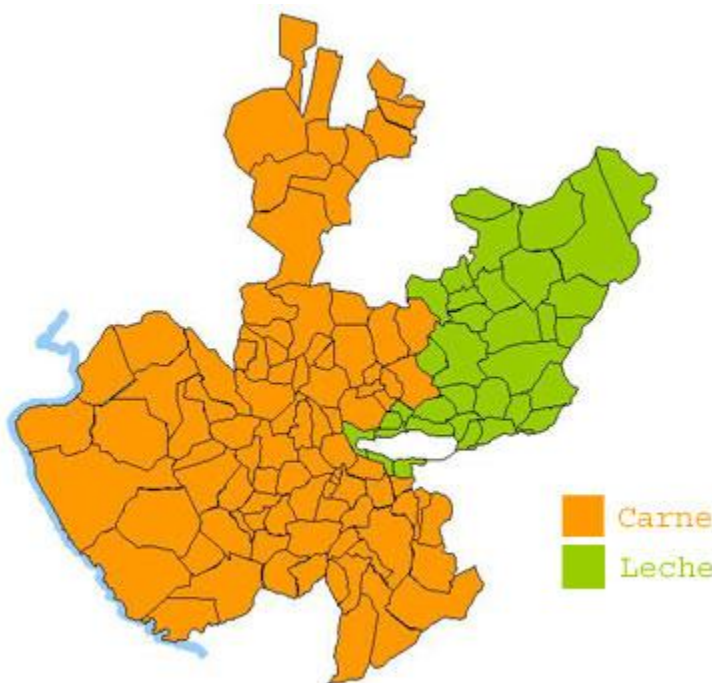


Figura 1. Distribución de los productos de la industria ganadera en Jalisco (UGRJ, 2022).

1.2 Caracterización de la organización

CENEBA BIOPROCESS S.A de C.V es un laboratorio de análisis que ofrece servicios principalmente a la industria farmacéutica, pero también a la industria alimentaria y de dispositivos médicos. La empresa fue fundada en 2015; debajo de la gerencia general está organizada en 3 departamentos: Investigación y Desarrollo, Gestión de Calidad y Administración. El laboratorio se encuentra dentro del departamento de Investigación y Desarrollo, la gerencia de este departamento coordina todas las actividades que se llevan a cabo en este, entre ellas los análisis que se ofrecen a los clientes. Cuenta con áreas que están equipadas para desarrollar procesos y productos biotecnológicos en sus fases iniciales (área de bioprocesos), un área de genética y bioensayos, área de microbiología, cromatografía, análisis fisicoquímicos; cada área está conformada por un jefe analista que coordina los proyectos, así como otras personas que están asignadas. Existe un jefe de laboratorio que supervisa el funcionamiento general de todas las áreas y sirve de contacto con los demás departamentos. Adicionalmente están los auxiliares de laboratorio que asisten en actividades

que son necesarias para el funcionamiento de todas las áreas. Las actividades realizadas, ya sea dentro o fuera del laboratorio, se rigen por un sistema de gestión de calidad implementado y supervisado por el mismo departamento, que tiene la responsabilidad de revisar y aprobar toda la documentación que se genere.

La empresa brinda el servicio al cliente mediante la diversificación de su oferta, para poder cubrir las necesidades que este tenga, a través de la compra de equipos de vanguardia y la implementación de los métodos más solicitados por la industria, ofreciendo cualquier análisis que el mercado requiera o, en su defecto, tener la capacidad para implementarlo, al mismo tiempo que busca obtener las certificaciones que respalden estos servicios. Un ejemplo de lo anterior es que esta empresa fue de las primeras en Jalisco en ser certificadas por el InDRE para implementar pruebas para detectar SARS-CoV-2 con el objetivo del control epidemiológico de COVID-19 en el año 2020 (Secretaría de Salud, 2020).

Se diferencia de otras en el rubro por su atención y servicio al cliente. Los servicios se ofertan haciendo hincapié en la atención personalizada que la empresa brinda al momento de negociar la contratación, y durante la implementación de este. Se empieza con un proceso para conocer las necesidades de un potencial cliente interesado en un tipo de análisis, después se ofrecen alternativas para adaptar el método a los requerimientos del cliente o incluso desarrollar uno nuevo. El trato personalizado se mantiene durante toda la implementación del servicio para seguir atendiendo a los requerimientos que se tengan de manera correcta. Esta flexibilidad y atención representan una ventaja competitiva para captar la preferencia de los clientes.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La empresa busca aprovechar su nueva capacidad de ofrecer servicios para diversificarse, atraer la atención de más industrias y crecer económicamente. Como se mencionó en la Sección 1.1, hay poca disponibilidad del servicio de análisis de clenbuterol en el estado de Jalisco; al identificar esta problemática, CENEBA decidió cubrir esta necesidad implementando este servicio.

Para lograr esto, se necesita personal calificado que valide el protocolo, lleve a cabo los análisis y mantenga el funcionamiento de la empresa en general.

Así, al aportar recursos humanos que tengan la capacidad de asistir en la implementación de nuevos servicios, con el objetivo de incursionar en industrias que anteriormente no se habían considerado en el segmento de mercado, se atiende a la necesidad que busca cubrir la empresa, promoviendo su crecimiento, de la economía de la región, al mismo tiempo que se contribuye a la salud de la población.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Para garantizar que los productos de ganado bovino están libres de clenbuterol, los productores, los organismos gubernamentales que los regulan y laboratorios terceros autorizados, realizan pruebas a muestras generalmente de orina o suero para garantizar el cumplimiento de la NOM-194-SSA1-2004; este análisis se realiza por un método ELISA competitivo utilizando un método autorizado, La Secretaría de Desarrollo Rural (SADER) realizó una convocatoria donde implementaron pruebas de aptitud para ser incluidos en la nueva lista de laboratorios terceros autorizados para realizar este análisis. Obtener este reconocimiento puede llevar a la adquisición de nuevos clientes, permite obtener otra certificación con más reconocimiento a nivel nacional y facilita el proceso administrativo para la futura certificación de otros métodos analíticos.

La prueba de aptitud consiste en el análisis de una muestra líquida enviada al laboratorio participante. Posteriormente se envía de regreso el resultado de la prueba y se espera el dictamen para hacer los trámites correspondientes. Sin embargo, para implementar una metodología nueva, el método debe verificarse para asegurar que los resultados emitidos son confiables.

Para atender a la problemática, en el área de análisis de genética, se evaluó cuál método se validaría para implementar el servicio de análisis de clenbuterol, la alternativa que se decidió que se usaría el Kit RIDASCREEN® Clenbuterol, que es una buena opción ya que brinda resultados en un corto periodo de tiempo, tiene un protocolo simple y el proveedor lo tiene en stock todo el año, por lo que se puede adquirir rápidamente cuando se solicite el análisis en el laboratorio, además de que es el kit utilizado por las instituciones de referencia.

