

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Determinación de Penicilinas G en muestras de leche cruda en la comunidad de Zuleta, cantón Ibarra provincia de Imbabura, mediante inmunocromatografía de oro coloidal

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas
con Mención en Química Analítica**

Bryan Andrés Cabrera Corrales

Quito, 2020

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica, del Sr. Bryan Andrés Cabrera Corrales ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Msc. Eva Isabel Cipriani Avila
Directora de la Disertación
Quito, 05 de febrero del 2020

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a DIOS porque respiro, camino, veo, hablo y siempre me regala un día más de vida

A mi padre y mi madre ya que ellos me han dado todo su apoyo incondicional, en los momentos difíciles y felices de mi vida. Gracias por darme todo lo que he deseado y por sus palabras de aliento cada día.

A mi hermano, quien es la persona que me ayudó y estuvo al pendiente siempre dándome sus consejos.

A mi abuelita, tíos y primos quienes me han apoyado para llegar a este momento de mi vida.

A mis profesores, ya que con su conocimiento impartido me han ayudado a ser la persona que soy hoy en día.

A mi directora de disertación Msc. Eva Isabel Cipriani Avila quien me apoyo con mucha paciencia y dedicación en varios ámbitos de mi vida estudiantil y profesional.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, ya que por medio del “Fondo Públícalo” logré acceder a los recursos necesarios para realizar mi trabajo de disertación.

Agradezco al CESAQ y a todas las personas quienes lo conforman, por brindarme la apertura de utilizar sus instalaciones e instrumentos necesarios para la culminación del trabajo de disertación.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis amigos los cuales han formado parte de momentos increíbles en mi vida universitaria y fuera de ella. Especialmente a Karen y Bruna a quienes considero como mi familia. Gracias por todas las anécdotas vividas y que seguramente serán más.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 LECHE	4
1.1.1 Características y requerimientos de la leche	4
1.1.2 Principales fuentes de contaminación de la leche cruda	5
1.2 Residuos Veterinarios.....	7
1.2.1 Antibióticos.....	7
1.2.2 Betalactámicos	8
1.2.3 Sulfonamidas	8
1.2.4 Tetraciclinas.....	9
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	11

OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1 Desarrollo del método cromatográfico	12
2.1.1 Pruebas de extracción mediante SPE	14
2.2 Evaluación del método de inmunocromatografía de oro coloidal.....	15
2.3 Determinación de penicilinas en las muestras de leche cruda de la comunidad de Zuleta, mediante inmunocromatografía con oro coloidal.	16
2.3.1 Lugar de muestreo.....	16
2.3.2 Recolección de muestras	17
2.3.3 Determinación de antibióticos en las muestras de leche cruda de la comunidad de Zuleta, mediante inmunocromatografía con oro coloidal.....	18
2.4. Evaluación del desempeño del método cuantitativo	19
2.4.1 Exactitud.....	20
2.4.2 Precisión.....	20
2.4.3 Límite de detección y cuantificación	20
2.4.4 Linealidad	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
3.1 Desarrollo del método cromatográfico	22
3.2 Evaluación del método cromatográfico.....	27
3.2.1 Extracción de muestras mediante SPE	31

3.3 Análisis en laboratorio externo.....	37
4. CONCLUSIONES.....	38
5. RECOMENDACIONES.....	39
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7. ANEXOS.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca.

Tabla 2. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda.

Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda.

Tabla 4. Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis de penicilinas G.

Tabla 5. Condiciones variables que se aplicaron al método cromatográfico.

Tabla 6. Fortificaciones realizadas para la evaluación de desempeño del método.

Tabla 7. Áreas correspondientes a las penicilinas G benzatínica, potásica y procaínica según cada parámetro estudiado.

Tabla 8. Áreas correspondientes a las curvas de calibración de las penicilinas potásica y procaínica

Tabla 9. Evaluación de la precisión, exactitud, límites de cuantificación y detección del método cromatográfico.

Tabla 10. Influencia de la temperatura en la determinación de antibióticos por inmunocromatografía de oro coloidal.

Tabla 11. Evaluación del método de inmunocromatografía empleando estándares en tres niveles de concentración.

Tabla 12. Determinación de tres familias de antibióticos mediante inmunocromatografía de oro coloidal en muestras de leche.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación de la hacienda Zuleta con respecto a la ciudad de Ibarra.
- Figura 2. Diagrama de interpretación para evaluar la presencia de antibióticos betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas.
- Figura 3. Cromatograma de penicilinas G empleando dos tipos de columnas.
- Figura 4. Cromatograma de penicilinas G en dos longitudes de onda.
- Figura 5. Cromatogramas de penicilinas G empleando dos tipos de fases móviles.
- Figura 6. Cromatograma de penicilinas G empleando distintos volúmenes de inyección.
- Figura 7. Curva de calibración de la penicilina procaínica.
- Figura 8. Curva de calibración de la penicilina potásica.
- Figura 9. Cromatogramas de penicilinas G empleando extracción en fase sólida.
- Figura 10. Cromatograma de penicilinas G sin emplear extracción en fase sólida.
- Figura 11. Cromatograma de penicilinas G empleando un proceso de desnaturalización ácida de la muestra.

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Estructura química y principales usos de los antibióticos analizados.
- Anexo 2. Lugar de recolección de muestras
- Anexo 3. Principales antibióticos que se emplean y controlan en el país.
- Anexo 4. Certificado de calidad del Kit de pruebas rápidas BioEasy 3 in1 BTS.
- Anexo 5. Equipos empleados en los ensayos de inmunocromatografía.
- Anexo 6. Análisis de Anova de las penicilinas G potásica y procaínica
- Anexo 7. Comparación de una prueba rápida al emplear una incubadora y sin ella.
- Anexo 8. Modelo interpretativo de las pruebas rápidas para la determinación de penicilinas G, sulfadiazina y oxitetraciclina empleando estándares individuales en tres niveles de concentración.
- Anexo 9. Límites de detección del método por inmunocromatografía de oro coloidal.
- Anexo 10. Modelo interpretativo para la determinación de tres familias de antibióticos en un mix.
- Anexo 11. Pruebas realizadas en muestra de leche cruda mediante kit de pruebas rápidas.
- Anexo 12. Controles de calidad positivos y negativos realizados en la determinación de antibióticos por inmunocromatografía de oro coloidal.
- Anexo 13. Reporte de resultados de ensayos bromatológicos, metales y antibióticos realizados por Inspectorate en una muestra de leche cruda.

RESUMEN

La determinación de antibióticos en leche cruda ha tenido gran importancia en los últimos años, debido a que se han establecido controles en los límites máximos residuales de medicamentos veterinarios, con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos y evitar afecciones a la población. En este estudio, se planteó la determinación de penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica) en muestras de leche cruda almacenadas en un tanque de uso comunitario en la comunidad de Zuleta, para esto se desarrolló y evaluó un método empleando cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV) en el cual se obtuvieron valores de linealidad mayores a 0.9960, los porcentajes de recuperación oscilaron en el rango de 60% a 103% para la penicilina potásica, mientras que para la penicilina procaínica su rango fue de 45% a 102%. En relación a los límites de detección y cuantificación, se obtuvieron valores para la penicilina potásica de 1,5 y 5 mg/L, respectivamente, mientras que para la penicilina procaínica dichos valores fueron de 3.5 y 10 mg/L respectivamente, los límites obtenidos se encontraron por encima del valor requerido para evaluar el contenido de antibióticos según la normativa correspondiente, ya que se requieren valores en el rango de $\mu\text{g/L}$. Con lo cual se concluyó que el método cromatográfico desarrollado no es el adecuado para el análisis de penicilinas G, ya que únicamente se cumple con los criterios de linealidad y porcentaje de recuperación en el caso de la penicilina G potásica. Por otro lado, se evaluó el método de inmunocromatografía de oro coloidal, para esto se realizaron pruebas con estándares de penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica), sulfadiazina y oxitetraciclina, en tres niveles de concentración, los resultados obtenidos fueron óptimos ya que se lograron determinar los antibióticos de acuerdo a los límites y rangos de detección reportados por el fabricante y de acuerdo a lo requerido por la normativa. Mediante el método de inmunocromatografía de oro coloidal se pudo determinar que la concentración de antibióticos en las muestras de leche analizadas, estuvieron bajo los límites de detección, lo cual indica que la leche es apta para el consumo, cumpliendo con la norma NTE INEN: 9 2012, cuyo valor para el contenido máximo de antibióticos es de 4 $\mu\text{g/L}$.

Palabras clave: HPLC-UV, inmunocromatografía de oro coloidal, SPE, antibióticos, leche.

ABSTRACT

The determination of antibiotics in raw milk has had a great importance in recent years, since maximum residual limits of veterinary drugs have been established, in order to guarantee food safety and prevent diseases in the population. This study is focused on determining the presence of penicillins G (benzathine, potassium and procaine) in samples of raw milk, which is stored in tanks for community use, for this a method was developed and evaluated using high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV) in which linearity values greater than 0.9960 were achieved, the recovery percentages ranged from 60% to 103% for potassium penicillin, while for procaine penicillin its range was 45% to 102%. Regarding the limits of detection and quantification, the values obtained for potassium penicillin were 1.5 and 5 mg/L, while for procaine penicillin the values were 3.5 and 10 mg/L respectively, these values were not optimal for evaluating the antibiotic content according to the corresponding regulations, because The regulations require values in the range of $\mu\text{g/L}$, this happened because in the pretreatment and extraction phase of the sample no acceptable results were achieved. This concluded that the chromatographic method is not suitable for the analysis of penicillins G, because the criteria of linearity and percentage of recovery are only acceptable for potassium penicillin G. Additionally, the colloidal gold immunochromatography methodology was evaluated, for this, the tests were performed with standards of penicillins G, sulfadiazine and oxytetracycline, at three different levels of concentration, the results obtained were as expected according to the limits and ranges of detection reported by the manufacturer. Using the colloidal gold immunochromatography method, it was possible to determine that the concentration of antibiotics in the milk samples was below the detection limits, indicating that the milk is suitable for consumption, complying with the NTE INEN standard: 9. whose value for the maximum antibiotic content is 4 $\mu\text{g/L}$.

Keywords: HPLC-UV, colloidal gold immunochromatography, SPE, antibiotics, milk.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LECHE

La leche descrita técnicamente, es un alimento de alta complejidad ya que está compuesta de varias moléculas tales como: proteínas (caseína), lípidos, grasas, minerales, vitaminas (A, D, B2, B12) y otros nutrientes detallados en la tabla 1, es uno de los alimentos de mayor consumo por su alto valor nutricional en niños y adultos (Agudelo, 2005). Por otro lado, se debe entender que la leche cruda o no pasteurizada, se obtiene directamente de la vaca y no se aplica ningún tipo de tratamiento térmico o similar para contrarrestar la actividad microbiana (Codex Alimentarius, 2011).

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca.

	Nutrientes x cada 100 (g)					
	Agua	Energía (Kcal).	Proteína	Grasa	Lactosa	Minerales
Vaca	88	61	3.2	3.4	4.7	0.72

Agudelo (2005)

1.1.1 Características y requerimientos de la leche

La leche es un alimento de suma importancia para la dieta de los seres humanos y mamíferos en general, por esta razón, la misma debe cumplir con ciertas características organolépticas para asegurar la calidad del producto al consumidor: 1. Debe ser blanco opalescente o ligeramente amarillento. 2. Su olor debe ser suave, lácteo característico y libre de otros olores. 3. Su aspecto debe ser homogéneo y libre de partículas extrañas. Además, la leche debe cumplir ciertos parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, límites máximos de contaminantes, entre otros aspectos, los cuales están detallados en las tablas 2 y 3 (NTE INEN 9, 2012).

Tabla 2. Requisitos fisicoquímicos de la leche cruda.

Requisitos	Min.	Max.	Método de ensayo
Densidad relativa (20 °C)	1.028	1.032	NTE INEN 11
Materia grasa % (fracción de masa)	3.0	-	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico (fracción de masa)	0.13	0.17	NTE INEN 13
Sólidos totales (fracción de masa)	11.2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos (fracción de masa)	8.2	-	-
Cenizas (fracción de masa)	0.65	-	NTE INEN 14
Proteínas (fracción de masa)	2.9	-	NTE INEN 16
Presencia de conservantes, neutralizantes, adulterantes.	Negativo		NTE INEN 1500
Punto de congelación (°C)	-0.536		NTE INEN 15
Ensayo de reductasa (azul de metileno)	3 h		NTE INEN 018
Residuos medicamentos veterinarios ug/L	-	Establecidos por el Codex Alimentarius 4 µg/L	Establecidos por un compendio de métodos, los cuales respaldan los LMR del Codex

NTE INEN 9 (2012)

Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda

Requisito	Limite Max.	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos REP. UFC/cm ³	1.5x10 ⁶	NTE INEN 1529:5
Recuento de células somáticas/cm ³	7.0x10 ⁵	AOAC-978.26

NTE INEN 9 (2012)

1.1.2 Principales fuentes de contaminación de la leche cruda

La leche además de ser un medio nutritivo es también un medio favorable para la proliferación de los microorganismos, por lo que, para garantizar la inocuidad del producto que llega al consumidor, hay que entender cuáles son los

riesgos de contaminación que tiene la leche, partiendo por el ordeño, almacenamiento y transporte de esta. A estos contaminantes se los trata en dos grupos, los que se encuentran en el entorno y los de aplicación veterinaria.

La contaminación de la leche está directamente relacionada con el entorno y ecosistema en el que el ganado se desarrolla, en donde se destacan tres principales rutas de contaminación: La primera es el aire, en donde se encuentran únicamente los microorganismos como *Micrococcus*, *Streptomyces* y esporas de mohos como *Penicillium* y *Aspergillus* que son capaces de resistir a cambios de temperatura, constante exposición al oxígeno, radiación solar y humedad. La segunda ruta de contaminación es el agua que se emplea para la limpieza de los utensilios de ordeño, la higiene tanto del animal como del personal, en este caso, el agua puede ser fuente de microorganismos *psicrófilos* (*Pseudomonas*). Por último, el suelo, donde se encuentran microorganismos termodúricos y termófilos, cabe mencionar que la leche no entra en contacto con el suelo propiamente, pero si los animales y los utensilios empleados en el ordeño (Castillo, 2017).

