

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON
DETECTOR DE ULTRAVIOLETA, PARA LA DETERMINACIÓN DE
DOS TETRACICLINAS EN LECHE FRESCA DE VACA**

Informe Final de Tesis

Presentado por:

ANA MARY RODRÍGUEZ MONDAL

Para optar al título de:

QUÍMICO BIÓLOGO

Guatemala, octubre del 2003

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	7
III. ANTECEDENTES	
A. Mastitis	9
B. Tetraciclinas	12
C. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	15
D. Implementación, validación y calibración del método por HPLC	25
E. Importancia del consumo de alimentos sanos para la salud	30
IV. JUSTIFICACIÓN	39
V. OBJETIVOS	40
VI. HIPÓTESIS	41
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
A. Universo de trabajo	42
B. Muestra	42
C. Recursos	42

D.	Procedimiento	44
E.	Diseño de investigación	56
VIII.	RESULTADOS	60
A.	Optimización de condiciones cromatográficas	60
B.	Optimización de condiciones del método	64
C.	Determinación de parámetros de validación	67
D.	Análisis de costos	73
IX.	DISCUSIÓN	74
X.	CONCLUSIONES	77
XI.	RECOMENDACIONES	78
XII.	REFERENCIAS	79
XIII.	ANEXOS	
	Anexo No. 1: Preparación de mini-columna de resina Metal quelada	83
	Anexo No. 2: Acondicionamiento de mini-columna y extracción de la muestra (mini-columna SPE Octadecyl C ₁₈)	84
	Anexo No. 3: Extracción de la muestra método 2	85
	Anexo No. 4: Determinación en el cromatógrafo	86
	Anexo No. 5: Gradiente de fase móvil	87

Anexo No. 6: Tablas de resultados de tiempos de retención para las tetraciclinas	88
Anexo No. 7: Tablas de resultados para la optimización de las condiciones cromatográficas	89
Anexo No. 8: Tablas de resultados para la optimización de las condiciones del método de extracción	91
Anexo No. 9: Tablas de resultados para la determinación de parámetros de validación del método	93
Anexo No. 10: Tabla de resultados de porcentajes de recuperación	96

I. RESUMEN

La leche es uno de los alimentos básicos para la nutrición tanto para niños como para adultos por lo que es importante que la misma sea totalmente sana y no produzca ningún efecto secundario. Los residuos de tetraciclina son uno de los analitos que pueden estar presentes en la leche debido a su uso indiscriminado en la ganadería.

El análisis de tetraciclinas en diferentes alimentos está empezando a adquirir importancia en el país debido a las exigencias mundiales de alimentos sanos y de mejor calidad. En Guatemala muy pocos laboratorios cuentan con las metodologías y experiencia adecuadas para llevar a cabo este tipo de análisis de una manera confiable. Con esto en mente se realizó este trabajo para implementar y validar una metodología de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector ultravioleta para la determinación de dos tetraciclinas en leche fresca de vaca.

Para su elaboración se requirió de patrones de oxitetraciclina y tetraciclina, los cuales se analizaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa y detector ultravioleta (355nm) usando de referencia un método de la AOAC para el análisis simultáneo de residuos de tetraciclinas en leche fresca de vaca. Se buscaron las mejores condiciones cromatográficas para que las tetraciclinas eluyeran en tiempos de retención diferentes y se presentaran en picos separados y definidos. La fase móvil con la que se logró la mejor separación fue 70% de solvente A, 22% de acetonitrilo y 8% de metanol a una temperatura de 20-25°C. El método óptimo de trabajo fue el método 1 utilizando una columna comercial desechable de Octadecyl.

Una vez obtenidas las mejores condiciones cromatográficas y el óptimo método para trabajar la muestra, se procedió a la determinación de los parámetros de validación del método los cuales fueron: precisión, exactitud, linealidad,

sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad. Para obtener los parámetros de validación se prepararon mezclas patrón de las dos tetraciclinas, las que tenían concentraciones que variaron entre 150ng/ml y 20ng/ml y se elaboró un plan piloto de 5 muestras de leche fresca de vaca fortificada con concentraciones de oxitetraciclina y tetraciclina que variaron entre 60ng/ml y 15ng/ml. Estas muestras se inyectaron en el HPLC por duplicado, se obtuvieron los cromatogramas, de los cuales se utilizaron las alturas de los picos correspondientes a cada tetraciclina. Con estos valores se calcularon los parámetros de validación. Las determinaciones se realizaron en forma repetitiva durante el mismo día y en diferentes días.

En base a los resultados se puede indicar que el método implementado es lineal ya que los coeficientes de correlación son cercanos a uno y con confiabilidad del 95%. Es sensible debido a que las pendientes muestran valores pequeños. Es robusto ya que acepta pequeños cambios en las condiciones del método. Además, es selectivo y específico ya que los blancos y controles negativos no presentan picos en el tiempo en donde eluyen las tetraciclinas. En lo que se refiere a la precisión y repetibilidad los resultados no son los aceptados para la validación pero se encuentran muy cercanos a ellos. La exactitud y la reproducibilidad varían un poco más de lo aceptado y el error aumenta conforme disminuye la concentración del analito; pero debido a que posee una buena linealidad, precisión y repetibilidad bastante aceptables se puede utilizar factores de corrección: 1.8 para oxitetraciclina y 1.5 para tetraciclina. El límite de detección se encuentra en 15ng/ml y el de cuantificación en 20ng/ml (0.02ppm).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método implementado en este trabajo es bastante confiable para realizar el análisis de tetraciclinas en leche, ya que se obtiene una separación adecuada y casi todos los parámetros de validación son aceptables.

II. INTRODUCCIÓN

La mastitis subclínica bovina es la infección de la glándula mamaria que más afecta a los hatos lecheros, produciéndose una enfermedad crónica con cambios patológicos irreversibles, con la consiguiente pérdida de la producción y calidad de la leche, necesidad de reemplazar las vacas enfermas, decomiso de la leche proveniente de ubres que han recibido tratamiento antibiótico, gastos debido al tratamiento veterinario y aumento de las horas de trabajo (9,11).

Es importante, entonces, controlar la mastitis, sobre todo teniendo en cuenta que el sector de leche cruda constituye el mayor sistema de canalización de la leche en Guatemala, siendo tanto una fuente grande de nutrición y de actividad económica como de problemas potenciales para la salud humana.

Estudios realizados en Guatemala acerca de los diferentes casos de mastitis indican las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (9).

Las tetraciclinas están siendo uno de los antibióticos de amplio espectro de elección para el tratamiento de mastitis. Debido a que la mayoría de bacterias causantes de esta enfermedad presentan gran resistencia a las penicilinas, se emplea el grupo de las tetraciclinas como segunda opción más efectiva y económica.

El uso excesivo e indiscriminado de las tetraciclinas en la ganadería puede desarrollar serios problemas de resistencia a las mismas a través de los alimentos para las personas. La leche es uno de los alimentos básicos para la nutrición tanto de niños como de adultos por lo que es importante que la misma sea totalmente sana y no produzca efectos secundarios dañinos. La presencia de residuos de antibióticos en la leche puede producir resistencia a los mismos. Además un porcentaje de la población es hipersensible a antibióticos, por lo que la presencia de residuos de los mismos puede producir un shock anafiláctico y hasta la muerte.

Se han utilizado numerosas pruebas indirectas para el análisis de tetraciclinas en la leche, como la inhibición del crecimiento bacteriano, ELISA, etc. Estas pruebas son sensibles pero no específicas, ya que no diferencian los

diversos tipos de antibióticos. Las pruebas microbiológicas pueden dar resultados falsos positivos causados por las sustancias inhibitorias naturales presentes en la leche. Un método directo, automatizado y que posee una gran sensibilidad y especificidad en la actualidad es por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que identifica y cuantifica los residuos de antibióticos presentes en la leche (6).

Debido a que los alimentos, y sobre todo la leche, no deben tener residuos de antibióticos y la importancia que tiene la determinación de los mismos tanto en el campo de la salud como en el económico, el trabajo de tesis tiene como fin la implementación y validación de un método de HPLC con detector de ultravioleta para la determinación de dos de las tetraciclinas más utilizadas (oxitetraciclina y tetraciclina) para tratar mastitis y varias otras enfermedades en el ganado lechero. Para llevar a cabo el proyecto se analizarán 5 muestras de leche fresca utilizada como materia prima en una lechería guatemalteca.

La metodología implementada y validada en este trabajo de tesis podrá ser transferido a otros laboratorios de análisis y ser aplicado en forma rutinaria.

III. ANTECEDENTES

A. Mastitis

1. Generalidades

El término mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria, sea cual sea su causa. Los efectos de la mastitis se caracterizan por alteraciones físicas, químicas y, casi siempre, bacteriológicas de la leche. Una gran proporción de glándulas con mastitis no se identifican fácilmente por palpación ni por exámenes visuales (9,10).

En términos de pérdidas económicas, la mastitis bovina es, sin duda, la enfermedad más importante con la cual se enfrenta la industria lechera, debido a que representa disminución en la producción de leche, alteración de la calidad, necesidad de reemplazar las vacas enfermas, decomiso de la leche proveniente de ubres que han recibido tratamiento antibiótico, gastos debido al tratamiento veterinario, aumento de las horas de trabajo, etc (9,11).

Entre las diferentes clases de mastitis, la más importante y frecuente es la mastitis subclínica (12). Se caracteriza por su naturaleza inaparente, no se distinguen signos externos de enfermedad, la vaca se presenta normal en su comportamiento, la ubre se observa sin signos de anormalidad y la leche que se ordeña se aprecia aparentemente normal a pesar de que el examen de laboratorio comprueba que está afectada con bacterias patógenas (12,13). Los tejidos productores de leche son atacados por las bacterias, produciendo una enfermedad crónica con cambios patológicos irreversibles, con la consiguiente pérdida en la producción y calidad de la leche (9,14).

2. Etiología

En la literatura sobre la mastitis se mencionan diferentes tipos de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, algas y virus.

Estudios realizados en Guatemala sobre los diferentes casos de mastitis indican las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia, entre las que se pueden mencionar en orden de importancia, las siguientes: *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus uberis*, Coliformes fecales, *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp, *Micrococcus*, *E. coli*, *Salmonella* spp y *Enterococcus* spp. (9). Las bacterias más contagiosas y comunes en los tejidos de la glándula mamaria son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (2,15,16).

Las características que hace al agente más o menos eficaz para desarrollar una mastitis son: resistencia al medio ambiente, los procedimientos de limpieza y desinfección, resistencia a antibióticos, invasibilidad e infecciosidad. Estas características les permiten aprovechar medios nutritivos en los tejidos, sangre o leche y colonizar rápidamente la ubre formando focos de infección (17).

3. Tratamiento

A través del tratamiento antibiótico se puede eliminar la infección causada por los diversos agentes etiológicos. Para poder aprovechar en su totalidad el potencial de tratamiento, éste debe ser adecuado al tipo específico de infección de la ubre (17). Teniendo en cuenta que uno de los problemas más importantes es la variación en la respuesta al tratamiento, se recomienda la identificación bacteriológica y, de ser posible, la sensibilidad a diferentes antibióticos frente al microorganismo causal aislado(18).

La industria farmacéutica veterinaria ofrece varios productos contra la mastitis, encontrándose entre ellos: penicilina, estreptomycin, bacitracina, neomicina, polimixina B, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, sulfonamidas y novobiocina(9). Cuando se realiza la sensibilidad antibiótica in vitro, se presenta el problema de que algunas casas que distribuyen estos productos no cuentan con los discos de sensibilidad adecuados para el uso en medicina veterinaria y, en general, se emplean los utilizados en medicina humana. De ahí que, a pesar de realizar la sensibilidad, ésta no sea de gran utilidad, por lo que, al realizar la terapia, se prescribe cualquier tipo de antibiótico y/o en dosis inadecuadas, lo cual aumenta la resistencia a los antibióticos y repercute en la salud pública al convertirse las personas en los consumidores de los subproductos de animales tratados en esta forma (3,9,10).

Los antibióticos suelen aplicarse solos o asociados entre sí, para buscar sinergismo (efecto aditivo bactericida), o bien con coadyuvantes (corticosteroides, enzimas proteolíticas, antihistamínicos, vitaminas) que favorecen la penetración de los antibióticos y mejor recuperación de los tejidos afectados. Se han clasificado en dos grupos a los antibióticos, tomando en cuenta el sinergismo y el antagonismo entre ellos:

Grupo 1: penicilina, esteptomicina, bacitracina, neomicina y polimixinas.

Grupo 2: tetraciclinas, cloramfenicol, eritromicina, novobiocina y sulfonamidas.

Cada grupo logra un mayor efecto con la combinación entre sus componentes, pero los miembros del segundo grupo son antagonistas del primero, es decir, ellos contrarrestan los efectos antibacterianos de los antibióticos del primer grupo. No siempre se ha tomado en cuenta la clasificación anteriormente mencionada en la elaboración de productos para combatir la mastitis lo que ha ayudado a incrementar la resistencia bacteriana, dando al final un tratamiento ineficaz e insuficiente (10,19).

Una terapia profiláctica muy utilizada en la actualidad contra la mastitis es aplicar tratamiento antibiótico a todas las vacas al final de cada lactancia, incluyendo a las vacas sanas, lo que trae un aumento de cepas de microorganismos resistentes (20).

Como es de esperarse, después de tanto tiempo de utilizar los mismos antibióticos, se ha incrementado la resistencia bacteriana, han aumentado el número de microorganismos fármaco resistentes, la población bacteriana en el ambiente no se ha reducido (18), así como también han progresado las afecciones mastíticas causadas por *Staphylococcus*, principalmente productores de penicilinas, es decir, penicilino resistentes (15). Según estudios realizados en años anteriores, los antibióticos hacia los que se observa mayor resistencia son: penicilina, dicloxacina y estreptomicina; por lo que se busca la acción de otros antibióticos de amplio espectro que den mejores resultados, entre los que se encuentran las tetraciclinas y el cloramfenicol (4,10).

B. Tetraciclinas

1. Generalidades

La obtención de las tetraciclinas fue el resultado de la búsqueda sistemática en muestras de tierra obtenida de diversas partes del mundo, para detectar microorganismos que produjeran antibióticos. El primero de estos compuestos, la clortetraciclina, se introdujo en clínica en 1948 (21). Las tetraciclinas constituyen un grupo de fármacos con una estructura común de 4 anillos, de ahí su nombre (4).

La clortetraciclina y oxitetraciclina se obtienen mediante la modificación química de sustancias producidas por el *Streptomyces aurefaciens* y *rimosus* respectivamente. La tetraciclina se produce en forma sintética a partir de la clortetraciclina. Son antibióticos de amplio espectro y su efecto es, principalmente, bacteriostático; afecta la síntesis proteínica del microorganismo infeccioso deteniendo su crecimiento y reproducción (21,22).

Las tetraciclinas se absorben fácilmente en el estómago y porciones proximales del intestino delgado, se distribuyen bien por todos los tejidos y líquidos del organismo y se difunden a través de la barrera placentaria y las meninges no inflamadas (22,23).

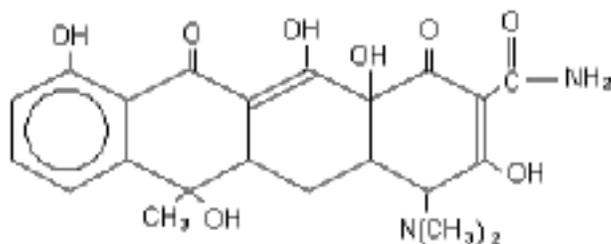
Las tetraciclinas se conocen como antibióticos de amplio espectro debido a sus efectos sobre infecciones causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas aerobias y anaerobias, micoplasma, clamidias y varias rickettsias (21).

En contraste con el gran beneficio proporcionado por las tetraciclinas, las grandes cantidades de tetraciclinas utilizadas han contribuido al importante aumento del número de microorganismos resistentes. Esto proviene no sólo del uso de las tetraciclinas en la práctica médica, sino también de la inclusión de las tetraciclinas en los alimentos para animales con el propósito de promover su crecimiento (4).

2. Tetraciclina

Es un polvo cristalino inodoro de color amarillo; estable al aire, pero la exposición a luz solar intensa hace que se oscurezca; su potencia se compromete en soluciones de pH inferior a 2 y es rápidamente destruida por las soluciones de hidróxidos alcalinos; es más soluble que la clortetraciclina y es más estable dentro del espectro fisiológico y moderadamente alcalino del pH; sus soluciones se oscurecen más rápidamente que la clortetraciclina pero menos que la oxitetraciclina; el pH (de una suspensión acuosa, 10 mg/ml) está entre 3 y 7; el pK_a es de 3,3, 7,7, 7,9. Un gramo de tetraciclina se disuelve en unos 2.500 ml de agua y en aproximadamente 50 ml de alcohol; es completamente soluble en soluciones de HCL diluido o en solución de hidróxido alcalino; es prácticamente insoluble en cloroformo o éter (4,23).

[4S-(4 α , 4 α , 5 α ,6 β ,12 α)]-4-(Dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,6,10,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenocarboxamida.

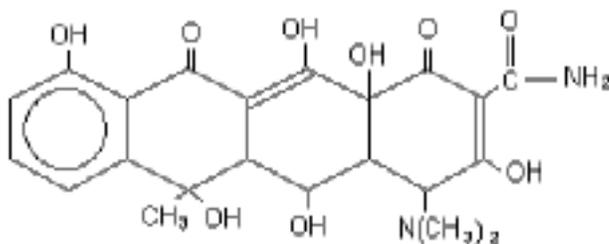


[60-54-8] $C_{22}H_{24}N_2O_8$ (444,44). Potencia: equivalente a no menos de 975 μ g de clorhidrato de tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8HCL$)/mg, calculados sobre la base anhidra (23).

3. Oxitetraciclina

Polvo cristalino amarillo pálido, inodoro y estable al aire, aunque la exposición a la luz solar lo oscurece; se deteriora en soluciones de pH menor de 2 y es destruido rápidamente por las soluciones de hidróxidos alcalinos; la solución saturada es casi tornasol, pues tiene un pH aproximado de 6,5. Su preparación consiste en un cultivo de una cepa seleccionada de *Streptomyces rimosus* en un medio consistente en agua, proteínas y sales nutritivas

[4S-(4 α ,4 α ,5 α ,5 α ,6 β ,12 α)]-4-(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacenecarboxamida dihidratada; Dihidrato de oxitetraciclina.



[6153-64-6] $C_{22}H_{24}N_2O_9 \cdot 2H_2O$ (496,47); anhidra [79-57-2] (460,44).
Potencia: no inferior a 832 μ g de $C_{22}H_{24}N_2O_9$ /mg (23).

4. Reacciones adversas

Las tetraciclinas producen diferentes reacciones de hipersensibilidad. Después de utilizar cualquiera de las tetraciclinas, surgen reacciones cutáneas que incluyen erupciones morbiliformes y urticaria. Entre las respuestas alérgicas más intensas están angioedema y anafilaxia. Así mismo, pueden aparecer reacciones anafilactoides después de la ingestión de estos compuestos. Otros efectos que se han atribuido a la hipersensibilidad son: ardor de ojos, quilosis, glositis atrófica o hipertrófica, prurito anal o vulvar y vaginitis. Los efectos mencionados suelen persistir semanas o meses después de interrumpir el uso de tetraciclinas. A veces surge fiebre de diversos grados y eosinofilia. También se ha observado asma, superinfecciones, fiebre, daño hepático, mareos y ronquera. Es frecuente la sensibilización cruzada entre la diversas tetraciclinas (21,22).

Las tetraciclinas quelan a los iones de metales divalentes y trivalentes; por esto, el medicamento no debe emplearse durante los períodos de desarrollo de los dientes (último trimestre de embarazo, período neonatal y los primeros años de la infancia) porque puede afectar la formación del esmalte, pigmentación dental y deformidad de los dientes (4). También en niños pequeños puede causar lesiones óseas, aumento de la presión intracraneana y fotosensibilidad (21,22).

Debe emplearse con cuidado y en dosis reducidas en pacientes con insuficiencia renal (22).

Inicialmente se advirtió que las tetraciclinas eran útiles para tratar infecciones por bacilos gramnegativos aerobios, pero en la actualidad muchas *Enterobacteriaceae* son relativamente resistentes. Las tetraciclinas no se absorben del todo en vías gastrointestinales y por ello concentraciones importantes de estos fármacos llegan al interior de los intestinos y alteran en grado notable la flora entérica. Muchos microorganismos coliformes aerobios, anaerobios y bacterias esporógenas grampositivas son sensibles y es posible suprimirlas en grado notable durante regímenes con tetraciclina usadas por largo tiempo antes de que reaparezcan cepas resistentes. Sin embargo, al disminuir el número de coliformes en heces surge proliferación excesiva de microorganismos resistentes a la tetraciclina y, sobre todo, levaduras (especies de *Candida*), enterococos, *Proteus* y *Pseudomonas*. Las tetraciclinas producen a veces la llamada colitis por antibióticos (colitis pseudomembranosa causada por la toxina de *Clostridium difficile*) (21).

La administración de tetraciclinas deterioradas puede resultar en un síndrome similar al de Fanconi, caracterizado por náuseas, vómitos, acidosis, proteinuria, glucosuria, aminoaciduria, polidipsia, poliuria, e hipocalcemia (22).

C. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

1. Generalidades

Dos de los problemas principales que enfrenta la química analítica son:

a) la exactitud y reproducibilidad en la determinación de pequeñas cantidades de analito;

b) la necesidad de ser capaz de llevar a cabo determinaciones cuando el analito de interés está presente como componente menor en una matriz compleja y con sustancias potencialmente interferentes.

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida

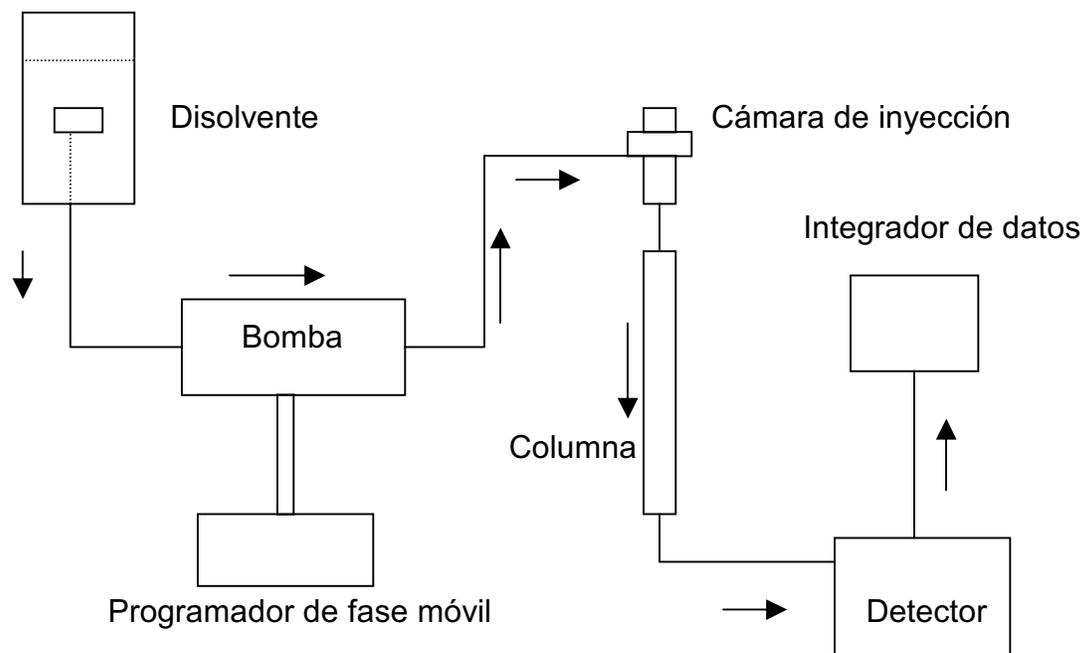
entre dos fases, una estacionaria y una móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de una mezcla es selectivamente retenida por la fase estacionaria (23,24,27).

La cromatografía líquida de alta presión o HPLC, por sus siglas en inglés (High-Performance Liquid Chromatography), utiliza columnas de diámetro muy reducido, rellenas de materiales especiales pulverulentos, cuyas partículas tienen un tamaño de 30-40 μ m y, en ocasiones, hasta de 3-10 μ m. Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión. Por esta razón, es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria es pequeña por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10 mg. La HPLC es una técnica extremadamente versátil y puede ser utilizada para determinar casi cualquier analito no gaseoso, siempre y cuando sea soluble en solventes orgánicos o inorgánicos. Esta versatilidad ha hecho que la HPLC sea una de las técnicas más importantes que existen para el analista y es la razón de su rápido crecimiento desde la década de los 70 (23,24).

2. Instrumental

Los requerimientos para un aparato de HPLC son relativamente simples: una cámara para el disolvente, una bomba, inyector, columna, detector y muchos ya incluyen un sistema completo de integración. Ver figura No.1.

Figura No. 1 HPLC



a) Disolventes - llamados también fase móvil, aunque no son parte del instrumental propiamente dicho. La composición del disolvente utilizado en una separación cromatográfica depende mucho de la naturaleza de la muestra y el modo de separación empleado. Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en cromatografía líquida son (23,25):

- Alta pureza para obtener resultados reproducibles
- Disolver la muestra
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado

Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases se desgasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficacia de la columna. Por este motivo, es necesario remover de la fase móvil los gases disueltos. Actualmente,

en muchos instrumentos, el recipiente del diluyente está acondicionado para efectuar dicha remoción. Una forma es aplicar vacío sobre el recipiente que contiene la fase móvil mientras se agita el líquido con un agitador magnético. Si esto no es suficiente, se procede, además, a calentar ligeramente el líquido en tanto que el espacio libre del recipiente se purga con nitrógeno o con algún otro gas inerte menos soluble (23).

b) Bombas - las columnas utilizadas en cromatografía líquida están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a una velocidad razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos (24,26,27).

Los aspectos más importantes del sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación
- Intervalo de volúmenes obtenibles
- Reproducibilidad y constancia del flujo
- Características del flujo

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema (23).

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño existen básicamente dos tipos de bombas:

i. Bombas mecánicas: las cuales, a su vez, pueden ser de pistón o de desplazamiento continuo. Las primeras desplazan flujos de volumen constante en forma no continua. La máxima presión que se puede obtener es aproximadamente de 200atm. En las segundas el flujo es desplazado de forma uniforme y sin pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para rellenar la cámara es necesario suspender por un momento su funcionamiento (23,24).

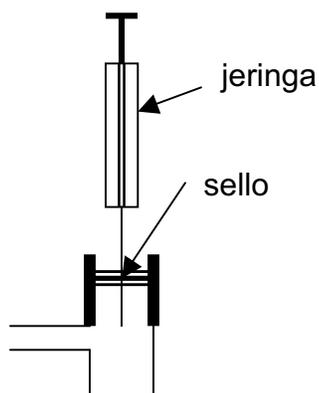
ii. Bombas neumáticas: en las bombas de este tipo, el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte. La fuerza es la misma en ambos lados del pistón, pero la presión es mayor en un área más pequeña, de

hasta 990atm (27). Las desventajas de estas bombas son la capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido, lo cual se puede resolver utilizando algún tipo de interfase o descartando las últimas porciones de líquido que han sido saturadas por el gas (23,24).

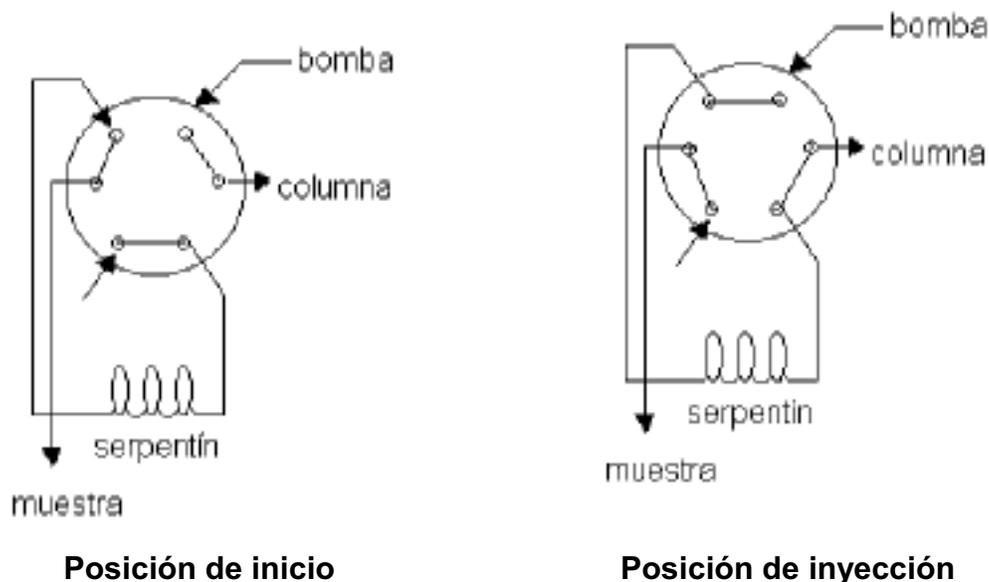
c) Sistema de inyección - esta parte del instrumento debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades debe ser llenadas por la fase móvil. Existen diferentes sistemas para inyectar la muestra:

i. Jeringas de alta presión: se requiere que la presión sea menor de 100atm. La muestra se introduce perforando, con la aguja de la jeringa, un disco o sello que sea capaz de resistir altas presiones y la acción disolvente de la fase móvil (23). Ver figura No. 2.

Figura No. 2 **Inyección**



ii. Válvulas de inyección: opera a presiones mayores de 100 atm. Este sistema separa la muestra introducida del sistema con el diluyente a alta presión. Cuando ésta se encuentra en posición inicial, la muestra es inyectada a presión atmosférica al serpentín, mientras el diluyente pasa directamente de la bomba a la columna a alta presión. Cuando la válvula se rota a la posición de inyección, el serpentín forma parte del sistema de flujo del diluyente y la muestra se introduce a la columna (24). Ver figura No. 3.

Figura No. 3 Válvulas

iii. Detener el flujo momentáneamente: que consiste en interrumpir la presión, deteniendo la bomba; se espera que el flujo cese antes de remover el sello perforable y se deposita la muestra en la cámara de inyección o en la parte superior de la columna; posteriormente, se reinstala el sello y se restablece el flujo. Mediante esta técnica no hay pérdida de eficiencia en la separación ya que las velocidades de difusión en líquidos son muy bajas (23)

d) Columnas y fases estacionarias - la columna es la parte más importante del sistema, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra que se analiza. Básicamente consiste en un segmento de tubo de un material inerte, diámetro uniforme y capaz de resistir las altas presiones. El acero inoxidable de diámetro preciso y de paredes internas finamente pulidas es el más utilizado. La longitud de la columna varía entre 15cm y varios metros; el diámetro, entre 2 y 3 mm; empacadas con partículas de fase estacionaria de 3, 5 o 10 μ m. . La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno (23,24).

Las fases estacionarias pueden ser de diferentes materiales como sílica, sílica químicamente modificada, estireno-divinylbenceno, alúmina, silicato de magnesio, borosilicato, celulosa, zeolitas, agarosa, etc. El tamaño de la partícula es importante porque controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro y afuera de los poros de la partícula. El material ideal es aquél que, en el menor tiempo, dé una mejor resolución de la separación de la muestra, tenga la máxima capacidad de la muestra, fácil de introducir en la columna, produzca caídas de presión pequeñas y, además, tengan un costo reducido (23,27).

e) Detector - debe ser capaz de reconocer cuándo la sustancia a analizar sale de la columna. Tiene que monitorear los cambios de composición de la fase móvil y convertir todo esto en una señal eléctrica para que ésta pueda ser revelada y mostrar las zonas de desviación. Las características del detector deben ser (27):

- Capaz de ser igualmente sensible a todos los componentes de la muestra o reconocer los de interés.
- No verse afectado por los ligeros cambios de temperatura o composición de la fase móvil.
- Ser capaces de monitorear pequeñas cantidades del componente (trazas).
- Que no contribuya a alargar la banda; por esta razón, el volumen de la celda debe ser pequeño.
- Reaccionar inmediatamente para mostrar los picos correctos, ya que la muestra pasa rápidamente por la celda.
- Ser fácil de manipular, barato y duradero.

Entre los detectores que se utilizan en cromatografía líquida de alta presión se encuentran:

i. Detectores Espectrofotométricos: es el grupo de detectores más utilizados en HPLC y pueden ser empleados como método estándar para la mayoría de los ensayos. Existen dos tipos diferentes de estos detectores:

- detectores espectrofotométricos de luz ultravioleta-visible: es el más común, posee un rango lineal, es muy sensible pero, a su vez, se ve poco afectado por los cambios de flujo y temperatura (27). Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta; la respuesta del detector es selectiva, ya que sólo percibirá los compuestos que absorban luz de longitud de onda específica (23). Entre los compuestos que pueden ser detectados están: compuestos orgánicos, con cromóforos, compuestos aromáticos, iones inorgánicos y complejos. La mayor parte de los diseños comerciales operan a una longitud de onda de 254 ó 280 nm, utilizando como fuente de luz UV una lámpara de mercurio de baja presión (24).

- detectores de fluorescencia: pueden ser utilizados con compuestos que fluorescen o poseen propiedades fluorescentes y su sensibilidad puede ser 1000 veces mayor que el detector UV (27).

ii. Detectores Electroanalíticos: se utilizan para la detección de analitos basados en cambios de conductividad de los disolventes o en la reducción u oxidación electroquímica de los analitos(24). Existen dos tipos diferentes de estos detectores:

- detectores conductométricos: los analitos son ionizados y llevan una carga que puede ser detectada midiendo los cambios de conductividad del disolvente entre dos electrodos. Se utiliza en cromatografía de intercambio de iones.

- detectores amperométricos y coulométricos: algunos compuestos pueden ser reducidos u oxidados en solución por la adición o sustracción de electrones en la superficie de un electrodo. Estas reacciones electroquímicas tienen lugar cuando se aplica un potencial positivo o negativo en la solución. Este método se utiliza para la determinación de iones de metales en soluciones diluidas (24,27).

iii. Detectores de índice de refracción: miden la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro de la solución de la muestra que sale de

la columna; de esta manera, se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. Este tipo de detector no es muy selectivo ni sensible (23,24,27).

iv. Detector de arreglo de diodos: son detectores de elevada sensibilidad y especificidad. Utiliza tecnología de fibra óptica que mejora la eficiencia de la transmisión de la luz, minimiza la pérdida de volumen y los efectos de los cambios de temperatura. Es muy utilizado en la detección de analitos en bajas concentraciones (24).

v. Detectores acoplados: para obtener información adicional del analito, el disolvente del sistema de HPLC puede pasar por una segunda técnica de análisis como la que realizan los detectores radioquímicos, de absorción atómica, polarímetro, infrarrojo, de resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas, etc. (24).

vi. Otros detectores: existen otros tipos de detectores en el mercado, pero ninguno ha tenido una total aceptación. Entre éstos, se encuentran los detectores de conductividad, detectores de fotoconductividad, detectores infrarrojos, detectores radioactivos, etc. (27).

f) Automatización y procesador de datos - la HPLC no ha sido inmune a la influencia de microprocesadores y revolución en la tecnología de la información. Las computadoras han tenido un gran impacto en el control del instrumento, inyección automática de las muestras, recolección e integración de datos, optimización de las condiciones de separación, etc. Existen sistemas robóticos para la preparación de las muestras, la extracción, dilución, adición de estándares directos; incluso, podrán seleccionar el método y resolver los problemas que se presenten (24).

3. Métodos de separación

Escoger las condiciones cromatográficas más adecuadas para un análisis específico en HPLC es complejo y depende de una variedad de factores. Debido a la gran versatilidad del HPLC, se pueden llevar a cabo diferentes métodos de separación, utilizando el mismo aparato, únicamente cambiando la fase móvil o la fase estacionaria. Dos consideraciones se tienen que tener presentes: el tamaño

molecular junto con la polaridad de los analitos y la naturaleza de cualquier otro componente que pueda estar presente en la muestra. Además, hay que tomar en cuenta el tiempo que se lleve para completar el análisis y el costo del mismo.

a) Cromatografía de fase-normal - se utiliza en muestras que contienen una mezcla de compuestos con diferentes grupos funcionales. La separación depende de las diferencias entre las interacciones polares de los analitos con la fase estacionaria polar. Estas interacciones polar-polar dominan la separación y hacen que compuestos similares y compuestos no polares sean detectados pobremente. Aparte los compuestos muy polares, como las aminas y los ácidos, interactúan fuertemente con la columna y no son detectados en un tiempo razonable (24).

b) Cromatografía de fase-reversa - debido a las limitaciones de la fase normal, los métodos con fase reversa son de los más utilizados. Luego de enlazar C18, C8 u otras cadenas, la superficie de silica gel es mucho menos polar que las demás. Por consiguiente, la superficie de la columna es convertida desde una polar a una no polar, lo que le proporciona diferentes características de separación. Además, se utiliza como fase móvil agua u otro compuesto orgánico como el metanol o el acetonitrilo. Estos solventes hacen mucho más fáciles las separaciones de los compuestos farmacéuticos, los cuales necesitan grupos polares como ácidos carboxílicos o aminas para enlazarse. El intercambio entre las formas neutras e iónicas de los ácidos y las aminas puede causar problemas pero se anulan al controlar el pH de la fase móvil con un buffer (24,25,27).

c) Cromatografía de intercambio de iones - compuestos iónicos como los aminoácidos pueden ser separados por este método. La fase estacionaria posee la capacidad de intercambiar iones al mismo tiempo que posee carga sobre su superficie. Grupos iónicos como SO_3^{2-} , COO^- , NH_3^+ o NR_3^+ son incorporados al gel o resina. La fase móvil posee iones y moléculas iónicas de la muestra que

compiten con estos iones por lugares en la superficie de la fase estacionaria (24,27).

d) Cromatografía por exclusión - los analitos son separados de acuerdo al tamaño o peso molecular. La columna empacada posee poros de diferentes tamaños por lo que algunas moléculas son excluidas y no logran pasar a través de ella; luego, estas moléculas son arrastradas lentamente por la fase móvil. Son las últimas en ser detectadas. Este es el método más efectivo para moléculas cuyo peso es mayor a 2000 y se utiliza para separar biopolímeros, proteínas, etc. (24,27).

4. Aplicaciones de la HPLC

Virtualmente cualquier componente que se pueda disolver en un solvente acuoso u orgánico puede ser separado y cuantificado por HPLC, con una sensibilidad dependiente de la capacidad de detección. Bajo estos criterios se incluyen casi todos los compuestos no poliméricos y no gaseosos de interés. Los grupos de analitos más importantes son los compuestos farmacéuticos, incluyendo las penicilinas, tetraciclinas, barbitúricos, alcaloides opiáceos y muchas otras drogas. En lo que se refiere a problemas relacionados con la contaminación ambiental, se utiliza para el estudio de compuestos agroquímicos como herbicidas e insecticidas organohalógenos y organofosforados. También la HPLC es especialmente útil para la separación de muestras biológicas y compuestos que incluyen los carbohidratos, lípidos, vitaminas, aditivos de alimentos, colorantes y preservantes de alimentos. En el campo de la investigación se utiliza para analizar ácidos nucleicos, proteínas, esteroides, biopolímeros, etc.

D. Implementación, validación y calibración del método por HPLC

En la química analítica se han ido incrementando las regulaciones que controlan la calidad y validez de los datos que se obtienen. Para obtener la máxima confiabilidad en los resultados, se debe poner atención en la implementación del método y en los procedimientos de validación y calibración.

1. Implementación del método

La implementación de un método en cromatografía líquida requiere de un cuidadoso planeamiento para reducir el tiempo del proceso y el error. Es importante no solamente que se obtenga una buena separación sino también que el método no sea sensible a los pequeños cambios en la composición de la fase móvil. En cromatografía líquida, la implementación del método usualmente incluye: la búsqueda de las variaciones de fases (fase móvil y fase estacionaria), los tipos de columna con los cuales se realizará la separación más óptima, el tipo de detector dependiendo de las características de la muestra (UV, fluorescencia) y tomar en cuenta la influencia de la temperatura para optimizar las condiciones cromatográficas (29,30).

Una vez que el método se ha implementado, se debe validar. Para lograr esto, se necesitan ciertos criterios que aseguren que el método es recomendado para lo que se intenta utilizar.

2. Validación del método

“La validación de un método analítico es el procedimiento establecido por estudios de laboratorio, en el que las características del método cumplen con los requerimientos necesarios para la aplicación analítica que se intenta”(31).

La validación es requerida en cualquier método para asegurar que éste es capaz de mostrar resultados reales y reproducibles, cuando es utilizado por diferentes analistas o equipo análogo en el mismo laboratorio o en otro. En la mayoría de los casos la validación de un método solamente necesita ser demostrado una vez (29).

