

Determinación de residuos de tetraciclinas: oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina en tejido muscular de porcino mediante cromatografía líquida de alta resolución

Determination of tetracyclines residues: oxitetracycline, tetracycline and chlortetracycline in pig muscle tissue by high performance liquid chromatography

AGRICIA QUINTANA DE G¹, OSMARY MEDINA¹, JENNY DE NÓBREGA¹,
LISBETH DE ABREU² Y LIANA JAIMES¹

Resumen

Las Tetraciclinas comprenden un grupo de antibióticos que se utilizan en animales con fines terapéuticos y profilácticos. Entre los más utilizados se encuentran la Oxitetraciclina (OTC), la Tetraciclina (TTC) y la Clortetraciclina (CTC). Existe una preocupación de la posible presencia de residuos de estos antibióticos en alimentos de consumo humano como son las carnes (músculo) de ganado bovino, porcino y ovino, en la carne de aves de corral (pollo), en la leche y en la miel. Se realizó un estudio del contenido de las Tetraciclinas (OTC, TTC y CTC) en el músculo de porcino de venta en mercados de Caracas y del Estado Miranda. Se utilizó el método publicado por la AOAC, y se validó dicho método normalizado con Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa y detección UV para las condiciones de trabajo, tomando en cuenta los parámetros fijados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Se estudiaron tres columnas cromatográficas (Nova-Pack C18, Spherisorb C8 y Sun Fire C18). Los límites de detección y cuantificación encontrados fueron adecuados para detectar las cantidades máximas de antibióticos aceptadas (LMR) en dichas muestras, de 200 ng/g. Los coeficientes de correlación de las curvas patrones de cada tetraciclina en cada una de las columnas estudiadas fueron lineales con coeficiente de regresión >0.99. Los promedios de recuperación obtenidos (9 determinaciones para cada tetraciclina) fueron para la Oxitetraciclina (OTC): 73-85% RSD 5,96%; Tetraciclina (TTC): 67-85% RSD 8,82%; Clortetraciclina (CTC) 65-89%, RSD 12,66%. Se analizaron 26 muestras de carne de porcino, de las cuales 14 resultaron sospechosas de la presencia de Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina, pero en cantidades inferiores al límite máximo aceptado (200 ng/g), por lo tanto al corroborar dichos resultados se comprobó que los picos observados no correspondían a la presencia de Tetraciclinas. Se concluyó que de las 26 muestras estudiadas, ninguna presenta las Tetraciclinas (OTC, TTC y CTC).

Palabras clave: Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clortetraciclina, Tejido muscular porcino, HPLC.

Abstract

Tetracycline comprises a group of antibiotics that are used in animals with therapeutic and prophylactic purpose. Among the most commonly used are oxytetracycline (OTC), tetracycline (TTC) and chlortetracycline (CTC). There is a concern of the possible presence residues of these antibiotics in food for human consumption such as muscle of beef, pigs and sheep, meat of poultry, milk and honey. A study was made of the content of Tetracycline (OTC, TTC and CTC) in the pork muscle sold in markets in Caracas and Miranda State. The AOAC method was used. The study validated the AOAC standard method by reverse phase liquid chromatography, UV detection. Taking into account the parameters set by the Organization of the United Nations Food and Agriculture (FAO), three columns were tested (Nova-Pack C18, Spherisorb C8 and Sun Fire C18). The limits of detection and quantification were found adequate to detect the maximum amounts of antibiotics accepted in these samples of 200 ng / g. The correlation coefficients for each tetracycline standards in each column studied were linear near 0,999. The average recovery (9 determinations

¹ Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

² Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

for each tetracycline) was Oxytetracycline: 73-85% RSD 5,96%, Tetracycline: 67-85 RSD% 8,82% 65-89% Chlortetracycline, RSD 12,66%. 26 samples of pig meat were analyzed, out of which 14 presented evidence of the presence of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline, but in amounts below the limited (LMR) (200 ng/g). These results in 14 samples were assessed; it was found that peaks observed did not correspond to the presence of tetracycline. It was concluded that none of the samples presented Tetracycline (OTC, TTC and CTC).

Key words: Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline, pork muscle tissue, HPLC.

Introducción

Las tetraciclinas constituyen un conjunto de antibióticos naturales (clortetraciclina, Oxitetraciclina, Tetraciclina) o semisintéticos (metaciclina, demeclocina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces*. Se caracterizan por compartir el mismo núcleo tetracíclico naftaceno, espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y toxicidad. Las principales diferencias radican en su perfil farmacocinético. Son agentes bacteriostáticos con actividad sobre una gran variedad de microorganismos, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en los seres humanos, animales y en algunas áreas de la agricultura (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Cué y Morejón, 1999; Franfe y Neu, 1987); Klein y Cunha, 1995; Rodríguez y col., 1998).

El uso de drogas antimicrobianas en medicina veterinaria, sin lugar a dudas ha sido una de las principales herramientas en el control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de abasto y compañía. Sin embargo, casi paralelamente con su introducción a fines de la Segunda Guerra Mundial, se comenzó a investigar en torno a los efectos adversos que pudiera provocar la presencia de estos fármacos en productos destinados al consumo humano, como son leche, carne y huevos (Berridge, 1956).

Así por ejemplo, es importante mencionar el caso de cloranfenicol, cuyo efecto adverso más importante se ejerce sobre la médula ósea, constituyéndose este antibiótico en una de las drogas que más comúnmente provoca anemia aplásica. El hecho de que la frecuencia de aparición de los síntomas no tenga relación con la dosis (Kucers, 1980) y que la enfermedad se manifiesta especialmente en individuos que se han expuesto a la droga en más de una ocasión, ha motivado a los Estados Unidos, Canadá y los países de la Comunidad Europea, a prohibir o restringir su empleo en animales de abasto (Settepani, 1984; FDA, 1991), existiendo penalidades a nivel de los productores y plantas procesadoras si se encuentran trazas de esta droga en los productos finales (Keukens y col., 1992). También son conocidos los efectos sobre tejidos en crecimiento, sobre todo

aquellos con alto contenido de calcio, produciendo manchas en los dientes, acumulación en los huesos (Martínez, 1987; Goodman y Gilman, 2007). El depósito del fármaco en los dientes y huesos se debe a la propiedad quelante y la formación de complejos de tetraciclina y ortofosfato de calcio (Araujo y Mediavilla, 1987).

La oxitetraciclina es una de las drogas de mayor vigilancia en los países de gran desarrollo ganadero a nivel de residuos en carne y leche (Oka y col., 1991).

