

**FORTALECIMIENTO DE COMPETENCIAS INVESTIGATIVAS EN DOCENTES EN
FORMACIÓN A TRAVÉS DEL ABI: EL ESTUDIO DE ANTIBIÓTICOS EN AGUA
SUPERFICIAL Y LECHE BOVINA**

ANDREA YULIANA BONILLA ROJAS

JOHAN CAMILO PINZÓN LEÓN

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

BOGOTÁ D.C.

2024

**FORTALECIMIENTO DE COMPETENCIAS INVESTIGATIVAS EN DOCENTES EN
FORMACIÓN A TRAVÉS DEL ABI: EL ESTUDIO DE ANTIBIÓTICOS EN AGUA
SUPERFICIAL Y LECHE BOVINA**

ANDREA YULIANA BONILLA ROJAS

JOHAN CAMILO PINZÓN LEÓN

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

DIRECTORA

DORA LUZ GÓMEZ AGUILAR

Dr. Desarrollo sostenible

CODIRECTORA

NOHORA MARLEN ARIAS VARGAS

Mg. En enseñanza de ciencias exactas y
naturales

ASESORA DE INVESTIGACIÓN

BIBIANA CHAVARRO PORTILLO

Dr. Biotecnología

UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

BOGOTÁ D.C.

2024

Dedicatoria.

A mis padres, Mercedes Rojas y Alberto Bonilla, por su amor incondicional y apoyo constante; a mis hermanas, Diana, Sofía y Eva, por su compañía y aliento; y a mi pueblo, por inspirarme y ser una fuente constante de motivación y orgullo.

- Andrea Yuliana Bonilla Rojas

A las personas de las que he recibido su amor y apoyo durante estos años especialmente a mi mamá María León, a mi papá Leovigildo Pinzón, a mi hermana Heidy Pinzón y a mi pareja Angie Meléndez.

- Johan Camilo Pinzón León.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Pedagógica Nacional, no solo por brindarnos sus instalaciones para este proyecto, sino también por formarnos como docentes y personas durante los últimos cinco años. Agradecemos a nuestra directora, codirectora y asesora de investigación por su invaluable guía y apoyo. También queremos reconocer al señor Nelson y a su madre Teresa por permitirnos realizar la toma de muestras en su finca, así como al personal y a la analista del laboratorio del Departamento de Química de la Universidad Pedagógica Nacional por su apoyo en el trabajo de laboratorio y en la manipulación de equipos. Agradecemos a los estudiantes del Énfasis Disciplinar I por la oportunidad de formar parte de su proceso de aprendizaje y ellos del nuestro. A aquellos amigos que hemos encontrado en este camino, quienes nos han acompañado y han contribuido a nuestro desarrollo con su conocimiento y calidez. Finalmente, queremos expresar nuestro agradecimiento al laboratorio central de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitirnos acceder a sus recursos y brindarnos su apoyo profesional en microbiología, así como a los trabajadores de estas instalaciones por su amabilidad y trabajo.

Tabla de Contenido

1. Introducción	10
2. Justificación.....	11
3. Planteamiento del problema	12
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos específicos	13
5. Antecedentes.....	13
5.1 Antecedentes Didácticos	13
5.1.1 Antecedentes Internacionales	14
5.1.2 Antecedentes Locales	16
5.2 Antecedentes Disciplinarios	16
5.2.2 Antecedentes Internacionales	16
5.2.3 Antecedentes Nacional.....	17
5.2.4 Antecedentes Locales	18
6. Referentes conceptuales	18
6.1 Referentes pedagógicos	18
6.1.1 Secuencia Didáctica	18
6.1.2 Aprendizaje Basado en Investigación (ABI).....	19
6.1.3 ¿Qué es la investigación en el ABI?	19
6.1.4 Fases del ABI	20
6.1.5 Competencias Investigativas.	21
6.2 Referentes disciplinares	22
6.2.1 Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE's).....	22
6.2.2 Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF)	22
6.2.3 Antibióticos y su uso veterinario	24
6.2.4 Antibiograma.....	26
6.2.5 La leche cruda	28
6.2.6 Técnica Analítica de Cromatografía Líquida De Alto Rendimiento (HPLC). 31	
7. Metodología de la investigación.....	31
7.1 Enfoque metodológico.....	31
7.2 Población y Muestra.....	32
7.3 Fases de la Investigación.....	32
7.3.1 Fase I Recolección de muestras y análisis de calidad	33

7.3.2	Fase II. Pruebas de Sensibilidad en cepas bacterianas ATCC	37
7.3.3	Fase III. Diseño, validación e implementación de la secuencia didáctica.	40
7.4	Criterios de evaluación	45
8.	Resultados y Análisis.	45
8.1	Fase I de investigación	46
8.1.1	Resultados curva de calibración Penicilina G	46
8.1.2	Resultados curva de calibración Amoxicilina	49
8.2	Fase II de investigación.....	51
8.2.1	Antibiogramas por el método Difusión en disco.	52
8.2.2	Antibiogramas por el método Dilución en agar.	54
8.3	Fase III de investigación	57
8.3.1	Actividad inicial o diagnóstica.	57
8.3.2	Actividad 1. Bioacumulación y calidad de la leche.	72
8.3.3	Actividad 2. Métodos de análisis de sensibilidad bacteriana.	77
8.3.4	Actividad 3. Propuesta análisis de residuos de antibióticos en leche y agua ...	79
8.3.5	Actividad 4. Práctica para análisis de antibióticos por HPLC	83
8.3.6	Actividad Final.....	85
9.	Conclusiones.....	104
10.	Sugerencias.....	105
11.	Referencias	106
12.	Anexos	113
	Anexo 1. Medicamentos empleados en la Finca	113
	Anexo 2. Actividad de inicio	114
	Anexo 3. Lecturas bioacumulación de antibióticos	117
	Anexo 4. Infografía ciclo de bioacumulación de antibióticos	118
	Anexo 5. Actividad interactiva: Sensibilidad bacteriana	119
	Anexo 6. Vídeo práctica microbiológica y resultados	120
	Anexo 7. Propuesta para análisis de antibióticos por HPLC	121
	Anexo 8. Vídeo recolección de muestras	123
	Anexo 9. Vídeo técnica y cálculos HPLC	123
	Anexo 10. Guía de práctica de laboratorio	124
	Anexo 11. Actividad de cierre	129
	Anexo 12. Formato validación de la secuencia didáctica.....	131

Lista de tablas

Tabla 1.	Definición de las fases del ABI.....	20
Tabla 2.	Propiedades químicas y físicas de Amoxicilina y Penicilina G.	26
Tabla 3.	Parámetros de calidad de la leche cruda analizada	29
Tabla 4.	Condiciones Cromatográficas usadas para Penicilina G.....	36
Tabla 5.	Condiciones Cromatográficas usadas para Amoxicilina.....	37
Tabla 6.	Métodos microbiológicos.....	38
Tabla 7.	Concentraciones para el método de dilución en agar.	39
Tabla 8.	Zonas de siembra bacteriana.	40
Tabla 9.	Descripción de las actividades secuencia didáctica	42
Tabla 10.	Observaciones de los validadores.	44
Tabla 11.	Rúbrica de evaluación	45
Tabla 12.	Datos de la curva de Calibración de Penicilina G.....	46
Tabla 13.	Cromatogramas de patrones de Penicilina G	47
Tabla 14.	Cromatogramas de muestras faseadas con Penicilina G	47
Tabla 15.	Concentraciones muestras falseadas con Penicilina G.....	48
Tabla 16.	Datos curva de calibración Amoxicilina.	49
Tabla 17.	Cromatogramas de patrones de Amoxicilina	50
Tabla 18.	Cromatogramas de muestras faseadas con Amoxicilina.....	50
Tabla 19.	Concentraciones muestras falseadas con Amoxicilina.....	51
Tabla 20.	Resultados antibiogramas por difusión en disco	52
Tabla 21.	Diámetro del halo de inhibición por difusión en disco.	53
Tabla 22.	Resultados de antibiogramas con Penicilina G por dilución en agar.	54
Tabla 23.	Antibiogramas con Penicilina G por dilución en agar.	55
Tabla 24.	Resultados de antibiogramas con Amoxicilina por dilución en agar	55
Tabla 25.	Antibiogramas con Amoxicilina por dilución en agar	56
Tabla 26.	Datos estadísticos de la encuesta tipo Likert, actividad diagnóstica.....	58
Tabla 27.	Resultados actividad interactiva: antibiogramas	78
Tabla 28.	Cromatogramas Penicilina G de las muestras problema	83
Tabla 29.	Cromatogramas Amoxicilina de las muestras problema.....	84
Tabla 30.	Datos estadísticos de la encuesta tipo Likert, actividad final.....	87
Tabla 31.	Nivel de desempeño de la Dimensión actitudinal.	97
Tabla 32.	Nivel de desempeño del Componente Conceptual.....	99
Tabla 33.	Nivel de desempeño de la dimensión procedimental.	102

Lista de imágenes

Imagen 1.	Tipos de ABI	20
Imagen 2.	Relación residuos de antibióticos en leche y agua	24
Imagen 3.	Formula estructural de los betalactámicos	25
Imagen 4.	Estructura molecular Amoxicilina	26
Imagen 5.	Estructura molecular Penicilina	26
Imagen 6.	Fases de investigación	33
Imagen 7.	Esquema siembra bacteriana.	40
Imagen 8.	Esquema difusión en disco	40
Imagen 9.	Fases de la secuencia didáctica	41
Imagen 10.	Cromatograma Penicilina G 2 ppm	47
Imagen 11.	Cromatograma Penicilina G 100 ppm	47
Imagen 12.	Cromatograma MFP leche 2	47
Imagen 13.	Cromatograma MFP leche 3	47
Imagen 14.	Cromatograma MFP leche 5	47
Imagen 15.	Cromatograma MFP agua	47
Imagen 16.	Cromatograma patrón de 10 ppm.....	50
Imagen 17.	Cromatograma patrón de 100 ppm.....	50
Imagen 18.	Cromatograma MFA leche 2.....	50
Imagen 19.	Cromatograma MFA leche 3.....	50
Imagen 20.	Cromatograma MFA leche 5.....	51
Imagen 21.	Cromatograma MFA agua.....	51
Imagen 22.	Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 976 y 29213.....	52
Imagen 23.	Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 1026 y 977	52
Imagen 24.	Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 6538 y 25923.....	52
Imagen 25.	Halos de inhibición cepas <i>S. pyogenes</i> 19615 y <i>S. agalactiae</i>	52
Imagen 26.	Dilución en agar Penicilina G 1 µg/mL	55
Imagen 27.	Dilución en agar Penicilina G 16 µg/mL	55
Imagen 28.	Dilución en agar Penicilina G 32 µg/mL	55
Imagen 29.	Dilución en agar Penicilina G 64 µg/mL	55
Imagen 30.	Dilución en agar Amoxicilina 0,5 µg/mL	56
Imagen 31.	Dilución en agar Amoxicilina 4 µg/mL	56
Imagen 32.	Dilución en agar Amoxicilina 8 µg/mL	56
Imagen 33.	Dilución en agar Amoxicilina 32 µg/mL	56

Imagen 34.	Conceptos para definir	59
Imagen 35.	Esquema jerárquico de conceptos E1.....	62
Imagen 36.	Esquema jerárquico de conceptos E5.....	63
Imagen 37.	Identificación de grupos funcionales E 1	64
Imagen 38.	Identificación de grupos funcionales E 2	64
Imagen 39.	Identificación de grupos funcionales E5	65
Imagen 40.	Esquema bioacumulación de antibióticos G 1	73
Imagen 41.	Esquema bioacumulación de antibióticos G 2	74
Imagen 42.	Pregunta opción múltiple 1	78
Imagen 43.	Pregunta opción múltiple 2	78
Imagen 44.	Nube de palabras sobre antibiogramas.....	78
Imagen 45.	Caso por dilución en agar.....	78
Imagen 46.	Caso por difusión en disco	78
Imagen 47.	Análisis de resultados por estudiante	79
Imagen 48.	Reactivos y materiales penicilina G 1	80
Imagen 49.	Diseño experimental penicilina G 1	81
Imagen 50.	Condiciones cromatográficas G 1	81
Imagen 51.	Reactivos y materiales Amoxicilina G 2.....	82
Imagen 52.	Diseño experimental Amoxicilina G 2.....	82
Imagen 53.	Condiciones cromatográficas G 2	82
Imagen 54.	Reactivos y materiales G 3.....	83
Imagen 55.	Condiciones cromatográficas G 3	83
Imagen 56.	Cromatograma MPP leche 1	83
Imagen 57.	Cromatograma MPP leche 2	83
Imagen 58.	Cromatograma MPP leche 3	84
Imagen 59.	Cromatograma MPP leche 4	84
Imagen 60.	Cromatograma MPP leche 5	84
Imagen 61.	Cromatograma MPP agua	84
Imagen 62.	Cromatograma MPA leche 1.....	84
Imagen 63.	Cromatograma MPA leche 2.....	84
Imagen 64.	Cromatograma MPA leche 3.....	85
Imagen 65.	Cromatograma MPA leche 4.....	85
Imagen 66.	Cromatograma MPA leche 5.....	85
Imagen 67.	Cromatograma muestra agua.....	85

Imagen 68.	2 Caso de inmersión - E 2 parte A.	91
Imagen 69.	2 Caso de inmersión - E 4 parte A	91
Imagen 70.	Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E2	95
Imagen 71.	Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E4	96
Imagen 72.	Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E8	96

Lista de gráficos

Gráfico 1.	Curva de calibración de Penicilina G	46
Gráfico 2.	Curva de calibración Amoxicilina.....	49
Gráfico 3.	Resultados escala tipo Likert dimensión actitudinal	57
Gráfico 4.	Niveles alcanzados en la actividad de inicio - Dimensión actitudinal.	70
Gráfico 5.	Niveles alcanzados en la actividad de inicio – Dimensión conceptual.	70
Gráfico 6.	Niveles alcanzados en la actividad de inicio - Dimensión procedimental.	71
Gráfico 7.	Respuesta de encuesta tipo Likert - Actividad final.....	86
Gráfico 8.	Niveles alcanzados en la actividad final - Dimensión actitudinal.....	98
Gráfico 9.	Niveles alcanzados en la actividad final – Dimensión conceptual.....	100
Gráfico 10.	Niveles alcanzados en la actividad final – Dimensión procedimental.	103

Introducción

Los Contaminantes Orgánico-Emergentes (COE's) abarcan sustancias sintéticas y naturales que pueden afectar tanto la salud humana como el medio ambiente. Estas pueden ingresar por diferentes vías de exposición como inhalación, contacto dérmico, ingestión de agua y consumo de alimentos (Nascimento et al. 2015). Dentro de la categoría de COE's, se encuentran los Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF), que son detectables en agua, suelo, aire y alimentos. Según García-Rincón (2022) los RPF tienen origen en diversas fuentes, tales como hospitales, farmacias, veterinarias, agroindustrias, hogares y Centros de Atención y Valoración de fauna silvestre (CAV).

Los residuos de antibióticos, incluidos en los RPF, derivan del uso de medicamentos para tratar infecciones y enfermedades causadas por microorganismos en animales (Sanchez, 2017). Estos medicamentos rara vez se metabolizan completamente en el organismo, lo que lleva a su eliminación a través de la orina y las heces. En bovinos, estos residuos también pueden encontrarse en la leche cruda, que, después de un proceso industrial, se comercializa (Aytenfsu et al., 2016). Además, los desechos excretados que contienen RPF pueden afectar otras matrices, como el agua (Zhang et al., 2014), que es consumida tanto por humanos como por bovinos. Así que la ingesta de leche o agua contaminada con estos residuos puede tener diversos impactos en la salud de los consumidores, tales como la resistencia bacteriana a los antibióticos, reacciones alérgicas, intoxicaciones y efectos adversos en mujeres embarazadas (Parra, 2003).

En este contexto, se diseñó e implementó una secuencia didáctica para abordar esta problemática, adaptando tres fases del Aprendizaje Basado en Investigación (ABI): conceptualización, investigación y conclusión (Pedasté et al., 2015). Esta secuencia tiene como objetivo fortalecer las competencias investigativas de los estudiantes de Licenciatura en Química al permitirles identificar y aplicar métodos de análisis químico y microbiológico en situaciones reales. Para lograrlo, la secuencia incluye un trabajo experimental para detectar residuos de antibióticos en las matrices de leche y agua, y un análisis microbiológico con antibiogramas para evaluar la sensibilidad bacteriana a antibióticos.

Justificación

La investigación sobre los Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE's) en agua y leche ha mostrado un aumento significativo en los últimos años (Gil et al., 2012). En Colombia, estudios recientes revelan que el 90% de las muestras de agua potable contienen COE's, incluyendo bifenilos policlorados (PCB), plaguicidas organoclorados (OCP) y retardantes de llama bromados (BFR) (Martínez-González et al., 2022). Además, el 70% de las muestras de leche cruda presentan COE's, destacando la presencia de antibióticos que afectan la calidad de los productos lácteos y contribuyen a la resistencia antibiótica (Castro-Duque et al., 2023; Hernández et al., 2017).

Rodríguez et al. (2020) advierten que la resistencia antibiótica es una problemática interconectada entre humanos, animales y el medio ambiente, destacando que la exposición continua a antibióticos contribuye al desarrollo y propagación de cepas resistentes. Boxall et al. (2012) añaden que la excreción de animales tratados con estos antibióticos puede introducir residuos en afluentes cercanos, que son utilizados tanto para el consumo humano como para la ganadería, exacerbando el riesgo de contaminación en alimentos y en el ecosistema acuático. A pesar de estos hallazgos graves, la contaminación de alimentos con residuos de antibióticos sigue siendo poco explorada a nivel nacional e internacional, y las normas actuales de ICONTEC, como la NTCC 399, no incluyen criterios para estos residuos, subrayando la urgente necesidad de investigar y abordar esta problemática.

En respuesta a lo anterior, se propone una secuencia didáctica, dirigida a estudiantes del Énfasis Disciplinar I en Calidad de Aguas de la Licenciatura en Química de la Universidad Pedagógica Nacional (UPN), diseñada para abordar estos desafíos mediante el ABI. La secuencia didáctica permitirá a los estudiantes analizar y abordar los efectos de los residuos de antibióticos en contextos reales, fortaleciendo su capacidad para identificar y aplicar métodos químicos y microbiológicos. Al integrar el ABI, se busca no solo abordar problemas ambientales actuales, sino también preparar a los futuros profesionales para enfrentar retos complejos en su carrera. Esta propuesta está alineada con la misión del programa académico, que busca formar profesionales en educación en ciencias naturales de manera integral y transdisciplinar, promoviendo procesos educativos e investigativos contextualizados.

Planteamiento del problema

Para garantizar la seguridad alimentaria en relación con los contaminantes orgánicos emergentes (COEs) que afectan al consumidor, tanto entidades nacionales como internacionales han establecido límites máximos de residuos de productos farmacéuticos (RPF) en los alimentos. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV) para la Amoxicilina en leche bovina son de 4 µg/Kg, y para la Penicilina G son de 4 µg/L. En Colombia, la Resolución 00001382 de 2013, expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS), adopta estos parámetros emitidos por la FAO.

Esta regulación responde al conocimiento sobre los impactos ambientales y en la calidad de los alimentos que generan los RPF, así como su potencial para afectar la salud humana. Se ha demostrado que los RPF están vinculados con la resistencia de microorganismos, efectos mutagénicos, cancerígenos y reacciones alérgicas (Doyle, 2006).

En el contexto de la formación de licenciados en química, un reto fundamental es mejorar las competencias investigativas de los estudiantes (Andrade et al., 2020). El Aprendizaje Basado en la Investigación (ABI) se aplica para fomentar estas competencias en relación con temas propios de la disciplina. Sin embargo, muchos programas educativos enfrentan dificultades para integrar prácticas investigativas efectivas en el currículo (Healey & Jenkins, 2009).

La formación de competencias investigativas es crucial para los futuros licenciados en química, ya que estas competencias son esenciales para construir conocimiento en el aula y fomentar la investigación. Además, fortalecer estas competencias permite abordar problemáticas reales y aplicar métodos de investigación pertinentes, reforzando la relevancia de una educación enfocada en la investigación. De lo anterior, surge la pregunta: ¿Cómo fortalecer una competencia investigativa en estudiantes de Licenciatura en Química mediante una secuencia didáctica centrada en el ABI y en el análisis de antibióticos veterinarios en aguas superficiales y leche bovina?

Objetivos

1.1 Objetivo general

Fortalecer una competencia investigativa en estudiantes de la Licenciatura en Química de la UPN a través de una secuencia didáctica centrada en el Aprendizaje Basado en Investigación (ABI) y el análisis de antibióticos veterinarios en aguas superficiales y leche bovina.

1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la cuantificación de antibióticos betalactámicos por la técnica analítica de HPLC en matrices de agua superficial y leche bovina
- Implementar una secuencia didáctica que fortalezca la competencia investigativa de los estudiantes para identificar y aplicar métodos en investigaciones con problemáticas reales.
- Evaluar la secuencia didáctica en relación con el desarrollo de competencias investigativas en sus dimensiones conceptual, procedimental y actitudinal, tras su implementación en los estudiantes.

Antecedentes

En este apartado se hace constatar el estudio y selección de artículos relevantes para los autores de la presente investigación que permiten relacionar los conceptos tanto didácticos como disciplinares que se están abordando en este trabajo. Por eso se encuentran estudios realizados para enseñar la química mediante el ABI y estudios de residuos de fármacos en leche y agua. Para establecer la mirada investigativa actual sobre estas temáticas.

1.3 Antecedentes Didácticos

En este apartado se presentan investigaciones previas que, de manera directa o indirecta, aportan al desarrollo y contextualización de esta investigación. Estas referencias incluyen estudios que exploran metodologías didácticas, enfoques pedagógicos y estrategias de enseñanza que enriquecen la comprensión y la implementación de la secuencia didáctica propuesta. La revisión de estos antecedentes proporciona una base sólida para el diseño, la ejecución y la evaluación del proceso educativo.

1.3.1 Antecedentes Internacionales

En un estudio hecho por Pedaste, et al. (2015), realizaron una recopilación de autores que plantean fases para ejecutar el ABI, en su revisión bibliográfica determinaron las fases que más se repetían entre los diferentes artículos referidos a la estrategia didáctica. Determinando que, aunque con diferentes nombre y pequeñas diferencias entre los autores las fases más predominantes del ABI son: orientación, conceptualización, investigación, conclusión y debate. Los autores que realizaron esta unificación de fases establecen sub-fases en algunas de las fases principales. El ABI es una estrategia didáctica usada para el desarrollo de competencias investigativas propuestas por el docente ligadas principalmente al proceso investigativo. Dado que las fases del ABI varían significativamente entre diferentes autores, se optó por adaptar algunas las fases propuestas por Pedaste, et al. (2015).

La investigación es una de las tareas fundamentales de la universidad contemporánea. Sin el componente investigativo, la misión de ese centro de altos estudios quedaría reducida a la mera enseñanza o simplemente a la transmisión de conocimientos, sin el desarrollo pertinente de los modos de actuación, es por esto que la universidad tiene la responsabilidad de preparar a los estudiantes y atender sus carencias en correspondencia con las necesidades sociales, además de garantizar su pleno desarrollo.

Según Martínez, Medina y Salazar (2018), la educación superior es la formación de profesionales competentes para la investigación, debido a que son estos profesionales quienes deben resolver los problemas que impiden el avance de las sociedades en su desarrollo. Estos profesionales deben ser innovadores, dirigentes y líderes en la labor de investigación. Una educación superior que no tenga como objetivo formar en función de lo anterior, no es más que una educación para transferir información y conocimiento. Para los autores, las competencias investigativas son aquellas que buscan la relación entre el conocimiento teórico y la práctica, o el actuar procedimental enfocado en dar soluciones a los desafíos de la sociedad contemporánea.

Así mismo, Freire (2016), destaca el papel fundamental de las competencias investigativas en la formación de docente universitarios. Puesto que fortalecer estas competencias durante la

formación prepara a los futuros educadores para abordar los desafíos complejos del entorno educativo actual, fomentando una enseñanza más efectiva y adaptable.

Antecedentes Nacionales

En un estudio realizado por la UNAD en 2013, la docente Libia Esperanza Nieto plantea que el objetivo del ABI es que los estudiantes establezcan conexiones sólidas entre la investigación y el proceso de aprendizaje, fusionando la construcción de conocimiento por parte de los estudiantes con la generación de saberes que estén en línea con las prácticas científicas. Además, establece que los estudiantes deben ser pensadores autónomos, mientras que los docentes se encargan de estimular y fomentar el desarrollo de competencias en los estudiantes, en particular, las vinculadas a la investigación. Este artículo nos plantea que el ABI debe aplicarse en contextos que permitan al estudiante establecer los conocimientos se aplican en entornos reales.

Desde la perspectiva de la aplicación del ABI para contribuir a la formación de docentes en el contexto actual. Un estudio realizado por Colina et. al, (2023) plantea que el ABI responde a la necesidad de integrar competencias para fomentar la investigación, el pensamiento crítico y la autonomía en los estudiantes. Además, este impulsa transformaciones en los planos de estudio, promoviendo un aprendizaje basado en un análisis crítico con argumentación. Por lo que, el objetivo de la esta investigación es identificar en los estudiantes competencias investigativas, exponiendo los componentes que conforman la construcción del conocimiento científico y sugerir estrategias para fortalecerlo, a través de su aplicación y reflexión crítica. Adicionalmente, Mejía (2022) manifiesta que estas competencias son fundamentales en el ámbito académico y profesional, ya que permiten a los estudiantes se acerquen a los fenómenos de la naturaleza como científicos e investigadores.

En este contexto, las universidades en Colombia están sujetas a transformaciones según los avances educativos a nivel mundial. A pesar de ello, la investigación académica en el país sobre el ABI en profesores en formación es escasa. Por lo cual, el Ministerio de Educación Nacional, en su decreto 1330 de 2019, insta a los docentes a integrar competencias de investigación en el aprendizaje, promoviendo la integración de las áreas científicas, académicas y de extensión en los programas educativos.

1.3.2 Antecedentes Locales

En 2017 Jiménez plantea una secuencia didáctica utilizando el aprendizaje por investigación, donde evidencia que entre las fases aplicadas están, la conceptualización e investigación del ABI, para la enseñanza y aprendizaje de la ley de proporciones definidas. Para generar hipótesis y preguntas, diseñó e implementó actividades educativas que promuevan la investigación. Los resultados revelaron que la unidad didáctica desarrollada a través del ABI facilitó el aprendizaje autónomo, y contribuyó a desafiar y corregir concepciones erróneas que los estudiantes sostenían sobre fenómenos naturales de su vida cotidiana.

Por otro lado, para comprender las implicaciones pedagógicas y didácticas de la implementación del modelo de ABI en la enseñanza de la Química. El artículo de Riveros et al. (2014) plantea una propuesta de enseñanza para los conceptos ácido-base utilizando el ABI. En este se resalta la necesidad de desarrollar estrategias que faciliten la conexión entre el contenido químico impartido en el aula y la vida cotidiana de los estudiantes. Esto, no solo facilitará la adquisición de conocimientos relevantes y contextualizados para los estudiantes, sino que también estimulará su interés por explorar aspectos que generalmente no se abordan en el ámbito educativo.

1.4 Antecedentes Disciplinarios

1.4.1 Antecedentes Internacionales

En el año 2016, Aytenfsu, Mamo y Kebede realizaron un estudio de revisión bibliográfica y de estudios relacionados a la presencia de RPF estableciendo la relación existente entre el proceso metabólico del medicamento en el cuerpo y su posterior excreción tanto en orina y heces como en la leche. Con relación al consumo de esta leche contaminada con RPF establece que es un problema de salud pública en Etiopía debido a la adaptación de los microorganismos a los agentes microbianos presentes y al impacto a la salud del consumidor que genera la ingesta de estos productos a la flora intestinal.

Por otra parte, un estudio realizado en el norte de la India por Jindal et al. (2021) evaluó la presencia de residuos de antibióticos en leche, desechos fecales y agua de las granjas lecheras, debido a la creciente preocupación por la resistencia antibiótica de los microorganismos. En la India, la falta

de regulaciones estrictas sobre la venta y comercialización de antibióticos, combinada con el uso indiscriminado de estos medicamentos en la cría y mantenimiento de animales de granja, favoreció la resistencia a los antibióticos. Los resultados de esta investigación revelaron que el 15.6% de las muestras de purines y el 11.7% de las muestras de leche contenían residuos de antibióticos.

Del mismo modo, Zhang et al. (2014) realizó un estudio en las aguas superficiales de una región ganadera en el norte de China. Y encontró que uno de los factores que contribuye a la resistencia de los antibióticos es la acumulación de residuos de antibióticos en los desechos animales puesto que una parte sustancial de la dosis entre el 30% y el 90% se excreta en forma de metabolitos activos, por heces y orina, contaminando las aguas superficiales del lugar. Esto demuestra la importancia de abordar esta cuestión de manera integral, ya que los residuos de antibióticos en una matriz pueden influir en otra. Además, estos trabajos permiten conocer las técnicas de análisis químicos como HPLC utilizadas para detectar y cuantificar los residuos de antibióticos en las muestras, y destaca los factores que contribuyen a la problemática.

Por otra parte un estudio microbiológico que busca determinar la resistencia bacteriana de microorganismos patógenos que son causantes de la mastitis en bovinos realizado en Perú por Rosas (2023) se realizó el análisis de cepas de algunas bacterias que fueron tomadas en diferentes años siendo desde el 2010 hasta el 2019, esto con la finalidad de analizar la inhibición causada por diferentes antibióticos a estas bacterias entre los fármacos utilizados se encuentran la Amoxicilina y Penicilina G y entre las bacterias analizadas se incluyeron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*. El estudio consistió en usar antibiogramas por el método de Kirby-Bauer en cepas recolectadas de diferentes años esto para determinar la resistencia a los antibióticos, en el estudio se determinó que la Penicilina G es uno de los medicamentos a los que las bacterias que desencadenan la mastitis han obtenido tolerancia esto viendo que más del 70% de cepas analizadas presentan tolerancia con respecto a estudios de años anteriores.

1.4.2 Antecedentes Nacional

La investigación sobre la contaminación por residuos de productos farmacéuticos como los antibióticos y la resistencia bacteriana en el sector lechero colombiano ha revelado una compleja interrelación. Flores et al. (2021) documentaron la presencia significativa de metabolitos de RPF

en cuerpos de agua, sugiriendo una posible fuente de contaminación para los sistemas acuáticos y, por ende, para los animales.

Por otro lado, Trujillo et al. (2011) identificaron una alta prevalencia de cepas bacterianas causantes de la mastitis, resistentes a la penicilina en hatos lecheros antioqueños, lo que podría estar asociado a la exposición de los animales a estos contaminantes. Los resultados de Buitrago et al. (2001) proporcionan evidencia adicional sobre la importancia de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos para guiar el tratamiento de las mastitis y prevenir la propagación de la resistencia bacteriana. Estos hallazgos proporcionan información crucial para establecer los rangos de las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos, necesaria para la realización de los antibiogramas en esta investigación.

1.4.3 Antecedentes Locales

Navarrete (2019), establece en su investigación un problema en la calidad de la leche por los antibióticos, su investigación encontró que en la zona de producción lechera cundiboyacense se observan RPF. Una relación directa en cuanto a la calidad de la leche, por lo que concluye que 62% de las muestras tomadas y analizadas para este estudio son buenas. Por lo tanto, nos dice que el 38% de las muestras de leche analizadas tiene una calidad regular o mala.

Referentes conceptuales

En este apartado se abordan las fuentes teóricas, ya que son las bases de este trabajo de investigación, enmarcado en la fase investigativa del ABI, usando una secuencia didáctica. En cuanto a la parte disciplinar se encuentran definiciones, relaciones importantes entre los antibióticos y las matrices de leche y agua. Además, se detallará la técnica analítica HPLC empleada para la detección y cuantificación de los RPF en las muestras.

1.5 Referentes pedagógicos

1.5.1 Secuencia Didáctica

Según Rodríguez (2014) la secuencia didáctica consiste en la planificación de actividades que siguen un orden lógico y guardan relación entre sí. Por lo tanto, al diseñar las actividades de una secuencia didáctica, el docente debe verificar que estas respondan a una finalidad concreta.

Al mismo tiempo Obaya y Ponce (2007). Indican que una secuencia didáctica debe tener consideraciones antes de su diseño y desarrollo, puesto que debe estar justificada y responder a preguntas sobre la importancia de la secuencia didáctica y de cómo esta puede impactar positivamente en los estudiantes. Antes de su diseño se debe caracterizar los conocimientos previos de los estudiantes para que tenga un sentido relevante en el aprendizaje. Se plantean actividades basadas en las observaciones del docente frente al grupo de estudiantes, además de establecer materiales, espacios, tiempo para la ejecución de dichas actividades y para la actividad evaluativa.

1.5.2 Aprendizaje Basado en Investigación (ABI)

Actualmente, una de las estrategias didácticas más relevantes a nivel global es el ABI, ya que permite al alumno desarrollar competencias investigativas que no pretenden simplemente replicar el conocimiento, sino que busca que los estudiantes diseñen o implementen saberes a fin de generar productos intelectuales que impacten en el ámbito académico y social a partir de la investigación (Peñaherrera, Chiliza y Ortiz, 2014)

Aunque el ABI está teniendo mayor relevancia en Instituciones de Educación Superior en los últimos años Travé y Pozuelos (2008). La realidad es que a principios del siglo XX el pedagogo Denwey (1916) proponía una estrategia didáctica que implementara el método científico con la finalidad de que el estudiante pudiera integrarse a la investigación y aprender de este proceso en lugar de que el docente le transmitiera el conocimiento obtenido en las investigaciones hechas por terceros.

1.5.3 ¿Qué es la investigación en el ABI?

La investigación desempeña un papel fundamental en el ABI, según lo planteado por Pedasté et al. (2015) y Nieto (2013) esta es la columna vertebral que sustenta el proceso de aprendizaje de los estudiantes. Puesto que esta estrategia pedagógica se caracteriza por fomentar la exploración activa de temas o problemas por parte de los estudiantes, y la investigación es la principal herramienta que utilizan para lograrlo. En este contexto, la investigación no solo implica que los estudiantes formulen preguntas, lleven a cabo experimentos, recopilen, analicen datos y lleguen a conclusiones basadas en evidencias sólidas, sino que los ayuda a comprender la aplicabilidad del

conocimiento en contextos reales, brindándoles una perspectiva más profunda de los conceptos en la práctica.