Los parámetros analíticos que se utilizan para validar un método incluyen: precisión, exactitud, linealidad, rango, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad.

a) Precisión - “es el grado de aproximación entre los resultados de mediciones independientes obtenidos cuando el método es aplicado a múltiples

submuestras de una muestra homogénea”(31). La precisión representa la medición de la reproducibilidad de todo el método analítico (incluyendo el muestreo, preparación de la muestra y análisis) bajo circunstancias normales de trabajo. La precisión es determinada utilizando el método de realizar mediciones de la muestra el número de veces necesarias hasta obtener resultados estadísticamente válidos. La precisión es expresada como Desviación Estándar Relativa (29,32).

$$\%DER = \frac{\text{desv est} \times 100}{\text{media}}$$

b) Exactitud - “proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor real de una cantidad mensurable”(31). La exactitud indica la desviación entre el valor encontrado y el valor real. Es determinada aplicando al método muestras a las cuales se les conoce la cantidad de analito agregado. Esto debe ser analizado contra estándares y con soluciones blanco para asegurar que no existen interferentes. La exactitud es, por tanto, calculada como el porcentaje de recuperación del analito por ensayo (29,33).

c) Linealidad - es la habilidad del método de obtener resultados que son directa o indirectamente proporcionales a la concentración del analito sin saber el rango (29). Además, se determina el rango lineal, que es el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado. La linealidad se determina calculando la regresión lineal de los resultados versus la concentración de los analitos (32,34).

d) Sensibilidad - Es la pendiente de la curva respuesta (área)-concentración o el cambio de respuesta por unidad de concentración (31).

e) Reproducibilidad - proximidad entre los resultados de mediciones de la misma cantidad mensurable, donde las mediciones se llevan a cabo bajo el mismo

procedimiento de medición, distintos observadores, distintos sistemas de medición, distintas ubicaciones y distintos momentos (35).

f) Repetibilidad - proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma cantidad mensurable sujetas a un mismo procedimiento de medición, observador, sistema de medición, ubicación, condiciones de uso y realización sucesiva de todas las mediciones en un período corto de tiempo (35).

g) Robustez - es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo una variedad de condiciones normales de la prueba: diferentes analistas, diferentes laboratorios, instrumentos, diferentes temperaturas, pequeñas variaciones de fase móvil, diferentes días, etc. (29).

h) Límite de detección - es la mínima concentración de la muestra que puede ser detectada, bajo condiciones experimentales establecidas. El límite de detección es importante en muestras que contengan impurezas o residuos de drogas y placebos. Es generalmente expresado como la concentración resultante del ratio de la señal-a-ruido de 2:1 y es confirmado analizando un número de muestras cerca de este valor utilizando la siguiente ecuación:

El ratio señal-a-ruido es determinada por:

$$s = H/h$$

donde H = altura del pico correspondiente al compuesto y h = valor absoluto de la fluctuación más larga de ruido de la línea base del cromatograma de la solución blanco (29).

i) Límite de cuantificación - es la mínima concentración del analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable. Es expresado como la concentración resultante del ratio de la señal-a-ruido de 10:1 y es confirmada analizando un número de muestras cerca de este valor (29).

j) Selectividad - es la habilidad de medir con exactitud y especificidad el analito en presencia de compuestos que se pueden esperar que estén presentes en la matriz de la muestra (35).

k) Especificidad - asegura que la señal medida proviene de la sustancia interés, y que no hay interferencias de impurezas o restos de producto degradado (29,36).

3. Calibración del método

Una vez el método o sistema ha sido validado, se debe chequear que el sistema implementado se mantenga dentro de los límites validados. Una forma sencilla para calibrar el sistema de HPLC incluye la comparación del cromatograma del estándar con un cromatograma de referencia del mismo analito. En esta comparación se incluye la línea base, la forma del pico y el tiempo de aparición del mismo (29).

Alternativamente, los parámetros del cromatograma se pueden calcular conociendo:

a) El número de platos teóricos - con esto se mide la forma del pico y muestra la eficiencia de la columna. Cuanto mayor es el número de platos mejor es la eficiencia de la columna.

b) Factor de capacidad k - este valor indica por cuanto tiempo es retenido cada componente en la columna y asegura que la muestra se ha separado del solvente.

c) Factor de separación α o retención relativa - describe la posición relativa entre dos picos cercanos.

d) Resolución - este parámetro mide la separación de dos picos cercanos y, al mismo tiempo, la eficacia de la columna.

e) Factor de cercanía T - este parámetro mide la asimetría del pico.

f) Desviación estándar relativa o precisión - este parámetro abarca la reproducibilidad de un número de inyecciones repetidas del analito en cuestión (29).

E. Importancia del consumo de alimentos sanos para la salud

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la frecuencia de los casos de enfermedades causadas por alimentos mal conservados o contaminados cada vez aumentan más. Esta mayor frecuencia tiene un impacto comercial considerable, ya que la globalización y la intensificación de los intercambios de productos son responsables de la propagación y agravación de las enfermedades, del aumento del número de brotes infecciosos y de la complejidad de las patologías(37). Todo esto está obligando a las autoridades de muchos países a asumir posiciones más rigurosas en cuanto al control de calidad e inocuidad de los alimentos.

Actualmente se considera que los alimentos son la mayor fuente de exposición de riesgos por la presencia de agentes patógenos, tanto químicos como biológicos, que afectan sin distinción el nivel de desarrollo de los países (5). Hay que tomar en cuenta que la presencia constante de productos de mala calidad y contaminados en los mercados mundiales y el consiguiente aumento de los rechazos, se traduce en graves daños para el desarrollo económico de los países. Los rechazos no sólo afectan a un producto sino a importantes cantidades de diferentes productos; en algunos casos, el rechazo se puede extender a los productos provenientes de toda una región (37).

El estudio mundial sobre los mayores contaminantes que afectan el comercio internacional de alimentos, llevado a cabo en 1990 por la FAO con el patrocinio de Finlandia (37), indica que los contaminantes más frecuentemente encontrados en los alimentos son los siguientes: microorganismos como *Salmonella*, *Listeria* y *Shigella*; residuos de plaguicidas, fertilizantes y medicamentos veterinarios entre otros.

A pesar de que es sabido que las insuficiencias sanitarias en la producción de alimentos son uno de los mayores problemas de la salud pública, muchas de las autoridades que tienen bajo su cargo y responsabilidad el control de calidad e inocuidad de los mismos aún no comprenden claramente el impacto de este problema en el desarrollo económico y social del país.

1. Antibióticos en los alimentos

Los antibióticos producidos por microorganismos o sintéticamente inhiben a los microorganismos en grandes diluciones. Durante cierto tiempo se emplearon en los alimentos para inhibir las bacterias alterantes, pero actualmente se prohíben en los alimentos. Incluso, pequeños residuos existentes en los alimentos procedentes de los animales tratados con antibióticos se consideran actualmente inaceptables (19).

Los microorganismos de los alimentos pueden convertirse en antibiótico-resistentes y colonizar el intestino del hombre y de los animales. Asimismo, los residuos pueden ejercer una acción selectiva favoreciendo a la flora ya existente en el intestino; en estas condiciones, los antibióticos empleados terapéuticamente pueden resultar ineficaces (38). Una de las más importantes razones de la persistencia de bacterias resistentes es el empleo indiscriminado de medicamentos antimicrobianos en el hombre y en el ganado (Organización Mundial de la Salud –OMS-, 1976). Los microorganismos antibiótico-resistentes carecen de interés en los alimentos procesados térmicamente, debido a que, en general, hay que esperar que se destruyan durante el tratamiento; sin embargo, pueden encontrarse en los alimentos crudos y llevar a cabo la contaminación de otros alimentos(3,9,10,19).

La utilización continua de antibióticos en los alimentos de los animales domésticos surgió a partir de la publicación de un trabajo de Stokstad y Jukes (1950) quienes observaron que la aureomicina suministrada en dosis pequeñas aumentaba el ritmo de crecimiento del 4 al 10%. El suministro de antibióticos ha permitido también el desarrollo de unas condiciones de cría intensivas y superpobladas que caracterizan a las modernas técnicas de explotación animal (19).

No obstante, el aumento de la incidencia de microorganismos antibiótico-resistentes ha causado preocupación. La existencia de microbios resistentes se conoce desde el trabajo de Paul Erlich a comienzos de siglo; se pensó que estas bacterias se convertían resistentes por una mutación cromosómica espontánea o por la selección, en presencia del agente químico terapéutico, de las bacterias resistentes ya existentes en la población microbiana. La resistencia de tipo cromosómico es específica de un grupo de antibióticos relacionados entre sí (19,21).

A finales de la década de los años 50', investigadores japoneses descubrieron la resistencia múltiple de las bacterias. Estas pueden convertirse en resistentes simultáneamente a varios grupos de antibióticos no relacionados entre sí. La resistencia múltiple se adquiere por transferencia de un elemento genético, llamado plásmido, desde un microorganismo resistente a otro sensible. Los plásmidos existen independientemente del cromosoma bacteriano, y en un mismo microorganismo puede haber uno o varios tipos diferentes de plásmidos. El relacionado con la antibiótico-resistencia microbiana se ha llamado también factor de resistencia (factor R) y la bacteria que lo posee suele denominarse R⁺. Se admite ahora generalmente que la mayoría de las "resistencias" de las bacterias de tipo salvaje se deben a factores R y no sólo del tipo cromosómico (19,21).

Los problemas de transferencia de resistencia antibiótica de las bacterias patógenas a las inócuas y el consiguiente miedo a que falle la terapéutica humana, especialmente en el caso de la resistencia antibiótica múltiple, ha llevado al establecimiento de comisiones específicas de la Unión Europea (UE), FDA (EEUU) y otras(39).

Un informe de la OMS hace énfasis en que los beneficios del suministro de concentraciones bajas de antibióticos son demasiado grandes como para considerar su retirada del empleo ganadero. No obstante, dado que los antibióticos son indispensables para la terapéutica humana y animal, se han ordenado de acuerdo a su mayor o menor peligro.

Aquellos que presentan menos peligro son adecuados para su utilización con el pienso, mientras que los que presentan gran riesgo no son aptos para este

fin. A continuación se clasifican los antibióticos empleados con fines terapéuticos, profilácticos o alimenticios en orden creciente de peligrosidad respecto al desarrollo de resistencia bacteriana (19):

- Bacitracina, flovomicina, virginiamicina
- Polimixina, furanos, lincomicina, lilosina y macrólidos relacionados con ellos
- Eritromicina, espiramicina, oleandomicina
- Penicilina, tetraciclinas
- Ampicilina, cefalosporinas
- Sulfonamidas, estreptomina, neomicina
- Cloranfenicol

La Comunidad Económica Europea (CEE) reconoció, en la década de 1960, el riesgo de suministrar antibióticos que pudieran seleccionar los microorganismos resistentes que albergan plásmidos y desaconsejó su empleo como aditivos del pienso de tetraciclinas, estreptomina y antibióticos relacionados con ellas. Se prohibió el empleo de la penicilina por el amplio uso que se hace de este antibiótico en medicina humana y animal. En la CEE nunca se han utilizado con fines nutritivos el cloranfenicol, polimixina, ampicilina, cefalosporinas ni sulfamidas; sin embargo, algunas de éstas siguen utilizándose como coccidiostáticos en avicultura. Continúan las discusiones sobre el empleo de macrólidos, incluida la lincomicina. Debería prohibirse en terapéutica animal y en los piensos; algunos antibióticos pueden excluirse de su empleo animal (19,39).

2. Residuos de antibióticos

En los alimentos no deben existir residuos de antibióticos; sin embargo, dado que estos agentes terapéuticos se emplean mucho como promotores del crecimiento y para el control de las enfermedades animales, a veces se encuentran residuos en la carne y en la leche.

a) Fuentes de residuos - los antibióticos adicionados a los piensos para promover el crecimiento se emplean en concentraciones muy bajas y, por lo tanto, no son una fuente importante de residuos; sin embargo, en las condiciones

modernas de explotación intensiva animal los antibióticos también se suministran con el pienso con fines profilácticos (5). La OMS ha señalado que una concentración de 20 ppm es suficiente para promover el crecimiento mientras que las dosis de 100-200 ppm constituyen niveles profilácticos. Estos niveles más altos pueden dejar residuos en la carne, leche y huevos. Dado que un antibiótico definido puede emplearse con ambos fines y puesto que el efecto promotor del crecimiento se debe, en parte, al efecto profiláctico, es difícil distinguir entre ambos puntos (40). Los animales tratados terapéuticamente con antibióticos están especialmente predispuestos a presentar residuos. Desde el punto de vista de la microbiología de los alimentos el problema más importante deriva de los residuos de antibióticos a consecuencia del tratamiento de las mastitis vacunas con estos quimioterapéuticos (18,39). Los residuos de antibióticos pueden afectar a la flora de la leche cruda y a la elaboración de productos lácteos fermentados, en especial yogurt (39), y pueden ser responsables de resistencias y de alergias humanas.

b) Pruebas para detectarlos - la leche es frecuentemente analizada para verificar la presencia de estos antibióticos, utilizando pruebas rápidas, sensibles y cualitativas. Estas involucran inhibición del crecimiento microbiológico, (41) que se basa en que la concentración de residuos es menor a la concentración mínima inhibidora (MIC) del microorganismo testigo más sensible; por ello, se han establecido tolerancias microbiológicas en relación con los valores de las MIC. Tales test pueden emplear pocillos o discos impregnados de extractos cárnicos que se colocan en placas de agar sembradas con suspensiones normalizadas de esporas, o bien el extracto alimenticio o la leche se colocan en pocillos del agar. Las zonas de inhibición (observadas) se atribuyen a los antibióticos o a otras sustancias antimicrobianas (6,19,42).

Una sustancia inhibidora detectada puede identificarse de varias formas. Su inactivación por una enzima puede ser una forma, por ejemplo, la pellicinasa inhibe la penicilina. Los antibióticos también pueden diferenciarse usando una serie de microorganismos testigos que se sabe son sensibles o resistentes a ciertos antibióticos. Cada vez se utilizan más las técnicas de separación químicas;

por ejemplo, los antibióticos se separan por cromatografía de capa fina y electroforesis (43). Los cromatogramas y electroferogramas no se tiñen como se hace corrientemente en los laboratorios de química, sino que se recubren de una capa de un medio de agar, sembrando un microorganismo testigo. Los antibióticos se identifican entonces observando la situación de las zonas de inhibición. Los inconvenientes de las pruebas microbiológicas son que pueden dar resultados falsos positivos causados por las sustancias inhibitorias naturales presentes en la leche; además, no son específicas y llevan más tiempo (6,19).

Otras pruebas indirectas para el análisis de antibióticos en la leche son reacciones enzimáticas, kits de ELISA, inmunoensayos, etc. Estas pruebas son sensibles pero no específicas, ya que no diferencian los diversos tipos de antibióticos (41,44). Un método directo, automatizado y que posee una gran sensibilidad y especificidad en la actualidad es por HPLC que identifica y cuantifica de forma rápida cada uno de los residuos de antibióticos que se puedan encontrar presentes en la leche (6,42).

c) Alergias: se conoce que varios antibióticos de los alimentos producen respuestas alérgicas. Por ejemplo, los residuos de penicilina, que pueden tener o no actividad antibiótica, se sospecha que son fuertemente alérgicos (45). El vehículo más frecuente es la leche de los animales tratados por mastitis. También puede tener graves consecuencias el aporte de leche de tanques o recipientes en los que la leche que contiene residuos de antibióticos se mezcla con leche sin contaminar; la única medida segura es retirar la leche del comercio. Un porcentaje de la población es hipersensible a ciertos antibióticos, por lo que la presencia de residuos de antibióticos puede producir un shock anafiláctico y hasta la muerte(19).

3. Leche cruda

Se define como la secreción de la glándula mamaria, libre de calostro, obtenida por ordeño de una o más vacas sanas con un contenido de grasa de al menos 3.25%, un extracto seco magro superior al 8.25% y una densidad de

1.033g/ml a temperatura ambiente. La composición de la leche varía ampliamente dependiendo de la raza e incluso del mismo individuo (43). Este término abarca a la leche desde la granja de producción y durante el transporte hasta la central lechera antes de recibir cualquier tratamiento. La leche cruda se considera la materia prima para la elaboración de leches comerciales y productos lácteos como helados, leches concentradas, leches en polvo, leches fermentadas, quesos, mantequillas, cremas, etc. (19).

La obligación de los hatos lecheros es la producción de leche de óptima calidad desde el punto de vista de la salud pública.

Hay que tomar en cuenta que la leche y los productos lácteos pueden presentar un peligro para el hombre, no solamente a causa de la presencia de bacterias patógenas, sino también a causa de las sustancias tóxicas elaboradas por algunas bacterias (14).

Otro problema ocasionado por la mastitis es el de residuos de antibióticos o quimioterapéuticos usados en el tratamiento, tanto desde el punto de vista de la salud pública (sensibilización a ciertos antibióticos) como en la industria láctea, que debe comercializar productos con un mínimo de bacterias presentes y libre de residuos de contaminantes (3,9).

El antibiótico que no es absorbido por el tejido mamario se elimina en la leche. La cantidad varía en los distintos individuos, pero el tiempo que la vaca elimina el antibiótico de la leche depende del tipo de tratamiento, de la concentración de la sustancia, del tiempo transcurrido entre el tratamiento y el primer ordeño, de la fase de lactancia y de la capacidad de reabsorción del tejido mamario (20,46).

La importancia del control de residuos de antibióticos en la leche se debe a diferentes factores:

a) Ciertos individuos son muy sensibles a los antibióticos, presentando hipersensibilidad, daño hepático, lesiones óseas, pigmentación y deformidad de dientes, daños gastrointestinales, etc. (21,22)

b) El consumo continuo de leche puede llevar a la aparición de bacterias resistentes y, por lo tanto, insensibles al tratamiento(3,10).

c) Los productos lácteos fabricados con leche que contenga antibióticos pueden contener cepas de bacterias infecciosas resistentes (9).

d) Los antibióticos presentes en la leche que se utiliza como materia prima altera la fabricación de los productos lácteos que se realicen con ella (47).

4. Límites Máximos de Residuos (LMR) de tetracilinas en la leche

El Comité experto en Aditivos en Alimentos de la FAO/OMS definió los Niveles Máximos de Residuos de Drogas Veterinarias en alimentos como: “ el Nivel Máximo de Residuos (LMR) es la máxima concentración de residuo resultante del uso de una droga veterinaria (expresada en mg/kg o µg/kg en peso fresco) que es recomendado por la Comisión del Codex Alimentario para ser legalmente permitido o reconocido como aceptable en los alimentos. Esto está basado en el tipo y cantidad de residuo que ya no es considerado como tóxico o dañino para la salud humana según la Ingesta Diaria Recomendada” (48).

Han sido muchos los investigadores que han estudiado el contenido de antibióticos de muestras de leche (41). En diversos países se han establecido sistemas de inspección y control que comprenden leyes, reglamentos y normas rigurosas, mecanismos de inspección, análisis y certificación externos mediante los cuales los propios productores velan por la calidad e inocuidad de sus productos (5,37,39).

Los países en desarrollo, como Guatemala, no poseen sistemas de inspección regulados y efectivos como los de los países desarrollados, por lo que se encuentra en una gran desventaja a la hora de comercializar sus productos a estos países. Además, el consumo de productos que carecen de un control de los residuos de antibióticos representan un gran riesgo para la población. Por ambas razones, es importante el establecimiento de métodos y programas para determinar dichos residuos.

Los límites máximos de residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, y tetraciclina) en leche, según la secretaría de la FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) del Programa Estándar de Alimentos, son (49):

Tabla No. 1
Límites Máximos de Residuos

Grupo Tetraciclinas
(oxitetraciclina y tetraciclina)

<i>Especies</i>	<i>Tejido</i>	<i>LMR (µg/kg)</i>	<i>LMR</i> <i>(µg/g=ppm)</i>
Vacuno/Vaca	Leche	100	0.10

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos está siendo un problema cada vez mayor para todos los que se dedican a la salud. La mayoría de antibióticos se utiliza tanto para humanos como para animales y muchos de ellos están perdiendo su efectividad debido a que las bacterias desarrollan resistencia a ellos. El uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos en la ganadería, en especial de las tetraciclinas, puede desarrollar serios problemas de resistencia a las tetraciclinas a través de los alimentos para las personas. La leche es uno de los alimentos básicos para la nutrición tanto de niños como de adultos por lo que es importante que la misma sea totalmente sana y no produzca efectos secundarios dañinos. Desde el punto de vista económico, la presencia de agentes patógenos, tanto químicos como biológicos en la leche, afecta el nivel de desarrollo de los países debido al rechazo que se produce en los mercados mundiales en cuanto a los productos de mala calidad y contaminados.

Debido a la repercusión que tienen los residuos de tetraciclinas en la leche, tanto para la salud como para la economía, la determinación de los mismos es de suma importancia. Uno de los métodos más efectivos, exactos, precisos y selectivos en la actualidad para determinar los residuos de tetraciclinas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La HPLC es una técnica extremadamente versátil y puede ser utilizada para determinar casi cualquier analito no gaseoso, siempre y cuando sea soluble en solventes orgánicos o inorgánicos. Esta versatilidad ha hecho que la HPLC sea una de las técnicas más precisas que existen para el analista, por lo que el método implementado y validado en este trabajo de tesis podrá ser transferido a otros laboratorios de análisis y aplicado en forma rutinaria.

V. OBJETIVOS

A. General

1. Implementar y validar un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de Ultravioleta para la determinación de residuos de oxitetraciclina y tetraciclina en leche fresca de vaca.

B. Específicos

1. Determinar los tiempos de retención, límite de detección, reproducibilidad, repetibilidad y porcentaje de recuperación a partir de soluciones patrón de las diferentes tetraciclinas

2. Realizar un estimado de los costos del análisis sin que esto repercuta en la calidad y confiabilidad del método implementado.

3. Desarrollar un plan piloto que conste de 5 muestras de leche para llevar a cabo la implementación y validación del método.

VI. HIPÓTESIS

Por el tipo de trabajo desarrollado no se presenta hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

1. Método de HPLC que será implementado y validado durante la parte experimental.

2. Leche fresca de vaca utilizada como materia prima en una lechería guatemalteca.

B. Muestra

1. Patrones de tetraciclinas (oxitetraciclina y tetraciclina) que serán utilizados en el análisis.

2. Se trabajará con 5 muestras de leche fresca de vaca utilizada como materia prima. Se tomarán muestras compuestas, para asegurar la homogeneidad de las mismas.