Otros riesgos en la población humana, interesantes de mencionar, son las reacciones de hipersensibilidad a las penicilinas naturales, semisintéticas y cefalosporinas (Dewney y Edwards, 1984; Ryan y col., 1986); y las alteraciones en la microflora intestinal causantes de colitis pseudomembranosas, provocadas por antibióticos como clindamicina y amoxicilina, entre otros (Bartlett, 1990).

Sin lugar a dudas, una de las medidas más adecuadas para evitar la presencia de estas drogas en productos de origen animal destinados al consumo humano, es respetar los **periodos de resguardo o supresión** que recomiendan las industrias farmacéuticas para sus productos; sin embargo esto no siempre se lleva a cabo.

Esto ha llevado a que países de gran desarrollo lechero hayan establecido legislaciones sanitarias gubernamentales que regulan y norman el uso de antibióticos, controlando los niveles máximos permitidos o también denominados **niveles de tolerancia** en los alimentos de origen animal. Éstas varían de un país a otro, pero siempre dentro de los márgenes recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Booth y Harding, 1986) o la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA). Todas estas legislaciones pasan por tener técnicas estandarizadas para la detección de «residuos» de antibióticos en leche, carne y huevos.

Diversos métodos han sido empleados para los fines de detectar «residuos» de antimicrobianos en leche, y su aplicación depende básicamente de los recursos económicos a nivel estatal y privado. Los métodos de mayor sensibilidad corresponden a téc-

nicas fisicoquímicas como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (McEwen y col., 1992), electroforesis (Cáceres, 1990), métodos inmunológicos como el radioinmunoensayo (Keukens y col., 1992) y uno de los más modernos, el Charm II (Cullors, 1992). El empleo de estos métodos, debido fundamentalmente a sus elevados costos, se limita sólo a instituciones supervisoras a nivel gubernamental.

La presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos animales de consumo humano, puede generar problemas de salud a nivel humano, lo cual podría considerarse como un problema de salud pública. Se considera de importancia realizar un estudio de la presencia en diferentes productos de venta en la Región Capital del antibiótico Tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina) aplicando el método por Cromatografía líquida de alta resolución del AOAC y (MacNeil y col., 1996).

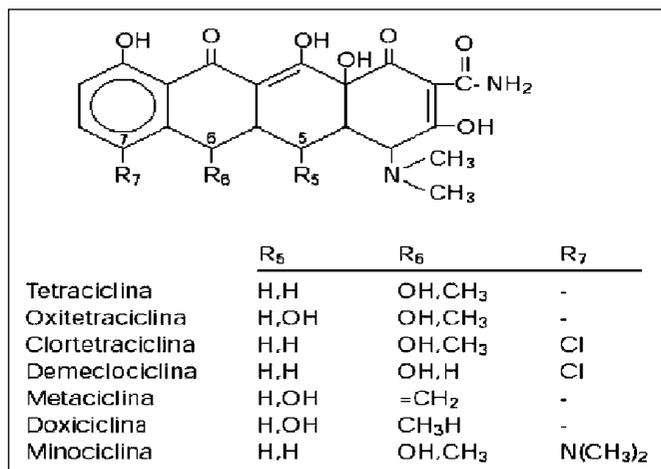


Figura 1. Tetraciclina disponibles. Se representa la estructura química de las Tetraciclina y sus derivados.

- Clortetraciclina (Aureomicina), derivado del *Strep. aureofaciens*.
- Demetilclortetraciclina o demeclociclina.
- Oxitetraciclina (Terramicina).
- Tetraciclina, se obtiene semisintéticamente.
- Doxiciclina (vibramicina), por desoxigenación de la oxitetraciclina.
- Metaciclina, derivado de la oxitetraciclina.
- Minociclina, derivado semisintético de la tetraciclina.

En algunos países se ha establecido una tolerancia nula para las tetraciclina, a las que no se les había fijado ningún límite máximo de residuo (LMR), solamente existe una norma internacional en la que se establecía el LMR para la oxitetraciclina. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y el Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs In Foods (CCRVDF) establecieron que las tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina) deberían tener un LMR común. El objetivo de este trabajo es determinar la posible pre-

sencia de residuos de Tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina) en tejido muscular cárnico, específicamente el porcino. Consideramos validar el método descrito por la Asociación Oficial Químico-Analítico (AOAC). Esta revalidación es necesaria (Quattrocchi, 1992) cuando se va a aplicar un método cromatográfico validado y donde se utilizan equipos y columnas de diferente origen al publicado. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Proyecto TCP/RLA/3013(A), que establece la necesidad de «desarrollar un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur».

Esta premisa establece que se debe comprobar que nuestro laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

Como parte del estudio, se realizó la linealidad en las tres columnas utilizadas, límite de detección, cuantificación y precisión en la inyección. Con los cromatogramas obtenidos se calculó la resolución de los picos más cercanos, como son la oxitetraciclina y la Tetraciclina, factores de capacidad, porcentaje de recuperación de las tres tetraciclina, desviación estándar relativa (% RSD). Al trabajar con columna analítica y columna de corroboración se realizó la identificación de los picos sospechosos y en algunas de estas muestras se les añadió las tetraciclina para de esta forma poder comprobar la presencia o no de estos antibióticos.

Tabla I

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (CCRVDF) Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods

Límites establecidos: OTC / TTC / CTC

Los límites máximos aceptados para residuos de medicamentos veterinarios (3) son:

Especie	Tejido	LMR (µg/kg)	JECFA	CCRVDF
porcino	músculo	200	45, 47, 50	9V, 10V

LMR: Límite Máximo de Residuos

Materiales y métodos

PRINCIPIO

Las tetraciclina son extraídas desde el tejido con un buffer a pH 4, el extracto es filtrado y clarificado por una columna de extracción fase sólida C18. Las tetraciclina son separadas por cromatografía líquida usando una columna C8 y C18, volumen de inyección de 60 µL o 100 µL, detector UV a 350 nm, con una sensibilidad de 0,005 AUFS.

APARATOS Y MATERIALES

- I. Cromatógrafo líquido equipado con dispensador de solventes que provee un flujo de 1-2 mL/min., con baja pulsación. Se utilizaron dos cromatógrafos líquidos:
 1. Waters modular compuesto por: bomba de distribución de solventes modelo 510, detector ultravioleta modelo 484, módulo de datos modelo 745B, inyector Rheodyne, detector UV a 350 nm, 0,005 unidades de absorbancia por la escala total (AUF5).
 2. Shimadzu Class VP: bomba LC-10ATVP, detector SPD-M10AVP, inyector Rheodyne, controlador del sistema SCL-10AVP, impresora Epson modelo C60. Condiciones de trabajo: volumen de inyección 50-60 o 100 µL. Tiempo de corrida 15 min. Detector UV-VIS λ 190-800 nm.