El objetivo del proyecto es realizar la prueba de aptitud de SADER del método de prueba para la determinación cuantitativa de clenbuterol mediante un inmunoensayo enzimático competitivo. Los objetivos específicos son:

- Diseñar y elaborar el procedimiento para la verificación e implementación del método analítico.
- Asistir en la ejecución de la verificación del método y la prueba de aptitud.
- Asistir en el análisis de los datos obtenidos y la emisión los resultados a SADER.

Los productos esperados son: el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) para la prueba, el protocolo de verificación de la ELISA, y el reporte de resultados de ambos.

A continuación (Tabla 1), se muestra el cronograma de actividades para cumplir los objetivos establecidos.

Tabla 1. Cronograma de actividades del PAP.

ACTIVIDAD	QUINCENA							
	Ago-1	Ago-2	Sep -1	Sep-2	Oct-1	Oct-2	Nov-1	Nov-2
Capacitación inicial en el sistema de gestión de calidad de la empresa.								
Investigación bibliográfica sobre las técnicas y la problemática								
Conocer el Kit RIDASCREEN® Clenbuterol.								
Establecer los indicadores de desempeño para el procedimiento y contar con los								

materiales necesarios.							
Redactar el procedimiento.							
Revisión del procedimiento.							
Apoyo en la ejecución de los ensayos establecidos.							
Evaluar los resultados obtenidos.							
Hacer el análisis estadístico de los resultados.							
Redacción de los informes de resultados							

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Antes de empezar el trabajo dentro de la empresa fue necesario realizar la capacitación obligatoria que todo el personal debe de cumplir antes de empezar con sus demás actividades, principalmente para aprender sobre el funcionamiento del Sistema de Gestión de Calidad, ya que es una parte fundamental de la empresa y todas las actividades están ligadas a este, como los registros de actividades y de uso de equipos, así como los protocolos, procedimientos y reportes de resultados; el sistema se implementa a través de plantillas estandarizadas, donde se especifican todos los datos necesarios para asegurar la trazabilidad de los análisis y otras actividades, también a través de la supervisión en distintos niveles para asegurar que se hacen los registros correctamente, es por esto que fue importante aprender a realizar los registros de las actividades que se desempeñaron dentro de la empresa. También se leyeron los protocolos y se tomaron las capacitaciones necesarias para manejar los equipos y realizar las actividades necesarias para el funcionamiento general del laboratorio y dentro del área de

análisis de genética, donde se trabajó durante el proyecto. Como parte del proceso de mejora continua se siguieron tomando capacitaciones durante toda la duración del proyecto según lo requiriera el proyecto.

Se presentaron los potenciales proyectos para el área y se estudiaron para conocer a profundidad cada uno, entre ellos la implementación del análisis de clenbuterol. La gerencia decidió que, entre otros proyectos, se trabajaría en la verificación e implementación del método de análisis de clenbuterol, ya que se conocía que había una convocatoria antes de finales de año para realizar una prueba de aptitud con el objetivo de ser reconocido como apto para realizar dicho análisis. Se estudió principalmente el inserto del kit para identificar los materiales y reactivos que serían necesarios para realizar las pruebas. Así mismo se determinaron las pruebas necesarias para la verificación del método, que fueron dictadas principalmente por una metodología de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) para la validación del análisis con el Kit RIDASCREEN® Clenbuterol (CCAYAC, 2017).

Teniendo esta información, se redactó el Protocolo de Verificación del método, que incluye los objetivos, materiales y equipos necesarios, la metodología, los indicadores o parámetros de desempeño y los criterios de aceptación de la prueba, entre otras secciones que forman parte del formato de la empresa y son relevantes para la trazabilidad dentro del Sistema de Gestión de Calidad, cuya evidencia se omitirá por razones de confidencialidad. Simultáneamente se redactó el PNO que se usaría en la prueba de aptitud y los futuros análisis que le sean solicitados a la empresa. En el Anexo 1 se encuentra un extracto modificado de ambos documentos. Los criterios de aceptación de la prueba se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Criterios de aceptación de la verificación del método.

Parámetro de verificación	Criterio de aceptación
Repetibilidad del sistema	$CV \leq 20\%$
Repetibilidad del ensayo	$CV \leq 20\%$
Reproducibilidad	$CV \leq 20\%$
Ruido de fondo	$CV \leq 20\%$

Porcentaje de recobro

$$CV \leq 20\%$$
$$70\% \leq R \leq 130\%$$

Después se redactó el PNO del análisis, para realizar la prueba de aptitud. Este documento comparte algunas secciones con el protocolo de verificación, excluyendo los indicadores de desempeño ya que no aplica en este caso. El objetivo cambia con respecto al otro documento, pero el contenido de las secciones es similar. Los criterios de aceptación determinan si se ejecutó la prueba correctamente y si sus resultados son confiables, estos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Criterios de aceptación de la implementación del método.

Parámetro de implementación	Criterio de aceptación
50% de inhibición	$\pm 20\%$ de lo indicado en el certificado del kit
Repetibilidad en curva Blanco	Std 2-3: $CV \leq 20\%$ Std 4-6: $CV \leq 25\%$ > 0.6
Ajuste	Similaridad con la curva del certificado del kit
Precisión	$\%CV \leq 20\%$

Antes de procesar las muestras, el proveedor del kit realizó una visita a la empresa para impartir una capacitación en el funcionamiento y uso del Kit RIDASCREEN Clenbuterol, que se enfocó principalmente en el procesamiento de muestras sólidas, posteriormente se entregó una constancia de la capacitación (Anexo 2).

Para la verificación se obtuvieron muestras de orina de bovino de un productor local, y se compró un estándar de clenbuterol, que fue usado para preparar las muestras positivas y las muestras fortificadas; se asistió en la realización de la prueba de acuerdo con el protocolo previamente redactado (ver resultados), y se analizaron los resultados obtenidos.

Cuando se anunciaron las fechas exactas de la convocatoria se organizaron las actividades para la recepción y procesamiento de las 2 muestras, se ingresaron con las condiciones de acuerdo con las especificaciones que contenía el paquete, y se almacenaron en congelación. El día del análisis se procesaron las muestras de acuerdo con el PNO, que se describe en la sección de resultados; se realizaron tres réplicas de cada una, se hizo la lectura por

absorbancia y se procesaron los resultados en el software RIDASOFT® especializado para el kit, que ajusta los datos de la curva a un modelo logístico, del cual calcula la concentración de las muestras tomando en cuenta la dilución.