C. Recursos

1. Recursos humanos

- a) Br. Ana Mary Rodríguez Mondal (autora)
- b) Lic. Raúl Antonio Paniagua Piloña (asesor)
- c) Lic. Jorge de León (diseño experimental)
- d) Lic. Ramón Rodríguez Paradela (redacción y ortografía)

2. Recursos físicos

- a) Reactivos
 - Agua destilada y desionizada (H₂O) y agua para HPLC
 - Metanol para HPLC
 - Acetonitrilo para HPLC
 - Ácido oxálico dihidratado

- Soluciones estándar de oxitetraciclina y tetraciclina (TC)
- Ácido cítrico monohidratado
- Fosfato monoácido de Sodio (Na_2HPO_4)
- Etilendiamin de Sodio dihidratado Triplex III ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de Sodio en lentejas (NaCl)
- Ácido Succínico¹
- Hidróxido de sodio 10M (NaOH)¹
- Hexano para HPLC²
- Diclorometano para HPLC²
- Ácido tricloroacético²
- Resina de metal quelada (Sigma 14510)³
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)³
- Etanol (20%v/v)³

b) Cristalería

- Matraces ámbar (o forrados con papel aluminio) de 1000 ml (6), 100 ml (3), 50ml (3) y 5ml (2).
- Beakers de 10ml (6).
- Erlenmeyer de 500ml (1).
- Balón aforado de 10ml (1)
- Balón aforado de 1000 (1)
- Balón aforado de 500 (1)
- Pipetas volumétricas de 1.0, 2.0 5.0 y 10ml
- Kitazato
- Dispositivo de Filtración
- Frascos plásticos ámbar con tapadera (10ml)

¹ Utilizado en el Método 1 de la preparación de la muestra.

² Utilizado en el Método 2 de la preparación de la muestra

³ Utilizado en la preparación de la mini -columna de metal quelada

c) Materiales

- Mini-columnas desechables SPE Octadecyl (C₁₈) (JT Baker o Whatman)⁴
- Mini-columnas de polipropileno (pp) descartables³
- Filtros Nylon 47 x 0.45
- Jeringas con filtro
- Tubos de centrifuga con rosca de 15ml
- Jeringas
- Pipetas pasteur de 9pulg

e) Equipo:

- Sistema de HPLC provisto de bomba, inyector con bucle de 2ml, detector de UV y sistema de integración.
- Columnas empacadas para cromatografía líquida LiChroCART ® 250mm- 4mm. Cartridge LiChrosorb ® RP8 (Cat-No 1.51353.0001 Pat size 5µm)
- Centrífuga con refrigeración (10°C y para tubos de 15ml)
- Balanza analítica electrónica
- Refrigeradora
- Pipetas automáticas ajustables de 10-200µl y 0.05-1.00ml
- Medidor de pH
- Bomba de Vacío

D. Procedimientos

Este procedimiento es aplicable para la determinación en leche cruda de vaca de tetraciclina entre 15-80ng/ml y oxytretracicina entre 15-60ng/ml.(7,8)

1. Preparación de reactivos

a) Agua destilada, desionizada e irradiada con luz Ultravioleta (para remover trazas de impurezas orgánicas).

⁴ Utilizado en la preparación de la mini -columna desechable de Octadecyl

b) Buffer McIlvaine - agregar 12.9g de ácido cítrico monohidratado y 10.9g de Na_2HPO_4 en un matraz de 1000ml, enrasar el volumen con H_2O , guardar este buffer en refrigeración (7).

c) Buffer de EDTA-NaCl - agregar 37.2g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 29.2g de NaCl en un matraz de 1000ml y enrasar el volumen con el buffer de McIlvaine (D1b). La solución contiene 0.1M de EDTA y 0.5M de NaCl. Filtrar la solución a través de un filtro de Nylon 47 de $0.45\mu\text{m}$. Guardar a temperatura ambiente ≤ 2 semanas (7).

d) Estándar de Tetraciclinas (TC) analíticas certificadas

i. Solución Patrón de TC: solución patrón de $100\mu\text{g/ml}$. Pesar 10mg de cada una de las TC en 2 diferentes matraces ámbar (o forrados con papel aluminio) de 100ml. Enrasar con metanol. Mezclar bien y conservar en refrigeración. Las soluciones patrón son estables a 10°C por 2 meses (7,8).

ii. Solución estándar de TC combinadas para trabajo: a concentración de $1\mu\text{g/ml}$. Trasvasar 0.5ml de cada una de las soluciones patrón de TC a un matraz de 50ml ámbar. Enrasar con metanol y conservar la solución ≤ 5 días a 10°C (7,8).

iii. Soluciones cromatográficas patrón de TC: solución no estable; preparar el día de análisis.

- $150\eta\text{g/ml}$. Trasvasar 1.5ml de solución estándar de TC combinadas para trabajo en un matraz de 10ml. Enrasar con buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl (D1c).

- $100\eta\text{g/ml}$. Diluir 4ml de la solución cromatográfica de $150\eta\text{g/ml}$ con 2ml de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl (2+1).

- $50\eta\text{g/ml}$. Diluir 2ml de la solución cromatográfica de $100\eta\text{g/ml}$ con 2ml de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl (1+1).

- $20\eta\text{g/ml}$. Diluir 1ml de la solución cromatográfica de $150\eta\text{g/ml}$ con 4ml de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl (1+4).

Las soluciones cromatográficas patrón de TC de 20, 50, 100 y 150 η g/ml son equivalentes a 10, 25, 50 y 75 η g/ml de TC en una muestra de leche (7).

e) Resina de metal quelada (Sigma 14510)³ Ácido aminodiacético covalentemente unido a una epoxy Sepharosa activada 6B de flujo rápido suspendida en 20% de etanol. Mantener refrigerada.

f) Buffer de succinato de sodio¹ 0.1M, ph 4.0. Pesar 11.8g de ácido succínico en un matraz de 1000ml y agregar menos de un litro de H₂O. Llegar a pH 4.0 con solución de NaOH 10M (1+1 p/p). Enrasar al volumen con H₂O. Mantener en refrigeración. Descartar luego de un mes o si aparece cualquier partícula en suspensión (7)

g) Sulfato de cobre 10mM³. Pesar 0.5g de CuSO₄•5H₂O y disolverlo con 200ml de agua HPLC. Conservar a temperatura ambiente.

h) Etanol 20% v/v³

i) Fases móviles. Solvente A: 10mM de ácido oxálico (1.26g de ácido oxálico•2H₂O/L). Al agregar pequeñas cantidades de acetonitrilo (2-5%) al Solvente A incrementa los tiempos de equilibrio entre corridas. Estable un mes. Solvente B: Metanol, agua y acetonitrilo.

Filtrar todas las fases móviles a través de un filtro Nylon 47 de 0.45 μ m. Si se utiliza un sistema de filtración binario, el solvente B debe variar de acetonitrilo-metanol (22+8 v/v) a 10mM ácido oxálico-acetonitrilo-metanol (20+22+8 v/v) para mantener los requerimientos recomendados para el sistema (7,8).

j) Solución Hexano-Diclorometano² - 1:3 v/v Prepararlo en el momento de utilizarlo.

k) Ácido tricloroacético² - 1g/ml de ácido tricloroacético en agua HPLC. Prepararlo en el momento de utilizarlo.

l) Ácido oxálico en metanol⁴ 0.01M. Pesar 0.126g de ácido oxálico en un matraz de 100ml. Enrasar al volumen con metanol. Duración 3 días, aunque es recomendable preparar solución nueva cada vez que se realice la extracción de TC.

2. Sistema recomendado

Realizar una corrida de prueba en el HPLC con las soluciones cromatográficas patrón de TC utilizando el gradiente de fase móvil como se indica en (D7a). El sistema de HPLC debe cumplir con los siguientes criterios:

a) Ausencia de picos en la región de las TC durante las corridas hechas sin inyección de muestra o inyectando solamente el buffer (7,29).

b) Señal/ruido >10 (7,29).

c) Línea base o resolución cerca de la línea base de las TC, la resolución entre oxitetraciclina y tetraciclina debe ser mayor de 90% (la altura del valle al pico) (7,29).

d) Los tiempos de retención de los residuos de TC deben ser estables, con menos de 0.1min de cambio entre las soluciones cromatográficas de los estándares de TC inyectados en varias corridas diferentes (7,29).

e) Las curvas de linealidad estándares deben ser obtenidas. Al calcular los valores para la calibración, éstos deben coincidir con los valores actuales con menos de 10% de variación (7,29).

3. Preparación de controles

Para control se debe utilizar leche entera y cruda de vaca (fresca o previamente refrigerada, que no muestre signos de acidez o descomposición) (7).

a) Control Negativo - leche libre de TC.

b) Control Positivo - leche fortificada con 15,30 y 60 η g de TC/ml agregando, respectivamente, 75,150 y 300 μ l de solución estándar de TC combinadas (D1dii) a alícuotas de 5ml de leche (7).

Analizar controles positivo y negativo al inicio para irse familiarizando con el método. Analizar los controles positivo y negativo por separado el día de análisis como parte del aseguramiento de la calidad del método (7,29).

4. Preparación de la muestra

a) Método 1

i. Transferir 5.0 ± 0.1 ml de la leche a analizar en un tubo de centrifuga de 15ml y centrifugar 15min a 1500rpm a 10°C para separar la crema (7). Si se carece de centrifuga con temperatura controlada se puede utilizar una centrifuga más grande y colocar los tubos con la muestra dentro de frascos con hielo picado, de manera que formen una camisa alrededor del tubo y así disminuir la temperatura. Es importante que los frascos tengan un peso equivalente para no descalibrar la centrifuga.

ii. Transferir la parte de la leche descremada a un tubo limpio de centrifuga de 15ml utilizando una pipeta pasteur. Mientras está fría la leche, atravesar la capa de grasa sólida con la pipeta y decantar la leche descremada. Descartar la grasa. Agregar 10ml de buffer de succinato de sodio (D1f) a la leche descremada (D1e) para terminar de desgrasar la leche, tapar el tubo y mezclar el contenido invirtiendo el tubo varias veces, y centrifugar 30min a 1500rpm a 10°C (7). Es muy importante mantener la muestra a temperaturas inferiores de 10°C para una mejor recuperación de las TC.

iii. Filtrar el sobrenadante en una jeringa con filtro.

iv. Guardar la muestra en refrigeración hasta el momento de pasarla por la mini-columna.

b) Método 2

i. Transferir 2.0 ± 0.1 ml de la leche a analizar en un tubo de centrifuga, adicionar 20ml de Buffer EDTA-McIlvaine (D1c) a 4°C y 3ml de mezcla Hexano: Diclorometano (D1j). Mezclar y centrifugar 30min a 2400rpm a 4°C para separar la crema (50). Si se carece de centrifuga con temperatura controlada se puede utilizar una centrifuga más grande y colocar los tubos con la muestra dentro de frascos con hielo picado, de manera que formen una camisa alrededor del tubo y así disminuir la temperatura. Es importante que los frascos tengan un peso equivalente para no descalibrar la centrifuga.

ii. Transferir la parte de la leche descremada a un tubo limpio y agregar al precipitado 10ml más de Buffer de McIlvaine (4°C) para terminar de desgrasar la leche, tapar el tubo y mezclar el contenido invirtiendo el tubo varias veces, y centrifugar 30min más a 2400rpm a 4°C (50). Es muy importante mantener la muestra a temperaturas inferiores de 4°C para una mejor recuperación de las TC.

iii. Recolectar el sobrenadante y mezclar con el anterior. Medir el volumen total.

iv. Agregar la solución de ácido tricloroacético (D1k) en un volumen igual al 10% del volumen total del sobrenadante. Mezclar la muestra por un minuto.

v. Colocar la muestra en una cama de hielo por 15 min.

vi. Filtrar la muestra a través del filtro de nylon en un equipo de vacío.

vii. Mantener la muestra a 4°C hasta pasarla a través de la mini-columna.

Nota: es muy importante mantener la muestra a temperaturas inferiores a 4°C debido a que lo contrario precipitan los reactivos, no se pueden pasar a través de la mini-columna y se pierde parte de la muestra.

5. Preparación y acondicionamiento de la mini-columna

a) Mini-columna de resina de metal quelada - las mini-columnas se pueden preparar simultáneamente por grupos; de 10-14 soluciones se pueden extraer en 8 horas. Preparar las mini-columnas como se indica (Ver anexo No. 1):

i. Agitar la botella que contiene la resina de metal quelado (D1e) hasta obtener una suspensión homogénea (7).

ii. Transferir dos alícuotas de 0.7ml de la resina de metal quelado a la mini-columna utilizando una pipeta automática, con un tip de 1ml, al cual se le ha cortado 2-3mm de la punta para incrementar el tamaño del agujero (7).

iii. Abrir la parte de debajo de la mini-columna y dejar pasar buffer de succinato de sodio (D1f) a través de ella. Agregar o remover resina de modo que el volumen de la cama sea de 1.0-1.2ml. Lavar la resina 3 veces con 2ml de H₂O y luego agregar 2ml de solución de CuSO₄ (D1g). Lavar nuevamente la mini-columna con 2ml de H₂O. El volumen de la cama debe ser de 1.0-1.2ml, con un espacio de 0.7ml de la punta azul para la absorción del Cu⁺². Un tercio de la parte de debajo de la mini-columna debe permanecer blanca. La mini-columna opera utilizando fuerza de gravedad, la misma mini-columna puede ser utilizada ≤ 6 veces (7,8).

b) Mini-columna desechable SPE Octadecyl C₁₈ (JT Baker o Whatman) - Las mini-columnas se pueden preparar por grupos y sujetarlas con pinzas en un soporte. Preparar las mini-columnas como se indica (Ver anexo No. 2):

i. Agregar 3 x 2 ml de metanol, seguidos por 3 x 2 ml de buffer EDTA-McIlvaine. No dejar que la columna se seque durante y después del paso de acondicionamiento (50,51).

La mini-columna opera utilizando fuerza de gravedad o aspirando a través de la columna a un máximo de 10ml/min. La misma mini-columna puede ser utilizada de 2 a 3 veces (50).

6. Extracción

a) Mini-columna de resina de metal quelada (D5a) - seguir los siguientes pasos (Ver anexo No. 3):

i. Agregar el sobrenadante limpio directamente a la mini-columna. Si el reservorio no es lo suficientemente largo, agregar el sobrenadante en 2 grupos. Dejar que la solución se filtre. No mover la cama de la mini-columna excesivamente. Luego que no sea visible el líquido por encima de la resina, proceder al siguiente paso. No dejar que la mini-columna se seque totalmente (7,8).

ii. Lavar la mini-columna en forma de secuencia con 2ml de succinato de sodio, 2ml de H₂O, 2ml de metanol y 2ml de H₂O (7).

Nota: los siguientes pasos son críticos para una buena recuperación. Usar solamente fuerza de gravedad (7).

iii. Cuidadosamente agregar 0.70 ± 0.005 ml de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl a la mini-columna. Dejar caer el buffer por las orillas de la columna sin alterar la cama de la misma. Descartar el líquido que salga luego de atravesar la columna (7).

iv. Eluir las TC de la columna utilizando 2.5 ± 0.05 ml adicionales de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl. Guardar la solución eluída (que debe ser azul) en un tubo y refrigerar hasta que sea analizada o coleccionar la solución eluída directamente en la cámara superior de retención o en los ultrafiltros, y luego proseguir a la ultrafiltración. La mini-columna debe estar blanca en este punto (7).

v. Limpiar la mini-columna con 2-3ml de buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl. Lavar la columna 3 veces con 2ml de H₂O y luego con 5-10ml de etanol. Cubrir la columna con exceso de etanol al 20% v/v y guardar en el refrigerador. Antes del siguiente uso, mezclar el contenido de la columna en un vortex o invertir la columna varias veces para resuspender la resina de metal quelado completamente. Cuando se reutilice la mini-columna, abrir la parte superior de la misma y comenzar desde el paso 5aiii. No reutilizar mini-columnas que han sido

expuestas a leche ácida o excesiva cantidad de TC ($>5\mu\text{g}$). Las mini-columnas son reutilizables al menos por 2 meses si son guardadas apropiadamente (7,8).

Nota: las soluciones recolectadas en 6aiv no son estables y desarrollan precipitado, lo cual puede tapar y destruir la columna del cromatógrafo líquido. Por esta razón hay que desproteinizar las soluciones a analizar antes de inyectarlas en el HPLC (7,8).

vi. Tapar e invertir el matraz que contiene la solución 6aiv, varias veces para asegurar que esté bien homogenizada. Centrifugar de 30-90min a 5000rpm. Pare la centrifugación cuando aproximadamente 1ml del filtrado esté en la parte inferior (7,8). Este paso se puede omitir si el extracto del paso 6aiv que ha sido recolectado en tubo es refrigerado hasta el análisis en el HPLC y luego filtrado a través de un filtro de Nylon 66 de $0.2\mu\text{m}$, inmediatamente antes de la inyección en el HPLC (7,8).

b) Mini-columna desechable SPE Octadecyl C_{18} (JT Baker o Whatman) - seguir los siguientes pasos (Ver anexo 2):

i. Agregar la muestra filtrada directamente a la mini-columna activada (5b). Si el reservorio no es lo suficientemente largo, agregar el sobrenadante en grupos. Dejar que la solución se filtre. No dejar que la mini-columna se seque totalmente (7,8).

ii. Lavar la mini-columna con 2ml de H_2O para lavar todas las impurezas de la mini-columna (51).

iii. Eluir las TC de la columna utilizando $2.0 \pm 0.05\text{ml}$ adicionales de ácido oxálico en metanol (D11). Guardar la solución eluída en un frasco plástico ámbar y refrigerar hasta que sea analizada o colectar la solución eluída e inyectarla directamente en el HPLC (50).

iv. Limpiar la mini-columna con 2-3ml de ácido oxálico en metanol. Lavar la columna 3 veces con 2ml de H_2O . No reutilizar mini-columnas que han sido expuestas a leche ácida o excesiva cantidad de TC. Las mini-columnas son reutilizables al menos por 3 veces si son guardadas apropiadamente (7,8).

7. Determinación en el cromatógrafo

Inyectar volúmenes iguales de cada una de las soluciones cromatográficas estándar de TC y de las soluciones filtradas de leche a analizar. El monitor UV debe estar con absorbancia a 355nm (Ver anexo No. 4) (7).

a) Gradiente de fase móvil (Ver tabla No. 2).

i. 0min: equilibrio con 100% de solvente A, a una tasa de fluidez de 1ml/min. El día de análisis acondicionar paulatinamente la columna del cromatógrafo, que se encuentra en 100% de acetronitrilo, a 100% de solvente A.. El equilibrio del solvente A es lento. Realizar una corrida con buffer para remover cualquier partícula no deseada en la columna.

ii. 0-1min: 100% de solvente A a 1ml/min.

iii. 1-6 min: rampa linear de solvente A-acetonitrilo-metanol (70+22+8).

iv. 6-17 min: solvente A-acetonitrilo-metanol (70+22+8) a 1ml/min. El tiempo se puede prolongar si es necesario eluir todas las tetraciclinas.

v. 17-19 min: rampa linear a 100% de solvente A con un aumento linear de la tasa de flujo de 1 a 1.5ml/min.

vi. 19-20 min: 100% solvente A con una disminución linear de la tasa de flujo de 1.5 a 1ml/min.

vii. 20-24 min:100% solvente a a 1ml/min

Tabla No. 2
Gradientes de Fase móvil

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua	% Acetonit	% Solv. A	Flujo (ml/min)
0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	1.0
1.0	0.0	0.0	0.0	100.0	1.0
6.0	8.0	0.0	22.0	70.0	1.0
17.0	8.0	0.0	22.0	70.0	1.0
19.0	0.0	0.0	0.0	100.0	1.5
20.0	0.0	0.0	0.0	100.0	1.0
24.0	0.0	0.0	0.0	100.0	1.0

Inyectar la muestra de leche a analizar cuando la fase móvil es 100% el solvente A, a una tasa de fluidez de 1ml/min.

Recalibrar la columna del HPLC ≥ 4 min (para estabilizar los tiempos de retención) a las condiciones iniciales antes de inyectar la siguiente muestra (7,29).

Sistemas sin dosificador automático de He pueden presentar problemas de desgaseado, los cuales típicamente aparecen como picos largos, amplios y redondeados en el tiempo de elusión de la oxitetraciclina. Si los problemas de desgaseado ocurren durante el gradiente cromatográfico, agregar pequeñas cantidades de acetonitrilo (2-5%) al solvente A para incrementar el tiempo de equilibrio entre corridas.

Al finalizar la corrida acondicionar la columna del HPLC nuevamente a solución de acetonitrilo en forma graduada de solvente A-agua-acetonitrilo, al igual el sistema cromatográfico deberá lavarlo con H₂O (10-15min a 1ml/min) para prevenir la precipitación del ácido oxálico causado por concentraciones elevadas de solvente orgánico (7). Si va a seguir analizando tetraciclinas al día siguiente, puede dejar el cromatógrafo a flujo continuo de solvente A a una tasa de fluidez de 0.3ml/min toda la noche. Asegurarse de dejar preparado suficiente solvente A para evitar que el HPLC aspire aire y se formen burbujas en el sistema cromatográfico.

b) Inyección de muestras - dependiendo de la sensibilidad del detector, inyectar 0.5-1.0ml de la muestra filtrada. Para una exacta cuantificación, inyectar volúmenes idénticos cada vez. Utilizar H₂O para lavar el inyector y así evitar la precipitación de sales. Inyectar la solución cromatográfica estándar de TC cada 5-10 inyecciones de muestras para verificar los tiempos de retención (7,8,29).