1.5.4 Fases del ABI.

El ABI es una estrategia didáctica la cual está dividida en fases, para su aplicación estas varían según el contexto donde se aplique, el tipo de papel que se le quiera dar al estudiante y de igual forma el énfasis que el docente plantee para la fase investigativa (Healey y Jenkins, 2009).

Imagen 1. Tipos de ABI



Fuente: Adaptación al castellano de Peñaherrera et al. (2014) de Healey y Jenkins (2009)

Tabla 1. Definición de las fases del ABI

Fase y definición	Subfases y definición
Orientación Proceso donde se estimula la curiosidad del tema a abordar. Se declara el problema de forma que sea un desafío para el alumno.	
Investigación El proceso de planificación de la experimentación, que permite recolectar	Exploración Proceso sistemático de revisión de conceptos relevantes para la investigación.

datos de interés frente a la problemática para el posterior análisis de datos obtenidos por la experimentación.	Experimentación El proceso de diseñar y realizar una experiencia que permita la recolección de datos, responder las preguntas y probar las hipótesis.
	Interpretación de datos El proceso de darle sentido a los datos recopilados, para las síntesis del conocimiento.
Conclusión Proceso de extraer conclusiones frente a los datos registrados de la experimentación. Permitiendo comparar las hipótesis iniciales y dar respuesta a las preguntas de la investigación.	

Fuente: Adaptación de los autores de Pedasté, et al. (2015)

1.5.5 Competencias Investigativas.

Freire et al. (2016) mencionan la importancia de las competencias investigativas en cuanto al desarrollo de la actividad investigativa especificando en el saber, saber hacer y saber ser, por lo cual indica que cada una se puede evaluar desde las dimensión conceptual, actitudinal, procedimental, comunicativa y específica de la profesión en cuanto a la educación superior. En este trabajo de investigación se pretende fortalecer la competencia investigativa de identificar y llevar a cabo métodos de investigación para abordar problemáticas reales.

Así mismo Freire et al. (2016) profundiza en cada una de estas dimensiones o componentes en la formación de competencias investigativas en los estudiantes universitarios definiéndolos de la siguiente manera:

Dimensión conceptual: Permiten al investigador manejar y aplicar conceptos, teorías, modelos que permitan guiar y estructurar el proceso investigativo.

Dimensión procedimental: Hace referencia al conjunto de prácticas y técnicas que permiten extraer información relevante para la investigación.

Dimensión actitudinal: Se refiere a la disposición emocional y mental que un investigador adopta durante el desarrollo de una investigación. Se incluyen actitudes como la curiosidad, el compromiso con la investigación.

La UNESCO (1992) indica que las competencias investigativas para un profesional tienen dos objetivos, el primero es simplemente cuantificable en cuanto a la eficiencia de la actividad investigativa y la experiencia adquirida debido a esta. Una segunda consiste en entender que los conceptos disciplinares profesionales no son el eje, sino la importancia que tienen para la comprensión y el actuar del estudiante, profesional y de la persona, ya que una persona competente en la investigación es quien hace, que hace, participa, se involucra y se apasiona por lo que hace.

1.6 Referentes disciplinares

1.6.1 Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE's)

Existen diversas definiciones para el concepto de COE'S, para este trabajo se seleccionó la definición del Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS, 2015), donde los COE'S hacen referenciarse a cualquier sustancia orgánica, ya sea de origen natural, sintético o microbiológico, que en el entorno ambiental no puede regularse por sí mismo. Los residuos de medicamentos en cualquier tipo de alimento son considerados como COE'S por lo que estos compuestos pueden generar consecuencias negativas en el entorno o en la salud de las personas.

1.6.2 Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF)

Los RPF comprenden sustancias que previamente se utilizaron en tratamientos médicos tanto en seres humanos como en animales, pero que han perdido su eficacia terapéutica o han sobrepasado su fecha de caducidad (Morfil, 2021). Estos RPF están vinculados a los residuos de medicamentos veterinarios, los cuales, según el Instituto Nacional Agropecuario (ICA), son compuestos o productos metabólicos que permanecen en los tejidos de los animales después de haber sido empleados para el tratamiento de enfermedades o para mejorar su rendimiento. Estos posteriormente se excretan del organismo, contaminando, aguas, suelos y alimentos por lo cual son considerados como COE'S (Paíga et al. 2019).

1.6.2.1 Residuos de antibióticos en aguas Superficiales

Las aguas superficiales según el IDEAM son cuerpos de agua que se encuentran en la superficie de la tierra y están en contacto directo con la atmósfera. Estos pueden ser flujos de agua que siguen una dirección, como los ríos, páramos y manantiales o cuerpos de agua en reposo, como los lagos. Una vez que los antibióticos se liberan en estas masas de agua, ya sea a través del contacto directo con medicamentos caducados o la excreción de animales, varios factores como las propiedades físicas y químicas de los antibióticos, por ejemplo: su concentración, la actividad microbiana en el entorno, exposición a la luz solar, el pH, la temperatura y los niveles de oxígeno, entre otros, pueden influir en su proceso de degradación (Martínez et al. 2020)

Considerando lo anterior, Grenni et al. 2018 ha observado que algunos antibióticos, como las Penicilinas, tienden a degradarse con mayor facilidad, mientras que otros, como las fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas, permanecen en el medio ambiente durante períodos más prolongados. Por eso, estos antibióticos se encuentran en diversas masas de agua, incluidas aguas superficiales.

1.6.2.2 Resistencia microbiana y otros impactos a la salud

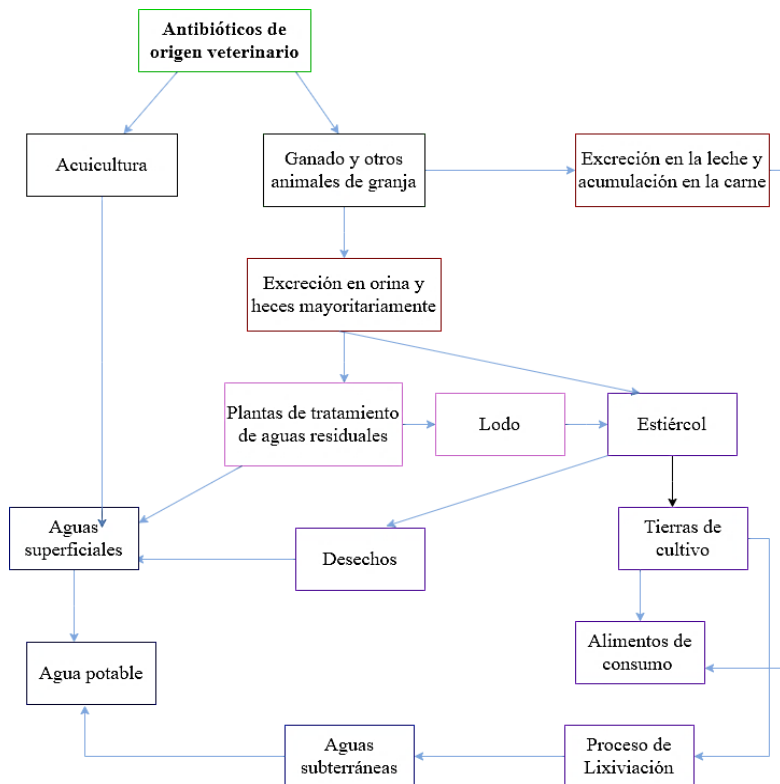
Según Cartelle (2014) una de las preocupaciones de la ONU es la resistencia microbiana, esto amenaza la efectividad de los tratamientos que emplean antibióticos. Existen diversos mecanismos por los cuales, los microorganismos están generando genes que les permita cierta inmunidad a los agentes antimicrobianos. Por ejemplo, los betalactámicos hacen que los microorganismos produzcan enzimas que inhiben el mecanismo de acción del antibiótico. Esta problemática tiene varios frentes de preocupación, uno de los más relevantes es la ingesta de antibióticos de uso veterinario en productos de consumo humano.

Por su parte, Díaz (2016) concluye una relación entre el consumo de alimentos con pequeñas trazas de antibióticos y la resistencia bacteriana. Sin embargo, este no es el único impacto que puede llegar a generar en la salud. Personas con alergias a la Penicilina u otros medicamentos pueden desarrollar síntomas como ardor en la piel, comezón e incluso asma, esto con dosis mínimas como 0,003 UI de Penicilina / mL.

1.6.2.3 Relación de los residuos de antibióticos en leche y agua

Las matrices de agua y leche están interconectadas de manera tal que la contaminación por Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF) en una de ellas afecta igualmente la calidad de la otra tal como se evidencia en el siguiente esquema.

Imagen 2. Relación residuos de antibióticos en leche y agua



Fuente: Adaptación de los autores al castellano de Jindal, et al. (2015)

1.6.3 Antibióticos y su uso veterinario

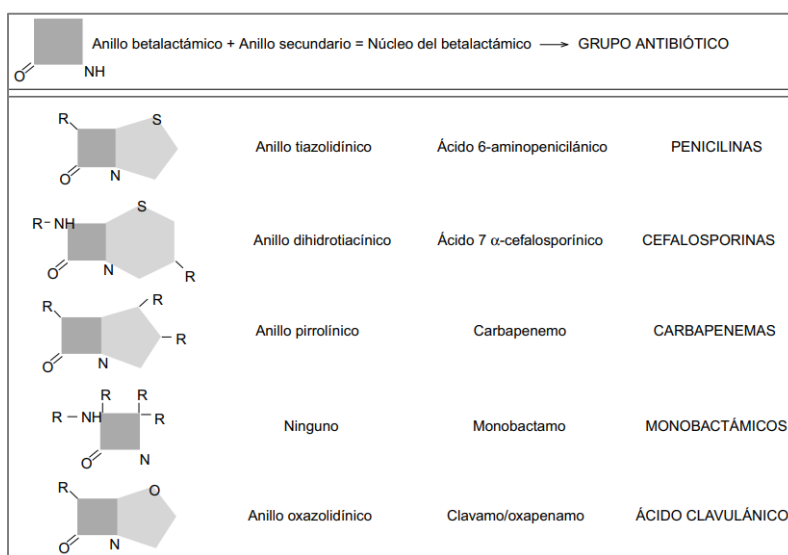
Según Sejia y Vignoli (2006) los antibióticos son un grupo de medicamentos que tienen una acción farmacocinética y farmacodinámica diferente entre las sustancias microbianas que componen el antibiótico, estos ejercen una acción tóxica que es selectiva actuando en estructuras o funciones de microorganismos que generan una afección. Estos son empleados debido al bajo impacto toxico en las células del paciente.

Así mismo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) expone que los antibióticos de uso veterinario representan una importante fuente de RPF. Ya que estos antibióticos se emplean para combatir infecciones en animales destinados a la producción alimentaria, como ganado, aves de corral y peces. Cuando los animales eliminan estos antibióticos a través de sus excrementos, orina y otros fluidos corporales, existe la posibilidad de que estos contaminen el entorno y los alimentos que se obtienen a partir de ellos.

1.6.3.1 Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos se emplean con regularidad para tratar muchas enfermedades en humanos y animales, por esto se denominan antibióticos de alto espectro, Marín y Gudiol (2003).

Imagen 3. Formula estructural de los betalactámicos



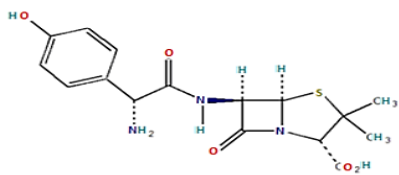
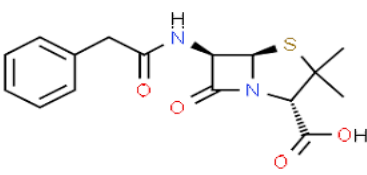
Fuente: Tomado de (Suarez y Gudiol, 2009)

Los betalactámicos se llaman así porque en su estructura química poseen un anillo betalactámico que inhibe la síntesis de la pared celular de microorganismos. Sin embargo, el anillo betalactámico necesita de otros anillos que activen su acción biológica sobre los microorganismos tal y como se muestra en la imagen 3, Suarez y Gudiol (2009).

1.6.3.2 Descripción química de Amoxicilina y Penicilina G

Los antibióticos relevantes para esta investigación son la Amoxicilina y la Penicilina G, por lo que es fundamental conocer algunas de sus propiedades fisicoquímicas, detalladas en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades químicas y físicas de Amoxicilina y Penicilina G.

Propiedades / Antibióticos	Amoxicilina	Penicilina G
Fórmula Molecular	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$
Estructura Molecular	Imagen 4. Estructura molecular Amoxicilina  Fuente: Soledad (2016)	Imagen 5. Estructura molecular Penicilina  Fuente: Soledad (2016)
Nombre IUPAC	Ácido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico.	Ácido 4-tia-1- azabicyclo (3.2.0) heptano-2-carboxílico,3,3-dimetil-7-oxo-6((fenilacetil)amino) - (2S-(2alfa, 5alfa, 6beta))
Soluble	Agua, Metanol, Etanol y otros solventes orgánicos polares.	Agua, metanol, dimetil-formamida y otros solventes polares orgánicos.
No soluble	En hexano, Benceno y otros solventes orgánicos apolares.	acetona, acetonitrilo, cloroformo y otros solventes orgánicos apolares.

Fuente: Soledad (2016)

1.6.4 Antibiograma.

Un antibiograma es una técnica que permite observar la resistencia de un microorganismo frente a diferentes especies microbianas. Es una técnica in vitro que con la cual se busca determinar la

sensibilidad de la bacteria clasificándola en: sensible, intermedio y resistente esto para el estudio cualitativo. Si se desea realizar un estudio cuantitativo se busca medir la concentración mínima (CMI) del antibiótico efectiva para la inhibición del crecimiento de la cepa microbiana. (Cercenado y Saavedra, 2009)

1.6.4.1 Antibiogramas por el método de difusión en disco

El método de antibiograma disco-placa, basado en el trabajo de Bauer y Kirby (1966), es recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este procedimiento consiste en inocular un microorganismo en una placa de agar y depositar discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos en su superficie. El antibiótico se difunde radialmente formando un gradiente de concentración y tras 18-24 horas de incubación, se observan zonas de inhibición alrededor de los discos.

La concentración crítica en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI), aunque los métodos disco-placa no permiten una lectura directa de la CMI. Para cuantificarla, se mide el diámetro de la zona de inhibición y se compara con datos de cepas con CMI conocidas, graficando estos diámetros frente a las CMI para obtener una línea de regresión que correlaciona estos valores. Finalmente, los diámetros de inhibición estandarizados se interpretan como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías del NCCLS (1997).

1.6.4.2 Antibiogramas por el método dilución en agar.

El método de dilución en agar para determinar la sensibilidad bacteriana a antibióticos implica incorporar el antimicrobiano al medio de cultivo antes de que se solidifique. Se preparan varias placas con diferentes concentraciones del antimicrobiano, vertiendo 20 ml de medio con antimicrobiano en placas de Petri estériles y evitando burbujas. Tras solidificar, las placas se inoculan con una suspensión bacteriana diluida 1:10, ajustada a una turbidez comparable al estándar 0.5 de la escala de MacFarland (densidad óptica de 0.08-0.10 a 625 nm, equivalente a $1-2 \times 10^8$ CFU/ml). Utilizando un replicador, se deposita aproximadamente 10^4 UFC por gota,

comenzando con un control sin antimicrobiano, seguido de concentraciones crecientes, y finalizando con otro control sin antimicrobiano.

Las placas se dejan secar a temperatura ambiente y se incuban a 35°C durante 16-20 horas. La CMI se determina como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano visible. Los controles se incluyen para verificar el crecimiento y la pureza del inóculo, asegurando la precisión del ensayo (NCCLS, 1997).

1.6.4.3 Sinergismo y Antagonismo entre Amoxicilina y Penicilina G

En el caso de los antibióticos, el sinergismo se manifiesta cuando la unión de dos o más antibióticos genera un efecto en la bacteria que es más eficiente en términos de eliminación o inhibición en su crecimiento, de lo que se lograría si cada antibiótico se administrara de manera individual (Suárez et al. 2012). El antagonismo, en cambio, se manifiesta cuando la mezcla de dos o más antibióticos resulta en un efecto bactericida o bacteriostático que es inferior a la suma de los efectos de cada antibiótico utilizado de manera individual. (Ramos et al. 2016).

Cuando la Penicilina G y la Amoxicilina se administran juntos, pueden llegar a actuar de forma sinérgica para aumentar la actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias. Esto se debe a que la Penicilina G puede inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, mientras que la Amoxicilina puede penetrar la pared celular bacteriana y atacar la membrana celular interna (Ramos et al. 2016).

1.6.5 La leche cruda

La leche de vaca es el producto fresco extraído del proceso del ordeño completo de una o más vacas sanas, bien alimentadas, en reposo y exento de calostro y que cumple con características fisicoquímicas, microbiológicas y de higiene establecidas por un ente gubernamental que vigile y supervise la calidad del producto. Como se mencionó anteriormente la leche de vaca tiene parámetros microbiológicos que determinan su calidad, por lo cual se debe realizar un chequeo para detectar microorganismos en el producto (Magariños, 2000).

Algunos parámetros fisicoquímicos están enfocados a la calidad de la leche en cuanto contenido nutricional y para garantizar que el producto no ha sido adulterado, algunos de estos parámetros han sido regulados por el ICONTEC en la NTC 399 entre estos parámetros no se encuentra una regulación en cuanto a la presencia de residuos de antibióticos. En la tabla 3 se presentan los parámetros fisicoquímicos de la leche cruda analizados en este trabajo, junto con un contraste de los datos obtenidos frente a la normativa establecida en Colombia obtenidos en una práctica de laboratorio externa a esta investigación en el énfasis en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Tabla 3. Parámetros de calidad de la leche cruda analizada

Parámetro	Resultado	Cumplimiento de la norma NTC 399
Pruebas cuantitativas		
pH	6,33	La norma NTC 399 no establece un rango específico de pH para la leche cruda. Sin embargo, su pH promedio de la está entre 6.6 y 6.8 a 20 °C. La variación de pH se debe a que las pruebas se realizaron cuatro días después de la recolección.
%Acidez	0,127	La acidez según la NTC 399 debe reportarse en %de ácido láctico y está el máximo permitido es de 0,13% por lo cual la muestra analizada cumple con la normatividad.
%Proteína SNG	36,98%	El mínimo permitido en la norma es 33% por lo cual la muestra de leche es una buena fuente de proteína y cumple con la norma.
%SNG	8,54%	La muestra cumple con la NTC 399 en este parámetro nutricional debido a que el mínimo permitido es 8,3%.
Densidad a 15°C	1,030g/mL	Este parámetro indica que la leche no ha sido adulterada o diluida con agua u otro solvente debido a que la muestra está entre el rango aceptado.
%Grasa	4,3%	La materia grasa es un parámetro que se tiene en cuenta debido a su valor nutricional en la leche según la NTC 399 esta debe ser como mínimo del 3%
Pruebas cualitativas		

Reductasa	Positiva	Esta prueba nos indica la cantidad de microorganismos presentes en la leche entre menor sea el tiempo de desaparecer el color significa una mayor cantidad de microorganismos.
Peroxidasa	Positiva	Esta prueba se realiza a las leches comerciales para observar si el proceso de pasteurización se realizó correctamente, al dar positivo nos indica que la leche es cruda. Por lo tanto, cumple con la norma.
Peróxidos	Negativa	En esta prueba, al resultar negativa, se concluye que cumple con la normativa, ya que la leche, al ser un producto natural, no debe contener conservantes.
Formol	Negativa	Esta prueba al dar negativa implica que no se le ha adicionado formaldehído como conservante, cumple con la norma.
Estabilidad Alcohol	Negativa	La ausencia de coagulación indica que las proteínas permanecen intactas, lo que asegura que la leche mantiene su calidad y es segura para el consumo.

Fuente: Propia tomada del informe parámetros fisicoquímicos en leche.

1.6.5.1 Residuos de antibióticos en Leche

Según García (2020) en este momento ya se ha establecido que los residuos de antibióticos y otro tipo de medicamentos en leche de bovino producen agentes xenobióticos para el humano y tóxicos en el medio ambiente. Por otra parte, Aytenfsu et al. (2016) plantea que la leche es una importante vía de excreción de componentes químicos tóxicos. La leche al ser una emulsión de lípidos en solución acuosa de proteínas puede contener cualquier componente toxico que este en solución acuosa en el organismo del bovino. Las sustancias químicas simples llegan a la leche debido a la difusión de las glándulas mamarias en su forma libre, en solución lipídica o unidas a las proteínas del alimento (Máttar et al., 2009).

1.6.6 Técnica Analítica de Cromatografía Líquida De Alto Rendimiento (HPLC)

El HPLC es un método de separación para el análisis de un analito específico, esto implica que deben existir un método que permita la separación de los compuestos que componen la muestra a analizar, para esto se hace uso de una mezcla de solventes uno orgánico apolar y otro de índole polar que permita retener por afinidad química al componente que queremos analizar. (Fallon, Booth y Bell, 1987)

En la cromatografía HPLC se hace uso de dos fases, una móvil y una estacionaria. La fase móvil compuesta por la mezcla de solventes permite separar las moléculas que conforman la muestra a analizar, ya que estas son retenidas según la afinidad con la fase móvil. Esto implica que no todos los compuestos llegan a la vez a la fase estacionaria, que es un sólido inerte. Esto implica un tiempo de retención del analito que permite el análisis cuantitativo y cualitativo de los compuestos presentes en la muestra (Suarez y Morales, 2018).

En el contexto de la investigación el método de análisis químico HPLC permite cuantificar de manera precisa los antibióticos amoxicilina y penicilina G en muestras como agua superficial y leche bovina. Esta metodología es esencial para identificar y medir con exactitud los niveles de estos compuestos en las matrices estudiadas, lo que es crucial para evaluar la contaminación y sus posibles riesgos.

Metodología de la investigación.

La metodología de esta investigación se estructura en cuatro aspectos clave. Primero, se define el enfoque metodológico que orienta el diseño y desarrollo del estudio. Segundo, se especifica la población y muestra objeto de investigación. Tercero, las fases de la investigación describen los pasos secuenciales implementados para alcanzar los objetivos del estudio. Finalmente, los criterios de evaluación establecen los parámetros para medir y analizar los resultados.

1.7 Enfoque metodológico.

La investigación emplea un enfoque metodológico mixto para abordar de manera integral las dimensiones conceptuales, procedimentales y actitudinales de la competencia investigativa. Este enfoque combina métodos cualitativos y cuantitativos, permitiendo una comprensión completa de la problemática estudiada (Sampieri, 2018).

Se utilizaron métodos cualitativos, como la revisión bibliográfica y el análisis de casos, para explorar los conceptos teóricos sobre los antibióticos en agua y leche. Esta fase proporciona una base sólida para entender cómo los estudiantes aplican la teoría en contextos prácticos (Fallon, Booth y Bell, 1987). Complementariamente, el análisis cuantitativo se realizó mediante HPLC para medir los niveles de antibióticos, como la amoxicilina y la penicilina G, en las muestras. Este método cuantitativo valida y refuerza los hallazgos cualitativos, mejorando la confiabilidad y precisión de los resultados (Suárez y Morales, 2018).

La integración de estos enfoques permite una evaluación más completa y precisa de las competencias investigativas de los estudiantes, destacando tanto su comprensión teórica como su capacidad para aplicar métodos de investigación en situaciones reales.

1.8 Población y Muestra

El trabajo se llevó a cabo en la sede principal de la Universidad Pedagógica Nacional en Bogotá D.C. y contó con la participación de ocho (8) estudiantes de noveno semestre de la Licenciatura en Química, quienes están en el ciclo de profundización en el espacio académico "Énfasis Disciplinar I", centrado en el análisis de la calidad de aguas.

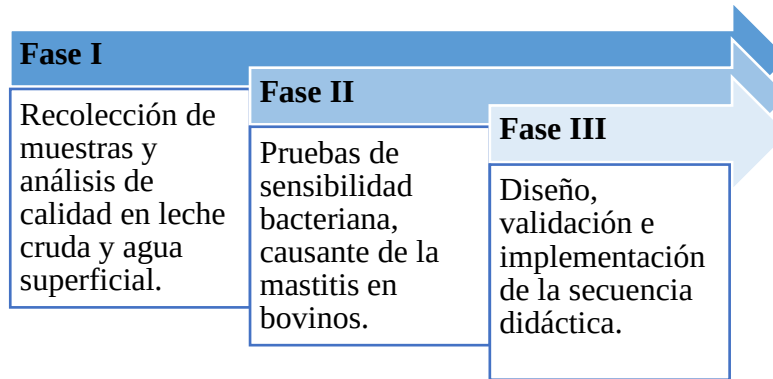
La población objeto de estudio fue seleccionada por las siguientes razones:

- Al ser estudiantes del ciclo de profundización y específicamente tener conocimientos en áreas como fisicoquímica, química analítica, bioquímica y biología, tienen conocimientos previos frente a la investigación disciplinar.
- Este espacio busca desarrollar competencias investigativas que buscan relacionar el conocimiento teórico con proceder investigativo en contextos de problemáticas existentes en la sociedad colombiana.

1.9 Fases de la Investigación.

El diseño metodológico de esta investigación se desarrollará en tres fases, cada una con un enfoque específico. Las fases I y II se centran en comprobar la efectividad y reproducibilidad de las metodologías de análisis químico y microbiológico, por lo que se realizó sin la participación de los estudiantes. La fase III se basa en la implementación de la secuencia didáctica, tomando en cuenta los resultados de las fases anteriores.

Imagen 6. Fases de investigación



Fuente propia.

1.9.1 Fase I Recolección de muestras y análisis de calidad

1.9.1.1 Recolección de muestras de leche cruda y agua superficial

El estudio se focaliza en una zona rural lechera específica, ubicada en una finca del municipio de Guatavita, en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Esta región es conocida por la producción y comercialización de productos lácteos. Los medicamentos veterinarios empleados en la finca contienen principalmente Amoxicilina y Penicilina G, ver anexo 1, lo que genera inquietud sobre la presencia de residuos de estos antibióticos en la leche, tanto cruda como pasteurizada, y en las aguas superficiales de la zona. Se obtuvieron muestras de leche cruda de cinco bovinos en producción. Se utilizaron cinco frascos ámbar de 100 mL, previamente lavados y esterilizados mediante autoclave, siguiendo el protocolo de Faría et al. (2000). Los frascos se rotularon y mantuvieron refrigerados con pilas de refrigeración y hielo dentro de una nevera de poliestireno expandido (ICOPOR) durante el transporte a la sede principal de la Universidad Pedagógica Nacional en Bogotá, donde se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis.

Adicionalmente, se recolectó una muestra de agua consumida por los bovinos, proveniente del sistema de acueducto del páramo de Monquentiva. Esta muestra se almacenó en un frasco ámbar de 100 mL, previamente esterilizado, y se refrigeró de la misma manera que las muestras de leche. Para observar el proceso de recolección de muestras ver el anexo 8.

1.9.1.2 Técnica analítica HPLC

El objetivo es identificar la presencia de los antibióticos Amoxicilina y Penicilina G en muestras de leche cruda de bovino utilizando el método HPLC. Esto se realiza para verificar el cumplimiento de la Resolución 00001382 del 2013 sobre los residuos de antibióticos en productos lácteos. Además, se analiza la calidad del agua consumida por los animales en la finca mediante la técnica HPLC, con el fin de descartar que cualquier señal positiva de residuos sea atribuible a la contaminación del agua por procesos de bioacumulación.

1.9.1.3 Tratamiento de las muestras para el análisis por HPLC.

El tratamiento de muestras es un proceso previo el cual tiene como objetivo separar el analito de interés de otras sustancias que puedan afectar el análisis por la técnica HPLC, debido a que absorban a la misma longitud de onda y que tengan una afinidad similar con la fase móvil al analito de interés, por lo cual se superpongan las señales en el cromatograma. Para observar el proceso realizado de la extracción de Penicilina G y Amoxicilina en las matrices de agua y leche, ver el anexo 8.

Penicilina G en leche

La identificación y cuantificación de residuos de Penicilina G en las muestras de leche cruda se realizó utilizando el método validado por Faría et al. (2000). Se ajustaron las medidas de volumen según las especificaciones de los autores debido al tipo de material de laboratorio utilizado.

Se tomaron 5mL de muestra haciendo uso de una pipeta volumétrica de 5mL, se descargó el volumen en un vaso de precipitado de 150mL se tomaron 4mL de una solución 0,01M de fosfato dibásico de sodio (NaH_2PO_4) y 6mL de metanol grado HPLC estos volúmenes se calcularon teniendo en cuenta la proporción dada por los autores (15:10 v/v). Se agito constante con un agitador magnético por 3 minutos. Posteriormente se trasladó la muestra trata a un tubo falcón de 15mL, se centrifugo durante 3 minutos a 2500 r.p.m. Se recolecto el sobrenadante con una jeringa y posteriormente se filtró con un filtro de 0,2 μm lo recolectado se almaceno en un vial posteriormente se inyecto en el cromatógrafo.

Para las tener un control positivo de las muestras, se realizó el mismo procedimiento anterior solo añadiendo 2 mL del patrón de 100 ppm de Penicilina G.

Amoxicilina en leche

La identificación y cuantificación de residuos de Amoxicilina en las muestras de leche cruda se realizó empleando el método descrito por Singh et al. (2013). Se tomó 1 mL de la muestra con una pipeta volumétrica de 1 mL se desalojó en un tubo falcón se añadieron 3 mL de acetonitrilo (C_2H_3N) grado HPLC, se agitó vigorosamente durante 20 segundos y se sometió a baño de hielo por un tiempo de 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 30 minutos, se separó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur se trasladó a un nuevo tubo falcón y se le agregaron 3 mL de diclorometano y se volvió a centrifugar a 2000 r.p.m. por un tiempo de 30 minutos, se separó y filtró con un filtro de $0,2\mu m$ el sobrenadante, se almacenó en un vial y se inyectó en el cromatógrafo. Para tener un control positivo de las muestras, se realizó el mismo procedimiento anterior solo añadiendo 2 mL del patrón de 250 ppm de Amoxicilina.

Penicilina G y Amoxicilina en agua

Con la finalidad de identificar y cuantificar residuos para ambos antibióticos se hizo uso del método propuesto por Samandari et al. (2022). Se tomaron 6 mL de la muestra con una pipeta volumétrica de 10 mL, se desalojó el volumen tomado en un tubo falcón de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 4000 r.p.m. Posteriormente se filtró haciendo uso de un filtro de $0,2\mu m$ se almacenó en un vial y posteriormente se inyectó al cromatógrafo. Para tener un control positivo de las muestras, se realizó el mismo procedimiento anterior solo añadiendo 4 mL del patrón de 100 ppm de cada antibiótico a analizar.

1.9.1.4 Preparación de curva de calibración de Penicilina G.

Inicialmente, se preparó una solución stock de 6000 ppm de Penicilina G, ya que no se disponía de un patrón certificado. Se utilizó un vial comercial de Penicilina G sódica de 1,000,000 U.I., equivalente a 600 mg de la sal. Para garantizar una concentración adecuada, se usó todo el contenido del vial. Se añadieron 5 mL de D-Glucosa al 5%, se agitó la mezcla y se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL utilizando un embudo de vidrio. Este procedimiento se repitió tres veces para asegurar que todo el antibiótico se trasladara al balón. Finalmente, se completó el aforo con la solución de D-Glucosa al 5% para disolver completamente la Penicilina G, siguiendo las recomendaciones de la USP 43-NF38, pg 3450.

Posteriormente se tomó una solución intermedia de 294 ppm, tomando una alícuota de 4,9 mL y se aforo con solución de D-Glucosa al 5% en un balón aforado de 50 mL. De la solución intermedia se tomaron 17 mL y en un balón de 50 mL se llevó a aforo con la solución de D-Glucosa con la finalidad de tener un patrón de 100 ppm. Para los demás patrones de la curva se empleó la solución de 100 ppm, se tomaron volúmenes de 0,5mL, 1,5mL,2,5mL,5mL,12,5mL, esto con la finalidad de tener con las siguientes concentraciones: 2ppm, 6ppm, 10ppm, 20ppm y 50ppm.

1.9.1.5 Preparación de curva de calibración de Amoxicilina.

Debido a que no se contaba con un patrón certificado de Amoxicilina se tomó la decisión de usar el antibiótico en su presentación comercial en comprimidos de 500mg de Amoxicilina. Debido a la poca solubilidad de este antibiótico en agua se decidió hacer uso del método establecido por la Farmacopea argentina, el cual consiste en transferir de forma cuantitativa 500mg de Amoxicilina a un balón aforado de 100mL aforando con un buffer de fosfatos de concentración 0,1M y pH 5. Posteriormente se agitó constantemente por 15 minutos y luego se realizó ultrasonido por 7 minutos a 20kHz, se transfirió a un balón de 500mL y se aforo con el buffer de fosfatos.

Finalmente, por las limitaciones del detector en el cromatógrafo se seleccionaron las siguientes concentraciones para la curva de calibración: 0,5ppm, 1ppm, 2ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100 ppm. Para esto primero se tomó una alícuota de 10 y aforo a 100 con buffer de fosfatos para garantizar la primera concentración, posteriormente se usó la concentración del patrón de 100ppm para realizar los demás patrones de la curva tomando volúmenes haciendo uso de una bureta.

1.9.1.6 Condiciones cromatográficas

Tabla 4. Condiciones Cromatográficas usadas para Penicilina G

Fase Móvil	Metanol-Buffer fosfato 0,01M pH 7
Proporción	35:65
Tipo de detector	Arreglo de diodos UV-Vis
Longitud de onda	230nm
Flujo	2mL/min
Columna cromatográfica	Fase reversa C18

Adaptado de Faría et al. (2000).

Tabla 5. Condiciones Cromatográficas usadas para Amoxicilina.

Fase Móvil	Acetonitrilo/Acetato de Amonio 10mM pH 5
Proporción	10:90
Tipo de detector	Arreglo de diodos UV-Vis
Longitud de onda	220nm
Flujo	1mL/min
Columna cromatográfica	Fase reversa C18

Adaptado de Singh et al. (2013).

1.9.1.7 Eficiencia de los tratamientos de las muestras.

Para comprobar la funcionalidad de los métodos empleados para identificar y cuantificar residuos de los antibióticos en las muestras, se añadió un volumen de 2mL del patrón de 100ppm al inicio del procedimiento para que al agregar todos los reactivos para la extracción se diluya en un factor de 2:15, es decir, que se espera una señal en el cromatograma correspondiente a una concentración cercana a 13ppm.