II. Columnas cromatográficas

1. Para la determinación de las Tetraciclinas se empleó la columna Spherisorb C₈ 5 µm x 250 x 4,6 mm.
2. Para la confirmación de los resultados cuantitativos se emplearon las columnas:
 - 2a. Columna de C₁₈ 5 µm Sun Fire 250 x 4,6 mm.
 - 2b. Columna C₁₈ Nova Pak 4 µm 300 mm x 3.9 mm.

III: Equipos

Balanza analítica con sensibilidad: 0.001 g; Embudo Buchner de 5.5 cm, Centrifuga con tubos de 50 mL de polipropileno y capaz de proveer 2500 x g; Filtro Microfibra de vidrio grado GB 140 Advantec 1.0 micras 47 mm; Fiola Kitasato de 125 µl; Homogenizador equipado con cuchillas de cortar para desintegrar y homogeneizar el tejido animal; Agitador mecánico; Sonicador; Vórtex; Potenciómetro; Pipeta volumétrica de 2 mL y 3 mL; Pipeta graduada de 10 mL; Balones aforados de 10 mL, 100 mL, 1L y 2 L; Cartuchos seppak 500 mg/ 6 mL; Swinnex Holder porta membranas de 13 mm; membranas HP 13 mm 0,45 micras; 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; bomba de vacío.

REACTIVOS:

Patrones de referencia: tetraciclina clorhidrato Sigma, oxitetraciclina clorhidrato Sigma y clortetraciclina Clorhidrato (Sigma Aldrich, MO, USA). Acetonitrilo grado HPLC; metanol grado HPLC; agua destilada; ácido cítrico; Na₂HPO₄ anhidro; sal sódica del ácido etilendiamino tetracético; ácido oxálico.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- McIlvaine buffer pH 4,0: 28,4 g Na₂HPO₄ anhidro (grado reactivo)/1L en agua. Diluir la solución con agua hasta el aforo y mezclar. Colocar 21.0 g de Ac. cítrico en un frasco volumétrico de 1L, diluir con agua destilada hasta completar 1 L. Mezclar bien. Combinar 1L del sol. de ácido cítrico con 625 mL de la sol. de fosfato sódico en un balón aforado de 2L. Ajustar a pH 4.0 ± 0.05. Preparar esta solución semanalmente.
- McIlvaine buffer-Solución de EDTA: Ajustar McIlvaine buffer de forma de contener 0,1M de etilendiamino del ácido tetracético sal sódica. A 1.625 L de buffer McIlvaine pH 4,0, añadir 60,5 g de EDTA. 2H₂O disódico. Mezclar hasta que se disuelva. Preparar semanalmente.
- Solución metanólica de ácido oxálico 0,01M: pesar 1.26 g de ácido oxálico dihidratado en un frasco volumétrico de 1 L, disolver y llevar a volumen con metanol. Preparar diariamente.
- Solución acuosa de ácido oxálico 0,01M: disolver 1,26 g de ácido oxálico dihidratado en agua destilada dentro de un frasco volumétrico de 1L. Diluir a volumen y mezclar.

SOLUCIONES PATRONES

1. Solución madre de cada uno de los antibióticos de una concentración de 1000 µg/ mL (1000 ppm) en metanol.
2. Solución madre combinada de los tres antibióticos (clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC) y tetraciclina (TTC)) a una concentración de 100 µg/mL (100 ppm) de cada uno: medir dentro de un balón aforado de 100 mL, 10 mL de cada una de las soluciones anteriores. Aforar con metanol.
3. Solución de trabajo combinada de los tres antibióticos a una concentración de 25 µg/ml (25 ppm): medir 2,5 mL de la solución anterior dentro de un balón aforado de 10 mL y diluir con metanol. Preparar semanalmente.

SOLUCIONES PATRONES CROMATOGRÁFICAS:

A partir de la solución de trabajo combinada (25 µg/ml) preparar soluciones a diferentes concentraciones 0,05-0,10-0,25-0,5 y 1,0 µg/ml (0,05-0,10-0,25-0,5 y 1,0 ppm). Preparar semanalmente. Conservar en la nevera.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

1. Para la determinación de las tetraciclinas.

Columna Spherisorb C₈ 5 µm x 250 x 4,6 mm. Fase móvil: solución acuosa de ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo: metanol (600:200:200). Flujo 1,2 mL/min.

2. Para la confirmación de los resultados cuantitativos:

2a. Columna de C₁₈ 5 µm Sun Fire 250 x 4,6 mm. Fase móvil: solución acuosa de ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo: metanol (850:50:100). Flujo 1,2 mL/min.

2b. Columna C₁₈ Nova Pak 4 µm 300 mm x 3,9 mm. Fase móvil: solución acuosa de ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo: metanol (750:150:100). Flujo 1,0 mL/min.

Todas las determinaciones fueron con sistema isocrático.

Filtrar y desgasificar la fase móvil.

SISTEMA CONVENIENTE

Los cartuchos SPE deben proporcionar una recuperación igual o mayor del 80% de cada una de las tetraciclinas (Clortetraciclina, Oxitetraciclina y Tetraciclina), utilizando las condiciones de elución especificadas en el método. Algunos lotes de cartuchos no cumplen con este requerimiento pero pueden ser aceptados para su uso si las recuperaciones son consistentes (RSD menor o igual al 10%).

Cuando el método se utiliza como rutina es necesario correr muestras de recuperación para cada corrida.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Se analizaron 26 muestras adquiridas en diferentes mercados de Caracas y Estado Miranda (Supermercados: Este de Caracas, Catia, Quinta Creso, Guarenas, Valles del Tuy). El tejido permaneció congelado hasta el momento del análisis y el proceso de extracción se realizó en el mismo día.

Método A.O.A.C con algunas modificaciones introducidas

Se pesan $3 \pm 0,05$ g de tejido dentro de un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL, y en otro tubo de centrifuga igual al anterior, se pesan otros 3 g de tejido blanco al cual se le añaden 60 µL de la solución estándar combinada que contiene 25 µg/mL de cada antibiótico (1,5 µg de cada tetraciclina en los 3 g). A cada tubo de centrifuga se le añaden 10 mL de la sol. McIlvaine buffer-EDTA y se agita con vórtex durante 30 seg., y se centrifuga a 2500 x g, durante

10 min. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de centrifuga de 50 mL, tubo 2, cuidando de no transferir ningún tejido. Se resuspende dos veces el tejido mediante la adición de 10 y 5 mL, respectivamente, de la sol. McIlvaine buffer-EDTA al primer tubo y agitación con vórtex. Después de centrifugar a 2500 x g, durante 10 min., se transfiere el sobrenadante al tubo 2.