Realizar al inicio de cada día de trabajo 1-2 corridas en blanco antes de inyectar la solución cromatográfica patrón de TC o las muestras para asegurar la ausencia de interferentes cerca del tiempo de retención de las TC (7,8,29).

c) Identificación del pico: las TC eluyen en el siguiente orden: minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina, metaciclina y

doxyciclina (*Nota:* los tiempos de retención tienden a cambiar ligeramente entre más usadas son las columnas y el número de inyecciones) (7).

Definir ventanas cercanas para la identificación de los picos, ya que las tetraciclinas eluyen muy cerca unas de otras. Todos los picos de residuos que aparezcan deben tener tiempos de retención no mayores de 0.05min de diferencia con los tiempos de retención observados en los estándares definidos (7).

Algunos metabolitos pueden interferir con el análisis por ser compuestos parecidos, la administración oral de TC en vacas puede resultar con la aparición de dos tetraciclinas y picos tempranos (por ejemplo epitetraciclina), la cual eluye muy cerca de oxitetraciclina (7).

Ocasionalmente un pico endógeno puede aparecer entre oxitetraciclina y tetraciclina. Esto puede ser causado por elevadas concentraciones de riboflavina en la leche. El tiempo de retención es de 0.1min antes que el de la tetraciclina. Para reducir la interferencia de la riboflavina se debe lavar la columna con el doble de volumen de succinato de sodio en el proceso de extracción (esto disminuye un poco la cantidad de oxitetraciclina y tetraciclina recuperada) (7).

d) Estabilidad del extracto: las TC no son estables a temperatura ambiente y con condiciones ácidas (en el buffer de McIlvaine-EDTA-NaCl). La tetraciclina y clortetraciclina se degradan $\geq 50\%$ en 24hrs. Para evitar este problema, se debe centrifugar a 10°C. Refrigerar los extractos o analizarlos antes de 4hrs después de su preparación. Las soluciones que utiliza la mini-columna deben ser refrigeradas \leq de 2 días o congeladas \leq 1 semana, presentando solamente pequeños cambios en la concentración de las TC (7).

8. Cálculos

Realizar la curva estándar para cada una de las TC a partir de los cromatogramas de las soluciones estándar de TC (7,29).

Calcular la concentración de TC utilizando regresión lineal como se indica:

$$C = mP + b$$

Donde C es igual a la concentración de TC por extracto inyectado, $\eta\text{g/ml}$, y P al área del pico de la TC o la altura del pico.

Cada curva de estándar de TC debe ser lineal.

Para el método 1, calcular la concentración de TC en la leche dividiendo la concentración inyectada de la muestra entre 2.5 que es el factor de dilución usado en el procedimiento de la mini-columna, el cual reduce el volumen de la porción analizada de 5 a 2.0ml.

E. Diseño de investigación

El tipo de investigación es descriptiva, realizada en tres fases

1. Fase I: Ajuste de las condiciones cromatográficas (fase móvil).

Las mezclas patón de las tres tetraciclinas (20-150 $\eta\text{g/ml}$) fueron sometidas al análisis cromatográfico y se observaron los tiempos de retención (picos) de cada tetraciclina. Por prueba y error se ajustó el gradiente de la fase móvil hasta que se logró la separación de los picos ($\Delta\text{TR} \geq 1\text{min}$). Se observó que ligeras variaciones en la fase móvil (2%) aumentan los tiempos de retención pero se sigue logrando la separación.

También se realizaron pruebas a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (20-25°C), 30°C y 35°C; se obtuvo una mejor separación a temperatura ambiente y se observó que a 30°C se mantienen los tiempos de retención, pero los porcentajes de error estándar aumentan, tanto para la oxitetraciclina como para la tetraciclina. A 35°C no se logró obtener una línea base recta por lo que no se llevaron a cabo los análisis.

2. Fase II: Se determinaron los valores de los parámetros analíticos que se utilizan para validar el método, los cuales fueron: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, rango, robustez, reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad.

a) Precisión - se inyectaron cinco días las mezclas de estándares de tetracilinas con diferentes concentraciones y las muestras de leche contaminada

con concentraciones de TC conocidas. De esta manera, se obtuvo la desviación estándar tanto de los estándares como de las muestras. A menor desviación estándar mayor es el grado de precisión del método.

b) Exactitud - se inyectaron muestras de concentraciones conocidas de tetracilinas y luego fueron analizadas contra soluciones estándar y un blanco, para asegurar que no existiera ningún interferente. Posteriormente es calculada como el porcentaje de recuperación del analito.

c) Linealidad - se preparó una solución patrón de tetracilinas y se realizaron diluciones de concentraciones diferentes, entre 150ng/ml y 20ng/ml para las soluciones estándar y muestras contaminadas con 60ng/ml a 15mg/ml. Estas soluciones se inyectaron por duplicado. Con los resultados obtenidos se graficaron los valores de concentración (eje x) vrs. la altura de los picos (eje y) se obtuvo la ecuación de la recta y se calculó el coeficiente de correlación, el cual, entre más cerca esté del valor ± 1 , indica una mejor linealidad del método. Luego se realizó una significación del coeficiente de correlación para comparar la correlación entre resultados y observar si es significativa en el nivel de confianza del 95% (52).

d) Sensibilidad - se inyectaron muestras de estándares y de leche contaminada con concentraciones conocidas y se determinó la altura del pico de cada tetraciclina. Con los datos obtenidos en linealidad, se realizó una curva de calibración para los estándares y otra para las muestras, luego se calcularon las pendientes de las rectas (b) al graficar los valores de la concentración de la oxitetraciclina y tetraciclina en el eje "x" y los valores de la absorción de la luz UV expresada como la altura en el eje "y".

e) Reproducibilidad - se inyectó 5 días diferentes los estándares de TC de diferentes concentraciones y las muestras de leche con concentraciones conocidas, se calculó la media, la desviación estándar y el porcentaje de error

respectivamente El porcentaje de error no debe ser mayor del 5% para métodos de esta naturaleza.

f) Repetibilidad - se inyectó, en un mismo día, 7 veces una solución estándar y 7 veces una muestra de leche de concentración conocida. Se calculó el porcentaje de error, que debe ser menor del 5% para establecer la repetibilidad de cada tetraciclina.

g) Robustez - se realizó un cuadro comparativo donde se muestran los ligeros cambios de condiciones a las que se sometió el método para determinar en qué forma afectan a la reproducibilidad del mismo. También se presenta otro cuadro en los que se comparan los resultados obtenidos por un laboratorio llevando a cabo el método de referencia para el análisis de TC y los resultados obtenidos al realizar el análisis de TC con el método utilizado en la tesis (modificado).

h) Límite de detección - se realizó un estudio de ensayo-error con diferentes concentraciones de la mezcla patrón de estándares de TC hasta que ya no se observara un pico medible en los cromatogramas. Como el límite de detección es dependiente del ruido del aparato, las corridas de tetraciclinas no se realizaron hasta que se obtuviera una señal de ruido y drift menor de 10 y el blanco presentara una línea base recta.

i) Límite de cuantificación - es la mínima concentración de tetraciclinas en una muestra en la cual aún se mantuvo la linealidad del método. Con los resultados de la desviación estándar de la linealidad se determinó el límite de cuantificación (53).

j) Selectividad y especificidad - con el blanco y el control negativo de la muestra de leche se observó la presencia de otros compuestos que pudieran afectar en el análisis de las tetraciclinas.

3. Fase III: se realizó un análisis de costos tanto fijos como de insumos para llevar a cabo la implementación y validación del método de tetraciclinas en leche fresca de vaca; así como un precio estimado de la prueba.

Tabla No. 3
Análisis de Costos

Costos Fijos	Insumos
Costo de instalaciones (agua, luz, teléfono).	Patrones de Tetraciclinas
Sueldos del analista	Reactivos
Mantenimiento y reparación del equipo	Columna
Depreciación del detector e integrador	

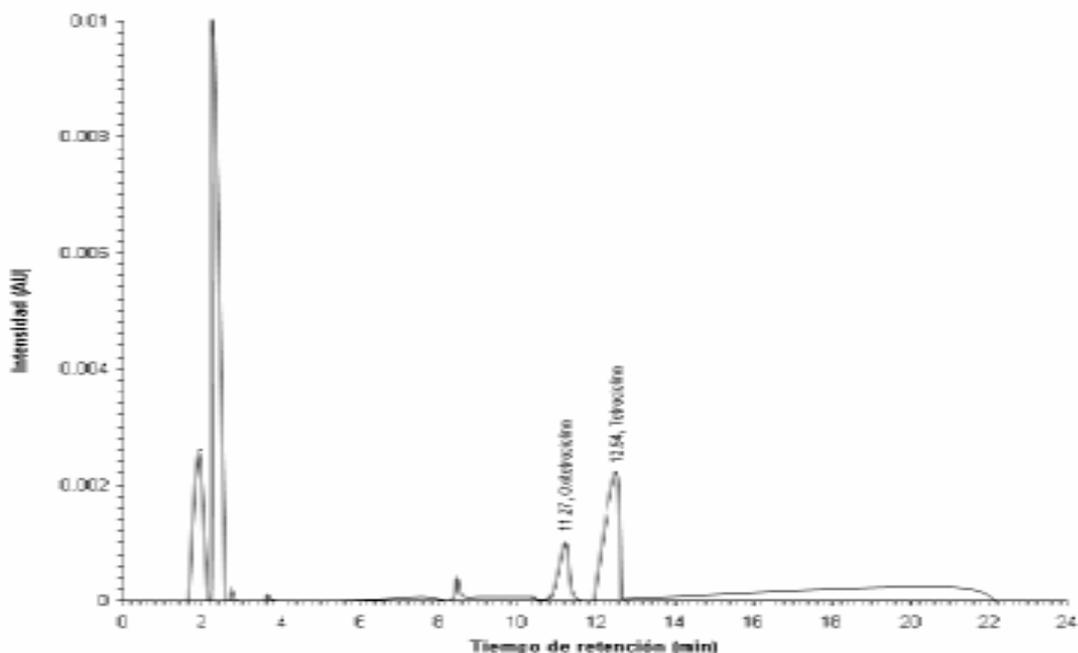
VIII. RESULTADOS

A. Optimización de condiciones cromatográficas (Anexo No.6)

Utilizando las soluciones patrón preparadas se obtuvo un cromatograma para cada una de las tetraciclinas analizadas (oxitetraciclina y tetraciclina), conociéndose de esta manera el tiempo de retención de cada una. En la gráfica No. 1 se presenta el cromatograma con los tiempos de retención de las mismas analizadas Para oxitetraciclina es de 11.31 ± 0.20 min y para tetraciclina de 12.67 ± 0.24 min (Gráfica No.2).

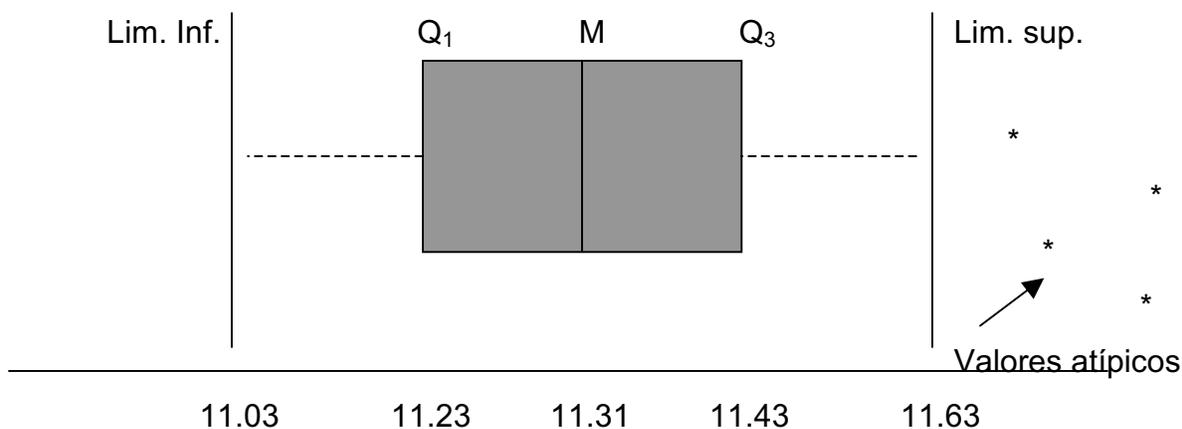
Gráfica No. 1

Cromatograma del análisis simultáneo de oxitetraciclina y tetraciclina

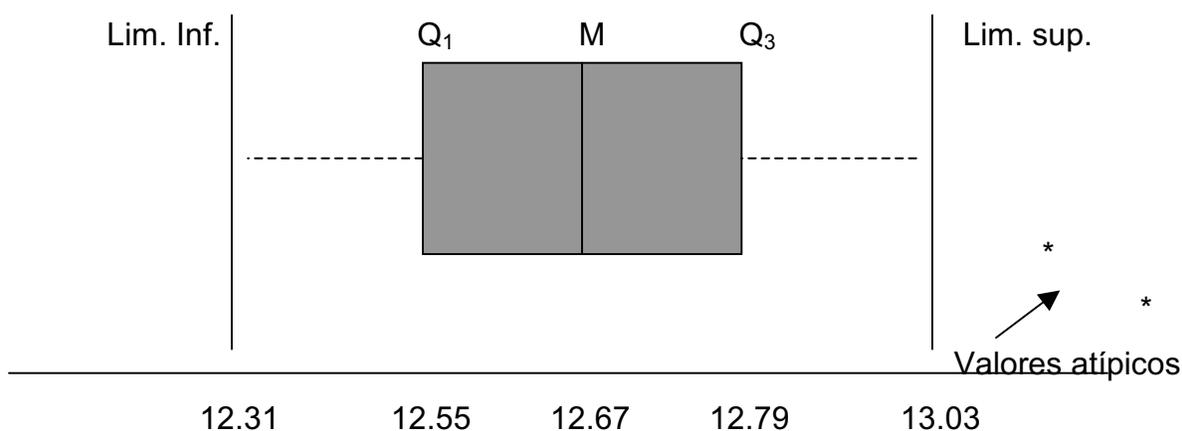


Se calcularon los valores atípicos, el límite inferior y el límite superior para los tiempos de retención de los estándares de la oxitetraciclina y la tetraciclina. Se observó que para la oxitetraciclina, el 86% de los datos se encuentran a una desviación estándar de la media y el 100 % a tres desviaciones estándar de la media. Para la tetraciclina el 93% de los datos se encuentran a una desviación estándar y el 100% a dos desviaciones estándar de la media.

Gráfica No 2
Tiempos de retención de Estándares de Oxitetraciclina



Tiempos de retención de Estándares de Tetraciclina

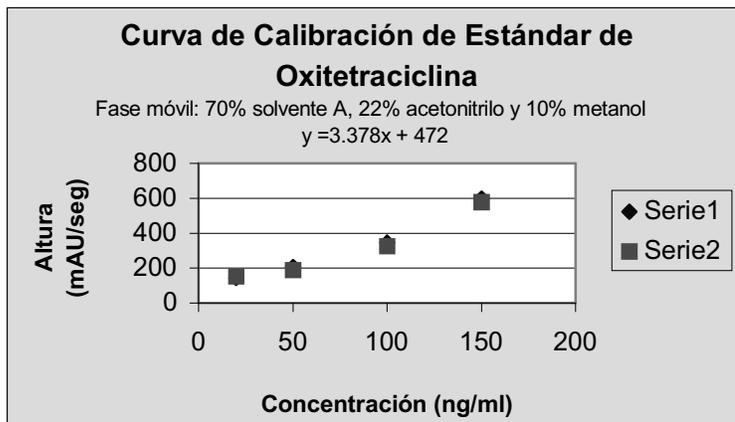
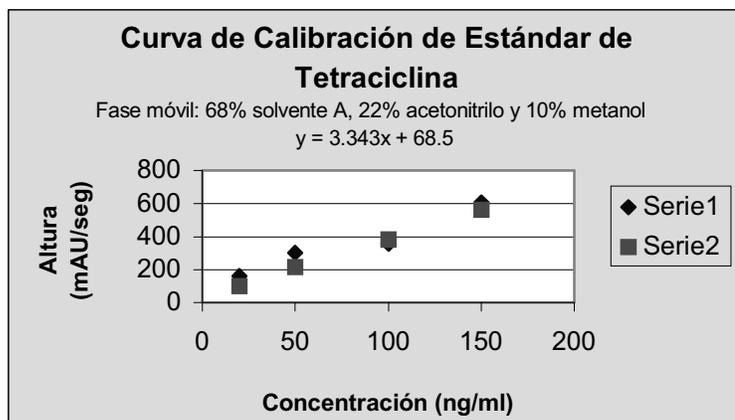
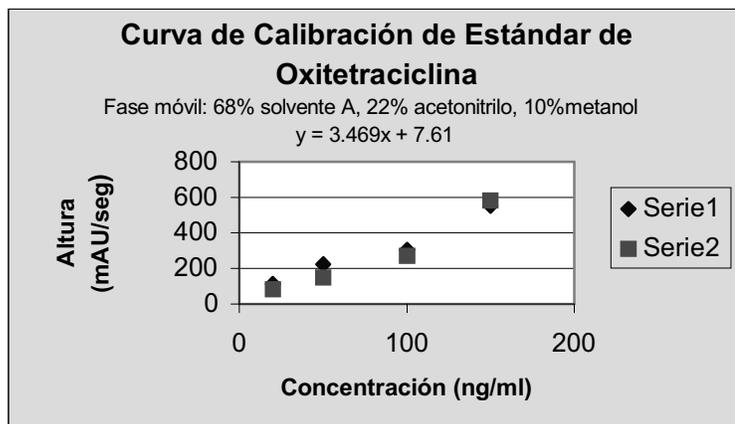


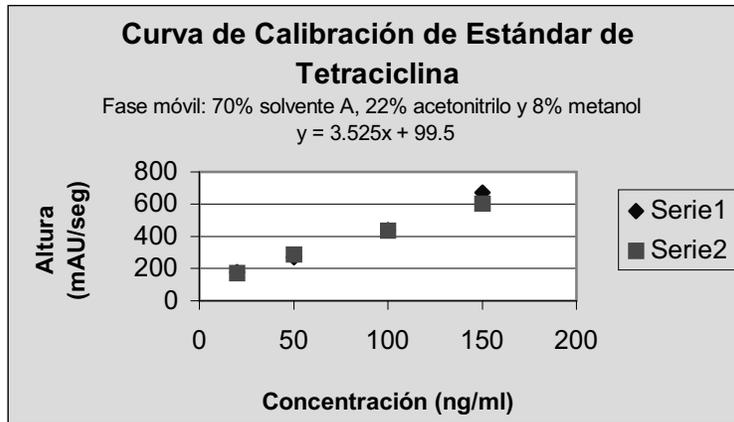
Posteriormente se probaron varios gradientes de fase móvil para obtener la mejor separación de las tetracilinas y con esto buenas curvas de calibración (Gráfica No. 3). Con la siguiente fase móvil se logró la mejor separación de las tetracilinas: 0-1min 100% de solvente A con flujo de 1.0ml/min; 6-17min 8% de metanol HPLC, 22% de acetonitrilo HPLC y 70% de solvente A con flujo de 1.0ml/min; 19-20min 100% de solvente A con flujo de 1.5ml/min y de 20-25min 100% de solvente A con flujo de 1.0ml/min (Anexo No.5) El solvente A

corresponde a una solución de ácido oxálico 10mM con 3% de acetonitrilo (Anexo No. 7).

Gráfica No. 3

Curvas de calibración de estándares de tetraciclinas

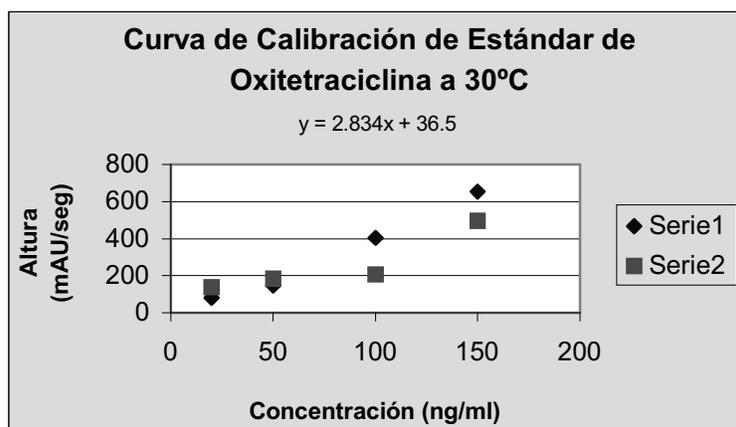


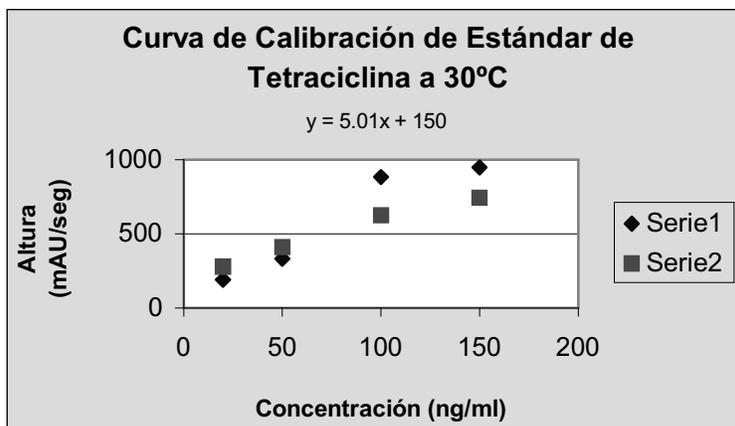


Nota: los análisis se llevaron a cabo por duplicado y a 25°C.