1.9.2 Fase II. Pruebas de Sensibilidad en cepas bacterianas ATCC

En esta fase, contamos con la colaboración de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, específicamente de la Dra. Bibiana Chavarro Portillo, para desarrollar prácticas de laboratorio microbiológico en sus instalaciones con los protocolos necesarios para el manejo de bacterias patógenas. El objetivo fue evaluar la sensibilidad de diferentes cepas bacterianas ATCC, incluyendo seis cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa ATCC de *Streptococcus pyogenes* y una cepa de *Streptococcus agalactiae* proveniente de un caso subclínico de mastitis en un paciente humano.

Estas prácticas se utilizaron como recurso pedagógico para acercar a los estudiantes a una de las problemáticas relacionadas con esta investigación: el aumento de la tolerancia o la disminución de la sensibilidad en microorganismos patógenos debido al consumo de alimentos contaminados con antibióticos.

Tabla 6. Métodos microbiológicos

Antibiograma	Descripción
Método de difusión en disco.	Determinar el grado de sensibilidad de las cepas bacterianas a cada antibiótico.
Método dilución en agar.	Determinar la concentración mínima inhibitoria de cada una de las cepas referente a los dos antibióticos usados.

Fuente propia

1.9.2.1 Esterilización de material y lugar de trabajo.

Debido a que el trabajo de laboratorio microbiológico debe estar libre de microorganismos se realiza esterilización del material que será usado durante la investigación para esto se hizo uso de una autoclave para garantizar material estéril, de igual manera todo el trabajo practico se realizó con un ambiente estéril por lo cual se esterilizo mesones y superficies, de igual forma se usaron mecheros bunsen de gas para mantener estéril el ambiente de trabajo.

1.9.2.2 Siembra de las cepas bacterianas ATCC en agar sangre

En la siembra de las cepas bacterianas *Streptococcus viridans* y *Staphylococcus spp.* en agar sangre, se siguieron las directrices del CLSI-M100. Primero, se prepararon medios de cultivo de agar sangre, asegurando la esterilidad y calidad del agar. Luego se prepararon los inocuos, seleccionando colonias aisladas de cada cepa bacteriana ATCC y se suspendieron en solución salina estéril al 0,85% hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar de 0.5 de McFarland realizando una comparación visual, con un hisopo estéril, se tomó una alícuota de la suspensión bacteriana y se sembró en placas de agar sangre mediante la técnica de estría en superficie para lograr un crecimiento uniforme y finalmente se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

1.9.2.3 Preparación de agar Müller-Hinton.

Para la preparación del agar se pesaron 28,5g de la sal, posteriormente se agregó la sal en un Erlenmeyer de 1000mL posteriormente se le añadieron 750mL de agua estéril, se dejó en agitación constante hasta que dilución completa de la sal.

1.9.2.4 Preparación de las concentraciones de antibióticos.

Según lo descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), el método de dilución en agar requiere generar diluciones sucesivas a la mitad de cada una de las concentraciones previas. Para lograrlo, se preparan soluciones stock de cada antibiótico trabajado. En este caso, se preparó una solución de 1536 µg/mL de Penicilina en un matraz aforado de 50 mL. De esta solución, se tomaron 25 mL y se aforaron a 50 mL. Este procedimiento se replicó sucesivamente, obteniendo las siguientes concentraciones en µg/mL: 768, 384, 192, 96, 48, 24, 12, 6.3, 1.5 y 0.72. Este procedimiento se replicó para la preparación de Amoxicilina.

1.9.2.5 Siembra del agar para el método de dilución en agar.

Se agrego el agar Muller-Hinton a cajas de Petri previamente rotuladas con la concentración de antibiótico correspondiente. Se tomaron 23 mL de la solución con pipetas graduadas de 10mL y posteriormente se le añadió 1mL de la concentración de los antibióticos con una micropipeta, se agito para homogenizar el agar con el antibiótico obteniendo las concentraciones registradas en la Tabla 7, este rango de concentraciones evaluadas se estableció según la investigación de Buitrago et al. (2001).

Tabla 7. Concentraciones para el método de dilución en agar.

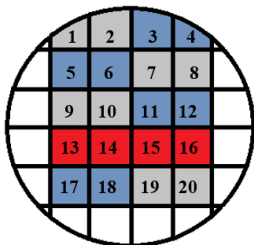
Penicilina G (µg/mL)	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Amoxicilina (µg/mL)	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	

Fuente propia.

1.9.2.6 Siembra bacteriana para el método de dilución en agar.

Se sembraron las bacterias en cada caja de Petri, utilizando 10 µL de cada una en zonas previamente establecidas para evitar la mezcla de cepas bacterianas. Para facilitar el análisis de sensibilidad bacteriana, la caja de Petri se dividió en 20 zonas, conforme a lo indicado en la Tabla 8 y después se analizaron los antibiogramas.

Tabla 8. Zonas de siembra bacteriana.

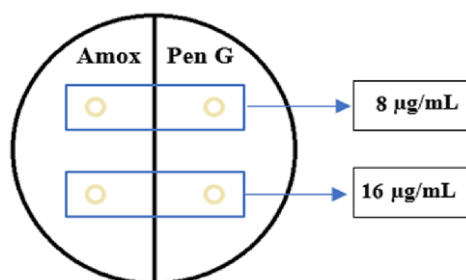
Zona	Bacteria sembrada	Esquema
1 y 2	<i>Staphylococcus aureus</i> 976	 Imagen 7. Esquema siembra bacteriana.
3 y 4	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	
5 y 6	<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	
7 y 8	<i>Staphylococcus aureus</i> 1026	
9 y 10	<i>Staphylococcus aureus</i> 29213	
11 y 12	<i>Staphylococcus aureus</i> 977	
17 y 18	<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615	
19 y 20	<i>Streptococcus agalactiae</i>	

Fuente propia

1.9.2.7 Siembra bacteriana para el método de difusión en discos.

En el método de difusión en disco - placa, se utilizaron 8 cajas de Petri, cada una con 24 mL de agar Muller-Hinton. Se sembró una bacteria en cada caja utilizando un hisopo esterilizado. Luego, se introdujeron los sensidiscos caseros, hechos de cartón paja, impregnados con 10 μL del antibiótico. Para este método, se usaron 4 sensidiscos por caja: 2 de Penicilina y 2 de Amoxicilina. Se decidió emplear dos concentraciones para cada antibiótico, 8 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$.

Imagen 8. Esquema difusión en disco



Fuente propia

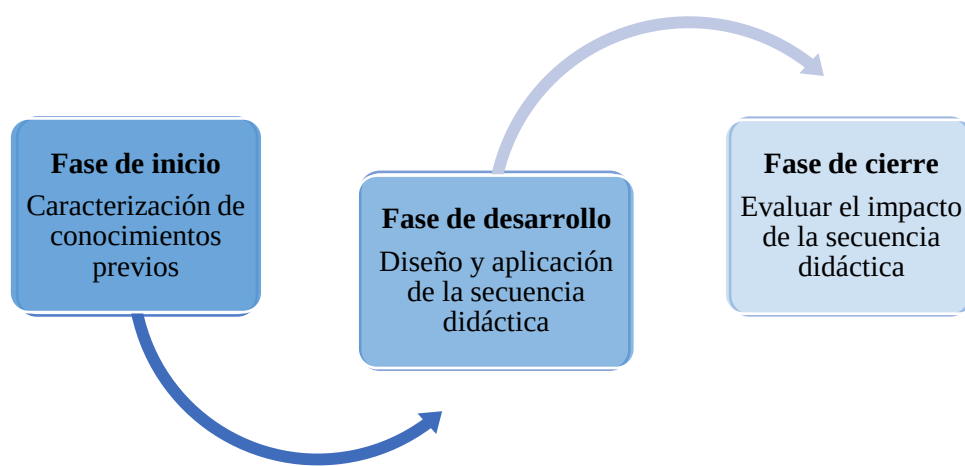
1.9.3 Fase III. Diseño, validación e implementación de la secuencia didáctica.

En esta fase se diseñó e implementó una secuencia didáctica que, según Buitrago et al. (2009) es una propuesta didáctica que interconecta instrumentos para desarrollar competencias investigativas, en particular la secuencia didáctica diseñada adapta fases del ABI.

La secuencia didáctica diseñada contiene una prueba inicial que busca caracterizar la actitud de los estudiantes frente al trabajo sobre la calidad de la leche bovina en cuanto a antibióticos y cómo, por un ciclo de bioacumulación, el producto puede estar contaminado con estos fármacos.

De igual manera, el propósito es evaluar la competencia investigativa de los estudiantes en cuanto a su capacidad para identificar y aplicar métodos de investigación en la resolución de problemáticas reales, considerando las dimensiones conceptual, procedimental y actitudinal. Para ello, se utilizan diversos instrumentos diseñados para desarrollar estas competencias, incluyendo una actividad de inicio, actividades intermedias y una actividad final.

Imagen 9. Fases de la secuencia didáctica



Fuente propia

1.9.3.1 Descripción de instrumentos

La secuencia didáctica se organiza en tres fases, utilizando la estrategia ABI para desarrollar en los estudiantes la competencia investigativa en sus dimensiones conceptual, procedimental y actitudinal. Este enfoque permite a los estudiantes identificar y aplicar métodos de investigación para resolver problemáticas reales, como la que se aborda en esta investigación. La estructura de la secuencia está detallada en la Tabla 8, que incluye pruebas y actividades diseñadas para facilitar la construcción activa del conocimiento con el apoyo y guía del docente.

Tabla 9. Descripción de las actividades secuencia didáctica

Actividad	Descripción	Dimensión investigativa analizada
Actividad de inicio.	Este instrumento consiste en tres partes una que permite evaluar la dimensión actitudinal haciendo uso de una encuesta tipo Likert, una segunda parte donde se observa el conocimiento teórico y conceptual en cuanto a conceptos claves de la investigación de la calidad de la leche cruda frente a antibióticos y una última parte que tiene como objetivo dar contexto de investigación para que el estudiante proponga métodos de análisis haciendo uso de conocimiento teórico.	- Conceptual. - Procedimental - Actitudinal
1. Bioacumulación y calidad de la leche	Esta actividad tiene como objetivo aproximar a la investigación haciendo uso de artículos científicos a las posibles implicaciones que tiene la bioacumulación en la calidad de la leche cruda en cuanto a RPF's.	- Conocimiento conceptual
2. Métodos de análisis de sensibilidad bacteriana	Este instrumento cuenta con dos partes. La primera parte busca dar contexto a la investigación a realizar en cuanto a los métodos microbiológicos de análisis de sensibilidad bacteriana. La segunda parte busca evaluar los conocimientos adquiridos en la primera parte mediante preguntas de opción múltiple y el análisis de los resultados en casos posibles.	- Conceptual. - Procedimental
3. Propuesta de análisis HPLC para residuos	Esta actividad se centra en la investigación a los estudiantes para usar sus conocimientos en fisicoquímica den propuestas para tratar las	- Conceptual. - Procedimental

de antibióticos en leche cruda y agua	muestras y que haciendo uso de sus conocimientos en química analítica propongan condiciones cromatográficas para el análisis por HPLC de las muestras.	
4. Práctica de laboratorio para análisis de antibióticos por HPLC	La guía de laboratorio es un instrumento otorgado a los estudiantes con la finalidad de observar sus competencias procedimentales y cómo se desempeñan en el espacio de laboratorio. Como segundo producto, los estudiantes entregan un informe de laboratorio donde utilizan sus conocimientos para analizar los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio.	- Conceptual. - Procedimental
Actividad de cierre	El objetivo de esta actividad es evaluar las competencias investigativas de los estudiantes con un cuestionario dividido en tres partes: una escala Likert para medir la actitud hacia la investigación, la resolución de problemas teóricos para evaluar la comprensión de conceptos, y situaciones procedimentales para valorar la aplicación práctica de los conocimientos.	- Actitudinal - Conceptual. - Procedimental

Fuente propia.

1.9.3.2 Validación de la secuencia

La secuencia didáctica, junto con la rúbrica de investigación y otros instrumentos utilizados en las intervenciones con los estudiantes, fue validada por dos profesionales en educación y docencia. Para ello, se adaptó un formato de validación, anexo 12 de Mejía, L. (2014).

Tabla 10. Observaciones de los validadores.

Validador 1			
Título de pregrado	Licenciada en Química Universidad pedagógica Nacional		
Título de posgrado	Magíster en Docencia de la Química Universidad pedagógica Nacional		
Criterios evaluados	Contenido	Metodología	Evaluación
Valoración (1 - 3)	2.75	2.75	3
Observaciones generales			
Es un trabajo bastante interesante desde el ámbito educativo, de salud, social y experimental, siendo un tema de discusión para el gremio de la producción de leche, la alimentación bovina e incluso el tratamiento de enfermedades que pueden desencadenar del uso de antibióticos. Sería interesante conocer la opinión de los campesinos y la afectación que trae la problemática.			
Validador 2			
Título de pregrado	Bióloga Universidad del Rosario		
Título de posgrado	Magister en educación (Énfasis en Ciencias Naturales) Universidad Externado de Colombia		
Criterios evaluados	Contenido	Metodología	Evaluación
Valoración (1 - 3)	2.75	3	3
Observaciones generales			
El diseño de las actividades de la secuencia refleja un buen entendimiento de los procesos de enseñanza-aprendizaje, ya que combina un abordaje teórico y práctico de la temática. Las actividades se alinean con los objetivos del ABI, fomentando competencias investigativas en la apropiación de saberes, el análisis de información y el desarrollo de técnicas de laboratorio. Además, la rúbrica de evaluación es pertinente y permite una evaluación objetiva y alineada con los objetivos de aprendizaje.			

Fuente propia

1.10 Criterios de evaluación

Dada la naturaleza de la investigación, se han considerado los criterios propuestos por Correa Bautista (2009) y Abella (2011) para la rúbrica de evaluación. Estos criterios están diseñados para identificar y evaluar las competencias investigativas durante las intervenciones y el desarrollo de la secuencia didáctica, alineándose con los postulados de los autores mencionados.

Tabla 11. Rúbrica de evaluación

C r i t e r i o s d e e v a l u a c i ó n	Niveles de desempeño				
	Dimensión conceptual	Bajo	Básico	Alto	Superior
	Conocimiento Teórico	Demuestra una comprensión limitada de los conceptos clave sobre la calidad de la leche y las consecuencias de las trazas de antibióticos en ella.	Entiende los conceptos fundamentales relacionados con la calidad de la leche y las consecuencias de las trazas de antibióticos en ella.	Comprende y relaciona conceptos sobre la calidad de la leche y las consecuencias de las trazas de antibióticos en ella.	Integra y aplica conocimientos concisos, relacionando los conceptos con otros campos de estudio.
	Análisis de Datos y Resultados	Presenta dificultades en el análisis de datos, interpretación de resultados y establecimiento de conclusiones.	Realiza un análisis básico de datos, pero con algunas limitaciones en la interpretación y conclusiones.	Realiza un análisis sólido de datos, interpretando resultados de manera clara y coherente.	Realiza un análisis avanzado, identificando patrones, relaciones y proponiendo conclusiones significativas.
	Dimensión procedimental	Bajo	Básico	Alto	Superior
	Técnica Analítica	Presenta procedimientos sin conocer métodos de análisis adecuados para el contexto, resultando en resultados imprecisos.	Ejecuta protocolos con comprensión limitada de la teoría y la práctica, logrando resultados aceptables.	Aplica procedimientos y técnicas de análisis químico, entendiendo la teoría y la práctica, obteniendo resultados precisos.	Realiza procedimientos y relaciona la teoría y la práctica y el contexto, logrando resultados óptimos y fundamentados.
	Manejo de laboratorio	Muestra dificultades en la ejecución de procedimientos y en el manejo del material de laboratorio.	Ejecuta procedimientos con ayuda ocasional y maneja el material de laboratorio de manera básica.	Realiza procedimientos de manera autónoma y maneja el material de laboratorio con precisión.	Realiza procedimientos complejos con autonomía y maneja el material de laboratorio con eficiencia.
	Dimensión actitudinal	Bajo	Básico	Alto	Superior
	Actitud frente a la Investigación	Muestra poco interés y participación limitada en actividades de investigación.	Participa en actividades de investigación con interés, pero a veces de manera pasiva.	Participa activamente en investigación, mostrando un enfoque proactivo.	Demuestra un compromiso excepcional con la investigación, liderando iniciativas propias.

Fuente propia.

Resultados y Análisis.

Se obtuvo resultados tanto cuantitativos como cualitativos que se analizaron y discutieron de manera detallada de cada una de las fases, permitiéndonos así obtener conclusiones tanto de la calidad de la leche cruda como de la eficiencia de la propuesta didáctica en cuanto al desarrollo de las competencias investigativas de evaluadas en tres dimensiones, conceptual, procedimental y actitudinal según lo descrito en la rúbrica de evolución.

1.11 Fase I de investigación

En esta sección se discutirán los resultados experimentales relacionados con la calibración del equipo, la eficiencia de la extracción de los analitos utilizando la metodología seleccionada para el análisis HPLC a través de controles negativos.

1.11.1 Resultados curva de calibración Penicilina G

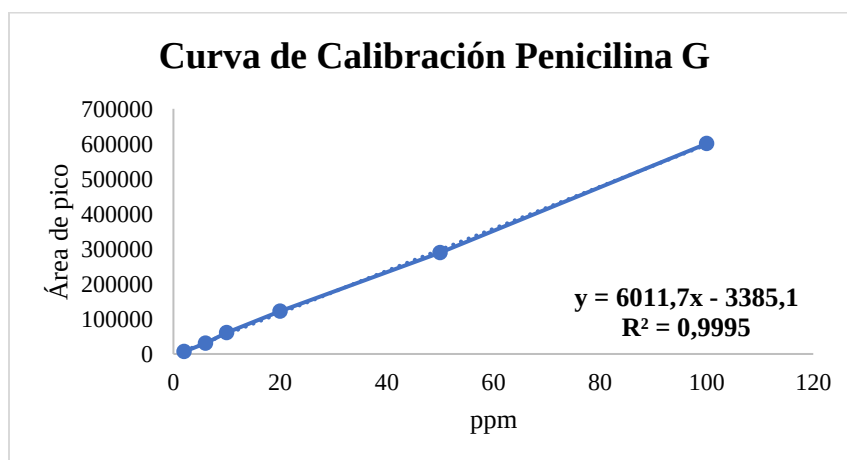
La curva de calibración de la Penicilina G sódica mostró buenas respuestas para los patrones de 100 ppm a 2 ppm, con señales esperadas entre 4.5 y 5 minutos, mientras que los patrones menores a 2 ppm no fueron significativos debido a la baja sensibilidad del equipo y se descartaron. Todos los patrones se aforaron con una solución de D-glucosa, que se utilizó como blanco.

Tabla 12. Datos de la curva de Calibración de Penicilina G.

Patrón	Volumen (mL)	Concentración (ppm)	Área
Blanco	0	0	0
1	0,5	2	6512
2	1,5	6	30956
3	2,5	10	60398
4	5	20	122243
5	12,5	50	289388
6	-	100	600391

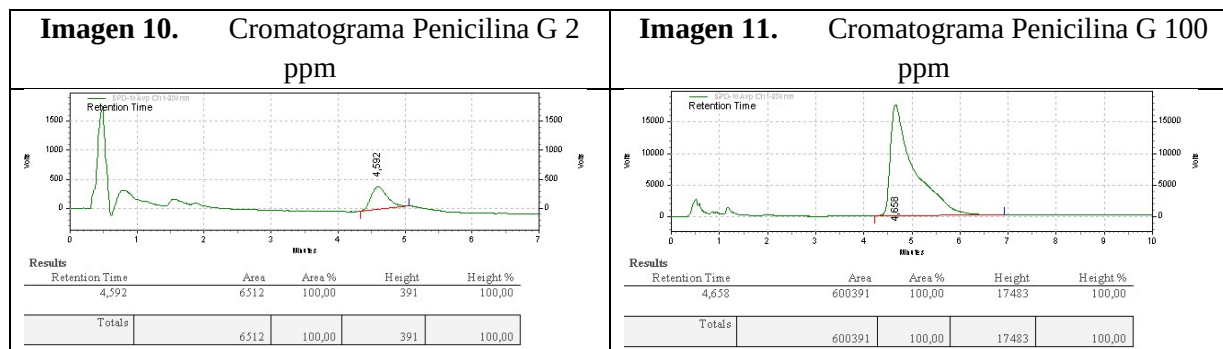
Fuente propia

Gráfico 1. Curva de calibración de Penicilina G



Fuente propia

Tabla 13. Cromatogramas de patrones de Penicilina G

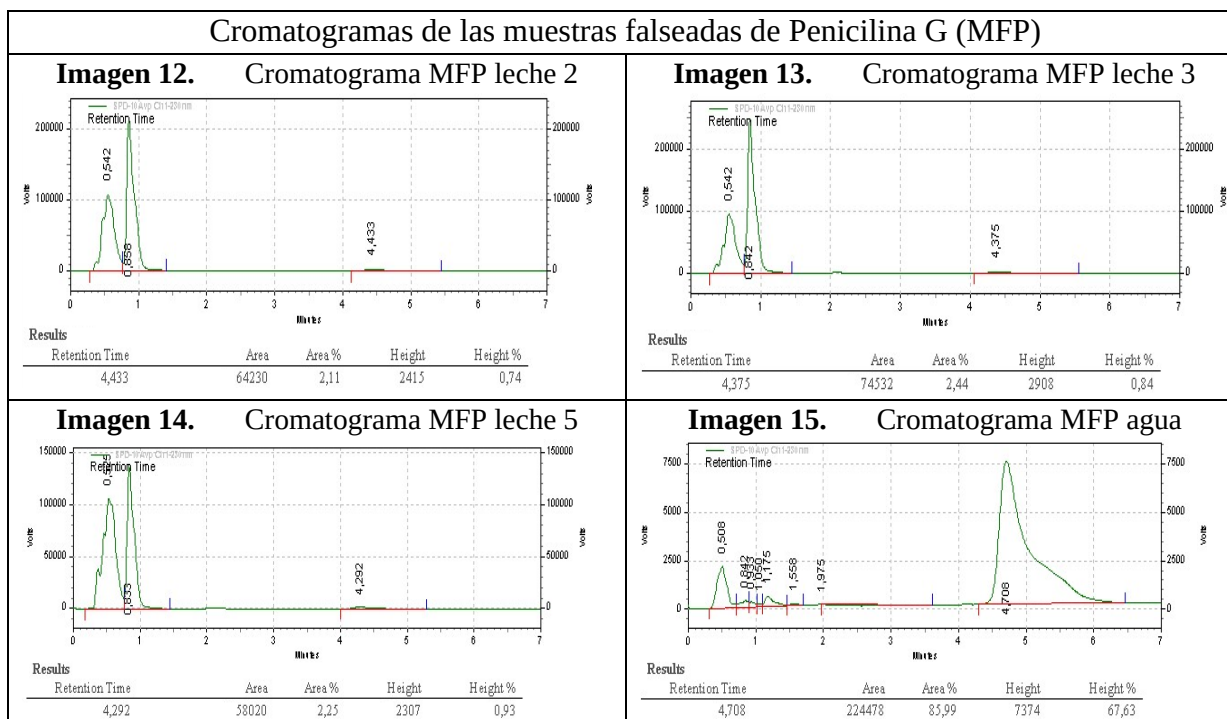


Fuente propia

Los cromatogramas obtenidos de las soluciones patrón de penicilina G, evidencian que los tiempos de retención pueden rondar cerca de 4,592 y 4,658 minutos, como se observa en la tabla 13.

1.11.1.1 Efectividad de la extracción de la Penicilina G

Tabla 14. Cromatogramas de muestras faseadas con Penicilina G



Fuente propia

Para garantizar la efectividad del método utilizado en el tratamiento de las muestras de leche, se decidió añadir un volumen conocido de Penicilina G, tal como se describe en la metodología. Los

resultados obtenidos demostraron que la metodología implementada permitió la identificación y cuantificación de Penicilina G mediante HPLC, ya que al comparar los tiempos de retención de las soluciones patrón registradas en la Tabla 13 y los de las muestras falseadas con el antibiótico en la Tabla 14, tienen un tiempo de retención comparable indicando la presencia del analito en las muestras.

Es importante aclarar que las variaciones que tiene esta variable se pueden deber a la inyección manual e inestabilidad en la presión de la bomba del sistema.

Tabla 15. Concentraciones muestras falseadas con Penicilina G

Muestra falseada	Área	Concentración Experimental (ppm)	Concentración Teórica (ppm)	Error Absoluto
Leche 1	62625	10,98	$[Pen] = \frac{2 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}}{17 \text{ mL}}$ $= 11,76 \text{ ppm}$	0,78
Leche 2	64230	11,25		0,51
Leche 3	74532	12,06		0,84
Leche 4	56333	9,93		1,83
Leche 5	58020	10,21		1,55
Agua	224478	37,90	$[Pen] = \frac{4 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}}{10 \text{ mL}}$ $= 40 \text{ ppm}$	2,10

Fuente propia

Los valores obtenidos experimentalmente para las muestras de leche adulteradas con el antibiótico varían entre 12,06 y 9,93 ppm, mientras que el valor teórico es de 11,76 ppm, lo que muestra variaciones significativas en términos de concentración. Del mismo modo, la muestra de agua presentó un valor experimental de 37,90 ppm, acercándose al valor teórico de 40 ppm. A pesar de las variaciones en los valores obtenidos, la metodología descrita por para extraer el analito de la muestra problema puede considerarse confiable debido a la proximidad de los valores experimentales de los controles positivos con los teóricos.

Las discrepancias observadas, aunque significativas, están dentro de un rango razonable y pueden explicarse por factores en el laboratorio, como errores del analista y la incertidumbre inherente a las mediciones experimentales.

1.11.2 Resultados curva de calibración Amoxicilina

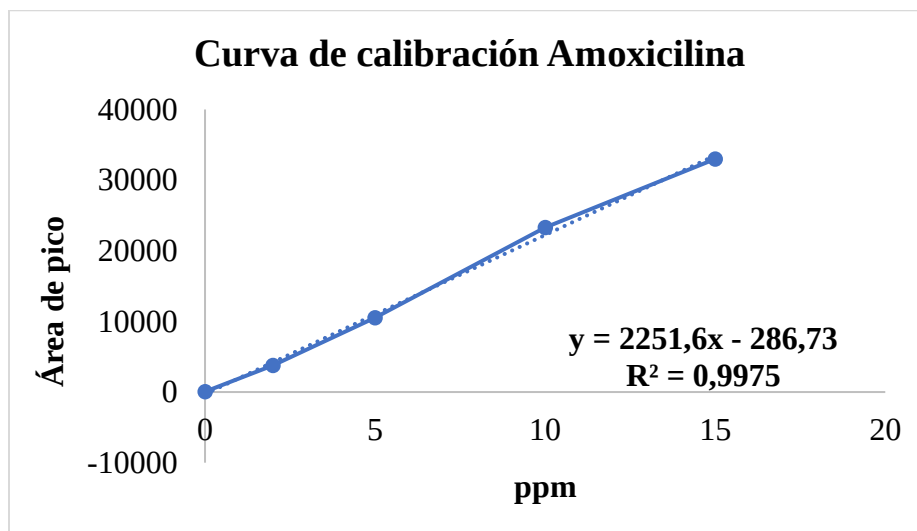
La curva de calibración de amoxicilina se construyó utilizando patrones de mayor concentración debido a la sensibilidad limitada del cromatógrafo, con un valor analítico mínimo de 5 ppm. Solo se incluyeron los patrones detallados en la tabla 16, y se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos como blanco para la calibración.

Tabla 16. Datos curva de calibración Amoxicilina.

Patrón	Volumen (mL)	Concentración (ppm)	Área
Blanco	0	0	0
1	1,25	5	209225
2	2,5	10	418454
3	5	20	837490
4	12,5	50	2013975
5	-	100	3701555

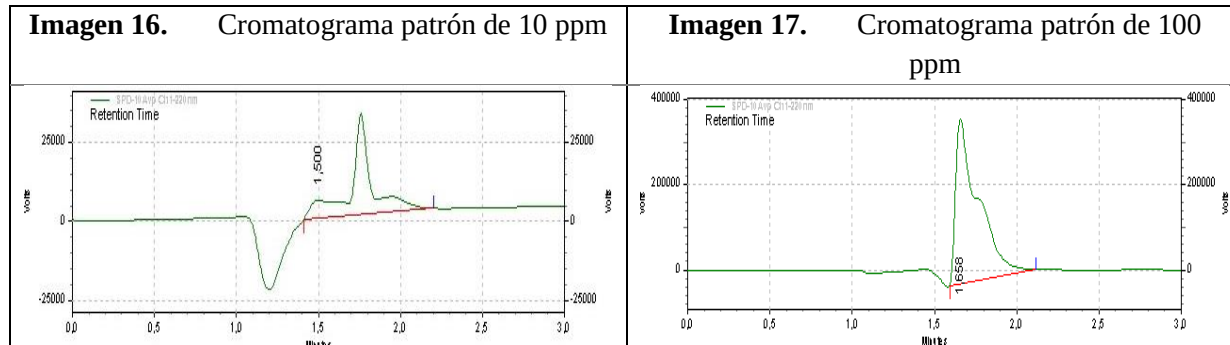
Fuente propia.

Gráfico 2. Curva de calibración Amoxicilina



Fuente propia

Tabla 17. Cromatogramas de patrones de Amoxicilina



Fuente propia

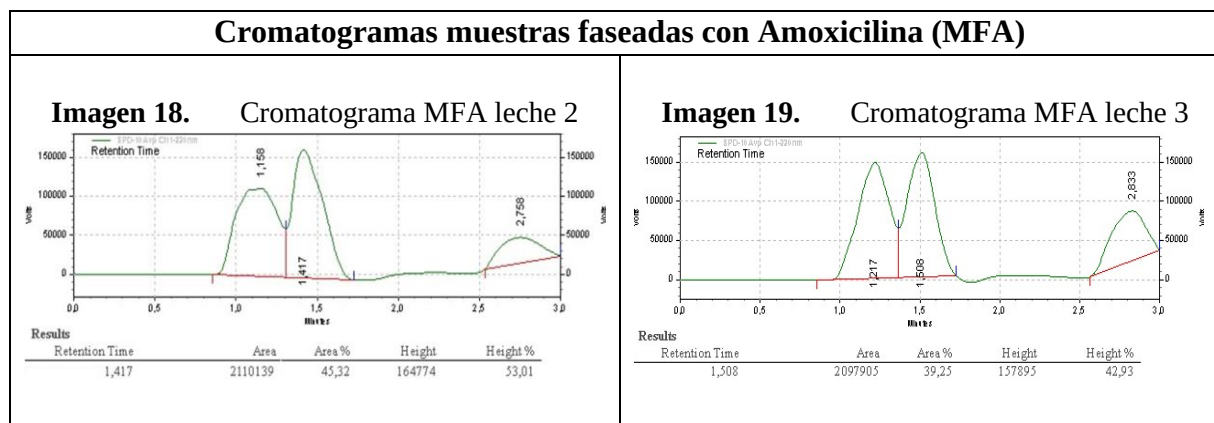
Los cromatogramas obtenidos de las soluciones patrón de Amoxicilina, evidencian que los tiempos de retención pueden variar o rondar cerca de 1,500 y 1,658 minutos, como se muestra en la Tabla 17 de los cromatogramas de patrones de Amoxicilina.

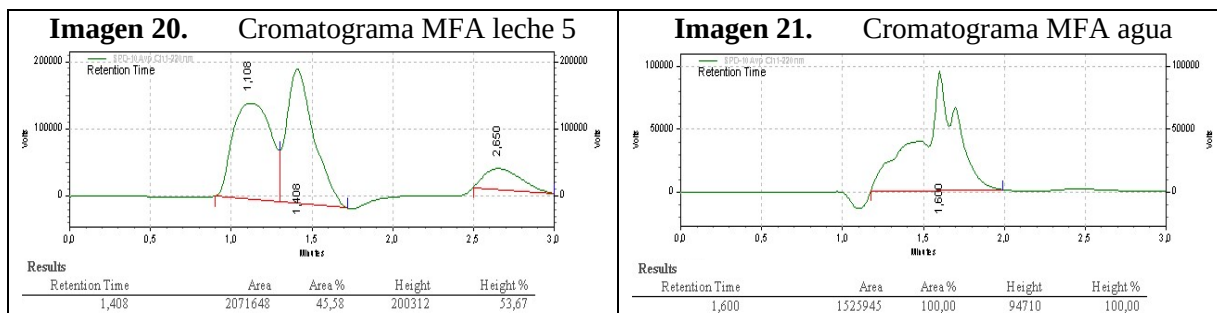
1.11.2.1 Eficiencia de la metodología extracción de la Amoxicilina

El método utilizado para la identificación y cuantificación de la Amoxicilina resultó ser eficiente, ya que se obtuvieron los resultados esperados con relación al contenido del antibiótico previamente añadido a las muestras de leche.

Por lo tanto, se puede concluir que este método es adecuado para procesar muestras de leche bovina antes de su análisis mediante cromatografía de HPLC. Como se puede observar las siguientes imágenes correspondientes a los cromatogramas de las muestras falseadas con Amoxicilina.

Tabla 18. Cromatogramas de muestras faseadas con Amoxicilina





Fuente propia

Tabla 19. Concentraciones muestras falseadas con Amoxicilina

Muestra falseada	Área	Concentración Experimental (ppm)	Concentración Teórica (ppm)	Error Absoluto
Leche 1	-	-	$[Amo] = \frac{2 \text{ mL} \cdot 250 \text{ ppm}}{9 \text{ mL}}$ $= 55,55 \text{ ppm}$	-
Leche 2	2110139	55,47		0,08
Leche 3	2097905	55,14		0,41
Leche 4	2036459	53,48		2,07
Leche 5	2071648	54,43		1,12
Agua	1525945	39,7	$[Amo] = \frac{4 \text{ mL} \cdot 100 \text{ ppm}}{10 \text{ mL}}$ $= 40 \text{ ppm}$	0,3

Fuente propia

Los valores experimentales para las muestras de leche adulteradas con el antibiótico varían entre 53,43 y 55,47 ppm, en comparación con el valor teórico de 55,55 ppm, evidenciando variaciones significativas en concentración. La muestra de agua presentó un valor experimental de 39,7 ppm, muy cercano al valor teórico de 40 ppm. A pesar de estas variaciones, la metodología para extraer el analito de la muestra se considera confiable debido a la proximidad de los valores experimentales de los controles positivos con los teóricos.