La contaminación de la leche por aplicación de medicamentos veterinarios se da debido a cualquier afección que pueda llegar a tener el ganado vacuno. Para entender esto se debe mencionar que la leche al salir del pezón de la vaca puede contener de 100 a 10.000 bacterias/mL, esta carga puede aumentar exponencialmente si algún microorganismo afecta a la vía mamaria, mencionando también que la ubre de la vaca está en constante contacto con el suelo, aire, paja, forraje, lo cual aumenta considerablemente la carga bacteriana a la que puede llegar a estar expuesta la leche. Una de las principales enfermedades es la mastitis, la cual generalmente es tratada con antibióticos para contrarrestar sus efectos y evitar contaminación (Castillo, 2017).

La mastitis es un cambio inflamatorio de la glándula mamaria, en el ganado vacuno es causada por microorganismos que entran en contacto con las vías mamarias, provocando cambios físicos, químicos y microbiológicos, la mastitis se caracteriza por el incremento de células somáticas y por afecciones patológicas en el tejido mamario (Lundberg, 2015)

Los microorganismos tales como *estafilococos* y *estreptococos* son los principales organismos responsables de la mastitis en el ganado, hay otros organismos relacionados, pero en un porcentaje mucho menor. Mediante el uso regular de antibióticos intramamarios y la sustitución del ordeño manual con maquinaria, la incidencia de infecciones estreptocócicas ha disminuido radicalmente. En la actualidad, existen otros patógenos que provienen del entorno de las vacas, en este caso, *Escherichia Coli* y *Streptococcus aberis*, los cuales también pueden producir mastitis (Lundberg, 2015).

1.2 Residuos Veterinarios

Generalmente los medicamentos veterinarios se emplean para aumentar el metabolismo o tratar alguna afección del ganado vacuno. Una vez que el medicamento es suministrado al animal este pasa por un proceso para su eliminación ya sea por la orina, heces e incluso en la leche, estos residuos son altamente peligrosos para la salud humana, ya que se pueden acumular en cantidades tóxicas produciendo alergias u otro tipo de afecciones. Es por ello, que los antibióticos deben suministrarse con sumo cuidado debido a que su utilización requiere que se respeten unos tiempos de retiro, se entiende por tiempo de retiro al periodo que se debe esperar antes de comenzar la producción de leche, huevos y carne de animal, de manera que no permanezcan en estos productos los residuos del antibiótico empleado (Zapata, 2016).

1.2.1 Antibióticos

La palabra antibiótico proviene de la palabra “antibiosis” que significa “contra la vida”. Los antibióticos son considerados compuestos orgánicos que se obtienen por síntesis química o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos y que tienen la capacidad de inhibir la actividad de otros microorganismos. Sin embargo, esta definición a lo largo del tiempo ha ido cambiando, ya que se introdujeron términos más adecuados como los antimicrobianos, entre otros (Rachel, 2019).

La leche al tener un alto valor nutricional se ha convertido en un alimento prioritario y esto a su vez conlleva al uso regular de antibióticos para tratar enfermedades de glándulas mamarias en el ganado, entre los principales antibióticos están los betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas (Anexo 1), esto en función de su alta eficacia, bajo costo y variedad de fabricantes. Se debe mencionar que algunos antibióticos pueden eliminar por completo a otras bacterias y otros solo pueden inhibir su crecimiento, a estos se los llama bactericidas y bacteriostáticos respectivamente (Rachel. F, 2019; Suárez, 2009).

1.2.2 Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son compuestos orgánicos que en su estructura contienen un heterociclo azetidina, el cual es altamente reactivo, estos antibióticos tienen la propiedad de actuar inhibiendo las proteínas esenciales para la síntesis de la pared celular bacteriana, con el fin de producir una bacteriolisis en el proceso de división celular (Suárez, 2009). Las penicilinas son los antibióticos de mayor renombre, y pueden dividirse en varios subgrupos dependiendo de su actividad bacteriana, estas pueden ser las penicilinas naturales, semisintéticas y las resistentes a las penicilinasas, estas últimas son de gran importancia, ya que son fármacos con una acción bactericida de amplio espectro contra *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, entre otros (Gómez, 2015). Las penicilinas del tipo natural o G están compuestas por cuatro formas principales según su comercialización: penicilina G procaínica, penicilina G sódica, penicilina G potásica y la penicilina G benzatínica, estas tienen una acción efectiva contra *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens* y *Treponema pallidum*, la administración de estos antibióticos se realiza cada 4 horas, y su tiempo de retiro en leche tiene un rango de 3 a 5 días (Codex Alimentarius, 2018).

1.2.3 Sulfonamidas

Las sulfonamidas son compuestos análogos del ácido p-aminobenzóico. La primera de importancia clínica fue el prontosil (sulfamidocrisoidina), aunque se han sintetizado muchas, cada una difiere de otra en su estructura, pero no varían sus actividades antimicrobianas. Las sulfas usualmente son

bacteriostáticas e interfieren con la síntesis del ácido fólico, actuando como inhibidores competitivos del ácido p-aminobenzóico en los microorganismos susceptibles (Werth, 2018).

1.2.4 Tetraciclinas.

Las tetraciclinas son una familia de productos naturales entre ellas se encuentran: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina, también las hay semisintéticas como: metaciclina, doxiciclina, minociclina. Su forma de actuar es inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias. Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos (Vicente, 2009).

1.3 Técnicas de análisis para determinación de antibióticos en leche.

Internacionalmente la cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detector ultravioleta o detector de masas (HPLC/UV y HPLC/MS) han tenido gran auge en el campo de investigación, llevándolas a ser las técnicas por excelencia para la determinación de antibióticos en leche cruda. Las ventajas de estas técnicas instrumentales frente a los métodos cualitativos usados son bastante significativos, ya que principalmente nos permite conocer de forma exacta la cantidad de antibiótico que está presente en la leche; estas técnicas son más selectivas para definir que antibiótico está presente en la muestra, adicionalmente, se debe mencionar que con el uso de estas técnicas analíticas se logran límites de detección y cuantificación en el orden de mg/L en el caso de HPLC-UV y $\mu\text{g/L}$ en HPLC/MS. Si bien es cierto, son muchas las ventajas de los métodos cuantitativos, no está al alcance de todos, es por ello, que se emplean técnicas de identificación rápida.

1.3.1 Pruebas de identificación rápida de antibióticos

Las técnicas analíticas para la identificación de antibióticos generalmente son de carácter cualitativo mediante pruebas de laboratorio empleando kits que se usan específicamente para detectar residuos veterinarios. Su proceso

consiste en sumergir tiras de papel indicador o algún reactivo que produzca una reacción de coloración y mediante un diagrama se establece la ausencia o presencia del analito de interés (Aroca, 2016)

La inmunocromatografía de oro coloidal es una técnica la cual emplea dos anticuerpos. El primero es el anticuerpo de recubrimiento, el cual es capaz de interactuar con un antígeno. El otro es el anticuerpo de captura, los cuales están fijados en tiras de papel indicador de nitrocelulosa. El proceso se efectúa por medio de capilaridad, en donde se observa que se forma un complejo coloreado por la interacción de los anticuerpos y el antígeno, perteneciente al analito de interés. Actualmente, esta técnica ha tenido gran auge, ya que se pueden determinar varios compuestos complejos como antígenos, antibióticos y además representa una forma accesible para análisis de fluidos biológicos (Yu,2018).

En Ecuador la norma NTE INEN 9 2012 es la que establece los requisitos de calidad de la leche cruda, entre los que se consideran los límites máximos permitidos de residuos veterinarios; en esta norma se hace referencia al Codex Alimentarius, en donde se estipula que los límites máximos de residuos veterinarios en leche cruda para penicilinas G no deben ser superiores a 4 µg/L, sulfonamidas y tetraciclinas 100 µg/L, en ambos casos (Codex Alimentarius, 2018).

A pesar de las múltiples ventajas analíticas que presentan las técnicas de cromatografía líquida, en la práctica su aplicación para el control rutinario es reducido debido al costo y tiempo de análisis. Por ello, el presente estudio desea evaluar la eficacia y validez de una de las técnicas más usadas en campo para el control de antibióticos en leche, para lograr obtener resultados más confiables que garanticen la inocuidad de la leche que llega a los consumidores.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de penicilinas G en muestras de leche cruda recolectadas en la comunidad de Zuleta, cantón Ibarra provincia de Imbabura, empleando inmunocromatografía de oro coloidal, para establecer si se cumple con la normativa nacional, en cuanto al contenido máximo de residuos veterinarios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el desempeño del método de inmunocromatografía de oro coloidal en muestras de leche fortificadas con antibióticos según varios niveles de trabajo del método.

Determinar semicuantitativamente la presencia de antibióticos betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas empleando un kit de pruebas rápidas, para establecer si cumplen la normativa de límites máximos residuales.

Desarrollar el método cromatográfico para la determinación de penicilinas G en leche cruda.

Evaluar la metodología empleada para la separación de penicilinas teniendo en cuenta: linealidad, exactitud, precisión, límites de cuantificación y detección.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis de la calidad de la leche cruda es un análisis cotidiano y muy utilizado en el sector lácteo. Para la obtención de resultados confiables se debe seguir una serie de pasos, desde la recolección de la muestra, proceso de extracción y purificación, análisis de las muestras y la representación de los resultados. La realización de este estudio estuvo dividida en tres partes principales:

1-Desarrollo y evaluación del método cromatográfico: Determinación de penicilinas G benzatínica, potásica y procaínica mediante cromatografía líquida con detector UV. Posterior a su extracción mediante SPE.

2-Evaluación del desempeño del método de inmunocromatografía con oro coloidal.

3-Determinación de antibióticos en las muestras de leche cruda de la comunidad de Zuleta, mediante inmunocromatografía con oro coloidal.

2.1 Desarrollo del método cromatográfico

Para realizar el análisis de penicilinas G en leche cruda se empleó una columna C8 como fase estacionaria y una fase móvil de buffer fosfato (Merck) y Metanol (Merck, grado HPLC) con ácido trifluoroacético (TFA) (Merck para espectroscopia) y trietilamina (TEA) como modificadores orgánicos, la fase móvil fue filtrada empleado una bomba de vacío (Boeco R-300) con filtros (HV-Durapore EM PVDF 0.45 μm) y desgasificada por ultrasonido (Branson 2000). Se prepararon soluciones stock individuales de 1000 mg/L, para esto se utilizó una balanza analítica (Mettler Toledo) y se pesó 0.0100 g de estándar y se aforó a 10 mL con disolvente buffer fosfato/metanol (60:40), se realizaron diluciones para conseguir un mix de los tres antibióticos en las siguientes concentraciones 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/L. Cada solución se filtró (RephiQuik Philic PVDF 0,22 μm) antes de colocarlos en los viales (Agilent technologies) para su posterior análisis mediante sistema HPLC-UV (Hitachi L-2200). En la tabla 4 se detallan las condiciones cromatográficas empleadas para realizar el análisis (Ghassempour, 2005).

Se probaron algunas modificaciones al método propuesto por Ghassempour (2005) con el fin de determinar cuáles eran los resultados óptimos. En primer lugar, se cambió la columna de una C8 a C18 para observar cómo afecta la separación de los analitos y su influencia en los tiempos de retención en el cromatograma; la segunda variable fue la fase móvil en donde no solo se cambió la proporción de solventes sino también se probó empleando otros solventes como el agua. Por último, en el equipo se modificaron parámetros como: volúmenes de inyección y longitud de onda, todos los parámetros modificados se encuentran detallados en la tabla 5 (Han, 2015; Cámara,2013).

Tabla 4. Instrumentación y condiciones cromatográficas para el análisis de penicilinas G.

Fase móvil	A B	Metanol 45% Buffer Fosfato 55% (pH = 3.4)
Fase Estacionaria	C8	
Flujo	1 mL/min	
Volumen de Inyección	80 µL	
Modo de elución	Isocrático	
Longitud de onda	215 nm	
Tiempo de corrida	11 minutos	

Tabla 5. Condiciones variables que se aplicaron al método cromatográfico.

Fase móvil	A B	Metanol 30% Buffer Fosfato 70 % (pH = 3.4)
Fase Estacionaria	C18	
Flujo	1 mL/min	
Volumen de Inyección	20, 40, 50, 80 µL	

Modo de elución Isocrático

Longitud de onda 210 nm

Tiempo de corrida 15 minutos

2.1.1 Pruebas de extracción mediante SPE

Este proceso se llevó a cabo empleando un volumen de 5 mL de muestra de leche cruda homogeneizada y fortificada con 50 mg/L del estándar de penicilinas G en un tubo de ensayo de 15 mL, al cual se agregaron 5 mL de acetonitrilo (Merck grado HPLC) para promover la precipitación de proteínas. La mezcla se agitó durante 1 minuto, luego se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se procedió a precipitar los sólidos en una centrifuga (Irvine Scientific IS300) durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µm. Una vez realizada la precipitación de la proteína, se procedió a realizar la extracción en fase sólida.

Se usó un cartucho SPE Oasis HLB, el cual fue acondicionado de forma secuencial con 5 mL de acetonitrilo grado HPLC, seguido de dos volúmenes de 5 mL de agua grado HPLC en condiciones de vacío empleando una bomba (Boeco R300) y un sistema múltiple de vacío (Waters) durante 15 s con cada solvente respectivamente. Posteriormente se pasó la muestra previamente tratada a través del cartucho y los analitos retenidos se eluyeron con dos volúmenes de 3 mL de buffer fosfato a pH 3,4 y acetonitrilo (30:70, v / v) en otro tubo de ensayo. Los eluatos obtenidos de la extracción SPE se evaporaron a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno a temperatura ambiente empleando un evaporador de nitrógeno marca Glas-col. Finalmente, los residuos obtenidos fueron disueltos en un volumen de 500 µL de metanol, y se inyectó una alícuota de 80 µL en el sistema HPLC-UV (Hitachi L-2200). Para realizar las pruebas se empleó la investigación de Cámara (2013), cuyo procedimiento se adaptó para fines de nuestro estudio.