Una vez reunidos los tres extractos en el tubo 2, se centrifuga a 2500 x g por 20 min., y se filtra el sobrenadante a través de un filtro GB en el embudo Buchner, recolectando el filtrado dentro de una fiola Kitasato de 125 mL de capacidad, aplicando vacío. Se lava el tubo de centrifuga dos veces con 2 mL de sol. McIlvaine buffer-EDTA y se filtra a través del Buchner.

A un grupo de cartuchos SPE en el Manifold se le añaden 20 mL de metanol seguido de 20 mL de agua y se descarta el eluato. Se filtra el líquido contenido en la fiola Kitasato a través del cartucho y se lava el Kitasato dos veces con 2 mL de sol. McIlvaine buffer-EDTA y con 10 mL de agua y se transfiere al sep-pak. Al finalizar la filtración a través del sep-pak, se pasa una corriente de aire por 2 min., con la finalidad de que el cartucho se seque. Se eluye el sep-pak seco mediante la adición de 3 mL de sol. metanólica de ácido oxálico (1,26 g%), cuidando la velocidad de filtración, ya que esta solución pasa mucho más rápido que la solución acuosa. Se recoge el eluato en un vial, al cual se le añaden 2 mL de agua destilada, de manera de tener la muestra en 5 mL. Si es necesario, antes de inyectar en el cromatógrafo se filtran las muestras por cartucho de filtración de 13 mm id. 0,45 mm con Luer-lock o un swinnex con membrana de filtro apropiada.

Resultados

Como parámetros de validación se determinaron: la precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad. Para lo cual se prepararon mezclas patrón de las tres tetraciclinas (0,25 µg/mL), y se inyectaron en las tres columnas estudiadas como se puede observar en la Figura 2.

Se validó el método con las condiciones de trabajo, se determinaron los límites de detección y cuantificación (Quattrocchi y col., 1992). Con base en los resultados se puede indicar que el método es lineal, ya que la linealidad de cada una de las tetraciclinas estudiadas (OTC-TTC y CTC) y en las tres columnas cromatográficas, se obtuvo un coeficiente de regresión mayor a 0.99. Soluciones inyectadas

para la linealidad: 0,05-0,10-0,25-0,5 y 1,0 µg/ mL, 0,05-0,10-0,25-0,5 y 1,0 ppm. La Figura 3 describe las linealidades encontradas.

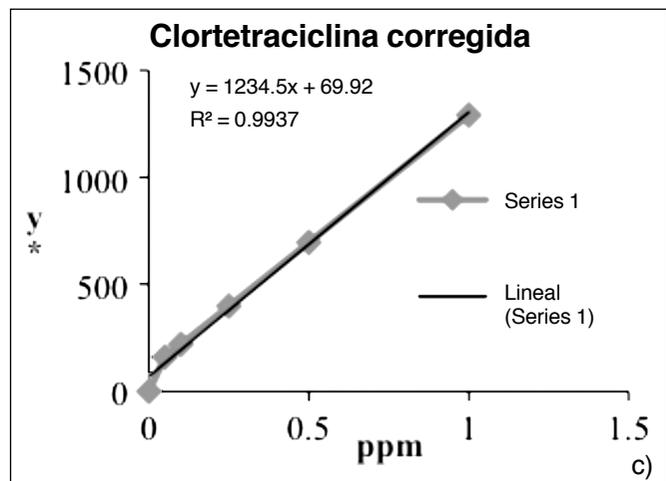
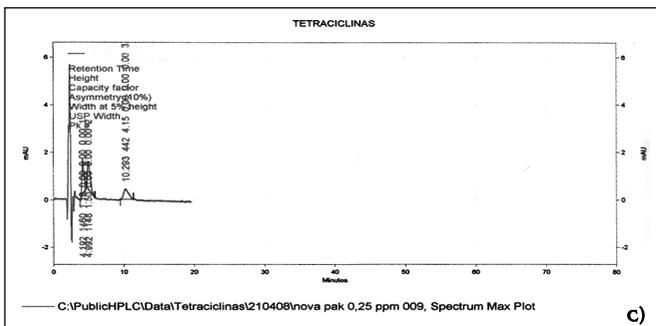
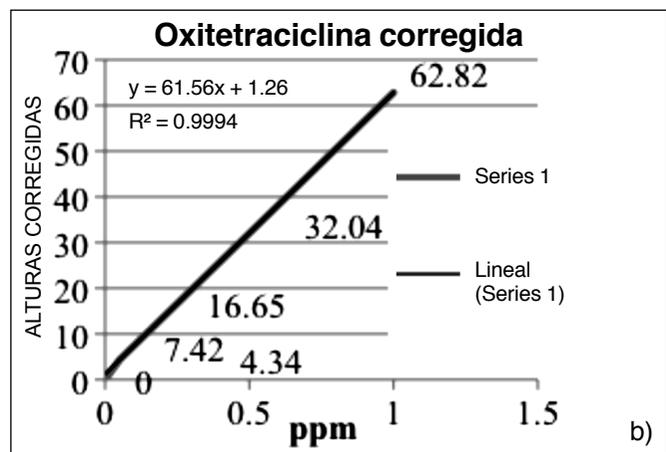
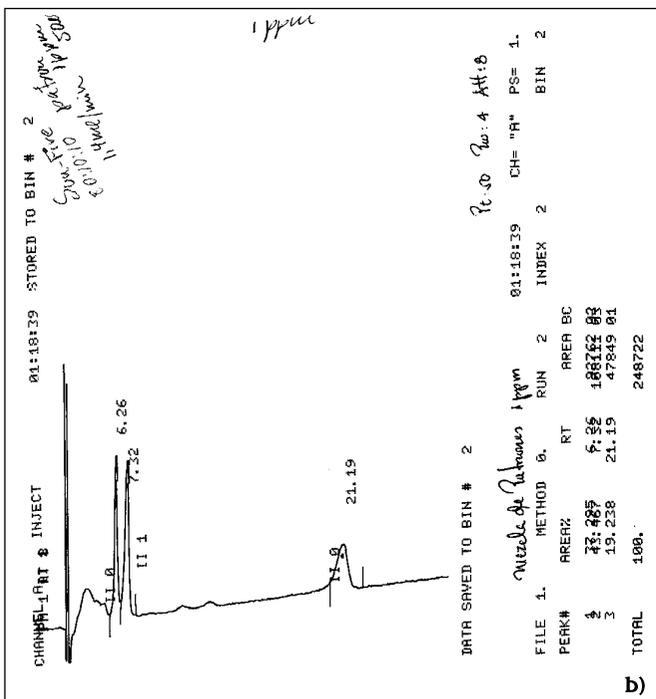
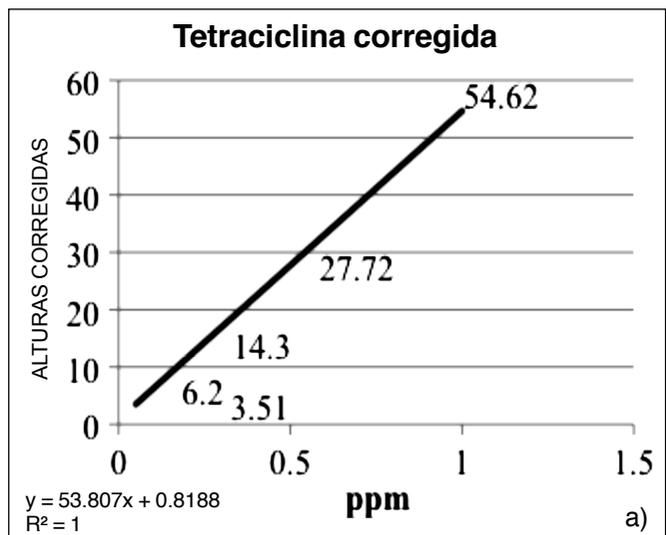
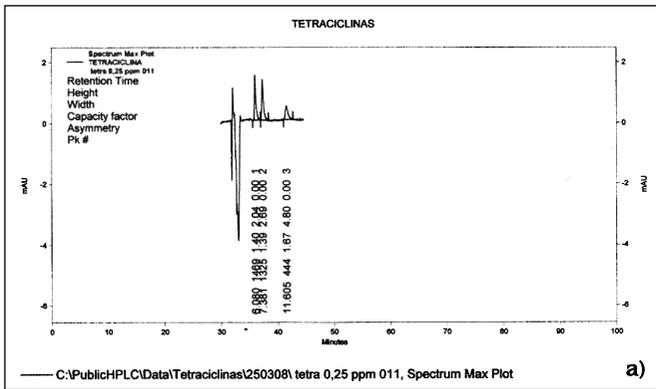