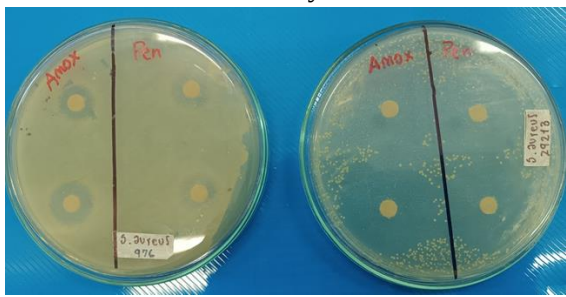
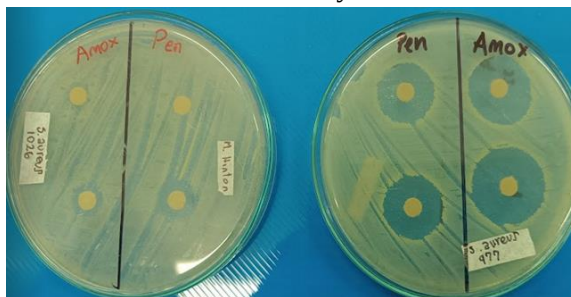
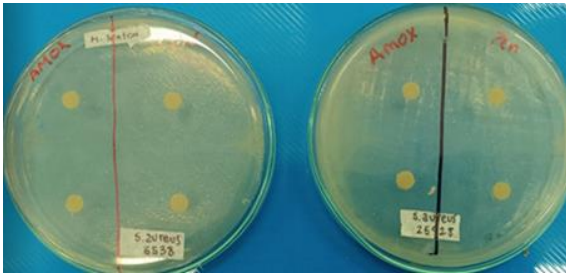
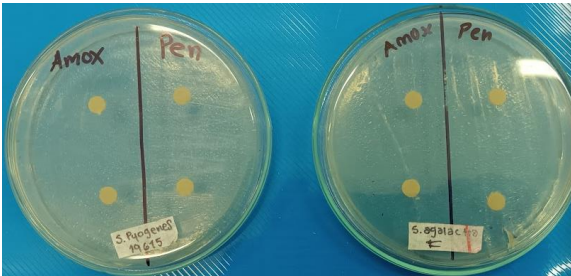
1.12 Fase II de investigación

Se presentarán y discutirán los resultados del trabajo de laboratorio microbiológico, incluyendo los resultados de los antibiogramas obtenidos mediante los dos métodos empleados y el contraste entre ellos. Para observar el procedimiento utilizado en los antibiogramas ver el anexo 6.

1.12.1 Antibiógramas por el método Difusión en disco.

La técnica de difusión en disco o Kirby-Bauer tiene como fundamento observar la sensibilidad de una cepa bacteriana a un agente antimicrobiano de forma cualitativa midiendo los halos de inhibición. Esta técnica es cualitativa y permite determinar si una cepa es sensible o resistente a un antibiótico específico. Los resultados mostraron que, a pesar de evaluar una misma especie bacteriana, como *Streptococcus aureus*, la resistencia a la penicilina o amoxicilina varía dependiendo de la cepa.

Tabla 20. Resultados antibiógramas por difusión en disco

Imagen 22. Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 976 y 29213 	Imagen 23. Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 1026 y 977 
Imagen 24. Halos de inhibición cepas <i>S. aureus</i> 6538 y 25923 	Imagen 25. Halos de inhibición cepas <i>S. pyogenes</i> 19615 y <i>S. agalactiae</i> 

Fuente propia.

En la tabla 21 se observarán, los datos de los diámetros de los aros de inhibición obtenidos en esta práctica en centímetros.

Tabla 21. Diámetro del halo de inhibición por difusión en disco.

Bacteria	[Pen] 8 µg/mL	[Pen] 16 µg/mL	[Amo] 8µg/mL	[Amo]16 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> 29213	3,4cm	3,4cm	3,2cm	3,4cm
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	6,4cm	7,0cm	5,0cm	6,0cm
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	4,1cm	4,8cm	4,3cm	4,4cm
<i>Staphylococcus aureus</i> 1026	Resistente	1,4cm	0,9cm	1,2cm
<i>Staphylococcus aureus</i> 976	1,5cm	1,5cm	1,4cm	1,9cm
<i>Staphylococcus aureus</i> 977	2,1cm	2,2cm	2,4cm	2,7cm
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615	Muy sensible	Muy sensible	Muy sensible	Muy sensible
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Muy sensible	Muy sensible	Muy sensible	Muy sensible

Fuente propia.

Como se puede observar en los resultados de la Tabla 21, las cepas de una misma especie, como los *Staphylococcus aureus*, presentan diferentes tamaños de aro de inhibición, lo cual indica una diferencia en la tolerancia a los antibióticos estudiados (Penicilina G y Amoxicilina). En el caso del 1026, se observa poca sensibilidad a los antibióticos, posiblemente debido a la presencia de enzimas betalactamasas que degradan la acción antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos, como los dos fármacos de interés.

A diferencia de la cepa anterior, el *Staphylococcus aureus* 6538 tiene un aro de inhibición de tamaño considerable, siendo mayor a 6 cm a una concentración de 192 µg/mL. En cuanto a los *Streptococcus pyogenes* y *agalactiae*, no fue posible medir el diámetro del halo de inhibición, ya que el tamaño de este era mayor que el espacio de las cajas de Petri. Por esta razón, se determina que hubo acción antimicrobiana y que estas cepas son muy sensibles a los antibióticos usados.

1.12.2 Antibiogramas por el método Dilución en agar.

A diferencia del anterior método, los antibiogramas por dilución en agar permiten observar a que concentración de antibiótico la cepa bacteriana comienza a ser sensible, razón por la cual se realizan diluciones en cascada a la mitad de la concentración anterior.

En la tabla 22, se puede observar una “X” para soportar que a esa concentración la bacteria tiene crecimiento en el agar, mientras que la ausencia de esta marca significa que a la concentración respectiva la bacteria no tiene crecimiento, de esta manera se puede determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Tabla 22. Resultados de antibiogramas con Penicilina G por dilución en agar.

Penicilina G																
[] ppm	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	17	18	19	20
0,03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,06	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,125	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
1	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X				
2	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X				
4	X	X					X	X	X	X	X	X				
8	X	X					X	X	X	X	X	X				
16	X	X					X	X			X	X				
32	X	X					X	X								
64	X	X														

Fuente propia.

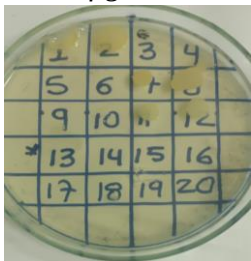
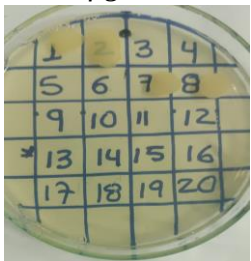
La cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* 976 sigue presentando crecimiento en el agar incluso a una concentración de 64 µg/mL, por lo cual concluimos que su CMI está a una concentración mayor a las utilizadas o que posiblemente esta bacteria sea resistente a la Penicilina G. Para la cepa *Staphylococcus aureus* 6538, se observa que dejó de crecer a una concentración de 1 µg/mL, por lo cual su CMI debe estar entre 0,5 µg/mL y 1 µg/mL. En el caso de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* 25923, se observa que deja de crecer a 4 µg/mL, por lo cual el CMI debe estar en un rango entre 2 µg/mL y 4 µg/mL.

La cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* 1026 tiene una mayor tolerancia a la Penicilina G, ya que presenta crecimiento bacteriano incluso a una concentración de 32 µg/mL. Sin embargo, a diferencia de la cepa 976, esta bacteria no tuvo crecimiento a la concentración de 64 µg/mL, por

lo que se puede concluir que su CMI debe estar entre 32 $\mu\text{g/mL}$ y 64 $\mu\text{g/mL}$. La cepa *Staphylococcus aureus* 29213 no tiene crecimiento a la concentración de 16 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual su CMI debe estar en el rango entre 8 $\mu\text{g/mL}$ y 16 $\mu\text{g/mL}$. La última cepa de *Staphylococcus aureus*, 977, tiene un CMI entre 16 $\mu\text{g/mL}$ y 32 $\mu\text{g/mL}$.

En cuanto a los *Streptococcus*, ambos dejaron de tener crecimiento bacteriano a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual su CMI debe estar entre 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$. En la tabla 23, consigna los resultados obtenidos de los antibiogramas con Penicilina por dilución en agar.

Tabla 23. Antibiogramas con Penicilina G por dilución en agar.

Concentración de Penicilina G			
Imagen 26. Dilución en agar Penicilina G 1 $\mu\text{g/mL}$ 	Imagen 27. Dilución en agar Penicilina G 16 $\mu\text{g/mL}$ 	Imagen 28. Dilución en agar Penicilina G 32 $\mu\text{g/mL}$ 	Imagen 29. Dilución en agar Penicilina G 64 $\mu\text{g/mL}$ 

Fuente propia.

En la Tabla 24, se registran los resultados obtenidos de los antibiogramas con Amoxicilina por dilución en agar.

Tabla 24. Resultados de antibiogramas con Amoxicilina por dilución en agar

Amoxicilina																
[] ppm	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	17	18	19	20
0,03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,06	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
0,125	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
0,25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
0,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
4	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X				
8	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X				
16	X	X					X	X								
32	X	X					X	X								

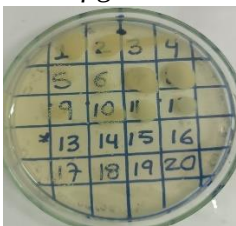
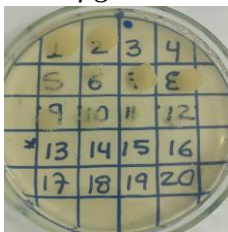
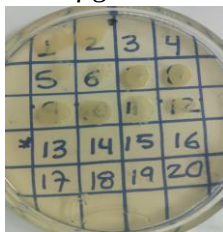
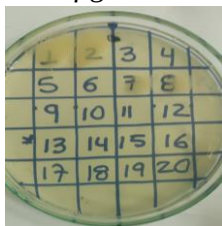
Fuente propia.

Se puede observar que no hay mucha diferencia entre los resultados obtenidos con Penicilina G y los obtenidos con Amoxicilina. Esto se debe a que ambos pertenecen al grupo de los betalactámicos, por lo cual se concluye que las cepas que son resistentes a estos antibióticos poseen un mecanismo de defensa, como la enzima betalactamasa, que degrada la función antimicrobiana de estos antibióticos.

Las cepas *Staphylococcus aureus* 976 y 1026 tienen un CMI mayor a 64 µg/mL, mientras que las cepas 25923, 29213 y 977 tienen un CMI entre 16 µg/mL y 8 µg/mL. El *Streptococcus pyogenes*, similar a los resultados con Penicilina G, tiene un CMI ≤ 1 µg/mL. El *Streptococcus agalactiae* muestra una mayor sensibilidad a la Amoxicilina que a la Penicilina G, ya que esta bacteria detuvo su crecimiento a una concentración de 0,125 µg/mL.

La tabla 25, consigna algunos resultados obtenidos de los antibiogramas con Penicilina por dilución en agar.

Tabla 25. Antibiogramas con Amoxicilina por dilución en agar

Concentración de Amoxicilina en µg/mL			
Imagen 30. Dilución en agar Amoxicilina 0,5 µg/mL 	Imagen 31. Dilución en agar Amoxicilina 4 µg/mL 	Imagen 32. Dilución en agar Amoxicilina 8 µg/mL 	Imagen 33. Dilución en agar Amoxicilina 32 µg/mL 

Fuente propia.

Al contrastar las metodologías de difusión en disco y dilución en agar, se observa una concordancia en los resultados. Las cepas con mayor resistencia, identificadas por un halo de inhibición pequeño en la difusión en disco, coinciden con aquellas que forman colonias en la dilución en agar, puesto que las cepas de *S. aureus* 976 y 1026 mostraron la mayor resistencia, mientras que las cepas más sensibles fueron *S. pyogenes* 19615 y *S. agalactiae*. En la difusión en disco, *S. aureus* 976 y 1026 presentaron el menor halo de inhibición, y en la dilución en agar, esta cepa también mostró mayor resistencia, confirmando los hallazgos del método de dilución en agar.

1.13 Fase III de investigación

En este apartado se presentan los resultados de la fase III de la investigación, que corresponde a la implementación de la secuencia didáctica. Se incluyen las respuestas y análisis de un grupo de ocho estudiantes del Énfasis Disciplinar I, evaluadas en relación con las dimensiones de las competencias investigativas, específicamente en la identificación y aplicación de métodos de investigación para abordar problemas reales, como la presencia de antibióticos en leche bovina y agua superficial y como este se relaciona con la resistencia microbiana.

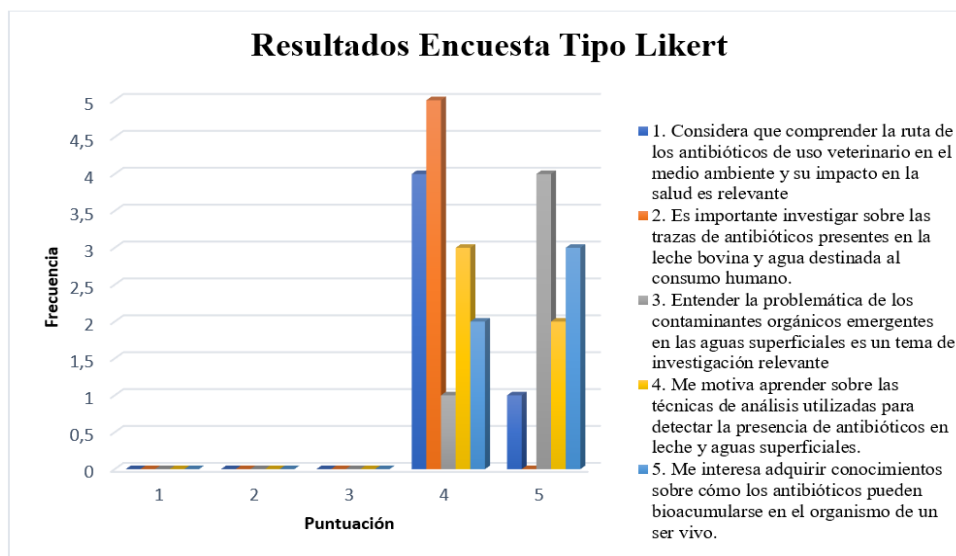
1.13.1 Actividad inicial o diagnóstica.

Para caracterizar el nivel de cada estudiante frente a las dimensiones de la competencia que se pretende fortalecer, se utilizó un instrumento diagnóstico dividido en dos partes, con un tiempo de ocho días para entregarse resuelto. Ver el instrumento en el anexo 2.

Parte 1. Escala tipo Likert.

La primera parte de la actividad es una escala tipo Likert diseñada por los autores, con la finalidad de caracterizar la actitud de los estudiantes frente a la investigación propuesta. Se indicó a los estudiantes dar una puntuación del 1 al 5 frente a una afirmación que enmarcan la importancia de la investigación donde 1 es estar en total desacuerdo y 5 estar totalmente de acuerdo.

Gráfico 3. Resultados escala tipo Likert dimensión actitudinal



Fuente propia.

Para reconocer de mejor manera cuál de las afirmaciones tiene una mejor valoración y por tanto genera una mejor disposición del estudiante frente a la investigación se generarán promedios y desviaciones estándar, varianza y por último se hará un coeficiente α de Cronbach para dar fiabilidad a los resultados obtenidos por la encuesta Likert.

Ecuación α Cronbach

$$\alpha = \frac{k}{k-1} \left(1 - \frac{\sum S^2}{S_T^2} \right)$$

$$\alpha = \frac{5}{5-1} \left(1 - \frac{0,2 + 0 + 0,2 + 0,3 + 0,3}{2,5} \right) = 0,75$$

Tabla 26. Datos estadísticos de la encuesta tipo Likert, actividad diagnóstica.

Estudiante	Afir. 1	Afir. 2	Afir. 3	Afir. 4	Afir. 5	Sumatoria
1	4	4	4	4	4	20
2	4	4	5	4	4	21
3	5	4	5	5	5	24
4	4	4	5	5	5	23
5	4	4	5	4	5	22
Promedio	4,2	4	4,8	4,4	4,6	22
Desviación estándar	0,45	0	0,45	0,55	0,55	1,58
Varianza	0,2	0	0,2	0,3	0,3	2,5
Coeficiente Cronbach	0,75					

Fuente propia.

La encuesta utilizada es eficaz para medir actitudes, por lo que es la única dimensión que se puede caracterizar con esta parte de la prueba diagnóstica es la actitudinal. Los resultados muestran que los estudiantes que resolvieron la prueba están interesados en la propuesta disciplinar de investigación. Sin embargo del grupo de ocho personas, se recibieron cinco respuestas, las cuales revelan un alto nivel de interés en esta competencia.

Además, el coeficiente alfa de Cronbach, superior a 0,7, indica que los resultados de la encuesta son confiables, lo que asegura que el instrumento es consistente y proporciona mediciones estables, esto nos indica que los ítems evaluados en este caso las afirmaciones planteadas en la escala tipo Likert guardan entre si una relación lógica, debido a esto los resultados obtenidos de esta encuesta llevan a análisis y conclusiones fiables. Por otra parte, la escala tipo Likert no fue la única forma de evaluar la actitud hacia la investigación, también se valoró la calidad del trabajo, el tiempo invertido y otros aspectos también son componentes de la competencia actitudinal examinados en esta prueba diagnóstica.

Parte 2. Diagnóstico de conocimientos previos.

La segunda parte tiene como objetivo evaluar los conocimientos previos que tienen los estudiantes frente al tema disciplinar de la investigación sobre el análisis de calidad de la leche cruda de bovino frente a los residuos de antibióticos y como esta se puede contaminar por el proceso de bioacumulación.

Pregunta 1. Defina de forma precisa y exprese con sus propias palabras para los conceptos que se relacionan en la siguiente tabla.

Imagen 34. Conceptos para definir

Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE)	Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF)	Aguas Superficiales	Leche de Bovino para consumo humano
Microorganismos	Antibióticos	Antagonismo	Sinergismo
Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo	Bioacumulación	Resistencia microbiana

Fuente propia

Esta pregunta busca evaluar el conocimiento que los estudiantes tienen sobre los conceptos clave de la investigación disciplinar, fundamentales para comprender la relevancia de la investigación en el contexto de la problemática abordada y determinar su nivel de desempeño en cuanto a los criterios de la dimensión conceptual.

Algunos estudiantes admitieron no estar familiarizados con ciertos conceptos listados, lo que llevó a que muchos eligieran no definirlos. Los conceptos que presentaron mayores dificultades fueron "sinergismo" y "antagonismo", con solo un estudiante proporcionando una definición adecuada. Otros conceptos problemáticos incluyeron "bioacumulación", con una persona indicando no haber tenido contacto previo con el término, y "residuos de productos farmacéuticos" (RPF), con un estudiante sin conocimiento del concepto y otro sin proporcionar una definición. Como resultado, se realizó una retroalimentación para aclarar estos conceptos clave, resolviendo las dudas conceptuales de los estudiantes y socializando las definiciones correctas para construir un entendimiento más científico.

Además de estos conceptos difíciles, algunos otros fueron definidos de manera ambigua o coloquial, sin captar el conocimiento científico subyacente. Por otro lado, los estudiantes demostraron una mayor claridad en conceptos como "análisis cualitativo y cuantitativo", "aguas superficiales" y "resistencia bacteriana".

Con la finalidad de dar solidez a lo anteriormente expuesto, se citarán algunas de las definiciones otorgadas por los estudiantes.

Estudiante 2.

“COE; son contaminantes provenientes de productos que consumimos debido a que tienen presencia por ejemplo de antibióticos. Microorganismos; son organismos demasiado pequeños que pueden tener funciones biológicas importantes. Análisis cualitativo; corresponde a un análisis netamente de algo que no es numérico RPF; no había escuchado sobre eso. Antibióticos; son generalmente medicamentos usados para eliminar infecciones causadas por bacterias Análisis cuantitativo; este tipo de análisis suele ser numérico y se pueden obtener estadísticas, porcentajes y gráficas con estos datos Aguas superficiales; son aquellas que están expuestas como ríos, lagos, humedales, etc. Antagonismo; no sé qué es esto Leche de bovino para consumo humano; es la leche de vaca que consumimos diariamente Sinergismo; no sé qué es esto Resistencia microbiana; esto ocurre cuando un organismo ya reconoce por ejemplo el antibiótico y ya no hace efecto para combatir las infecciones Bioacumulación; no había escuchado sobre esto”

Estudiante 3.

“• Contaminantes Orgánicos emergentes: Son sustancias químicas de origen orgánico que no son monitoreadas con frecuencia, ni controladas por las autoridades ambientales. • Residuos de Productos Farmacéuticos: Son compuestos químicos que provienen de medicamentos y persisten en el entorno tras su utilización, ya sea porque son excretados por humanos o animales. • Aguas superficiales: Son cuerpos de agua como lagos, embalses, ríos, que está en la superficie de la tierra y que se pueden consumir. • Leche de Bovino para consumo humano: Es un producto que consumimos diariamente, producido por las vacas. • Microorganismos: Son organismos diminutos, generalmente unicelulares, que incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos. Muchos de ellos son beneficiosos, mientras que otros pueden causar enfermedades. • Antibióticos: Son sustancias químicas que se utilizan para combatir infecciones y que no se siga propagando. • Antagonismo: No lo sé • Sinergismo: No lo sé • Análisis cualitativo: Se centra en datos numéricos, estadísticos • Análisis Cuantitativo: Se centra en datos no numéricos, más en conceptos y opiniones. • Bioacumulación: Es un proceso donde ciertas sustancias se acumulan en los tejidos de los organismos vivos a medida que son absorbidas más rápidamente de lo que pueden ser metabolizadas o excretadas. • Resistencia microbiana: Es la capacidad de los microorganismos, como bacterias y virus, para resistir los efectos de los antimicrobianos, como antibióticos y desinfectantes, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones.”

Estudiante 4.

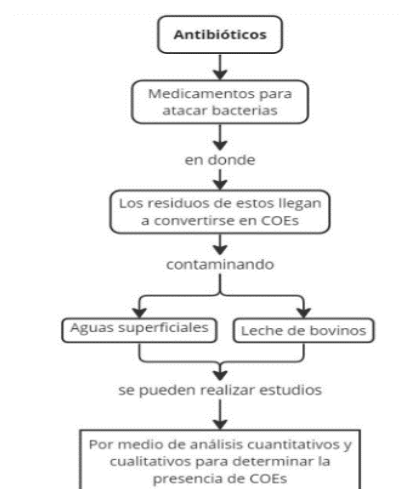
“COE: sustancias contaminantes que resultan de la descomposición de material orgánico o que son producto de seres vivos Microorganismos: Seres vivos a nivel que necesitan de un instrumento para poderlos ver (microscopio) y cumplen funciones en un organismo. Análisis cualitativo: Recopilación de datos para determinar aspectos de interés a partir de la observación Análisis cuantitativo: Recopilación de datos para cuantificar numéricamente aspectos de interés. Antibióticos: Sustancias químicas que usan para controlar infecciones y enfermedades. RPF: Desechos de medicamentos que no se comercializaron y no son aptos para el consumo o desechos que se encuentran en los fluidos o desechos biológicos. Aguas superficiales: Cuerpos de agua expuestos al medio ambiente externo, como ríos, quebradas. Lagos, Océanos, etc. Antagonismo: que tiene un papel secundario en el entorno que se desarrolle Bioacumulación: Agrupación de residuos o desechos orgánicos Leche de bovino para consumo humano: Leche de vaca Sinergismo: No conozco el término Resistencia microbiana: La capacidad que tiene el organismo para enfrentar Microorganismos que ingresan al cuerpo.”

Pregunta 2. Se le solicita al estudiante use los conceptos que reconoce del punto anterior y realice un mapa conceptual o un esquema donde establezca jerarquías, esto con la finalidad de observar como el estudiante hace uso de sus conocimientos para plasmar en un esquema sus conocimientos referentes al tema.

Este punto, al depender del anterior, está limitado por el esquema de conceptos que el estudiante ya conoce. Sin embargo, esto es válido, ya que el propósito principal de este instrumento es proporcionar al docente información sobre los conceptos que deben ser abordados más a fondo durante las actividades intermedias de la secuencia. Así, se busca fortalecer la dimensión conceptual de los estudiantes en relación con la competencia investigativa abordada.

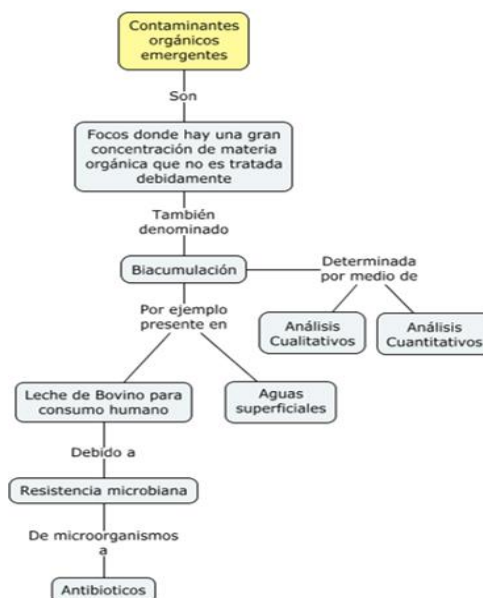
En algunos esquemas se observa el uso adecuado de conectores, con una jerarquización clara, información relevante y una buena organización en la mayoría de los casos. Los estudiantes destacan la importancia del concepto de antibiótico, dándole la mayor jerarquía, incluso cuando este forma parte de los residuos de productos farmacéuticos (RPF), que a su vez son un grupo dentro de los contaminantes orgánico-emergentes (COE). Aunque la mayoría de los estudiantes reconoce el concepto de COE, no identifican bien los grupos que lo componen. Sin embargo, se destaca el conocimiento de los estudiantes sobre los métodos de análisis para identificar y cuantificar analitos en las matrices de estudio. A continuación, se presentarán los esquemas realizados por algunos de los estudiantes.

Imagen 35. Esquema jerárquico de conceptos E1.



Fuente: Estudiante 1

Imagen 36. Esquema jerárquico de conceptos E5



Fuente: Estudiante 5

Pregunta 3. Reconocimiento de grupos funcionales de los antibióticos betalactámicos.

En este punto, se le solicita al estudiante identificar grupos funcionales orgánicos dentro de las estructuras moleculares de algunos antibióticos pertenecientes a los betalactámicos. Esto se hace con la intención de que se familiaricen con la naturaleza compleja de estas moléculas y sus propiedades fisicoquímicas, que pueden influir en el análisis de identificación de estas en las matrices de interés.

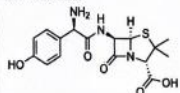
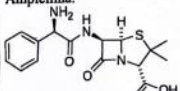
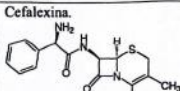
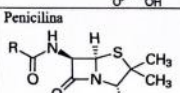
Aunque los estudiantes comprenden que todas las moléculas pertenecen a la familia de antibióticos betalactámicos, la mayoría no identifica correctamente el anillo betalactámico en cada estructura, algunos lo describen incorrectamente como un ciclo butano.

En la retroalimentación, se enfatizó la importancia de la estructura química de los antibióticos analizados y se explicó a los estudiantes por qué estos medicamentos son de interés. La mayoría muestra un buen conocimiento de química orgánica al reconocer grupos funcionales comunes en las estructuras moleculares, como amino, carboxilo, hidroxilo, carbonilo, alquilo y aromático, y algunos también identifican los grupos tiosulfato y amidas.

A continuación, se presentan algunas de las respuestas de los estudiantes.

Imagen 37. Identificación de grupos funcionales E 1

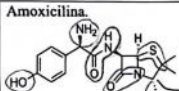
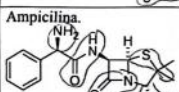
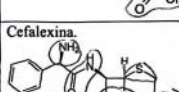
4. Identifique los grupos funcionales presentes en las siguientes moléculas y complete la tabla que señalando las similitudes y diferencias entre ellas.

Molécula	Grupos funcionales	Semejanzas entre moléculas	Diferencia entre moléculas
Amoxicilina. 	Alcoholes Ácido carboxílico Aminas Cetonas	Todos las moléculas tienen presencia de un grupo ácido carboxílico, aminas y cetonas y la molécula 1, 2 y 3: un grupo aromático	En la molécula 1, 2 y 4 cambia la cadena hidrocarbonada que está en la parte izquierda.
Ampicilina. 	Aminas Cetonas Ácido carboxílico		
Cefalexina. 	Aminas Cetonas Ácido carboxílico		
Penicilina 	Aminas Ácido carboxílico Cetonas		

Fuente: Estudiante 1

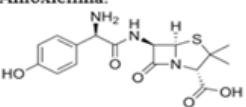
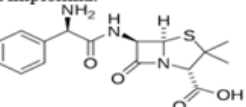
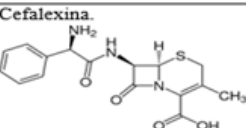
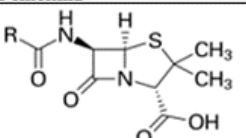
Imagen 38. Identificación de grupos funcionales E 2

4. Identifique los grupos funcionales presentes en las siguientes moléculas y complete la tabla que señalando las similitudes y diferencias entre ellas.

Molécula	Grupos funcionales	Semejanzas entre moléculas	Diferencia entre moléculas
Amoxicilina. 	• Amida • Amino • Alcohol • Ácido Carboxílico • Sulfuro • Anillo aromático	• Las moléculas comparten algunos grupos funcionales: Amida, Amino, Ácido carboxílico y Sulfuro. • Las cuatro estructuras pertenecen a antibióticos. • En todas las estructuras se encuentra el ciclobutano. • En tres de ellas hay un anillo aromático.	• La estructura de la penicilina no tiene un anillo aromático. • En la cefalexina y la penicilina hay presencia de metilos. • Solo la amoxicilina posee el grupo alcohol. • En la penicilina a diferencia de las demás estructuras no hay presencia del grupo amina.
Ampicilina. 	• Amida • Amino • Ácido Carboxílico • Sulfuro • Anillo aromático		
Cefalexina. 	• Amida • Amino • Ácido Carboxílico • Sulfuro • Anillo aromático		
Penicilina 	• Amida • Sulfuro • Ácido Carboxílico		

Fuente: Estudiante 2

Imagen 39. Identificación de grupos funcionales E5

Molécula	Grupos funcionales	Semejanzas entre moléculas	Diferencia entre moléculas
Amoxicilina. 	• Hidroxilo • Carbonilo • Amino • Benceno • Ciclo • Carboxilo	Para el caso de los tres primeros fármacos, existe una clara semejanza en cuanto a su estructura molecular, variando en algunos grupos funcionales como el fenilo en el caso de la amoxicilina.	La principal diferencia se puede notar con respecto a la penicilina. Entre las tres primeras moléculas, para el caso de la cefalexina hay una diferencia en el ciclo y la presencia de un metilo.
Ampicilina. 	• Hidroxilo • Carbonilo • Amino • Benceno • Ciclo • Carboxilo		
Cefalexina. 	• Hidroxilo • Carbonilo • Amino • Benceno • Ciclo • Carboxilo		
Penicilina 	• Hidroxilo • Carbonilo • Amino • Carboxilo • Ciclo		

Fuente: Estudiante 5

Pregunta 4. Usted toma una muestra de agua que posiblemente contenga RPF de Amoxicilina por lo cual decide aplicar pruebas cualitativas para confirmar la presencia del antibiótico en la muestra de agua. Explique cómo podría identificar de forma cualitativa la Amoxicilina en agua. Nota: Tenga en cuenta los grupos funcionales de la Amoxicilina y de los otros antibióticos betalactámicos en la tabla anterior para dar certeza de que lo identificado es Amoxicilina y no otro antibiótico.

El objetivo con esta pregunta es evidenciar el nivel de desempeño del estudiante en relación con las dimensiones conceptuales y procedimentales de la competencia investigativa. Además de reconocer los conocimientos prácticos del estudiante sumergiéndolo en un caso hipotético en el cual le solicitan que identifique Amoxicilina en muestras de agua de manera cualitativa, mediante métodos que pueden ir desde los inmunoensayos ELISA, reconocimiento de grupos funcionales de manera colorimétrica o por medios microbiológicos.

Algunos estudiantes manifiestan no saber cómo realizar de forma cualitativa la identificación de estas especies en las muestras, sin embargo para los estudiantes el método cualitativo para realizar esta identificación es hacer uso de la espectroscopia IR, la cual genera un espectro que puede ser

leído para identificar los grupos funcionales de una molécula, algunos también añaden al IR otro método instrumental como la espectroscopia de RMN o masas, las cuales sirven como complemento a los espectros de IR y que podrían generar un buen resultado para certificar la presencia de Amoxicilina o de otro antibiótico de ser el caso. Aunque los estudiantes proponen en su mayoría métodos instrumentales hay quienes mencionan métodos colorimétricos para identificar los grupos funcionales como lo es el caso de hacer reaccionar el Fe (III) que formaría un complejo de coordinación con la Amoxicilina, lo cual genera un precipitado de color rojo. Por lo cual se puede decir que los estudiantes reconocen los diferentes métodos instrumentales para caracterizar analitos en matrices de forma cualitativa y que saben hacer uso de herramientas para la lectura de espectros de IR, RMN y masas. A continuación, se plasmarán las respuestas de algunos de los estudiantes.

Estudiante 3.

“Una de las pruebas que realizaría es la prueba de formación de complejos con Hierro (III). Ya que el hierro (III) es un ion metálico que tiene la capacidad de formar complejos con ciertas moléculas orgánicas, como la Amoxicilina. Cuando se agrega una solución de cloruro de hierro (III) a una muestra de agua que posiblemente contenga Amoxicilina, si este antibiótico está presente, se producirá una reacción entre la Amoxicilina y el hierro (III). Se formará un complejo de color rojo intenso”

Estudiante 4.

“Por cambios de color frente algún reactivo, por la reacción con otras sustancias según los grupos funcionales, análisis de IR y el más eficiente en la actualidad el análisis de espectroscopia de masas”

Estudiante 5.