A continuación, se compararon los resultados con los criterios de aceptación mencionados en la **Tabla 2** y se redactaron los reportes de verificación solicitados por CENAPA, junto con los reportes de resultados internos de la empresa que también fueron solicitados, que incluían un reporte en el formato de la empresa y las hojas de cálculo. Estos reportes se mandaron a revisión interna de la empresa en el departamento de Calidad y posteriormente fueron enviados a CENAPA.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Se realizaron 4 de las 5 pruebas que se tenían contempladas para la verificación y la primera parte de Reproducibilidad, sin embargo, en los resultados se detectó la presencia de clenbuterol en la muestra de orina de bovino que fue donada para la realización de la prueba, por lo que la prueba no se pudo realizar correctamente y los resultados no son satisfactorios. Ya que el kit no tenía suficientes reacciones para repetir este procedimiento, quedó pendiente su realización para ser reprogramada cuando se adquiera el kit nuevamente.

La implementación de la prueba de aptitud se realizó con éxito, se redactó el protocolo, se implementó la prueba, después de comprobar que se cumplían todos los criterios establecidos, se emitieron los resultados según lo requerido para ser evaluados y en un futuro cercano obtener el reconocimiento como tercero autorizado, lo que permitirá que la empresa diversifique sus servicios, atendiendo a un sector grande en el estado y en crecimiento, esto permitirá el desarrollo de la empresa a través de la contratación de más servicios, además que facilitará el registro de otras pruebas ante la EMA. Los documentos redactados permitirán a los analistas realizar correctamente el servicio cuando se solicite, teniendo una guía clara del procedimiento y procesamiento de los datos, además de facilitar la trazabilidad de las pruebas que se ejecuten cuando se realicen auditorías.

Una perspectiva es realizar la estandarización de otras matrices para implementar la prueba con otro tipo de muestras, de acuerdo con las necesidades del cliente que lo solicite. Para este fin se necesitará realizar una actualización de los documentos y, dependiendo del tipo de

muestras, la compra de los equipos necesarios para el procesamiento de muestras de carne e hígado, o en su defecto, la verificación de un método alternativo.

1.7. Bibliografía y otros recursos

CCAYAC. (2017). CCAYAC-PV-153/V2. Protocolo de confirmación del método: determinación de clenbuterol para orina de bovino por el ensayo inmunoenzimático de ELISA para el kit de nuevo desarrollo RIDASREEN Fast R-Biopharm R-1711.

COFEPRIS. (2021). Relación de Laboratorios de Prueba Terceros Autorizados. Recuperado de:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/616071/Laboratorios_de_Prueba_2021-01-19.pdf

COFEPRIS. (s.f.). Clenbuterol. Uso ilegal del clenbuterol. Recuperado de: <https://coepris.michoacan.gob.mx/clenbuterol/>

Congreso Nacional de Farmacias. (2022). Industria farmacéutica mexicana estima crecimiento del 36% para 2022. Recuperado de: <https://enfarma.lat/index.php/noticias/5947-industria-farmaceutica-mexicana-estima-crecimiento-del-36-para-2022>

Ezquerria Osorio, A., Bueno Arias, G. M., Torres González, K. S., Arias Marín, R., Ramírez García, J. E., Ezquerria Osorio, A., Bueno Arias, G. M., Torres González, K. S., Arias Marín, R., & Ramírez García, J. E. (2019). Intoxicación alimentaria por clenbuterol, padecimiento subdiagnosticado. *Acta médica Grupo Ángeles*, 17(4), 406–408.

Hernández, C. M. L., Ortíz, S. A. G., Muñoz, D. L., Planell, C. B. O., Vázquez, M. A. G., Todd, M. T. C., & Henríquez, J. B. H. E. (2011). Determinación de clenbuterol en el ganado bovino de la ciudad de Xalapa, Veracruz, México. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 11(2), 28–31.

INEGI. (2016). Estadísticas a propósito de... la industria farmacéutica. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825088583.pdf

Inserto del Kit RIDASCREEN® Clenbuterol de R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania (2019). Inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de Clenbuterol y otros β -agonistas.

NOM-194-SSA1-2004 Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.

Pérez-Zazueta, G. & Quiroga, G. (2013). Industria Farmacéutica. *PRO MÉXICO*. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820_DS_Farmaceutica_ESP.pdf

R-Biopharm. (2019). Inserto del Kit RIDASCREEN® Clenbuterol

SADER. (2020). Previene Agricultura uso de clenbuterol para la engorda de ganado bovino. Comunicado. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/previene-agricultura-uso-de-clenbuterol-para-la-engorda-de-ganado-bovino-231980#:~:text=El%20clenbuterol%20es%20un%20agente,los%20bovinos%20y%20otras%20especies.>

Secretaría de Salud. (2020). Laboratorios con reconocimiento por parte de la Secretaría de Salud de México (InDRE), para realizar el diagnóstico de COVID 19, con fines de Vigilancia Epidemiológica. Recuperado de: <https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/Mexico/pt-br/file/LABORATORIOS%20MEXICO%20.pdf>

Secretaría de Salud. (2022). Apéndice III. Validación de Métodos Analíticos. Recomendaciones para su Presentación ante la FEUM. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 13° Ed. Vol. 1.

UGRJ. (2022). PRODUCTORES. *UGRJ – Producción*. Recuperado de: http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=138&Itemid=228#:~:text=La%20poblaci%C3%B3n%20ganadera%20es%20estimada,litros%20de%20leche%20al%20d%C3%ADa.

1.8. Anexos generales

Anexo 1. Extracto modificado del PNO y del Protocolo de verificación del ensayo inmunoenzimático para el análisis de clenbuterol.

OBJETIVO

Realizar la verificación del método de prueba para la determinación cuantitativa de clenbuterol mediante un inmunoensayo enzimático competitivo a través del diseño y desarrollo de pruebas documentadas.

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Usar el equipo de protección personal (bata, cubre pelo desechable, calzado para laboratorio y guantes de nitrilo sin talco), mantener el área de trabajo limpia y ordenada, etiquetar todas las soluciones y reactivos para evitar contaminaciones.

FUNDAMENTO

El clenbuterol pertenece al grupo de los β -agonistas, son adecuados como mejoradores del rendimiento en el campo de la producción ganadera. En particular, se puede mejorar la relación carne-grasa en animales de engorda o acelerar su crecimiento. Sin embargo, dichos compuestos no han sido autorizados como adyuvantes de engorda, hasta el momento, la NOM-194-SSA1-2004 establece que los productos de ganado bovino deben estar libres de clenbuterol. Además de sus efectos lipolíticos y anabólicos, el clenbuterol tiene un efecto relajante en músculo liso, por esto se le da uso terapéutico como agente antiasmático y tocolítico. Cuando el clenbuterol se utiliza como adyuvante de engorda es administrado en dosis de 5 a 10 veces más altas que en su uso terapéutico. Por lo tanto, es posible que los residuos de clenbuterol, después de su uso en prácticas ilegales, puedan generar un riesgo a los consumidores.