Figura 2. Cromatograma de una mezcla de patrones oxitetraciclina (OTC), Tetraciclina (TTC) y Clortetraciclina (CTC) a) Columna Spherisorb C8. Fase móvil ácido oxálico 0,01M; Acetonitrilo: Metanol 600: 200:200. Flujo 1.2 mL/min. Vol. inyectado 100 µL 0,25 ppm. Cromatógrafo Shimadzu. tr OTC: 6.080 min TTC: 7,58min CTC: 11.607 min b), Columna Sun FIRE. Fase Móvil: ácido oxálico 0,01M; acetonitrilo: metanol (850: 50: 100) tr OTC:6.26 min. TTC 7.32 min. CTC 21.19 min. 1 ppm. c) Columna Nova Pak. Fase móvil: ácido oxálico 0,01M; acetonitrilo: metanol (750: 150: 100) 0.25 ppm tr OTC 4.19 min. TTC 4.99 min. CTC 10.29 min.

Figura 3. Linealidad de cada una de las tetraciclinas estudiadas (OTC- TTC y CTC) en las tres columnas cromatográficas, tanto la de determinación como las de confirmación, encontrándose un coeficiente de regresión > 0.99.

Se calculó el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco), encontrándose: oxitetraciclina LD 0.03-0.045 ppm y LC OTC 0.03-0.05 ppm para la TTC; LD: 0.035 -0.064 y LC: 0.030-0.082 y para CTC: LD: 0.064-0.10 y LC: 0.080-0.15.

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

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

Donde:

S_{bl} = desviación estándar del blanco

b = pendiente de la curva de calibración

Y_{bl} = respuesta del blanco

n = número de determinaciones

En relación al porcentaje de recuperación, éste fue realizado para las tres tetraciclinas, las recuperaciones de cada una, tomando como muestra aquella que proporcionó resultados negativos, nueve determinaciones para cada Tetraciclina. Los promedios de recuperación obtenidos fueron para la oxitetraciclina: 73-85% RSD 5,96%; Tetraciclina: 67-85% RSD 8,82%; Clortetraciclina 65-89% RSD 12.66%.

Se observan algunos resultados de recuperación bajos debidos posiblemente a los sep-pak utilizados, que presentan problemas entre diferentes lotes de fabricación, es por lo que la recuperación es un promedio mínimo de 9 determinaciones. Las mayores recuperaciones fueron para la oxitetraciclina y las menores para la clortetraciclina. Esta observación coincide con los resultados reportados por MacNeil (1996) en su estudio colaborativo, recuperaciones más bajas MacNeil (1996) reporta en su trabajo, estas recuperaciones se pueden observar en dicho estudio.

De acuerdo con Horwitz (1982), el porcentaje del coeficiente de variación para la determinación de concentraciones de analitos a niveles de 1 ppm puede oscilar entre -20 y + 20%.

De las muestras analizadas con la columna analítica Spherisorb, 14 resultaron sospechosas de la presencia de Tetraciclinas, lo cual fue descartado con la columna Sun Fire y Nova Pack. Las inyecciones de cada muestra en el cromatógrafo fueron alternadas con inyecciones de patrones de 0.25 ppm.

La Tabla II contiene el resumen de los resultados obtenidos al analizar las 26 muestras, en donde la columna 1 representa el número de la muestra, a qué muestra se le añadió las tetraciclinas (0.5µg/g) y a qué muestra se le realizó la corroboración para comprobar los resultados obtenidos; la columna 2 indica la zona donde se adquirió la muestra, la

