

# **Determinación de residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina) en leches líquidas pasteurizadas, en polvo y en fórmulas infantiles de venta en mercados del área metropolitana**

## **Determination of tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline, chlortetracycline and doxycycline) residues in infant formulas, powder and pasteurized fluid milk, sold in the metropolitan area markets**

**MARISOL GÓMEZ<sup>1\*</sup>, AGRICIA QUINTANA DE G<sup>2</sup>, JENNY DE NOBREGA<sup>1</sup>, SONIA ALVARADO<sup>3</sup>**

### **RESUMEN**

Para la determinación de la presencia de residuos de oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina en muestras de leche adquiridas en el mercado del área metropolitana, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa con Detección Ultravioleta, se utilizó el método analítico publicado por el Journal AOAC (1995) y se validó para las condiciones de trabajo en el laboratorio, tomando en consideración los parámetros fijados por el Codex Alimentarius. Se empleó la columna cromatográfica PLRP-S. Se obtuvo linealidad en el rango de concentraciones estudiado con coeficientes de correlación  $>0,99$ . Los porcentajes de recuperación obtenidos en la leche analizada a la cual se le añadieron las tetraciclinas, tomando como muestra blanco aquella leche que proporcionó resultados negativos, fueron: oxitetraciclina 71,44% - 84,13%, DER promedio 5,77%; tetraciclina 65,36% - 89,77%, DER promedio 9,89%; demeclociclina 70,99% - 90,38%, DER promedio 8,76%; clortetraciclina 65,61% - 85,24%, DER promedio 6,53% y doxiciclina 64,56% - 84,49%, DER promedio 7,40%. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para cada una de las cinco tetraciclinas fueron los adecuados para detectar las cantidades aceptadas de estos antibióticos en leche (LMR 100  $\mu\text{g/L}$ ). Las muestras de leche analizadas no presentaron residuos de las tetraciclinas objeto de estudio.

**Palabras clave:** Oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina, doxiciclina, leche, HPLC.

### **ABSTRACT**

Residues of oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline, chlortetracycline and doxycycline in samples of milk acquired in the market of the Metropolitan Area were assessed by a method published by the Journal AOAC by reverse phase High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection and previously validated for working conditions in the laboratory. Parameters set by Codex Alimentarius were considered. It was used the chromatographic column PLRP-S. Linearity was obtained in the concentration range studied with a coefficients correlation  $> 0,99$ . Recovery rates obtained in the milk analyzed in which the tetracyclines were added, taking as blank sample that milk that provided negative results, were: oxytetracycline 71,44% - 84,13%, average RSD 5,77%; tetracycline 65,36% - 89,77%, average RSD 9,89%; demeclocycline 70,99% - 90,38%, average RSD 8,76%; chlortetracycline 65,61% - 85,24%, average RSD 6,53% and doxycycline 64,56% - 84,49%, average RSD 7,40%. The limits of detection and quantification obtained for each of five tetracycline's were adequate to detect the quantities accepted of these antibiotics in milk (MRL 100  $\mu\text{g/L}$ ). The milk samples analyzed in this study showed no residues of tetracyclines object of study.

**Key words:** Oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline, chlortetracycline, doxycycline, milk, HPLC.

<sup>1</sup> Cátedra de Análisis Farmacéutico, <sup>2</sup>Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. <sup>3</sup>Cátedra de Histología y Embriología. Departamento de Ciencias Biomédicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay.

\* Autor a quien se le envía la correspondencia: Marisol Gómez. Email: mgomezfernandez@hotmail.com

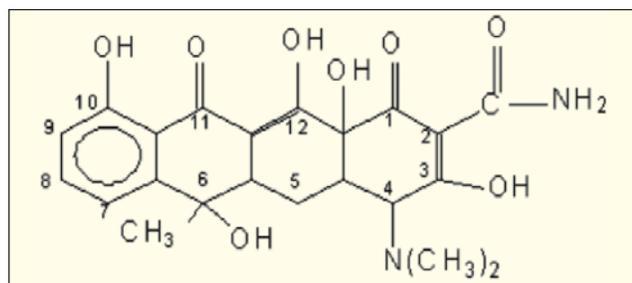
## Introducción

La leche es un producto alimenticio de origen animal imprescindible en la dieta de la mayoría de las personas. La condición sanitaria del rebaño juega un papel significativo en la producción lechera junto a otros aspectos como genética, alimentación, ambiente y manejo. Sin embargo, el aspecto sanitario es fundamental y requiere de sistemas de producción que incluyan un programa de medicina preventiva adecuada a la demanda nacional de la empresa ganadera de modo de garantizar el estatus sanitario deseable que prevenga y controle las enfermedades del ganado lechero (Codex Alimentarius, 2000; Sinópoli, 2011).

Entre las enfermedades que afectan a las vacas lecheras se encuentra la mastitis bovina. Ésta es una enfermedad infecciosa causada por más de 137 especies bacterianas siendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* los principales microorganismos responsables de la misma (Gasque, 2008; Rodríguez, 2003).

En el ganado lechero, las tetraciclinas se utilizan para el tratamiento de la metritis y mastitis; éstos antibióticos son empleados debido a que la mayoría de las bacterias causantes de dichas enfermedades presentan resistencia a otros antimicrobianos (Cancho y col., 2000; Rodríguez, 2003, Barrera y col., 2012).

Las tetraciclinas constituyen un grupo de fármacos, unos naturales (extraídas de hongos del género Actinomices) y otros semisintéticos, con actividad frente a una gran diversidad de microorganismos. Químicamente estos compuestos están formados por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes (derivados análogos de la naftace-nocarboxamida policíclica) (Figura 1).