De acuerdo a revisión bibliográfica Han (2015), a este protocolo se propuso realizar algunas variantes con el fin de observar si existe una mejoría en los resultados, esto se centró en el proceso de extracción en fase solida SPE,

en el cual se cambiaron los solventes para acondicionar el cartucho, para acondicionar la fase estacionaria se emplearon 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua tipo 1 y finalmente 2 mL de buffer fosfato a pH de 3,4. La elución de los analitos se realizó empleando metanol; los eluatos obtenidos se evaporaron a sequedad en una corriente suave de nitrógeno y se los reconstituyó con metanol. Finalmente se evaluó el omitir la extracción en fase sólida y únicamente realizar la precipitación de la proteína con acetonitrilo para su posterior filtración y análisis en el equipo. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Adicionalmente, se planteó otro método de extracción de las muestras propuesto por (Yáñez, 2015) en donde se pesaron 1,2 g de leche cruda y se la llevó a calentamiento durante 10 minutos a una temperatura de 50°C, posteriormente se agregaron 0,25 mL de una solución de ácido acético en metanol al 40%, la mezcla se calentó nuevamente por 10 minutos y se añadió 1.0 mL de una solución 3 M de acetato de sodio, por tercera vez se calentó la muestra a la misma temperatura y tiempo mencionados anteriormente. Finalmente se procedió a centrifugar y recolectar el sobrenadante, al cual se le disolvió en 2 mL de agua grado HPLC para su posterior filtración y lectura en el equipo.

2.2 Evaluación del método de inmunocromatografía de oro coloidal

Una vez finalizadas las pruebas de extracción por SPE, los resultados obtenidos no cumplían con las necesidades analíticas para poder ser aplicado en las muestras reales, por esta razón se optó por usar únicamente la técnica de inmunocromatografía con oro coloidal, los cuales son kits de uso comercial. Para lo cual, se decidió realizar una evaluación del método mediante el análisis de muestras fortificadas con antibióticos de tres familias diferentes, para las fortificaciones se partió de soluciones stock en una concentración de 100 mg/L para esto se pesó 0,0010 g de las tres familias de antibióticos individualmente y se aforó con agua desionizada, luego se realizaron diluciones hasta llegar a las concentraciones detalladas en la tabla 6, el volumen final fue aforado con leche comercial (La lechera), cuyo contenido de antibióticos se conoce es nulo.

Para mayor confiabilidad de los resultados se propuso evaluar ciertos parámetros del procedimiento como es el caso del uso de la incubadora, con el fin de observar si hay variabilidad al emplear temperaturas distintas, para eso se procedió a realizar pruebas con estándares de penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica), sulfadiazina y oxitetraciclina, se los evaluó empleando la incubadora y sin ella. Por otro lado, se evaluaron estándares de cada familia en tres niveles de concentración para corroborar resultados bajo el rango de medida, dentro del rango de medida y sobre el rango de medida del kit, cabe mencionar que los análisis se realizaron en diferentes días y con tres analistas distintos, eso con el fin de obtener resultados representativos en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 6. Fortificaciones realizadas para la evaluación de desempeño del método.

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica)	0.75 µg/L	1.5 µg/L	3 µg/L
Sulfadiazina	1.0 µg/L	4 µg/L	6 µg/L
Oxitetraciclina	10 µg/L	20 µg/L	35 µg/L

2.3 Determinación de penicilinas en las muestras de leche cruda de la comunidad de Zuleta, mediante inmunocromatografía con oro coloidal.

2.3.1 Lugar de muestreo

El muestreo se realizó en la comunidad de Zuleta, cantón Ibarra provincia de Imbabura, donde se proporcionó la apertura a los tanques fríos de uso comunitario para almacenar la leche. En la figura 1 se muestra el lugar en el que se realizó el muestreo.



Figura 1. Ubicación de la hacienda Zuleta con respecto a la ciudad de Ibarra.

2.3.2 Recolección de muestras

El método que se empleó para la recolección de la muestra fue el Instructivo INT/CL/010 sugerido por Agrocalidad. Este protocolo busca el cumplimiento de dos requisitos básicos que se deben tener en cuenta para que la muestra cumpla con los lineamientos; ser representativa del volumen total de leche de donde se extrajo o recolectó y manejo de la muestra de tal manera que se mantenga su composición original hasta el momento de realizar los análisis en el laboratorio (Agrocalidad, 2018).

Las muestras de leche cruda se obtuvieron de dos tanques de uso comunitario, los cuales tienen control de temperatura, con capacidad de 2000 L (Anexo 2), para realizar la recolección se homogeneizó el tanque con un cucharón de acero inoxidable para que la muestra sea representativa, se procedió a medir la temperatura del tanque, así como el pH de la leche, el cual debe estar entre 6.5 y 6.7. Al momento de extraer la leche primero se introdujo el cucharón 2 veces, volcando su contenido en el mismo recipiente, luego introduciendo el cucharón como mínimo de 15 a 20 cm por debajo del nivel de leche se recolectó la muestra, se debe evitar tomar la muestra de la superficie o de la llave del tanque; con el fin de obtener una muestra representativa y evitar

contaminación cruzada. Se colocó la leche en un recipiente de vidrio de 500 mL, sellado con su respectiva identificación. Finalmente, las muestras se colocaron en un enfriador para mantener su temperatura durante el traslado hacia el laboratorio (Agrocalidad, 2018).

Al ser tanques de uso comunitario se espera que el contenido de antibióticos esté bajo el límite de residuos veterinarios, esto debido a que la comunidad cuenta con un protocolo de recolección de leche el cual contempla el tiempo de retiro de los antibióticos.

2.3.3 Determinación de antibióticos en las muestras de leche cruda de la comunidad de Zuleta, mediante inmunocromatografía con oro coloidal

Los antibióticos que se eligieron cuantificar en este estudio fueron seleccionados mediante revisión bibliográfica de normas tales como: Codex Alimentarius, Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura, Normas INEN y por último se contactó con Agrocalidad, la cual es la agencia que se encarga de regular la inocuidad de alimentos, sanidad vegetal y animal en Ecuador; esta agencia proporcionó una tabla de los principales antibióticos que se emplean y controlan en el país (Anexo 3), en donde se estableció cuáles son los antibióticos mayormente suministrados al ganado. Una vez realizada la revisión bibliográfica se determinaron los antibióticos para realizar el estudio, los cuales fueron: betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas.

Para la determinación de las tres principales familias de antibióticos (betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas) en leche cruda mediante pruebas cualitativas se adquirió un kit (BioEasy 3 in1 BTS) (Anexo 4) y estableció realizar los ensayos "*in situ*", para esto se recolectaron alícuotas de 500 mL de cada tanque frío con el procedimiento explicado previamente. Se usó un incubador (Shenzhen MiniT-N) (Anexo 5) y se estableció una temperatura la cual fue de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se pipeteo 200 μL de leche dentro de una celda que contiene el reactivo que dará origen a la coloración, se procuró homogeneizar perfectamente hasta que se forme una única fase líquida y se la incubó durante tres minutos a 40°C . A continuación, se introdujo una lámina graduada dentro

de la celda y se lo dejó incubar durante seis minutos adicionales a la misma temperatura. Finalmente, se procedió a retirar la lámina graduada de la celda e interpretar los resultados mediante la figura 2. Para corroborar los datos obtenidos se empleó un control positivo con 60 µg/L de tetraciclina, 50 µg/L de sulfametazina y 4.5 µg/L de penicilinas G. y para el control negativo únicamente se empleó agua desionizada (Sudmilk).

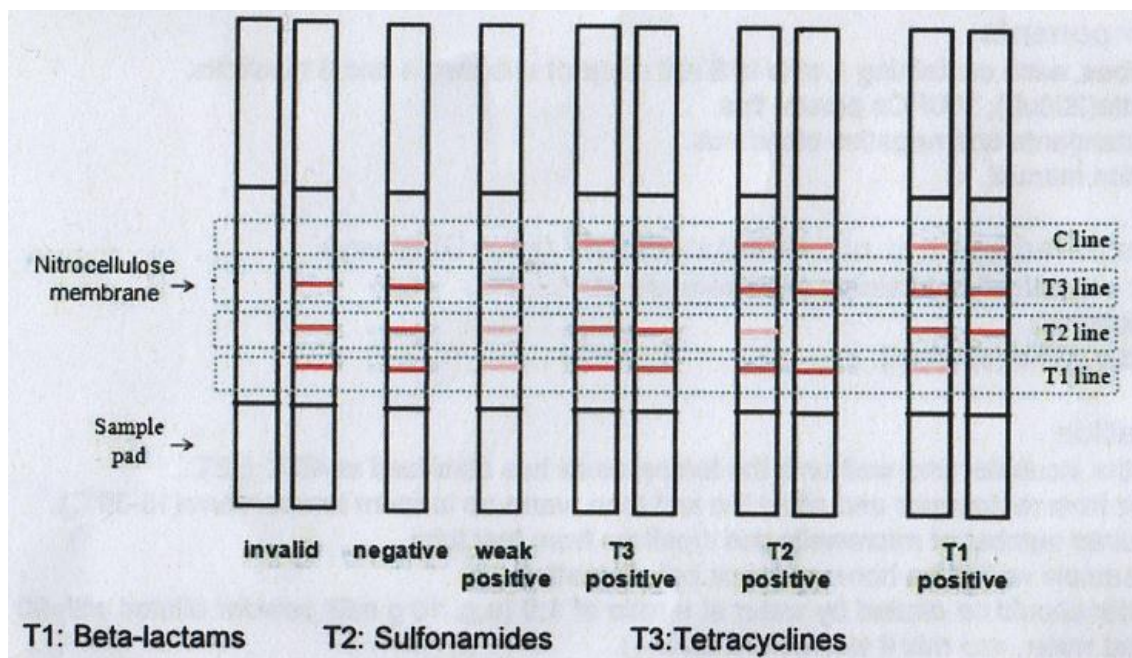


Figura 2. Diagrama de interpretación para evaluar la presencia de antibióticos betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas.

2.4. Evaluación del desempeño del método cuantitativo

Generalmente para la determinación o identificación de un analito en cierto tipo de matriz, se desarrolla un método analítico el cual debe ser puesto a prueba para evaluar la capacidad que tienen los procedimientos y condiciones empleados para reflejar resultados confiables, con el fin de aceptar o rechazar el método según varios criterios de calidad (CENAM, 2005). Para evaluar el método cromatográfico de este estudio se ha propuesto considerar los siguientes parámetros:

2.4.1 Exactitud

El término exactitud se lo define como el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurando. La exactitud se evalúa en términos de % de recuperación y se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{concentración obtenida}}{\text{concentración real}} * 100$$

2.4.2 Precisión

Se la define como una medida de proximidad entre los valores medidos de una misma medida, obtenidos en mediciones repetidas, bajo condiciones establecidas, en este caso se evalúa el porcentaje de CV (coeficiente de variación) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CV} = \frac{S}{X} (100\%)$$

Donde: S = Desviación estándar

X = Media de las concentraciones

2.4.3 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección está definido como la concentración más baja que se puede distinguir mediante el método establecido. Mientras que el límite de cuantificación se define como la cantidad más pequeña de un analito que se pueda cuantificar confiablemente por el instrumento, las fórmulas que se emplean para calcular estos parámetros son las siguientes (Boque, 2004).

Límite de Detección: $LD = t \text{ de student} * S$

Límite de Cuantificación: $LC = LD * 3$

Donde: LD = Límite de detección (mg/mL)

S= Desviación estándar

LC = Límite de cuantificación (mg/mL)

2.4.4 Linealidad

La linealidad se encarga de relacionar que tan exactas son las mediciones efectuadas en el rango de medida establecido, además indica si el sistema de medición cumple con los criterios de exactitud en cuanto a los valores de referencia en la curva. La linealidad se evalúa empleando la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R^2 .

$$y = mx + b$$

Donde: y = señal de respuesta

m = pendiente

x = concentración

b = intercepto

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Desarrollo del método cromatográfico

Luego de las diversas pruebas realizadas con las respectivas modificaciones al método se determinó que las mejores condiciones para la determinación de penicilinas G eran las indicadas en la tabla 4. A continuación se comparan los cromatogramas obtenidos en cada una de las pruebas realizadas:

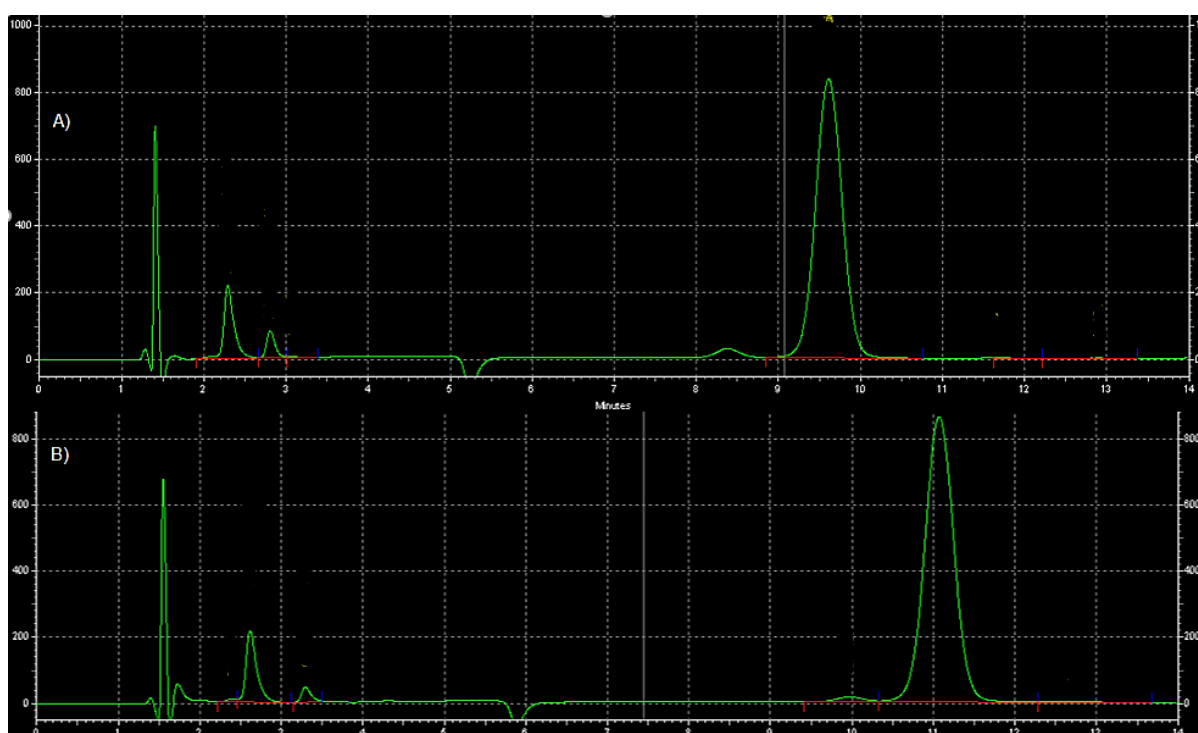


Figura 3. Cromatograma de penicilinas G empleando A) Columna C8 B) Columna C18

En primer lugar, se evaluaron los tiempos de retención de los analitos mediante la comparación de dos columnas cromatográficas. Como se puede evidenciar en la figura 3A el tiempo de retención para las penicilinas procaínica, benzatínica y potásica es de 2.25, 2.84 y 9.58 respectivamente, mientras que en el caso de la figura 3B el tiempo de retención de cada penicilina es de 2.62, 3.29 y 11.16 respectivamente. Esta diferencia está marcada por la composición que tienen las columnas cromatográficas, la columna C8 (octilsilano) presenta

menor número de carbonos unidos a la sílice con respecto a la C18 (octadecilsilano) esto se traduce en que la columna C18 presenta una mayor densidad y área superficial provocando que el analito presente en la fase móvil tenga mayor interacción con la fase estacionaria ocasionando que los analitos eluyan en un tiempo más largo (European pharmacopoeia, 2013). Por este motivo, se seleccionó a la columna C8 como idónea ya que los tiempos de retención son menores, lo cual evita tiempos de corrida más largos, así como el consumo de fase móvil, además de no existir diferencia significativa en la resolución de los picos o señal obtenida con cada columna.

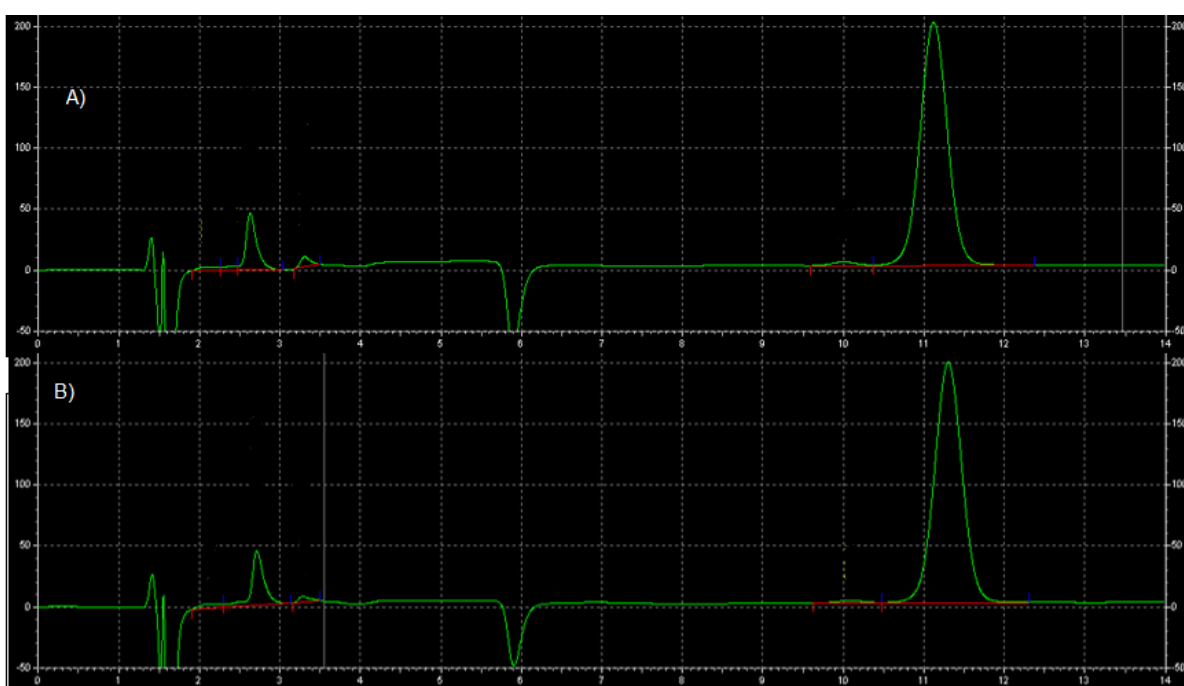


Figura 4. Cromatograma de penicilinas G empleando dos longitudes de onda A) 210 nm B) 215 nm

Como se puede ver en la figura 4, se realizaron corridas cromatográficas en dos longitudes de onda distintas, con el fin de observar si los picos en los cromatogramas presentan mejor resolución, en este caso, se observó que los picos de las penicilinas G no cambian drásticamente ya que ambas longitudes de onda presentan picos de absorbancia y áreas significativas. Idealmente se debería realizar un barrido completo con un detector de arreglo de diodos para evidenciar donde se encuentra el pico de máxima absorbancia de nuestro analito y a su vez observar el efecto del solvente en el cromatograma. Por otro

lado, se debe tener en cuenta la fase móvil empleada tiene metanol, el cual presenta una longitud de onda de corte de absorbancia a 210 nm (Aguareles et al, 2011) provocando la formación de un pico el cual puede solaparse con los analitos que tengan tiempos de retención bajos.



Figura 5. Cromatogramas de penicilinas G empleando dos tipos de fases móviles: A) Metanol/buffer (45:55) B) Metanol/Buffer (70:30)

En cuanto a la composición de la fase móvil para la determinación de penicilinas G, se emplearon dos combinaciones de solventes distintas, y se evaluó un estándar de penicilina G de 100 mg/L. En la figura 5A, se observan picos pertenecientes a la penicilina procaínica, benzatínica y potásica en tiempos de retención de 2.25, 2.84 y 9.58 respectivamente, estos picos se encuentran definidos y resueltos. Por otro lado, en la figura 5B no se logró obtener el pico característico a la penicilina benzatínica y los tiempos de retención de los demás picos aumentaron. Con respecto a las figuras 5A y 5B su variación se debe al aumento de polaridad de la fase móvil, ya que al incrementar el porcentaje de fase orgánica (metanol), las penicilinas tienden a solubilizarse mejor y por consecuencia al estar empleando una columna C8, la interacción entre el analito presente en la fase móvil y la fase estacionaria aumenta, por ello, el aumento en los tiempos de retención. Para los fines de este estudio se empleó una fase móvil con TFA y TEA como modificadores los cuales cumplieron dos objetivos, ser un amortiguador de la fase móvil ya que se

trabajó con buffer pH 3.4 y también de suprimir las interacciones de los grupos silanol (pH ácido) traduciendo esto en una menor interacción del analito con la fase estacionaria y por ende tiempos de retención más bajos.

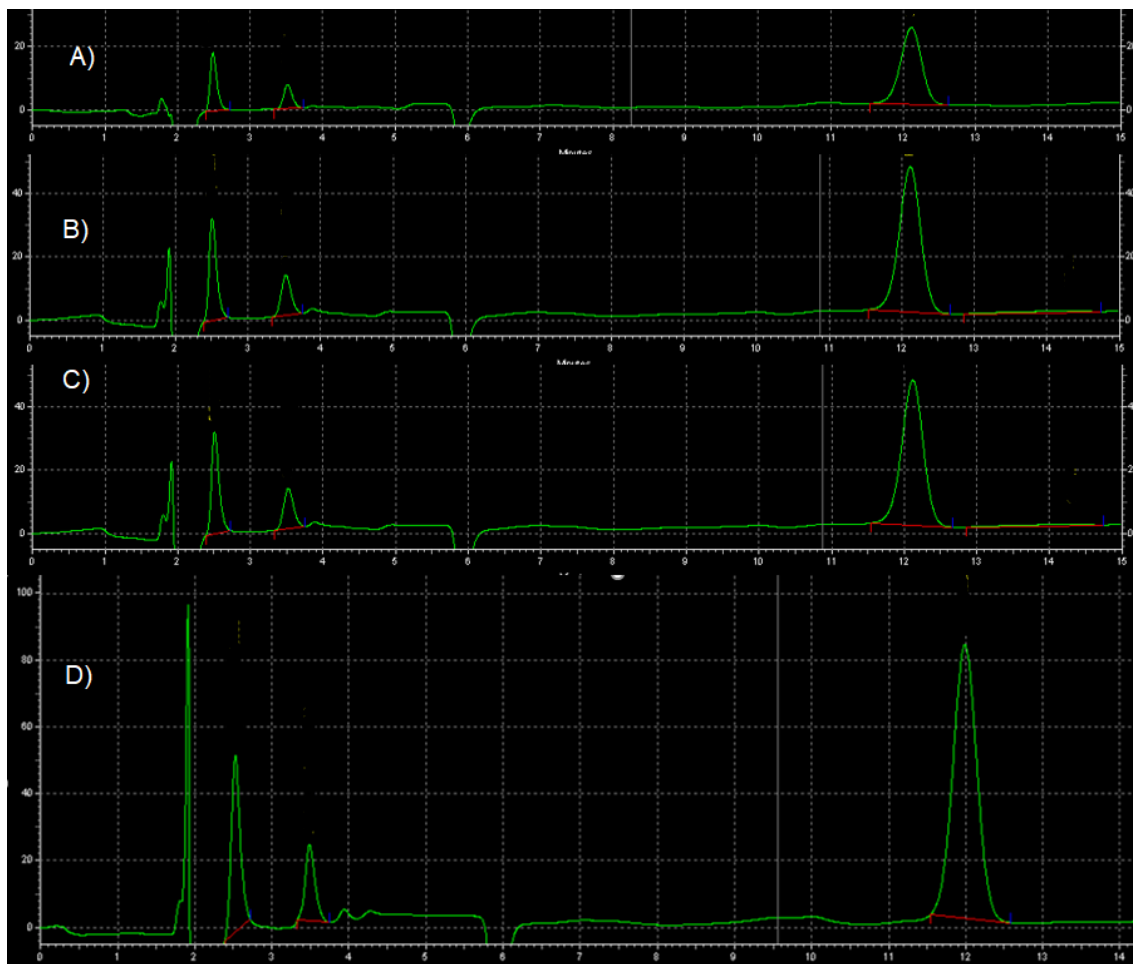


Figura 6. Cromatograma de penicilinas G empleando distintos volúmenes de inyección: A) 20 µL B) 40 µL C) 50 µL D) 80 µL

En la figura 6, se presentan cuatro cromatogramas pertenecientes a un estándar de penicilinas G en una concentración de 10 mg/L, como se puede observar en los cromatogramas a medida que el volumen de inyección aumenta, el área de los picos también lo hace. Sin embargo, hay ciertas consideraciones que se deben tomar en cuenta al momento de seleccionar un volumen de inyección ideal, generalmente a medida que se aumenta el volumen de inyección, los picos tienden a ensancharse, lo cual, al tener picos juntos, estos podrían llegar a solaparse provocando cromatogramas no resueltos. Por otro lado, se debe tener presente el volumen de la columna cromatográfica ya que,

si se inyecta demasiado, puede generarse una mala forma de pico debido a la sobrecarga en la columna, sumado a que, si no se controla con un flujo de fase móvil adecuado, se genera mayor presión al sistema provocando daños en la columna. Por estos motivos se sugiere que el volumen de inyección debe ser al menos 5% menos del volumen total de la columna (Waters, 2012). Por estos motivos el volumen de flujo ideal fue de 80 μL , ya que se lograron obtener picos resueltos y mejorar la sensibilidad del método sin poner en riesgo la columna.

Las distintas condiciones cromatográficas aplicadas al método permitieron obtener cromatogramas con picos resueltos y definidos, pero hay un concepto al cual hay que enfatizar, el tiempo muerto es el tiempo que tarda en eluir un componente que no se retiene en la columna. Es por ello, que para considerar una buena separación cromatográfica el pico que eluya primero debe tener al menos el doble de tiempo de retención que el tiempo muerto, en este estudio, el pico correspondiente a la penicilina procaínica no cumple con este criterio de separación (Agilent technologies, 2016).

En los cromatogramas observados, hay la presencia de picos negativos, estos picos se detectan debido al diluyente empleado en los estándares o por la fase móvil, este fenómeno ocurre ya que existe la presencia de algún compuesto con una absorbancia menor a 0, este efecto es común cuando se emplean modificadores orgánicos, dado el caso que el pico negativo este cerca de un pico característico del analito se debería probar con otro tipo de diluyente como el agua. Hay que destacar que los picos negativos observados en los cromatogramas no difieren en su área y tiempo de retención por lo cual no representan un problema para el método. Una vez seleccionadas las condiciones óptimas se procedió a preparar estándares en diferentes niveles para determinar la sensibilidad del método.

A continuación, se presenta la tabla 7 la cual corresponde a un resumen donde se pueden identificar las áreas de los picos correspondientes a las penicilinas G benzatínica, potásica y procaínica, para cada parámetro estudiado en el desarrollo del método cromatográfico.

Tabla 7. Áreas correspondientes a las penicilinas G benzatínica, potásica y procaínica según cada parámetro estudiado.

Parámetro		Áreas		
		PG benzatínica	PG procaínica	PG potásica
Tipo de columna	C8	2444141	7806297	75878981
	C18	1396387	7984257	86491201
Longitudes de onda	210 nm	292414	1748113	19165121
	215 nm	176529	1960039	19086582
Fases móviles	Metanol/buffer (45:55)	2822947	7740153	75907462
	Metanol/Buffer (70:30)	pico no resuelto	pico no resuelto	17537221
Volumen de inyección	20 µL	259645	484029	1997185
	40 µL	489368	924921	3854399
	50 µL	571795	1125569	4749813
	80 µL	815202	1700039	7101568

3.2 Evaluación del método cromatográfico

La linealidad evalúa qué tan exactas son las medidas efectuadas con respecto al valor teórico, como se puede evidenciar en las figuras 7 y 8 se obtuvieron relaciones lineales aceptables para la penicilina procaínica y potásica respectivamente, Por otro lado, en el caso de penicilina benzatínica no se obtuvieron picos definidos en ninguna concentración provocando una variación en sus áreas. Para evaluar la linealidad se calculó el coeficiente de correlación (R^2). En este caso únicamente la penicilina potásica y procaínica cumplen con los criterios de aceptación, de al menos un R^2 mayor a 0.995, los cuales se han propuesto mediante revisión de otros estudios similares, mientras que la penicilina benzatínica no cumple con los criterios de aceptación

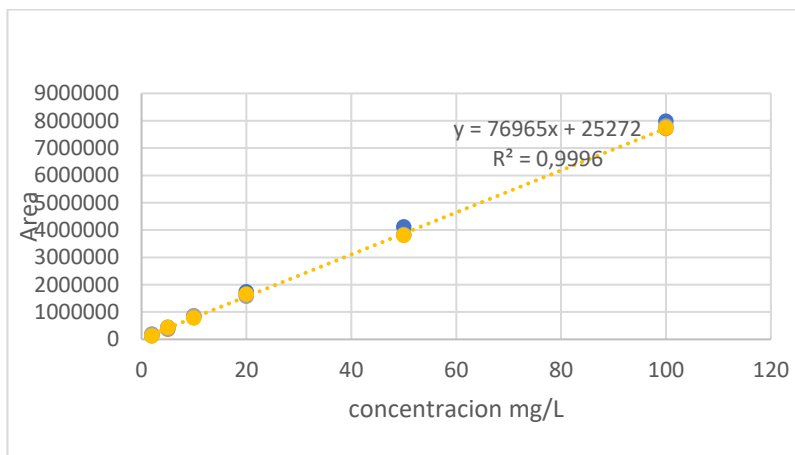
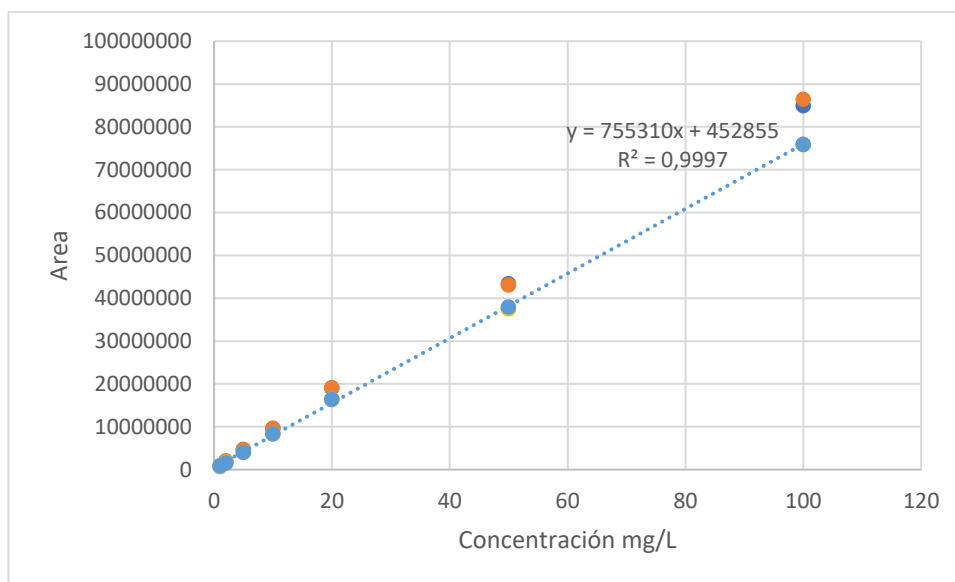


Figura 7. Curva de calibración de la penicilina procaínica.



En la tabla 8 se observa un resumen con los valores de las áreas correspondientes a las curvas de calibración para las penicilinas potásica y procaínica.

Tabla 8. Áreas correspondientes a las curvas de calibración de las penicilinas potásica y procaínica

Penicilina Potásica					
Concentración mg/L	Área C1	Área C2	Área C3	Área C4	Área C5
2	1990088	1968401	1505872	1741815	1555432
5	4731914	4718119	4026561	4076214	4038579
10	9646219	9669060	8341748	8359951	8367744
20	19086582	19165121	16357696	16466049	16429892
50	43431122	43135922	37629178	37623922	37992608
100	84931853	86491201	75940883	75878981	75907462

Penicilina Procaínica						
Concentración mg/L	Área C1	Área C2	Área C3	Área C4	Área C5	
2	Pico no definido	143314	183569	197645	123796	
5	430533	436939	374613	396534	436907	
10	950787	843935	866685	863486	781358	
20	1960039	1748113	1625630	1578288	1661769	
50	4259101	4117188	3832432	3843896	3800040	
100	7880150	7984257	7719175	7806297	7740153	

Figura 8. Curva de calibración de la penicilina potásica

En el Anexo 6 se muestra el análisis de varianza (Anova), para esto se planteó una hipótesis nula H_0 "La varianza de los errores es constante en todo el rango analizado", para aceptar o rechazar esta afirmación se debe comparar F calculado vs F crítico. Al realizar este análisis se logró constatar que la hipótesis nula se acepta, lo cual indica que la metodología aplicada cumple dentro del rango establecido.

Los estándares de 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg/L no dieron una señal cuantificable por lo cual indica que el límite del método fue de 2 y 5 mg/L para la penicilina potásica y procaínica respectivamente.

Tabla 9. Evaluación de la precisión, exactitud, límites de cuantificación y detección del método cromatográfico.

Penicilina Potásica						
Concentración (mg/L)	%Precisión CV	Exactitud %Recuperación	S	LD (t*S)	LC (LD*3)	
2	24,55	60,50	0,30	1,11	3,34	
5	9,09	87,66	0,40	1.49	4.48	
10	6,37	100,19	0,64			
20	5,75	103,38	1,19			
50	4,75	96,90	2,30			
100	4,52	97,78	4,42			
Penicilina procaínica						
Concentración (mg/L)	%Precisión CV	Exactitud %Recuperación	S	LD (t*S)	LC (LD*3)	
2	150,13	45,15	1,36	6,16	18,47	
5	24,96	76,02	0,95	3.56	10.67	
10	13,79	95,43	1,32			
20	6,23	102,58	1,28			
50	4,03	99,02	2,00			
100	1,24	99,10	1,24			

Como se observa en la tabla 9, se realizó la evaluación de precisión y exactitud para el método, esto se realizó mediante el promedio de 5 lecturas realizadas en dos días distintos. En el caso de la precisión se puede observar una relación inversamente proporcional, a medida que la concentración de las dos penicilinas aumenta, el porcentaje CV disminuye; lo cual indica que, al evaluar valores de concentración más bajos, hay menor cantidad de analito, provocando que el CV aumente y a su vez tenga una variabilidad mayor con respecto al valor teórico. Para aceptar el método en términos de precisión, se debe tener un porcentaje CV menor a 10, cuyo valor se estableció mediante revisión bibliográfica de trabajos similares (UNODC, 2012; Cámara, 2013), lo cual indica que para la penicilina potásica el rango aceptable empieza a una concentración de 5 mg/L, mientras que en la penicilina procaínica su rango de aceptabilidad está en concentraciones mayores a 10 mg/L. Para evaluar la exactitud se evaluaron los porcentajes de recuperación, en donde se observa una relación proporcional, a mayor concentración se incrementa el porcentaje de recuperación, en este caso la evaluación permitió obtener porcentajes de recuperación que oscilaron en el rango de 60% a 103% para la penicilina potásica, mientras que para la penicilina procaínica su rango fue de 45% a 102%.

Los límites de detección y cuantificación alcanzados en la evaluación del método cromatográfico se detallan en la tabla 9, se evidencia que la penicilina potásica presentó una concentración ideal para su determinación de 5 mg/L, mientras que para la penicilina procaínica se obtuvieron valores que no están dentro del criterio de aceptabilidad ya que el límite de detección es mayor al esperado 10 mg/L. Esta variación entre los dos analitos se debe a la variabilidad de los resultados obtenidos al hacer las repeticiones en las concentraciones evaluadas, lo cual indica que el método no es sensible para determinar penicilina procaínica.

Una vez realizada la evaluación del método cromatográfico para la determinación simultánea de penicilina potásica, procaínica y benzatínica se observó que no se lograron obtener resultados óptimos para cada analito, esto principalmente se debe a la solubilidad, ya que son relativamente diferentes

como el caso de la penicilina benzatínica, en donde las repeticiones realizadas para la evaluación del método difieren de manera significativa, ocasionando datos dispersos. Para la penicilina procaínica, se obtuvieron mejores resultados, aunque el rango óptimo de trabajo no fue el esperado, esto indica que el método desarrollado para este analito no es lo suficientemente sensible para trabajar en concentraciones bajas. Finalmente, se obtuvieron los mejores resultados evaluando la penicilina potásica, esto en su medida gracias a que fue el analito con mayor solubilidad en el disolvente empleado en los estándares, además que la sensibilidad del método permite trabajar en concentraciones más bajas con respecto a los otros analitos. En conclusión, se observó que el método es capaz de determinar penicilina potásica dentro de los criterios de aceptabilidad, mientras que para la penicilina procaínica y benzatínica se deberían evaluar otras condiciones cromatográficas.

3.2.1 Extracción de muestras mediante SPE

Para realizar la determinación de medicamentos veterinarios en una matriz compleja como la leche cruda, se debe realizar un pretratamiento de la muestra, con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferencias y a su vez que indirectamente mejore la sensibilidad y selectividad del método. La composición de la leche es compleja ya que contiene proteínas, grasas, carbohidratos entre otros compuestos. Por este motivo, se decidió realizar la precipitación de proteínas empleando como solvente orgánico acetonitrilo cuya constante dieléctrica es relativamente baja (37,5) de modo que, al agregarlo a la leche, baja la constante dieléctrica del medio, lo que favorece la interacción de los grupos amino con carga eléctrica de las proteínas y por lo tanto de su precipitación (Novak, 2016). Con este proceso se logró obtener un extracto relativamente limpio el cual se filtró para eliminar cualquier tipo de interferencia y se procedió a la realizar la extracción SPE.

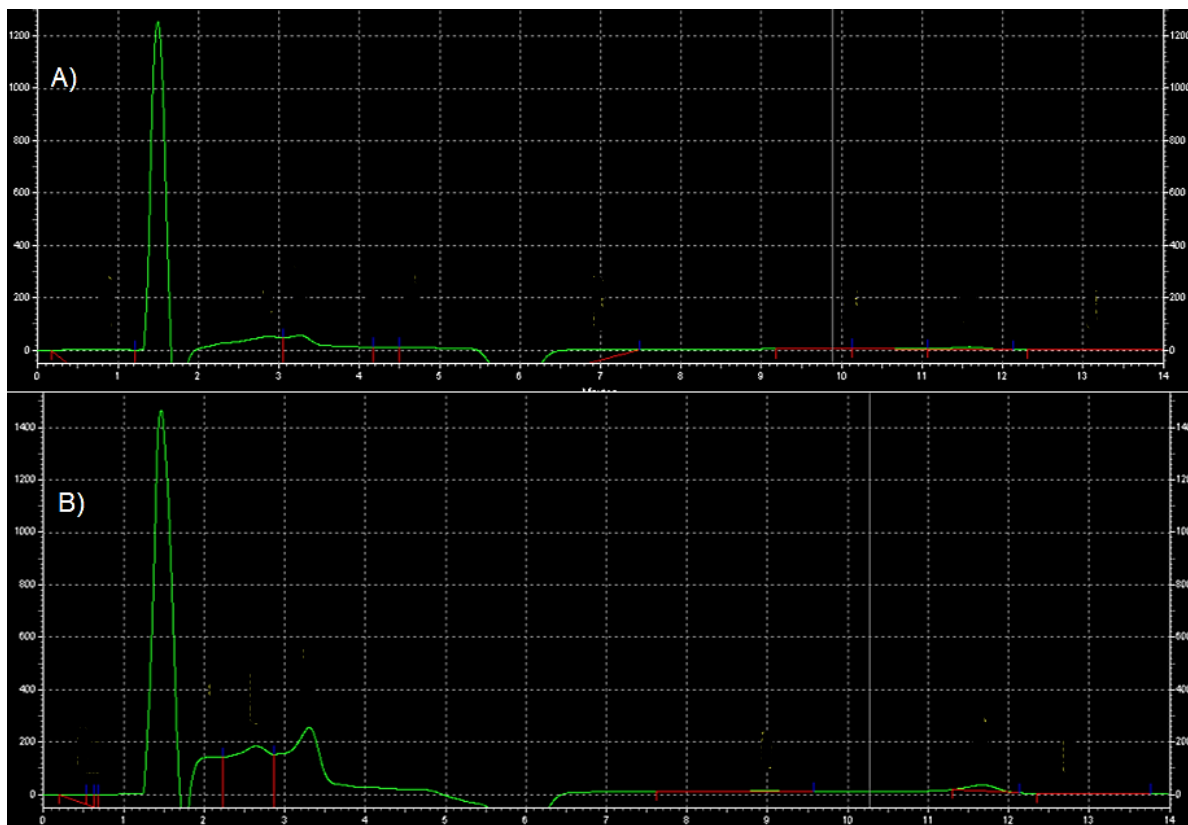


Figura 9. Cromatogramas de penicilinas G empleando extracción en fase solida A) Cartucho acondicionado con acetonitrilo y agua tipo 1 B) Cartucho acondicionado con metanol, agua tipo 1 y buffer fosfato

Una vez realizado el proceso de pretratamiento de la muestra, se prosiguió a realizar la extracción en fase sólida, como se puede observar tanto en la figura 9A y 9B no se lograron obtener picos pertenecientes a las penicilinas G, en los dos casos el tiempo de elución de los analitos fue de 15 segundos, al notar que los resultados no eran los esperados, se aumentó el tiempo a 10 minutos, tratando de emular las condiciones de separación de la columna cromatográfica, con ningún tiempo se lograron obtener cromatogramas resueltos. Según (Han, 2015), un factor que interfiere directamente en la retención de los analitos es el pH, ya que los betalactámicos son estables en soluciones neutras o ligeramente básicas, en este caso se usó buffer fosfato pH 3.4 para acondicionar el cartucho, el pH al ser tan bajo ocasionó una protonación del compuesto con H^+ , lo cual alteró las propiedades de la molécula provocando así que no se produzca una señal en los cromatogramas.

El acondicionamiento del cartucho y la elución de los analitos es de vital importancia en una extracción SPE, ya que de ello depende su estabilidad y adsorción, es por este motivo, que se deben evaluar más opciones en cuanto a los solventes usados en el acondicionamiento del cartucho y también se deben manejar tiempos más largos para lograr una elución efectiva de los analitos.

Adicionalmente, se debe mencionar que se realizaron pruebas con un cartucho SPE C18 (Sep-Pak Waters), el cual tenía una capacidad de adsorción menor, con este cartucho se esperaba trabajar con muestras en menores concentraciones y lograr obtener picos definidos. Pero al efectuar el mismo procedimiento que al cartucho C8, no se lograron obtener resultados diferentes.

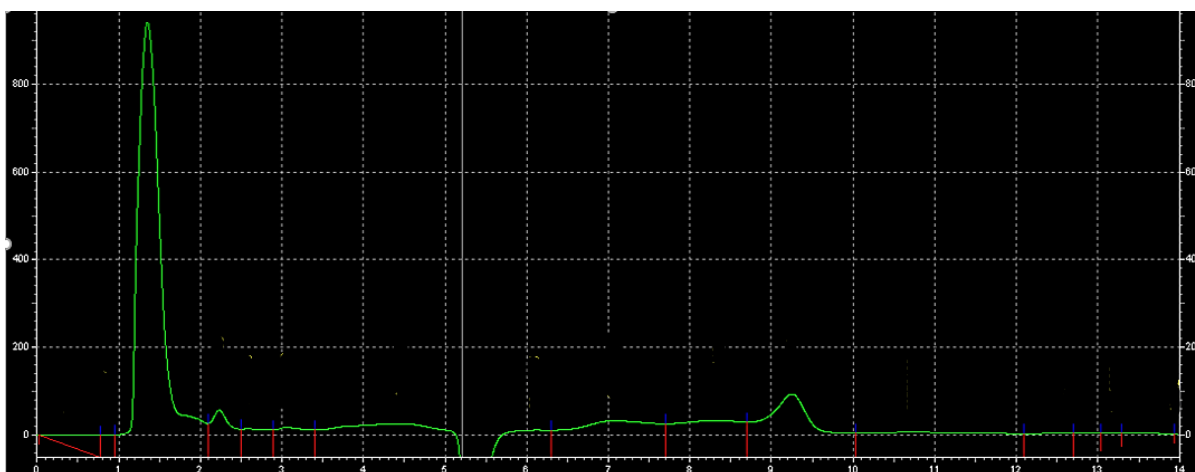


Figura 10. Cromatograma de penicilinas G sin emplear extracción en fase sólida.

En conclusión, el proceso de extracción de la muestra tuvo errores con respecto al cartucho SPE y su acondicionamiento empleado, por esto, se decidió procesar una muestra de leche fortificada a 50 mg/L sin emplear extracción en fase sólida y concentración con evaporación de nitrógeno, con el fin de evaluar el porcentaje de analito perdido en el proceso de precipitación de la muestra. Como se evidencia en la figura 11, el cromatograma presenta ruido debido a que no se realizó un proceso de extracción mediante SPE de los compuestos que precipitaron en la desnaturalización de la leche, generando interferencia; aunque en este caso se lograron ver picos pertenecientes las penicilinas G al compararlos con un estándar de 50 mg/L no presentaron las mismas

características, principalmente el área del pico y su resolución, por lo cual se definió que el pretratamiento de la muestra tuvo problemas con la precipitación de las proteínas utilizando acetonitrilo.

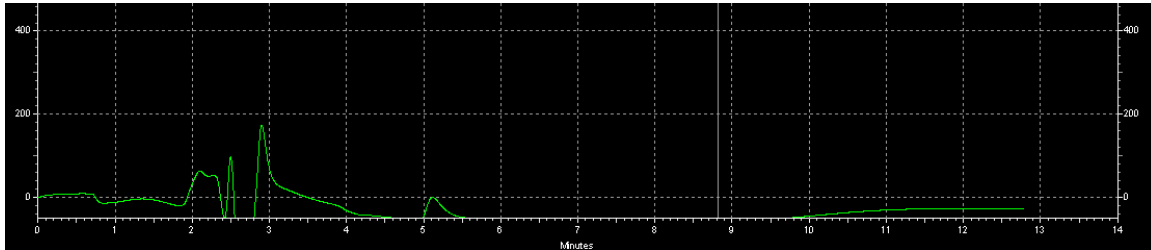


Figura 11. Cromatograma de penicilinas G empleando un proceso de desnaturalización ácida de la muestra.

Como se observa en la figura 11, el cromatograma obtenido es ruidoso, con alta presencia de interferencias y con picos no resueltos. En este caso las condiciones evaluadas no funcionaron para betalactámicos, ya que al emplear un tipo de desnaturalización ácida (ácido acético), con incremento de temperatura (50°C), provocó que las penicilinas G se degradara e incluso más si se eleva su temperatura, es por ello, que esta metodología no es concluyente para la preparación de la muestra.

3.3 Evaluación del método de inmunocromatografía con oro coloidal.

En la tabla 10, se puede observar que los resultados obtenidos mediante inmunocromatografía de oro coloidal fueron los mismos, a pesar de que varié la temperatura. Para ello, se evaluaron estándares de un antibiótico de tres familias distintas en el nivel de concentración 2 detallado en la tabla 6, tal que los resultados esperados estuvieran dentro del rango de medida (positivos). A pesar de que se obtuvieron los mismos resultados cabe mencionar que, el análisis está estipulado para realizarlo en tiempo aproximado de 9 minutos, lo cual se cumplió mediante el uso de incubadora. Además, al realizar estos análisis sin aplicar temperatura el tiempo que se tardó en obtener una señal visible fue de aproximadamente 15 minutos y con una ligera diferencia en la intensidad con la cual se logró distinguir las líneas control con respecto a las líneas de pruebas (Anexo 7). En primera estancia la incubadora ayudó a controlar que al momento de realizar los análisis *“in situ”*, todas las muestras estén a las mismas

condiciones de temperatura y los datos sean reproducibles, por otro lado, al aplicar una temperatura baja no se afectó a la estabilidad de los analitos, mejorando la solubilidad y la unión de los analitos con el antígeno (Wang, 2017), aparte se disminuye la viscosidad, lo cual hace que la muestra ascienda por capilaridad en un tiempo menor.

Tabla 10. Influencia de la temperatura en la determinación de antibióticos por inmunocromatografía de oro5.

	Con incubadora (40 °C) Nivel 2	Sin incubadora (T° ambiente) Nivel 2
Penicilinas G (benzatínica, potásica y procanica)	1.5 a 2 µg/L	1.5 a 2 µg/L
Sulfadiazina	2 a 5 µg/L	2 a 5 µg/L
Oxitetraciclina	30 a 40 µg/L	30 a 40 µg/L

Tabla 11. Evaluación del método de inmunocromatografía empleando estándares en tres niveles de concentración.

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
	Analista 1	Analista 1	Analista 1
Penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica)	<1.5 µg/L	1.5 a 2 µg/L	>2 µg/L
Sulfadiazina	< 2 µg/L	2 a 5 µg/L	>5 µg/L
Oxitetraciclina	<30 µg/L	30 a 40 µg/L	>40 µg/L
	Analista 2	Analista 2	Analista 2
Penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica)	<1.5 µg/L	1.5 a 2 µg/L	>2 µg/L
Sulfadiazina	< 2 µg/L	2 a 5 µg/L	>5 µg/L
Oxitetraciclina	<30 µg/L	30 a 40 µg/L	>40 µg/L
	Analista 3	Analista 3	Analista 3
Penicilinas G (benzatínica, potásica y procaínica)	<1.5 µg/L	1.5 a 2 µg/L	>2 µg/L
Sulfadiazina	< 2 µg/L	2 a 5 µg/L	>5 µg/L
Oxitetraciclina	<30 µg/L	30 a 40 µg/L	>40 µg/L
	Analista 1	Nivel 2	Nivel 3
Mix Antibióticos Nivel 1	<límite de detección	dentro del rango de detección	del de > el límite de detección
Mix Antibióticos Nivel 2	<límite de detección	dentro del rango de detección	del de > el límite de detección
Mix Antibióticos Nivel 3	<límite de detección	dentro del rango de detección	del de > el límite de detección

En la tabla 11, se encuentran los datos correspondientes al análisis individual de cada familia de antibióticos en tres niveles de concentración. Para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad del método, se realizaron los análisis con tres analistas diferentes en días distintos; para eso se prepararon estándares a concentraciones bajo, dentro y sobre el límite de detección. Así se observó que los resultados obtenidos son similares (Anexo 8), lo cual indica que el método es robusto y cumple con los criterios de límites de detección proporcionados por el fabricante (Anexo 9). Adicionalmente, al ser un método que puede determinar hasta tres familias de antibióticos en simultáneo, se preparó un mix que contenía los tres antibióticos y se analizó según los niveles de concentración ya conocidos. En esta prueba de igual manera se obtuvieron los resultados esperados, evidenciando que el analito y el antígeno empleado en la prueba inmunocromatográfica son selectivos, es por ello, que no existió interferencias al realizar los análisis en simultáneo (Anexo 10).

3.3.1 Análisis de muestras

Tabla 12. Determinación de tres familias de antibióticos mediante inmunocromatografía de oro coloidal en muestras de leche.

Semana	Tanque 1			Tanque 2		
	Betalactámicos µg/L	Sulfonamidas µg/L	Tetraciclinas µg/L	Betalactámicos µg/L	Sulfonamidas µg/L	Tetraciclinas µg/L
Semana 1	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 1	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 2	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 2	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 3	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 3	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 4	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 4	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 5	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30
Semana 5	<1,50	<2.00	<30	<1,50	<2.00	<30

En la tabla 12, constan los resultados de los análisis realizados durante 4 semanas en muestras de leche cruda, de la comunidad Zuleta, en Ibarra. Los resultados obtenidos fueron negativos, es decir, el contenido de antibióticos en leche estaba bajo los límites de detección del kit (Anexo 11), cumpliendo con la normativa para el consumo humano. Para corroborar que el proceso se estaba

realizando de la manera correcta se midieron varios controles tanto positivos como negativo en cada semana de análisis de leche; en cada caso los controles cumplieron con los estándares de calidad del kit (Anexo 12), lo cual indicó que las muestras se analizaron de forma idónea.

Si bien es cierto se obtuvieron resultados negativos, hay que destacar que este método es de carácter cualitativo, lo cual indica que prácticamente no presenta selectividad para diferenciar entre antibióticos de la misma familia, por otro lado, se debe mencionar que realizar este tipo de determinaciones es más accesible por su bajo costo con respecto a otras técnicas y se obtienen resultados inmediatos pues el análisis se realiza *“in situ”*. En la medida de lo posible se recomienda realizar estos análisis mediante una técnica analítica que posea alta sensibilidad y selectividad como HPLC/MS (Han, 2015), con el fin de elucidar qué analito en específico está presente en las muestras de leche y en qué concentración; esta información es de vital importancia, ya que podemos comparar los resultados, con los límites máximos residuales (LMR) y concluir si la leche es apta para el consumo.

3.3 Análisis en laboratorio externo

Se tomó una muestra de leche con la cual se trabajó en el desarrollo del método cromatográfico y se la envió a analizar por el laboratorio Inspectorate; Este análisis también sirvió como confirmación de resultados en los ensayos realizados por inmunocromatografía de oro coloidal. Se solicitó el análisis de pruebas bromatológicas como: acidez, cenizas y sólidos totales, también se realizó el análisis de plomo y por último un análisis mediante HPLC/MS de antibióticos pertenecientes a la familia de tetraciclinas (ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina y ciclotetraciclina), con el fin de comprobar la veracidad del método cualitativo y tener el respaldo de una entidad exterior en cuanto a resultados (Anexo 13). Con respecto a los resultados obtenidos, se logró corroborar que la cantidad de tetraciclinas esta bajo los límites máximos residuales (LMR).

4. CONCLUSIONES

La determinación de penicilinas G mediante inmunocromatografía de oro coloidal en muestras de leche cruda cumplió con los resultados esperados, es decir, la leche cumple con la normativa establecida en cuanto a límites máximos de residuos veterinarios, logrando demostrar la inocuidad de este alimento.

Se concluyó que el kit de pruebas rápidas cumple con los criterios de calidad del fabricante y la normativa establecida, para la determinación betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas en simultáneo.

En la evaluación del método cromatográfico para determinar penicilinas G (potásica y procaínica), se obtuvieron valores de linealidad mayores a 0.9960, los porcentajes de recuperación oscilaron en el rango de 60 % a 103% para la penicilina potásica, mientras que para la penicilina procaínica su rango fue de 45 % a 102 %.; Por otro lado, los límites de detección y cuantificación fueron de 1.49 y 4.8 respectivamente en el caso de la penicilina potásica, mientras que para la penicilina procaínica y benzatínica no se obtuvieron resultados concluyentes. Estos valores se lograron calcular mediante análisis de estándares de las penicilinas G.

La penicilina G potásica obtuvo los mejores resultados para su determinación mediante HPLC-UV, al cumplir con los criterios de aceptabilidad del método.

La metodología aplicada para la determinación de penicilinas G en antibióticos mediante HPLC-UV no fue la adecuada, ya que no se pudo realizar los análisis en muestras de leche cruda reales, dado que el método de pretratamiento y extracción de la muestra no presentaron resultados óptimos. Por lo tanto, no se lograron alcanzar los límites requeridos por la norma.

5. RECOMENDACIONES

Para realizar el análisis de antibióticos en una matriz compleja como la leche se recomiendan emplear técnicas cuya sensibilidad y selectividad sea mayor como la cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas, con el objetivo de alcanzar concentraciones en el rango de $\mu\text{g/L}$

Con respecto a la extracción en fase sólida SPE se recomienda evaluar métodos más afines al analito, se debería estudiar detalladamente la estructura de la molécula, o realizar pruebas independientes para cada analito y determinar si no existen interferencias entre los analitos.

Se recomienda el uso del método colorimétrico, ya que presenta la ventaja de realizarla "*in situ*", y al ser un alimento perecible es necesario la rapidez en el análisis, aunque no permite diferenciar a los antibióticos de diferentes familias, se debe combinar con una técnica cromatográfica como análisis confirmatorio.

Al contemplar que el método colorimétrico es confiable, se debería hacer este tipo de análisis en otras comunidades, de otras ciudades, que se sabe son productoras de leche y en plantas de mayor tamaño.

Se recomienda realizar más estudios con respecto al control de antibióticos, con el objetivo de promover el control de inocuidad de la leche y en otros alimentos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agilent technologies. (2016). Introducción y Consideraciones Prácticas en HPLC/UHPLC. Recuperado de https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/Intro_TEORICA_CO NSID_PRACTICAS_HPLC_UHPLC.pdf

Agrocalidad, (2018). Instructivo para “Toma de muestras de leche cruda”, Instructivo INT/CL/010, Rev 6. Pag 9-16. Ecuador.

Agudelo, D., & Bedoya, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación, 2 (1), 38-42.

Aguareles, B., Diaz, E., Córdoba, C & Legaz, M. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Reduca (Biología). Serie Técnicas y Métodos. 4 (3): 79-89, 2011. ISSN: 1989-3620, Madrid, España.

Aroca, N. (2016). Detección Cualitativa de residuos de antibióticos en leche cruda comercializada en el cantón naranjal Provincia del Guayas, UTMACH, Ecuador.

Boque, R. (2004), El límite de detección de un método analítico, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España

Cámara, M. (2013), An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk, Food Chemistry, Volume 141, Issue 2, 15 November 2013, Pages 829-834.

Castillo, D, y Alvarez, J. (2017), Principales fuentes de contaminación de a leche cruda, Food News Latam, Recuperado de <https://www.lacteoslatam.com/sectores/34-procesos-envases/3311-las-principales-fuentes-de-contaminaci%C3%B3n-de-la-leche-cruda.html>

CENAM. (2005), Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos, 2 Edición, Mexico, Pagina 21-31.

Codex Alimentarius, (2011). Leche y productos Lácteos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Segunda Edición, Roma.

Codex Alimentarius, (2018). Maximum residue limits (mrls) and risk management recommendations (rmrs) for residues of veterinary drugs in foods, CX/MRL 2-2018.

Ghassempour, A. (2005), Determination of ternary mixtures of penicillin G, benzathine and procaine by liquid chromatography and factorial design study, *Talanta* 65 (2005) 1038–1044.

Gómez, J. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica, Facultad de Medicina-Universidad de Murcia, *Rev Esp Quimioter* 2015;28(1): 1-9, España.

Han, W. (2015), Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS, Food Chemistry, Volume 181, 15 August 2015, Pages 119-126.

INEN, (2012), NTE INEN 9 Leche cruda. Requisitos, Edición 1, Quinta revisión, Quito, Ecuador,

Ludenberg, A. (2015), Mastitis in Dairy Cows, Swedish University of Agricultural Sciences (Disertación de doctorado), Suecia.

OPS, (2004). Guía para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, ISBN 92 75 32537 5, Washington, D.C.

Novák, P., & Havlíček, V. (2016). *Protein Extraction and Precipitation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 51–62. doi:10.1016/b978-0-444-63688-1.00004-5

The European pharmacopoeia, (2013), Liquid Chromatography, Volumen 8; Pages 5-46,

Rachel F. Eyler % Kristina S. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics, *CJASN*, 14 (7) 1080-1090; DOI: <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>

Suarez, A. y Gudiol, F. (2009), Antibióticos betalactámicos, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(2):116–129, El Sevier , Barcelona, España.

Vicente, D. y Tallero, E. (2009), Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol, *El Sevier*, Vol. 28. Núm. 2. páginas 122-130.

Waters. (2012). HPLC a UPLC, Como conseguir una buena transferencia de métodos, Recuperado de https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/SP_IV_Reunion_usuarios_UPLC_Sesion_practica_Transferencia_metodos.pdf

Werth, B. (2018), Manual MSD: SULFONAMIDAS, *University of Washington School of Pharmac*, Recuperado de <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/sulfonamidas>

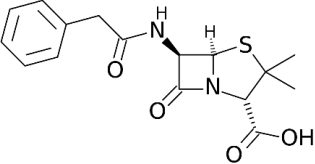
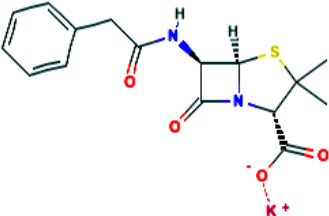
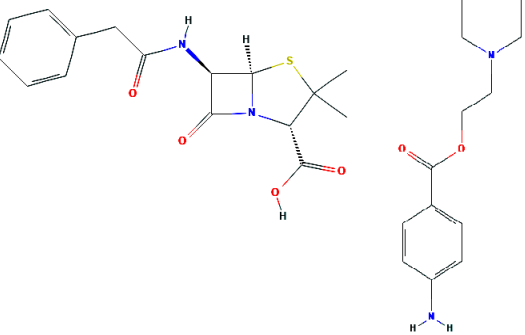
Yu, X. % Lei, W. (2018), Development of Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of Goose Parvovirus, *Frontier in Microbiology*; 9: 953.

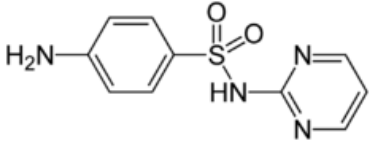
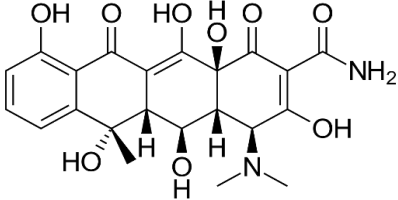
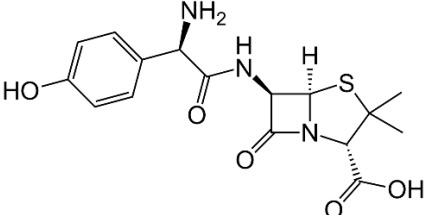
Yanez, G; Aguilar, M y Gomez, A. (2015), Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles, *Journal of Chromatography A Volume 1405*, 31 July 2015, Pages 126-132

Zapata, D. (2016), Determinación de sulfonamidas en leche bovina por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC), Universidad de las Américas (Deisertación de pregrado), Quito, Ecuador.

7. ANEXOS

Anexo 1. Estructura química y principales usos de los antibióticos analizados (OPS; OMS, 2004).

Antibiótico /Formula	Estructura Química	Nombre IUPAC	Usos
Penicilina Benzatínica $C_{16}H_{18}N_2O_4S$		Ácido (2 S, 5 R, 6 R) -3,3-dimetil-7-oxo-6 - [(2-fenilacetil) amino] -4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico	Infecciones como sífilis Piodermias graves provocadas por bacterias sensibles. Enfermedad de Lyme
Penicilina Potásica $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$		Potasio; (2 S, 5 R, 6 R) -3,3-dimetil-7-oxo-6 - [(2-fenilacetil) amino] -4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxilato	Infecciones como sífilis Sirve para tratar la enfermedad de Lyme
Penicilina Procaínica $C_{29}H_{38}N_4O_6S$		Ácido (2 S, 5 R, 6 R) -3,3-dimetil-7-oxo-6 - [(2-fenilacetil) amino] -4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico	En general tiene los mismos usos que la penicilina benzatínica.

<p>Sulfadiazina C₁₀H₁₀N₄O₂S</p>		<p>4-amino- <i>N</i>-pirimidin-2-ilbencenosulfonamida</p>	<p>Fármaco anti-infeccioso tópico que se utiliza para tratar y prevenir infecciones de heridas y quemaduras</p>
<p>Oxitetraciclina C₂₂H₂₄N₂O₉</p>		<p>(4 <i>S</i>, 4 <i>a R</i>, 5 <i>S</i>, 5 <i>a R</i>, 6 <i>S</i>, 12 <i>a R</i>) -4-(dimetilamino) -1,5,6,10,11,12 <i>a</i> -hexahidroxi -6-metil-3, 12-dioxo-4,4 <i>a</i> , 5,5 <i>a</i> -tetrahidrotetraceno-2-carboxamida</p>	<p>El antibiótico es utilizado en neumonías, enteritis, conjuntivitis, artritis, metritis, infecciones en general,</p>
<p>Amoxicilina C₁₆H₁₉N₃O₅S</p>		<p>ácido (2<i>S</i>,5<i>R</i>,6<i>R</i>)-6-[[(R)-2-amino-2-(4-hidroxi-fenil)acetil] amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tio-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico.</p>	<p>Se usa para tratar algunas infecciones provocadas por bacterias como la neumonía; la bronquitis e infecciones de los oídos, nariz, garganta, del tracto urinario</p>

Anexo 2. Lugar de recolección de muestras

Tanques de uso comunitario para almacenamiento de leche.



Mapa de la comunidad Zuleta.




Anexo 3. Principales antibióticos que se emplean y controlan en el país

Antibióticos	Límite máximo residual
Betalactámicos	
Penicilinas G	4 µg/L
Ampicilina	4 µg/L
Amoxicilina	4 µg/L
Sulfonamidas	
Sulfadiazina	100 µg/L
Tetraciclinas	
Tetraciclinas	100 µg/L
Oxitetraciclinas	100 µg/L

(Agrocalidad vía e-mail)

Anexo 4. Certificado de calidad del Kit de pruebas rápidas BioEasy 3 in1 BTS



Certificate of Analysis
YRM1026 3IN1 BTS
Beta-lactams+Sulfonamides+Tetracyclines Rapid Test for Milk

	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Art:</td> <td>YRM1026</td> </tr> <tr> <td>Lot:</td> <td>1906026C00170</td> </tr> <tr> <td>Mfd:</td> <td>2019-09-18</td> </tr> <tr> <td>Exp:</td> <td>2021-03-19</td> </tr> </table>	Art:	YRM1026	Lot:	1906026C00170	Mfd:	2019-09-18	Exp:	2021-03-19
Art:	YRM1026								
Lot:	1906026C00170								
Mfd:	2019-09-18								
Exp:	2021-03-19								

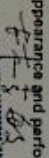
COMPONENTS (96test/kit)

- ❖ 12 test tubes, each containing 1 strip of 8 red reagent microwells and 8 dipsticks;
- ❖ 1pc pipette(200ul), 100pcs pipette tips;
- ❖ Positive standards and negative standards, each containing 8 microwells;
- ❖ 1 instruction manual.

Intended Usage

To detect and discriminate Beta-lactams+Sulfonamides+Tetracyclines (3IN1) in a milk sample.

For and on behalf of
SHENZHEN BIOERASY BIOTECHNOLOGY CO., LTD



Quality Assurance Manager:.....
Authorized Signatory(s)

This product was tested and the physical appearance and performance met the internal quality standard and approved for sale.

Date:2019-09-19

TEST KIT		Test method: 3-tetrimin 40±2 °C	
Sample Tested	Negative Sample	Result/Interpretation	
Penicillin G	0.75ppb	Negative	
	1.5ppb	Negative	
	2ppb	Positive	
Sulfadiazine	7.5ppb	Negative	
	15ppb	Positive	
	25ppb	Positive	
Tetracyclines	10ppb	Negative	
	20ppb	Positive	
	30ppb	Positive	

Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd
 Address: 2/F, 18 Lianhua Street, Xixun Road, Guanzhou District, Shenzhen, Guangdong, China. 518001 TEL: +86-0755-27681126 FAX: +86-755-27681116 Email: info@bioeasy.com.cn www.bioeasy.com

Anexo 5. Equipos empleados en los ensayos de inmunocromatografía**Incubadora Shenzhen MiniT-N**

Anexo 6. Análisis de Anova de las penicilinas G potásica y procaínica

Anova Penicilina potásica

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	69,94	4	17,48	0,0126	0,9996	2,75
Dentro de los grupos	34585,77	25	1383,43			
Total	34655,72	29				

Anova Penicilina procaínica

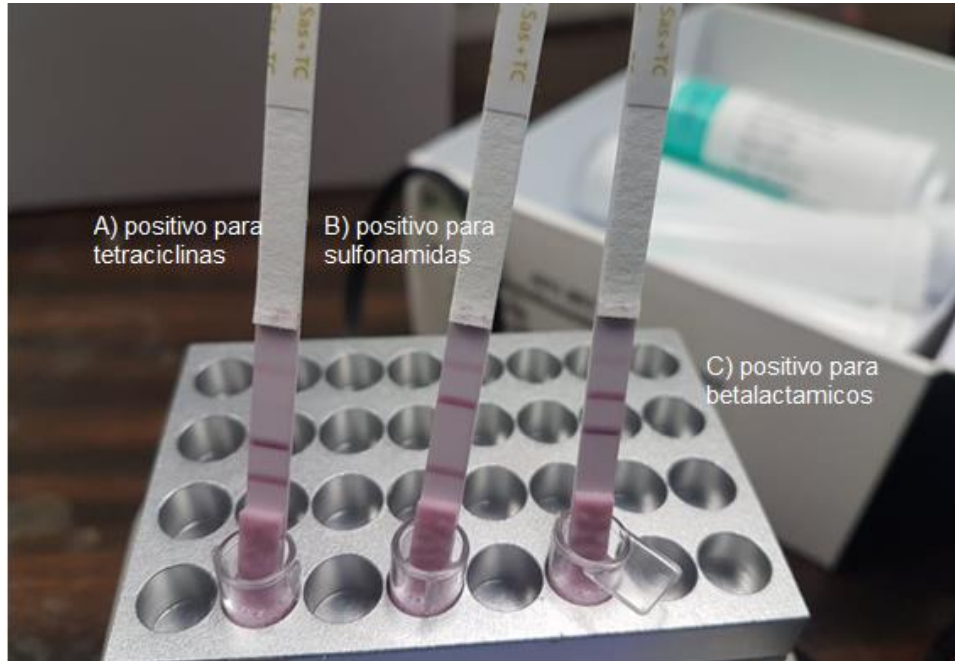
ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	213,35	4	53,33	0,0366715	0,9972	2,77
Dentro de los grupos	34908,52	24	1454,52			
Total	35121,88	28				

Anexo 7. Comparación de una prueba rápida al emplear una incubadora y sin ella.



Anexo 8. Modelo interpretativo de las pruebas rápidas para la determinación de penicilina G, sulfadiazina y oxitetraciclina empleando estándares individuales en tres niveles de concentración.



Anexo 9. Límites de detección del método por inmunocromatografía de oro coloidal

Performance Information

Sensitivity: limits of detection (ng/ml-ppb)

Beta-lactams

Name of antibiotics	LOD	Name of antibiotics	LOD
Penicillin-G	1.5-2	Cefacetrile	20-40
Ampicillin	3-4	Cephapirin	8-15
Amoxicillin	3-4	Cefalonium	6-12
Oxacillin	8-12	Cefazolin	50-70
Nafcillin	20-35	Ceftiofur	80-100
Cloxacillin	6-10	Cefquinome	12-18
Dicloxacillin	6-12	Cefoperazone	2-4
Piperacillin	6-12	Cefalotin	30-50
Cephalexin	500-600		

Sulfanomides

Name of antibiotics	LOD	Name of antibiotics	LOD
Sulfamethazine	15-25	Sulfamerazine	4-8
Sulfapyridine	10-30	Sulfamehtoxy pyridazine	20-40
Sulfaquinoxaline	14-28	Sulfadimethoxine	12-24
Sulfaphenazolum	20-40	Sulfathiazole	2-5
Sulfamethoxazole	3-6	Sulfamethizole	2-5
Sulfachloropyridazine	8-16	Sulfamonomethoxine	2-4
Sulfadiazine	2-5	Sulfapyrazole	80-100
Sulfadimethoxypyrimidine	1.5-4	Sulfamoxole	30-50
Sulfadoxine	80-100	Sulfisoxazole	80-100

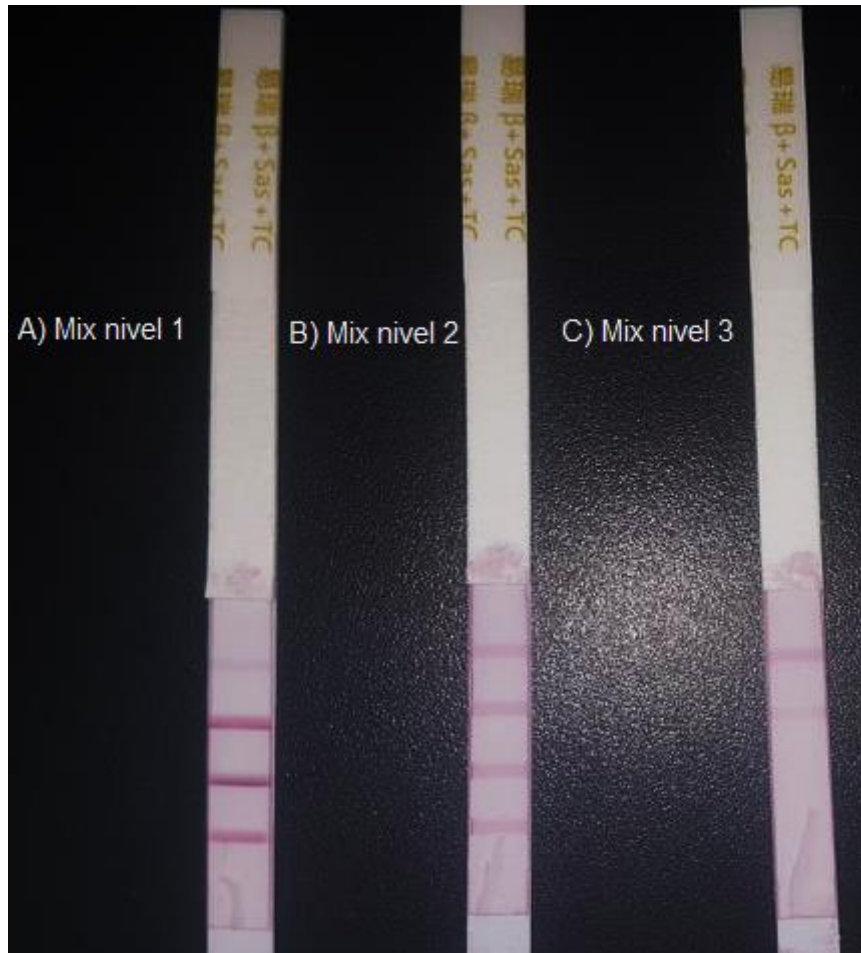
Combined total should not exceed 100.

Tetracyclines

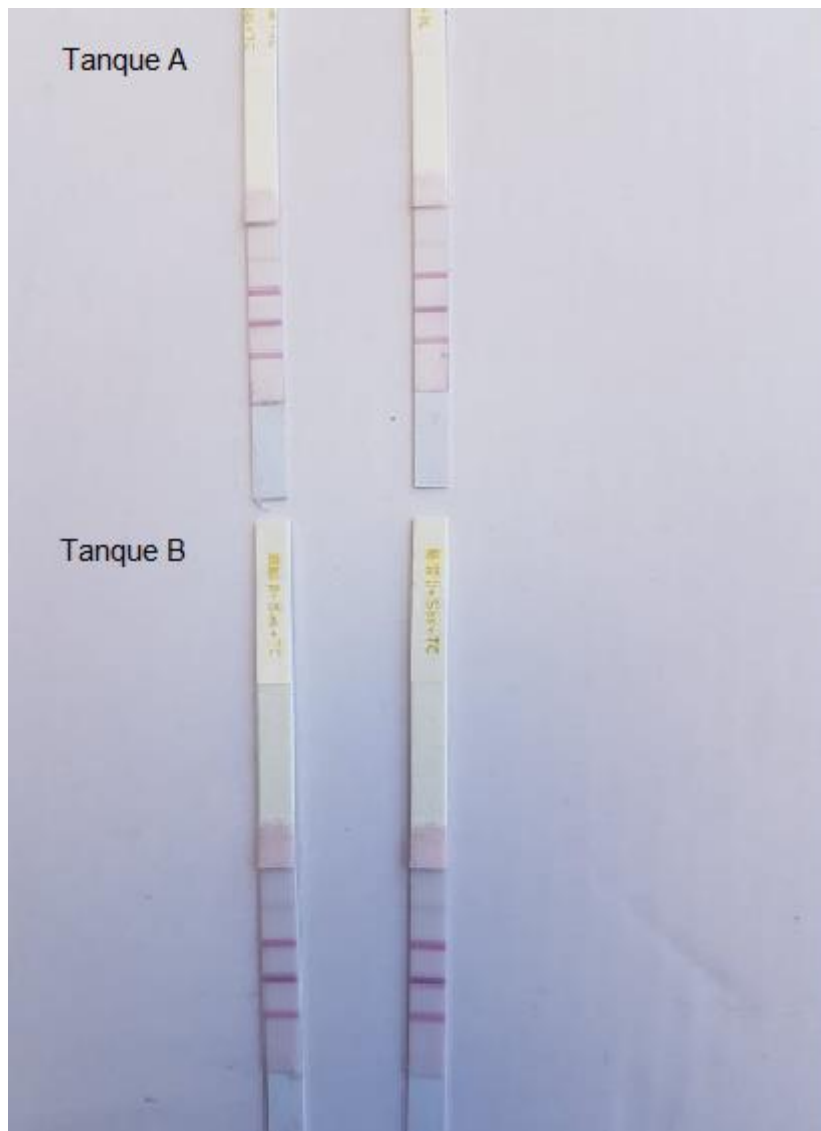
Name of antibiotics	LOD	Name of antibiotics	LOD
Tetracycline	30-40	Oxytetracycline	30-40
Chlorotetracycline	30-40	Doxycycline	30-40

(Sudmilk and Bioeasy, 2019)

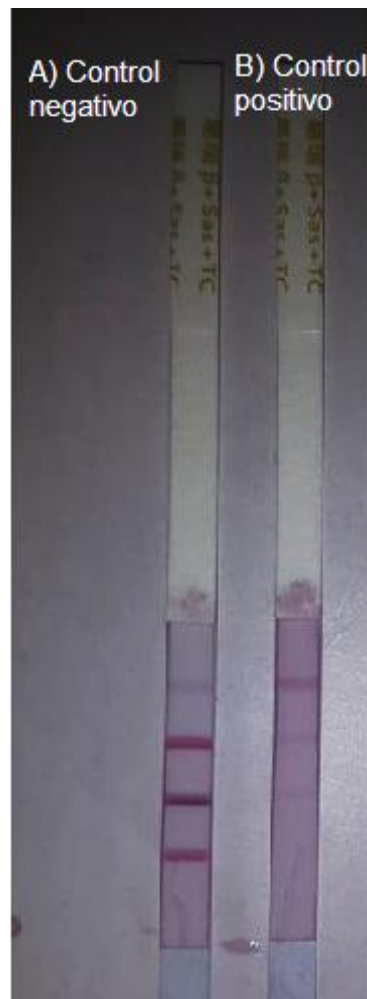
Anexo 10. Modelo interpretativo para la determinación de tres familias de antibióticos en un mix.



Anexo 11. Pruebas realizadas en muestra de leche cruda mediante kit de pruebas rápidas



Anexo 12. Controles positivos y negativos realizados en la determinación de antibióticos por inmunocromatografía de oro coloidal



Anexo 13. Reporte de resultados de ensayos bromatológicos, metales y antibióticos realizados por Inspectorate en una muestra de leche cruda.

Informe de ensayo			
Guayaquil OL N°:90876/1			
Datos del cliente			
Cliente:	CIPRIANI AVILA EVA ISABEL		
Dirección:	PICHINCHA / QUITO / IÑAQUITO / AV ELOY ALFARO N36-25 Y LUIS ARMENDARIZ		
Solicitado por:	Ing. Eva Isabel Cipriani Avila		
Muestreo realizado por:	El Cliente	Tipo de muestreo:	N/A
Fecha de muestreo:	N/A	Hora de muestreo:	N/A
		Lugar de muestreo:	n/a
Fecha de recepción:	22/08/2019	Fecha de análisis:	22/08/2019
		Reporte final:	29/08/2019
<p>NOTA: Los resultados reportados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibida(s) en el laboratorio, la identificación de las muestras es la responsabilidad del cliente. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente, excepto con la aprobación escrita del laboratorio. Preguntas o comentarios comuníquese al: 042-399192. Ext. 107-110 o 120 La información contenida en este certificado está sujeta a validación por las partes interesadas.</p>			
<p>Laboratorio de Ensayo Acreditado por A2LA con certificado No.- 2185.01 y 2185.02. Laboratorio de Ensayo Acreditado por el SAE con acreditación No. SAE LEN 07-006.</p>			

Datos de la Muestra										
Tipo:	Leche	Cantidad:	1.500 ml	Envase:	cerrado, de vidrio,					
Identificación de la muestra:	M1.- Leche Cruda									
Resultados de Cromatografía										
Parametro	Metodos	A2LA	SAE	Unidad	Resultados	CCa	LOQ	LOD	(±)U	% R
*Ampicilina	UPLC MSMS			ug/kg	<LOQ		4	-	-	-
*Amoxicilina	UPLC MSMS			ug/kg	<LOQ		4	-	-	-
Oxitetraciclina	BVE-CTD-LAB-SOP-192/Determinación De Multiresiduos de drogas Veterinarias en Productos del Mar UPLC			ug/kg	<LOQ	-	10	-	-	-
Tetraciclinas	BVE-CTD-LAB-SOP-192/Determinación De Multiresiduos de drogas Veterinarias en Productos del Mar UPLC			ug/kg	<LOQ	-	10	-	-	-
Clortetraciclina	BVE-CTD-LAB-SOP-192/Determinación De Multiresiduos de drogas Veterinarias en Productos del Mar UPLC			ug/kg	<LOQ	-	10	-	-	-
Resultados de Metales										
Parametro	Metodos	A2LA	SAE	Unidad	Resultados	LOQ	LOD	(±)U	% R.	
*Plomo	INSP-LAB-SOP-076 United States Departamrnt of Agriculture,food Safety and inspection			mg/kg	<LOQ	0.05	-	-	-	

Resultados de Bromatología								
Parametro	Metodos	A2LA	SAE	Unidad	Resultados	LOQ	LOD	(±)U
Acidez	INSP-LAB-SOP-033/AOAC 19th 947.05	✓		%	0.15	-	-	-
Cenizas	INSP-LAB-SOP-008/AOAC 20th 945.46	✓	✓	%	0.71	-	-	0.04
*Solidos Totales	AOAC 990.20 18			%	11.70	-	-	-