En el mercado existen diversos kits de ELISA que ayudan a la detección de clenbuterol, el kit RIDASCREEN® de R-Biopharm es un ensayo ELISA competitivo capaz de detectar fragmentos de proteína grandes y pequeños con solo un punto de enlace. Por este motivo, el ensayo ELISA competitivo RIDASCREEN® demuestra una sensibilidad elevada y se puede utilizar en productos alimentarios muy procesados para la determinación cuantitativa de

clenbuterol como leche, carne, hígado, riñón, orina, plasma/suero, cabello, glóbulo ocular y alimentos. El kit RIDASCREEN® se basa en la interacción Ag-Ac, donde los pocillos están recubiertos con Ac de captura inmovilizados anti-anti-clenbuterol, la microplaca ya se encuentra funcionalizada con Ac anti-clenbuterol, que están unidos a los anticuerpos de captura. Los estándares, muestras, y el conjugado del clenbuterol son agregados a los pocillos, luego el clenbuterol libre y el conjugado con la enzima compiten por los sitios de unión en los Ac, en este punto todo el conjugado no unido es retirado en un paso de lavado. El conjugado unido convierte un cromógeno en un producto color azul, la adición de la solución de paro provoca un cambio de color azul a amarillo, ver Figura 1. Posteriormente, la lectura espectrofotométrica se realiza a 450 nm donde la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol en la muestra.

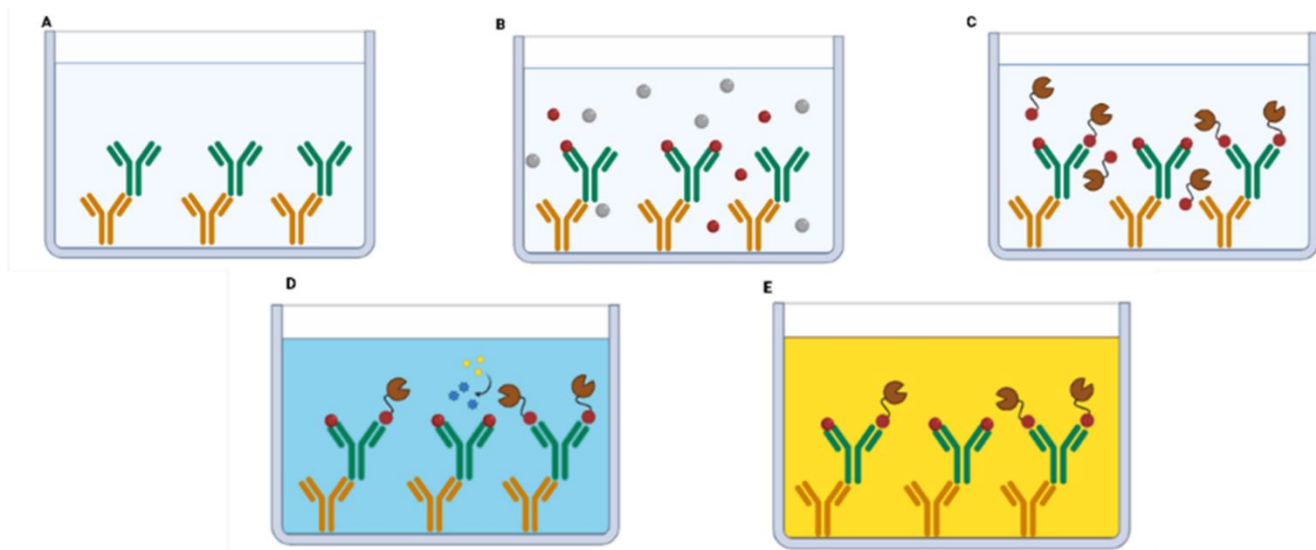


Figura 1. Representación de la ELISA. A) La placa está recubierta de Ac anti-anti-clenbuterol y funcionalizada con Ac anti-clenbuterol. B) El analito en la muestra interactúa selectivamente con los Ac. C) El conjugado compite por los sitios de unión en los Ac. D) La enzima en el conjugado cataliza el cambio de color en el sustrato. E) La solución de paro detiene la reacción para su posterior análisis.

MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS

MATERIALES
Nombre

Microtubos de 1.5 mL
Puntas de 1000 µL
Puntas de 100 µL
Puntas de 200 µL
Toallas de papel

REACTIVOS	
Nombre	Grado/Pureza
Kit RIDASCREEN® Clenbuterol	Biología molecular
Decolorante de Muestra RIDA® (R1699)	Biología molecular
Acetonitrilo	≥ 99%
n-Hexano	95%
Agua	MilliQ

EQUIPOS
Nombre
Lector de microplacas
Sistema Generador de Agua Ultrapura
INSTRUMENTOS
Nombre
Centrífuga
Micropipeta Monocanal 10-100 µL
Micropipeta Monocanal 100-1000 µL
Micropipeta Monocanal 20-200 µL
Micropipeta Multicanal 10-100 µL

MÉTODO

Los componentes del kit deben estar almacenados de 2 a 8 °C (no congelar). Antes de empezar la prueba comprobar que no haya una coloración azul en la solución sustrato/cromógeno y llevar todos los reactivos a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C.

1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

a. PREPARACIÓN DE BUFFER DE LAVADO 10 X

- Abrir la bolsa de sales que contiene el kit, pesar 10 g de sales y disolverlas en 100 mL de agua MilliQ en un frasco de 100 mL.
- Almacenar a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.

Nota: una vez preparado el buffer de lavado a una concentración 10 X, tiene una caducidad de 8 a 12 semanas.

b. PREPARACIÓN DE 100 mL DE BUFFER DE LAVADO 1 X

- Tomar 10 mL del buffer de lavado preparado a una concentración de 10 X y disolverlos en 90 mL de agua MilliQ para obtener buffer de lavado 1 X.
- Si utiliza la placa completa de 96 pozos, puede preparar todo el sobre de sales disolviendo los 10 g que contiene en 1 L de agua MilliQ para obtener buffer de lavado a una concentración 1 X.

Nota: Una vez preparado el buffer de lavado a una concentración 1 X, tiene una caducidad de 2 a 6 semanas.

c. PREPARACIÓN DE 800 µL DE DECOLORANTE DE MUESTRA RIDA® 1

- Hacer una dilución 1:4 de decolorante, en un microtubo de 1.5 mL, agregar 200 µL de decolorante de muestra RIDA® 1 y 600 µL de agua MilliQ.

Nota: Solo se utiliza el decolorante de muestra RIDA® 1 para procesar muestras de hígado y de carne

d. PREPARACIÓN DEL RESTO DE REACTIVOS

Nota: Atemperar de 20 a 25 °C los reactivos enlistados a continuación antes de su uso.

- Pocillos de microplaca (mantenerlos siempre dentro de su bolsa y retirar únicamente los pocillos a usar).
- Estándares 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
- Decolorante de muestra RIDA 2 y 3.
- Buffer de lavado 1 X.
- Conjugado.
- Sustrato/cromógeno.
- Solución de paro.

2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRA

a. PREPARACIÓN DE MUESTRA DE HÍGADO

- Tomar y cortar la muestra completa de hígado con un bisturí sobre una placa Petri.
- Introducir la muestra en un procesador de alimentos.
- Homogenizar hasta que queden trozos pequeños.
- Tomar 3 g de muestra e introducirlos en un tubo de 15 mL.
- Agregar 1.5 mL de acetonitrilo y agitar vigorosamente en vórtex por 10 s.
- Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Agitar en vórtex por 10 s.
- Centrifugar a 4,000 g por 10 min a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.
- Transferir 250 µL del sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL.
- Agregar 350 µL de Decolorante de Muestra RIDA® 1 diluido previamente y agitar con vórtex brevemente.
- Agregar 100 µL de Decolorante de Muestra RIDA® 2 y agitar con vórtex brevemente.
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 g por 2 min a temperatura ambiente.
- Agregar 50 µL de Decolorante de Muestra RIDA® 3 y mezclar cuidadosamente invirtiendo el tubo.
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 g por 2 min a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.
- Recuperar el sobrenadante ya que será la muestra que se utilizará en la ejecución de la prueba.
- Para la ejecución de la prueba utilizar 50 µL de muestra por pocillo.
- **Nota:** en caso de usar una centrifuga refrigerada establecer la temperatura de 20 a 25 °C.

b. PREPARACIÓN DE MUESTRA DE ORINA

- Diluir la muestra de orina 1:2 en buffer de lavado, al analizar las muestras por duplicado, preparar un volumen de 100 µL de muestra de orina diluida.
- Colocar 50 µL de orina + 50 µL de buffer de lavado (reactivo incluido en el kit) en un tubo de 1.5 mL para una dilución 1:2.
- Continuar con la ejecución de la prueba colocando 50 µL de la muestra previamente diluida (1:2) por pozo.

c. PREPARACIÓN DE MUESTRA DE CARNE (RES, PUERCO, AVES DE CORRAL)

- Tomar y cortar la muestra de carne con un bisturí sobre una placa Petri.
- Introducir la carne en un procesador de alimentos.
- Homogenizar hasta que queden trozos pequeños.
- Tomar 2 g de carne e introducirlos en un tubo de 15 mL.
- Añadir 6 mL de acetonitrilo a la carne homogeneizada y agitar vigorosamente en vórtex por 10 s.
- Agitar el tubo de 15 mL con la carne durante 15 min en vórtex con la tapa hacia abajo hasta homogeneizar completamente.
- Centrifugar a 3,000 g por 10 min a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.
- Transferir 4 mL del sobrenadante a un tubo de 15 mL.
- Dejar evaporar el sobrenadante hasta secar bajo una corriente débil de aire.
- Reconstituir el residuo seco con 2 mL de buffer de lavado.
- Para carne de res y puerco, utilizar 50 µL de muestra reconstituida en buffer de lavado por pocillo en la prueba.
- Para carne de aves de corral: añadir 1 mL de hexano a la muestra reconstituida con buffer de lavado, agitar en vórtex por 10 s, centrifugar 10 min a 3,000 g a temperatura ambiente de 20 a 25 °C y tomar 50 µL de la fase inferior para cada pozo en la ejecución de la prueba.

Nota: en caso de usar una centrifuga refrigerada establecer la temperatura de 20 a 25 °C.

3. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.

Nota: Siempre se deben analizar las muestras y los 6 estándares por duplicado. Seguir estrictamente el procedimiento de lavado, no permitir que los pocillos se sequen entre los pasos de trabajo.

- Cortar y colocar en la base de la microplaca la cantidad suficiente de pocillos considerando los 6 estándares que se deben procesar y la muestra a analizar (asegurarse de que los pocillos queden bien sujetos a la base de microplaca y no usar las orillas).
- Agregar 50 µL de cada estándar (del 1 al 6) a los pocillos designados (el estándar 1 será utilizado como Blanco).
- Agregar 50 µL de muestra en cada pozo según corresponda (muestra de leche previamente diluida 1:2).
- Incubar durante 30 min a temperatura ambiente de 20 a 25 °C en oscuridad.

- Verter el líquido de los pocillos sobre un papel absorbente y golpear 3 veces seguidas el soporte de los pocillos boca abajo para asegurar la eliminación completa del líquido.
- Agregar 250 μL de buffer de lavado 1 X utilizando una micropipeta multicanal y verter nuevamente el líquido de los pocillos, golpear 3 veces seguidas el soporte de los pocillos boca abajo sobre un papel absorbente para asegurar la eliminación completa del líquido. Repetir dos veces más este paso.
- Agregar 50 μL de conjugado a cada pocillo con una micropipeta multicanal.
- Agitar suavemente la placa sobre la mesa para mezclar.
- Incubar durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.
- Verter el líquido de los pocillos y golpear 3 veces seguidas el soporte de los pocillos boca abajo sobre un papel absorbente para asegurar la eliminación completa del líquido.
- Agregar 250 μL de buffer de lavado 1 X a cada pocillo con una micropipeta multicanal y verter el líquido de los pocillos golpeando 3 veces seguidas el soporte de los pocillos boca abajo sobre un papel absorbente para eliminar por completo el líquido. Repetir dos veces más este paso.
- Agregar 100 μL de Sustrato/cromógeno a cada pocillo.
- Agitar suavemente la placa sobre la mesa para mezclar.
- Incubar durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente de 20 a 25 °C.
- Agregar 100 μL de Solución de paro a cada pocillo.
- Agitar suavemente la placa sobre la mesa para mezclar.
- Medir la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas dentro de los 15 min después de agregar la Solución de paro.
- Analizar los resultados con el software RIDA@SOFT Win.

Nota: la absorbancia del estándar 1 (Blanco) debe ser mayor a 0.6 unidades de absorbancia, un valor menor a 0.6 indica inestabilidad o deterioro de los reactivos.

PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

4. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA Y LINEALIDAD

La repetibilidad del sistema son las pruebas utilizadas para medir la precisión de los resultados del método realizado en la rutina de trabajo en un intervalo corto de tiempo, verificando que el sistema cumple con los criterios de aceptación^(b).

- Realizar la curva de calibración del kit 3 veces por un analista (A, B y C), en la misma corrida y utilizando el mismo kit.
- Leer la densidad óptica (DO) en el lector de microplacas a 450 nm y procesar las lecturas en el software RIDA®SOFT Win.
- Calcular el promedio de las concentraciones (\bar{X}), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (%CV).
- Obtener el coeficiente de correlación (R^2) para evaluar la linealidad del sistema graficando concentración vs respuesta analítica (DO)

5. REPETIBILIDAD DEL ENSAYO Y RUIDO DE FONDO

La repetibilidad del ensayo, son las pruebas utilizadas para medir la precisión de los resultados del método realizado en la rutina de trabajo en un intervalo corto de tiempo, verificando que el método cumple con los criterios de aceptación.

- Realizar 6 repeticiones independientes de una muestra positiva (+) y 6 repeticiones de una muestra negativa (-), mismo analista y utilizando el mismo kit.
- Leer la densidad óptica (DO) en el lector de microplacas a 450 nm y procesar las lecturas en el software RIDA®SOFT Win.
- Calcular el promedio de las concentraciones (\bar{X}), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (%CV).
- El ruido de fondo estará dado por el %CV obtenido de la muestra negativa la cual debe tener concentraciones menores a 500 ppt.

6. REPRODUCIBILIDAD

La precisión intermedia expresa variaciones dentro de los laboratorios. Los factores por considerar deben incluir fuentes potenciales de variabilidad, por ejemplo, diferentes días, diferentes condiciones ambientales, diferentes analistas o diferentes equipos.

- Realizar 6 repeticiones independientes de una muestra positiva por 2 analistas en 2 días diferentes.
- Leer la densidad óptica (DO) en el lector de microplacas a 450 nm y procesar las lecturas en el software RIDA®SOFT Win.

- Calcular el promedio de las concentraciones (\bar{X}), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (%CV).

7. REPRODUCIBILIDAD USANDO MUESTRAS FORTIFICADAS

Se evaluará la precisión intermedia del laboratorio que ejecuta el método. Se utilizan muestras adicionadas con un estándar de referencia.

- Adicionar estándar de clenbuterol a 4 niveles de concentración (200, 300, 500 y 800 ppt) a 6 réplicas de muestras independientes de matriz (muestra negativa).
- Leer la densidad óptica (DO) en el lector de microplacas a 450 nm y procesar las lecturas en el software RIDA®SOFT Win. Graficar resultados.
- Calcular el promedio de las concentraciones (\bar{X}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (%CV).

8. PORCENTAJE DE RECOBRO

- Adicionar estándar de clenbuterol a una muestra negativa para obtener 4 niveles: 150, 300, 500 y 2000 ppt
- Realizar 6 repeticiones independientes.
- Leer y procesar las lecturas en el software RIDA®SOFT Win.
- Calcular media (\bar{X}), desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (%CV).

Anexo 2. Constancia de capacitación en “Análisis de Clembuterol mediante la prueba RIDASCREEN(R) ELISA”.



2. Productos

Nombre y código del PAP	PAP 4F04. Programa para mejoramiento de la calidad, productividad y logística en la industria regional i
Nombre del proyecto	Protocolo de Verificación de un método inmunoenzimático de análisis de clenbuterol utilizando el Kit RIDASCREEN® Clenbuterol por ELISA
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se entregó un protocolo de verificación de un método inmunoenzimático para la detección de clenbuterol. Este contiene información sobre el método, el procedimiento para realizarlo y los parámetros de desempeño que se deben de cumplir.
Autores:	Yuridia Hernández Vázquez & Alejandro Flores Arias

Nombre y código del PAP	PAP 4F04. Programa para mejoramiento de la calidad, productividad y logística en la industria regional i
Nombre del proyecto	Procedimiento Normalizado de Operación del Método inmunoenzimático para el análisis de Clenbuterol utilizando el kit RIDASCREEN® Clenbuterol por ELISA

Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se escribió un PNO para la implementación del análisis de clenbuterol con un kit autorizado, para realizar el análisis cuando sea solicitado por un cliente y para realizar la prueba de aptitud de SADER para que CENEBA sea reconocido como un laboratorio tercero autorizado, con esta prueba registrada dentro de sus servicios.
Autores:	Yuridia Hernández Vázquez & Alejandro Flores Arias

A continuación, se describe el contenido del del Protocolo de verificación y el PNO, omitiendo algunas secciones por motivos de confidencialidad:

La sección de objetivos describe el objeto del protocolo dependiendo si se trata del protocolo de verificación o el PNO. También aquí se describen las medidas de seguridad que se deben tomar al seguir el procedimiento.

Después, se describe el fundamento del método, describiendo la problemática del clenbuterol y el funcionamiento de una ELISA competitiva, con los específicos del kit, acompañado de una imagen que ilustra el método (Anexo 1). Esta sección se basó principalmente en el fundamento del método que contiene el inserto del kit (R-Biopharm, 2019).

Posteriormente, se acomodaron en tablas los materiales, reactivos, equipos e instrumentos que se requieren para la prueba, con sus especificaciones y códigos internos para identificarlos. En la siguiente sección se describen los métodos para ejecutar la prueba según la metodología que contiene el inserto del kit, empezando por el manejo apropiado de los reactivos y la preparación de todas las soluciones necesarias: la preparación del buffer de lavado que viene separado en las sales y el buffer con las instrucciones para reconstituirlo y almacenarlo, el decolorante de muestra RIDA® 1, que es necesario para el pretratamiento de las muestras de hígado, se tiene que diluir, ya que está a una concentración de 10X, además, se tienen que llevar todos los demás reactivos a temperatura ambiente.

El pretratamiento de la muestra varía según el tipo de muestra: para muestras de hígado se tiene que homogenizar una cantidad determinada, después se realiza una extracción líquido-líquido usando acetonitrilo, y finalmente se tienen que agregar los 3 reactivos decolorantes para que el color del tejido no interfiera con las mediciones espectrofotométricas del análisis. Para una muestra de músculo se utiliza un procedimiento similar: se homogeniza la muestra y se hace una extracción con acetonitrilo, pero se tiene que evaporar la fase que contiene el analito para poderse resuspender en un volumen más pequeño de buffer de lavado; en caso de la carne de ave se tiene que realizar una extracción adicional utilizando hexano. Las muestras líquidas no requieren pretratamiento, solamente una dilución 1:2 en todos los casos (orina, sangre/suero) excepto en leche, donde se utiliza directamente.