Congéneres	Sustitutos	Posición (es)
Clortetraciclina	-Cl	(7)
Oxitetraciclina	-OH, -H	(5)
Demeclociclina	-OH, -H; -Cl	(6;7)
Metaciclina	-OH, -H; =CH <sub>2</sub>	(5;6)
Doxiciclina	-OH, -H; -CH <sub>3</sub> , -H	(5;6)
Minociclina	-H, -H; -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	(6;7)

Figura 1. Fórmula estructural de las tetraciclinas (Chambers, 2007).

Si bien es cierto que la utilización de los antibióticos continúa siendo la forma más efectiva para el tratamiento de las diversas enfermedades bacterianas causadas por microorganismos patógenos, éstos y particularmente las tetraciclinas, pueden permanecer como residuos químicos en los animales y los productos derivados de los mismos, que pueden ser tóxicos *per se* o causar reacciones alérgicas en los pacientes más sensibles; incluso más importante aún, los niveles bajos de las dosis de estos antibióticos en los alimentos consumidos por largos períodos de tiempo pueden conducir a problemas con respecto a la proliferación de microorganismos resistentes a dichos fármacos (Cinquina y col., 2003; Gómez y col., 2012).

Hay que considerar que un residuo de cualquier medicamento de uso veterinario, en general, es una sustancia farmacológicamente activa (ya sea un activo, excipiente o bien productos de degradación y metabolitos) que permanece en los productos alimenticios obtenidos a partir de los animales a los que se les ha administrado el medicamento (Cancho y col., 2000; Codex Alimentarius, 2003; Gómez y col., 2012). Así, se ha reportado que las causas más frecuentes de residuos en leche son 64% por tratamiento de mastitis, 24% por tratamiento de secado, 3% por higiene de la ubre, 1% por antiparasitarios, 1% por limpieza de equipo de ordeño y 11% por otras enfermedades (Knappstein y col., 2004). Los residuos de éstos antimicrobianos no son eliminados por tratamientos térmicos como la pasteurización, esterilización o ultrapasteurización (UHT) (Magariños, 2000; Parra y col., 2003, Roca, 2008; Noa-Lima y col., 2009; Berruga y col., 2010; Barrera y col., 2012).

El límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV) o también llamado límite máximo de residuos (LMR) se define como aquella concentración de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso fresco) que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda que se permita legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo (Codex Alimentarius 2003). El LMR se fija para cada especie animal y para cada tejido (músculos, hígado, riñones, grasa, leche, miel y huevos).

Para garantizar que la concentración residual de los antibióticos no sea superior a su correspondiente LMR, es necesario establecer un tiempo de espera. En el caso particular de la leche, este tiempo de espera se define como el tiempo que transcurre entre la última administración y el momento que en la leche se encuentran concentraciones iguales a los niveles de tolerancia del medicamento veterinario empleado.

Cada antibiótico debe ir acompañado de un prospecto en donde conste el valor del tiempo de espera (Zurich y col., 1994; Ocampo, 1995; Sumano y col., 1995; Cancho y col., 2000; McEwen y col., 2002; Parra y col., 2003; Cerniglia y col., 2005; Quintana y col., 2009; Carmona y col., 2010; Barrera y col., 2012; Gómez y col., 2012).

En Venezuela, se asume como LMR para las tetraciclina en la leche, los establecidos por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y el Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF). En su reunión 35 del año 2012, se estableció como LMR para las tetraciclina en leche de vaca 100 µg/L.

Para la identificación y cuantificación de los residuos de los medicamentos veterinarios en los alimentos, en el caso específico de las tetraciclina, se han empleado diversos métodos inmunológicos, microbiológicos y fisicoquímicos. Debido a que los métodos inmunológicos y microbiológicos no pueden identificar con certeza todas las tetraciclina, en el Journal AOAC del año 1996 se desarrolló un método analítico que permite separar, detectar y cuantificar la presencia de residuos de tetraciclina en la leche. En dicho método analítico, las tetraciclina son adsorbidas específicamente de los extractos de la leche por medio de su quelación a los iones cobre unidos reversiblemente a la resina epoxi activada del ácido iminodiacético (Sephacrose®). Las tetraciclina se eluyen con un buffer que contiene EDTA y posteriormente son analizadas por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta. Este método analítico permite la separación, detección y cuantificación de residuos de varias tetraciclina en la leche de manera simultáneamente.

En el presente trabajo se propone revalidar dicho método. Una revalidación, se hace necesaria cuando han sido previamente validados los métodos, pero se deben volver a evaluar debido a las posibles variaciones que se puedan presentar en aspectos como el instrumental (cambio de equipo o de alguno de sus componentes, del tipo u origen de la columna), la matriz que contiene la muestra o de la proporción relativa del analito (Quattrocchi y col., 1992).

## Materiales y métodos

Se emplearon lo siguientes equipos: 1. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) marca Agilent, modelo 1260, equipado con un sistema de bomba cuaternario G1311C, sistema automático para desgasificar la fase móvil, una válvula de inyección manual G1328C con un loop de 100 µL, un detector Ultravioleta (UV) de longitud de onda variable G1314B,

acoplado a un computador personal con el software OPEN LAB.

2. Columna Cromatográfica en fase reversa polimérica PLRP-S, 150 X 4,6 mm, diámetro interno 5 µm, tamaño de partícula 100 Å. Varian, Inc.

3. Manifold Waters SPE de extracción fase sólida 20 puestos con rack para tubos de ensayo (16 x 100) mm, con bloque de vacío con 10 - 12 puertos, agujas de vacío y reservorios de 75 mL. mini-columna de polipropileno (Bio-Rad, Hercules); electrodo de vidrio de combinación, Marca Sensorex®; equipo de Filtración Millipore®, filtros Millipore tipo HA 0,45 µm; Vortex marca Thermolyne modelo 37600 Maxi Mix II.

## REACTIVOS

Acetonitrilo y Metanol grado HPLC marca J.T. Baker. Ácido cítrico monohidratado, Ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA) (IDRANAL® III), Ácido oxálico dihidrato, grado reactivo marca Riedel-De Haën AG; Seelze-Hannover. Ácido succínico Reagent Plus®, ≥ 99,0%, marca Sigma Aldrich, MO, USA. Patrón de cloruro de clortetraciclina, pureza 78% HPLC; cloruro de oxitetraciclina, pureza 100% HPLC; cloruro de tetraciclina, pureza 100%; patrón de doxiciclina, pureza 100% HPLC; patrón de demeclociclina clorhidrato, pureza 100% HPLC todos marca Sigma-Aldrich. Resina epoxi activada del ácido iminodiacético, Sepharose®, etanol suspensión acuosa, marca Sigma Aldrich, MO, USA.

## PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRONES

La solución madre de cada uno de los antibióticos se preparó a una concentración final de 100 µg/mL en metanol y se almacenó a 4 °C. La solución madre combinada de los patrones se preparó a la concentración final de 1 µg/mL en metanol para cada una de las tetraciclina.

## CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para la determinación de las tetraciclina las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Sistema: Gradiente con las condiciones dadas a continuación

0 - 5,00 min	100% de solución acuosa de ácido oxálico
5,01 - 18,00 min	Gradiente lineal solución acuosa de ácido oxálico: ACN: Metanol (60: 22: 18)
18,01 - 20,00 min	100% de solución acuosa de ácido oxálico

Tiempo posterior a la corrida: 4 min en condiciones isocráticas con 100% de solución acuosa de ácido oxálico. Longitud de onda de absorción: 350 nm; Velocidad de flujo: 1,0 mL/min; Volumen de inyección: 100 µL.

### PREPARACIÓN DE LAS MINI-COLUMNAS

Las mini-columnas se acondicionan justo antes del paso de la muestra a través de las mismas; para ello, se coloca un juego de mini-columnas en el Aparato Manifold Waters SPE; se agita el frasco que contiene la resina con el quelato metálico para obtener una suspensión, se transfiere a cada una de las mini-columnas, 2 alícuotas de 0,70 mL de la resina con el quelato metálico, utilizando para ello una pipeta Eppendorf® y se procede a abrir la parte inferior de la mini-columna y se deja drenar el buffer. El volumen debe ser 1,0 - 1,2 mL. Si es necesario se añade o retira resina para alcanzar dicho volumen. Posteriormente se lava la resina con 3 x 2 mL de agua, y se añaden 2 mL de solución de  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  10 mM. Se lava de nuevo con 2 x 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . El volumen de la cama de la mini-columna debe ser de 1,0 - 1,2 mL, con aproximadamente 0,70 mL de color azul debido a la adsorción del cobre. La tercera parte de la mini-columna debe permanecer blanca. Este procedimiento se realiza para cada una de las mini-columnas empleadas durante todo el análisis. La mini-columna trabaja utilizando la gravedad. La misma mini-columna puede utilizarse  $\leq 6$  veces (AOAC, 1996).

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se analizaron 14 muestras de leche de diferentes presentaciones entre las que se encuentran: leche pasteurizada completa, en polvo completa, en polvo completa extra-calcio, en polvo semi-descremada, de larga duración completa y fórmula láctea adaptada para lactantes. Las mismas fueron seleccionadas al azar de diferentes puntos de venta del área de Caracas (Supermercados, Mercados populares y Abastos del Este de Caracas, del Oeste de Caracas, de Guaremas). Adicionalmente se emplearon muestras de leche provenientes de la Sección de Caprinos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), correspondientes a 4 cabras: dos cabras control y otras dos tratadas con una solución intramuscular (IM) de OTC, estas últimas fueron suministradas por la Profesora M.V. Sonia Alvarado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, Maracay-estado Aragua.

Para la extracción de las tetraciclinas en la leche, se siguió la metodología descrita por el método de análisis del Journal AOAC 1996, la misma consiste en: medir 5,0 mL  $\pm$  0,01 mL de la leche refrigerada y transferirlos a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL; en otro tubo de centrifuga de igual capacidad y material, se transfiere la misma cantidad de leche a la cual se le añaden 0,25 mL de la solución madre combinada de los patrones (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para cada

una de las 5 tetraciclinas), (lo que corresponde a una concentración final después del proceso de extracción de 100 ng/mL de OTC, TTC, DMC, CTC y DXC). Se centrifugan los dos tubos durante a 1500 x g, durante 15 min. para separar la crema.

Una vez transcurrido el tiempo, se transfiere la leche descremada con la ayuda de una pipeta Pasteur a otros tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL con tapa previamente rotulados; evitando el paso de la capa de grasa formada durante la centrifugación. A cada uno de estos tubos que contienen la leche descremada, se le añaden 10 mL del buffer de succinato de sodio, se tapa el tubo de centrifuga, se mezcla el contenido invirtiendo varias veces, se agita por 10 segundos y se centrifuga a 1500 x g durante 30 min.

Finalizado el proceso de centrifugación, se transfiere el contenido de cada uno de los tubos directamente sobre dos mini-columnas colocadas en el Aparato Manifold Waters SPE, dejando que la solución filtre a través de la mini-columna. Después de que no se observe el líquido por encima de la resina, se procede a lavar la mini-columna secuencialmente con 2 mL del buffer de succinato de sodio, 2 mL de agua, 2 mL de metanol, y luego 2 mL de agua. Se transfiere cuidadosamente 0,70  $\pm$  0,05 mL del buffer McIlvaine-EDTA-NaCl, dentro de cada mini-columna evitando el movimiento de la resina. Se descarta el eluado. Se limpia y seca el reservorio y se colocan dos tubos de 15 mL de capacidad con tapa previamente rotulados. Se eluyen las tetraciclinas de la mini-columna mediante el empleo de 2,5  $\pm$  0,05 mL del buffer McIlvaine-EDTA-NaCl. El eluato recolectado (debe ser azul) es refrigerado hasta ser analizado. La mini-columna debe ser blanca para este momento.

Se inyecta una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada una de estas soluciones directamente en el cromatógrafo líquido bajo las condiciones cromatográficas previamente mencionadas.

### LIMPIEZA DE LA MINI-COLUMNAS PARA SER REUTILIZADA

Una vez culminado el proceso de extracción de las tetraciclinas se procede a lavar las mini-columnas con cantidades adicionales del buffer McIlvaine-EDTA-NaCl, luego con 3 x 2 mL de agua y 5-10 mL de etanol. Luego las mini-columnas se llenan con etanol al 20% y guardan en el refrigerador hasta ser utilizadas nuevamente. Antes de re-utilizarlas deben agitarse en un vortex o invertirse varias veces para re-suspender la resina con el quelato metálico.

Cuando se va a re-utilizar una mini-columna seguir los pasos de preparación de la misma previamente descritos. No deben ser re-usadas mini-columnas que

han sido empleadas con leches ácidas o con cantidades muy grandes de tetraciclinas (> 5µg). Las columnas son re-usables por dos meses si han sido guardadas adecuadamente (Journal AOAC, 1996).

#### PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRONES PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Diariamente se prepararon las soluciones combinadas de los patrones a las concentraciones finales de 100, 150, 200, 300 y 400 ng/mL a partir de la solución madre combinada de los patrones de concentración final 1 µg/mL.

#### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para la determinación de la precisión del sistema, bajo condiciones de repetibilidad, se realizaron seis inyecciones consecutivas de solución combinada de los patrones (OTC, TTC, DMC, CTC y DXC) de concentración final 200 ng/mL para cada una de las tetraciclinas.

#### EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación correspondientes a las 5 tetraciclinas en la leche analizada se determinaron para la concentración de 100 ng/mL de OTC, TTC, DMC, CTC y DXC respectivamente; estas soluciones fueron preparadas de la manera siguiente: En 2 tubos de centrifuga de 15 mL de capacidad previamente rotulados, se transfirieron  $5,00 \pm 0,05$  mL de la leche a analizar. En el tubo rotulado como 1, fueron añadidos 0,250 mL de la solución madre combinada de los patrones de 1 µg/mL (lo que corresponde a una concentración final después del proceso de extracción de 100 ng/mL para cada una de las cinco tetraciclinas). El tubo 2, se rotuló como leche blanco (muestra de leche sin el añadido de tetraciclinas). Cada tubo fue agitado en el vortex durante 30 segundos; posteriormente se procedió de acuerdo al método de preparación de la muestra, previamente descrito e inyección en el cromatógrafo líquido.

El porcentaje de recuperación de OTC, TTC, DMC, CTC y DXC fue calculada por comparación de los cromatogramas de las muestras analizadas, con los obtenidos por la inyección de la solución combinada de los patrones preparada según la metodología previamente descrita y a concentración similar, pero que no fue sometida al proceso de extracción.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se determinaron de manera matemática empleando las siguientes fórmulas (Quattrocchi y col., 1992):

$$\text{Límite de Detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \quad \frac{1}{\sqrt{n^1}}$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \quad \frac{1}{\sqrt{n^1}}$$

Dónde,

$Y_{bl}$ = Respuesta del blanco

$S_{bl}$ = Desviación estándar del blanco

$b$ = pendiente de la curva de calibración

$n^1$ = Número de determinaciones

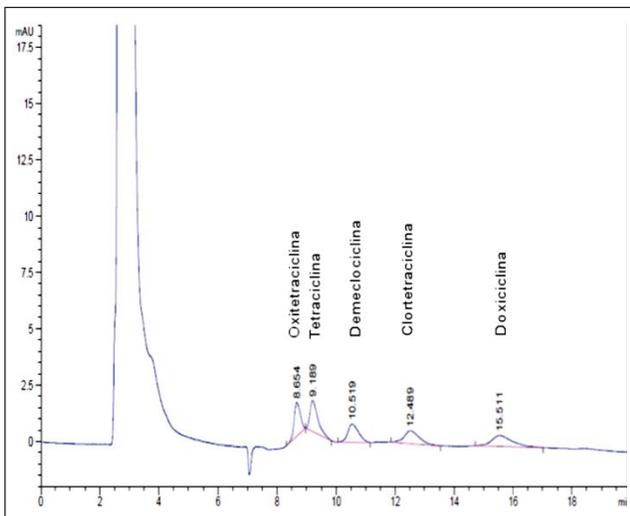
#### MUESTRAS DE LECHE CRUDA DE CABRAS QUE FUERON TRATADAS CON OXITETRACICLINA

Se seleccionaron 4 cabras de 42 – 44 Kg de peso, provenientes de la Sección de Caprinos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en Maracay, estado Aragua; cuyas muestras de leche fueron donadas por Sonia Alvarado y Eva Salazar, ambas Investigadoras III de INIA dependencia CENIAP, especialista en el área de ovinos y caprinos.

Los animales fueron divididos en dos grupos, los controles (dos cabras identificadas con los números 709 y 804), y los que recibieron tratamiento con una solución IM de OTC (dos cabras identificadas con los números 710 y 920). En el día cero del experimento, las cuatro cabras fueron pesadas, se les midió la temperatura corporal y se tomó una muestra de leche de cada una de ellas. Una vez concluidos los pasos anteriores, a las dos cabras destinadas a recibir tratamiento les administraron 4 mL de una solución IM de OTC. Durante cinco días consecutivos se repitieron los pasos de medición de temperatura a las cuatro cabras, toma de muestra de leche y administración de OTC a las cabras con tratamiento. Transcurrido ese período de tiempo, se continuó con la toma de muestra de leche de todos los animales, para un total de ocho días de muestreo. La leche obtenida durante el total de los días de experimentación, fue tratada siguiendo la metodología descrita para la preparación de la muestra, omitiendo el paso de fortificación de la muestra con la solución madre combinada de los patrones.

#### Resultados y discusión

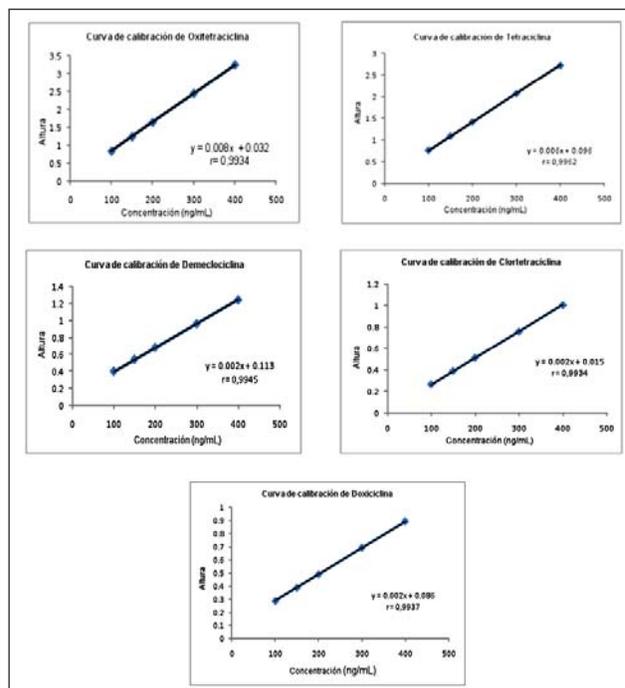
En la figura 2 se muestra un cromatograma típico de los patrones de las 5 tetraciclinas bajo las condiciones de análisis, en el que puede detallarse que los analitos se separaron completamente en picos simétricos en 17 min.



**Figura 2.** Cromatograma correspondiente a la inyección de la solución combinada de los patrones oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina a una concentración final de 200 ng/mL para cada una de las tetraciclinas. Columna PLRP-S. Fase móvil constituida por una mezcla de ácido oxálico 10 mM, acetonitrilo y metanol (60:22:18). Velocidad de flujo 1,0 mL/min. Volumen de inyección 100 µL. Longitud de onda de detección 350 nm.

**LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Para determinar la linealidad del método se construyó una curva de calibración corregida por el método de los mínimos cuadrados para cada tetraciclina en el rango de concentraciones de 100, 150, 200, 300 y 400 ng/mL (Figura 3). Todas las soluciones fueron inyectadas por triplicado. Este procedimiento se realizó tres veces en días diferentes, incluyendo la preparación de las soluciones patrones. Podemos decir que el método analítico tiene linealidad en el rango de concentraciones estudiado, con un coeficiente de regresión lineal ( $r$ ) > 0,99.



**Figura 3.** Curvas de calibración de los patrones de oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina. Rango de concentraciones de 100, 150, 200, 300 y 400 ng/mL.

**PRECISIÓN DEL SISTEMA**

Los resultados correspondientes a la precisión del sistema, en condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo día, mismo instrumento), se basaron en la variación de las alturas y el tiempo de retención para cada una de las cinco tetraciclinas (**Tabla I**), obteniéndose una desviación estándar relativa (DER) inferior al 2%, por lo que podemos decir que el método es preciso de acuerdo con lo establecido por la Farmacopea de los Estados de Unidos (USP 36).

**Tabla I**

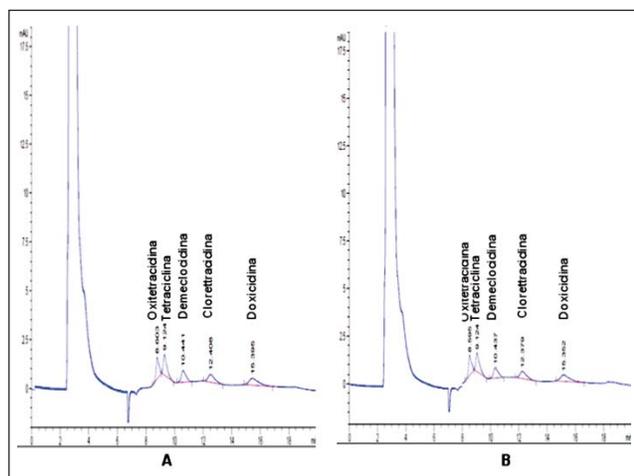
**Resultados de la precisión del sistema para una solución combinada de los patrones de oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina a la concentración final de 200 ng/mL para cada una de las tetraciclinas**

Inyección	OTC		TTC		DMC		CTC		DXC	
	TR <sup>a</sup>	Altura	TR <sup>a</sup>	Altura	TR <sup>a</sup>	Altura	TR <sup>a</sup>	Altura	TR <sup>a</sup>	Altura
1	8,624	1,59484	9,131	1,43050	10,281	0,797178	12,321	0,514711	15,161	0,411257
2	8,625	1,57616	9,144	1,42736	10,497	0,805985	12,415	0,524308	15,425	0,405589
3	8,622	1,58759	9,143	1,42830	10,468	0,801387	12,446	0,513266	15,419	0,423617
4	8,627	1,57165	9,132	1,39765	10,464	0,792382	12,497	0,525347	15,456	0,407606
5	8,625	1,58198	9,156	1,41848	10,466	0,784621	12,436	0,517378	15,511	0,414829
6	8,625	1,59179	9,156	1,40425	10,470	0,800887	12,481	0,514279	15,447	0,413343
<b>Promedio</b>	<b>8,625</b>	<b>1,58400</b>	<b>9,144</b>	<b>1,41776</b>	<b>10,441</b>	<b>0,797073</b>	<b>12,433</b>	<b>0,518215</b>	<b>15,403</b>	<b>0,412707</b>
Desviación	0,002	0,009	0,011	0,014	0,079	0,008	0,062	0,005	0,123	0,006
<b>RSD<sup>b</sup></b>	<b>0,02</b>	<b>0,57</b>	<b>0,12</b>	<b>0,97</b>	<b>0,76</b>	<b>0,95</b>	<b>0,50</b>	<b>1,02</b>	<b>0,80</b>	<b>1,54</b>

a= Tiempo de retención  
b= Desviación estándar relativa

## EXACTITUD

Los cromatogramas típicos se observan en la Figura 4. Los porcentajes de recuperación obtenidos correspondientes a las muestras de leche analizadas, se detallan en la Tabla II. Los resultados de los porcentajes de recuperación promedio obtenidos para las cinco tetraciclinas estudiadas, oscilan entre 75% y 78% respecto a la cantidad añadida de cada una de las tetraciclinas, con valores de DER promedio inferiores al 20% que es el porcentaje máximo permitido cuando el LMR es de 10 a 100 µg/L (Codex Alimentarius. CAC-GL 16-1993); con base a estos resultados el método analítico validado en el presente trabajo es preciso, exacto, y puede utilizarse para la determinación de residuos de tetraciclinas a los LMR aceptados para cada una de las mismas.



**Figura 4.** A. Cromatograma correspondiente a la inyección de una muestra de leche pasteurizada completa, con el añadido de la solución madre combinada de los patrones a una concentración final de 100 ng/mL. B. Cromatograma correspondiente a la inyección de una muestra de leche completa en polvo, con el añadido de la solución madre combinada de los patrones a una concentración final de 100 ng/mL. Para estos cromatogramas se empleó la columna PLRP-S. Fase móvil constituida por una mezcla de ácido oxálico 10 mM, acetonitrilo y metanol (60:22:18). Velocidad de flujo 1,0 mL/min. Volumen de inyección 100 µL. Longitud de onda de detección 350 nm.

Tabla II

### Recuperación Absoluta de las tetraciclinas en la leche. Columna PLRP-S

Fármaco, número de muestras	Cantidad añadida (ng / 5 mL de leche)	% Promedio de Recuperación Absoluta (ng / 5 mL de leche)	DER <sup>a</sup>
OTC (n= 14)	250	76,64	5,77
TTC (n= 14)	250	75,53	9,89
DMC (n= 14)	250	78,02	8,76
CTC (n= 14)	250	76,09	6,53
DXC (n= 14)	250	75,02	7,40

a= Desviación estándar relativa

Es importante destacar que, las 14 muestras de leche analizadas en este proyecto, entre las que se encuentran leche en polvo, de larga duración, pasteurizada y fórmulas infantiles, ninguna presentó residuos de las tetraciclinas objeto de análisis.

## LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

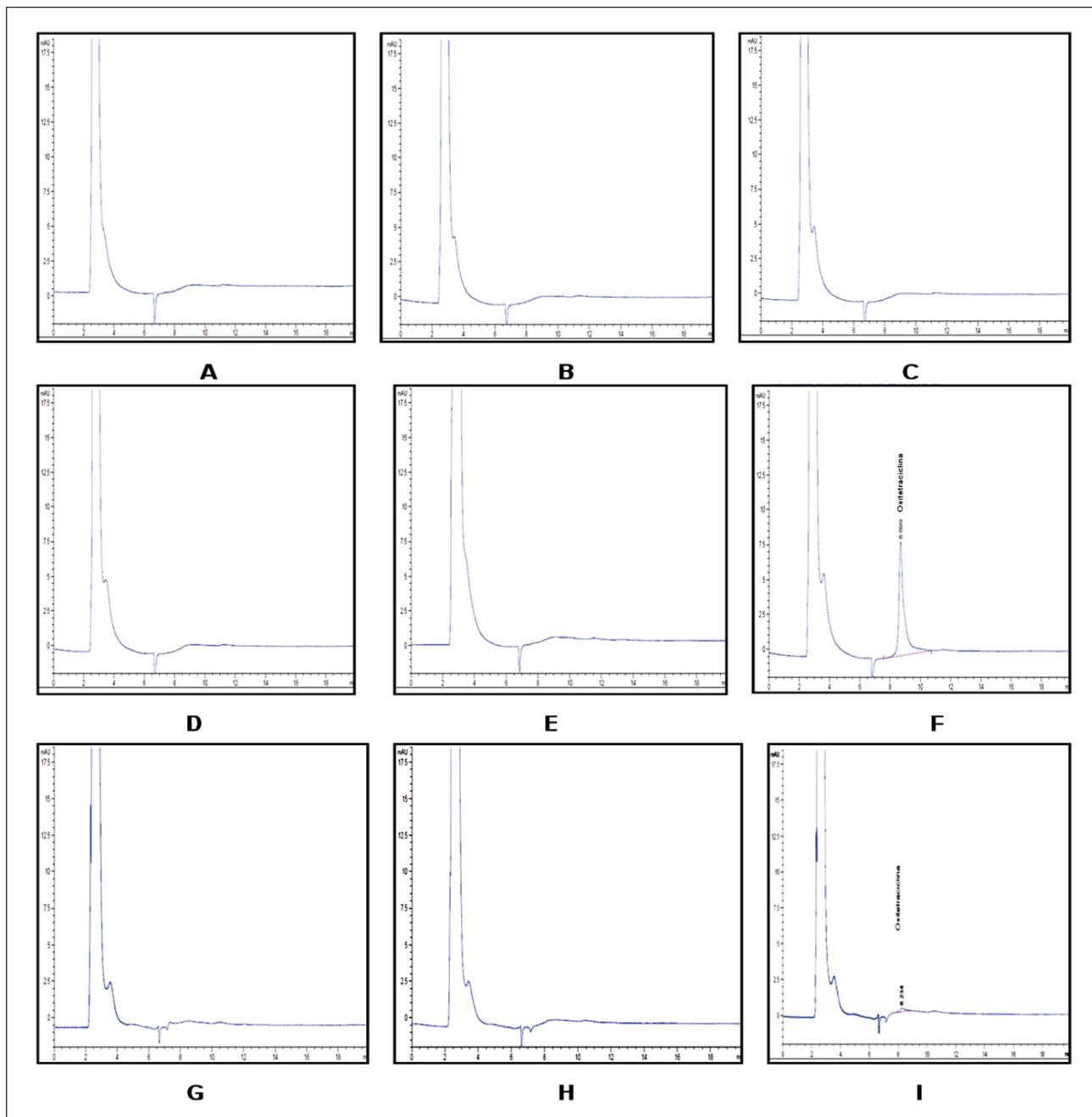
Los límites de detección para las distintas tetraciclinas OTC, TTC, DMC, CTC y DXC fueron 6,40; 7,87; 32,41; 2,92 y 2,40 ng/mL, respectivamente. Mientras que los límites de cuantificación para las tetraciclinas OTC, TTC, DMC, CTC y DXC fueron 7,11; 11,16; 47,02; 22,72 y 13,39 ng/mL, respectivamente.

## MUESTRAS DE LECHE CRUDA DE CABRAS QUE FUERON TRATADAS CON OXITETRACICLINA

Los cromatogramas correspondientes a los diferentes días del experimento se muestra en la Figura 5. Los resultados obtenidos de la concentración de oxitetraciclina encontrada en la leche de cabra, se detallan en la Tabla III. Puede observarse en dicha tabla que, para el sexto día (24 horas después de última administración del tratamiento), en la cabra con tratamiento identificada con el número 920 no se detecta el pico de OTC, mientras que para la cabra identificada con el número 710 se obtuvo una concentración de 7,89 ng/mL muy por debajo del LMR de 100 µg/L de OTC en la leche. De acuerdo a los resultados obtenidos puede asumirse un tiempo de retiro de 96 horas para OTC empleada como medicamento veterinario y mencionado por Zurich y col., 1994, como el tiempo requerido para el ordeño de un animal que ha sido tratado con dicho antibiótico, antes de que ese alimento sea utilizado para el consumo humano.

## Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos, en la validación del método publicado en el AOAC en el año de 1995, se demostró que es un método preciso, exacto, reproducible, sensible, lineal, ya que permite la determinación de oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, clortetraciclina y doxiciclina en la leche, obteniéndose recuperaciones superiores al 60% con DER inferiores al 20%, porcentaje máximo permitido cuando la concentración del analito analizado es 10 a 100 µg/L (Codex Alimentarius, 1993). Asimismo, este método permite detectar la presencia de residuos de tetraciclinas a concentraciones inferiores a los LMR permitidos para las mismas en la leche del ganado vacuno (LMR 100 µg/L) (Codex, 2012). La leche adquirida en el mercado del área metropolitana y analizada, no presentó residuos de ninguna de las tetraciclinas objeto de estudio.



**Figura 5.** A, B, C y D. Cromatogramas correspondientes a la inyección de una muestra de leche de la cabra control número 804, y número 709, respectivamente y de la cabra con tratamiento número 710 y número 920, respectivamente; del día 0 de la recolección. E y F. Cromatogramas correspondientes a la inyección de una muestra de leche de la cabra control 804 y con tratamiento 920, respectivamente; el día 1 de recolección. G, H e I Cromatogramas correspondientes a la inyección de una muestra de leche de la cabra control 804, con tratamiento 920 y 710, respectivamente; el día 6 de recolección. Para estos cromatogramas se empleó la columna PLRP-S. Fase móvil constituida por una mezcla de ácido oxálico 10 mM, acetonitrilo y metanol (60:22:18). Velocidad de flujo 1,0 mL/min. Volumen de inyección 100  $\mu$ L. Longitud de onda de detección 350 nm.

Se recomienda: 1) continuar con los análisis para la detección de residuos de medicamentos en otros tejidos de las diferentes especies animales que son de alto consumo por parte de la población venezolana (por ejemplo, camarones, huevos, miel de abeja, etcétera); 2) instar a las entidades públicas y privadas en Venezuela a mantener los controles sobre el uso

de los medicamentos en los animales de consumo humano regidas principalmente por el Codex Alimentarius, para de esa manera, conservar la inocuidad y calidad de los alimentos, desde la producción primaria hasta el consumo; y 3) la existencia de un registro por zonas de país con información relacionada a la industria lechera y vendedores de leche, con el fin de

**Tabla III**  
**Resultados de la concentración de oxitetraciclina encontrada en la leche de cabra**

Día	Control 804 Concentración (ng/mL)	Control 709 Concentración (ng/mL)	Tratamiento 710 Concentración promedio (ng/mL)	Tratamiento 920 Concentración promedio (ng/mL)
0	0	0	0	0
1	0	0	132,72	167,25
2	0	0	Envase vacío	239,83
3	0	0	382,64	140,65
4	0	0	82,07	65,48
5	0	0	141,80	174,06
6	0	0	7,89	0
7	0	0	Envase vacío	0

El envase que contenía la muestra de leche de la cabra con tratamiento correspondiente a los días 2 y 7 del experimento, venía vacío motivo por el cual no se tiene información de OTC para esos días.

orientar sobre el riesgo y peligro de la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de consumo humano.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento de este Proyecto CDCH N° PG- 06-7515-2009/1. A la Profesora M.V. Sonia Alvarado de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UCV y M.V. MSc Eva Salazar por su colaboración por las muestras donadas. A la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Al personal del laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, UCV.

### Referencias bibliográficas

- AOAC. 1996. Official Method of Analysis 995.04. Multiple tetracycline residues in milk. Metal chelate affinity-liquid chromatographic method. First edition 1995. Journal AOAC International. Supplement March 1996, Chapter 33, 43-47.
- Barrera MAM, Ortez PEM. 2012. Determinación de residuos de antibióticos en leche cruda de cinco ganaderías ubicadas en el Municipio de San Luis Talpa y en leche pasteurizada. Trabajo de grado (Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia). Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Medicina Veterinaria.
- Berruga I, Zorraquino MA, Beltrán MC, Althaus RL, Molina MP. 2010. Efecto del calentamiento sobre la actividad antimicrobiana de beta-lactámicos y tetraciclinas en la leche. Revista mundo lácteo y cárnico: Enero-febrero: 15-20.
- Cancho B, García FMS, Simal J. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal perspectiva actual. Cienc Tecnol Aliment 3(1): 39-47.
- Carmona SG, Vindas S. 2010. Uso racional de los medicamentos veterinarios en hatos lecheros. Presentado en el 11° Congreso Pan-Americano de Leite- Belo Horizonte-Minas Gerais-Brasil.
- Cerniglia CE, Kotarski S. 2005. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. J Vet Pharmacol Therap 28: 3-20.
- Chambers HF. 2007. Fármacos antimicrobianos: Inhibidores de la síntesis de proteína y otros antimicrobianos. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Brunton LL, Lazo JS, Parker K, Goodman and Gilman, Eds.). (Undécima Edición). Editorial McGraw-Hill Interamericana. Editores, S.A. de C.V. de México. Capítulo: 46, páginas: 1173-1201.
- Cinquina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. J Chrom A 987(1-2): 227-235.
- Codex Alimentarius. 2000. El control de los medicamentos veterinarios en la leche y productos lácteos. CCX/RVDF 00/12. Comité del CODEX sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.
- Codex Alimentarius. 2003. Glosarios de términos y definiciones para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, CODEX MISC 5-1993 enmendado en 2003, páginas 1-4.
- Codex Alimentarius. 2012. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Detalles sobre el medicamento veterinario. Clortetraciclina/oxitetraciclina/ tetraciclina.
- Gasque Gómez, Ramón. 2008. Enfermedades de los bovinos: Mastitis bovina. En: Enciclopedia Bovina. Primera Edición. D.R. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ciudad Universitaria, México. Capítulo: 4, páginas: 176-181.
- Gómez FM, Quintana A. 2012. Determinación y confirmación de residuos de Tetraciclinas en muslo e hígado de pollos, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Rev Fac Farmacia 2 (75): 29-38.

- Knapstein K, Suhren G, Walte H. 2004 Prevention of antibiotic residues. Appropriate management of antibiotic treatment of cows in automatic milking systems. (Documento en línea). Disponible en <http://www.automatic-milking.nl/Projectresults/Reports/DeliverableD12.pdf>.
- Magariños H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda; Una guía para la pequeña y mediana empresa. Edición: 2001 Producción y Servicios Incorporados S.A. Guatemala, Centroamérica. (Documento en línea). Disponible en: [http://www.science.oas.org/oea\\_gtz/LIBROS/LA\\_LECHE/leche\\_all.pdf](http://www.science.oas.org/oea_gtz/LIBROS/LA_LECHE/leche_all.pdf)
- McEwen Scott A, Fedorka-Cray PJ. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infectious Dis* 34 (3): 93-106.
- Ocampo Camberos L. 1995. Residuos de fármacos en productos de origen animal. (Documento en línea). Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgClig011.pdf>
- Noa-Lima E, Noa M, González DG, Landeros P, Reyes W. 2009. Evaluación de la presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México. *Revista Salud Animal* 31 (1): 29-33.
- Parra TMH, Peláez SL, Londoño AJE, Pérez AN, Rengifo BG. 2003. Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control. (Documento en línea). Disponible en: [http://agronet.gov.co/www/docs\\_si2/20061024154510\\_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf](http://agronet.gov.co/www/docs_si2/20061024154510_control%20estrategico%20residuos%20medicamentos%20en%20la%20leche.pdf)
- Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A, California 2750/52 (1989). Buenos Aires. Capítulo: 12, páginas 301-325.
- Quintana de GA, Medina O, De Nóbrega J, De Abreu L, Jaimes L. 2009. Determinación de residuos de tetraciclinas: oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina en tejido muscular de porcino mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Rev Fac Far* 72:11-22.
- Roca Marugán MI. 2008. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ciencia Animal. (Documento en línea). Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3022/tesisUPV2884.pdf>
- Rodríguez MAM. 2003. Implementación y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta, para la determinación de dos tetraciclinas en leche fresca de vaca. Trabajo de grado (Químico biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, octubre de 2003. Disponible en el catálogo en línea de la Biblioteca de la Universidad de San Carlos: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2170.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2170.pdf)
- Sinópoli E. 2011. Serie "Buenas prácticas en el manejo de la leche". Manual 3: Procesos para la elaboración de productos lácteos. En el proyecto GCP/GUA/012/SPA, II fase. Representaciones de la FAO en Guatemala. Ministerio de agricultura, Ganadería y Alimentación, Ciudad de Guatemala, Guatemala, C.A. (Documento en línea). Disponible en: [http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/11/13305375675880/manual\\_lacteos\\_3\\_atinar\\_ii.pdf](http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/11/13305375675880/manual_lacteos_3_atinar_ii.pdf)
- Sumano LH, Ocampo CL. 1995. Bases farmacológicas de la vigilancia de residuos de fármacos en productos de origen animal. Artículo por invitación. *Revista Veterinaria México* 26 (3): 175-182.
- Zurich L, San Martín B. 1994. Residuos antimicrobianos en leche. Monografías de Medicina Veterinaria, 16 (1 y 2). (Documento en línea). Disponible en: [http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon\\_vet\\_completa/0,1421,SCID%253D18265%2526ISID%253D451,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D18265%2526ISID%253D451,00.html)
- United States Pharmacopea. USP 36 – NF 31. En Español. Capítulos Generales: <621> *Chromatografía*. 2013.