

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACION DE RESIDUOS DE TETRACICLINA EN HUEVOS DE
GALLINA POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCION (HPLC)**

INFORME DE TESIS

presentado por:

RUTH ADELAI DA TRUJILLO GIRON

Para optar al Título de
QUIMICO FARMACEUTICO

Guatemala, junio de 1997.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06
T(1205)
204

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

PROFESOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
CONTROL

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS

Porque "con Dios está la sabiduría y el poder:
suyo es el consejo y la inteligencia". Job 12: 13.

A MIS PADRES

Juan Francisco Trujillo Rojas y Cleofelia Girón
de Trujillo.
Este triunfo es de ustedes, muchas gracias por su
amor, su apoyo, su paciencia y su comprensión.

A MI ESPOSO

Abdiel
Muchas gracias por todo el apoyo y la comprensión
brindadas. Para tí, con amor.

A MI HIJA

Andrea
Con mucho amor y cariño.

A MIS HERMANOS

Victor Eduardo, Rolando Elías, y Manuel de Jesús.
Con mucho cariño.

A MIS AMIGAS

Bessie Orozco y Gloria Romero

A LA ESCUELA DE QUIMICA FARMACEUTICA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

AGRADECIMIENTO

Al Doctor Rubén Velásquez, por su valioso asesoramiento y orientación brindadas para la realización de esta investigación.

A la Lic. Blanca Samayoá, por la orientación brindada al inicio de esta investigación.

Al Doctor Abdiel Orozco, por su apoyo económico para la realización de este estudio.

A Miriam y Bessie por su colaboración en el proceso de las muestras en el trabajo de laboratorio.

A Edgar y Cibbie Orozco por su colaboración en la computación de datos y envío de artículos científicos de la Universidad de Berkeley California.

Al Departamento de Bioquímica por permitir el uso de sus instalaciones y equipo.

UNIVERSIDAD DE GUATEMALA
Biblioteca Central



2. INTRODUCCION

En las granjas de producción de huevos de gallina, es necesario que las aves ponedoras sean sanas. Con el objetivo de prevenir y eliminar enfermedades en las aves, el uso de una variedad de antibióticos, entre estos la tetraciclina, es una práctica común [1].

Como todo medicamento, la eliminación y metabolismo de las tetraciclinas siguen normalmente una curva de decaimiento [2]. Estas se unen en grado variable a las proteínas plasmáticas lo que provoca más tiempo de permanencia del organismo del ave [3]. Inicialmente la eliminación es grande, pero decae a concentraciones bajas cuando los residuos no pueden ser eliminados completamente [2]. Esto produce un efecto acumulativo de antibiótico o sus metabolitos en los diferentes tejidos del ave concentrándose especialmente en ovario, útero e indiscutiblemente en el huevo [4].

El empleo masivo de tetraciclina en forma constante, inadecuada e indiscriminada tanto a niveles subterapéuticos, preventivos y curativo puede provocar un incremento en la resistencia de los microorganismos. La presencia de residuos de tetraciclinas en huevo y otros tejidos de pollo pueden representar una ingesta de dosis subterapéuticas de los mismos. Una bacteria se hace resistente cuando es expuesta a dosis bajas de antibiótico, lo que permite un proceso de selección en que algunas de ellas no mueren y desarrollan resistencia. Una vez que han aparecido bacterias resistentes éstas pueden posteriormente sobrevivir a un tratamiento con dosis terapéuticas del antibiótico al que estuvieron expuestas anteriormente e incluso a tratamientos con otras drogas existentes. De esta manera puede existir una interferencia con el tratamiento de enfermedades sensibles a la tetraciclina tanto en el ser humano como en las aves [3]. Por ello, se hace necesario un control de residuos de tetraciclinas en alimentos como peces, huevos y leche con métodos analíticos sensibles y específicos [5].

Mediante el presente trabajo de investigación se pretendía demostrar la presencia de residuos de tetraciclinas en huevos de gallina de una granja avícola de Guatemala, mediante un método altamente sensible y específico [6].

3. ANTECEDENTES

3.1 GENERALIDADES

En cuanto a trabajos sobre residuos de tetraciclinas se encontró que Perla, F. en 1969 de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala, determinó residuos de Clortetraciclina en 150 huevos provenientes de 25 granjas de la ciudad de Guatemala. Para su determinación utilizó el método de Sakaguchi modificado para colorimetría [4].

En 1987, Roudaut, Moretain y Boisseau a través de un método microbiológico determinaron oxitetraciclina en huevo después de una medicación oral a doce gallinas ponedoras. Encontraron una mayor concentración en la yema del huevo que en la albúmina. También determinaron oxitetraciclina en huevo con medicación intramuscular donde la mayor concentración encontrada fue en la yema del huevo [7].

En 1989, Roudaut, Moretain y Boisseau determinaron tetraciclina y clortetraciclina en huevo después de una medicación oral en gallinas ponedoras. Doce gallinas fueron administradas con tetraciclina y ocho con clortetraciclina por cinco días usando método microbiológico y a la mayor concentración encontrada fue en la yema hasta diez días después de la medicación con tetraciclina y doce días con clortetraciclina [8].

En 1990, Fletouris, Psomas y Botsoglou utilizaron cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar residuos de oxitetraciclina y tetraciclina en leche, encontrando hasta 10 ppb con este método [9].

En 1992, Tunc Agasoster determinaron residuos de oxitetraciclina en leche, carne de pescado, carne bovina y huevo en dialisis y una reacción post-columna detectada con HPLC. El cual resultó ser un método simple para la determinación de drogas en compuestos biológicos [5].

En 1996, Garcia et al. Determinaron residuos de penicilina, gentamicina, tetraciclina y cloranfenicol, por método microbiológico y sulfametoxazol por colorimetría, como contaminantes en leche pasteurizada, leche sin pasteurizar, en carne y en huevo. Utilizaron 20 muestras para cada análisis de antibiótico realizado [10]

3.2 USO DE TETRACICLINAS EN AVES

3.2.1 Generalidades

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos producidos por varias cepas de actinomicetos del género Streptomyces. La clortetraciclina es producida por Streptomyces aureofaciens y la oxitetraciclina por el Streptomyces rimosus. Actualmente se obtienen por cultivo o en forma sintética [3, 11].

Entre las tetraciclinas de mayor uso en las aves pueden mencionarse: La clortetraciclina, la oxitetraciclina y la tetraciclina. Estas son sustancias anfotéricas que forman sales con los ácidos o con las bases, cristalizan en soluciones acuosas porque sus sales son menos estables en medios ácidos. Las tetraciclinas base son polvos alcalinos, ligeramente amarillos, sin olor u ligeramente amargos, insolubles en agua destilada y en otros solventes. Combinadas con sodio o con Clorhidratos forman sales muy solubles como el clorhidrato de oxitetraciclina [3,12].

En forma general las tetraciclinas poseen un pH ácido en soluciones acuosas y disminuyen su potencia cuando son expuestas a la luz, aire o compuestos alcalinos. La mayoría son higroscópicas. Las propiedades físicas y químicas que poseen les permiten ser utilizadas por distintas vías en las aves como son el agua de bebida, el alimento, inyección intramuscular y subcutánea [3, 12]. Ver anexo No. 13.1

Son absorbidas en el tracto gastrointestinal y producen concentraciones sistémicas antibacterianas en el torrente sanguíneo y en los demás tejidos del organismo [3, 13].