Luego de haber seleccionado la fase móvil, se realizaron pruebas a diferentes temperaturas: 20-25°C (temperatura ambiente), 30°C y 35°C (Anexo No. 7); se obtuvieron mejores curvas de calibración a temperatura ambiente (20-25°C) que a 30°C (Gráfica No. 4). Se mantienen los tiempos de retención pero los porcentajes de error estándar aumentan, tanto para la oxitetraciclina como para la tetraciclina. A 35°C no se logró obtener una línea base recta por lo que no se llevaron a cabo los análisis.

Gráfica No. 4
Curva de calibración de los estándares a 30°C





Nota: los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

B. Optimización de las condiciones del método (Anexo No.8)

Del método oficial de la AOAC para el análisis de múltiples residuos de tetracilinas en leche fresca de vaca se realizaron varias modificaciones:

1. Se probó un método alternativo para la preparación de la muestra (el método 2), con el fin de encontrar el método más fácil y que mostrara una mejor recuperación dentro de los límites de la validación. Se demostró que el método 1 es un método más fácil, seguro, con menos puntos críticos durante el análisis de la muestra y mucho más económico que el método 2, en el cual se observó una mejor reproducibilidad pero menor precisión, exactitud, lleva muchos más pasos y tiempo la preparación de la muestra, es más alto el costo de la realización, el hexano, el diclorometano y el ácido tricloroacético son reactivos que requieren de mayor precaución que la habitual y, finalmente, la temperatura es un punto crítico para el análisis de la muestra, debido a que ésta se tiene que mantener a temperaturas inferiores a 4°C ya que, de lo contrario, se precipita y no se puede pasar por la mini-columna, disminuyendo así el volumen de muestra analizada y con esto las concentraciones.

Como se observa en la tabla No 4, las concentraciones calculadas para las muestras fortificadas con 60ng/ml, realizando el método 1, las dos tetracilinas son inferiores a lo esperado, por lo que el porcentaje de recuperación es menor. En cambio para las muestras fortificadas, realizando el método 2, las TC muestran

concentraciones mayores y porcentajes de recuperación algunos muy superiores al 100%.

La tabla No. 5 muestra la robustez del método al someterlo a ligeras variaciones para obtener las mejores condiciones cromatográficas, así como el mejor método de extracción de las tetraciclinas en la leche.

Tabla No. 4

Concentraciones de tetraciclinas en 7 muestras de leche fresca fortificada

Concentraciones obtenida del estándar de 100ng/ml		Método 1 Leche fortificada con 60ng/ml		Método 2 Leche fortificada con 60ng/ml	
Oxitetraciclina	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Tetraciclina
87.478	81.926	35.586	35.914	78.831	130.826
86.938	79.614	38.667	34.065	55.858	104.815
99.11	84.007	37.208	33.14	51.128	86.895
89.1	99.267	31.803	36.608	118.696	170.13
98.289	95.568	27.208	34.527	36.939	77.64
94.505	95.799	35.046	34.758	74.101	88.63
90.451	97.417	32.073	33.371	77.479	90.942
%ES = 5.243	%ES = 8.483	%ES = 10.584	%ES = 3.402	%ES = 34.652	%ES = 28.267

Tabla No.5

Resultados obtenidos en el análisis de Tetraciclinas bajo una ligera variedad de condiciones*

Paso	Condiciones	Estándar Oxitetraciclina	Estándar Tetraciclina
1	Fase móvil 70-22-8 25°C	%ES	3.305
		CC	0.978
		ER	$Y = 3.38x + 47.2$
	Fase móvil 68-22-10 25°C	%ES	11.896
		CC	0.984
		ER	$y = 3.34x + 68.5$

2	Fase móvil 70-22-8 30°C	%ES	27.254	14.609
		CC	0.981	0.972
		ER	$y = 2.83x + 36.5$	$y = 5.01x + 150$
3	Método 1	s	5.987	1.963
		%ES	10.584	3.402
		%RM	56.569	57.71
4	Método 2	s	16.271	20.188
		%ES	34.652	28.267
		%RM	46.955	71.418

*Los análisis se llevaron a cabo por duplicado

%ES = porcentaje de error estándar; CC = coeficiente de correlación; ER = ecuación de la recta; s = desviación estándar;
%RM = porcentaje de recuperación de muestra

2. Se utilizaron Mini-columnas desechables SPE Octadecyl (C_{18}) en vez de la columna de metal quelada con sulfato de cobre, debido a que el costo de 5ml de la resina de metal quelada es muy elevado y no está disponible en el mercado local. Se tienen que manejar con mucho cuidado y tener un lugar en la refrigeradora donde guardarlas ya que son reusables por 6 veces pero tienen un tiempo de vida de 2 meses; además, no se pueden volver a utilizar las columnas que hayan sido expuestas a leche ácida o cantidades excesivas de tetraciclinas ($>5\mu\text{g}$). Al observar todos estos inconvenientes se buscó en la bibliografía alternativas de mini-columnas y se encontraron las columnas desechables de Octadecyl (C_{18}) las cuales se utilizan para la extracción de antibióticos, entre ellos las tetraciclinas. Se pasaron estándares de tetraciclinas de diferentes concentraciones por las mini-columnas activadas y se inyectaron los extractos; se observaron tiempos de retención y altura de picos muy semejantes a los estándares (Tabla No.6). Lo anterior nos indica que las mini-columnas de Octadecyl son una buena opción, debido a que ocupan poco espacio, el cuidado para el almacenaje es mínimo, son más económicas, tiene un tiempo de caducidad más largo, pueden ser utilizadas para la extracción de otros analitos, se pueden reutilizar hasta 3 veces y se obtienen buenos resultados en la recuperación de la muestra.

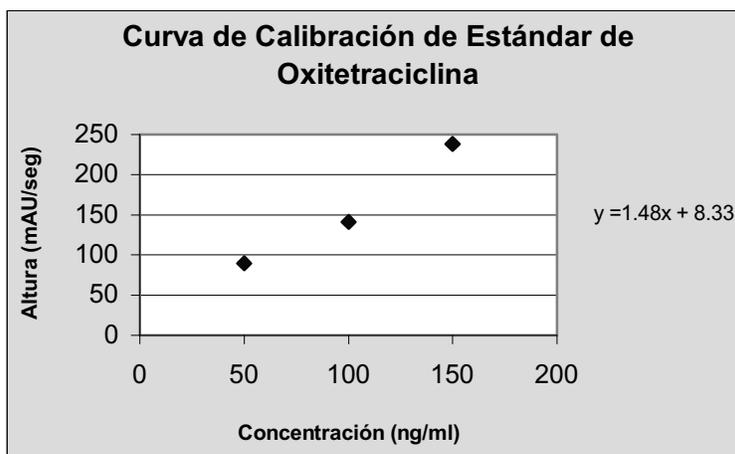
Tabla No.6
Recuperación de estándares 150ng/ml utilizando mini-columna de
Octadecyl (C₁₈)

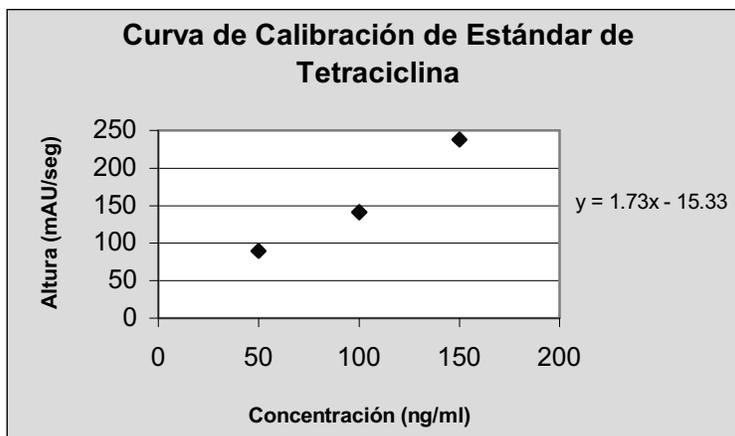
Antibiótico	Estándar	Muestra 1	Muestra 2
Oxitetraciclina			
Tiempo de Retención (min)	11.65	11.61	11.70
Área del pico (mUA/seg)	643	600	603
Tetraciclina			
Tiempo de Retención (min)	13.14	13.09	13.07
Área del pico (mUA/seg)	595	536	565

C. Determinación de parámetros de validación (Anexos No.8 y 9)

Para determinar los parámetros de validación se corrieron los estándares de oxitetraciclina y tetraciclina para realizar la curva de calibración. Esta curva se utilizó para calcular las concentraciones de tetraciclina en la leche (Gráfica No.5).

Gráfica No. 5
Curvas de Calibración





1. Precisión: en la tabla No. 7 se observa que las desviaciones estándar para las diferentes concentraciones del estándar de oxitetraciclina se encuentran entre 17.90 y 11.46; para las de tetraciclina están entre 22.10 y 8.60 lo que nos indica un grado de precisión relativamente bueno para los estándares. Las muestras de leche fortificadas con los antibióticos muestran desviaciones estándar entre 19.51 y 10.31 para la oxitetraciclina y entre 22.83 y 9.06 para la tetraciclina.

Tabla No. 7

Valores estadísticos utilizados para la validación del método

Antibiótico	Concentración	Media	Desv. Est.	% ES
Altura (mUA/seg)				
Estándar	100	316	17.90	5.664
de	50	163	14.792	9.074
Oxitetraciclina	20	101	11.465	11.308
Coefficiente de correlación		0.992		
Estándar	100	253	22.105	8.723
de	50	133	12.192	9.194
Tetraciclina	20	73	8.602	11.784
Coefficiente de correlación		0.995		
Oxitetraciclina	60	125	10.315	8.252
en Leche	30	69	15.942	23.172

en Leche	15	38	19.514	51.352
Coefficiente de correlación		0.965		
Tetraciclina	60	179	15.982	8.908
En	30	87	9.064	10.442
Leche	15	43	22.826	53.582
Coefficiente de correlación		0.996		

2. Exactitud: como se observa en la tabla No. 8, las concentraciones de tetraciclinas en las leches fortificadas fueron inferiores a los valores conocidos, por lo que los porcentajes de recuperación de los analitos se encuentran por debajo del 100% (Anexo No. 9). Los blancos y controles negativos no mostraron ningún pico en el área de los tiempos de retención de las tetraciclinas.

Tabla No. 8

Valores estadísticos utilizados para la validación del método

Antibiótico	Fortificación de TC	Concentraciones recuperadas			% de recuperación
		Media	Desv. Est.	% ES	
Oxitetraciclina	60	31.532	2.788	8.842	52.554
	30	16.343	4.309	26.36	54.478
	15	8.462	4.402	51.978	56.458
Coefficiente de correlación		0.967			
Tetraciclina	60	35.454	7.739	21.828	59.09
	30	19.591	3.817	19.482	65.302
	15	11.529	5.853	50.767	77.006
Coefficiente de correlación		0.961			

3. Linealidad: como se observa en la tabla No. 7, el coeficiente de correlación para el estándar de la oxitetraciclina es de 0.992 y para el del estándar de la tetraciclina corresponde a 0.995. Para la concentración de oxitetraciclina en leche el coeficiente de correlación correspondió a 0.965 y 0.996 para la de tetraciclina respectivamente. Al consultar con las tablas de significación del coeficiente de

correlación para estas variables y grados de libertad, el coeficiente de correlación debe tener un valor mayor de 0.950 por lo que los coeficientes de correlación de los estándares y de las concentraciones de tetraciclinas en leche se consideran significativos a un nivel de confianza del 95%.

4. Sensibilidad: en la gráfica No. 3 se muestran las curvas de calibración de los estándares de tetraciclinas con sus respectivas ecuaciones de la recta. Las pendientes de las rectas poseen valores cercanos a uno, lo que coincide con una linealidad y sensibilidad confiables, que es lo esperado en el método.

5. Reproducibilidad: como se observa en las tablas No. 7 y 8 para las muestras inyectadas en 5 días diferentes, los porcentajes de error son mayores del 5%. Para las alturas de los estándares, el porcentaje de error se encuentra por debajo del 12% y para las concentraciones de TC en las muestras de leche fortificadas con los antibióticos está entre un 8% y un 54%. Se observa que los porcentajes de error aumentan al disminuir la concentración de TC.

6. Repetibilidad: en la tabla No. 4 se muestran los resultados de las concentraciones de 7 inyecciones de una solución estándar y de una muestra de leche de concentración conocida trabajada con los dos métodos. El porcentaje de error es de 5.24% para el estándar de oxitetraciclina y de 8.48% para el estándar de tetraciclina. En lo que se refiere a la concentración de TC en la leche (método 1) el %ES es mayor para la oxitetraciclina y menor para la tetraciclina que los presentados por los estándares. El %ES en el método es menor del 10% por lo que muestra una repetibilidad buena.

7. Robustez: al realizar unos ligeros cambios de condiciones al método se observa una robustez buena en lo que respecta a fase móvil y temperatura; los resultados se muestran en la tabla No. 5. En cambio, los métodos de extracción de las TC presentan una diferencia significativa entre ambos, por lo que sí se ve afectado el % de recuperación. En la tabla No. 9 se presentan los resultados

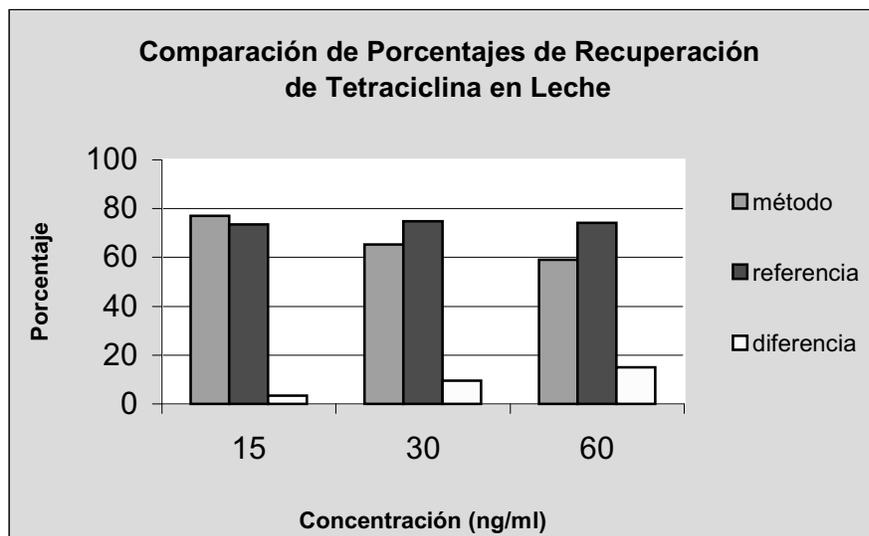
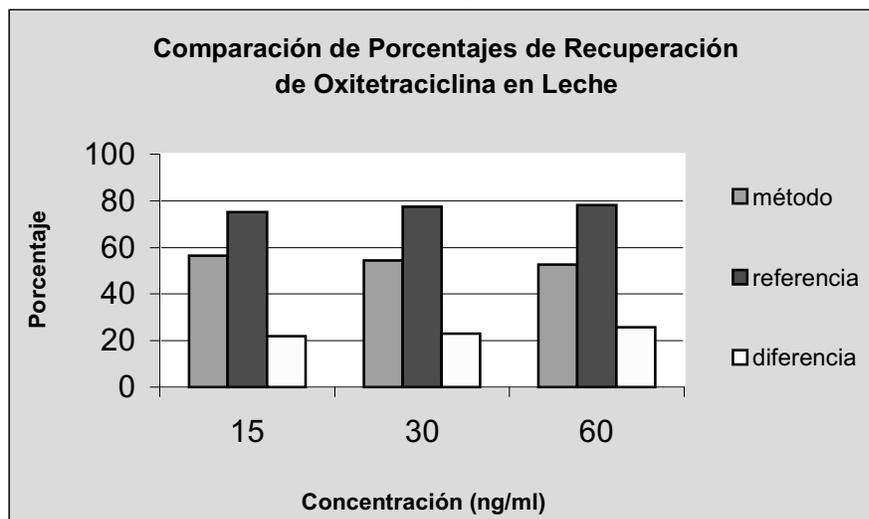
obtenidos al realizar la determinación de residuos de tetraciclinas en leche fortificada utilizando el método de afinidad con metal quelado (laboratorio de referencia) y el método modificado utilizado en la elaboración de esta tesis.

Tabla No.9
Resultados entre el método de referencia y el método modificado utilizado

Método modificado				Método de referencia		
Leche fortificada con 15ng/ml						
antibiótico	% de recuperación	Desviación estándar	% error estándar	% de recuperación	Desviación estándar	% error estándar
Oxitetraciclina	56.458	29.343	51.973	75.2	9.4	12
Tetraciclina	77.006	39.092	50.764	73.6	9.3	13
Leche fortificada con 30ng/ml						
Oxitetraciclina	54.478	14.36	26.365	77.5	6.3	8.2
Tetraciclina	65.30	12.726	19.488	74.8	6.5	8.7
Leche fortificada con 60ng/ml						
Oxitetraciclina	52.554	4.646	8.840	78.2	6.75	8.6
Tetraciclina	59.09	12.901	21.833	74.1	6.4	8.6

Como se presenta en la gráfica No. 6, los porcentajes de recuperación del método modificado en este trabajo son menores que los del laboratorio de referencia que realiza el método original. Los porcentajes de recuperación entre ambas metodologías presentan una diferencia aproximada del 20% para la oxitetraciclina y del 10% para la tetraciclina en las diferentes concentraciones, excepto para la leche fortificada con 15ng/ml de tetraciclina que presenta un porcentaje ligeramente mayor en el método modificado que en el de referencia (Anexo No 10). Sin embargo, debido a que el método presenta una buena linealidad, una precisión y repetibilidad bastante aceptables, se pueden utilizar factores de corrección para los resultados obtenidos. Estos son: 1.8 para la oxitetraciclina y de 1.5 para la tetraciclina, presentando al final resultados de concentraciones con un $\pm 5\%$ de error, que es un valor aceptable.

Gráfica No. 6
Comparación de porcentajes de recuperación



8. Límite de detección: se encuentra en 15ng/ml para las tetraciclinas, ya que a concentraciones menores ya no se observa un pico medible en los cromatogramas.

9. Límite de cuantificación: el método se mantuvo lineal hasta concentraciones de 20ng/ml, ya que a concentraciones menores el método pierde la linealidad. No se pudo calcular el límite de cuantificación con las desviaciones estándar de los blancos ya que éstos no presentaron valores medibles.

10. Selectividad y especificidad: con el blanco y el control negativo de la leche no se presentaron picos en los tiempos de retención de cada una de las tetraciclinas por lo que el método cumple con estos parámetros.

D. Análisis de costos

Se realizó un estimado del costo del montaje y validación del método para determinar dos tetraciclinas en leche fresca de vaca por HPLC. Para esto se tomó en cuenta costos fijos como depreciación del equipo, servicio de agua, luz, teléfono, sueldo del analista, etc.; además, el consumo de reactivos para el aparato, estándares, reactivos para el tratamiento previo de la muestra, etc.

Tabla No. 10
Costos de la implementación y validación del método

Materiales		Valor (Q)
Insumos	Patrones de Tetraciclinas	5.00
	Fase móvil Solvente A-Acetonitrilo-Metanol	2543.49
	Columna LiChrosorb ® RP8	1127.20
	Lavado diario del equipo	1143.00
	Reactivos para tratamiento de la muestra	3286.90
	Método 1	4977.90
	Método 2	94.24
	Material para registro de resultados	186.53
Costos Fijos	Costo de instalaciones(agua, luz, teléfono).	186.53
	Sueldos del analista	
	Mantenimiento y reparación del equipo	
	Depreciación del detector e integrador	

De acuerdo a los costos indicados en la tabla No. 10, el costo total de cada prueba para oxitetraciclina y tetraciclina en leche de vaca es, aproximadamente, de Q. 268.53 para el método 1 y de Q. 285.44 para el método 2.

IX. DISCUSIÓN

Con el propósito de Implementar y validar un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de Ultravioleta para la determinación de residuos de oxitetraciclina y tetraciclina en leche fresca de vaca se llevaron a cabo pruebas con soluciones patrón de tetraciclinas y se desarrolló un plan piloto de 5 muestras de leche para determinar los tiempos de retención, mejores condiciones cromatográficas, el método óptimo de trabajo y los parámetros de validación.

En base a los resultados se puede indicar que, para que se observen los picos de las TC separados por casi un minuto uno del otro (Gráfica No. 1) y con tiempos de retención tanto para la oxitetraciclina como para la tetraciclina excelentes (11.51 y 12.43min respectivamente), las mejores condiciones cromatográficas son: fase móvil de 70% solvente A, 22% de acetonitrilo y un 8% de metanol a temperatura ambiente (20-25°C). Además, se presentan muy pocos valores atípicos y la mayoría de los resultados se encuentran a un máximo de tres desviaciones estándar, indicando esto un alto grado de precisión.