Cromatogramas de muestras sospechosas

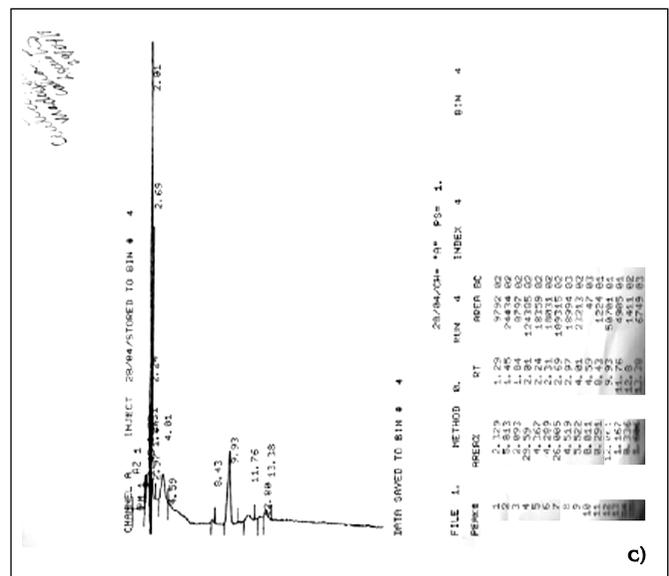
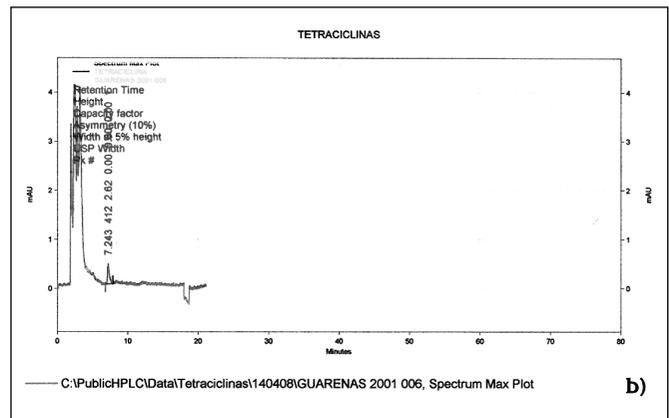
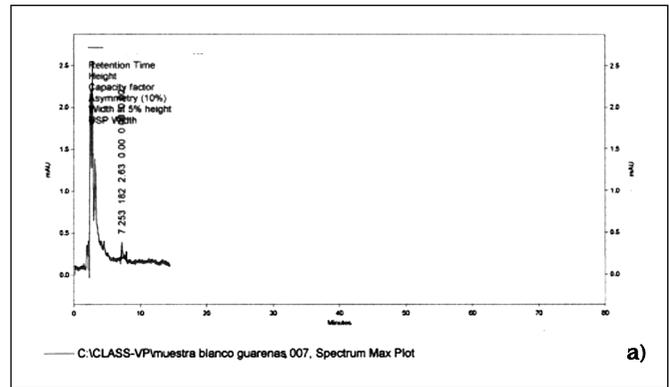


Fig. 4 (a y b). Cromatogramas de una muestra de chuleta de cochino determinada mediante el uso de la columna Spherisorb C8 Fase móvil ácido oxálico 0,01M; Metanol: Acetonitrilo (600:200:200), Flujo 1.2 mL/min. Pico tr 7.2 presentan un pico sospechoso. (c) Corroboración de la muestra de chuleta de cochino Columna de confirmación Sun Fire C18. Fase móvil: ácido oxálico 0,01M; acetonitrilo y metanol. (850: 50 : 100) 1.2 mL/min Cromatógrafo Waters. Aparecen cuatro picos tr 9.93 y 11.76 y 13.38 que no corresponden a ninguna tetraciclina; como se puede observar en el cromatograma de patrones. Por lo tanto se concluye que en las muestra de chuleta de cochino no se detecta la presencia de OTC ni TTC.

columna 3 el tipo de muestra; y en la 4, 5 y 6 los resultados obtenidos con las columnas Spherisorb (analítica) y Sun Fire y Nova-Pak (corroboración).

Cromatogramas de muestras sospechosas

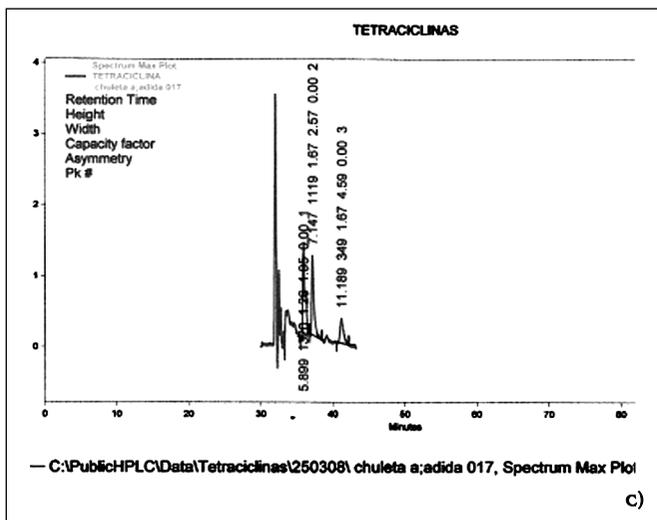
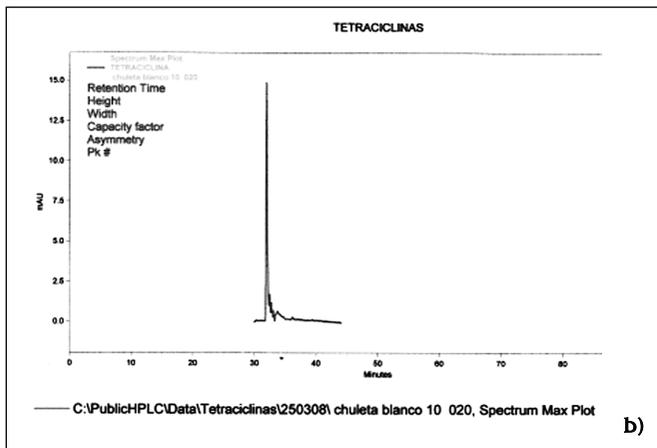
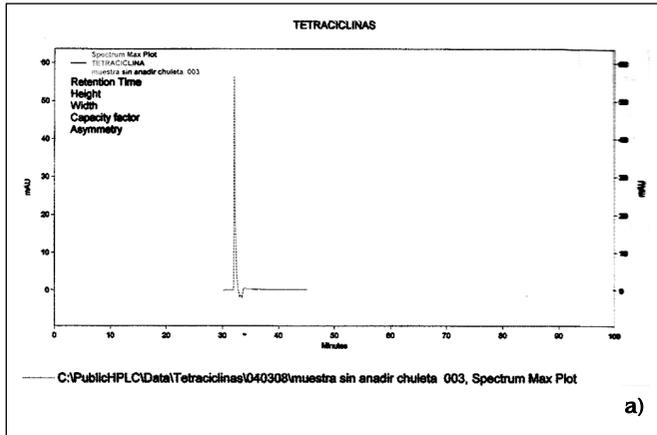


Fig 5 (a y b). Cromatogramas de una muestra de chuleta de cochino (supermercado Valles del Tuy, estado Miranda) donde no se observa la presencia de picos sospechosos (c) cromatograma de la muestra anterior con añadido de tetraciclinas. Condiciones cromatográficas: Columna de determinación Spherisorb C8 Fase móvil ácido oxálico 0,01M: Acetonitrilo: Metanol (600:200:200) flujo 1.2 mL/min Detector UV 350 nm, 0,005 AUFs.