3.2.2 MECANISMO DE ACCION

Se puede realizar mediante tres formas:

- a) Por bloqueo de la síntesis proteica, uniéndose en forma específica a las subunidades 30s de los ribosomas microbianos.
- b) Por inhibición de sistemas enzimáticos activos encargados de actuar en la formación de proteínas en los ribosomas microbianos.
- c) Por formación de agentes quelantes, que son producidos mediante la captación de metales que son

vitales para reacciones enzimáticas de la célula bacteriana.

El efecto de las tetraciclinas es bacteriostático [3].

3.2.3 ESPECTRO ANTIBACTERIANO

Actúan contra bacterias gramnegativas y grampositivas, pero principalmente contra grampositivas. Entre las más susceptibles a las tetraciclinas se encuentran los *Streptococcus* B-hemolíticos, *Streptococcus* no hemolíticos, *Clostridium* sp., *Haemophilus* sp., y *Klebsiella* sp. Las bacterias moderadamente sensibles como: *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp., *Salmonella* sp. Muestran resistencia hacia las tetraciclinas la *Pseudomonas* sp., *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella* sp. Y muchas cepas de *Staphylococcus* sp.

También tiene acción sobre microorganismos como la *Chlamydia psittaci* y sobre micoplasmas [3].

3.2.4 RESISTENCIA A LAS TETRACICLINAS

Los microorganismos que se hicieron resistentes a una tetraciclina exhiben a menudo resistencia a las otras formas de tetraciclina. Las bacterias sólo se hacen resistentes después de la exposición al fármaco.

La oxitetraciclina y la clortetraciclina cuando se administran en aves producen residuos orgánicos que permanecen por 15 a 30 días después de su aplicación parenteral y cuando se aplican por vía oral se eliminan de 3 a 5 días después [3].

Muchos microorganismos resistentes exhiben reducción de la acumulación de tetraciclina como resultado de: 1) La disminución del flujo del antibiótico; 2) adquisición de una vía de eliminación con gasto de energía y 3) también puede ser evidente la disminución del efecto de la tetraciclina sobre el ribosoma [3,14].

3.2.5 ABSORCIÓN DE LAS TETRACICLINAS

Después de la administración oral en aves las tetraciclinas se absorben en el estómago y en parte del intestino delgado, producen un nivel máximo en el plasma en 2 a 4 horas y resisten en concentraciones elevadas después de 5 a 6 horas de su administración [11].

La absorción de las tetraciclinas por vía oral se dificulta debido a la presencia de iones calcio, magnesio, hierro y aluminio con los que forma quelatos que no son absorbibles, por lo cual en las aves se recomienda disminuir los niveles de calcio o utilizar compuestos potencializadores de las tetraciclinas y así disminuir la formación de quelatos y aumenta la absorción de estos antibióticos [3].

La inyección intramuscular es adecuada para la oxitetraciclina y la tetraciclina, pero no para la clortetraciclina, que es irritante y se absorbe mal e irregularmente en el lugar de la inyección para el humano como para aves. La tetraciclina y la oxitetraciclina administradas por vía intramuscular se reconocen en el plasma a los 15 minutos, alcanzan el máximo en una hora. Mantienen en la sangre niveles significativos unas doce horas y luego declinan a las 24 horas después de la inyección [11].

La vida media de algunas tetraciclinas utilizadas en las aves es la siguiente: 1) Clortetraciclina 5.5 horas 2) Tetraciclina 8.5 y 3) Oxitetraciclina 9.5 horas.

Todas las tetraciclinas se unen en grado variable a las proteínas plasmáticas, dicha unión es reversible, con lo que obtiene una permanencia por más tiempo en el organismo. La oxitetraciclina se une de 20% a 25%, la clortetraciclina en un 50% a 70% y la tetraciclina de 25% a 30 % a las proteínas plasmáticas [3].

3.2.6 EXCRECION DE LAS TETRACICLINAS

Se excretan principalmente a través del riñón y a través de las heces y en forma parcial por la bilis [3].

3.2.7 TOXICIDAD

Las tetraciclinas no producen ningún problema de toxicidad importante en las aves [3].

3.3 NIVELES PERMITIDOS DE TETRACICLINAS EN HUEVOS, GRASAS Y TEJIDOS

ANIMALES

El gobierno de los Estados Unidos establece los límites de concentración para estas sustancias, las cuales son : cero para huevos , 0.1 a 0.4 ppm en grasas, tejidos y aves [15]. En Canadá se aceptan 5

Las ventajas que ofrece este método por la clase de equipo que usa es que los análisis son precisos, el tiempo en que se analiza cada muestra es de aproximadamente de una hora y la sensibilidad es hasta de 10 ppb en leche [9]. Ver anexo No. 13.2. para descripción de cromatografía por HPLC

6. HIPOTESIS

Los huevos de gallina que provienen de una granja avícola en Guatemala no contienen residuos de tetraciclinas.

- Filtro de Membrana (0.2 μ m, 15 mm)

7.4.3 REACTIVOS

Tetraciclina base

Metanol (Merck)

Acido perclórico (HClO_4) 0.1 M. (Merck)

Celite 545 (Merck)

Acido Clorhídrico (HCl) 1 N. (Merck)

Amberlita XAD-2. (Sigma)

Acido Betamercaptopropiónico. (Merck)

Acetonitrilo. (Merck)

Acido Fosfórico 0.02 M. (Merck)

7.4.4 CRISTALERIA

Beakers de 500 mL

Erlenmeyer de 200 mL

Tubos de ensayo

Agitadores de Vidrio

Embudo de Vidrio

7.5. METODOLOGIA

7.5.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

La presente investigación, fué un estudio explorativo en el que se buscó establecer la presencia de residuos de tetraciclinas en huevos de gallina, se utilizó una población de $n = 96$ EN UN PLAN PILOTO y NO SE HIZO COMPARACION ENTRE POBLACIONES.

Se validó el método, estableciéndose sus valores de linealidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación [19]. Para realizar los cálculos estadísticos en la validación del método se utilizó un programa de hoja electrónica QUATTRO-PRO versión 5, en un procesador 386/SX 40 MHZ; 1993.

7.5.2. SELECCION Y COLECTA DE LA MUESTRA

Las muestras fueron obtenidas de una granja avícola de Guatemala productora de huevos de gallina. El muestreo fue sistemático de la siguiente manera: Se escogieron 96 huevos de un lote en forma alatoria de los canales con banda sin fin que transporta los huevos antes de almacenarlos, se tomo un huevo y se dejaron pasar 47, luego se tomo otro huevo y se dejo pasar otros 47 huevos. Se hizo de esta manera hasta completar los 96 huevos que corresponden a la población. Estos huevos fueron transportados en cartones para huevos a temperatura ambiente, debidamente numerados conforme a su bolceta de recolección (anexo No. 13.4).

Previo a su almacenaje cada muestra se homogenizó y se guardó en bolsas de polietileno con cierre hermético, siendo estas también numeradas con el número correspondiente a cada huevo. Luego fueron almacenadas a -8°C . Del lugar de almacenamiento se trasladaron congeladas al laboratorio para proceder a su análisis.

7.5.3. TECNICAS DE OBSERVACION

Se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para detectar los residuos de tetraciclina y oxitetraciclina presentes, siguiendo el método que se describe a continuación.

7.6. PROCEDIMIENTO

El método para la identificación y cuantificación de residuos de tetraciclinas incluye el procesamiento de la muestra mediante una extracción y una filtración a través de una de una resina (amberlita XAD-2), adsorbente polimérico no iónico, y la posterior cuantificación por HPLC [20].

7.6.1 SOLUCIONES PATRON

Se prepararon soluciones madre de tetraciclina en metanol (1 mg/mL). Estas son estables por un mes al ser almacenadas a -25°C . A partir de estas se prepararon soluciones stock diluídas en metanol (100 ug/mL), inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de trabajo, con concentraciones de 0.064 a 1.6 ug/mL, se prepararon mediante dilución de las soluciones stock con la cantidad apropiada de ácido perclórico (HClO_4) 0.1 M. Estas se utilizaron en fresco y fueron protegidas de la luz solar directa y de

y de la luz artificial durante todo el análisis [9].

7.6.2. PREPARACION DE MUESTRAS ENRIQUECIDAS CON TETRACICLINAS

Se usaron huevos provenientes de gallinas a las cuales no se les administró ningún antibiótico (huevos de gallina de patio), con el fin de validar el método. Se pesaron 40 gramos de homogenizado de huevo de patio un beaker previamente tarado, con jeringas de 10 y 25 uL se enriquecieron con antibióticos de las soluciones stock descritas en el inciso 7.6.1, para alcanzar concentraciones finales de 0.2 a 1.00 ppm de cada una de las tetraciclinas. Las muestras se hicieron en duplicado y fueron tratadas de la manera descrita en los incisos 7.6.3 y 7.6.4

7.6.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO A SU ANALISIS EN HPLC

Se pesaron 40 g de muestra que previamente había sido homogenizada, en un beaker tarado; se le se le añadió 100mL de HCl 1 N, se homogenizó por 5 minutos, se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se filtró a través de una columna de vidrio (15 mm X 15 cm) previamente empacada con 5 g de celite 545. Al centrifugado se le repitió el proceso anterior y ambos filtrados se hicieron pasar por una columna de (10 mm X 25 cm) previamente empacada con Amberlita XAD-2 activada (anexo 13.3). La columna fue lavada con 200 mL de agua destilada, seguidamente se eluyó con 50 mL de metanol.

Estos 50 mL de eluido metanólico se colectaron en un frasco oscuro y se les agregó 1 mL de solución metanólica al 5 % de Acido B-mercapto-propiónico; esta finalmente fue la solución de prueba. Por último, la solución de prueba se filtró a través de un filtro de membrana (0.2 um) y fue analizada por HPLC.

Las soluciones patrón y muestras enriquecidas fueron protegidos de la luz solar y artificial durante todo el proceso del análisis.

7.6.4 ANALISIS CROMATOGRAFICO

Los filtrados de las soluciones prueba se analizaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis se lleva a cabo con las condiciones cromatográficas indicadas en la tabla No. 1. Tanto las muestras enriquecidas, así como los estándares fueron inyectados al sistema de HPLC con una jeringa de 250 uL de volumen.

TABLA No. 1
CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA EL ANALISIS DE TETRACICLINAS

Columna	Acero Inoxidable, 250 x 4 mm DI Lichrocart, Merck
Fase Estacionaria	Lichrospher 100, 5 u RP-18
Fase Móvil	Acetonitril / ácido fosfórico 0.02 M, pH 3. (24/76, v/v) elución isocrática.
Temperatura	Ambiente (23 -28 ° C)
Volumen de Inyección	200 uL.
Flujo	1.2 uL
Detección	UV (355)
Volumen de Celda	12 uL

7.7. VALIDACION DEL METODO

La validación del método se realizó de la siguiente manera:

7.7.1. VALIDACION DE CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Para la validación de las condiciones cromatográficas descritas en la tabla No. 1, se inyectaron en el equipo de HPLC, en forma separada o en mezcla, soluciones patrón de oxitetraciclina y de tetraciclina-HCl en concentraciones de 0 a 1.6 ppm. Posteriormente se inyectaron los extractos obtenidos de siete muestras enriquecidas con ambos antibióticos, cada uno en concentraciones finales entre 0.02 y 1.0 ppm. En todos los casos se hicieron más de tres inyecciones para cada muestra, pues se buscaban las condiciones de análisis cromatográfico para una buena separación de la oxitetraciclina y la tetraciclina-HCl.

Para la validación del método conjunto extracción-análisis por HPLC para la determinación y cuantificación de residuos de Tetraciclina en huevo, se realizaron los análisis y se determinaron los parámetros que a continuación se exponen:

7.7.2. LINEARIDAD

Para determinar la linealidad del método y análisis cromatográfico se prepararon diez soluciones patrón con cada uno de los antibióticos en concentraciones de 0.02 a 1.60 ppm. Para determinar la linealidad del método conjunto extracción-HPLC, se prepararon siete muestras de huevo enriquecida con ambos antibióticos cada uno en concentraciones de 0.2 a 1.00 ppm. Las soluciones patrón se inyectaron sin tratamiento previo, mientras que las muestras enriquecidas se analizaron con HPLC luego de ser procesadas.

Los resultados se graficaron, y se plotó la concentración (eje x) vs la absorción de la luz UV expresada como área debajo del pico (eje y). Con estos resultados se obtuvieron las ecuaciones de regresión para ambos antibióticos, tanto de soluciones patrón como de las muestras enriquecidas. Se calculó también el coeficiente de correlación (r), mediante el programa de hoja electrónica QUATTRO-PRO versión 5, con un procesador 386/SX.

7.7.3. EXACTITUD

Se prepararon 7 muestras de huevo enriquecidas con oxitetraciclina y tetraciclina-HCl con concentración de (0.02 a 1.00 ppm). se procesaron y analizaron con los procedimientos ya descritos en el inciso 7.6.2. Con los resultados se trazó una gráfica con los valores de concentración conocida de ambos antibióticos en el eje de las x , y en el eje de las y la concentración detectada de cada uno de los analitos. El valor de la pendiente b multiplicado por 100 es el porcentaje de recuperación.

7.7.4. LIMITE DE DETECCION

Se calculó la concentración teórica que tendría un cromatograma cuya señal de absorción de luz UV (expresada como altura) sea igual a 3 veces mayor que la señal del ruido (razón señal-ruido = 3: 1). Esta concentración constituyó el límite de detección para ambos antibióticos. en las soluciones estándar como en las muestras enriquecidas.

7.7.5. LIMITE DE CUANTIFICACION

Por la extrapolación de la gráfica concentración vs absorbancia de luz UV. Para esta gráfica se utilizaron los resultados obtenidos al analizar muestras enriquecidas con concentraciones de tetraciclina en el rango 0.02 a 1.00 ppm.

RESULTADOS

8. 1. VALIDACION DEL METODO

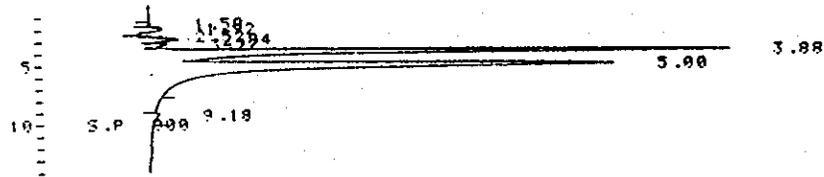
8. 1. 1. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Los análisis de estándares de OTC y TC- HCl dieron como resultado cromatogramas como los que se observan en la grafica No.1. Con las condiciones descritas en el tabla No. 1, se logró separar los dos antibióticos, los cuales mostraron un tiempo de retención (RT) de 3.88 ± 0.62 para OTC y de 5.12 ± 0.58 para TC-HCl, ($x \pm \sigma$; n= 14). El análisis de muestras de huevo enriquecidas con ambos analitos generaron cromatogramas similares, con RT de 4.34 ± 0.3 para OTC y de 5.32 ± 0.5 para TC-HCl, ($x \pm \sigma$; n= 10).

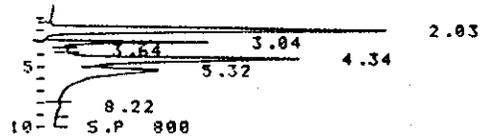
PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central



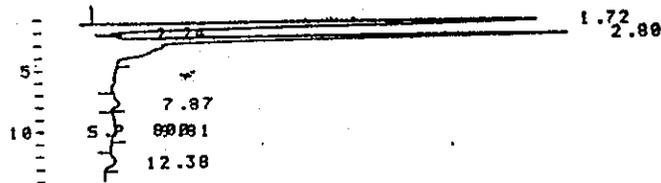
CH. 1 C.S. 2.50 ATT 4 OFFS 0 06/20/96 17:14



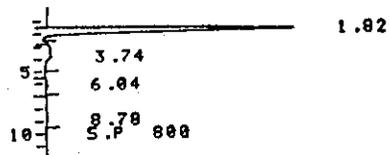
CH. 1 C.S. 2.50 ATT 6 OFFS 0 03/31/96 16:10



CH. 1 C.S. 2.50 ATT 4 OFFS 0 06/18/96 15:59



CH. 1 C.S. 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 01:37



Gráfica No. 1: Cromatogramas del análisis de A) 25 ng de OTC y 25 ng de TC-HCl, B) filtrado de prueba obtenido a partir de una muestra enriquecida con OTC y TC-HCl (c/u 1 ppm), C) filtrado de huevo de pato sin enriquecer (OTC y TC-HCl 0 ppm) y D) disolvente (HCl 1 N). Condiciones cromatográficas descritas en materiales y métodos tabla No.1.

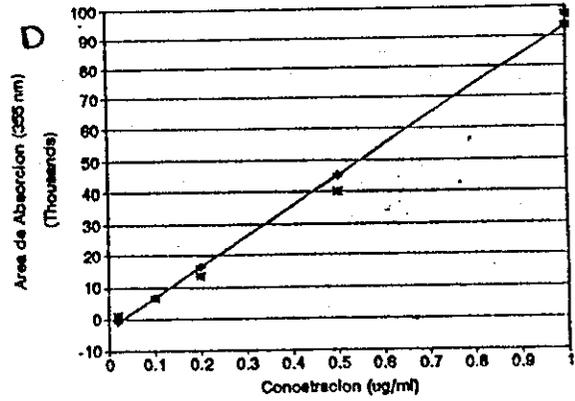
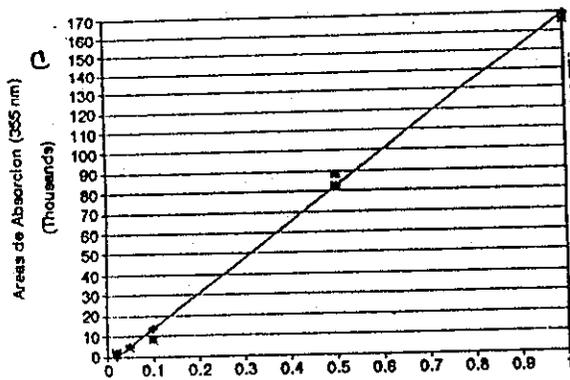
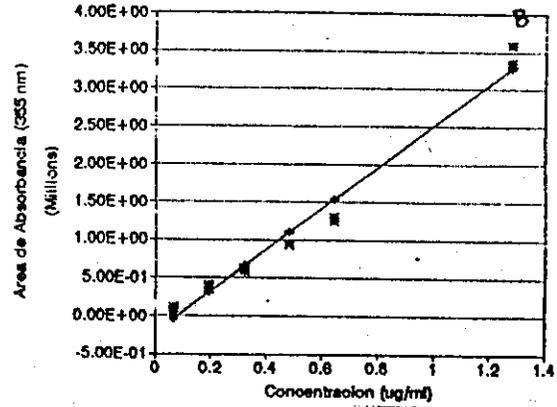
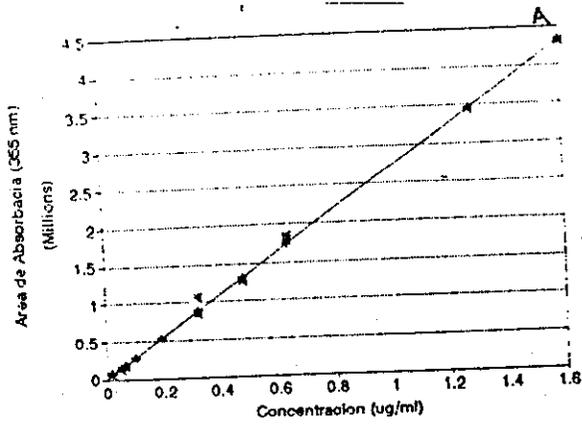
8.1.2. LINEARIDAD

Los análisis de las soluciones patrón de OTC y TC-HCl, en concentraciones que van de 0.02 a 1.6 ppm, así como el e las muestras de huevo enriquecidas con ambos analitos (0.02 a 1.0 ppm) dieron como resultado gráficas que generan líneas rectas con $r \geq 0.98$ ambos casos, las cuales se observan en la gráfica No. 2. Las ecuaciones de regresión lineal se observan en la tabla No. 2

TABLA No. 2

LINEARIDAD DEL METODO DE ANALISIS DE TETRACICLINAS POR HPLC, Y DEL METODO CONJUNTO DE EXTRACCION - ANALISIS DE HPLC

Compuesto/ Muestra	Ecuación de Regresión	Coefficiente de Correlación
Patrón de OTC	$y = 2687178x - 20114$	0.99
Patrón de TC-HCl	$y = 2717075x - 201715$	0.98
Muestra enriquecida con OTC	$y = 172873x - 3758$	0.98
Muestra enriquecida con TC-HCl	$y = 96560x - 2972$	0.98



Gráfica No. 2 : Curvas de calibración para tetraciclinas a partir de soluciones patrón de A) OTC (0.02-1.00 ppm, $r = 0.99$); B) TC-HCl (0.02 - 1.00 ppm, $r = 0.98$) y de soluciones de prueba obtenidas a partir de huevo de patio enriquecidas con : C) OTC (0.02 - 1.00 ppm, $r = 0.99$) y D) TC-HCl (0.02 - 1.00 ppm, $r = 0.98$). Condiciones descritas en materiales y métodos en la tabla No.1

8.1.3. EXACTITUD

El porcentaje de recuperación de las muestras de huevo enriquecidas con concentraciones de 0.02 a 1.00 ppm de OTC y de TC-HCl puede observarse en la tabla No. 3, donde $b = 0.355$ para la OTC, con un porcentaje de recuperación de 35.5, y para la TC-HCl $b = 0.328$ con porcentaje de recuperación de 32.8 (gráfica No.3). El r para ambos análisis es de 0.99.

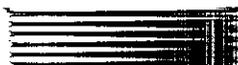
TABLA No.3

PORCENTAJE DE RECUPERACION DE OTC Y TC-HCl EN LA EXTRACCION DE MUESTRAS DE HUEVO ENRIQUECIDAS CON AMBOS ANTIBIOTICOS

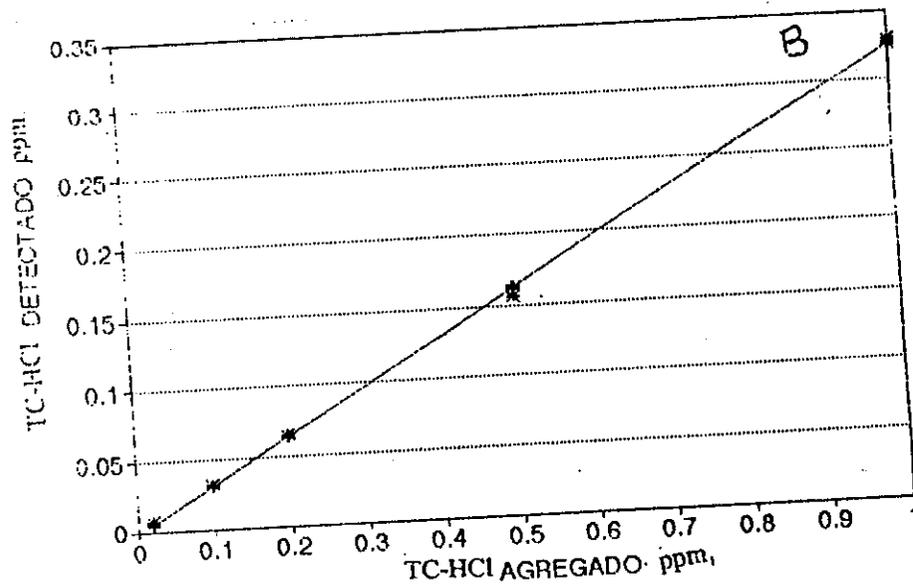
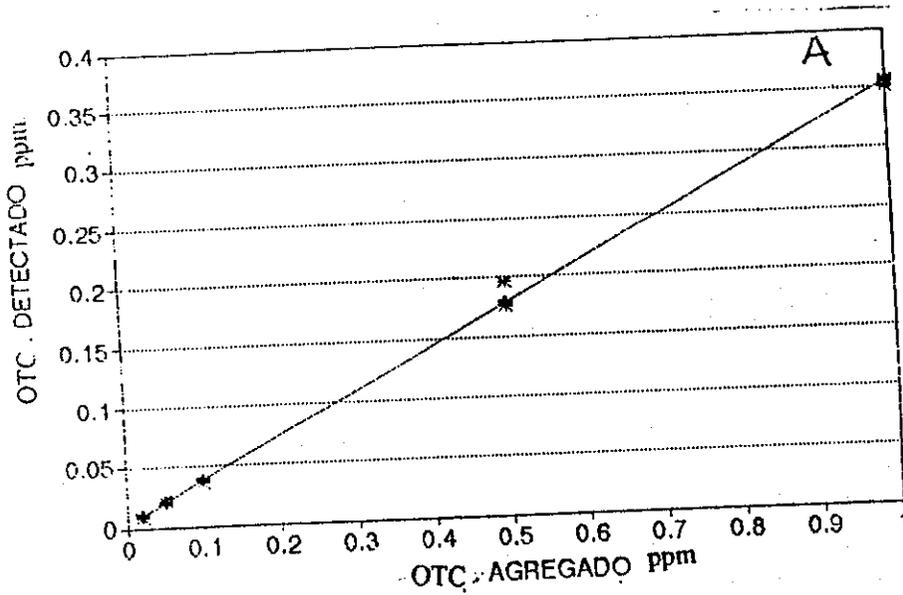
CANTIDAD AGREGADA (ppm)	CANTIDAD DETECTADA		PORCENTAJE DE RECUPERACION	
	OTC	(ppm) TC-HCl	OTC	TC-HCl
0.02	0.0075	---	37.5 %	----
0.02	0.0071	0.0065	35.5 %	32.5 %
0.05	0.0210	---	42.0 %	----
0.10	0.0350	0.321	35.0 %	32.1 %
0.20	---	0.0642	---	32.1 %
0.50	0.1961	0.1545	39.2 %	30.9 %
0.50	0.1762	----	35.2 %	----
1.00	0.3499	0.3256	34.9 %	32.56%
1.00	0.3569	0.3296	35.6 %	32.96 %
			$\bar{X} = 36.862$	$\bar{X} = 32.1867$
			S.D. = 2.558	S.D. = 0.632
			C.V. = 6.940	C.V. = 1.962

\bar{X} = Media, S.D. = Desviación Estandar, C.V. = Coeficiente de Variación

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Biblioteca Central



Grafica No .3 A) Porcentaje de recuperación de OTC en muestra de huevo enriquecida con concentraciones de 0.02 a 1.00 ppm de OTC ($r = 0.99$, pendiente = 0.355) B) Porcentaje de recuperación de TC-HCl en muestra de huevo enriquecida con concentraciones de 0.02 a 1.00 ppm de TC-HCl. ($r = 0.99$, pendiente = 0.328).



8.1.4. LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION

La menor cantidad de cada uno de los analitos agregada a las muestras de huevo de patio libres de antibióticos fue de 0.02 y 0.05 ppm. Las concentraciones de 0.02 ppm fueron detectables pero no cuantificables con exactitud, debido a que por el tamaño y la forma del pico se presentaron problemas de integración, lo que no permitió conocer con exactitud el área de los picos generados por esas cantidades.

Los límites de detección calculados para una razón señal/ruido de 3:1 son de 0.0075 ppm para OTC y de 0.074 ppm para TC-HCl para el análisis a partir de soluciones patrón y de 0.027 ppm para OTC y 0.031 ppm para TC-HCl para el análisis de los extractos obtenidos de las muestras de huevo de patio enriquecidas. Lo anterior puede observarse con mayor detalle en la tabla No. 4

TABLA No. 4

CALCULO DE LOS LIMITES DE DETECCION PARA OTC Y TC-HCl
(SEÑAL DE RUIDO DE 3:1)

COMPUESTO/ MUESTRA	ECUACION LINEAL	LIMITES DE DETECCION
Solución patrón de OTC	$y = 2687178x - 20114$	0.0075 ppm
Solución patrón de TC-HCl	$y = 2717075x - 2017075$	0.0740 ppm
Extracto de muestra enriquecida con OTC	$y = 95048x - 2479$	0.0270 ppm
Extracto de muestra enriquecida con TC-HCl	$y = 96560x - 2976$	0.0310 ppm

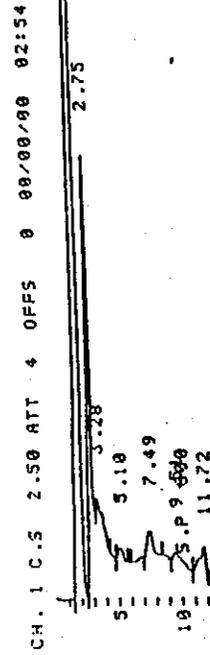
8.2. ANALISIS DE MUESTRAS

En tres muestras de las 96 se detectó antibiótico y se detallan en la tabla No. 5. Sus cromatogramas presentan picos con RT = 5.10 para la muestra No.6 y con RT = 5.12 para la muestra No. 15. Estos RT son comparables a los encontrados en las muestras de huevo enriquecidas con TC-HCl con concentraciones de 0.2 ppm. También la muestra No. 17 presenta un RT = 3.76 que es comparable al obtenido en la muestra de huevo enriquecida con OTC, RT = 3.78.

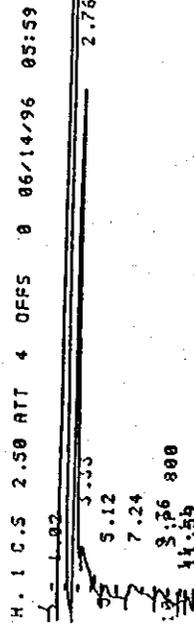
TABLA No.5
MUESTRAS EN LAS QUE SE DETECTO TC-HCl Y OTC EN EL ANALISIS
DE HPLC

Muestra No.	Antibiótico Detectado	Area	Altura	RT
6	Tetraciclina- HCl	6203	234	5.10
15	Tetraciclina- HCl	6290	229	5.12
17	Oxitetraciclina	7533	333	3.76

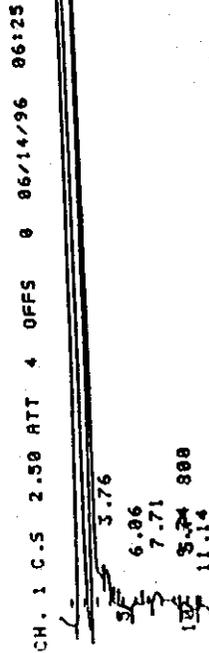
A



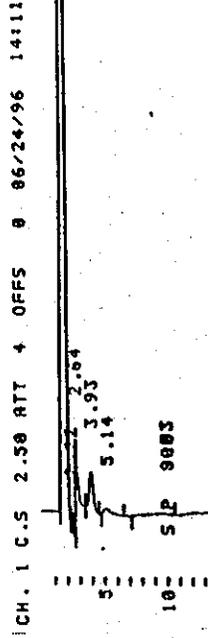
B



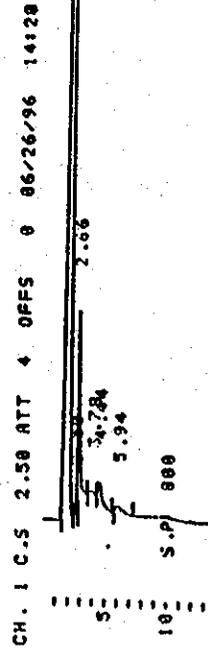
C



D



E



Gráfica No. 5: Detección de residuos de tetraciclina en huevos. Cromatogramas del análisis de filtrado obtenido a partir de las muestras A) Muestra No.6 con RT = 5.10 que pertenece a TC-HCl. B) Muestra No. 15 con RT = 5.12 que pertenece a TC-HCl. C) Muestra No.17 con RT = 3.76 que pertenece a OTC. Como comparación se muestran cromatogramas del análisis de D) Muestra de huevo enriquecida con OTC y TC-HCl a una concentración de 0.2 ppm, con RT = 5.10 que pertenece a TC-HCl y RT = 3.93 que pertenece a OTC. E) Muestra enriquecida con OTC y TC-HCl de concentración de 0.05 ppm con RT = 3.78 que pertenece a OTC y RT = 4.44 que pertenece a TC-HCl.

DISCUSION DE RESULTADOS

Para la determinación de residuos de tetraciclina en esta investigación se adaptaron dos métodos descritos previamente: El de Onji; et al [20] y el de Fletouris; et al [9]. Para la extracción del antibiótico se empleo el método de Onji et al, desarrollado para medir residuos de tetraciclina en carne y pescado por medio de cromatografía líquida. En este método se extraen los residuos de tetraciclinas por homogenizado de 20g de muestra, con 150 mL de HCl 1N. Después de su centrifugación, el sobrenadante se filtra a través de una columna de celite 545. El filtrado se aplica a una columna de Amberlita XAD-2, y esta se eluye con 100 mL de etanol. Finalmente la solución metanólica se concentra hasta un volumen de 2 mL. Al emplear este método se le hicieron modificaciones en algunos aspectos para adaptarlo al análisis de los huevos, una de ellas fue aumentar el peso de la muestra a 40 g con el fin de obtener una mayor cantidad de residuos, en el caso de estar estos presentes. También se modificó a 50 mL el volumen de metanol para eluir la columna de Amberlita, porque se observó que los picos de los cromatogramas no tenían variación en su forma y estos resultaban mayores. No se llevó a cabo la concentración del eluido metanólico, puesto que en pruebas piloto y con los recursos disponibles, ésta resultaba demasiado prolongada (> de 5 horas), lo que puede causar pérdidas de los residuos. Las condiciones cromatográficas fueron seleccionados del método de Fletouris et al, que describe el análisis de trazas de TC y OTC en leche por HPLC. Se modificó el volumen de inyección de la muestra aumentandose de 20 a 200 μ L para obtener picos más grandes.

Para la OTC, el porcentaje de recuperación del método conjunto extracción-HPLC fue de 34.5 % y para la TC- HCl de 32.8%. A pesar de que este es un porcentaje bajo, el coeficiente de variación no excedió el 6.9% y el 1.9% par OTC y TC- HCl, respectivamente. Los bajos porcentajes de recuperación pueden deberse a pérdidas durante el proceso de extracción, retención por la columna de Amberlita XAD-2 y degradación de los residuos a pH menor de 2 [22].

La Oxitetraciclina en medio ácido, metaboliza a apoterramicina según el proceso descrito por Sporns et al [24]. Las muestras al ser extraídas con HCl 1 N, pudieron haber sufrido pérdida en su potencia o

descomponerse a otros metabolitos como el mencionado anteriormente, por lo que ya no fueron detectadas cromatográficamente con el método validado. La TC-HCl y la OTC se descomponen a temperaturas superiores a los 180° C y se oscurecen con la exposición de la luz solar fuerte o a temperaturas de 90° C en una atmósfera húmeda [22], y no muestran ningún cambio aunque sean expuestas por 4 días consecutivos a 100 ° C [23].

El límite de detección del método desarrollado es menor (mayor sensibilidad) que los métodos microbiológicos descritos previamente. La sensibilidad de un método microbiológico para la OTC en albúmina de huevo es de 0.07 ppm y de 0.20 ppm en la yema. Para la TC-HCl en albúmina de huevo es de 0.07 y de 0.15 ppm en la yema, mientras que en el método de HPLC descrito en este trabajo presentó límites de detección de 0.027 y 0.031 ppm, para OTC y TC-HCl, respectivamente, para huevos homogenizados [7,8].

En tres de las 96 muestras analizadas fue detectada oxitetraciclina y tetraciclina-HCl. No se reporta la concentración en que se encuentran por las siguientes razones :

Primero, las muestras desconocidas de No. 6 y 15 muestran picos con RT= a 5.10 y 5.12 respectivamente, los que aparentemente corresponden al pico obtenido para tetraciclina-HCl. luego de la extracción y del análisis cromatográfico de la muestra de huevo enriquecida con 0.2 ppm de tetraciclina-HCl, la cual presentó un RT = 5.14. La muestra desconocida No. 17 muestra un pico con RT = 3.76 que aparentemente es correspondiente a la OTC.

Aunque se obtuvieron datos de área en los cromatogramas de las tres muestras que detectaron ambos antibióticos, no se reporta ninguna concentración del antibiótico presente, puesto que estas áreas están por debajo del límite de cuantificación de OTC y TC-HCl, 0.05 ppm, para cada una de las tetraciclinas.

La consecuencia de la ingesta de huevos con residuos de tetraciclina es la formación de cepas resistentes al antibiótico, los microorganismos que se hicieron resistentes a una tetraciclina exhiben a menudo resistencia a las otras [14]. La distribución de las tetraciclinas es mayor que la del agua corporal. Se unen a las proteínas plasmáticas en un grado variable. Pueden estar presentes en la sangre durante

largo tiempo después de su suspensión [14].

Si hay ingesta de huevos con residuos de tetraciclinas y estos son expuestos a temperaturas aproximadas a los 100°C por un período de tiempo de 1 a 10 minutos, estos antibióticos no son descompuestos por lo que su potencia no muestra una variación significativa. Las dosis usuales de tetraciclina en un adulto son de 1000 a 2000 mg (1 a 2 g) diarios para los adultos y para niños mayores de 8 años deben recibir 25 a 50 mg/kg/día en 2 a 4 dosis divididas. Si una persona come de 1 a 2 huevos diarios y el peso de cada huevo oscila entre 35 a 65 g significa que la persona podría estar ingiriendo entre 0.7 a 6.5 ug (7×10^{-4} - 6.5×10^{-3} mg), es una cantidad poco muy poco significativa.

En Guatemala no se ha establecido ningún parámetro específico para la tetraciclina residual presente en huevos de gallina. Tampoco se encontraron suficientes estudios para determinar un límite permitido de estos antibióticos en los huevos de gallina provenientes de granjas avícolas.

10. CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de residuos de **oxitetraciclina**, en 1.04% de los 96 huevos de gallina analizados, y de **tetraciclina** en 2.1% de los 96 huevos de gallina analizados, en concentraciones de 0.02 a 0.05 ppm
2. Se planteó un método alternativo para el análisis de residuos de tetraciclinas en huevos de gallina por medio de extracción con HCl 1 N, cromatografía con Amberlita XAD-2 y de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual es confiable y válido para este análisis.
3. En la validación del método desarrollado para el análisis de residuos de tetraciclinas, en huevos de gallina, se obtuvieron valores aceptables de linealidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación .

11. RECOMENDACIONES

1. Que se realicen estudios para establecer un límite permitido de tetraciclinas en huevos de gallina, ya que actualmente en Guatemala no se reportan estos datos.
2. Que el gobierno establezca un control de calidad periódico en los alimentos, como el huevo de gallina, donde se incluya la detección de tetraciclinas y de otros medicamentos que son utilizados frecuentemente con fines terapéuticos y como promotores del crecimiento en animales.
3. Que las organizaciones gubernamentales correspondientes ejerzan un estricto control sobre el uso de medicamentos en animales, así como de la venta de los mismos.

12. REFERENCIAS

1. Goodman Jw, Tudor C. **Industria avícola ; Explotación en grande y pequeña escala** . Ramón Palazón, trad. México: Herrero Hermanos Sucesores, 1965. (p. 463- 465).
2. Haeresing W, Cole DJA. **Recent Avances in Animal Nutrition** . London: University of Nottigham, School of Agriculture, 1989. 295 p. (p. 13-25).
3. Gómez J, Ocampo L. **Terapéutica Avícola**. México : Talleres de Mendoza e Hijos, 1987. (p. 44, 84-90).
4. Perla F. **Determinación de Clortetraciclina en huevos de consumo en la ciudad de Guatemala**. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Veterinaria y Zootecnia) 1969. 55p.
5. Agasoster T. **Automadet Determination of Oxitetracycline Residues in Muscle, Liver, Milk and Egg by On-Line Dialysis And Post-Column Reaction Detection HPLC**. Food-Addit-Contam. 1992; 9: 615-622.
6. Farrel FJ. **HPLC in The Analytical Service Laboratory**. Food Tech. Abril 1984: 81-84.

7. Roudaut B, Moretain JP, Boisseau J. **Excretion of Oxitetracycline in Eggs After Medication of Laying Hens.** Food-Addit-Contam. 1987; 4 No. 3 : 297- 307.
8. Roudaut B, Moretain JP, Bisseau J. **Excretion of Tetracycline And Chlortetracycline in Eggs After Oral Medication of Laying Hens.** Food-Addit-Contam. 1989; 6 No. 1 : 71- 78.
9. Fletouris DJ, Psomas JE, Botsoglou NA. **Trace Analysis of Oxitetracycline and Tetracycline in Milk by High Performance Liquid Chromatography.** J. Agric. Food Chem. 1990; 38: 1913- 1917.
10. Garcia J. et al. **Determinación de Residuos de Antibióticos como Contaminantes en Productos Pecuarios de Consumo Humano.** Bioquímica. 1996 21 : 3 (p. 535- 537).
11. Meyer-Jones L. **Farmacología Terapéutica Veterinaria.** México: Hispanoamericana. 1975. (p. 339- 445).
12. Soto M. **Farmacología Aplicada a La Terapéutica.** 6a. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1954. (p. 769- 770).
13. Blood DC. Et al. **Medicina Veterinaria.** 6a ed. Culchero F. Trad, México: Interamericana. 1987. (p. 140 - 141).

14. Goodman Y Gilman A. et al. **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. 8a. ed. México: Medica Panamericana, 1991. 1751p. (p. 1085).
15. **Food And Drug Administration**. Residues in Meats. U. S. A. April, 1994.
16. Furia TE. ed. **Handbook of Food Additives**. 2ed. Ed. U.S.A. CRC. 1975. (166-167).
17. COGUANOR NGO 34 170. **Concentrados para Animales. Alimentos para Aves. especificaciones**. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), Ministerio de Economía, Guatemala, C.A. 1988. 15p. (p. 1.6).
18. Morawski J. **Analysis of Dairy Products by HPLC**. Food Tech. 1984: April, report 2: (p. 70-79).
19. United States Pharmacopeia. XXII ed. The United States Pharmacopeia. 1990.
20. Onji, Y., M. Uno and K. Tanigawa. **Liquid Chromatographic Determination of Tetracycline Residues in Meat and Fish**. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 [6]: 1135- 1136.
21. Skoog DA, West DM. **Análisis Instrumental**. 2a. ed. México: McGraw-Hill/ Interamericana, 1989. XIII + 806p. (p. 721- 728).

22. **Información de Medicamentos.** Tomo II. Ministerio de Sanidad y Consumo. Ediciones Informatizadas, S.A. Madrid 1989. (p. 1403, 2434).
23. Berkow R. ed. **The Merck Manual of Diagnosis and Therapy.** 18th. Ed. U.S.A. : Merck Sharp & Dohme Research Laboratories. 1982: (p. 2314- 2316).
24. Sporns P, Kwan S, Roth LA. **HPLC Analysis of Oxitetracycline Residues in Honey.** Journal of Food Protection, vol 49. No. 5. Canada.. May 1986. (p. 383- 387).
25. Willard H, et al. **Métodos Instrumentales de Análisis.** Belmont, California: Iberoamérica, 1991. (p. 569, 581-582).

13. ANEXOS

13.1 DOSIS PARA AVES Y VIAS DE ADMINISTRACION

La administración oral se da en el alimento en una dosis de 100 a 400 ppm durante 5 a 10 días. También en el agua de bebida con dosis de 100 a 200 ppm durante 5 a 10 días, para ambos casos deberá tenerse precaución con el contenido de calcio en la dieta.

La inyección puede ser intramuscular o subcutánea con dosis de 50 a 100 mg/kg de p.v. [3].

13.2 DESCRIPCION DE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTO

RENDIMIENTO (HPLC).

Esta cromatografía no esta limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra. El HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos una variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro es disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa.

El HPLC ofrece una mayor variedad de fases estacionarias lo que permite una mayor gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. La recuperación de la muestra es facil. Las fracciones separadas se colectan en un recipiente al final de la columna y usualmente es cuantitativo excepto en la absorción irreversible en la columna [25].

13.2.1 COMPONENTES DEL EQUIPO PARA LA CROMATOGRAFIA

LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Contiene uno o más reservorios de vidrio o acero inoxidable con capacidad para uno o más litros de disolvente. Esto para extraer gases disueltos como oxígeno y nitrógeno que interfiere en la formación de burbujas en la columna y en el sistema de detección, esto causa ensanchamiento de las bandas e interfiere en el funcionamiento del detector. Consiste en un sistema de bomba de vacío, un sistema de destilación o un dispositivo para calentar y agitar el disolvente.

Las bombas tienen salidas de por lo menos 70 kg/cm² y preferiblemente de 280 a 420 kg/cm² con velocidad de flujo de por lo menos 3 mL / min que debe mantenerse constante dentro del 2% más o menos.

Las precolumnas contienen un empaque químicamente igual al de la columna analítica. El tamaño de la partícula es mucho mayor y su finalidad es retirar las impurezas del disolvente para evitar la contaminación de la columna analítica. También satura la fase móvil con el líquido que conforma la fase estacionaria, que evita la eliminación de la fase estacionaria del empaque de la columna analítica.

Para el sistema de inyección de muestra en la cromatografía líquida de alta resolución se utilizan a menudo válvulas giratorias. La muestra se coloca en la válvula por medio de una jeringa y un tabique obturador de silicona, neopreno o teflón. También se puede colocar la muestra deteniendo momentáneamente el flujo a través de la columna, en la parte superior de ella.

Las columnas se fabrican con tubos de vidrio de pared gruesa o acero inoxidable de calibre muy preciso. Tiene una longitud típica de 15 a 150 cm, con un diámetro interno

de 2 a 3 mm y las más largas poseen hasta un metro o más. El empaque más común es el gel de sílice finamente dividido. En algunas ocasiones se utiliza alúmina y celite con un tamaño uniforme de partícula de 5 a 10 μm . También hay unas partículas llamadas peliculares que consisten en pequeñas esferitas de vidrio con diámetro de 40 μm , cubiertas con una capa de 1 a 2 μm de material poroso como gel de sílice, alúmina o resina de intercambio iónico.

La temperatura en la cromatografía líquida de alta resolución es en la mayoría de los casos ambiental y sin termostatación.

El detector para la cromatografía líquida de alta resolución es adaptado y entre los más comunes son los que se basan en la absorción de la radiación ultravioleta y visible. El que se usará en esta investigación es ultravioleta de tipo selectivo.

13.3 ACTIVACION DE LA AMBERLITA XAD-2

La Amberlita XAD-2 es un adsorbente polimérico no iónico. Se coloca aproximadamente 100 mL de amberlita en un beaker de 300 mL, se le agrega acetona hasta 200 mL, se mezcla con un agitador de vidrio y se deja reposar por varios minutos. Se decanta la acetona y se le agrega metanol hasta 200 mL, se mezcla con el agitador de vidrio, se deja reposar por varios minutos, se decanta el metanol y se añade agua destilada hasta 200 mL. Se mezcla con el agitador de vidrio, se deja reposar por varios minutos y se decanta el agua. De esta manera queda activada, se le añade metanol para mantenerla húmeda, activada y lista para ser usada.

13.4. FICHA DE RECOLECCION DE MUESTRAS

TESIS**DETERMINACION DE RESIDUOS DE TETRACICLINA EN HUEVOS
DE GALLINA POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE
ALTA RESOLUCION (HPLC)****DATOS**

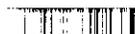
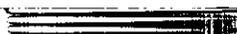
Número de Lote: _____

Número de Muestra: _____

Fecha: _____

Lugar: _____

Hora: _____



13.5. VALIDACION DEL METODO

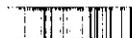
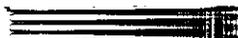
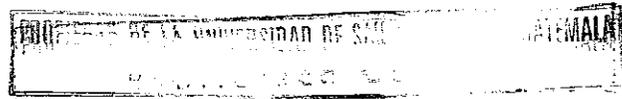
Es un proceso por el cual estudios de laboratorio establecen que las características de ejecución del método, que se expresan en términos de parámetros analíticos, cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas propuestas. Entre estos parámetros está la Linearidad y Rango, el Límite de detección, la Exactitud, el Límite de Cuantificación, la Precisión y la Especificidad.

13.5.1. LINEARIDAD Y RANGO

Definición: La linearidad de un método analítico es la habilidad de producir resultados de pruebas que son directamente, o que son proporcionales a la concentración de analito en muestra dentro de un rango dado. Generalmente se expresa en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la línea de regresión, calculada de acuerdo a una relación matemática establecida de los resultados de las pruebas obtenidos del análisis de las muestras con concentraciones variables del analito.

Definición: El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles más altos y más bajos del analito (incluyendo esos niveles) que ha sido demostrado que pueden ser determinados con precisión, exactitud y linearidad, usando el método según fue escrito. El rango se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de prueba (porcentaje, partes por millón) obtenidos por el método analítico.

Determinación: La linearidad de un método analítico se determina por el tratamiento matemático de los resultados de las pruebas obtenidos por el análisis de muestras con concentraciones del analito que cruzan el rango atribuido al método. Es el cálculo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados de los resultados de las



pruebas versus las concentraciones del analito. La pendiente de la línea de regresión y su varianza proveen una medida matemática de linealidad.

El rango del método se valida verificando que el método analítico de una precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen analito a los extremos del rango, así como dentro del rango.

13.5.2. LIMITE DE DETECCION

Definición: Es un parámetro del límite de los ensayos. Es la menor concentración del analito de una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo ciertas condiciones experimentales dadas. Usualmente se expresa como la concentración del analito (en partes por millón, porcentaje) en la muestra.

Determinación: De un método analítico varía dependiendo si es un procedimiento instrumental o no instrumental. Algunos investigadores determinan la razón de señal de ruido comparando los resultados de las pruebas de las muestras con concentraciones conocidas del analito con las muestras blanco y establecen un nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado. Se acepta una razón de señal de ruido de 2: 1 ó 3: 1.

En métodos no instrumentales, este límite por lo general se determina analizando las muestras con concentraciones conocidas del analito, y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado.

13.5.3. EXACTITUD

Definición: La exactitud de un método analítico es la proximidad de los resultados obtenidos por el método a los valores reales. La exactitud casi siempre es expresada

como el porcentaje de recuperación del ensayo cantidades conocidas del analito que fueron añadidas. La exactitud es una medida de la certeza del método analítico.

Determinación : Puede ser determinada al aplicar ese método a mezclas de excipientes a las que han sido añadidas cantidades conocidas del analito, tanto arriba como abajo de los niveles normales esperados en las muestras. La exactitud se calcula de los resultados de las pruebas como el porcentaje de analito recuperado del ensayo.

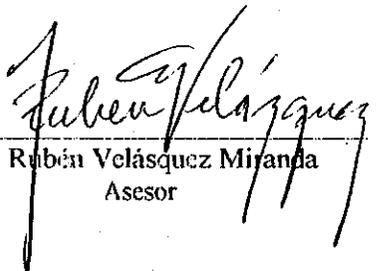
13.5.4. LIMITE DE CUANTIFICACION

Definición : Es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones experimentales dadas. El límite de cuantificación se expresa como la concentración de analito (porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Determinación: Varía dependiendo si el método es experimental o no instrumental. Para procedimientos instrumentales se mide la magnitud de la respuesta analítica del último término, analizando un número de muestras blanco y calculando la desviación estándar de esta respuesta. La desviación estándar multiplicada por un factor, usualmente 10, da un estimado límite de cuantificación. Este límite subsecuentemente se valida por medio del análisis de un determinado número de muestras conocidas cercanas o preparadas en el límite de cuantificación.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina generalmente por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo un nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado con precisión y exactitud aceptables.


Ruth Adelaída Trujillo Girón
Autora


Dr. Rubén Velásquez Miranda
Asesor


Licda. Beatriz Batres de Jimenez
Directora


Lic. Jorge Rodolfo Perez Fogar
Decano