“Los métodos espectroscópicos ayudan a reconocer en matrices previamente tratadas la presencia de analitos como los antibióticos, lo primero que haría es hacer uso de espectroscopio de IR para saber los grupos funcionales que tiene el analito, de igual forma haría uso de un espectroscopio de RMN-H para que en conjunto al IR armar una molécula que pueda estar en el agua”

Pregunta 5. ¿Qué método analítico conoce para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos en la leche y agua? Tenga en cuenta las características fisicoquímicas del producto. Elija el método que considere más apropiado y explique su elección en un párrafo que no exceda las 5 líneas.

Para realizar una investigación que revise la calidad de una matriz compleja, como la leche, en cuanto a la presencia de antibióticos, y determinar si se cumple con la normatividad expresada en la Resolución 00001382, es necesario tener conocimiento de las técnicas adecuadas para este análisis. El conocimiento detallado de cada técnica, así como de las características propias tanto de las matrices como de los analitos, permitirá ejecutar eficientemente el trabajo práctico en el laboratorio.

Del grupo de cinco estudiantes que realizaron la actividad tres estudiantes no conocen técnicas analíticas para cuantificar antibióticos en muestras de leche y agua. Solo dos estudiantes mencionaron técnicas instrumentales útiles para la detección y cuantificación de estos analitos, destacando la espectrofotometría como la más conocida. Esto indica que, aunque los estudiantes tienen ciertos conocimientos sobre técnicas instrumentales y analíticas, no relacionan estas técnicas con las características fisicoquímicas de los analitos, que son moléculas orgánicas. Un estudiante mencionó las técnicas de cromatografía instrumental, pero no especificó el tipo de cromatografía, es decir, si los antibióticos se analizan mejor mediante cromatografía de gases, líquida u otra.

A continuación, se presentan algunas de las respuestas de los estudiantes.

Estudiante 2.

“No conozco ningún método para hacer este tipo de análisis, ya que no lo he hecho antes y no conocía sobre el tema”

Estudiante 3.

“La espectrometría ya que es una técnica analítica poderosa que se utiliza para identificar y cuantificar compuestos químicos en muestras complejas. En cuanto a la detección de antibióticos en muestras de leche y agua, es particularmente útil debido a su alta sensibilidad y especificidad.”

Estudiante 5.

“La espectrofotometría es una técnica que permite identificar y cuantificar analitos, sin embargo, la longitud de onda que absorbe el antibiótico también puede absorber otro compuesto presente en la leche, no conozco mucho sobre cromatografías, pero sé que sirven para aislar analitos.”

Pregunta 6. Qué puede concluir sobre la lectura “Ojo con los antibióticos en la leche” (Ibáñez, J. 2022). Enlace: <https://www.infortambo.cl/es/contenidos/ojo-con-los-antibioticos-en-laleche>

En esta pregunta se les solicita a los estudiantes que lean un artículo que centra la problemática a abordar la cual es la calidad de la leche con respecto a los antibióticos, la cual puede verse afectada de manera directa (aplicando el fármaco directamente en el animal) o de forma indirecta (Ingesta de alimentos o líquidos que estén contaminados con antibióticos, es decir por procesos de bioacumulación), esta lectura sirve como introducción a la problemática existente frente a los antibióticos en alimentos de origen animal específicamente la leche, en problemas como la resistencia bacteriana. Además, establece técnicas de identificación de estos compuestos en la leche usados en campo para aceptar o descartar el producto por parte de las empresas.

Los estudiantes lograron entender el objetivo central de este artículo, que es resaltar la importancia del análisis de muestras de leche cruda en cuanto a la presencia de antibióticos. La mayoría reconoce las posibles consecuencias del consumo de antibióticos en los alimentos de origen animal, especialmente en la leche bovina. También comprenden la importancia económica y nutricional de este producto en la sociedad actual, especialmente en los países hispanohablantes, donde la mayoría de la leche consumida proviene de bovinos. Algunos estudiantes destacan la relevancia de las pruebas rápidas realizadas en campo para determinar si las muestras son aptas para los procesos industriales.

Se deja consigna de las conclusiones recolectadas de algunos estudiantes.

Estudiante 3.

“En cuanto al texto anterior resalta la importancia de asegurar la calidad de la leche, destacando un importante riesgo como la presencia de residuos antibióticos en este alimento. En este contexto nos dice que la leche es esencial para la alimentación humana y su calidad debe ser garantizada para prevenir

efectos adversos en la salud de los consumidores, como reacciones alérgicas y resistencia a los antibióticos. De igual manera señala que los residuos de antibióticos pueden afectar la producción y calidad de productos lácteos derivados, lo que tiene implicaciones económicas para la industria láctea, se identifican factores que contribuyen a la presencia de residuos de antibióticos, como errores en el manejo de los animales y el uso incorrecto de antibióticos. Es importante implementar medidas preventivas y herramientas de detección temprana, como el SNAP DUO de IDEXX, para garantizar la confianza en la leche de los consumidores en los productos lácteos.”

Estudiante 4.

“El artículo se centra en la importancia que tiene realizar chequeos a la leche antes de ser introducida a un proceso industrial debido a que una leche contaminada con antibióticos causa problemáticas a la salud humana y de ecosistemas, también recalca la importancia que tiene no ordeñar vacas durante un periodo debido a que esta leche estará contaminada con el antibiótico”

Estudiante 5.

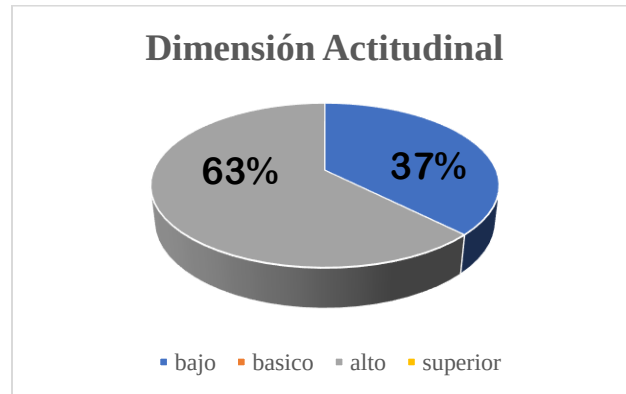
“La leche de vaca tiene importantes demandas alimentarias en la sociedad actual, debido a sus características nutricionales, es por esto por lo que es importante chequear la salud del ganado constantemente con la finalidad de controlar la presencia de microorganismos patógenos que puedan adulterar la calidad de la leche, es por esta razón que se le aplican al ganado antibióticos que también generan un compromiso a la salud y al bienestar ambiental si no son usados con responsabilidad.”

Los resultados de los estudiantes muestran un buen desempeño en conocimientos clave, como las técnicas instrumentales para identificar antibióticos cualitativa y cuantitativamente. También tienen conciencia sobre las posibles consecuencias microbiológicas del consumo de antibióticos en los alimentos y comprenden su importancia económica y de salud.

Cinco de los ocho estudiantes muestra una buena disposición hacia la investigación, y su desempeño general ha sido caracterizado. Sin embargo, se han identificado algunas falencias conceptuales que pueden mejorarse con una secuencia didáctica adecuada y mayor contexto sobre la investigación.

A continuación, se presentarán gráficas y estadísticas que permiten conocer el nivel de desempeño del grupo en cada una de las competencias analizadas con este instrumento.

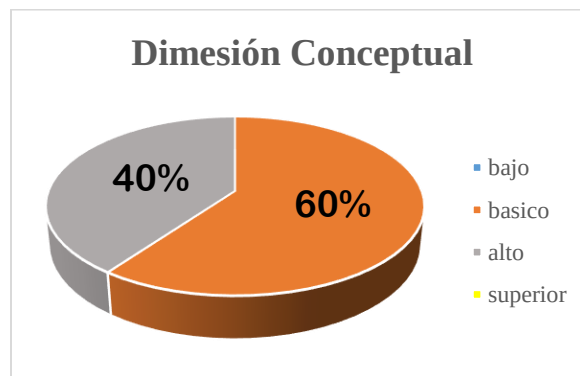
Gráfico 4. Niveles alcanzados en la actividad de inicio - Dimensión actitudinal.



Fuente propia

Como se observó en la encuesta tipo Likert donde los estudiantes tenían una concordancia con respecto a los postulados preguntados donde el valor más bajo fue de 4 para los estudiantes en esta encuesta y que los cinco estudiantes que dieron respuesta a esta demuestran un alto empeño en el desarrollo de la actividad, tomándose el tiempo para responder cada pregunta de forma honesta, detallada y en algunos casos dando un nivel de alta calidad en sus respuesta se considera que estas cinco personas entran en el nivel alto de desempeño de en la competencia actitudinal. Los estudiantes que no dieron respuesta al instrumento se les asigno el nivel de desempeño bajo debido al criterio tenido en la rúbrica donde se especifica que el no realizar las actividades se considera una actitud deficiente para la investigación.

Gráfico 5. Niveles alcanzados en la actividad de inicio – Dimensión conceptual.

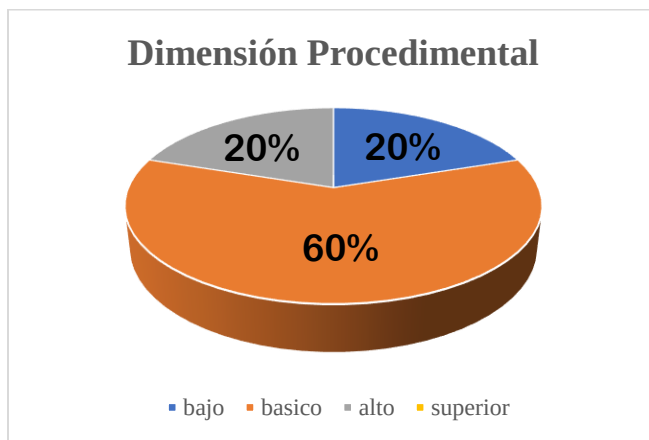


Fuente propia.

Los estudiantes aquí evaluados fueron únicamente los cinco que respondieron a la caracterización. Estos estudiantes enfrentaron diversas dificultades en el desarrollo de la actividad, especialmente en cuanto a la claridad de los conceptos, la habilidad de jerarquizar y extrapolar los conocimientos al contexto de la investigación. Sin embargo, en muchas respuestas se observa claridad en temas como las técnicas espectroscópicas para el análisis cualitativo, las técnicas espectrofotométricas para el análisis cuantitativo, pruebas de grupos funcionales, conceptos relevantes de química orgánica y algunos conceptos de biología. En su totalidad, los estudiantes fueron capaces de identificar el objetivo central de la lectura y de reconocer los grupos orgánicos simples de las moléculas de antibióticos.

Los estudiantes tienen un nivel deseable para realizar una intervención que mejore su desempeño en esta competencia. Se destaca que dos de los estudiantes (estudiantes 3 y 5), respondieron a todas las preguntas y dieron respuestas con mayor claridad y cercanas a los conceptos teóricos, fueron capaces de extrapolar sus conocimientos conceptuales y teóricos al contexto de la investigación. Debido a la calidad de su trabajo y su conocimiento, se destaca su alto nivel en esta competencia, mientras que tres estudiantes (estudiantes 1, 2 y 4) presentaron mayor desconocimiento y que dieron ideas ambiguas, conflictuadas o erróneas frente a los conceptos se establecieron en un nivel básico debido a que algunas respuestas plasmas por estos estudiantes fueron satisfactorias.

Gráfico 6. Niveles alcanzados en la actividad de inicio - Dimensión procedimental.



Fuente propia.

En el instrumento se evaluó la dimensión procedimental de la competencia investigativa propuesta, inmergiendo al estudiante en situaciones donde se le solicitaba ser práctico para conseguir resultados relevantes para la investigación disciplinar. Se pidió a los estudiantes que describieran los métodos que usarían para extraer información, resultados y características de muestras sospechosas de estar contaminadas con residuos de antibióticos. Muchos de los estudiantes describieron acertadamente cómo, mediante los grupos funcionales, se puede identificar la presencia de estas moléculas en las matrices. Sin embargo, en la parte de cuantificación se evidenció una falta de conocimiento, manifestada por los mismos estudiantes.

Se puede concluir que uno de los estudiantes tiene un nivel bajo, ya que describen no conocer la forma de proceder para extraer información relevante para la investigación. Mientras que el estudiante 5 reconoce la mejor manera de extraer resultados válidos para la investigación, por lo que se sitúan en un nivel de competencia alto, aunque necesitan detallar más las características propias de los analitos y las metodologías para extraer esta información. Por otro lado los estudiantes (1, 2 y 3), se encuentra en un nivel básico de la competencia procedimental, ya que reconocen los métodos, pero no describen ni profundizan en al menos uno de los casos de inmersión.

Debido a los resultados obtenidos en la prueba diagnóstica se decidió realizar una intervención con los estudiantes en la cual se hizo uso de la secuencia didáctica que permitieran comunicar de manera efectiva la retroalimentación, corrigiendo de esta forma muchos de los errores cometidos y dando mayor claridad a las temáticas que se desarrollarían durante la investigación.

1.13.2 Actividad 1. Bioacumulación y calidad de la leche.

La actividad uno sigue los lineamientos de la fase de orientación del ABI. Su objetivo es introducir conceptos clave y fomentar la curiosidad de los estudiantes sobre la investigación. La actividad consiste en la lectura de dos artículos científicos: el primero trata sobre la problemática de los antibióticos en alimentos debido al ciclo de bioacumulación en India; el segundo aborda cómo la bioacumulación de fármacos en productos de origen animal genera problemas económicos, sociales, ambientales y de salud.

Tras las lecturas, se pide a los estudiantes que propongan un esquema que explique el ciclo de bioacumulación y su relevancia para los productos derivados de bovinos lecheros. Además, se

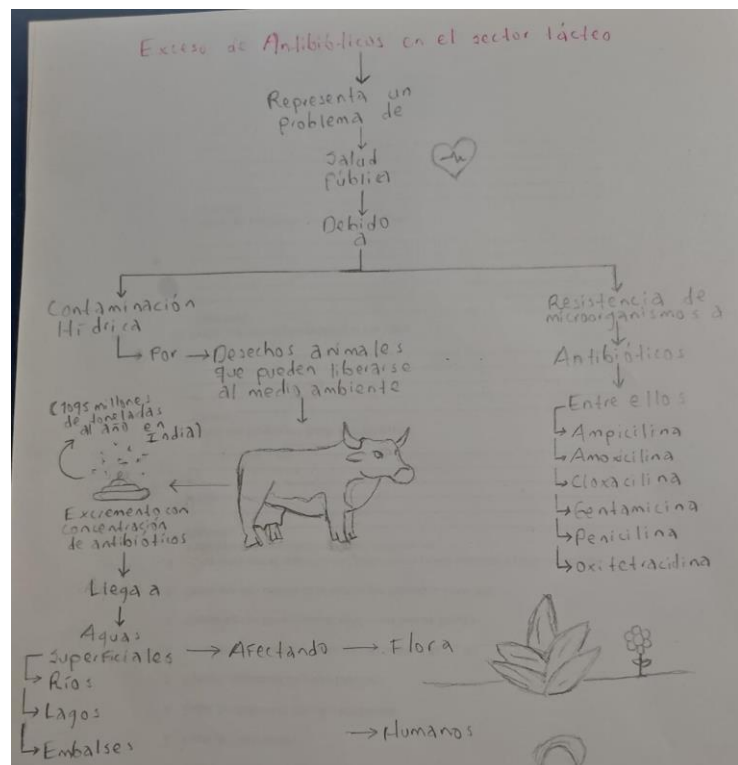
utilizará la plataforma Educaplay para controlar la lectura y comprensión conceptual. Esta actividad se desarrollará en grupos: grupo uno (estudiantes 1, 3 y 5), grupo dos (estudiantes 2, 4 y 8) y grupo tres (estudiantes 6 y 7).

Pregunta 1. Lea el artículo “Epidemiological assessment of antibiotic residues in dairy farm milk and farm waste and water in northern India” Jindall, et al. (2020). Con base en la lectura realice un diagrama a mano incluya dibujos donde se integren todos los agentes que se pueden ver afectados por los residuos de productos farmacéuticos.

Se evidencia que los estudiantes realizaron la lectura del artículo y comprendieron los conceptos más relevantes. Los esquemas desarrollados muestran cómo el ciclo de bioacumulación puede generar contaminación indirecta en alimentos y fuentes hídricas de consumo humano. Además, estos esquemas destacan cómo este ciclo afecta la calidad de los alimentos y la salud de animales y humanos debido a la contaminación ambiental y la eliminación excretora de estas sustancias.

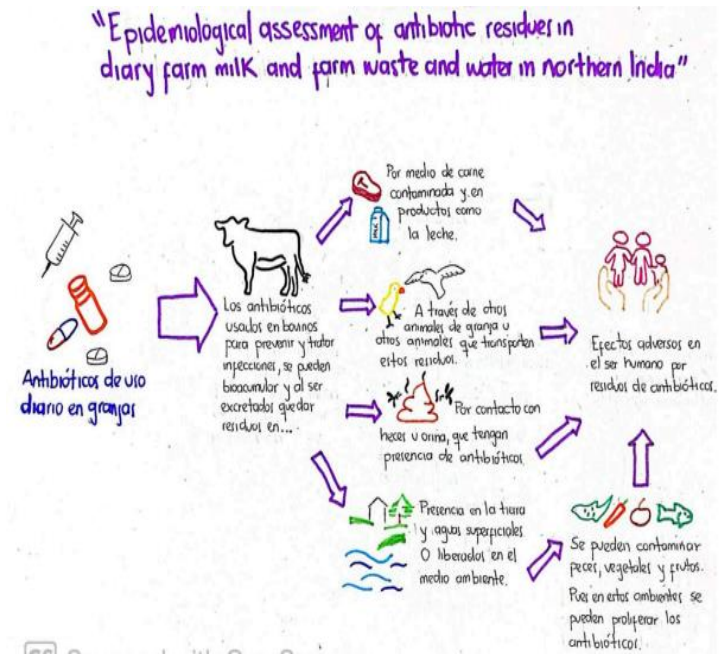
A continuación, se presentan los esquemas realizados por los estudiantes.

Imagen 40. Esquema bioacumulación de antibióticos G 1



Fuente: Grupo 1

Imagen 41. Esquema bioacumulación de antibióticos G 2



Fuente: Grupo 2

Pregunta 2. Plantee un párrafo donde explique cómo el proceso de bioacumulación en un bovino lechero genera trazas de Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF) de antibióticos en la leche haciendo uso del esquema antes esbozado y como esto puede ser problemático para los consumidores y los diferentes ecosistemas.

Los estudiantes utilizan su esquema para explicar por qué el ciclo de bioacumulación es una problemática que puede impactar tanto la salud de los consumidores como el bienestar de los ecosistemas. Principalmente, enfocan el problema en la salud de los consumidores debido a la resistencia microbiana que puede generarse por la ingesta de alimentos contaminados con RPF's. En cuanto al impacto ambiental, lo centran en los ecosistemas marinos, donde los RPF's pueden provocar la muerte de la fauna y flora, especialmente en aguas superficiales y subterráneas.

Sin embargo, el foco de mayor interés y preocupación para los estudiantes es el aumento de la resistencia microbiana, que puede afectar a todos los organismos de un ecosistema, incluyendo a la humanidad. Se dejarán plasmadas las respuestas que validan el análisis anteriormente descrito.

Grupo 1.

“Los bovinos lecheros reciben antibióticos para tratar o prevenir enfermedades, pero estos no se metabolizan completamente y se excretan en la leche o excrementos, generando residuos en la leche y ecosistemas. La bioacumulación ocurre cuando estos residuos se acumulan en los tejidos del animal, preocupando a consumidores y ecosistemas. En los consumidores, esto puede causar resistencia a los antibióticos, dificultando tratamientos de infecciones, provocar reacciones alérgicas y problemas de salud a largo plazo como cáncer, obesidad o asma. En los ecosistemas, los residuos se filtran en aguas superficiales y subterráneas, afectando la vida acuática, la calidad del agua y la salud de los animales..”

Grupo2.

“La bioacumulación en ganado lechero puede resultar en trazas de residuos farmacéuticos (RPF) de antibióticos en la leche. Los antibióticos administrados a las vacas se excretan en orina y heces, contaminando el medio ambiente y el suministro de agua. Esto puede llevar a la bioacumulación en organismos acuáticos y al desarrollo de resistencia bacteriana, afectando tanto a la microbiota animal como al medio ambiente.

El estudio en el norte de India por Jindall et al. (2020) no encontró residuos de antibióticos en agua potable pero sí en leche y estos residuos en la leche representan un riesgo para los consumidores, contribuyendo al desarrollo de bacterias resistentes y dificultando el tratamiento de infecciones. Es crucial implementar sistemas de control de residuos en el sector lácteo para asegurar el uso responsable de los antibióticos y cumplir con los períodos de retiro.”

Grupo 3.

“La bioacumulación en vacas lecheras puede dejar residuos de antibióticos en la leche. Cuando se les administran estos medicamentos, parte se excreta en la orina y las heces, contaminando el medio ambiente y afectando los ecosistemas acuáticos. Además, las bacterias pueden volverse resistentes y transmitir esa resistencia. Un estudio en el norte de la India encontró residuos de antibióticos en la leche, pero no en el agua potable, lo que preocupa por el riesgo de resistencia bacteriana y los problemas de salud asociados. Es crucial controlar el uso de antibióticos en granjas lecheras para proteger a los consumidores y el medio ambiente.”

Pregunta 3. Lea el artículo “Prevalence of Veterinary Antibiotics and Antibiotic- Resistant *Escherichia coli* in the Surface Water of a Livestock Production Region in Northern China” Zhang, et al. (2014). Explique porque es importante realizar un muestreo de aguas superficiales circundantes a las zonas ganaderas, además de la importancia del análisis de excremento de heces fecales y orina de los bovinos productores de leche.

Los estudiantes priorizan y se enfocan en la problemática de resistencia microbiana de los microorganismos en el ambiente debido a la cantidad de fármacos no metabolizados y excretados por los bovinos productores de leche, dando como respuesta que se debe analizar en conjunto excreciones, suelos, aguas circundantes en conjunto con el animal y el producto de origen animal.

Grupo 1.

“El muestreo de aguas superficiales cercanas a zonas ganaderas es crucial debido a la contaminación por el uso extendido de antibióticos en animales. Entre el 40-90% de estos antibióticos se excreta sin metabolizar, contribuyendo a la presencia de residuos y bacterias resistentes en el medio ambiente. El estiércol utilizado como fertilizante puede diseminar estos residuos hacia las aguas superficiales mediante la escorrentía. Monitorear estas aguas ayuda a evaluar y entender la distribución de la contaminación ganadera y la presencia de antibióticos en el agua fomenta el desarrollo de bacterias resistentes. Es importante analizar el estiércol y la orina de bovinos lecheros para determinar los niveles de antibióticos residuales, fuente directa de contaminación del suelo y el agua.”

Grupo 2.

“ El muestreo en aguas superficiales cerca de zonas ganaderas busca identificar la filtración de antibióticos y microorganismos resistentes, que pueden contaminar fuentes hídricas. Los antibióticos aplicados al ganado, no totalmente metabolizados, se excretan en heces y orina, y su presencia prolongada favorece la proliferación de bacterias resistentes. Un estudio en el río Jiyun encontró que entre el 58% y el 100% de 12 antibióticos analizados estaban presentes, con concentraciones de menos de 1 ng/L a 450 ng/L, siendo las más altas cerca de granjas porcinas y ganaderas. Los antibióticos en el estiércol migran al suelo agrícola y luego al agua por escorrentía, explicando la contaminación acumulada a lo largo del río.”

Grupo 3.

“El muestreo en aguas superficiales cercanas a zonas ganaderas es esencial para identificar la filtración de antibióticos que pueden contaminar fuentes hídricas y el medio ambiente. Los antibióticos administrados al ganado se excretan en gran parte a través de heces y orina, lo que genera la proliferación de bacterias resistentes. Estudios, como el realizado en el río Jiyun, han encontrado altos porcentajes de antibióticos en el agua, con concentraciones particularmente altas cerca de granjas. Los residuos de antibióticos en el estiércol pueden migrar al suelo y al agua a través del escurrimiento, indicando una contaminación continua y acumulada proveniente de actividades ganaderas y agrícolas.”

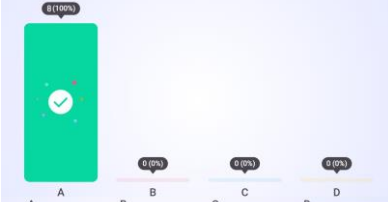
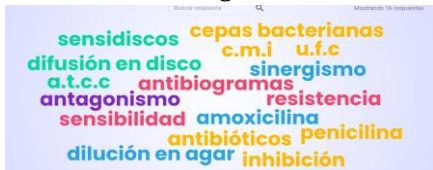
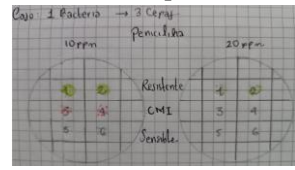
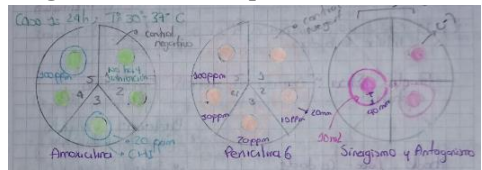
La función de esta actividad, que es generar curiosidad sobre la investigación centrada en la calidad de la leche en cuanto a antibióticos y acercar a los estudiantes a conceptos que previamente no conocían y su aplicabilidad en un contexto de investigación relevante, ha sido satisfactoria. Esto se refleja en las respuestas proporcionadas por los propios estudiantes durante la actividad. Para retroalimentar la información se empleó una infografía, anexo 4, sobre el ciclo de bioacumulación de antibióticos en el ganado.

1.13.3 Actividad 2. Métodos de análisis de sensibilidad bacteriana.

Los resultados de los antibiogramas obtenidos mediante los métodos de difusión en disco y dilución en agar, expuestos en la fase II de la investigación, se emplearon como recurso pedagógico con los estudiantes. Esto a través de una presentación interactiva realizada mediante la herramienta Classpoint, anexo 5, en la cual se explicaron las metodologías empleadas, los diseños experimentales, posibles resultados a obtener según casos simulados y se mostró un vídeo de la práctica de laboratorio microbiológico realizada en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, ver anexo 6.

Debido al riesgo biológico que supone la manipulación de bacterias patógenas, esta práctica no se realizó con los estudiantes. Sin embargo los resultados obtenidos se expusieron para que ellos sacaran sus propias conclusiones.

Tabla 27. Resultados actividad interactiva: antibiogramas

Pregunta o indicación	Respuesta
1 ¿Qué método se utiliza para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos? A. Método de impregnación B. Concentración mínima bactericida C. Método de Kirby-Bauer D. Método de cultivo	Imagen 42. Pregunta opción múltiple 1  Fuente: Actividad interactiva Classpoint
2 ¿Para qué se emplea el método de dilución en microbiología? A. Determinar la concentración mínima inhibitoria B. Contar el número de microorganismos C. Crear nuevos microorganismos D. Eliminar los microorganismos	Imagen 43. Pregunta opción múltiple 2  Fuente: Actividad interactiva Classpoint
3. ESCRIBA UNA PALABRA RELACIONADA CON LAS PRUEBAS DE ANTIBIOGRÁMAS	Imagen 44. Nube de palabras sobre antibiogramas  Fuente: Actividad interactiva Classpoint
4. PLANTEE DIFERENTES CASOS DE ANTIBIOGRAMAS	Imagen 45. Caso por dilución en agar  Fuente: Grupo 1 Imagen 46. Caso por difusión en disco  Fuente: Grupo 2

5. CON BASE EN EL VÍDEO,
REALICE UN ANÁLISIS BREVE DE
LOS RESULTADOS.

Imagen 47. Análisis de resultados por estudiante



Fuente: Actividad interactiva Classpoint

Fuente propia

El objetivo de esta actividad es que los estudiantes incursionaran en la microbiología, un área no abordada en el plan de estudios de la licenciatura en química, pero relacionada con el problema de investigación por sus causas y consecuencias. Además, buscó familiarizar a los estudiantes con las metodologías utilizadas y sus aplicaciones, como se evidenció en las preguntas 1, 2 y 3.

Para las indicaciones 4 y 5 se emplearon los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio bacteriológico para que los estudiantes comprendieran la sensibilidad y resistencia bacteriana, ilustrando cómo una misma especie, como *Staphylococcus aureus* 1026 y 976, podía mostrar alta resistencia a concentraciones elevadas de Penicilina G y Amoxicilina.

Estas pruebas estuvieron directamente relacionadas con las problemáticas derivadas del consumo de alimentos, como la leche, que contenían trazas de estos antibióticos. Esto, a su vez, contribuyó a la resistencia bacteriana y redujo la eficacia de los tratamientos contra bacterias patógenas.

1.13.4 Actividad 3. Propuesta análisis de residuos de antibióticos en leche y agua

Debido a que la secuencia didáctica adapta fases del modelo ABI, esta actividad incluirá la fase investigativa, incluyendo las dos primeras sub-fases, para ver la actividad completa ver el anexo 7. Para el desarrollo de esta actividad se decidieron formar grupos de trabajo. Debido a esto, los ocho estudiantes quedaron asignados en tres grupos diferentes, organizados de la siguiente manera grupo uno (estudiantes 1, 3 y 5), grupo dos (estudiantes 2,4 y 8) y grupo tres (estudiantes 6 y 7), cada uno con un caso diferente para desarrollar. Al grupo uno le fue asignado el caso del análisis de Penicilina G en la matriz de leche; al segundo grupo le fue asignado el análisis de Amoxicilina en la misma matriz; y al tercer grupo le fue asignado el caso del análisis de ambos antibióticos en

la matriz de agua. Esto se debió a la complejidad de la composición química de cada matriz de estudio.

La actividad se divide en dos partes, la primera tiene como finalidad dar el contexto de un trabajo de campo, donde se deja consignado un vídeo de cómo fueron recolectadas las muestras de leche y agua en la finca ganadera, producido y editado por los autores. En el segundo punto, se presenta un caso de inmersión donde se le solicita al estudiante investigar y proponer una metodología que sea eficiente para cada caso. Para esto, se les solicita a los estudiantes llenar tablas con los materiales, reactivos y equipos necesarios para el análisis del analito en su matriz correspondiente. De igual forma, deben construir un diagrama de flujo con la propuesta que ellos seleccionaron como idónea. Por último, y con la intención de introducirlos en el método instrumental de HPLC, se les piden las condiciones cromatográficas a usar.

Los estudiantes realizaron un buen ejercicio de investigación para cada caso, entregaron información relevante y organizaron de buena manera la información de la metodología usada en cada caso dentro del esquema del diagrama de flujo, de igual manera, realizan especificaciones oportunas en los ejercicios aplicados dentro de la actividad, se observa una falta de conocimiento en las normas APA 7 por parte de los estudiantes ya que no fueron usadas correctamente y en algunos casos no se tuvieron en cuenta.

A continuación, se dejan plasmados los resultados obtenidos por cada grupo.

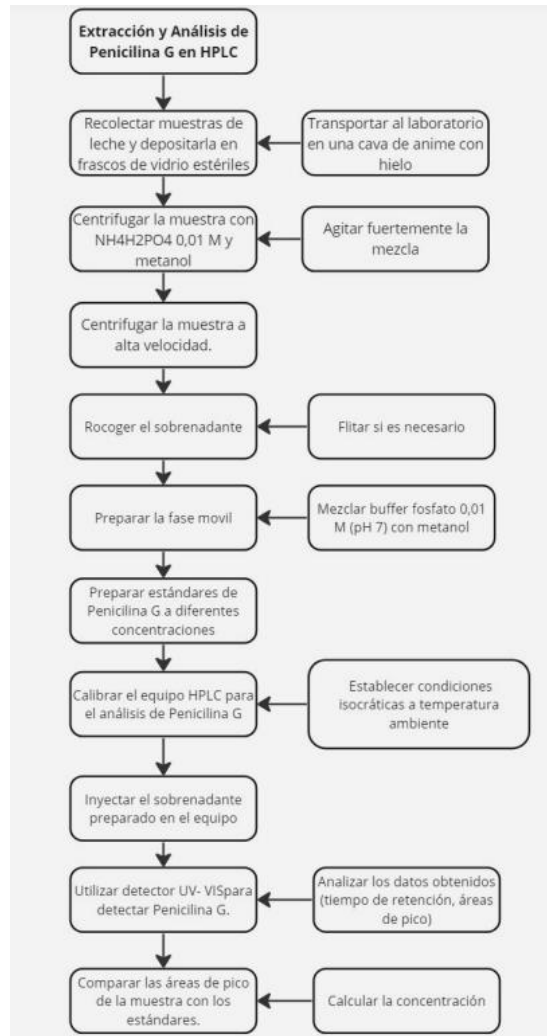
Imagen 48. Reactivos y materiales penicilina G 1

Tabla 1. Reactivos y Materiales

Reactivos	Materiales	Equipos
Fosfato di ácido de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Viales de muestra	Cromatógrafo líquido Shimadzu Corporation
Metanol	Micropipeta	Detector UV-VIS
Buffer Fosfato	Filtros de membrana	Columna de separación
		Centrifugadora

Fuente: Grupo 1.

Imagen 49. Diseño experimental penicilina G 1



Fuente: Grupo 1.

Imagen 50. Condiciones cromatográficas G 1
Tabla 2. Condiciones Cromatográficas.

Sistema Cromatográfico	
Fase Móvil.	La fase móvil consta de una mezcla buffer fosfato 0.01M a pH 7
Proporción de la fase móvil.	Se establece la mezcla Buffer fosfato y metanol en una proporción (65:35 v/v)
Tipo de detector.	El detector a usar fue un UV-VIS a 230 nm
Columna Cromatográfica	En cuanto a la columna, se propone una de fase reversa C18 a temperatura ambiente

Fuente: Grupo 1

Imagen 51. Reactivos y materiales Amoxicilina G 2

Tabla 1. Reactivos y Materiales (Caso 2)

Reactivos	Materiales	Equipos
Muestras de leche cruda.	Tubos de ensayo estériles.	Centrífuga
Buffer fosfato pH 7	Pipetas graduadas.	Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
estándares de amoxicilina.	Filtros de membrana.	
Solventes orgánicos: acetonitrilo	Matraz aforado	
Estándares de amoxicilina:	Jeringas y agujas	
Agua destilada/ desionizada	Papel de filtro	
Ácido acético	Microcentrifugas	
	Papel aluminio	

Fuente: Grupo 2.