La información recolectada, luego de varias pruebas, mostró que el método óptimo para trabajar la muestra fue el método 1 modificado, debido a que el método 2 demostró ser menos preciso, lineal, reproducible y exacto, la selectividad y especificidad también se vieron afectadas debido a que los porcentajes de recuperación de la muestra son mayores del 100%, sumándole que es un método más complicado de llevar a cabo y costoso. A pesar de lo anterior se observó que poseía una mejor repetibilidad que el método 1. La modificación que se le realizó al método 1 del método de referencia fue el cambio de la columna de extracción de la muestra. Se utilizó una columna comercial desechable de octadecyl en vez de la columna con resina de metal quelada. Esta modificación pudo afectar en la exactitud del método porque los porcentajes de recuperación de la muestra son menores que los del laboratorio de referencia. Una explicación para lo anterior puede ser que la columna de octadecyl posee un filtro

antes del sorbente, un porcentaje de las TC puede estar unido a macromoléculas, las cuales quedan atrapadas en el filtro, y al final solamente eluyen las TC que quedaron libres o unidas a moléculas más pequeñas. Los resultados variaron en un 15% aproximadamente. No se pudo determinar resultados más precisos debido a que no se llevó a cabo ninguna prueba con la columna de resina de metal quelada como para comparar los resultados.

Para determinar los parámetros de validación del método se desarrolló un plan piloto de 5 muestras de leche fortificada con diferentes concentraciones conocidas de tetraciclinas utilizando las mejores condiciones cromatográficas y el óptimo método de extracción analizados anteriormente. Se determinó que el método presenta una linealidad muy buena ya que las gráficas lo demuestran y los coeficientes de correlación son cercanos a uno por lo que resulta ser confiable en un 95%. Hay que tomar en cuenta también que el valor de los coeficientes de correlación disminuyen a menor concentración, lo que indica que el método va perdiendo linealidad. Presenta una buena sensibilidad, lo que se observa con pendientes de valores pequeños. Además, muestra ser un método selectivo y específico ya que al observar los blancos y controles negativos éstos no presentan picos en el tiempo donde eluyen las tetraciclinas, por lo que no hay cabida para falsos positivos o falsos negativos.

En lo que se refiere a la precisión, repetibilidad, exactitud y reproducibilidad los resultados difirieron un poco de lo deseado. La precisión y repetibilidad están muy cercanas a los valores permitidos para la validación del método. Cuanto menor sea el valor de las desviaciones estándar mejor es la precisión ya que los resultados presentan una menor dispersión. El método presenta desviaciones estándar con valores entre 8 y 22 por lo que se observa que los resultados están más dispersos. La repetibilidad, representada por los porcentajes de error estándar, muestra valores del 10% cuando se espera valores no mayores del 5% para que el método sea repetible confiablemente. La exactitud y la reproducibilidad presentan valores mayores a los permitidos para la validación de un método de

HPLC. La exactitud, que se observa a través de los porcentajes de recuperación muestran un margen del 15% menor que los presentados por laboratorios que lleva a cabo el método de referencia de la AOAC (7) sin modificaciones. Aunque debido a que el método presenta una buena linealidad, una precisión y repetibilidad bastante aceptables se pueden utilizar factores de corrección para los resultados obtenidos. Estos son: 1.8 para la oxitetraciclina y de 1.5 para la tetraciclina, presentando al final resultados de concentraciones con un $\pm 5\%$ de error, que es un valor aceptable. La reproducibilidad se observó que va ligada a la concentración de las TC, ya que cuanto menor es la concentración del analito mayores son los porcentajes de error estándar, lo que coincide con la pérdida de linealidad del método al disminuir la concentración del analito.

Otros parámetros que hay que tener en cuenta para la implementación y validación del método son la robustez, el límite de detección y el límite de cuantificación. El método muestra ser bastante robusto, acepta pequeños cambios en la fase móvil y el margen de la temperatura es amplio, afectando en ligera proporción los resultados. El límite de detección se encuentra en 15ng/ml, ya que a concentraciones menores no se presentan picos, incluso algunas veces la leche fortificada con esta concentración de TC no presentó picos. El límite de cuantificación se encuentra en 20ng/ml (0.02ppm) debido que a concentraciones menores el método pierde linealidad, reproducibilidad y exactitud. Esto no afecta a la finalidad del método, ya que el límite máximo de residuos de TC en leche según la FAO/WHO es de 0.1ppm (49).

Al realizar un estimado de los costos del análisis se observó que el precio del análisis de tetraciclinas por muestra de leche no es muy elevado, siendo éste aproximadamente de Q. 268.53. Teniendo en cuenta que este método es directo, cuantifica valores muy pequeños del analito, es muy selectivo y específico y, además, estos resultados benefician a las industrias que manejan este producto y sus derivados ya que pueden mejorar su calidad y evitar ser rechazados en mercados mundiales.

X. CONCLUSIONES

1. Las mejores condiciones cromatográficas fueron: fase móvil de 70% solvente A, 22% de acetonitrilo y un 8% de metanol a temperatura ambiente (20-25°C).
2. El tiempo de retención de la oxitetraciclina es aproximadamente de 11.51min y de 12.43min para la tetraciclina.
3. El mejor método para trabajar la muestra fue el método 1 modificado, aunque con éste se ve afectada la exactitud.
4. El método implementado es lineal, sensible, específico y selectivo.
5. Los parámetros de validación que se refieren a precisión, exactitud y reproducibilidad no son los ideales pero presentan valores cercanos a los deseados por el método
6. El método implementado para las tetraciclinas en leche no cumple con una reproducibilidad aceptable, ésta disminuye conforme disminuye la concentración de las TC en la muestra.
7. Se calcularon factores de corrección para encontrar una concentración más real tomando en cuenta las limitaciones del método.
8. El método es robusto, posee límites de detección y cuantificación muy bajos, por lo que es de utilidad para cuantificar la oxitetraciclina y la tetraciclina en muestras de leche.
9. El precio del análisis de dos tetraciclinas en leche por HPLC es adecuado, debido a que cubre los costos del mismo sin repercutir en la calidad y confiabilidad del método.

XI. RECOMENDACIONES

1. Que en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se amplíen las prácticas de laboratorio utilizando HPLC, debido a que el manejo de este equipo está adquiriendo mucha importancia en el análisis de muestras, y más ahora que se está reforzando el papel del Químico Biólogo en la industria, tanto farmacéutica como alimenticia.
2. Que las clases de estadística que se imparten en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se enfoquen un poco en lo que se refiere a la implementación y validación de métodos, ya que ésta es una parte importante en la elaboración de este trabajo.
3. Que el método implementado y validado durante la elaboración de esta tesis pueda ser utilizado para analizar otras tetraciclinas y se puedan probar otras matrices de carácter similar al de la leche.
4. Tratar de conseguir la resina de metal quelada, para llevar a cabo el análisis de la muestra tal y como dice el método para poder comparar los porcentajes de recuperación entre la columna comercial de octadecyl y los de la columna de resina de metal quelada.
5. Realizar más patrones de estándar de las tetraciclinas con mayores y menores concentraciones que las utilizadas para poder realizar una mejor curva de calibración y comprobar la linealidad a mayores concentraciones.

XII. REFERENCIAS

1. <http://www.case-agworld.com/cAw.LUmast.html>
2. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/MASTITIS CONTROL AND DRUG RESIDUE AVOIDANCE.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/MASTITIS_CONTROL_AND_DRUG_RESIDUE_AVOIDANCE.html)
3. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/THE USE OF ANIMAL DRUGS IN DAIRY MANAGEMENT.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/THE_USE_OF_ANIMAL_DRUGS_IN_DAIRY_MANAGEMENT.html)
4. Smith, C; Reynard, A. **Farmacología**. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1998 (pp. 777).
5. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/normativa/codex/gl/16-1993.PDF>
6. <http://www.ans.iastate.edu/ext/dairy/report96/health/dsl-103.pdf>
7. Horwitz, W. **Official Methods of Analisis of AOAC International**. 17th edition. USA. 2000.
8. Chromcircle2.0. **Applications Products IUPAC Tips**. Alemania: MERCK Kga A Darmstadt , 1998.
9. Arizandieta, C. **Estudio de mastitis subclínica en la cuenca lechera de la región sur occidente del país: prevalencia, diagnóstico de campo, tipificación y antibiograma de los agentes causales y enfoque económico**. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Veterinaria y Zootecnia), 1992 (pp. 4-8,30-40,59-72).
10. Espino, R. **Mastitis bovina. Relación entre el aspecto clínico y la terapéutica indicada por el antibiograma**. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Veterinaria y Zootecnia), 1974 (pp.10-31).
11. <http://www.case-agworld.com/cAw.LUmast.html>
12. <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mastitisa.html>
13. <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mastitisb.html>
14. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/UNDERSTANDING THE FACTS ABOUT MASTITIS.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/UNDERSTANDING_THE_FACTS_ABOUT_MASTITIS.html)
15. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/STAPHYLOCOCCUS AUREUS MASTITIS.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/STAPHYLOCOCCUS_AUREUS_MASTITIS.html)

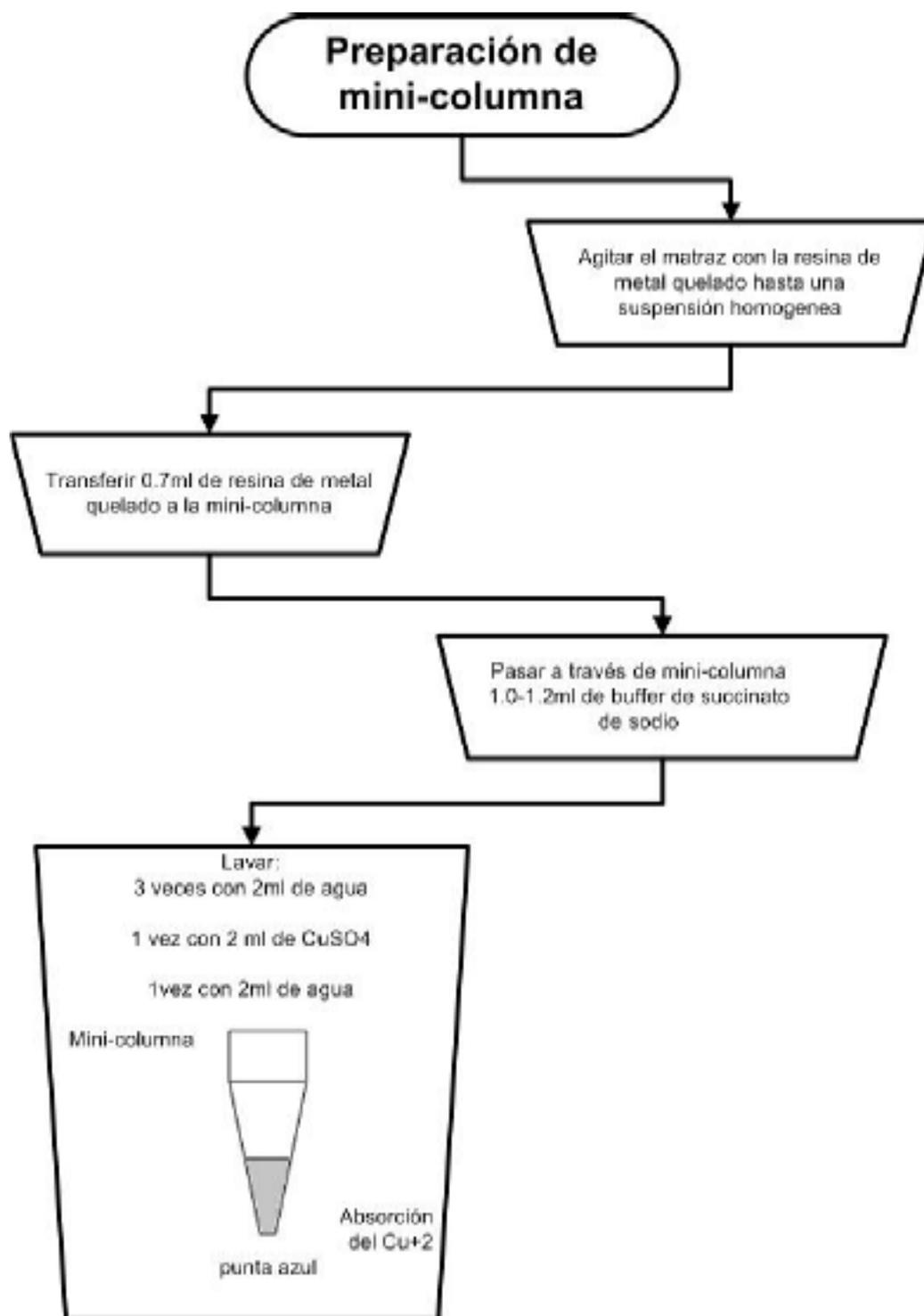
16. http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/STREPTOCOCCAL_MASTITIS.html
17. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/PROMOTING PROPER ANIMAL DRUG USE PART 1 OF 2.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/PROMOTING_PROPER_ANIMAL_DRUG_USE_PART_1_OF_2.html)
18. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/PROPER ANIMAL DRUG USE PART 2 OF 2.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/PROPER_ANIMAL_DRUG_USE_PART_2_OF_2.html)
19. Silliker, J.H.; Elliot, R.P.; et al. **Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos.** España: Editorial Acribia, 1980 (Vol I. pp168-177).
20. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/MASTITIS DURING LACTATION WHY USE ANTIBIOTICS.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/health/MASTITIS_DURING_LACTATION_WHY_USE_ANTIBIOTICS.html)
21. Hardman, J.; Limbird, L.; et.al. **Las bases farmacológicas Goodman & Gilman de la terapéutica.** Novena edición. México: Ed. Mc Graw-Hill Internacional, 1996 (Vol. I, pp. 1193-1201).
22. Loebl, S; Spratto, G. **Manual de Farmacología.** México: Editorial Orientación, S.A. de C.V., 1991 (Tomo I, pp 89-90).
23. Gennaro, A. **Remington. Farmacia.** 19^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1998 (Tomo II, pp 1964-1967).
24. McNair, M.; Esquivel, B. **Cromatografía Líquida de Alta Presión.** EEUU: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1973 (pp.6-36,47,51)
25. Smith, R. **Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry.** Inglaterra: John Wiley & Sons, 1988 (pp210-229, 263-285, 340-355).
26. Horváth, C. **High-Performance Liquid Chromatography. Advances and perspectives.** EEUU: Academic Press. 1980 (Vol 1.pp.94-100).
27. Runser, D. **Maintaining and Troubleshooting HPLC Systems.** EEUU: John Wiley & Sons, 1981 (pp 7-12,25-27,104-108).
28. Meyer, V. **Practical High Performance Liquid Chromatography.** 2th edition. Inglaterra: John Wiley & Sons, 1994 (pp4-8,22-27,69-76).

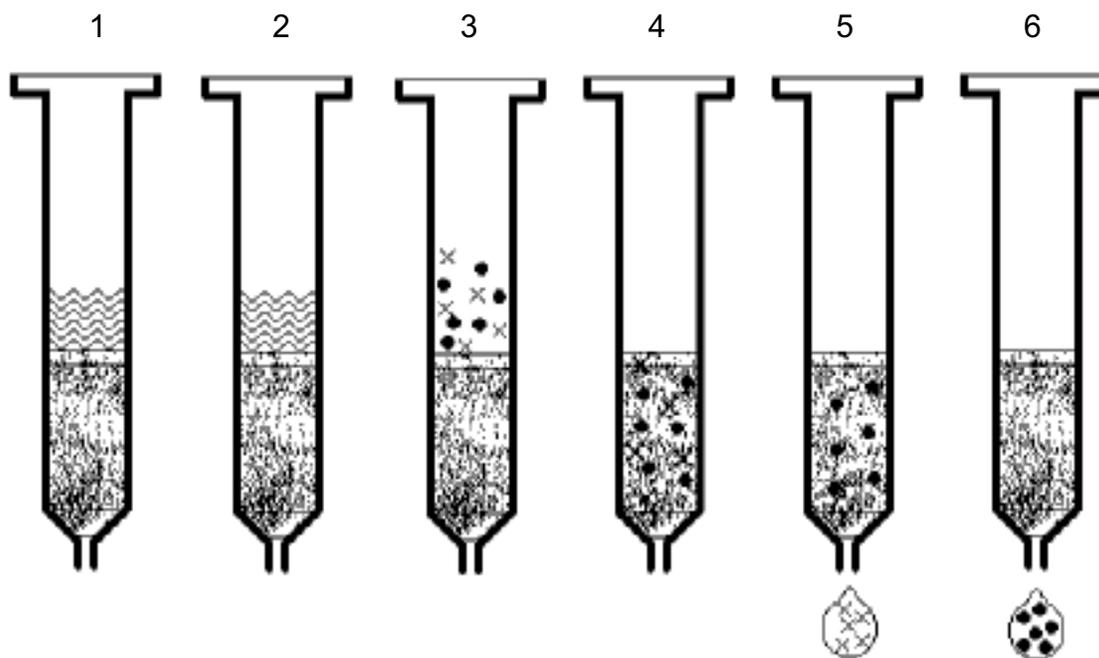
29. Hearn, G.M. **A guide to validation in HPLC**. Inglaterra: Perkin Elmer Corporation, 1992 (pp. 1,3,8-19)
30. Euchem, W. **Acreditación for chemical laboratories**. Santiago de Chile: Oficina Regional de la FAO, 1993
31. _____. **Validation of compendial Assays-Guidelines** "Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1985"
32. Miller JC, Miller, JN. **Statistic of analytical chemistry**. EEUU: John Wiley & Sons, 1988.
33. Orozco, B. **Determinación de residuos de tetraciclina en carnes de pollo que se consumen en la ciudad de Guatemala: plan piloto**. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1997 (pp.22,23).
34. Valenzuela, KD. **Implementación y evaluación de una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar el patrón de aminoácidos de alimentos**. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 2000 (pp53-55).
35. Jiménez, B.; Castillo, M.; Cáceres, A. et al. **Mejoría Continua de la Calidad**. México: Editorial Médica panamericana, 1998 (pp. 310)
36. Garfield, FM. **Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories**. AOAC International, 1991
37. Hernández L, L.F. **Problemas relativos a la calidad e inocuidad de los alimentos y su repercusión en el comercio**. Revista de alimentación, Nutrición y Agricultura. FAO. Vol 25, 1999 (pp34-36).
38. <http://www.eap.mcgill.ca/Publications/EAP69.htm>
39. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/WHO IS CONCERNED ABOUT DRUG RESIDUES.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/WHO_IS_CONCERNED_ABOUT_DRUG_RESIDUES.html)
40. Brillantes, S; Tanasomwang, V; et al **Oxytetracycline Residues in Guant Freshwater Prawn (Macrobrachium rosenbergii)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.49, No.10, 2001.

41. Holstege, DM; Puschner, G; et.al. **Screening and Mass Spectral Confirmation of β -Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.50, No.2, 2002
42. Riediker, S; Diserens, J-M; et al. **Analysis of β -Lactam Antibiotic in Incurred Raw Milk by Rapid Test Methods and Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry.** Journal of Agricultural and Food Chemistry .Vol.49, No.9, 2001.
43. [http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/TESTS FOR MILK QUALITY AND COMPOSITION.html](http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/milking/TESTS_FOR_MILK_QUALITY_AND_COMPOSITION.html)
44. Zurhelle, G; Petz, M; et al. **Metabolites of Oxytetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline and Their Distribution in Egg White, Egg Yolk, and Hen Plasma.** Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol.48, No.12, 2000
45. Bruno, F; Curini, R; et al. **Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Trace Determination of β -Lactam Antibiotic in Bovine Milk.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.49, No.7, 2001.
46. http://tox.umh.es/aet/Revista/Granada99/granada99_13.html
47. <http://www.milk.mb.ca/Nutritin/myth/farmlife.htm>
48. _____. **Evaluation of Certain Veterinary Drug residues in Food. 34th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report World Health Organization.** Geneva, Switzerland, 1989 (pp 9-11)
49. <http://apps1.fao.org/sevlet/org.fao.waicent.codees.VetDrugServlet>
50. <http://www.jtbaker.com/techlib/documents/tcadprot.html>
51. _____. Inserto de mini-columnas ODS Octadecyl Silane. Whatman.
52. _____. **Estadística.** España. Cultural, S.A, 1981 (pp178-185)
53. Miller, N y Miller, J. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica.** 4ta. Edición, España. Prentice Hall, 2002 (pp 21-32).