Para realizar el método de análisis se tienen que recortar los pocillos que se utilizarán para acomodarlos en la placa, después se agregan los estándares que incluye el kit para construir una curva de calibración y las muestras a analizar por duplicado. Se incuba la placa a temperatura ambiente y se vacían los pocillos, después se realizan 3 lavados con buffer. A continuación, se agrega el conjugado a todos los pocillos, se incuba a temperatura ambiente, en oscuridad, y se realizan los 3 lavados. Después se agrega el sustrato/cromógeno, se incuba a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente se agrega la solución de paro y se lee en el espectrofotómetro.

La siguiente sección contiene los parámetros de desempeño para la verificación en el caso del protocolo de verificación, estos se basan en el protocolo de validación de la CCAYAC (2017) para la misma prueba. Se evalúan 7 parámetros en 5 pruebas diferentes:

- Repetibilidad del sistema: se realiza por triplicado la curva de calibración del kit y se obtienen las medias (\bar{x}), desviaciones estándar (s) y coeficientes de variación (CV).
- Repetibilidad del ensayo y ruido de fondo: se realiza un ensayo utilizando una muestra positiva (adicionada con el estándar de clenbuterol) por sextuplicado y una muestra negativa también por sextuplicado, se obtiene \bar{x} , s y CV.
- Reproducibilidad: 2 analistas realizan la prueba por sextuplicado a una muestra positiva en 2 días diferentes. Se obtiene \bar{x} , s y CV.

- Reproducibilidad con muestras fortificadas: Se adiciona estándar de clenbuterol a las muestras para tener 4 niveles diferentes de concentración y se analiza por sextuplicado. Se obtiene \bar{x} , s y CV de cada uno.
- Porcentaje de recobro: Se adiciona estándar de clenbuterol a las muestras para tener 4 niveles diferentes de concentración y se analiza por sextuplicado. Se obtiene \bar{x} , s y CV de cada uno.

La siguiente sección contiene los criterios de aceptación para las pruebas anteriores, estos se basan en el coeficiente de variación de los resultados y muestran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** En el caso del PNO no se cuenta con la sección de indicadores de desempeño, solamente se verifica que se cumplan los criterios de aceptación de la Tabla 3.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Cuando empecé a realizar mis actividades del PAP, me fui familiarizando con el lugar donde se encuentra CENEBA y con las demás personas que trabajan dentro de la empresa. En la zona algunas personas realizan actividades primarias como ganadería, otras trabajan en las empresas que se establecieron en la zona como CENEBA o Laboratorios Pisa, y otras establecieron negocios que dependen del flujo que existe hacia la localidad por la presencia de estas mismas empresas, o que van de paso con otro destino.

Esto me hizo darme cuenta del impacto que tienen estas empresas y su desarrollo en la vida de las personas que viven a su alrededor, ya que abren más opciones de las actividades económicas que se pueden desempeñar en la zona. Al implementar un proyecto PAP en una de estas empresas se promueve su desarrollo, que termina impactando en la economía de la

zona y las personas que la habitan, ya que crea oportunidades de empleo y atraen visibilidad para que se mejore la infraestructura.

Al ir conociendo más a las personas que trabajan dentro de la empresa se pudo observar que la carga de trabajo se relaciona con su bienestar físico y mental, en especial en áreas donde hay poco personal. La presencia de apoyo de proyectos que aportan recursos humanos, como este PAP, tiene un impacto positivo dentro de la empresa, ya que se puede distribuir una parte de la carga de trabajo dentro del laboratorio, facilitando el cumplimiento de plazos y actividades de otra manera pudieran tener un impacto negativo en su bienestar.

Hablando específicamente del objetivo del proyecto, que atiende al problema de la poca disponibilidad de pruebas de clenbuterol, implementar esa prueba puede tener un impacto positivo a nivel estatal. Una de las dificultades que se encontró durante el proyecto fue que se encontró clenbuterol en la muestra de orina de un productor local que no estaba enterado de esta situación, esto reitera la importancia de la problemática sobre la que se planteó el proyecto, recordando que la situación representa un riesgo para el consumidor y que contribuir a la solución beneficia a todas las personas de la región que consumen productos provenientes de la industria ganadera.

3.2 Aprendizajes logrados

Al trabajar en este PAP uno de los primeros retos que enfrenté fue adaptarme al Sistema de Gestión de Calidad de la empresa, ya que necesitaba contar con las capacitaciones correspondientes antes de realizar cualquier actividad. El aspecto que representó un reto mayor para mí fue la documentación, es decir, el llenado de bitácoras de uso de equipos y de registro de actividades, ya que no estaba acostumbrado a hacer este tipo de registros ni a la forma en la que se hacía dentro de la empresa. Sin embargo, con asesoramiento, capacitaciones y práctica logré adaptarme a esta actividad y reconocer su importancia. De esta manera podré aplicar las buenas prácticas de documentación en mi vida académica y profesional.

Otro aprendizaje que tuve fue la forma en la que se trabaja en un laboratorio de análisis ya que, al estar participando gran parte del tiempo en actividades necesarias para el funcionamiento general del laboratorio, adicional al trabajo dentro de mi proyecto, conocí

cómo es la dinámica de trabajo y la relación entre áreas. Esta forma de trabajo probablemente aplica a otras empresas con un giro y estructura similar, por lo que estos conocimientos me podrían ayudar en un futuro trabajando en una empresa similar, facilitando la adaptación y mejorando la eficiencia de mi trabajo.

Dentro del proyecto también aprendí a adaptarme a los cambios que se presentaron y representaban un riesgo para la correcta realización de mi proyecto, ya que la planeación de las actividades cambiaba de acuerdo con la urgencia de algún servicio, de alguna actividad interna del laboratorio, o del retraso de los materiales necesarios para realizar la parte experimental del proyecto. Esto requirió que adquiriera cierta adaptabilidad para cumplir los objetivos del proyecto y al mismo tiempo realizar las actividades que la empresa requiriera. Dentro del trabajo en el área desarrollé conocimientos y habilidades sobre las distintas técnicas que se realizan en el área donde trabajé. El proyecto me permitió aprender a realizar una ELISA, ya que previamente en clase de inmunología solamente había tenido la oportunidad de aprender la teoría. Esto fomentó que aprendiera sobre las consideraciones prácticas que se tienen al momento de realizar una ELISA, además de la operación y requerimientos específicos del kit que se utilizó para el proyecto. Además de esto adquirí más práctica en técnicas de biología molecular como PCR y electroforesis; y en el manejo de cultivos celulares, gracias a otros proyectos que se realizaron en el área durante mi estadía en la empresa. Estos proyectos reforzaron mi conocimiento para técnicas de pipeteo para estudios muy sensibles a las variaciones, me ayudaron a familiarizarme con la forma en que se realizan reacciones y técnicas analíticas en microplaca, además, el resto de las actividades en el laboratorio me ayudaron a reforzar el uso de material volumétrico y los procedimientos para su verificación.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Tabla 4. Inventario de competencias. En azul aquellas que se desarrollaron con este PAP y en verde las que se adquirieron.

Competencia		Evidencia	Relevancia/Fortaleza*
C o n	Cinética microbiana	Proyecto final de Cinética Química y Microbiana, y de Ingeniería en Biorreactores	La caracterización de cepas y procesos es necesario en mi área

Inglés	TOEFL iBT Comprobante de intercambio académico con materias en inglés	El idioma facilita la obtención de información, la comunicación entre colaboradores, clientes y otras personas involucradas.
Biología molecular	Materias “Biología Molecular”, “Ingeniería Genética y Regulación” e Intercambio académico	La biología molecular es cada vez mas importante en el campo de la biotecnología y es necesario tener conocimientos del tema como base de las nuevas tendencias.
Diseño de experimentos	Materia “Diseño de Experimentos” Proyecto final de Cinética Química y Biológica	El diseño de experimentos es una herramienta muy útil para la mejora y optimización de procesos.
Ingeniería en Biorreactores	Materia “Ingeniería en Biorreactores” Taller de Fermentación Microbiana	Los biorreactores son el corazón de los bioprocesos y tener conocimiento en su diseño y operación es importante para el diseño e implementación del proceso.
Microbiología, cultivo de tejidos vegetales y animales.	Materias de la carrera.	Es muy importante tener la capacidad de manipular a los principales organismos con los que trabaja la biotecnología.
Bioprocesos	Materias cursadas en la carrera y el intercambio	Se debe de tener conocimientos de diseño e implementación de bioprocesos para ofrecer cualquier producto o servicio.
Buenas Prácticas de Documentación	Capacitaciones realizadas dentro de la empresa	Las BPD facilitan la trazabilidad de las actividades que se realizan, algo esencial durante una auditoría y facilita la resolución de problemas.
Ensayos ELISA	Este documento y una capacitación externa	Una ELISA es una técnica que se utiliza para detectar muchas biomoléculas, por lo que conocer su ejecución es una herramienta útil para el biotecnólogo.
Verificación de material volumétrico	Capacitaciones dentro de la empresa	Asegurarse que el material volumétrico cumple su función correctamente es indispensable cuando se está ofreciendo un servicio, además, existen ensayos donde pequeñas variaciones

			pueden tener un gran impacto en los resultados
	Pipeteo con pipeta multicanal	Proyectos trabajados en la empresa	Es un instrumento comúnmente utilizado para pruebas en placa y el procesamiento de muchas muestras, la práctica de su uso es importante antes de realizar cualquiera de estas pruebas.
H a b i l i d a d e s	Destreza en el laboratorio	Título de Tecnólogo Químico en Fármacos, formación en la carrera	El laboratorio es un área de trabajo usual para el biotecnólogo.
	Trabajo en equipo	Competencias desarrolladas en proyectos y prácticas.	En la actualidad es una habilidad indispensable en el ámbito profesional y académico.
	Ser cuidadoso	Competencia adquirida en las prácticas en la carrera	Es importante para el éxito de operaciones delicadas.
	Capacidad de planeación	Proyectos desarrollados en la carrera.	Permite la administración eficiente del tiempo y recursos en un proyecto.
	Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)	Documentos generados en la carrera.	El buen manejo de estas herramientas es básica y muy importante para el ámbito profesional.
	Capacidad de síntesis	Revisiones bibliográficas realizadas en las distintas materias.	Reconocer los puntos clave de la información ayuda a entenderla mejor, comunicarla y utilizarla.
	Pensamiento crítico	Competencia desarrollada a lo largo de la carrera.	Ayuda a discriminar la información y evitar tomar decisiones sesgadas.
	Adaptabilidad	Trabajo dentro de la empresa	En un medio donde las necesidades provocan cambios constantes en la planeación es necesario adaptar esos planes para cumplir con todos los objetivos planteados
A c t i v i d a d e s	Resolutivo	Éxito en la resolución de los problemas que se me han presentado a lo largo de mi formación.	Es importante plantear estrategias teniendo en cuenta el enfoque a resolver una problemática para llegar a una solución de la manera más eficiente.
	Práctico	La forma en la que he realizado el trabajo durante mi carrera.	Cuando varias soluciones cumplen todos los requerimientos se debe reconocer la que involucre menor tiempo, dinero y/o complejidad.
	Honesto	Valor inculcado en mí desde mi formación en casa.	Es importante desempeñarse éticamente en el ámbito académico y profesional.

	Disciplinado	Valor inculcado a través del trabajo escolar y los deportes.	Permite lograr objetivos más complejos a largo plazo.
--	--------------	--	---

Mis principales fortalezas son mis habilidades técnicas en mi área y mi enfoque práctico a resultados, a través de una buena planeación para cumplir mis objetivos, además soy perseverante para llegar a cumplirlos. Cuando surgen problemas generalmente me doy a la tarea de buscar una solución e implementarla, sin embargo, la mayoría del tiempo no asumo el liderazgo ni soy tan propositivo antes de que surja un problema, haciéndome parecer no proactivo. Otra debilidad es la falta de organización de tiempo que a veces provoca que no se pueda ejecutar correctamente la planeación establecida, generando retrasos en las distintas etapas de un proyecto.

Este proyecto desarrolló mis habilidades (Tabla X) ya las puse en práctica para lograr los objetivos del proyecto y desempeñar distintas actividades dentro de la empresa. Algunas de estas fueron esenciales para que los proyectos que se desarrollaron dentro del área se realizaran correctamente, incluyendo el PAP. También adquirí conocimientos y habilidades nuevas gracias a que fueron requeridas durante mi estadía en la empresa, desde para poder desarrollar mis actividades regulares en el laboratorio, hasta cosas que tienen un alto impacto en este y otros proyectos del área.

3.4 Dimensión persona

Cuando inscribí el PAP no esperaba tener este espacio de reflexión, pero después, conforme fui asistiendo a las sesiones y realizando los ejercicios propuestos me di cuenta de lo importante que era cerrar ciclos para poder empezar los siguientes sin arrastrar nada. Me di cuenta de lo mucho que me había afectado la pandemia tanto a nivel personal como académico y tuve la oportunidad de cerrar ese ciclo.

También estas sesiones me recordaron la importancia de desarrollar pensamiento autónomo y criterio propio para tomar decisiones que determinen el curso de mis acciones y que esas acciones construyan el futuro que quiero para mí.

Las actividades que realizamos me hicieron darme cuenta de la importancia del momento en el que estoy de mi vida, cerrando mi formación a nivel licenciatura y a punto de tomar

decisiones que marcaran el resto de mi vida profesional, las cuales es importante que me tome el tiempo de reflexionar y tomar de forma consciente.