Discusión

Se ha propuesto para el análisis de tetraciclinas a nivel de trazas, un valor de 200 ppb como el límite máximo de residuos (LMR) aceptado en muestras de carne de porcino, así como el empleo para su cuantificación de dos tipos de columnas, una C₈ y otra C₁₈. En el presente estudio se usaron dos columnas C₁₈, ambas no polares, pero de dimensiones diferentes, con la finalidad de diferenciar las tetraciclinas de las sustancias co-eluentes que puedan presentar picos que lleven a resultados falso positivos. Las sustancias co-eluentes presentes en tejidos cárnicos tendrán en cada columna un comportamiento diferente a las tetraciclinas, permitiendo tener un resultado más confiable.

Nuestros resultados muestran que del total de 26 muestras analizadas de la carne de cochino (pernil, chuleta, paleta) de diferentes zonas del Área Metropolitana, 14 presentaron resultados sospechosos, que al ser analizadas con las columnas de confirmación, se obtuvieron picos que no correspondieron a las Tetraciclinas estudiadas. En efecto, como se observa en los cromatogramas de la figura 4a y 4b, que corresponden a una muestra de chuleta de cochino, en los que se muestran picos sospechosos de tetraciclinas, la confirmación de la misma muestra, separada en la columna Sun Fire C₁₈ (figura 4c) indica que en este cromatograma, el pico obtenido no corresponde a ninguna de las tetraciclinas estudiadas de acuerdo con el patrón obtenido en la misma columna Sun Fire. Por lo tanto se puede inferir que los picos sospechosos corresponden a interferencias co-eluentes. Igualmente, las 14 muestras que proporcionaron picos sospechosos de tetraciclinas mostraron cromatogramas similares a las observadas en las figuras 4a y 4b. Al evaluar mediante el uso de las columnas Sun Fire y Nova-Pak, se demuestra que, dichos picos no correspondían a las Tetraciclinas estudiadas (Tabla III). Los resultados demuestran la utilidad en la aplicación del método de la AOAC.

Al estudiar los límites de detección y cuantificación encontrados, se optó por añadir a las muestras 0,5 µg/g de tetraciclina, de manera de obtener una concentración de 0,3 ppm para inyectar en el cromatógrafo. Ello permitió cuantificar las tetraciclinas presentes en función de los valores de límite de detección y cuantificación encontrados a través de la validación del método.

El estudio de recuperación de cada tetraciclina fue realizado en 9 muestras, haciendo un total de 27 determinaciones. De las 26 muestras analizadas (Tabla II), 12 no presentaron picos sospechosos. En la Figura 5a se observa el cromatograma de una mues-

Tabla II

Resultados de las muestras analizadas columna de determinación Spherisorb C₈ 5 µm. Fase móvil ácido oxálico 0,01M: acetonitrilo: metanol (600:200:200), flujo, 1.2 mL/min. Detector UV 350 nm, 0,005 AUFS

Numero	Zona	Tipo µg/g	OTC µg/g	TTC µg/g	CTC
1	Este SL	pernil	No se detecta	0.180	No se detecta
2	Este SL	pernil	No se detecta	0.180	No se detecta
3	Este SL	pernil	No se detecta	0.180	No se detecta
4	Este EC	pernil	0.0825	No se detecta	No se detecta
5	Este CM	pernil	No se detecta	No se detecta	No se detecta
6	Este CM	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
Muestra 6+añadido 0.5µg/g					
7	Este	pernil	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 7 + añadido 0.5µg/g					
8	Este	paleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
9	Valles del Tuy	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 9 + añadido 0.5µg/g					
10	Valles del Tuy	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
Muestra 10+ añadido 0.5µg/g					
Patrones					
11	Guarenas	chuleta	0.066	No se detecta	No se detecta
Muestra 11 + añadido 0.5µg/g					
12	Guarenas	chuleta	No se detecta	0.066	No se detecta
13	Este	chuleta	No se detecta	0.061	No se detecta
14	Este	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
15	Guarenas Hyper	chuleta	No se detecta	0.1195	No se detecta
16	Guarenas 2001	chuleta	No se detecta	0.140	No se detecta
M 16 corroboración	Guarenas 2001	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
17	Catia	lomo	No se detecta	0.1273	No se detecta
18	Catia	lomo	No se detecta	0.093	0.072
19	Catia	lomo	No se detecta	0.0633	No se detecta
M 19 + añadido 0.5µg/g					
20	Catia	lomo	0.128	No se detecta	No se detecta
M 20 corroboración					
	Catia	lomo	No se detecta	No se detecta	No se detecta
21	Central M	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
22	Catia	lomito	0.0377	No se detecta	No se detecta
M 21 corroboración					
	Central M	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 22 corroboración					
	Central M Catia	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 15 corroboración					
	Hyper Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 16 corroboración					
	Hyper Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 17 corroboración					
	Catia CM	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta

continuación...

Tabla II

Numero	Zona	Tipo µg/g	OTC µg/g	TTC µg/g	CTC
M 18, 19 y 20 corroboración	Catia CM	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
24	Catia CM	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
23	Catia	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
25	Quinta Crespo	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
26	Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta

Tabla III

Resultados de las 14 muestras corroboradas: Columnas de confirmación: Sun Fire C₁₈ 5 µm. Fase móvil: ácido oxálico 0,01M; acetonitrilo: metanol. (850: 50: 100), flujo: 1.2 mL/min, Nova-Pak C₁₈ 4 µm Fase móvil: ácido oxálico 0,01M; acetonitrilo: metanol (750: 150: 100). Flujo 1,0 mL/min longitud de onda 350 nm 0.005 AUFS

Numero	Zona	Tipo µg/g	OTC µg/g	TTC µg/g	CTC
M 16 corroboración	Guarenas 2001	chuleta	No detectada	No detectada	No se detecta
M 20 corroboración	Catia	lomo	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 21 corroboración	Central M	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 22 corroboración	Central M Catia	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 1 y 4 corroboración	Este	pernil	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 2 y 3 corroboración	Este	pernil	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 11 corroboración	Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 15 corroboración	Hyper Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 16 corroboración	Hyper Guarenas	chuleta	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 17 corroboración	Catia CM	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta
M 18, 19 corroboración	Catia CM	lomito	No se detecta	No se detecta	No se detecta

tra de chuleta de cochino donde no aparece ningún pico correspondiente a tetraciclinas. Se comprobó la ausencia de tetraciclinas agregando a la muestra 0,5 µg/g de una mezcla de patrones de tetraciclinas, obteniendo un cromatograma (Figura 5C) donde aparecen los picos correspondientes.

En el presente trabajo se aplicó el método oficial publicado por el (AOAC 1999). En el análisis de las muestras y estudios de recuperación se utilizaron tres columnas, una analítica C₈ y dos C₁₈ de diferentes dimensiones y tamaño de partícula para corroborar los resultados. Los hallazgos nos permiten concluir que para analizar las tetraciclinas en carnes de porcino, es imprescindible utilizar las dos columnas como

las empleadas en el presente estudio de manera de evitar reportar resultados falsos positivos, por la aparición de picos que confunden en el cromatograma con el tiempo de retención de las tetraciclinas.

Del estudio se desprenden las recomendaciones finales, como lo son en primer lugar, el continuar con la evaluación de otros alimentos de origen animal (pollos de engorde, vísceras de pollo, bovino), pescados (camarones), leche líquida en polvo, fórmulas infantiles elaboradas con leche en polvo, huevos y miel, así como extender el estudio a las carnes de cochino pero en diferentes etapas de consumo. Como segunda recomendación, incentivar a las autoridades sanitarias, a través de sus entes reguladores,

el establecimiento de controles relacionados con la presencia de tetraciclinas en diferentes tipos de alimentos de consumo humano, entre ellos, carnes (vacuno, porcino, pollo), pescados tipo camarones, leches, mieles, etcétera, por considerarse un problema de salud pública la presencia fuera de límites establecidos de antibióticos en estos alimentos.

Abreviaturas

JECTA: (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)

CRVDF: (Codex Comité de Residuos de Drogas Veterinarias en Alimentos)

OTC: Oxitetraciclina

TTC: Tetraciclina

CTC: Clortetraciclina

RSD: Desviación estándar relativa

tr: Tiempo de retención

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

ppm: Partes por millón ($\mu\text{g/g}$)

ppb: Partes por billón (ng/g)

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° 06-006278-2006. A la profesora Fanny C. de Padilla y al equipo de profesores del Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Facultad de Farmacia UCV. A la profesora Ligia Arrechadera. Centro de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos. Facultad de Farmacia UCV. Al personal del Laboratorio de Control de Calidad. Facultad de Farmacia. UCV.

Referencias bibliográficas

Araujo JA y Mediavilla A. 1984. Tetraciclina y cloranfenicol. En: Farmacología Humana. 2da ed. Tomo II. Ediciones Científicas Salvat. pp. 1029-1036.

A.O.A.C. Oficial Method 995.09 Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in Edible Animal Tissues Liquid Chromatographic Method. First Action 1995. Final Action 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL, CHEMIST (AOAC), 1984. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14 de. Assoc. Offic. Chem Arlington, V.A.

Bartlett JG. 1990. Clostridium difficile: Clinical considerations. Rev. Infect. Dis. 12: S244.

Berridge NJ. 1956. Penicillin in milk. I. The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. J Dairy Res. 23: 336-341.

Booth JM, Harding F. 1986. Testing for antibiotic residues in milk. Vet Rec 119:565-569.

Cáceres D. 1990. Evaluación de una técnica de electroforesis de alto voltaje / Bioautografía para la identificación de residuos de antibióticos. Memoria de título Fac de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad Austral de Chile.

Codex Alimentarius 2004. Código de prácticas sobre buena alimentación animal. CAC/RCP 54-2004, pagina 1-13 (Documento en línea) Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net/web/standardlist.do>.

Cué M, Morejón M. 1999. Antibióticos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. Rev Cub Med Gen Integr 15:156-167.

Cullors JS. 1992. Test for identifying Antibiotic residues in milk: How well do they work? Vet Med 87: 1235-1241.

Dewney JM, Edwards RG. 1984. Penicillin hypersensitivity-is milk a significant hazard? In Antimicrobials and Agriculture, ed. M. Woodbine. In press. pp. 457-572.

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y Validación de Metodología para Análisis Químico. Bogotá, Colombia, 28 de noviembre al 2 de diciembre de 2005.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Proyecto TCP/RLA/3013(A). 2005. «Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur. Taller subregional sobre aseguramiento de calidad y validación de metodología para análisis químicos». Bogotá, Colombia.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) 1991. Memorandum: Tolerance and/or safe levels of animal drug residues in milk. July 21.

Franfe EL, Neu HC. 1987. Tetracyclines. Med Clin N Am 3:1221-36.

Goodman C, Gilman H. 2007. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médica PanAmerican. Buenos Aires, Argentina, pp. 1173-1179.

Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. Anal. Chem. 54. No 1 1982 67A-74-A.

Keukens HJ, Erts MML, Traag WA. 1992. Analytical Strategy for the Regulatory Control of Residues of Chloramphenicol in Meat: Preliminary Studies in Milk. J. of AOAC International. 75, (2) pag.

Klein NC, Cunha BA. 1995. Tetracyclines. Med Clin N Am 79:780-801.

Kucers A. 1980. Current position of chloramphenicol in chemotherapy. J. Antimicrob. Chemother. 6: 1-9.

MacNeil JD, Martz VK, Korsrud GO, Salsbury DC, Oka H, Epstein RL, Barnes CJ y col. 1996. Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in Edible Animal Tissues, Liquid Chromatographic Method: Collaborative Study J AOAC Internacional 79:405-417.

- Martínez Teppa, B. 1987. Los antibióticos en veterinaria. 2ª edición. Multimar. Maracay, pp. 232.
- McEwen SA, Black WD, Meek AH. 1992. Antibiotic residues (bacterial inhibitory substances) in the milk of cows treated under label and extra-label conditions. *Can. Vet. J.* Vol. 33: 527-534.
- Oka H, Yoshimoto Y, Kawamura N, Hayakawa J. 1991. Limited Survey of Residual Tetracyclines in Tissues Collected From Diseased Animals in Aichi Prefecture, Japan. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (6) pag. 894-896.
- Oka H, Mattsumoto H, Uno K, Harada K, Kadowaki S, Suzuki M. 1985. *J Chromatogr* 325:265-274.
- Pérez-Trallero L, Iglesias L. 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enf. Infecc Microbiol Clin* 21:520-529.
- Quattrocchi OA, Andrizzi SA, Laba RF. 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica, Buenos Aires Argentina 12:301-328.
- Rodríguez MA, Gonzales-Piñera JG, Barreto J, et al. 1998. Tetraciclinas. *Acta Med* 8:75-9.
- Ryan JJ, Wildman EE, Duthie AH, Atherton V. 1986. Detection of Penicillin, Cephapirin and Cloxacilin in Commingled Raw Milk by the Spot Test. *J. Dairy Sc.* 69: 1510/1517.
- Settepani JA. 1984. The hazard of using chloramphenicol in food animal. *JAVMA*- 184: 930 pag.
- Smilack JD. 1999. The tetracyclines. *Mayo Clin Proc* 74: 727-729.
- Taller Subregional sobre Aseguramiento de Calidad y Validación de Metodología para Análisis Químicos Bogotá, Colombia 2005.