Imagen 52. Diseño experimental Amoxicilina G 2

Diagrama de Flujo:



Fuente: Grupo 2.

Imagen 53. Condiciones cromatográficas G 2

Tabla 2. Condiciones Cromatográficas. (Caso 2)

Sistema Cromatográfico	
Fase Móvil.	En esta fase se puede usar una mezcla de agua (85%) y acetonitrilo (15%). Añadiendo ácido acético (0,1% v/v) para mejorar la separación y sensibilidad.
Proporción de la fase móvil.	Acetonitrilo – agua en una proporción 15:85 lo que quiere decir que en 100 mL de fase móvil están conformados por 15 mL de acetonitrilo y 85 mL de agua
Tipo de detector.	Detector de UV-Vis, que es uno de los más utilizados debido a su sensibilidad y facilidad de uso.
Columna Cromatográfica	Columna de fase inversa C18. • Tipo de fase estacionaria: sílice modificada con grupos octadecilo • Tamaño de partícula: 3-5 μm (para análisis rutinario) o 1.8-2.5 μm (para análisis de alta resolución) • Longitud de la columna: 150-250 mm • Diámetro interno: 4.6 mm (columna estándar) o 2.1 mm (columna de menor volumen) • Temperatura: Generalmente entre 25-40°C, dependiendo de las condiciones óptimas para separación <i>Tomado de (Analice Eficientemente Sus Compuestos Más Desafiantes. Entregue Rápidamente Resultados de Alta Calidad. Guía de Selección de Columnas Agilent ZORBAX Para HPLC, n.d.)</i>

Fuente: Grupo 2

Imagen 54. Reactivos y materiales G 3

Tabla 1. Reactivos y Materiales

Reactivos	Materiales	Equipos
Acetronilo	Filtros de membrana	Cromatografo HPLC
Muestra de agua	Tubos de ensayo	
Estandares de Penicilina G	Agua tipo 1	
Estandares de amoxicilina	Pipetas	

Fuente: Grupo 3

Imagen 55. Condiciones cromatográficas G 3

Tabla 2. Condiciones Cromatográficas.

Sistema Cromatográfico	
Fase Móvil.	Para la fase móvil se puede mantener una mezcla de 80% agua y 20% Acetronilo
Proporción de la fase móvil.	Las proporciones de la fase móvil sería 80/20, lo cual quiere decir que hay 80 mL de Agua tipo 1 y 20 mL de Acetronilo
Tipo de detector.	Detector UV-VIS este tipo de detector es el mas usado por su gran definicion y sensibilidad para la determinación de grupos funcionales.
Columna Cromatográfica	Columna HPLC con fase estacionaria de C18, se toma este tipo de detctor por su resolucion y el tipo de grupo funcional que se desea determinar que seria el anillo Beta-Lactamico

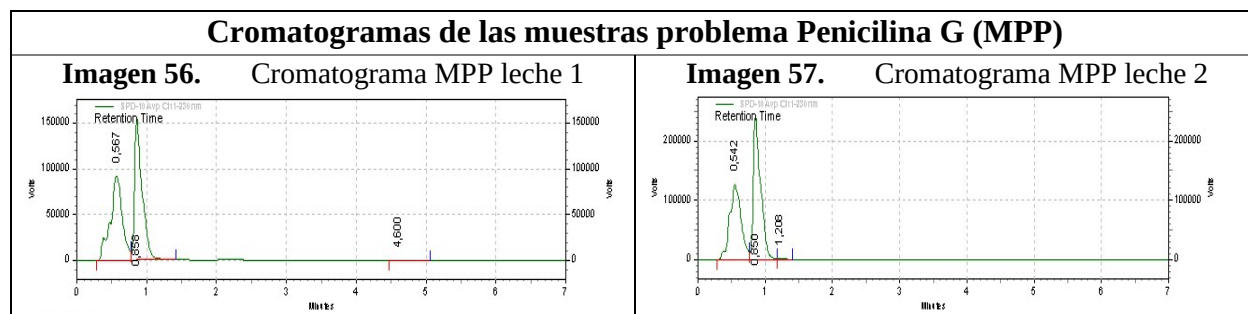
Fuente: Grupo 3

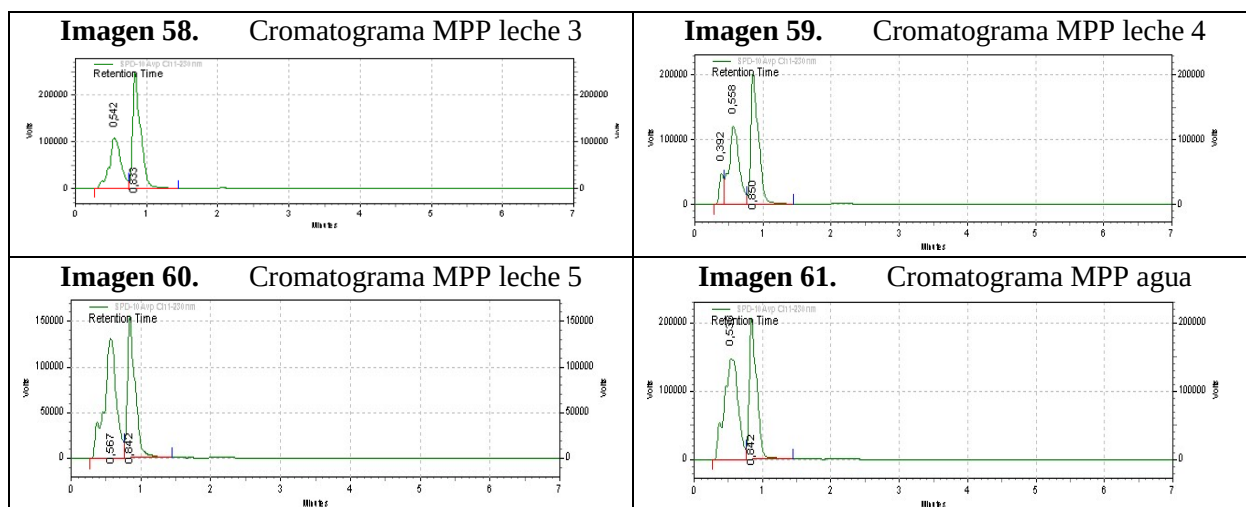
1.13.5 Actividad 4. Práctica para análisis de antibióticos por HPLC

En la práctica de laboratorio se realizó en dos grupos de laboratorio divididos por antibióticos, por lo cual un grupo realizó la extracción del analito en las dos matrices agua y leche cruda para Penicilina G y el grupo 2 para Amoxicilina.

Muestras problema Penicilina G

Tabla 28. Cromatogramas Penicilina G de las muestras problema





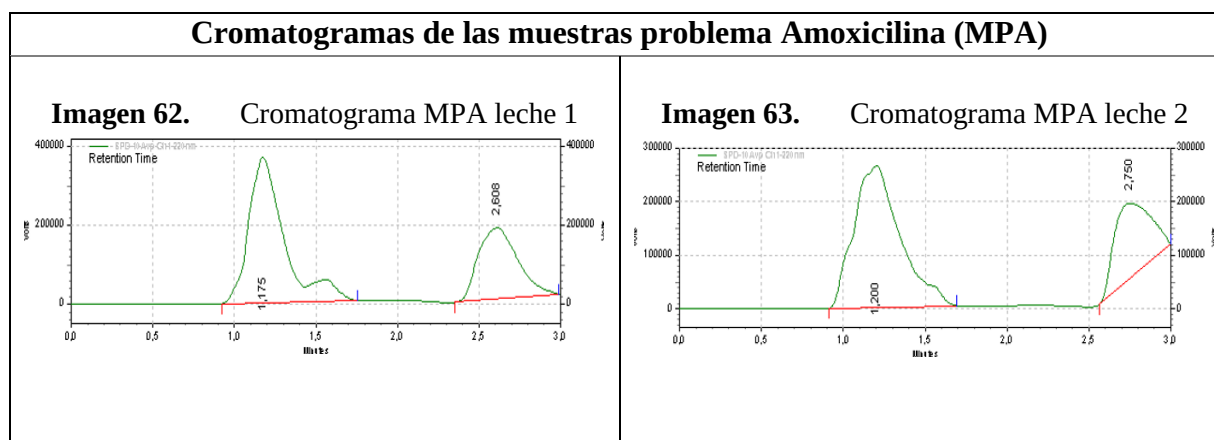
Fuente propia

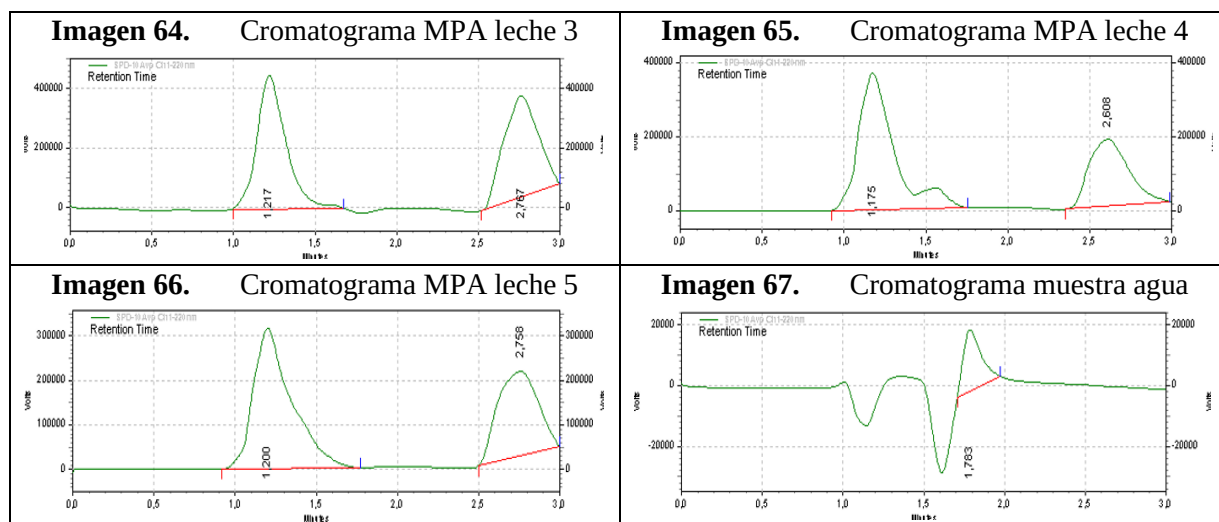
En el análisis de Penicilina G en muestras de leche cruda mediante la técnica HPLC, los cromatogramas revelan que la muestra 1 presenta una señal en un tiempo de retención de 4,6, coincidiendo con el rango de tiempo de los patrones. Esta señal sugiere una concentración de 1,07 ppm de Penicilina. Sin embargo, este valor no es confiable, ya que la sensibilidad del equipo solo permite detectar concentraciones a partir de 2 ppm, quedando esta cantidad por debajo del límite de detección. Las demás muestras no presentan señales de Penicilina G, ya que no se observaron picos en el rango de tiempo correspondiente a este medicamento.

En conclusión, no se detectaron residuos significativos de Penicilina G en las muestras de leche cruda analizadas.

Resultados de las muestras Amoxicilina.

Tabla 29. Cromatogramas Amoxicilina de las muestras problema





Fuente propia

En el análisis de Amoxicilina en muestras de leche, los cromatogramas obtenidos indican que el método utilizado para la detección y cuantificación del antibiótico ha sido efectivo. La ausencia de señales en el rango de tiempo de retención de 1,500 a 1,658 minutos, donde se espera que aparezca la Amoxicilina, sugiere que las muestras de leche no contienen residuos detectables de este antibiótico. Por lo tanto, se puede concluir que no se encontraron residuos de Amoxicilina en las muestras analizadas.

La ausencia de niveles significativos de Penicilina G y Amoxicilina en las muestras analizadas sugiere que la finca donde se realizó la recolección mantiene prácticas adecuadas en la gestión de antibióticos. Esto puede indicar que los protocolos de tratamiento y eliminación de residuos son efectivos, reduciendo la presencia de estos fármacos en la leche.

1.13.6 Actividad Final.

La actividad final consta de tres partes, la primera parte correspondiente a la encuesta tipo Likert, que se utilizó en la actividad inicial, para observar, comparar y analizar respecto a la primera respuesta obtenida en dicha actividad. De igual forma, una segunda parte busca que los estudiantes, que ya tuvieron un trabajo práctico de laboratorio respecto a la temática, se inmerjan en situaciones problema donde describan detalladamente el proceder para sustraer información y resultados que permitan determinar la calidad de la leche en relación con los residuos de antibióticos, la última y tercera parte evalúa los conceptos trabajados a lo largo de la investigación, para ver el instrumento

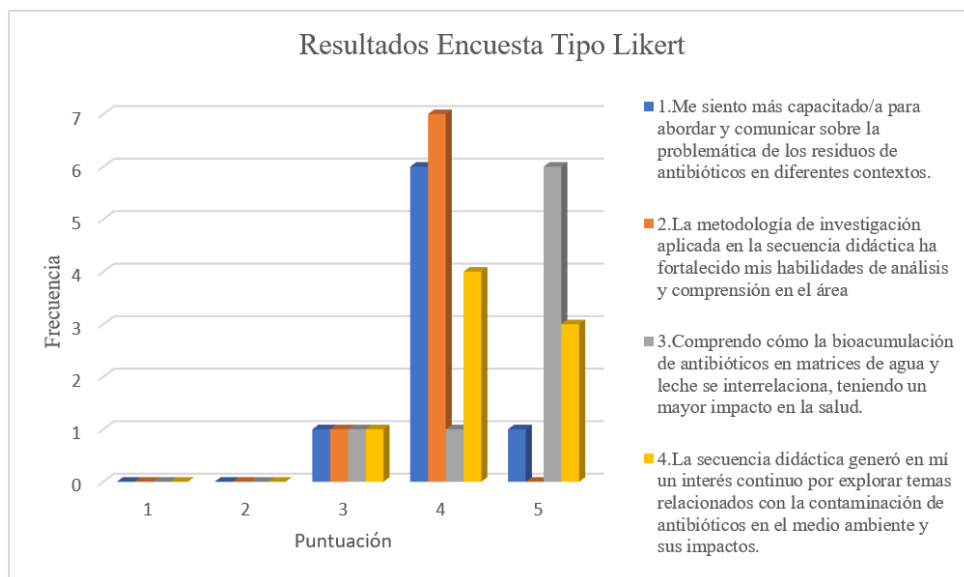
completo ver anexo 11. A diferencia de la actividad de inicio esta prueba fue resuelta por los ocho estudiantes.

Parte 1. Encuesta tipo Likert.

La primera parte consta de una encuesta tipo Likert donde los estudiantes dan un valor de 1 a 5 donde consideran estar totalmente de acuerdo o en desacuerdo con la afirmación, esta encuesta se usa para reconocer la actitud final que tiene el estudiante frente al proceso de investigación trabajado. Al igual que en la primera encuesta tipo Likert usada en la actividad diagnostica esta se le aplicaran tratamientos estadísticos para medir la fiabilidad de los datos con el coeficiente alfa de Cronbach, de igual manera no solo se tendrá en cuenta los resultados cuantitativos otorgados por parte de los estudiantes, sino que se evaluara en conjunto el trabajo realizado durante la aplicación de la secuencia didáctica.

De igual manera se realizará diagramas de frecuencia de respuesta por parte de los estudiantes para tener claridad de los aspectos que los estudiantes mejor manejan y en los que se debería reforzar teniendo en cuenta las respuestas que ellos mismos han proporcionado en la encuesta.

Gráfico 7. Respuesta de encuesta tipo Likert - Actividad final.



Fuente propia.

Ecuación α Cronbach

$$\alpha = \frac{4}{4-1} \left(1 - \frac{0,286 + 0,125 + 0,554 + 0,5}{2,5} \right) = 0,6$$

Tabla 30. Datos estadísticos de la encuesta tipo Likert, actividad final.

Estudiante	Afir. 1	Afir. 2	Afir. 3	Afir. 4	Sumatoria
1	4	4	5	5	18
2	4	4	5	5	18
3	4	4	4	4	16
4	4	4	5	5	18
5	4	3	5	3	15
6	4	4	5	4	17
7	5	4	5	4	18
8	3	4	3	4	14
Promedio	4	3,875	4,625	4,25	16,75
Desviación estándar	0,53	0	0,74	0,71	1,58
Varianza	0,286	0,125	0,554	0,5	2,5
Coefficiente Cronbach	0,6				

Fuente propia.

Debido a que el coeficiente de Cronbach es una medida de fiabilidad de los datos obtenidos de encuestas, y que un coeficiente aceptable es igual o mayor 0,7 y que el coeficiente obtenido del tratamiento estadístico es menor a 0,7 consideramos que es relevante observar la claridad y eficiencia de las afirmaciones que se han dejado plasmadas. La dimensión actitudinal de un estudiante es compleja y es un proceso que se ve en su conjunto al ser el resultado de un proceso académico debido a estas razones hemos decidido evaluar la actitud en conjunto del proceso de aplicación de la secuencia.

Parte 2. Casos de Inmersión.

Pregunta 1. En el laboratorio, se reciben diversas muestras de leche bovina procedentes de un hato del altiplano cundiboyacense. Para transportar estas muestras hasta Bogotá, se utiliza una nevera de icopor que, junto con las muestras, almacena dos pilas refrigerantes. Se toma un litro de leche directamente de la cantina después de extraer el producto de todos los bovinos productores de leche, y se divide en botellas ámbar de 250 mL cada una. Al llegar al laboratorio, se solicita un análisis cuantitativo de las muestras para descartar la contaminación del producto por antibióticos, específicamente Penicilina G. En este contexto, se requiere describir un procedimiento para tratar la leche antes de analizar con la técnica analítica de cromatografía HPLC. Es importante considerar que la leche es una matriz compleja que contiene carbohidratos, una fracción lipídica, minerales y proteínas.

En este punto se considera importante que el estudiante plantee como puede tratar la muestra para recolectar en una fracción el analito de interés por lo cual al ser la leche una matriz compleja se les pide que consideren las sustancias que la componen, esto nos permitirá observar como el estudiante vincula el conocimiento teórico con su saber procedimental.

La mayoría de los estudiantes generaron una lista de pasos para tratar la muestra y aislar el analito de interés, sin embargo, fueron pocos los que describieron por qué se realiza cada paso y como este afecta a la muestra, se demuestra el conocimiento procedimental, no obstante, es deseable que los estudiantes ligen sus conocimientos teóricos con sus experiencias prácticas y con su proceder metodológico. A continuación, se dejan respuestas que ejemplifican el análisis anterior.

Estudiante 3.

“Para analizar muestras de leche por contaminación de Penicilina G mediante HPLC, toma 5 mL de leche y colócala en un vaso de 100 mL. Añade 15 mL de solución de fosfato diácido de sodio y agita vigorosamente con un agitador magnético durante tres minutos. Transfiere la mezcla a tubos de centrifugación de 20 mL y centrifuga a 2500 rpm durante tres minutos. Retira el sobrenadante con una pipeta, filtra para eliminar partículas y transfiere a viales adecuados para el análisis por HPLC.”

Estudiante 5.

“Para un correcto análisis de Penicilina G en leche mediante cromatografía HPLC, es crucial preparar las muestras adecuadamente. Primero, utiliza un método estandarizado y coloca la muestra en un recipiente estéril para evitar contaminación. Luego, aísla las diversas especies presentes, como mediante una extracción de proteínas, y realiza un filtrado para eliminar impurezas y partículas que puedan obstruir la columna de HPLC. Además, ajusta el pH y realiza disoluciones si es necesario. Con estos tratamientos previos completados, la muestra estará lista para el análisis en el equipo HPLC.”

Estudiante 8.

“Para la lectura correcta de Penicilina G mediante cromatografía HPLC, es necesario preparar la muestra para separar el analito de interés de los demás componentes de la leche. Se toman 5 mL de muestra, se mezclan con fosfato diácido de sodio y metanol en un vaso de precipitados y se homogeneiza. Este tratamiento genera precipitados, separando los componentes de la leche del analito. Luego, se centrifuga la mezcla para separar el precipitado del sobrenadante, que contiene el analito. El sobrenadante se extrae y se utiliza para la preparación y lectura en HPLC.”

Pregunta 2. Debido a una epidemia de mastitis en la población bovina en una de las veredas del municipio de Guatavita (Cundinamarca-Colombia). Se han tratado alrededor de 100 cabezas de ganado el último mes con medicamentos veterinarios en los cuales está presente la Penicilina G. Los animales en tratamiento se han aislado y se han dejado en reposo sin extraer el producto de las glándulas mamarias con fines de comercializar. Sin embargo, debido a la excreción fisiológica de los animales se estima que posiblemente un cuerpo de agua superficial del Municipio que abastece a la vereda de agua potable se ha contaminado con Penicilina G debido a los residuos existentes en la orina y estiércol de los animales en tratamiento por lo cual se decide realizar un análisis de Penicilina G en muestras del cuerpo de agua superficial afectado.

- A. Usted como analista de estas muestras decide utilizar el cromatógrafo por HPLC para lo cual prepara una curva de calibración, describa como realizaría usted la curva de calibración para el análisis de las muestras de agua teniendo en cuenta que el patrón más concentrado es de 20ppm y el menor es de 0,05ppm y que para esto solo puede utilizar 500mg de un patrón certificado de Penicilina G.

- B. Con base a lo anterior, determine si se puede evidenciar un proceso de bioacumulación. En caso afirmativo, explique el proceso de bioacumulación descrito previamente, especifique como es este proceso y que consecuencias trae esto en el organismo del animal, suelo y aguas superficiales.

El objetivo con esta pregunta en la parte A es observar como el estudiante procedería en un caso determinado teniendo en cuenta las condiciones que se le dan en el apartado para el análisis de Penicilina G. En la parte B se observará como los estudiantes generan una respuesta bajo los conocimientos que han obtenido durante la intervención y desarrollo de la secuencia didáctica.

Algunos estudiantes aplican su conocimiento para elaborar una curva de calibración, considerando aspectos económicos de reactivos y solventes para el análisis por HPLC. Sin embargo, la mayoría no toma en cuenta estos aspectos y utiliza la totalidad del reactivo sin considerar el impacto económico y ambiental. Además, algunos cometen errores en los cálculos o no consideran criterios fundamentales de la química analítica.

Estudiante 1 parte A.

“Para preparar los patrones, diluir 20 mg de Penicilina G en 100 mL de agua para obtener una solución de 200 ppm. Tomar 10 mL de esta solución y diluir en un balón aforado de 100 mL para obtener una solución de 20 ppm. De esta solución madre de 200 ppm, preparar las siguientes diluciones:

$$200 \text{ ppm} * 6 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 12 \text{ ppm}$$

$$200 \text{ ppm} * 4 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 8 \text{ ppm}$$

$$200 \text{ ppm} * 2 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 4 \text{ ppm}$$

$$200 \text{ ppm} * 0,5 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 1 \text{ ppm}$$

$$200 \text{ ppm} * 0,025 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 0,05 \text{ ppm}$$

Filtrar los patrones para eliminar partículas residuales e inyectar cada patrón en el cromatógrafo, realizar la lectura. Graficar ppm en el eje X vs. Área de pico en el eje Y, obtener la curva de calibración.

Imagen 68. 2 Caso de inmersión - E 2 parte A.

Determinación de Penicilina G en Agua

• Solución Stock
 $m = 500 \text{ mg}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $[C] = \frac{m}{V}$ $1000 \text{ mg/L} = \frac{500 \text{ mg}}{V}$ $V = \frac{500 \text{ mg}}{1000 \text{ mg/L}} = 0,5 \text{ L} = 500 \text{ mL}$

Se disuelven 500 mg estándar de Penicilina G en 500 mL de H_2O para llegar a una solución 1000 ppm

• Soluciones Patrón $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$P_1 \rightarrow 20 \text{ ppm}$
 $C_1 = 1000 \text{ ppm}$ $C_2 = 20 \text{ ppm}$ $V_1 = \frac{(20 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 2 \text{ mL}$ Se opera a 100
 $V_2 = 100 \text{ mL}$

$P_2 \rightarrow 10 \text{ ppm}$ $P_3 \rightarrow 5 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(10 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 1 \text{ mL}$ $V_1 = \frac{(5 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,5 \text{ mL}$

$P_4 \rightarrow 1 \text{ ppm}$ $P_5 \rightarrow 0,5 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(1 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,1 \text{ mL}$ $V_1 = \frac{(0,5 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,05 \text{ mL}$

$P_6 \rightarrow 0,05 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(0,05 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,005 \text{ mL}$

Ya que el patrón mayor es de 20 ppm y el menor de 0,05 ppm, lo ideal sería usar patrones proporcionales para que sea una buena curva con 6 patrones sería suficiente

Fuente: Estudiante 2

Imagen 69. 2 Caso de inmersión - E 4 parte A

Determinación de Penicilina G en H_2O

• Solución Madre (blanca)
 $m = 500 \text{ mg}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm} \rightarrow (\text{mg/L})$
 $[C] = \frac{m}{V}$
 $V = \frac{500 \text{ mg}}{1000 \text{ mg/L}} = 0,5 \text{ L} = 500 \text{ mL}$

Disolver 500 mg estándar de Penicilina G en 500 mL de H_2O para obtener una solución 1000 ppm

• Soluciones Patrón $\rightarrow C_1 V_1 = C_2 V_2$

$P_1 = 20 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(20 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 2 \text{ mL}$ $C_2 = 20 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 2 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

$P_2 = 10 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(10 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 1 \text{ mL}$ $C_2 = 10 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 1 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

$P_3 = 5 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(5 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,5 \text{ mL}$ $C_2 = 5 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 0,5 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

$P_4 = 1 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(1 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,1 \text{ mL}$ $C_2 = 1 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 0,1 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

$P_5 = 0,5 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(0,5 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,05 \text{ mL}$ $C_2 = 0,5 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 0,05 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

$P_6 = 0,05 \text{ ppm}$ $C_1 = 1000 \text{ ppm}$
 $V_1 = \frac{(0,05 \text{ ppm})(100 \text{ mL})}{(1000 \text{ ppm})} = 0,005 \text{ mL}$ $C_2 = 0,05 \text{ ppm}$
 $V_2 = 100 \text{ mL}$
 0,005 mL del blanco y llevar a 100 mL con H_2O destilada

Fuente: Estudiante 4

En cuanto al apartado B se puede afirmar que la mayoría de los estudiantes integraron conceptos claves para dar respuesta a la pregunta, explicando detalladamente algunas de las complicaciones que puede tener tanto en los animales, seres humanos y ecosistemas, además de tener en cuenta aspectos sociales y económicos. A continuación, se plasmarán las respuestas de mayor satisfacción.

Estudiante 1.

“Sí, existe la posibilidad de bioacumulación de Penicilina G en el ecosistema, incluyendo suelo, aguas superficiales y organismos que dependen de ellos. La Penicilina G es un antibiótico de amplio espectro que puede ser absorbido por animales a través del tracto digestivo o por contacto con la piel. Una vez absorbida, se distribuye por todo el cuerpo y se excreta en la orina y el estiércol. La bioacumulación ocurre cuando la concentración de un contaminante es mayor en un organismo que en el medio ambiente debido a una mayor tasa de absorción que de eliminación. Las afectaciones de la bioacumulación incluyen:

Acumulación de residuos en tejidos animales, afectando la salud, el metabolismo y la respuesta inmune, además de representar un riesgo para la salud pública por el consumo de productos contaminados.

Afectación de bacterias benéficas en el suelo, importantes para la descomposición de materia orgánica y fijación de nitrógeno, perjudicando la calidad del suelo y el crecimiento de plantas.

Impacto en organismos acuáticos en aguas superficiales y el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos, con consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente..”

Estudiante 2.

“Se entiende por bioacumulación al proceso por el cual los organismos acumulan sustancias químicas al pasar del tiempo. En este caso con la Penicilina G en el agua, es un antibiótico que puede llegar a ser absorbido por organismos acuáticos y concentrarse en otros organismos debido a la cadena trófica.

Las consecuencias que puede traer la bioacumulación de Penicilina G en organismos acuáticos, es que puede provocar efectos tóxicos como alteraciones en su crecimiento, en cuanto al suelo la Penicilina G que se puede encontrar en el estiércol del ganado bovino puede contaminarlo al afectar la microflora y por último, la presencia de Penicilina G en aguas superficiales puede hacer que se favorezca el

desarrollo de bacterias que sean resistentes a este antibiótico, transfiriéndose a humanos y/o animales, haciendo que se reduzca la efectividad de este antibiótico.”

Estudiante 4.

“Para determinar la bioacumulación de Penicilina G en agua superficial, suelo y organismos vivos, es crucial evaluar la presencia del compuesto en el ambiente, su capacidad de acumulación en organismos y la exposición al antibiótico. La bioacumulación ocurre cuando un contaminante, como la Penicilina G, se acumula en un organismo por exposición o ingesta.

En este caso, se observó bioacumulación y biomagnificación de Penicilina G en 100 vacas, el suelo y aguas superficiales. Las vacas tratadas con este antibiótico para combatir la mastitis excretaron residuos que contaminaron el agua y el suelo. Esto afectó a organismos acuáticos como los peces y la flora del suelo, alterando el crecimiento de plantas y la calidad del agua para consumo humano y agrícola. Este es un ejemplo claro de biomagnificación, ya que la Penicilina G se encuentra a lo largo de la cadena trófica, lo que puede conducir al desarrollo de resistencia al antibiótico.

Parte 3. Conceptos microbiológicos en la investigación.

En esta parte, se observa la integración de conceptos microbiológicos importantes en el contexto de la investigación, puesto que los métodos para identificar la sensibilidad de cepas bacterianas son relevantes tanto como herramienta didáctica, que permite acercar a los estudiantes al concepto de resistencia microbiana, sus razones y las técnicas utilizadas en el campo de la microbiología y la bacteriología para el análisis de inhibición y tolerancia bacteriana frente a especies con efecto antimicrobiano.

Se observa que los de los estudiantes reconocen los métodos de Difusión en disco y Dilución en agar, los estudiantes no únicamente definen cada método de antibiogramas, sino que también, tienen el conocimiento de las limitaciones, la utilidad de cada uno de los métodos de igual manera algunos entienden los conceptos de siembra bacteriana, inoculación, agar nutritivo y algunos detallan en los procedimientos para realizar cada método de antibiogramas.

A continuación, se consignarán las respuestas de algunos de los estudiantes que corroboran lo anteriormente mencionado.

Pregunta 3. ¿Para qué se emplea el método de dilución en microbiología?

Estudiante 6.

“El proceso de disolución es utilizado para cuantificar microorganismo, para determinar toxicidad, para investigar propiedades metabólicas y fisiológicas y para determinar la concentración de inhibitoria (mínima). Para estos procesos son utilizados el método de disolución, ya que con las concentraciones de microorganismo son adecuados para la obtención de resultados cuantificables.”

Estudiante 7.

“El método utilizado para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos es el método de dilución en agar. Este método se considera el de referencia para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las bacterias a los antimicrobianos.

Consiste en realizar varias concentraciones de un antibiótico en agar, permitiendo estudiar la sensibilidad de múltiples bacterias a la vez, Este método es esencial para evaluar la efectividad de los antibióticos contra microorganismos específicos y guiar el tratamiento adecuado de las infecciones bacterianas.”

Estudiante 8.

“El método de dilución en microbiología es principalmente utilizado para identificar el efecto que puede tener la distinta concentración de un compuesto x frente a un microorganismo o compuesto orgánico. Este método es utilizado para determinar, por ejemplo, en que concentración un medicamento es más o menos efectivo contra un grupo de bacterias. También se puede determinar la resistencia que puede tener ese mismo grupo de bacterias a ciertas concentraciones de medicamentos en bajo las mismas condiciones.”

Pregunta 4. ¿Qué método se utiliza para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos?

Estudiante 2.

“Para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos se usa el método cualitativo conocido como la prueba de Kirby-Bauer o difusión en disco, este se usa ya que es adecuado para microorganismos de crecimiento rápido; en esta prueba se mide el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco.”

Estudiante 6.

“Método de difusión en disco (Kirby – Bauer): Este proceso es muy utilizado, pero su aplicabilidad es muy sencilla, ya que es inocular un placa de agar, junto con la bacteria que se va a estudiar, posteriormente se coloca el papel, impregnado con distintos antibióticos, luego se deja incubar y se mide el diámetro de las zonas de inhibición”

Estudiante 8.

“Se reconocen para esto dos métodos para determinar la sensibilidad de las bacterias a diferentes antibióticos, tomando como base la proliferación bacteriana frente a diferentes concentraciones de diferentes antibióticos. Este es: - El método de Kirby-Bauer: en el cual se hace uso de los sensibilizadores con las muestras de bacterias y antibióticos previamente preparadas, con el fin de determinar la sensibilidad o resistencia que tiene la bacteria o grupo de bacterias, al antibiótico.”

Pregunta 5. Realice un cuadro comparativo entre los métodos de antibiogramas, método de Kirby –Bauer y el método por dilución en agar.

Imagen 70. Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E2

Aspectos	Método de Kirby - Bauer	Método por Dilución de Caldo
Principio	Se determina la sensibilidad de las bacterias frente a diferentes antibióticos (cualitativo).	Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico a través de diluciones (semicuantitativo).
Medio de cultivo	Se realiza en una placa de agar	A través de caldo de cultivo (Mueller – Hilton)
Procedimiento	Se colocan discos impregnados con diferentes antibióticos o un mismo antibiótico sobre agar inoculado con una capa uniforme de bacterias.	Se preparan disoluciones del antibiótico en serie, en caldo de cultivo con una cantidad estándar de bacterias.
Interpretación	Medición de diámetro del halo de inhibición, según esto se categoriza el microorganismo como sensible.	Según el número de colonias que se formen se determina la concentración mínima inhibitoria.
Resultados	Sensible si se forma halo de inhibición. Si no se forma halo no es sensible.	Se obtiene en unidades de µg/mL.

Fuente: Estudiante 2

Imagen 71. Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E4

Aspectos	Método de Kirby – Bauer	Método por dilución en caldo
Principio	Determinar la sensibilidad de las bacterias a diferentes antibióticos.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible de microorganismos.
Medio de cultivo	Placa de agar	Caldo de cultivo (Mueller - Hilton)
Procedimiento	Colocación de discos impregnados con diferentes antibióticos en una placa de agar con una capa uniforme de bacterias	Preparación de diluciones seriadas del antibiótico en caldo de cultivo con una cantidad conocida de microorganismos
Interpretación	Según la longitud y el diámetro del halo de inhibición se categoriza el microorganismo como sensible	Se determinó la CMI según el número de colonias formadas
Reporte de resultados	Sensible según ahora de inhibición	µg/mL

Fuente: Estudiante 4

Imagen 72. Cuadro comparativo: Métodos de antibiogramas E8

Característica	Método de Kirby-Bauer	Método por Dilución en Caldo
Principio	Difusión de antibiótico desde discos sobre agar.	Dilución de antibiótico en medio líquido (caldo)
Procedimiento	Colocación de sensidiscos impregnados con antibiótico sobre superficie de agar inoculada. Incubación a 35-37°C durante 16-18 horas. Medición del diámetro de los halos de inhibición alrededor de los sensidiscos.	Serie de tubos con concentraciones crecientes de antibiótico. Inoculación de cada tubo con la bacteria. Incubación a 35-37°C durante 16-20 horas. Observación de crecimiento bacteriano (turbidez).
Lectura de resultados	Diámetro de halos de inhibición (en mm).	Concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja sin crecimiento visible.
Interpretación	Comparación con tablas estandarizadas para determinar sensibilidad, intermedio o resistencia.	Comparación con tablas estandarizadas para determinar sensibilidad, intermedio o resistencia.
Ventajas	Rápido y sencillo. No requiere equipos especializados. Amplia aceptación y uso en muchos laboratorios.	Proporciona datos cuantitativos precisos (CMI). Útil para determinar la dosis terapéutica.
Desventajas	Menos preciso que métodos cuantitativos. No apto para todos los tipos de bacterias o antibióticos.	Más laborioso y requiere más tiempo. Necesita equipo y medios específicos para preparar las diluciones.

Fuente: Estudiante 8

Los estudiantes han fortalecido las dimensiones que componen la competencia investigativa a lo largo de la implementación de la secuencia didáctica. Esto se refleja en las respuestas obtenidas en la actividad final, que muestran un avance significativo en comparación con la actividad diagnóstica, donde había menor claridad conceptual y procedimental.

Algunos estudiantes ahora no solo definen conceptos previamente desconocidos, sino que también los aplican eficazmente en casos de inmersión, utilizando un conjunto de conceptos para analizar resultados en procesos investigativos. Aunque algunos estudiantes aún enfrentan desafíos al extrapolar conceptos y teoría a escenarios propuestos, se observa una mejora general en las competencias evaluadas.

A continuación, se presentan los niveles alcanzados por los estudiantes teniendo en cuenta los criterios en la rúbrica de evaluación.

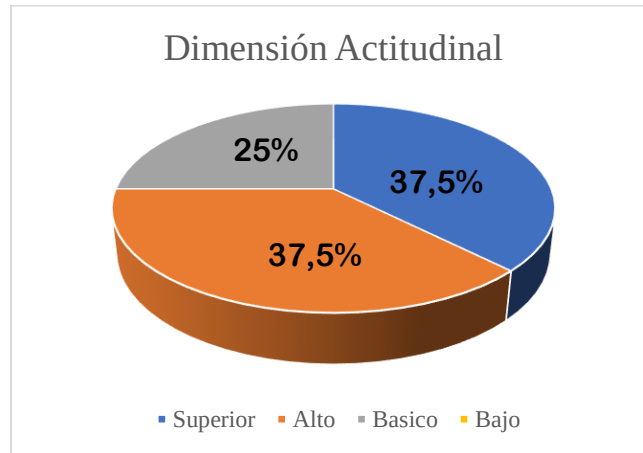
Análisis de la Dimensión Actitudinal.

Tabla 31. Nivel de desempeño de la Dimensión actitudinal.

Criterio	Descripción	Nivel de desempeño	Frecuencia	Porcentaje
Actitud frente a la Investigación.	Demuestra un compromiso excepcional con la investigación, liderando iniciativas propias	Superior	3	37,5%
	Participa activamente en actividades de investigación, mostrando un enfoque proactivo.	Alto	3	37,5%
	Participa en actividades de investigación con interés, pero a veces de manera pasiva.	Básico	2	25%
	Muestra poco interés y participación limitada en actividades de investigación.	Bajo	0	0%

Fuente propia

Gráfico 8. Niveles alcanzados en la actividad final - Dimensión actitudinal.



Fuente propia.

Los estudiantes según los criterios en la rúbrica de evaluación se pueden dividir en tres grupos. Un grupo de tres estudiantes (Estudiantes 2, 4 y 5) han tenido un nivel superior bajo los criterios de evaluación, debido a que se han interesado genuinamente, participado en clase, generando preguntas, llevando a discusiones que han enriquecido las sesiones de intervención y acompañado el proceso investigativo continuamente, han realizado todas las actividades propuestas, con nivel de calidad en ellas sobresaliente, de igual forma en la encuesta tipo Likert han manifestado interés y mejoría en habilidades que han fortalecido durante el proceso de aplicación de la secuencia didáctica.

Un grupo de tres estudiantes (1, 3 y 7) han tenido un nivel de desempeño alto, esto debido a que no se ha visualizado en ellos el interés del grupo anterior, sin embargo han participado activamente en las sesiones de intervención, han generado algunas preguntas, manifestado algunas áreas donde les gustaría profundizar sobre la investigación particularmente en conceptos y prácticas microbiológicas, han entregado las actividades propuestas de manera puntual y con un alto nivel de calidad en ellas.

Por su parte dos de los estudiantes que en un principio estaban en el nivel de desempeño bajo han alcanzado el nivel básico en la dimensión actitudinal de la competencia, esto debido a la falta de empeño o cuidado que se le ha prestado al proceso de investigación, que hemos visualizado en las sesiones de intervención y en la entrega de trabajos ya que la calidad de los trabajos ha sido irregular, entregando parcialmente terminadas las actividades o sin entrega de las actividades propuestas.

En comparación con los datos obtenidos en la actividad inicial o diagnóstica los estudiantes han fortalecido esta competencia gracias al proceso de aplicación, manifestando interés en las temáticas y teniendo en algunos casos un alto nivel de trabajo en las actividades y sesiones de intervención propuestas.

Análisis de la Dimensión Conceptual.

Esta dimensión abarca a los conocimientos necesarios para la investigación. Estos conocimientos se usan para plantear hipótesis, planificar y desarrollar un modelo que permita extraer información relevante y entender los resultados obtenidos para generar conclusiones frente a las hipótesis. Los estudiantes en este componente se han dividido en 3 grupos según el nivel que han plasmado principalmente en la actividad final, pero también analizado en el conjunto del proceso de aprendizaje durante la implementación.

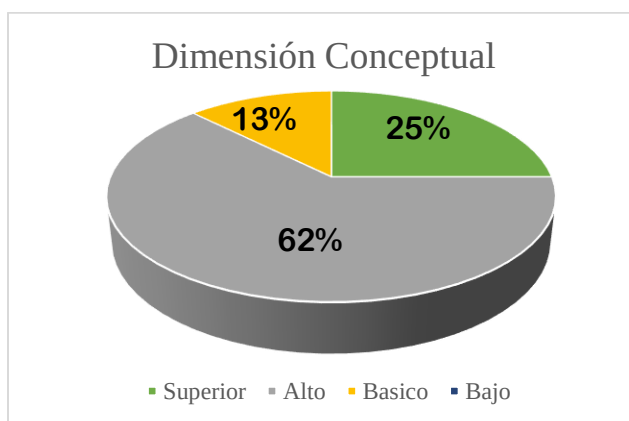
Tabla 32. Nivel de desempeño del Componente Conceptual.

Criterios	Descripción	Nivel	Frecuencia	Porcentaje
Conocimiento Teórico.	Integra y aplica conocimientos concisos, relacionando los conceptos con otros campos de estudio.	Superior.	2	25%
	Posee un conocimiento preciso de los conceptos relacionados con antibióticos en el medio ambiente	Alto.	5	62%
	Comprende los conceptos fundamentales relacionados con antibióticos en el medio ambiente.	Básico.	1	13%
	Demuestra una comprensión limitada de los conceptos clave relacionados con antibióticos en el medio ambiente.	Bajo.	0	0%
Análisis de datos y resultados	Realiza un análisis avanzado, identificando patrones, relaciones y proponiendo conclusiones significativas.	Superior.	2	25%

	Realiza un análisis sólido de datos, interpretando resultados de manera clara y coherente.	Alto.	5	62%
	Realiza un análisis básico de datos, pero con algunas limitaciones en la interpretación y conclusiones.	Básico.	1	13%
	Presenta dificultades en el análisis de datos, interpretación de resultados y establecimiento de conclusiones	Bajo.	0	0%

Fuente propia.

Gráfico 9. Niveles alcanzados en la actividad final – Dimensión Conceptual.



Fuente propia.

Del grupo de estudiantes, se destaca el nivel superior alcanzado por 2 de los estudiantes siendo estos los estudiantes 1 y 2. Durante la aplicación, han ido fortaleciendo sus conocimientos en investigación y han tenido un desempeño sobresaliente en esta última actividad. Esto se debe a que, en los casos simulados, han dado respuestas con propiedad y han tenido en cuenta aspectos económicos, ambientales y sociales que implica la problemática actual del consumo de RPFs en general y, específicamente, de los antibióticos en alimentos como la leche.

De igual forma, usaron sus conocimientos para abordar la problemática de la contaminación indirecta o por bioacumulación en los bovinos productores de leche debido al consumo de alimentos y agua con presencia de COEs. Además, vincularon una de las consecuencias de mayor relevancia ligada con el consumo de antibióticos no formulados: el aumento de la resistencia

microbiana. Reconocieron e identificaron diferencias, ventajas, desventajas o limitaciones de los métodos tratados durante las sesiones de intervención.

Un grupo mayoritario de 5 estudiantes se encuentra en un nivel alto. Esto se debe a que reconocen conceptos y los aplican de manera eficiente en los contextos presentados en los casos simulados. Sin embargo, este grupo, a diferencia del anterior, no expresa la relevancia de las consecuencias del consumo de antibióticos en los alimentos, ni formula respuestas que tengan en cuenta aspectos ambientales, económicos o sociales en conjunto con la problemática abordada. Aunque realizan cálculos de manera correcta, no extrapolan el pensamiento cuantitativo al caso narrado, lo que genera una mayor cantidad de desechos y hace poco eficientes sus respuestas.

Reconocen conceptos de bioacumulación, resistencia de microorganismos, y los métodos de análisis aplicados en laboratorios de bacteriología con la finalidad de determinar la tolerancia de cepas bacterianas. Distinguen las diferencias procedimentales y el objetivo específico de los métodos de antibiogramas trabajados en las sesiones de clase. Además, tienen en cuenta algunos componentes presentes en la leche para su análisis mediante técnicas analíticas que permiten identificar y cuantificar la presencia de RPF's en la leche.

El estudiante 8 tienen un nivel básico, esto implica que el estudiante no ha alcanzado un nivel conceptual eficiente en algunos de los conceptos o referentes teóricos que se aplican en la investigación. Sin embargo, algunos conceptos han sido fortalecidos con la implementación e incluso aplica algunos de estos en los casos de inmersión, se destaca las falencias principalmente en el entendimiento de la matriz de leche, no identifican o reconocen la complejidad del alimento de trabajo para su análisis.

Análisis referente a la dimensión procedimental.

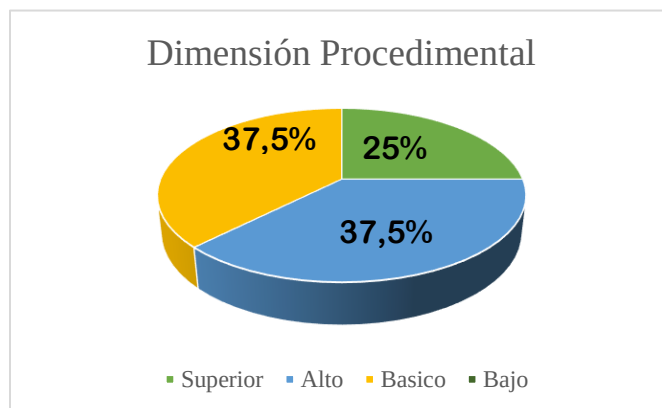
Los alumnos según su nivel demostrado durante la actividad final se dividieron en tres grupos, esto según los criterios que se tuvieron en cuenta para evaluar la dimensión procedimental, que consiste en la necesidad de obtener información a partir de los conocimientos que tienen los estudiantes para extraer resultados que sean posteriormente analizados, con la finalidad de llegar a tomar decisiones frente a situación problema de la investigación.

Tabla 33. Nivel de desempeño de la dimensión procedimental.

Criterio	Descripción	Nivel de desempeño	Frecuencia	Porcentaje
Técnica analítica	Realiza procedimientos y relaciona la teoría y la práctica y el contexto, logrando resultados óptimos y fundamentados.	Superior	2	25%
	Aplica procedimientos y técnicas de análisis químico, entendiendo la teoría y la práctica, obteniendo resultados precisos	Alto	3	37,5%
	Ejecuta protocolos con comprensión limitada de la teoría y la práctica, logrando resultados aceptables.	Básico	3	37,5%
	Presenta procedimientos sin conocer métodos de análisis adecuados para el contexto, resultando en resultados imprecisos.	Bajo	0	0%
Obtención de resultados.	Ejecuta procedimientos complejos con autonomía y maneja el material de laboratorio con eficiencia.	Superior	2	25%
	Realiza procedimientos de manera autónoma y maneja el material de laboratorio con precisión.	Alto	3	37,5%
	Realiza procedimientos con ayuda ocasional y maneja el material de laboratorio de manera básica.	Básico.	3	37,5%
	Muestra dificultades en la ejecución de procedimientos y en el manejo del material de laboratorio.	Bajo.	0	0%

Fuente propia.

Gráfico 10. Niveles alcanzados en la actividad final – Dimensión procedimental.



Fuente propia.

Los estudiantes 4 y 5 alcanzaron un nivel sobresaliente debido a la capacidad demostrada para extraer información relevante para el estudio de calidad de la leche en cuanto a la presencia de antibióticos, a partir de las matrices de análisis que difieren en complejidad y composición química, de esta manera no únicamente siguen eficientemente protocolos para el análisis de estos fármacos en el leche y agua sino que comprenden la teoría que existe detrás de cada paso para preparar una muestra, el funcionamiento de los equipos implementados y porque se obtienen los resultados que se obtienen de las prácticas de laboratorio.

El nivel de desempeño alto fue alcanzado por tres de los estudiantes esto ya que en sus respuestas han demostrado que además de ejecutar un protocolo entienden la teoría detrás de este casi en su totalidad, teniendo algunas dificultades en pasos puntuales presentes en los protocolos para la investigación de los analitos de interés en las matrices de estudio.

Un grupo de tres estudiantes lograron un nivel básico en el componente procedimental esto debido a que a diferencia del nivel superior tienen dificultad para extrapolar su conocimiento a un paso a paso presente en un protocolo ya establecido para el análisis de los analitos de interés en las matrices de estudio.

El análisis de la competencia investigativa revela un avance notable en los estudiantes a lo largo de la investigación sobre residuos de antibióticos. Inicialmente, los estudiantes presentaron un

desempeño básico o intermedio, con poco interés y dificultades para comprender conceptos y aplicar procedimientos adecuados. A medida que avanzaron en el proyecto, mejoraron significativamente en todos los aspectos de la competencia investigativa. Al final, mostraron un desempeño más alto, con una mayor capacidad para identificar y aplicar métodos investigativos de manera efectiva, formular hipótesis relevantes, y guiar el proceso de investigación con una comprensión más completa de los conceptos y procedimientos. Este progreso se refleja claramente en los resultados finales, evidenciando un fortalecimiento significativo en esta competencia investigativa.

Conclusiones

La implementación de la secuencia didáctica centrada en el ABI demostró tanto la eficiencia como la replicabilidad de los métodos empleados para analizar antibióticos en agua superficial y leche bovina. Al incorporar concentraciones conocidas a las muestras, los resultados experimentales coincidieron estrechamente con los valores teóricos, confirmando la efectividad del método. Además, los análisis de las muestras recolectadas en la finca Guandita, Cundinamarca, no detectaron niveles significativos de Amoxicilina y Penicilina G, lo que indica que la finca mantiene prácticas adecuadas en la gestión de antibióticos. Sin embargo, es importante considerar las limitaciones del cromatógrafo de HPLC utilizado en la cuantificación de los antibióticos.

La secuencia didáctica tuvo un impacto significativo en el desarrollo de las competencias investigativas de los estudiantes, reflejando mejoras notables en las dimensiones conceptual, procedimental y actitudinal de la competencia investigativa. Al inicio, el desempeño de los estudiantes era variado, pero al final del proceso, muchos alcanzaron niveles superiores. En la dimensión conceptual, siete de los ocho estudiantes alcanzaron niveles de desempeño alto y superior, demostrando una integración y aplicación efectiva de conceptos en el análisis de datos y resultados. En la dimensión procedimental, cinco estudiantes también lograron niveles altos y superiores, evidenciando un progreso en la aplicación de técnicas analíticas y el manejo del laboratorio. En cuanto a la dimensión actitudinal, seis estudiantes mejoraron su nivel de desempeño, situándose en los niveles alto y superior, lo que indica una mejora en su actitud hacia la investigación.

Estos resultados demuestran que la secuencia didáctica basada en ABI no solo mejoró las competencias investigativas de los estudiantes en términos de conocimientos y habilidades técnicas, sino también en actitud y enfoque hacia la investigación. Este avance integral confirma la efectividad de la secuencia en fortalecer las competencias investigativas en sus tres dimensiones, cumpliendo así con los objetivos propuestos.

Sugerencias.

Para futuras investigaciones, se sugiere adaptar la secuencia didáctica para incluir estudios que abarquen una mayor variedad de antibióticos, no limitándose a los betalactámicos. Además, debido al tiempo limitado y a las competencias específicas fortalecidas en esta investigación, se pueden incorporar otras fases del ABI en actividades intermedias, dependiendo de las competencias investigativas que se deseen desarrollar.

En cuanto al desarrollo de la investigación disciplinar, se recomienda utilizar patrones certificados, ya que estos generan menos residuos y requieren menos solventes para las curvas de calibración en HPLC. También es aconsejable utilizar equipos con mayor sensibilidad para detectar y cuantificar residuos de antibióticos en las muestras analizadas.

Implementar proyectos interdisciplinarios en el aula, integrando conocimientos de química, biología y salud pública, permite a los estudiantes abordar problemas complejos, como los residuos de antibióticos, de manera integral. Esto les ayuda a desarrollar soluciones prácticas y a comprender mejor la interconexión de sus disciplinas en contextos reales.

Facilitar la colaboración entre docentes, estudiantes y la comunidad afectada por los residuos de antibióticos es crucial. Los estudiantes pueden participar en talleres o mesas redondas con profesionales del sector y líderes comunitarios para discutir y analizar problemas reales. Esta interacción enriquece el proyecto con perspectivas adicionales y asegura que las soluciones propuestas sean prácticas, viables y adaptadas a las necesidades locales.

Referencias

- Abella, M., et al. Pachón, A. (2011). Formación en competencias investigativas en educación superior. Estudio de caso: Dos programas de maestría en educación.
- Andrade, A. M., Penagos, W. M. M., Suárez, C. J. M., Peña, J. Z., Utges, G., Jiménez, G. P., ... & Fúquene, A. A. (2020). INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN DE PROFESORES DE CIENCIAS: DIÁLOGOS DE PERSPECTIVAS LATINOAMERICANAS.
- Aytenfsu, S., Mamo, G., Kebede, B. 2016. Review on chemical residues in milk and their public health concern in Ethiopia. J Nutr Food Sci
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45(4), 493-496.
- Buitrago Gómez, L. E., Verónica Torres, L., & Hernández Velásquez, R. M. (2009). La secuencia didáctica en los proyectos de aula un espacio de interrelación entre docente y contenido de enseñanza.
- Buitrago, J. D. R., Ramírez, N., & Henao, O. A. (2001). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 14(2), 143-154.
- Correa Bautista, J. E. (2009). Measurement of the investigative competences of physiology teachers: An empirical approach. Revista Facultad de Medicina (Colombia), 57(3), 205-217.
- Boxall A. B.A, Rudd M. a, Brooks B.W., Caldwell D.J., Choi K., Hickmann S., Innes E., Ostapyk. K., Staveley J.P., Verslycke T., Ankley G.T., Beazley K.F. 2012. Review Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? 120, 1221–1229.
- Cartelle Gestal, M., Villacís, J., Alulema, M., & Chico, P. (2014). De la granja a la mesa. Implicaciones del uso de antibióticos en la crianza de animales para la resistencia microbiana y la salud. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 24(1), 11.

- Castro-Duque, J., Martínez-González, Y., & Suárez-Chávez, M. (2023). Occurrence of emerging organic contaminants in raw milk from Colombia. *Food Chemistry*.
- Cercenado, E. y Saavedra, J. (2009) El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (28th ed.). CLSI Document M100.
- Colina, M. de las M., Lora Carrillo, L. J., Granado Juvinao, K., Quiroz Vega, M. V., & Cadena Mareño, J. I. (2023). Aprendizaje basado en la investigación en los estudiantes de la licenciatura de ciencias naturales y educación ambiental de la Universidad Popular del Cesar. *Revista Boletín Redipe*, 12(7), 86–102. <https://doi.org/10.36260/rbr.v12i7.1985>
- CORPOICA (2017). Residuos de antibióticos en leche cruda en Colombia. Bogotá, Colombia: CORPOICA
- Díaz, D. (2016). Uso de Antibióticos en Ganadería Lechera. Utah State University, p. 36 –47
- Doyle, E. (2006). Veterinary drug residues in processed meats - potential health risk. Food Research Institute.
- Healey, M. y Jenkins, A. (2009). Developing undergraduate research and inquiry.
- Fallon, A., Booth, R., y Bell, L. (1987). Applications of HPLC in biochemistry (1.^a ed.). EE. UU.: Elsevier Science Ltd.
- Faría, J., Allara, M., Arenas, L., Marquez, E. (2000). Extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Revista Científica. FCV. LUZ*. X (3): 212-221.
- Farmacopea Argentina. (2013). Ministerio de Salud. ANMAT, Buenos Aires.
- Flórez, J. A., Méndez, D. M., Núñez, S. B., Montes, G. E., & Negrete, J. M. (2021). Productos farmacéuticos y de cuidado personal presentes en aguas superficiales, de consumo humano y residuales en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 179-197.

- Freire, E. E., Ríos, A. R. R., & Cuenca, N. P. T. (2016). Formación de competencias investigativas en los estudiantes universitarios. *Atenas*, 1(33).
- García, A. 2020. Peligros de contaminación de la leche por agroquímicos y fármacos veterinarios en el eslabón primario de la cadena productiva
- García-Rincón, J. A., Sánchez-Sánchez, J. M., López-Rubio, M. L., & Martínez-Carballo, M. A. (2022). Contaminantes orgánicos emergentes en el agua y los alimentos: una revisión. *Analítica*, 85(1), 1-15.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción+ limpia*, 7(2), 52-73.
- Hernández-Barrera, J. C., Angarita-Merchán, M., & Prada-Quiroga, C. F. (2017). Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria. *Ciencia y agricultura*, 14(2), 27-38.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). Aguas superficiales. <http://www.ideam.gov.co/web/agua/aguas-superficiales>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2007). Buenas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios y la inocuidad de los alimentos. Bogotá, Colombia.
- Jiménez, R. (2017) Implementación de una unidad didáctica desde el aprendizaje por investigación para la enseñanza y aprendizaje de la ley de las proporciones definidas. Tesis de pregrado. Universidad Pedagógica Nacional.
- Jindal, P., Bedi, J., Singh, R., Aulakh, R., & Gill, J. P. (2021). Epidemiological assessment of antibiotic residues in dairy farm milk and farm waste and water in northern India. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 29455-29466.
- Magariños, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. Página 5.
- Martínez-Alcalá, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas*, 29(3), 2070-2070.

- Martínez-González, Y., Gómez-Muñoz, J., & Suárez-Chávez, M. (2022). Prevalence of emerging organic contaminants in drinking water in Colombia. *Toxicology and Environmental Chemistry*, 109(1), 1-10.
- Máttar, M., Romero, A., y Martínez, M. (2009). Residuos de antibióticos en leche cruda en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(1), 56-65.
- MEN. (2004). Estándares básicos de competencias ciudadanas: formar para la ciudadanía ¡Sí es posible! Bogotá: Ministerio de Educación Nacional. Serie Guías No. 6.
- Mejía, L. (2014). Correlación entre la usabilidad de un OVA y su efectividad como herramienta de enseñanza-aprendizaje. *IngEam* (1), 66 – 75
- Mejía, R. D. (2022). fortalecimiento de competencias investigativas a través de secuencias didácticas. *Panorama*, 16(2 (31)), 337-360.
- Ministerio de Educación Nacional. (2019). Decreto 1330.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). Resolución 00001382
- Morfil, J. (2021). Residuos farmacéuticos como precursores de contaminantes emergentes en el recurso hídrico: una revisión de métodos, alternativas de tratamiento e impacto ambiental. Universidad de Córdoba.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1997). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventh informational supplement. NCCLS document M100-S7.
- Nascimento, Lucas X, Trindade Araújo, Reginaldo, & Giraldez Alvarez, Lisandro D. (2015). Poluentes Orgânicos Emergentes: Impactos e Soluções para a Saúde Humana e o Meio Ambiente. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (24), 28-34.
- Navarrete Fernández, J. A. (2019). Influencia del sistema de producción sobre la calidad higiénica, sanitaria y de residuos de antibióticos de la leche cruda en Colombia.
- Nieto, L. E. (2013). Aprendizaje Basado en Investigación (ABI). Metodologías, Estrategias y Herramientas Didácticas Para el Diseño de Cursos en Ambientes Virtuales de Aprendizaje en la Universidad Nacional Abierta ya Distancia UNAD, 15.

Obaya, A., & Ponce, R. (2007). La secuencia didáctica como herramienta de proceso enseñanza aprendizaje en el área de Químico Biológicas. UAM, 19-25.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Codex Alimentarius. Tomado de: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drug-detail/es/?d_id=6

Organización Mundial de la Salud (OMS). Residuos de productos farmacéuticos en el medio ambiente: evaluación del riesgo y gestión. Ginebra: OMS; 2022.

Organización Mundial de la Salud (2021). Resistencia a los antimicrobianos: Una amenaza para la salud global. Ginebra, Suiza: OMS. Tomado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Directrices de seguridad para el desecho de productos farmacéuticos. Washington, D.C.: OPS; 2019.

Pedasté, M. Mäeots, M. Siiman, L. et al. 2015. Phases of inquiry-based learning: Definitions and the inquiry cycle.

Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J., Freire, C., y Delerue-Matos, C. (2019). Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. Science of The Total Environment, 648, 582-600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.129> .

Parra, M. (2003). Proyecto 201411198: Determinar residuos de antibióticos y pesticidas en leche cruda, para diseñar estrategias encaminadas a la producción de leche limpia en explotaciones ganaderas de doble propósito de pequeños productores del departamento del Huila. CORPOICA.

Peñaherrera, M., Chiliza, K. y Ortiz, A. (2014). Inclusión del Aprendizaje Basado en Investigación (ABI) como práctica pedagógica en el diseño de programas de postgrados en Ecuador. Elaboración de una propuesta. Journal for Educators, Teachers and Trainers, Vol. 5(2), pp. 204 – 220.

Ramírez, L. Barragán, C. Cárdenas, et al. (2022) Revisión: residuos de antibióticos en la carne, un problema de salud pública en Colombia.

- Ramos, J. M. F., Zaragoza, M. G. O., Rodríguez, L. L. L., Partida, E. A. T., & Valencia, A. G. M. (2016). Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 73(5), 227-234.
- Riveros, M., Gómez, P. & Villamil, Z. (2014). Una propuesta para la enseñanza de los conceptos ácido-base, a partir del enfoque didáctico: aprendizaje por investigación. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12209/7027>.
- Rodríguez, F., Elías, R., Bolivar-Anillo, H., Hoyos Turcios, C., Carrillo Garcia, L., Serrano Hernandez, M., & Abdellah, E. (2020). Resistencia antibiótica: el papel del hombre, los animales y el medio ambiente. *Revista Salud Uninorte*, 36(1), 298-324.
- Rodríguez, V. 2014. La Formación situada y los principios pedagógicos de la planificación: la secuencia didáctica
- Rosas Vásquez, C. L. (2023). Determinación de la sensibilidad antibacteriana en muestras de leche bovina con mastitis analizadas con el método de Kirby-Bauer (antibiograma) en LABVETSUR, Arequipa 2010-2019.
- Sampieri, R. H. (2018). Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. McGraw Hill México.
- Sanchez, J. (2017). Prácticas de análisis microbiológico. Saniconsult.
- Samandari, M., Movahedian Attar, H., Ebrahimpour, K., Mohammadi, F., & Ghodsi, S. (2022). Measurement of ampicillin and penicillin G antibiotics in wastewater treatment plants during the COVID-19 pandemic: A case study in Isfahan. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 9(3), 201-211.
- Sejia, V. y Vignoli, R. 2006. Capítulo 34 de Temas de Bacteriología y Virología Médica. Universidad de la República. 2da Edición.
- Singh, S. K., Sahni, Y. P., & Qureshi, S. R. (2012). HPLC determination of amoxicillin residue in milk and effect of pasteurization. *Indian Journal of Field Veterinarians (The)*, 7(4), 82-84.

- Soledad, B. 2016. Estudio, desarrollo y aplicación de polímeros de impronta molecular para la determinación de antibióticos en leche por cromatografía líquida de alta resolución con detección de ultravioleta (HPLC-UV). Universidad Nacional de Educación a Distancia
- Suárez C, Gudiol F. (2009) Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Suárez, D. y Morales, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas.
- Travé, G. y Pozuelos, F. J. (2008). Enseñar economía mediante estrategias de investigación escolar. Estudio de caso sobre las concepciones y prácticas del profesorado. Enseñanza de las Ciencias Sociales, 7, 109-120.
- Trujillo, C. M., Gallego, A. F., Ramírez, N., & Palacio, L. G. (2011). Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 11-18.
- CEPAL/UNESCO, (1992). Educación y conocimiento. Eje de la transformación productiva con equidad. Santiago de Chile: ONU
- US Geological Survey. 2015. US-GS: Toxic Substances Hydrology Programme.
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., & Wang, L. (2014). Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China. *PloS one*, 9(11), e111026.

Anexos

Anexo 1. Medicamentos empleados en la Finca

Nombre comercial	Medicamentos	En qué casos se aplica	Dosis	Quien la aplica	Vía de aplicación	Durabilidad del tratamiento
Ganapen 10^o	Penicilina G Sódica Penicilina G Procaínica Penicilina G Benzatínica	Indicado para la mastitis, procesos infecciosos, carbón sintomático, edema maligno, hemoglobinuria bacilar, tétano, pielonefritis, leptospirosis, actinomicosis, listeriosis y estreptococosis.	1 dosis cada 5 días de 1 ml por cada 20 kg de peso vivo.	Administrador	Inyección intramuscular	Tiempo a criterio del Médico Veterinario
Tripén L.A	Penicilina G Sódica Penicilina G Procaínica Penicilina G Benzatínica	Para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos Gram positivos sensibles a la penicilina en bovinos.	1 dosis de 1mL por cada 10 kg de peso del animal	Administrador	Inyección intramuscular	1 día
Curacef duo	Ceftiofur (clorhidrato) Ketoprofeno Vehículo c.b.p	Tratamiento de necrobacillosis interdigital aguda causada por bacterias asociadas al dolor y/o piroxia y/o inflamación.	1dosis de 1 mL por cada 50 kg de peso del animal	Administrador	Inyección intramuscular	2 días a criterio del médico veterinario
Cefanext	Ceftiofur Sódico	Indicado para tratar infecciones respiratorias, infecciones podales e infecciones reproductivas.	2 ml por cada 50 a 100kg de peso, cada 24 horas	Administrador	Inyección intramuscular	3 a 5 días
Veter- Flucina	Penicilina G procainica Estreptomicina Flumetasona Solvente csp	Empleado para tratar Mastitis, abscesos, heridas infectadas, podo dermatitis, infecciones respiratorias, digestivas y renales.	Aplicar 5 mL por cada 100 kg de peso vivo cada 24 horas	Administrador	Debe administrarse Exclusivamente por Vía Intramuscular Profunda.	2 a 5 días
Enrofloxacin	Enrofloxacin Alcohol bencilico	Es un antibiótico de amplio espectro indicado para el tratamiento y control de enfermedades respiratorias, digestivas, genitourinarias y cutáneas de origen infeccioso.	Aplicar 5 mL por cada 100 kg de peso vivo cada 24 horas	Administrador	Vía intramuscular, intravenoso o subcutáneo	3 a 5 días consecutivos
Mastizur CL	Amoxicilina (trihidrato) Ácido Clavulánico Prednisolona Excipientes c.s.p.	Antibiótico y antiinflamatorio indicado para el tratamiento de mastitis clínica de vacas lecheras en lactancia. Abarca un espectro de Gram positivo y Gram negativo.	Una jeringa cada 12 horas durante 3 ordeños consecutivos	Administrador	Vía intramuscular.	1 a 2 días
Pezonil	Alantoína Oxido de Zinc Benzocaina Excipientes	Anestésico y cicatrizante para las heridas, excoiraciones, úlceras, viruelas y todos los procesos dolorosos del pezón que impiden o dificultan el ordeño y predisponen a la mastitis.	Aplicar sobre el pezón, dejar actuar durante 3 minutos y ordeñar.	Administrador	Uso tópico / Ungüento	Tiempo a criterio del Médico Veterinario

Anexo 2. Actividad de inicio

Página 1.

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado

Rastreado la ruta de antibióticos
de uso veterinario: Análisis en
muestras ambientales y biológicas



Actividad de inicio

Elaborado por: Andrea Yuliana Bonilla Rojas y Johan Camilo Pinzón León

Nombre: _____ Código: _____

1. Indique su grado de acuerdo con cada afirmación, utilizando una escala del 1 al 5, donde:

- 1 = Totalmente en desacuerdo
- 2 = En desacuerdo
- 3 = Neutral
- 4 = De acuerdo
- 5 = Totalmente de acuerdo

Por favor, marque el número que mejor refleje su opinión sobre cada afirmación.

Afirmación	1	2	3	4	5
Comprender la ruta de los antibióticos de uso veterinario en el medio ambiente y su impacto en la salud.					
Es importante investigar sobre las trazas de antibióticos presentes en la leche bovina y agua destinada al consumo humano.					
Entender la problemática de los contaminantes orgánicos emergentes en las aguas superficiales es un tema de investigación relevante					
Estoy motivado a aprender sobre las técnicas de análisis utilizadas para detectar la presencia de antibióticos en leche y aguas superficiales.					
Me interesa adquirir conocimientos sobre cómo los antibióticos pueden bioacumularse en el organismo de un ser vivo.					

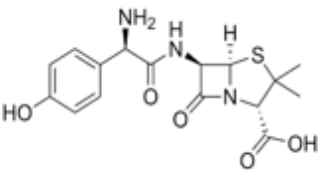
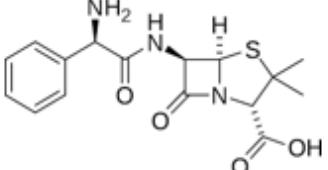
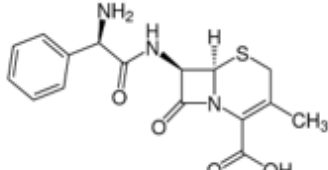
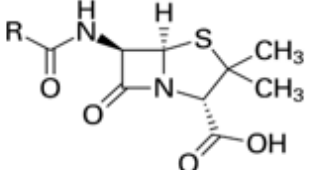
2. Defina de forma precisa y expresadas con tus propias palabras para los conceptos relacionados en la tabla 1. **Tabla 1.**

Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE)	Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF)	Aguas Superficiales	Leche de Bovino para consumo humano
Microorganismos	Antibióticos	Antagonismo	Sinergismo
Análisis cualitativo	Análisis cuantitativo	Bioacumulación	Resistencia microbiana

Página 2

3. Con base el ejercicio anterior, elabore un mapa conceptual o un esquema que facilite la organización de manera jerárquica los conceptos, estableciendo relaciones desde lo más general hasta lo más específico. Asegúrese de conectar los conceptos de manera que refleje la relación entre ellos.

4. Identifique los grupos funcionales presentes en las siguientes moléculas y complete la tabla que señalando las similitudes y diferencias entre ellas.

Molécula	Grupos funcionales	Semejanzas entre moléculas	Diferencia entre moléculas
Amoxicilina. 			
Ampicilina. 			
Cefalexina. 			
Penicilina 			

5. Usted toma una muestra de agua que posiblemente contenga RPF de amoxicilina por lo cual decide aplicar pruebas cualitativas para confirmar la presencia del antibiótico en la muestra de agua. Explique cómo podría identificar de forma cualitativa la amoxicilina en agua.

Nota: Tenga en cuenta los grupos funcionales de la Amoxicilina y de los otros antibióticos betalactámicos en la tabla anterior para dar certeza de que lo identificado es Amoxicilina y no otro antibiótico.

6. ¿Qué método analítico conoce para detectar y cuantificar la presencia de antibióticos en la leche y agua? Tenga en cuenta las características fisicoquímicas del producto. Elija el método que considere más apropiado y explique su elección en un párrafo que no exceda las 5 líneas.

7. Qué puede concluir sobre la lectura “Ojo con los antibióticos en la leche” (Ibáñez, J. 2022). Enlace: <https://www.infortambo.cl/es/contenidos/ojo-con-los-antibioticos-en-la-leche>

Enlace lectura “Ojo con los antibióticos en la leche” (Ibáñez, J. 2022):

<https://www.infortambo.cl/es/contenidos/ojo-con-los-antibioticos-en-la-leche>

Anexo 3. Lecturas bioacumulación de antibióticos

Página 1

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado

Rastreado la ruta de antibióticos
de uso veterinario: Análisis en
muestras ambientales y biológicas



Actividad 1.

LECTURAS: BIOACUMULACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LA CADENA ALIMENTARIA Y EL MEDIO AMBIENTE

Elaborado por: Andrea Yuliana Bonilla Rojas y Johan Camilo Pinzón León

Nombre: _____ Código: _____

Nombre: _____ Código: _____

Nombre: _____ Código: _____

1. Lea el artículo “Epidemiological assessment of antibiotic residues in dairy farm milk and farm waste and water in northern India” Jindall, et al. (2020). Con base en la lectura realice un diagrama a mano incluya dibujos donde se integren todos los agentes que se pueden ver afectados por los residuos de productos farmacéuticos.
2. Plantee un párrafo donde explique cómo el proceso de bioacumulación en un bovino lechero genera trazas de Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF) de antibióticos en la leche haciendo uso del esquema antes esbozado y como esto puede ser problemático para los consumidores y los diferentes ecosistemas.
3. Lea el artículo “Prevalence of Veterinary Antibiotics and Antibiotic- Resistant Escherichia coli in the Surface Water of a Livestock Production Region in Northern China” Zhang, et al. (2014). Explique porque es importante realizar un muestreo de aguas superficiales circundantes a las zonas ganaderas, además de la importancia del análisis de excremento de heces fecales y orina de los bovinos productores de leche.
4. Completar la actividad lúdica tipo juego “pasa palabra” realizado en educaplay, tomar pantallazo del puntaje cuando se haya terminado el juego y subirla en este documento.
Link: [https://es.educaplay.com/recursos-educativos/17952104-adivina la palabra.html](https://es.educaplay.com/recursos-educativos/17952104-<u>adivina la palabra.html</u>)

Anexo 4. Infografía ciclo de bioacumulación de antibióticos



Anexo 5. Actividad interactiva: Sensibilidad bacteriana

2

INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas son agentes causantes de diversas infecciones, y los antibióticos son esenciales para combatirlas.

En este estudio, nos enfocamos en Penicilina G y Amoxicilina, explorando su eficacia contra cepas bacterianas específicas.

CONCEPTOS

BIOACUMULACIÓN

Proceso por el cual sustancias se acumulan en los tejidos de organismos vivos debido a una absorción más rápida de lo que pueden ser metabolizadas o excretadas.

RESISTENCIA MICROBIANA

Es la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos de los antimicrobianos, dificultando el tratamiento de las infecciones.

ANTOGINISMO

Interacción en la que dos fármacos o sustancias reducen o bloquean los efectos del otro, disminuyendo así su efectividad.
Fuente :Diccionario NCI

Fuente :Diccionario NC

SINERGISMO

Interacción en la que dos fármacos o sustancias combinadas producen un efecto mayor que la suma de sus efectos individuales.

Fuente :Diccionario NCI

4

MÉTODO POR DIFUSIÓN KIRBY-BAUER



Este método de difusión se utiliza para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos.

También conocido como el ensayo de difusión en disco, implica la colocación de discos impregnados con diferentes antibióticos en una placa de agar con una capa uniforme de bacterias.

Según la longitud y diámetro del halo de inhibición se categoriza al microorganismo como sensible, sensible aumentando la dosis o resistente al antibiótico probado.

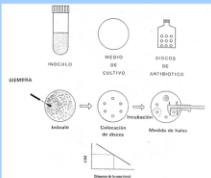


Figura 4. Método Kirby-Bauer. Tornado de Determinación de Actividad Microbiana. Recuperada de: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tpl8.pdf>

MÉTODO POR DILUCIÓN EN AGAR



Este método se emplea para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico, es decir, la concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de microorganismos.

Consiste en preparar diluciones seriadas del antibiótico en agar de cultivo (generalmente Müller-Hilton) y se inoculan con las bacterias. Luego, se observa si estas pueden crecer en estas diluciones o no.

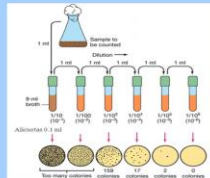
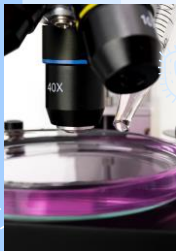


Figura 5. Método dilución. Tomado de método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. Recuperado de: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>

6

01 ACTIVIDAD INTERACTIVA



¿Qué método se utiliza para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos?

- A. Método de impregnación
- B. Concentración mínima bactericida
- C. Método de Kirby-Bauer
- D. Método de cultivo

 Multiple Choice

8

¿Para qué se emplea el método de dilución en microbiología?

- A.** Determinar la concentración mínima inhibitoria
- B.** Contar el número de microorganismos
- C.** Crear nuevos microorganismos
- D.** Eliminar completamente los microorganismos

 Multiple Choice

**ESCRIBA UNA
PALABRA
RELACIONADA CON
LAS PRUEBAS DE
ANTIBIOGRÁFAS**

Word Cloud

9

Video

**PRÁCTICA MICROBIOLÓGICA Y RESULTADOS:
DIFUSIÓN EN DISCO- KIRBY BAUER**

Inoculación de las cepas bacterianas



ENLACE: https://www.youtube.com/watch?v=n_L7tdZWHLI
Fuente propia

10

**CON BASE A LA METODOLOGÍA
KIRBY – BAUER, PLANTEA
DIFERENTES ANTIBIOGRAMAS**

**TOMA UNA FOTO Y
SUBELA A:**

Image Upload

11

**CON BASE EN EL VIDEO, REALICE UN
ANÁLISIS BREVE DE LOS
RESULTADOS.**

Short Answer

12

Referencias:

- Servicio Antimicrobianos, INEI. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución.
- Universidad Nacional del Nordeste. (2006). Practica 8 Determinación de actividad antimicrobiana.
- Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (2024). Normas de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (34.º edición). Documento MIOO del CLSI.

Anexo 6. Vídeo práctica microbiológica y resultados



ENLACE: https://www.youtube.com/watch?v=n_L7tdZWHLI

Fuente propia

Anexo 7. Propuesta para análisis de antibióticos por HPLC

Página 1

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado

Rastreado la ruta de antibióticos
de uso veterinario: Análisis en
muestras ambientales y biológicas



Actividad 3.

PROPUESTA PARA ANALISIS DE ANTIBIOTICOS EN MUESTRAS DE LECHE Y AGUA POR HPLC

Elaborado por: Andrea Yuliana Bonilla Rojas y Johan Camilo Pinzón León

Nombre: _____ Código: _____
Nombre: _____ Código: _____
Nombre: _____ Código: _____

1. Observe detenidamente el video: <https://www.youtube.com/watch?v=WkC2X8dVok> que muestra la recolección de muestras de leche de bovinos en Guatavita, Cundinamarca, así como la posterior toma de muestras de agua que los bovinos consumen.

2. Lea el siguiente texto sobre la recolección y transporte de muestras:

Se realizó la recolección de muestras de leche de algunos bovinos pertenecientes a un hato en Guatavita, Cundinamarca las muestras tomadas de 13 especímenes se dividieron en 5 botellas ámbar de 500mL. Para su transporte se hizo uso de una nevera portátil en su interior almacena pilas de refrigerantes para mantener la temperatura baja esto con la finalidad de conservar las características de la muestra al llegar al laboratorio se dejaron en refrigeración a una temperatura de 4°C. La toma de muestras tiene como finalidad detectar y cuantificar la presencia de los antibióticos Penicilina G y Amoxicilina, pertenecientes a los antibióticos betalactámicos. Con la finalidad de detectar y cuantificar la presencia de estos en la leche usted propone el método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

En su análisis detecta concentraciones de estos antibióticos en las muestras aun cuando los bovinos productores de leche no han sido sometidos a tratamientos con estos antibióticos por lo cual sospecha que la presencia de estos antibióticos en la leche es producto de una contaminación indirecta debido a la ingesta de agua en la cual se encuentran Residuos de Productos Farmacéuticos (RPF). Por lo cual se decide ir a tomar una muestra de agua del cuerpo hídrico del cual consumen los bovinos. Al llegar al laboratorio usted utiliza la técnica analítica HPLC para detectar y cuantificar residuos de Amoxicilina y Penicilina G en la muestra.

Debido a las características de la muestra y de la técnica analítica usada usted realiza un método para tratar la muestra de leche teniendo en cuenta sus características fisicoquímicas con la finalidad de aislar lo máximo posible los antibióticos en la muestra.

3. Considerando el video y texto anterior, plantee un procedimiento para extraer los analitos de interés según su caso asignado:

Caso 1: Procedimiento para extraer el antibiótico Penicilina G de las muestras de leche cruda.

Caso 2: Procedimiento para extraer el antibiótico Amoxicilina de las muestras de leche cruda.

Caso 3: Procedimiento para extraer los antibióticos Amoxicilina y Penicilina G de las muestras de agua superficial.

Tabla 1. Reactivos y Materiales

Reactivos	Materiales	Equipos

Diagrama de Flujo:

Tenga en cuenta las características del método y especifique las siguientes condiciones cromatográficas para su método (No olvide referenciar la información).

Tabla 2. Condiciones Cromatográficas.

Sistema Cromatográfico	
Fase Móvil.	La fase móvil está compuesta por dos o más solventes
Proporción de la fase móvil.	Ejemplo: acetonitrilo – agua en una proporción 10:90 esto significa que en 100mL de fase móvil están conformados por 10mL de acetonitrilo y 90mL de agua
Tipo de detector.	Existen varios tipos de detectores en cromatografía HPLC un ejemplo es el detector de masas.
Columna Cromatográfica	Para la columna cromatográfica es necesario especificar las medidas de esta.

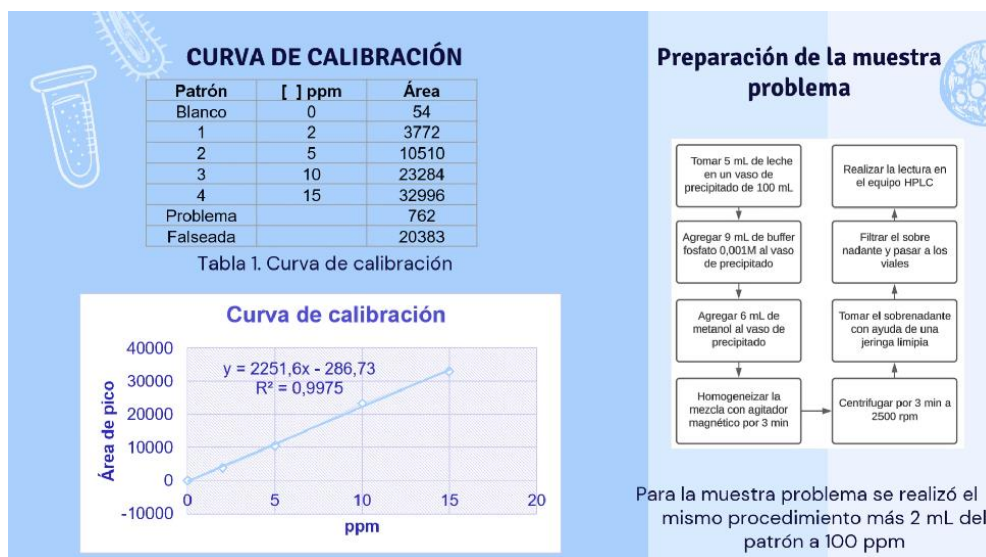
Anexo 8. Vídeo recolección de muestras



ENLACE: https://www.youtube.com/watch?v=qZh6wBs2z_M

Fuente propia

Anexo 9. Vídeo técnica y cálculos HPLC



ENLACE: <https://www.youtube.com/watch?v=nLVJUo8Hk7w>

Fuente propia

Anexo 10. Guía de práctica de laboratorio

Página 1

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado

Rastreado la ruta de antibióticos
de uso veterinario: Análisis en
muestras ambientales y biológicas



Práctica de laboratorio.

CUANTIFICACIÓN DE PENICILINA G Y AMOXICILINA EN AGUAS SUPERFICIALES Y LECHE BOVINA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Elaborado por: Andrea Yuliana Bonilla & Johan Camilo Pinzón

Objetivos

- Identificar la presencia de penicilina G y amoxicilina en muestras de leche y agua utilizando el equipo Shimadzu SCL-10Avp.
- Calcular la concentración de penicilina G y amoxicilina en las muestras.
- Determinar si la concentración de penicilina G y amoxicilina cumple las normas de LMRMV descritas en la resolución 1382 del 2013, expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS).

Preguntas orientadoras

- ¿La concentración de penicilina G y amoxicilina en las muestras de leche cumplen la normativa?
- ¿Qué implicaciones tiene la falta de una normativa específica de LMRMV en aguas de consumo humano y animal?
- ¿Cómo podría afectar la falta de regulación de LMRMV en aguas al proceso de bioacumulación de antibióticos y cuáles serían las posibles consecuencias para la salud humana y el medio ambiente?

Fundamentos teóricos

La leche bovina cruda es la materia prima para obtener el alimento líquido que tiene un importante valor nutricional en el país. Por lo cual es necesario realizar los respectivos análisis de calidad para el consumo de esta bebida, los que generalmente se realizan son microbiológicos o fisicoquímicos que tienen la finalidad de determinar la presencia de microorganismos que pueden ser patogénicos. Sin embargo, en los últimos años se ha decidido analizar un parámetro de calidad con respecto a la presencia de medicamentos veterinarios entre los cuales se incluye a los antibióticos.

Normativa

a Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha establecido límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV) en la leche. En Colombia, estos límites están regidos por la resolución 00001382 del 2013, emitida por el Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS). Los LMRMV para los antibióticos Penicilina G y Amoxicilina son de 4 µg/L. Sin embargo, no existe una normativa específica para estos antibióticos en el agua de consumo en Colombia.

Es importante destacar que para garantizar el cumplimiento de este parámetro en los centros de recolección del producto se utiliza un método colorimétrico de rápido resultado. Este método implica el uso de un Kit en el cual solo es necesario aplicar una gota de leche en las tirillas. Si la leche está contaminada por antibióticos, las tirillas cambiarán de color, ofreciendo así una indicación visual inmediata de la presencia de residuos.

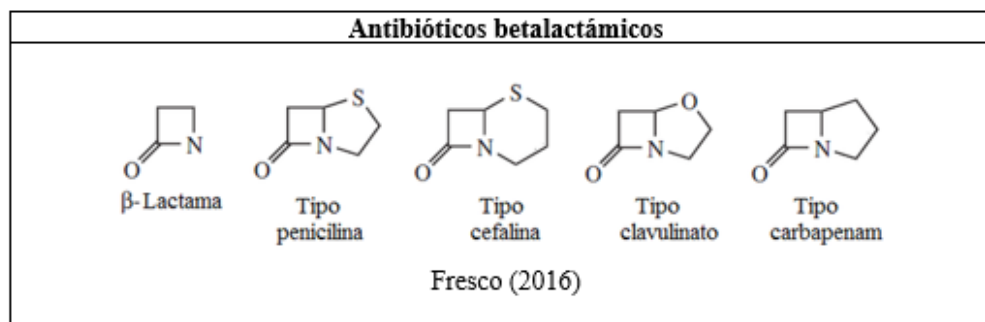
Técnica analítica

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método estándar y de referencia aceptado por la Association of Official Analytic Chemists (AOAC) para la detección y cuantificación precisa de antibióticos en leche. Para analizar la presencia de Amoxicilina y Penicilina G en leche, es necesario realizar un pretratamiento de la muestra. Esto implica la eliminación de la fracción lipídica, los carbohidratos y las proteínas para obtener una fase líquida pura, donde se encuentran los residuos de los antibióticos, solubles en solventes polares como el agua.

En cromatografía de líquidos, se utilizan una fase móvil y una fase estacionaria. La fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida y se encuentra dentro del cromatógrafo, retiene los analitos por afinidad química. Por otro lado, la fase móvil consiste en un solvente o mezcla de solventes en los cuales el analito debe ser soluble. La función de la fase móvil es transportar el analito a través de la fase estacionaria.

El principio de funcionamiento de la cromatografía se basa en el hecho de que la fase estacionaria retiene temporalmente los analitos presentes en una muestra, separándolos antes de que sean detectados por el detector. Dado que los analitos tienen interacciones diferentes con la fase estacionaria, llegan al detector en momentos diferentes. Esto permite identificar y cuantificar cada componente de la muestra. Los tiempos de retención de los analitos pueden compararse con datos de referencia para su identificación o mediante la inyección previa de soluciones con analitos conocidos.

Antibióticos betalactámicos





Fuente propia

Detección de penicilina en leche por la técnica HPLC

Materiales y reactivos

Materiales	Reactivos	Equipos
Pipeta de 5mL aforada	Metanol Grado HPLC.	Potenciómetro
Pipeta de 10mL graduada	Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	Centrifugadora
Tubo de centrifugadora	Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4)	Agitador Magnético
Vaso de precipitado de 100mL		

Tabla 1. Materiales para la práctica de Detección y Cuantificación de Penicilina G en leche.

Procedimiento

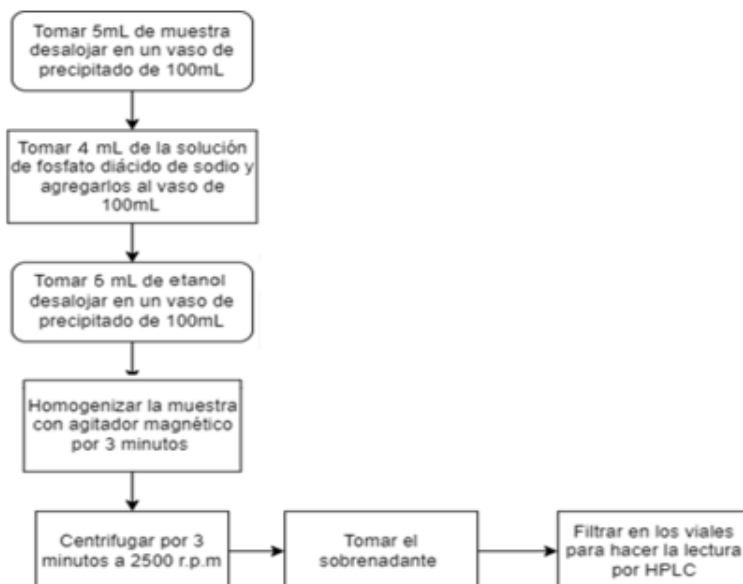


Figura 1. Diagrama de flujo para la detección y cuantificación de Penicilina G en leches.

Detección de amoxicilina en leche por la técnica HPLC

Materiales y reactivos:

Materiales	Reactivos	Equipos
Pipeta de 1mL	Acetonitrilo grado HPLC	Centrifugadora
Pipeta aforada de 5mL	Diclorometano	
Cubeta		
Hielo		
Placas para refrigerar		
Gotero		
2 tubos de centrifuga		

Tabla 2. Materiales para la práctica de Detección y Cuantificación de Amoxicilina en leche.

Procedimiento:

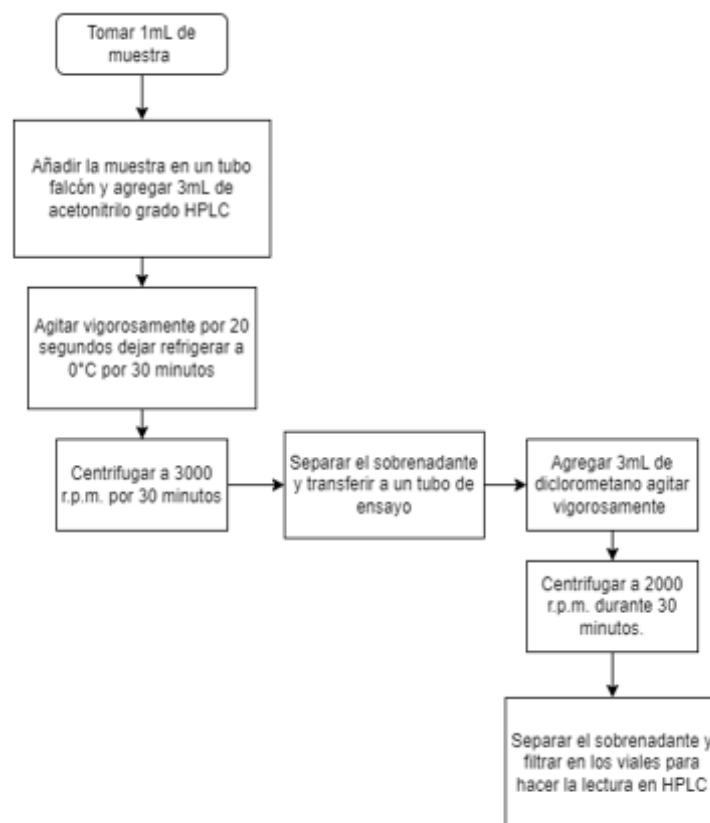


Figura 2. Diagrama de flujo para la detección y cuantificación de Amoxicilina G en leches.

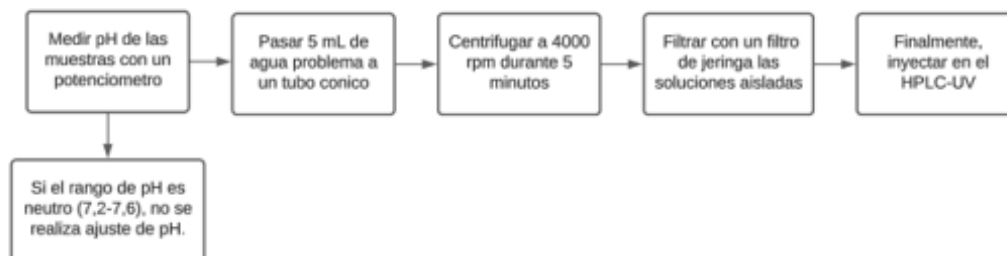
Detección de penicilina G y amoxicilina en agua por la técnica HPLC

Materiales y equipos

Materiales	Equipos
1 Pipeta de 5 mL aforada	Centrifugadora
3 Tubos de centrifugadora	
1 Filtro de jeringa	
1 Jeringa	

Tabla 3. Materiales para la práctica de Detección y Cuantificación de Amoxicilina y Penicilina G en agua.

Preparación de las muestras de agua



Referencias

- Fresco Merino, M. (2016). Diseño y mecanismos de acción molecular de nuevos inhibidores de β -lactamasa.
- Faría, J., Allara, M., Arenas, L., Marquez, E. (2000). Extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Revista Científica. FCV. LUZ. X (3): 212-221.
- Singh, S. K., Sahni, Y. P., & Qureshi, S. R. (2012). HPLC determination of amoxicillin residue in milk and effect of pasteurization. Indian Journal of Field Veterinarians (The), 7(4), 82-84.
- Samandari, M., Movahedian Attar, H., Ebrahimpour, K., Mohammadi, F., & Ghodsi, S. (2022). Measurement of ampicillin and penicillin G antibiotics in wastewater treatment plants during the COVID-19 pandemic: A case study in Isfahan. Environmental Health Engineering and Management Journal, 9(3), 201-211.

Anexo 11. Actividad de cierre

Página 1

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado

Rastreando la ruta de antibióticos
de uso veterinario: Análisis en
muestras ambientales y biológicas



Actividad Final.

Elaborado por: Andrea Yuliana Bonilla Rojas & Johan Camilo Pinzón León.

Nombre: _____ Código: _____

1. Indique su grado de acuerdo con cada afirmación, utilizando una escala del 1 al 5, donde:

- 1 = Totalmente en desacuerdo
- 2 = En desacuerdo
- 3 = Neutral
- 4 = De acuerdo
- 5 = Totalmente de acuerdo

Por favor, marque el número que mejor refleje su opinión sobre cada afirmación. Responda con sinceridad, recuerde que los resultados obtenidos serán usados únicamente con fines académicos.

Afirmación	1	2	3	4	5
Me siento más capacitado/a para abordar y comunicar sobre la problemática de los residuos de antibióticos en diferentes contextos.					
La metodología de investigación aplicada en la secuencia didáctica ha fortalecido mis habilidades de análisis y comprensión en el área					
Comprendo cómo la bioacumulación de antibióticos en matrices de agua y leche se interrelaciona, teniendo un mayor impacto en la salud.					
La secuencia didáctica generó en mí un interés continuo por explorar temas relacionados con la contaminación de antibióticos en el medio ambiente y sus impactos.					

2. En el laboratorio, se reciben diversas muestras de leche bovina procedentes de un hato del altiplano cundiboyacense. Para transportar estas muestras hasta Bogotá, se utiliza una nevera de icopor que, junto con las muestras, almacena dos pilas refrigerantes. Se toma un litro de leche directamente de la cantina después de extraer el producto de todos los bovinos productores de leche, y se divide en botellas ámbar de 250 mL cada una.

Al llegar al laboratorio, se solicita un análisis cuantitativo de las muestras para descartar la contaminación del producto por antibióticos, específicamente penicilina G. En este

Página 2

contexto, se requiere describir un procedimiento para tratar la leche antes de analizar con la técnica analítica de cromatografía HPLC. Es importante considerar que la leche es una matriz compleja que contiene carbohidratos, una fracción lipídica, minerales y proteínas.

3. Debido a una epidemia de mastitis en la población bovina en una de las veredas del municipio de Guatavita (Cundinamarca-Colombia). Se han tratado alrededor de 100 cabezas de ganado el último mes con medicamentos veterinarios en los cuales está presente la penicilina G. Los animales en tratamiento se han aislado y se han dejado en reposo sin extraer el producto de las glándulas mamarias con fines de comercializar. Sin embargo, debido a la excreción fisiológica de los animales se estima que posiblemente un cuerpo de agua superficial del Municipio que abastece a la vereda de agua potable se ha contaminado con penicilina G debido a los residuos existentes en la orina y estiércol de los animales en tratamiento por lo cual se decide realizar un análisis de penicilina G en muestras del cuerpo de agua superficial afectado.
 - A. Usted como analista de estas muestras decide utilizar el cromatógrafo por HPLC para lo cual prepara una curva de calibración, describa como realizaría usted la curva de calibración para el análisis de las muestras de agua teniendo en cuenta que el patrón más concentrado es de 20ppm y el menor es de 0,05ppm y que para esto solo puede utilizar 500mg de un patrón certificado de Penicilina G. Nota: Haga los cálculos necesarios, tome foto de estos y péguelos en el presente documento.
 - B. Con base a lo anterior, determine si se puede evidenciar un proceso de bioacumulación. En caso afirmativo, explique el proceso de bioacumulación descrito previamente, especifique como es este proceso y que consecuencias trae esto en el organismo del animal, suelo y aguas superficiales.
4. ¿Para qué se emplea el método de dilución en microbiología?
5. ¿Qué método se utiliza para determinar la sensibilidad de bacterias a diferentes antibióticos?
6. Realice un cuadro comparativo entre los métodos de antibiogramas, método de Kirby –Bauer y el método por dilución en caldo.

Anexo 12. Formato validación de la secuencia didáctica

Página 1

Universidad Pedagógica Nacional
Licenciatura en Química
Trabajo de Grado



VALIDACIÓN SECUENCIA DIDÁCTICA LICENCIATURA EN QUÍMICA TRABAJO DE GRADO

RASTREANDO LA RUTA DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINARIO: ANÁLISIS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS

Nombre:

Fecha:

Área de desempeño:

Objetivo: Valorar la pertinencia de la secuencia didáctica “RASTREANDO LA RUTA DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINARIO: ANÁLISIS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS” fundamentada en el Aprendizaje Basado en Investigación (ABI) para fomentar competencias de investigación a través de un proceso educativo con estudiantes del ciclo de profundización de la Licenciatura en Química en la Universidad Pedagógica Nacional.

En el marco de la Licenciatura en química, de la Universidad Pedagógica Nacional se tiene como propósito encarar los problemas de la enseñanza de la ciencia y de la Química desde una perspectiva investigativa. Por lo cual, esta secuencia busca que, a través del contenido y las prácticas docentes, se generen nuevos conocimientos, técnicas y estrategias, o se valide aquellas que ya forman parte del conocimiento establecido. Como resultado del trabajo de grado se propone una secuencia didáctica, denominada “RASTREANDO LA RUTA DE ANTIBIÓTICOS DE USO VETERINARIO: ANÁLISIS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS”, cuyo objetivo es abordar la problemática de la bioacumulación de dos antibióticos presentes en muestras ambientales y biológicas. Los residuos de estos productos farmacéuticos se analizarán en dos matrices específicas: la leche bovina y las aguas superficiales.

Para efectos de la valoración de la secuencia, encontrará un formato¹ con criterios en tres grandes ámbitos: contenido, metodología y oportunidades de aprendizaje y evaluación. Para nosotros son muy importantes sus consideraciones, por esta razón solicitamos, que, desde su experiencia y formación, diligencie y enuncie recomendaciones de acuerdo con los criterios planteados y atendiendo a la siguiente escala: 1 regular, 2 bueno y 3 excelente.

Muchas gracias por su colaboración.

CONTENIDO				
Criterios	Valoración			Recomendaciones
	1	2	3	
Las temáticas planteadas dentro de la secuencia son pertinentes para el abordaje de la identificación de los antibióticos en muestras ambientales y biológicas				

1. Tomado y adaptado de: Mejía, L. (2014). Correlación entre la usabilidad de un OVA y su efectividad como herramienta de enseñanza-aprendizaje. IngEam (1), 66 - 75

El contenido y las actividades propuestas favorecen la apropiación de conceptos y su aplicabilidad.				
Los contenidos presentados están relacionados adecuadamente con los objetivos de la secuencia y los establecidos en cada actividad.				
Los contenidos se encuentran organizados de manera pertinente para el abordaje de la temática.				
METODOLOGÍA Y POSIBILIDADES PARA EL APRENDIZAJE				
La metodología implementada en cada una de las actividades es apropiada para la comprensión de la temática.				
La secuencia didáctica favorece el fortalecimiento de las competencias cognitivas, procedimentales y actitudinales.				
La secuencia de actividades posibilita la comprensión contextualizada y completa de la problemática de los antibióticos y su impacto en los ecosistemas.				
El material presentado es apropiado para favorecer los procesos de aprendizaje.				
EVALUACIÓN				
Los procesos de evaluación y retroalimentación se ajustan a cada uno de los objetivos propuestos.				
La rúbrica de evaluación permite evidenciar el seguimiento del proceso del estudiante a lo largo de la secuencia didáctica.				

¿De acuerdo con lo experimentado durante la revisión de la secuencia didáctica, considera que la propuesta apunta a ser una estrategia que permite fortalecer no sólo un proceso de enseñanza sino la práctica docente desde la investigación y la creatividad? Justifique su respuesta.

Gracias por su colaboración,

¹Andrea Yuliana Bonilla Rojas & ²Johan Camilo Pinzón León

Estudiantes de la licenciatura en Química - UPN

¹aybonillar@upn.edu.co, ²jcpinzon1@upn.edu.co