XIII. ANEXOS

Anexo No. 1



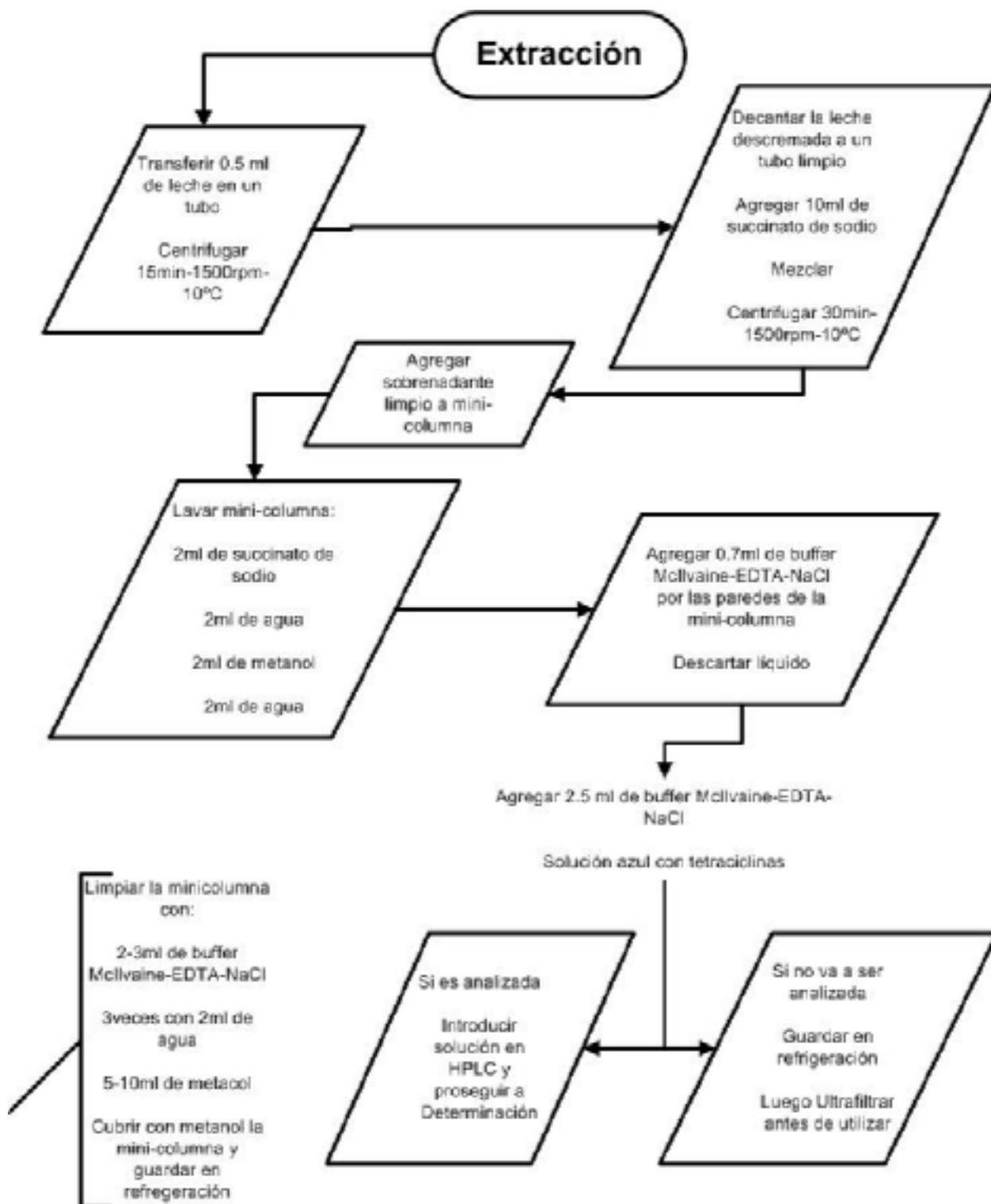
Anexo No. 2**Acondicionamiento de mini-columna y extracción de la muestra (mini-columna SPE Octadecyl C₁₈)****Activación de la mini-columna**

- a) 3 x 2 ml de metanol
- b) 3 x 2 ml de buffer de McIlvaine-EDTA

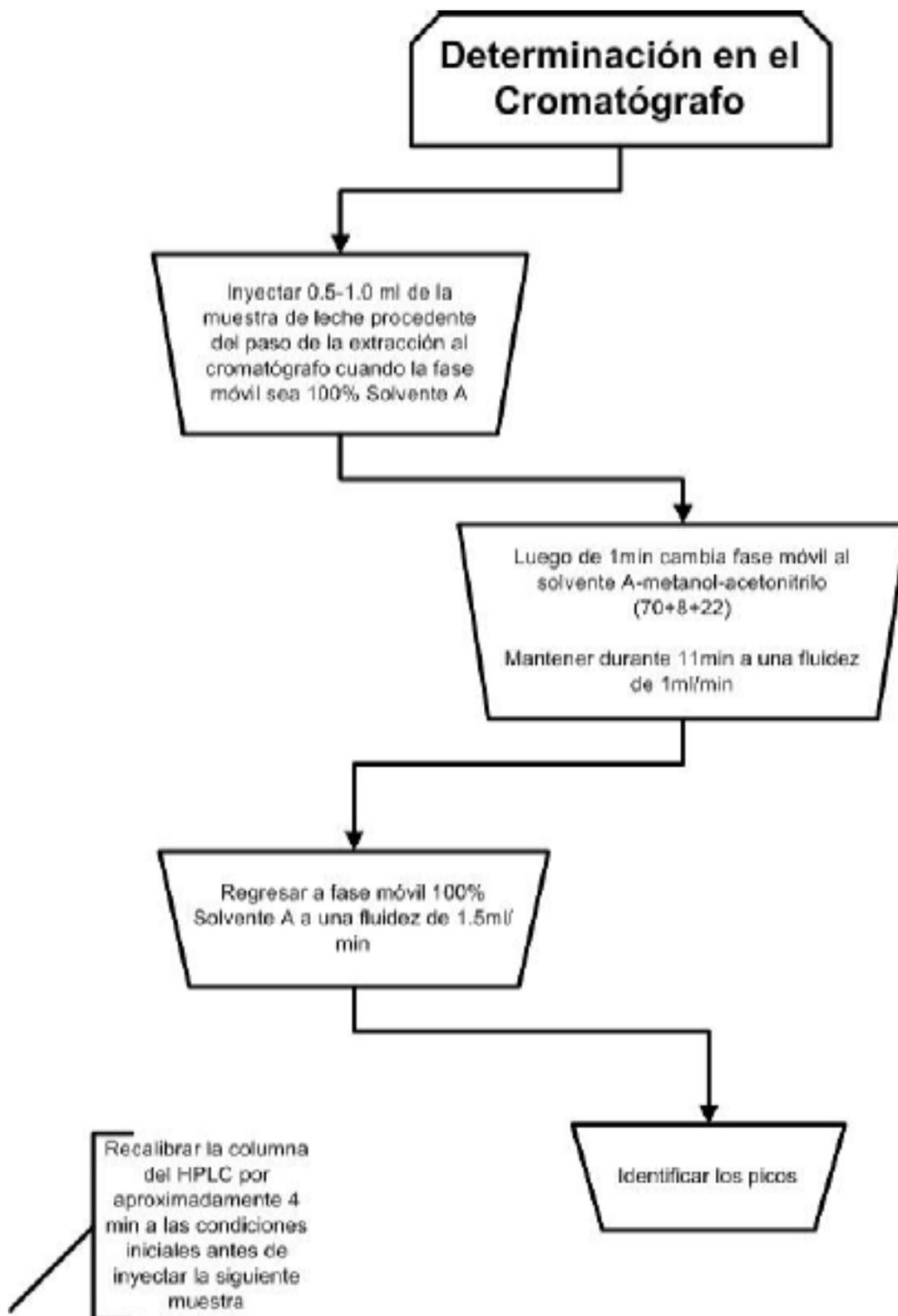
Extracción de la Muestra

- c) Agregar sobrenadante limpio de la muestra a la mini-columna activada
- d) Muestra penetra en la mini-columna
- e) Lavado de impurezas con 2 ml de H₂O
- f) Elusión de las TC con 2 ml de ácido oxálico en metanol

Anexo No. 3

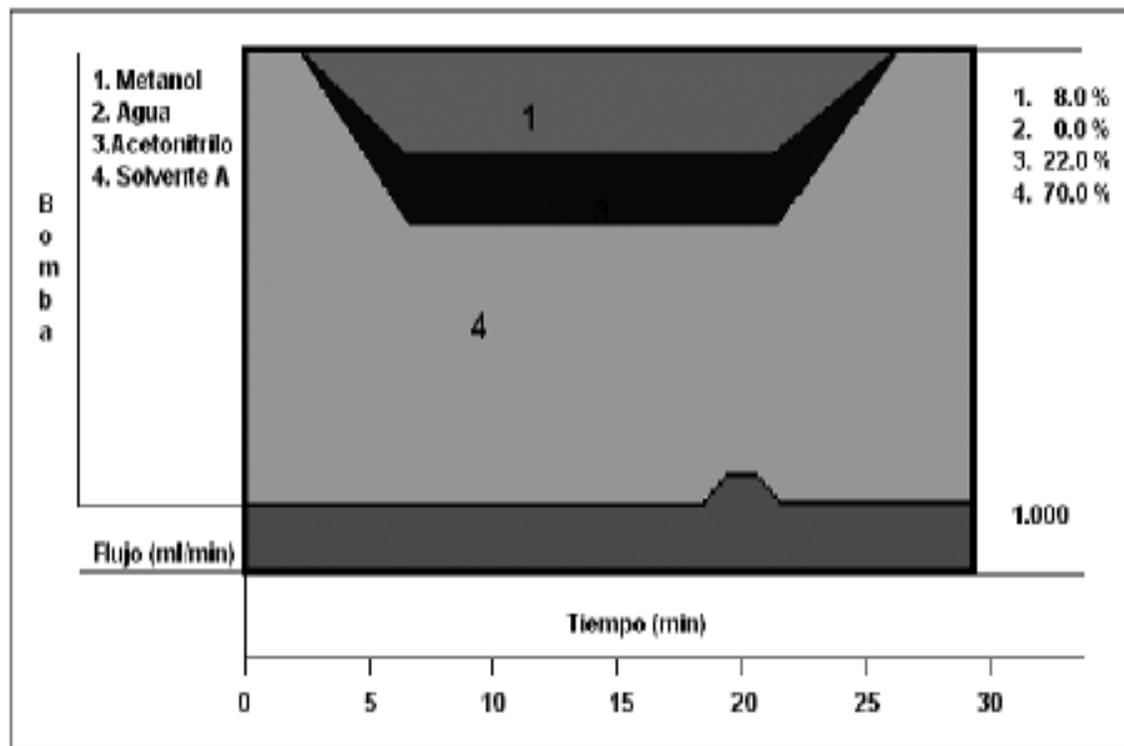


Anexo No. 4



Anexo No. 5

Gradiente de fase móvil



Anexo No. 6

Tablas de resultados de tiempos de retención de Tetraciclinas

Tiempos de Retención Estándares de Oxitetraciclina				
Tiempo			Media	s
11.88	11.41	11.17	11.414	0.258
11.77	11.43	11.19	a + 1s = 86%	
12.16	11.48	11.18	a + 2s = 93%	
12.16	11.55	11.23	a + 3s = 100%	
11.28	11.37	11.28	Q ₁ = 11.23	
11.29	11.43	11.33	Q ₂ = 11.31	
11.29	11.47	11.23	Q ₃ = 11.43	
11.31	11.23	11.31	R _{IQ} = 0.20	
11.42	11.23	11.3	Lim _{sup} = 11.63	
11.42	11.23		Lim _{inf} = 11.03	

Tiempos de retención Estándares de Tetraciclina				
Tiempo			Media	s
13.46	12.73	12.49	12.711	0.227
13.39	12.75	12.49	a + 1s = 93%	
12.53	12.8	12.52	a + 2s = 100%	
12.53	12.89	12.55	Q ₁ = 12.55	
12.66	12.72	12.63	Q ₂ = 12.67	
12.67	12.79	12.67	Q ₃ = 12.79	
12.69	12.8	12.55	R _{IQ} = 0.24	
12.7	12.53	12.64	Lim _{sup} = 13.03	
12.87	12.53	12.64	Lim _{inf} = 12.31	
12.86	12.55			

Anexo No. 7

**Tablas de resultados para la optimización de las condiciones
cromatográficas**

**Curva de Estándar de Oxitetraciclina
(fase móvil de 68%D-22%C-10%A a 25°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	552	582	567	15	
100	305	273	289	16	
50	225	148	186	38.5	
20	112	84	98	14	
Coefficiente de Correlación	0.973				10.778
Ecuación de la recta	$y = 3.47x + 7.61$				

**Curva de estándar de Tetraciclina
(fase móvil de 68%D-22%C-10%A a 25°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	607	563	585	22	
100	358	382	370	12	
50	301	216	258.5	42.5	
20	162	99	130.5	31.5	
Coefficiente de correlación	0.984				11.896
Ecuación de la recta	$y = 3.34x + 68.5$				

**Curva de estándar de Oxitetraciclina
(fase móvil de 70%D-22%C-8%A a 25°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	598	578	588	10	
100	348	325	336.5	11.5	
50	208	188	198	10	
20	143	152	147.5	4.5	
Coefficiente de correlación	0.978				3.305
Ecuación de la recta	$y = 3.38x + 47.2$				

**Curva de estándar de Tetraciclina
(fase móvil de 70%D-22%C-8%A a 25°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	672	604	638	34	
100	437	434	435.5	1.5	
50	270	285	277.5	7.5	
20	178	172	175	3	
Coeficiente de Correlación	0.997				2.522
Ecuación de la recta	$y = 3.52x + 99.5$				

**Curva de estándar de Oxitetraciclina
(fase móvil de 70%D-22%C-8%A a 30°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	653	295	474	179	
100	404	206	305	99	
50	145	184	164.5	19.5	
20	80	139	109.5	29.5	
Coeficiente de Correlación	0.981				27.254
Ecuación de la recta	$y = 2.83x + 36.5$				

**Curva de estándar de Oxitetraciclina
(fase móvil de 70%D-22%C-8%A a 30°C)**

Concentración (ng/ml)	Altura 1	Altura 2	Media	s	%ES
150	948	742	845	103	
100	882	625	753.5	128.5	
50	332	409	370.5	38.5	
20	190	278	234	44	
Coeficiente de Correlación	0.972				14.609
Ecuación de la recta	$y = 5.01x + 150$				

D = Solvente A; C = Acetonitrilo; A = Metanol.

s = desviación estándar; %ES = % error estándar; TR = Tiempo de retención

Anexo No. 8

**Tablas de resultados para la optimización
de las condiciones del método de extracción**

Curva de calibración

Oxitetraciclina		Tetraciclina	
Concentración (ng/ml)	Altura (mUA/seg)	Concentración (ng/ml)	Altura (mUA/seg)
150	238	150	253
100	141	100	140
50	90	50	80
Ecuación de la recta $y = 1.48x + 8.33$		Ecuación de la recta $y = 1.73x - 15.33$	
Coeficiente de correlación 0.98427813		Coeficiente de correlación 0.98471514	

Estándar de Tetraciclinas 100ng/ml

Mx.	Oxitetraciclina			Tetraciclina		
	Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación	Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación
1	332	87.478	87.478	339	81.926	81.926
2	330	86.938	86.938	329	79.614	79.614
3	378	99.911	99.911	348	84.007	84.007
4	338	89.1	89.1	414	99.267	99.267
5	372	98.289	98.289	398	95.568	95.568
6	358	94.505	94.505	399	95.799	95.799
7	343	90.451	90.451	406	97.417	97.417
		Media	92.382	379	Media	90.514
		S	4.844		s	7.678
		% ES	5.243		% ES	8.487

**Muestras de Leche fortificada con 60ng/ml de Estándar de mezcla de Tetraciclinas
Extracción según el Método 1**

Mx.	Oxitetraciclina Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación	Tetraciclina Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación
1	140	35.586	59.31	140	35.914	59.857
2	100	38.667	64.445	132	34.065	56.775
3	146	37.208	62.013	128	33.14	55.233
4	126	31.803	53.005	143	36.608	61.013
5	109	27.208	45.347	134	34.527	57.545
6	138	35.046	58.41	135	34.758	57.93
7	127	32.073	53.455	129	33.371	55.618
		Media	56.569		Media	57.710
		S	5.987		s	1.963
		% ES	10.583		% ES	3.402

**Muestras de Leche fortificada con 60ng/ml de Estándar de mezcla de Tetraciclinas
Extracción según el Método 2**

Mx.	Oxitetraciclina Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación	Tetraciclina Altura (mAU/seg)	Concentración (ng/ml)	% de recuperación
1	125	78.831	131.385	211	130.826	218.04
2	91	55.858	93.096	166	104.815	174.692
3	84	51.128	85.210	135	86.895	144.826
4	184	118.696	197.826	279	170.13	283.55
5	63	36.939	61.565	119	77.64	129.41
6	118	74.101	123.50	138	88.63	147.717
7	123	77.479	129.132	142	90.942	151.57
		Media	46.955		Media	71.418
		s	16.241		s	20.188
		% ES	34.652		% ES	28.267

Anexo No. 9

Tablas de resultados para la determinación de parámetros de validación del método

Estándar de Oxitetraciclina

Concentración ng/ml	Área (mUA/seg)					Media	s	%ES
	Día							
	1	2	3	4	5			
100	333	304	342	298	303	316	17.90	5.664
50	187	152	171	145	160	163	14.792	9.075
20	108	96	99	119	85	101.4	11.465	11.307
Coefficiente de correlación	0.99963795	0.99315506	0.99615946	0.97003257	0.99939338	0.99167568		

Estándar de Tetraciclina

Concentración ng/ml	Área (mUA/seg)					Media	s	%ES
	Día							
	1	2	3	4	5			
100	281	246	278	234	228	253.4	22.105	8.723
50	134	120	130	155	124	132.6	12.192	9.195
20	85	62	69	81	68	73	8.602	11.784
Coefficiente de correlación	0.99053606	0.99776512	0.99572384	0.9922621	0.99960365	0.99517815		

Leche fortificada con Oxitetraciclina

Concentración ng/ml	Área (mUA/seg)					Media	s	%ES
	Día							
	1	2	3	4	5			
60	138	136	117	112	122	125	10.315	8.252
30	83	46	80	82	53	68.8	15.942	23.172
15	49	43	55	0	43	38	19.514	51.353
Coefficiente de correlación	0.99850267	0.95382097	0.99689357	0.89956482	0.97655363	0.96506713		

Leche fortificada con Tetraciclina

Concentración ng/ml	Área (mUA/seg)					Media	s	%ES
	Día							
	1	2	3	4	5			
60	203	184	154	173	183	179.4	15.982	8.908
30	86	99	95	76	78	86.8	9.064	10.442
15	47	50	69	0	47	42.6	22.826	53.582
Coefficiente de correlación	0.99587059	0.9993433	0.99953864	0.99278983	0.99347959	0.99620439		

Concentración de Oxitetraciclina recuperada en Leche (ng/ml)

Fortificación (ng/ml)	Día					Media	s	%ES
	1	2	3	4	5			
60	35.046	34.505	29.37	28.019	30.722	31.532	2.788	8.842
30	20.181	10.181	19.37	19.911	12.073	16.343	4.309	26.359
15	10.992	9.37	12.614	0	9.37	8.469	4.402	51.977
Coefficiente de correlación	0.9985031	0.95382303	0.996896	0.90950594	0.97655575	0.96705676		

Concentración de Tetraciclina recuperada en Leche (ng/ml)

		Día							
Fortificación (ng/ml)	1	2	3	4	5	Media	s	%ES	
60	50.481	35	30.596	29.44	31.753	35.454	7.739	21.828	
30	23.429	14.18	22.042	22.504	15.799	19.591	3.818	19.482	
15	14.412	13.487	16.261	0	13.487	11.529	5.853	50.767	
Coefficiente de correlación	0.99586992	0.95380889	0.99688882	0.8840015	0.97655189	0.96142421			

Porcentaje de recuperación de Oxitetraclina en Leche

		Día							
Fortificación (ng/ml)	1	2	3	4	5	Media	s	%ES	
60	58.41	57.51	48.95	46.7	51.2	52.554	4.645	8.840	
30	67.27	33.94	64.57	66.37	40.24	54.478	14.362	26.365	
15	73.28	62.47	84.07	0	62.47	56.458	29.343	51.973	

Porcentaje de recuperación de Tetraciclina en Leche

		Día							
Fortificación (ng/ml)	1	2	3	4	5	Media	s	%ES	
60	84.14	58.33	50.99	49.07	52.92	59.09	12.901	21.833	
30	78.1	47.27	73.47	75.01	52.66	65.302	12.726	19.488	
15	96.8	89.91	108.41	0	89.91	77.006	39.092	50.765	

Anexo No. 10

Tabla de resultados de porcentajes de recuperación

Oxitetraciclina			
Concentración (ng/ml)	Porcentajes		
	método	referencia	diferencia
15	56.43	75.2	21.77
30	54.48	77.5	23.02
60	52.55	78.2	25.65

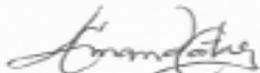
Tetraciclina			
Concentración (ng/ml)	Porcentajes		
	método	referencia	diferencia
15	77.01	73.6	3.41
30	65.3	74.8	9.5
60	59.09	74.1	15.01



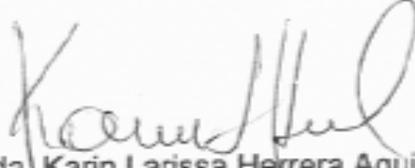
Ana Mary Rodríguez Mondal
Autora



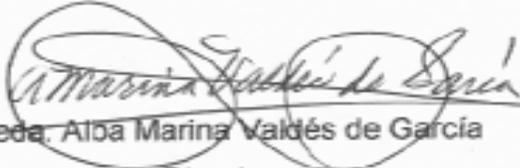
Lic. Raúl Antonio Paniagua Piloña
Asesor



Licda. Amanda Elsa Gálvez Figueroa
Revisora



Licda. Karin Larissa Herrera Aguilar
Revisora



Licda. Alba Marina Valdés de García
Directora



Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano