

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencia Farmacéuticas,
Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**DESARROLLO DE UN MÉTODO EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
DE LA PRESENCIA DE TRAZAS DE CIPROFLOXACINO Y
TETRACICLINA EN LECHE DE VACUNO, AREQUIPA- PERÚ 2018**

Tesis presentado por las Bachilleres:

Chara Hanco, Maribel

Paredes Yucra, Nayda Roverssy

Para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

Asesor:

Mg. Paredes Fuentes, Julitza Lindsey

Arequipa- Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000018963

N° Trámite en Fac. 1746-2018

Fecha 17-04-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CHARA HANCCO, Maribel
PAREDES YUCRA, Nayda Roverssy

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DESARROLLO DEL METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE LA PRESENCIA DE TRAZAS DE TETRACICLINA Y AMOXICILINA EN LECHE DE VACA DEL DISTRITO DE VALLE DE MAJES-AREQUIPA 2018"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Yenny López Valencia 2) Mgter. Maria Elena Guillén Núñez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan "DESARROLLO E INVESTIGACION DEL METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE LA PRESENCIA DE TRAZAS DE TETRACICLINA Y CIPROFLOXACINO EN LECHE DE VACA, AREQUIPA EN EL PERIODO 2018" después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Firmas: (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 18/05/2018

ASESOR: Mgter. Julitta Paredes Fuentes

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "DESARROLLO DE UN METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE LA PRESENCIA DE TRAZAS DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA EN LECHE DE VACUNO. AREQUIPA - 2018" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma Fecha 03/04/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. Jaime Cárdenas García
- 2) Dra. Yenny López Valencia
- 3) Mgter. Maria Elena Guillen Núñez

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: "DESARROLLO DE UN METODO EN CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE LA PRESENCIA DE TRAZAS DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA EN LECHE DE VACUNO. AREQUIPA - 2018", y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

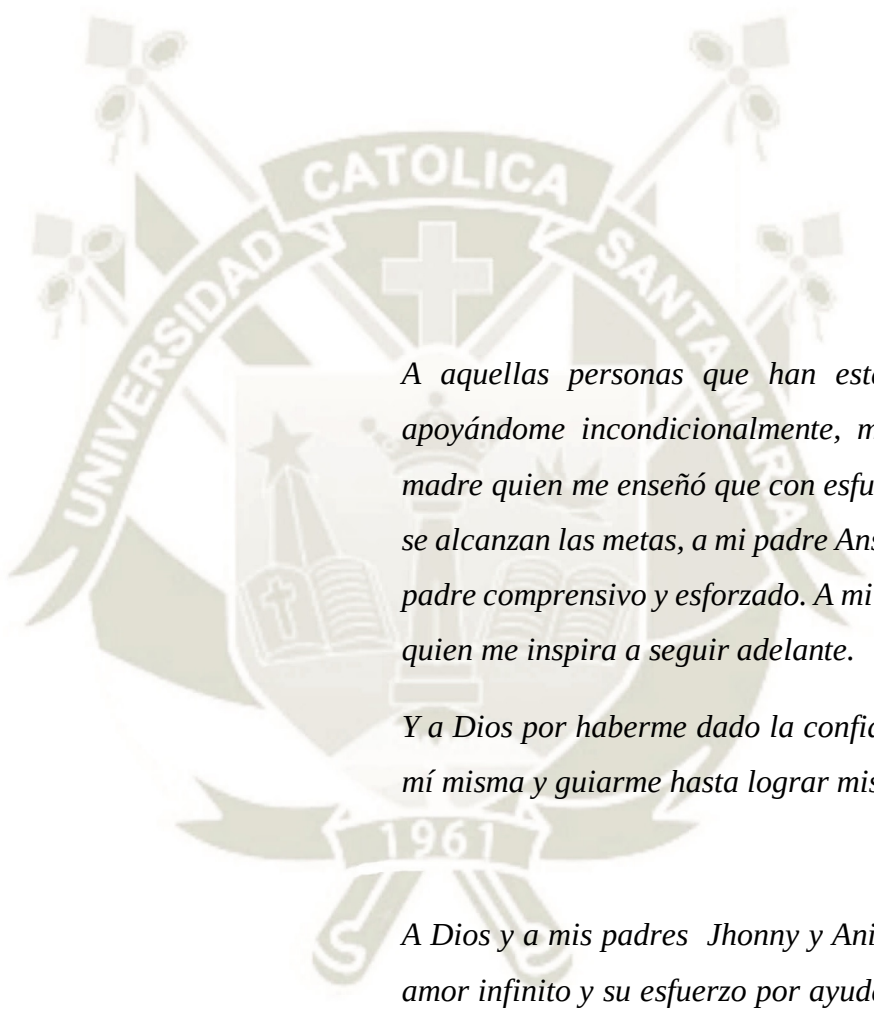
Firma (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 10/5/19

JURADOS: Presidente DR. JAIME CARDENAS GARCIA
Vocal DRA. YENNY LOPEZ VALENCIA
Secretario MAG. MARIA ELENA GUILLEN NUÑEZ

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 15/10/19 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)

DECANO



Dedicatorias

A aquellas personas que han estado a mi lado apoyándome incondicionalmente, mi familia, a mi madre quien me enseñó que con esfuerzo y sacrificio se alcanzan las metas, a mi padre Anselmo por ser un padre comprensivo y esforzado. A mi hermano Mario quien me inspira a seguir adelante.

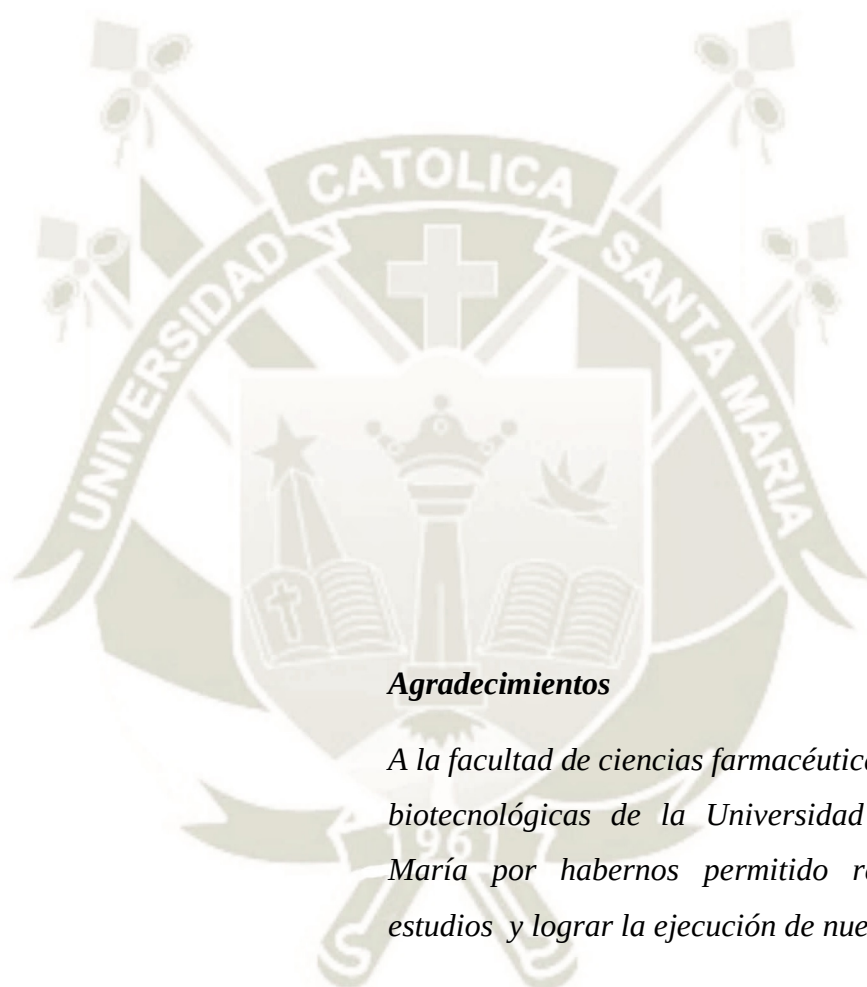
Y a Dios por haberme dado la confianza de creer en mí misma y guiarme hasta lograr mis metas.

Maribel

A Dios y a mis padres Jhonny y Anita Doris, por su amor infinito y su esfuerzo por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro, sencillo no ha sido el proceso, pero el que ellos confíen en mí lo es todo. A mis hermanos quienes cada día tienen algo nuevo que aportar a mi vida.

Gracias por estar conmigo y estar a mi lado siempre.

Nayda Roverssy



Agradecimientos

A la facultad de ciencias farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas de la Universidad Católica Santa María por habernos permitido realizar nuestros estudios y lograr la ejecución de nuestra carrera.

A nuestra asesora Mg. Julitza Paredes Fuentes por su invaluable apoyo recibido para desarrollar y concluir con nuestro proyecto de tesis.

Agradecemos al doctor Jaime Cardenas, PhD por ayudarnos a culminar nuestro proyecto de tesis.

Al doctor José Villanueva, PhD por permitirnos hacer uso de las instalaciones del laboratorio de investigación Docente “Proyecto Mercurio”

INTRODUCCIÓN

En la leche producto de origen animal, encontramos proteínas, grasas, vitaminas, minerales y enzimas, es por eso que este alimento ha formado parte de nuestra dieta por su alto valor nutritivo, por lo que es importante que se encuentre libre de agentes químicos ajenos a su composición. Los antimicrobianos son altamente utilizados por los médicos veterinarios para tratar infecciones como la mastitis, ocasionando así resistencia, sensibilidad, alergias y cambios en la flora intestinal en el ser humano.(1)
(2)

El hábito que tiene la población de consumir leche conlleva a un riesgo constante de comprar este alimento o sus derivados con trazas de antimicrobianos. Ello conlleva a una importante necesidad de recolectar muestras que faciliten su detección e impedir la comercialización del producto, ya que las trazas de antimicrobianos no se metabolizan en su totalidad, ni se inactivan con la industrialización. (3)

El ganadero no toma precauciones importantes como es el periodo de retiro de la vaca tratada hasta que las trazas del medicamento en la leche lleguen a alcanzar un nivel inocuo inferior al límite máximo de residuos (LMR). (4)

Es por eso que en esta investigación se cuantificó las concentraciones de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina en leche de vacuno, insumo de la industria láctea, utilizando como metodología de análisis, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a lo largo del texto de la tesis se describen aspectos teóricos, la técnica utilizada y el procedimiento de estandarización que requiere la metodología empleada, para concluir con nuestros resultados de la investigación.

RESUMEN

Se ha desarrollado un método analítico para determinar la concentración de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina mediante un método analítico, que utiliza la Cromatografía Líquida de Alta Resolución en leche de vacuno.

En primer lugar se procedió a establecer las condiciones cromatográficas mediante pruebas preliminares con corridas del estándar de referencia de Ciprofloxacino y Tetraciclina estableciendo como parámetros los siguientes: Tiempo de estabilización 20 min, flujo 1 ml/min, longitud de onda 280 nm y tiempo de corrida de 10 min. En cuanto a la composición de fase móvil fue de acetonitrilo y solución de ácido fosfórico 0.025 M pH 3.0 ± 0.1 , en una proporción de 13:87 partes respectivamente.

La estandarización del método analítico, se realizó a través de la linealidad con un $R^2=0.9998$ para Ciprofloxacino y $R^2=0.9997$ para Tetraciclina, precisión con porcentaje de coeficiente de variación de 0.118% Ciprofloxacino y para Tetraciclina 0.350%, la exactitud tuvo como recuperación 98.564% para Ciprofloxacino y 98.026% para Tetraciclina datos aceptables para la AOAC, un límite de detección de 5.925 $\mu\text{g/L}$ para Ciprofloxacino y 8.173 $\mu\text{g/L}$ para Tetraciclina y un límite de cuantificación de 15.003 $\mu\text{g/L}$ para Ciprofloxacino y 14.525 $\mu\text{g/L}$ para Tetraciclina.

Posteriormente, se realizaron las coordinaciones para procurar las muestras de estudio, que estuvo conformada por leche proveniente de 20 establos diferentes que desarrollan

sus actividades en la ciudad de Arequipa. Por cada punto de muestreo se tomó una muestra y una contra muestra las que fueron inmediatamente transportadas al laboratorio donde fueron homogeneizadas para tomar 5 mL de ellas y hacer la determinación de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina, previo tratamiento de la muestra donde se aplicó limpieza de la muestra, extracción y concentración previa de las trazas.

Las 20 muestras de los establos de Arequipa tomados como puntos de muestreo mostraron concentraciones diferentes de Tetraciclina y Ciprofloxacino, mediante el método estandarizado, donde los resultados fueron comparados con la norma técnica sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos de Consumo Humano NTS N° 120 MINSA/DIGESA. Para el caso del Ciprofloxacino se encontró en las 20 muestras de leche de vacuno un valor máximo de 141.346 µg/L y un valor mínimo de 32.168 µg/L, se estableció que cuatro muestras se encuentran por encima de los límites permisibles para este antimicrobiano, siendo las muestras las que se codificaron como M-07, M-08, M-011 y M-16. En el caso del contenido de trazas de Tetraciclina en las 20 muestras de leche se encontró un valor máximo de 134.765 µg/L y un valor mínimo de 49.182 µg/L, se estableció que seis muestras se encuentran por encima del límite máximo permisible para este antimicrobiano, siendo las muestras las que se codificaron como M-03, M-05, M-08, M-11, M-14 y M-17. Obteniendo estos resultados llegamos a la conclusión, que nuestro método es rápido, eficaz y factible para la determinación y cuantificación de trazas de Tetraciclina y Ciprofloxacino.

Palabras claves:

Tetraciclina, Ciprofloxacino, Leche, Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

ABSTRACT

An analytical method has been developed called High Resolution Liquid Chromatography to determine the concentration of traces of Ciprofloxacin and Tetracycline in cow milk.

First, the chromatographic conditions were established by preliminary tests with runs of the reference standard of Ciprofloxacin and Tetracycline, establishing as parameters the following: Stabilization time 20 min, flow 1 ml / min, wavelength 280 nm and run time 10 min. As for the mobile phase composition, it was acetonitrile and 0.025 M phosphoric acid solution pH 3.0 ± 0.1 , in a proportion of 13:87 parts respectively.

The standardization of the analytical method was carried out through linearity with $R^2 = 0.9998$ for Ciprofloxacin and $R^2 = 0.9997$ for Tetracycline, the precision with percentage of coefficient of variation of 0.118% for Ciprofloxacin and for Tetracycline of 0.350%, the accuracy was as recovery 98.564% for Ciprofloxacin and 98.026% for Tetracycline acceptable data for AOAC, a detection limit of 5.925 $\mu\text{g} / \text{L}$ for Ciprofloxacin and 8.173 $\mu\text{g} / \text{L}$ for Tetracycline and a quantification limit of 15.003 $\mu\text{g} / \text{L}$ for Ciprofloxacin and 14.525 $\mu\text{g} / \text{L}$ for Tetracycline.

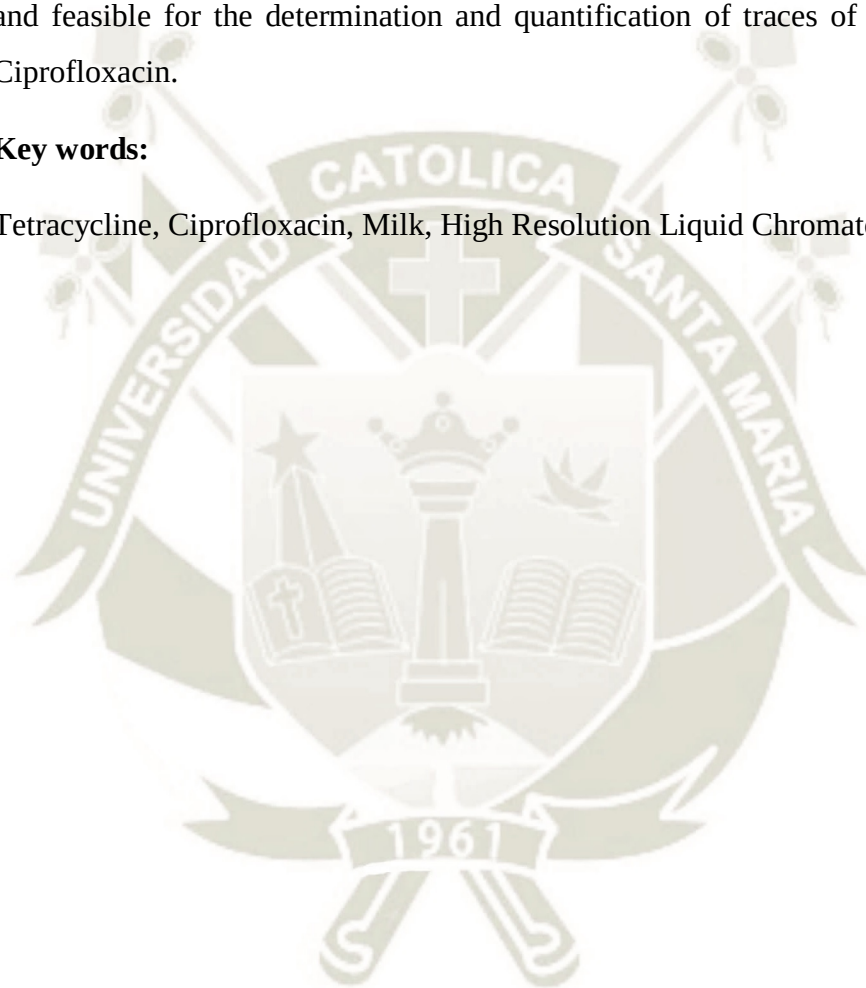
Subsequently, the coordination was carried out to procure the study samples, which was made up of milk from 20 different stables that carry out their activities in the city of Arequipa. For each sampling point a sample and a counter sample were taken which were immediately transported to the laboratory where they were homogenized to take 5 mL of them and make the determination of traces of Ciprofloxacin and Tetracycline, prior to treatment of the sample where the cleaning was performed of the sample, extraction and previous concentration of the traces.

The 20 samples from Arequipa stables taken as sampling points showed different concentrations of Tetracycline and Ciprofloxacin, using the standardized method, where the results were compared with the sanitary technical standard that establishes the Maximum Residue Limits of Veterinary Drugs in Consumer Foods Human NTS N° 120 MINSA / DIGESA. In the case of Ciprofloxacin, a maximum value of 141.346 $\mu\text{g} / \text{L}$ and a minimum value of 32.168 $\mu\text{g} / \text{L}$ were found in the 20 samples of beef, it was established that four samples are above the permissible limits for this

antimicrobial, the samples being those that were coded as M-07, M-08, M-011 and M-16. In the case of the Tetracycline trace content in the 20 milk samples, a maximum value of 134.765 $\mu\text{g} / \text{L}$ was found and a minimum value of 49.182 $\mu\text{g} / \text{L}$, it was established that six samples are above the maximum allowable limit for this antimicrobial, the samples being those that were coded as M-03, M-05, M-08, M-11, M-14 and M-17. Obtaining these results we conclude that our method is fast, efficient and feasible for the determination and quantification of traces of Tetracycline and Ciprofloxacin.

Key words:

Tetracycline, Ciprofloxacin, Milk, High Resolution Liquid Chromatography.



HIPÓTESIS

Debido al uso frecuente de antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones de la glándula mamaria en ganado vacuno, es probable, que mediante cromatografía líquida de alta resolución se detecten y cuantifiquen en leche de vacuno concentraciones de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina por encima de los límites máximo permisibles de estos antimicrobianos.



OBJETIVOS

- Establecer las condiciones óptimas analíticas del cromatógrafo líquido de alta resolución para determinar el contenido de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina en muestras de leche de vacuno.
- Estandarizar la técnica analítica con los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y de detección para la determinación y cuantificación del contenido de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina en muestras de leche de vacuno, mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- Desarrollar el método para determinar y cuantificar la concentración de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina mediante un método analítico estandarizado que utiliza la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en leche de vacuno.
- Cuantificar el contenido de trazas de Ciprofloxacino en muestras de leche de vacuno y establecer qué muestras se encuentran por encima de los límites máximo permisibles para este antimicrobiano.
- Cuantificar el contenido de trazas de Tetraciclina en muestras de leche de vacuno y establecer qué muestras se encuentran por encima de los límites máximo permisibles para este antimicrobiano.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

ABSTRACT

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	1
1. Fundamento teórico	2
2. Leche	2
3. Importancia de residuos en leche	3
3.1. Contaminación de la leche por residuos de antibióticos	3
3.2. Contaminación de residuos de antibióticos en la industria láctea	5
4. Tetraciclina.....	5
4.1 Introducción	5
4.2 Propiedades fisicoquímicos de la tetraciclina	6
4.3 Farmacodinámica	6
4.4 Farmacocinética	7
5. Ciprofloxacino.....	7

5.1 Introducción	7
5.2 Propiedades fisicoquímicos del ciprofloxacino	8
5.3 Farmacodinámica	8
5.4 Farmacocinética	8
6. Tiempo de retiro.....	9
7. Desarrollo de resistencia	9
8. Análisis de residuos en alimentos de origen animal	10
8.1 Etapa de extracción	10
8.2 Etapa de determinación y cuantificación	10
9. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	11
9.1 Componentes del HPLC.....	12
9.2 Tipos de cromatografía	13
9.2.1 Cromatografía de fase normal.....	13
9.2.2 Cromatografía de fase reversa.....	13
9.2.3 Cromatografía de intercambio iónico.....	13
10. Fundamento legal de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo <i>humano</i>	14
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Materiales.....	16
1.1. Instrumental de vidrio	16
1.2. Equipos de laboratorio	16
1.3. Reactivos	16
1.4. Otros	17
2. Metodologías.....	17

2.1 Planteamiento operacional	17
2.1.1 Ubicación espacial	17
2.1.2 Unidades de estudio (analitos)	18
3. Técnicas e instrumentos	18
3.1 Técnica	18
3.2 Instrumento	18
3.3 Metodología utilizada para la obtención de las muestras.....	19
3.3.1 Selección	19
3.3.2 Toma de muestra.....	19
3.3.3 Tamaño de la muestra	20
3.3.4 Identificación de la muestra	20
3.3.5 Transporte de la muestra	20
4. Metodología para la determinación de Ciprofloxacino y Tetraciclina en Leche de Vacuno mediante HPLC.....	20
4.1 Optimización de condiciones cromatográficas	21
4.2 Validación de la técnica analítica.....	23
4.2.1 Linealidad.....	23
4.2.2 Precisión.....	25
4.2.3 Exactitud	27
4.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación	29
4.3 Determinación y cuantificación de ciprofloxacino y tetraciclina por HPLC ...	31
4.3.1 Preparación de la solución stock de ciprofloxacino.....	31
4.3.2 Preparación de la solución stock de tetraciclina	32
4.3.3 Extracción de ciprofloxacino y tetraciclina en muestras de leche de vacuno.	33

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
1. Optimización de condiciones cromatográficas	36
1.1 Preparación de la solución estándar de ciprofloxacino y tetraciclina	36
1.2 Preparación de la fase móvil	37
1.3 Condiciones óptimas para la determinación de ciprofloxacino y tetraciclina por HPLC.....	38
2. Estadarización de la técnica analítica.....	39
2.1 Linealidad para el estándar de ciprofloxacino y tetraciclina.....	39
2.1.1 Linealidad para el estándar de ciprofloxacino	39
2.1.2 Linealidad para el estándar de tetraciclina	44
2.2 Precisión.....	48
2.2.1 Precisión para la determinación del ciprofloxacino	48
2.2.2 Precisión para la determinación de la tetraciclina	50
2.3 Exactitud	51
2.3.1 Exactitud para la determinación del ciprofloxacino.....	51
2.3.2 Exactitud para la determinación de la tetraciclina	54
2.4 Límites de detección y cuantificación.....	58
2.4.1 Límites de detección y cuantificación para la determinación del ciprofloxacino	58
2.4.2 Límites de detección y cuantificación para la determinación de tetraciclina	60
3. Determinación y cuantificación de ciprofloxacino y tetraciclina en las muestras de leche.....	62
3.1. Cuantificación de ciprofloxacino	64
3.2. Cuantificación de tetraciclina.....	65
CONCLUSIONES	70

SUGERENCIAS.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS Y CERTIFICADOS DE ESTÁNDARES	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1.1 Composición química de la leche.....	3
Tabla N° 1.2 Propiedades fisicoquímicas de la leche.....	3
Tabla N° 2. 1 Fase móvil y su proporción.....	22
Tabla N° 2. 2 Condiciones cromatográficas.....	23
Tabla N° 2. 3 Concentraciones de disoluciones patrón $\mu\text{g/L}$ equivalente a μL de Ciprofloxacino y Tetraciclina.....	33
Tabla N°3.1 Columnas para la identificación de Tetraciclina y Ciprofloxacino.....	37
Tabla N° 3.2 Áreas para determinar la linealidad de estándar Ciprofloxacino.....	40
Tabla N°3.3 Datos para determinar la proporcionalidad y linealidad del Ciprofloxacino	43
Tabla N°3.4 Áreas para determinar la linealidad del estándar Tetraciclina.....	44
Tabla N° 3.5 Datos para determinar la proporcionalidad y linealidad del estándar Tetraciclina.....	47
Tabla N° 3.6 Determinación de la precisión (áreas y concentración) para el estándar ciprofloxacino	49
Tabla N° 3.7 Determinación de la Precisión (Áreas y Concentraciones) para el estándar Tetraciclina.....	50
Tabla N°3.8 Datos de las muestras fortificadas con Ciprofloxacino.....	51

Tabla N° 3.9 Datos del estándar extraído por el método para la exactitud.....	52
Tabla N° 3. 10 Porcentaje de Recuperación del método para Ciprofloxacino.....	52
Tabla N° 3. 11 Prueba t para el Porcentaje de Recuperación del estándar Ciprofloxacino.....	54
Tabla N° 3. 12 Datos de las muestras fortificadas con Tetraciclina	54
Tabla N° 3. 13 Datos del estándar extraído por el método para la exactitud.....	55
Tabla N° 3.14 Porcentaje de recuperación del estándar Tetraciclina.....	56
Tabla N° 3.15 Prueba t para el porcentaje de recuperación del estándar Tetraciclina.....	56
Tabla N° 3. 16 La recuperación prevista como una función de la concentración del principio activo.....	57
Tabla N° 3. 17 Datos para determinar la linealidad promedio de las tres repeticiones del Ciprofloxacino.....	58
Tabla N° 3. 18 Datos para determinar la linealidad promedio de las tres repeticiones de la Tetraciclina.....	60
Tabla N° 3. 19 Codificación de las muestras de leche de vacuno evaluadas.....	63
Tabla N° 3. 20 Concentración en µg/L del contenido de Ciprofloxacino en las muestras de leche de vacuno.....	64
Tabla N° 3. 21 Concentración en µg/L del contenido de Tetraciclina en las muestras de leche de vacuno.....	66
Tabla N° 4. 1 Límites Máximos de Residuos (LMR) de Medicamentos Veterinarios en Alimentos.....	79
Tabla N° 4. 2 Codificación de las muestras de leche de vacuno evaluadas.....	81
Tabla N° 4. 3 Concentraciones para la curva de calibración de Tetraciclina y Ciprofloxacino.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Estructura química del Clorhidrato de Tetraciclina	6
Figura 1. 2 Estructura química del clorhidrato de Ciprofloxacino.....	8
Figura 2. 1 Lugares de muestreo.....	18
Figura 2. 2 Elaboración de la curva de calibración.....	24
Figura 3.1 Tiempos de retención de Ciprofloxacino y Tetraciclina.....	39
Figura 3. 2 Curva de calibración promedio para la linealidad de Ciprofloxacino.....	41
Figura 3. 3 Curva de calibración promedio para la linealidad de Tetraciclina.....	45
Figura 3. 4 Picos de Ciprofloxacino y Tetraciclina a diferentes concentraciones.....	48
Figura 3. 5 Desviación estándar versus concentración de Ciprofloxacino.....	59
Figura 3. 6 Desviación estándar versus concentración de Tetraciclina.....	61
Figura 3. 7 Codificación de las muestras.....	62
Figura 3. 8 Comparación de muestras de leche que contienen Ciprofloxacino.....	67
Figura 3. 9 Comparación de muestras de leche que contienen Tetraciclina.....	67
Figura 4. 1 Recolección de muestras de leche.....	82
Figura 4. 2 Procedimiento para la extracción de Ciprofloxacino y Tetraciclina a partir de la muestra de leche de vacuno.....	83



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

La seguridad alimentaria de la leche es de gran importancia para el consumidor debido a que pertenece al grupo de alimentos de mayor riesgo en salud pública no sólo por tratarse de un alimento básico y de amplio consumo, sino por su susceptibilidad para transmitir enfermedades y por la contaminación de antimicrobianos veterinarios; los medicamentos veterinarios se utilizan en los animales, para favorecer su crecimiento, profilaxis y tratamiento de enfermedades. (1) Después de administrar un medicamento a un animal, tiene lugar un proceso metabólico que favorece su eliminación; en términos generales, la mayor parte del producto y de sus metabolitos, se excretan por la orina y las heces; sin embargo, también se pueden encontrar trazas en la leche o en la carne después de sacrificar el animal; por lo tanto, se recomienda que cuando los animales estén sometidos a un tratamiento, la leche ordeñada de estos animales se separe de la leche de los animales no tratados, respetar el tiempo o período de retiro o supresión, hasta que se establezca con certeza que se puede consumir sin que existan restos de antimicrobianos. (2)

2. LECHE

Si no lleva especificación, la leche siempre corresponde a la leche de vaca. Químicamente es un sistema complejo, tanto que Stuart Patton ya escribía en 1978: “Este fluido elaborado por la glándula mamaria es una interesante mezcla de complejas moléculas biológicas”. La leche es una suspensión coloidal de partículas nutritivas, proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, minerales y vitaminas dispersos en una fase acuosa y en la fase grasa, con repercusión en la nutrición de los consumidores. (3)

La leche es un producto inestable, perecedero, que se altera rápidamente, sobre todo por la contaminación microbiana; debe refrigerarse lo antes posible y procesarse sin demora. Es un alimento complejo, en el que hay tres fases: una acuosa que tiene sales, azúcares, proteínas, vitaminas y aminoácidos disueltos; otra sólida, en estado coloidal formado por proteínas complejas principalmente caseína, fosfatos y otras sales insolubles de calcio; finalmente, otra lipídica emulsionada, formada por grasas esteroides principalmente colesterol y vitaminas liposolubles principalmente A y D. (4)

Tabla N° 1.1 Composición química de la leche

Componentes	Porcentaje %
Agua	87.6
Lactosa	4.8
Grasa	3.7
Proteína	3.2
Sales minerales	0.7

Fuente: Kuklinski Koppl C. Nutrición y Bromatología; 2017 (5)

Tabla N° 1.2 Propiedades fisicoquímicas de la leche

Propiedades fisicoquímicas de la leche	Porcentaje %
Densidad a 15 °C	1.030 - 1.034 g/cc
Ph	6.5 - 6.6
Acidez expresada en grados Dormic, es decir en décimas de ácido Lác/H	16 – 18

Fuente: Cadavid G. J. I. Granja Integral Autosuficiente; 2002 (6)

3. IMPORTANCIA DE RESIDUOS EN LECHE

3.1. CONTAMINACIÓN DE LA LECHE POR RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Las concentraciones de trazas más conocidos en productos de origen animal son los procedentes de antibióticos que se emplean con fines profilácticos y terapéuticos, los cuales se han ido estudiando con mayor interés, puesto que es necesario establecer un criterio muy estricto en cuanto al límite máximo de residuos, resultante de la utilización de un principio activo utilizado en un medicamento veterinario independientemente de los excipientes que lo acompañe, considerando la posible ingesta a través de alimentos contaminados. (7)

El uso de antibióticos en las explotaciones ganaderas es una realidad y una necesidad, sin embargo, cuando se utilizan de manera fraudulenta, indiscriminada y abusiva, la entrada de residuos en la cadena alimentaria puede suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores, por tal motivo las vacas tratadas deben de contar con un período de retiro adecuado y apropiada identificación de vacas en tratamiento para evitar contaminación accidental de la leche procedente de vacas sanas, además se debe identificar el motivo principal para usarlos y tomar las medidas adecuadas para disminuir el uso de estos. (8)

El uso excesivo e inapropiado de los antibióticos, ha logrado el aumento de microorganismos resistentes, los cuales han adquirido la capacidad para resistir los efectos de determinado fármaco ante el cual eran susceptibles, debido a esto, es importante que se apliquen buenas prácticas agrícolas y veterinarias, así como de higiene en las explotaciones lecheras, para evitar la presencia de residuos de fármacos en la leche. (9)

Es por eso que la presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos de origen animal constituye una preocupación que aumenta en el ámbito de la Salud Pública y los consumidores. Por tal motivo el objetivo principal es la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos, para evitar que lleguen al consumidor alimentos con residuos de sustancias como pesticidas y antimicrobianos, que puedan tener consecuencias negativas para la salud. (10)

En una explotación lechera comúnmente se administran antibióticos como Tetraciclina para casos de mastitis, porque es barata y de fácil acceso sobre todo las de aplicación intramamaria. Sin embargo, de la dosis administrada, una parte es absorbida por el cuerpo y pasa al torrente sanguíneo, otra parte es inactivada por la leche y los productos generados por la infección y el resto, que es la mayor parte, es excretada en la leche durante los ordeños siguientes, siendo los animales de baja producción los que se tardan más en eliminar el fármaco; por tanto, el ordeño frecuente ayuda a diluir el antibiótico y acorta el tiempo de eliminación del mismo, además debe tenerse en cuenta que no sólo se contamina la leche de los cuartos tratados sino también la leche producida por los cuartos vecinos, posiblemente por difusión pasiva entre la sangre, la leche y entre el tejido mamario. (11)

3.2. CONTAMINACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

Los problemas relacionados a la industria láctea están directamente relacionados a la pérdida de la calidad de la leche, afectando mayormente a los productos fermentados, fabricación y maduración del queso; los residuos de antibiótico por tanto, provocan demora en la codificación y coagulación, se puede dar el desarrollo de microorganismos indeseables y alteración de las características normales del producto, tales como cuerpo débil, textura blanda, sabor amargo y consistencia arenosa, además, reduce la producción normal de acidez y aroma durante la fabricación de la mantequilla y el yogurt. (11)

4. TETRACICLINA

4.1 INTRODUCCIÓN

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos descubiertos a finales de la década de 1940, producidos por los *actinomicetos Streptomyces sp.* Estas tienen un sistema de cuatro anillos de seis miembros lineales y se caracterizan por un esqueleto común de octahidronaftacenos formado por cuatro anillos condensados y por su amplio espectro de actividad como se menciona en la Figura 1.1. La Tetraciclina, es el prototipo de este tipo de antibióticos y se obtuvo por primera vez por hidrogenólisis de la 7-clorotetraciclina. Son potentes agentes antibacterianos de amplio espectro que combaten las bacterias aerobias y anaerobias grampositivas y gramnegativas por tal motivo se tiene un amplio uso en medicina veterinaria. Como resultado, las tetraciclinas son medicamentos de elección o alternativas bien aceptadas para una variedad de enfermedades infecciosas. (12)(13)

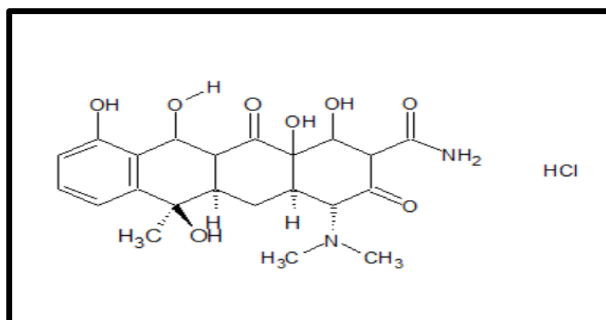


Figura 1. 1 Estructura química del Clorhidrato de Tetraciclina. (Fuente: Elaboración propia, ACD/ChemSketch).

4.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICOS DE LA TETRACICLINA

Polvo cristalino amarillo, inodoro. Estable al aire, pero se oscurece si se expone a la luz intensa, sus sales sódicas son solubles en agua, disminuyendo esta solubilidad al disminuir el pH. Son considerablemente estables en estado sólido, pero no tanto en solución, siendo particularmente inestables a pH superiores a 10.0 o inferiores a 2.0 (14)

4.3 FARMACODINÁMICA

Las Tetraciclinas son bacteriostáticos. No se conocen con exactitud su mecanismo de acción antibacteriano pero se sugieren las siguientes posibilidades: (15)

- ✓ Quelación activa de cationes intracelulares
- ✓ Inhibición de sistema enzimático
- ✓ Supresión de la síntesis proteica, al unirse de manera específica a las subunidades ribosómicas de 30s

4.4 FARMACOCINÉTICA

La Tetraciclina por vía intramuscular se absorbe muy bien y se detecta en plasma a los 15 min, para alcanzar su CP_{max} en 1 hora. Mantiene cifras terapéuticas durante 6

a 12 horas aproximadamente. El clorhidrato de Tetraciclina tiene biodisponibilidad de 23 a 25% y volumen de distribución alto (hasta 4 L/kg). tiene biodisponibilidad mayor que la Tetraciclina. La depuración es de 0.185 L/kg/h, con vida media de 16 horas. (15)

Por sus propiedades lipofílicas, las tetraciclinas pueden penetrar dentro de las células de los mamíferos y, por lo tanto, actuar contra algunos microorganismos intracelulares como *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. (16)

En cada Tetraciclina hay tres grupos ionizables presentes: Porción tricarbonil metano (pKa 3.5), porción fenoldicetona (pKa 7.7) y porción amonio catión (pKa 9.5). (12)

5. CIPROFLOXACINO

5.1 INTRODUCCIÓN

Los agentes antibacterianos del grupo de las quinolonas son el grupo de fármacos sintéticos de más desarrollo en la actualidad. En 1960, Leshner puso a disposición de la comunidad médica el ácido nalidíxico, primera quinolona antibacteriana. El Ciprofloxacino es un metabolito primario con gran potencia antibacteriana, que se utiliza principalmente en medicina humana pero tiene actividad contra bacterias que afectan a los animales domésticos. (17) (19)

Los congéneres tempranos (no fluorados en la posición C-6, como el ácido nalidíxico) se limitaron a ciertas infecciones gramnegativas, como las infecciones del tracto urinario. Sin embargo, la generación moderna de fluoroquinolonas, que contiene el sustituyente flúor en C-6 y un grupo amino básico cíclico en la posición C-7 como se muestra en la Figura 1.2, supera a sus predecesores en términos de espectro de actividad y potencia. Esto ha permitido su uso contra una variedad de gramnegativos, así como algunos patógenos grampositivos. (18)

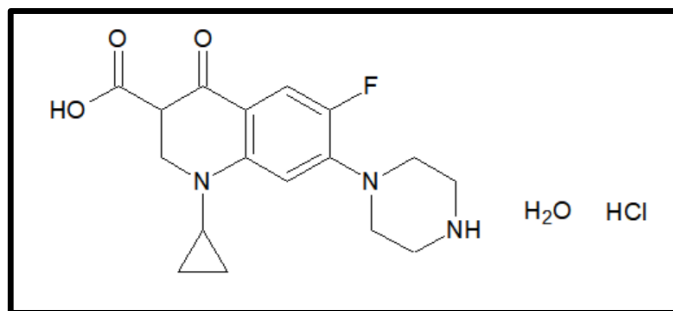


Figura 1. 2 Estructura química del clorhidrato de Ciprofloxacin. (Fuente: Elaboración propia, ACD/ChemSketch).

5.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL CIPROFLOXACINO

Cristales ligeramente amarillos, amarillo claro, moderadamente soluble en agua, poco soluble en ácido acético y en metanol, muy poco soluble en alcohol deshidratado, prácticamente insoluble en acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, en hexano y cloruro de metileno. (19)

Estructuralmente se diferencia de la enrofloxacin porque esta tiene un grupo etilo adicional.

5.3 FARMACODINÁMICA

Inhibe la girasa de DNA o topoisomerasa II. Actúa en las etapas de duplicación y crecimiento bacteriano; la bacteria muere a los 20-30 min. de estar expuesto al Ciprofloxacin. La penetración intracelular, espectro y potencia son mayores que en otros miembros de esta generación. Es un agente bactericida y su eficiencia depende de la concentración en el lugar requerido. (17)

5.4 FARMACOCINÉTICA

Desde una perspectiva veterinaria, el Ciprofloxacin es una fluoroquinilona de segunda generación, dado que a pesar de que tiene notable potencia, su farmacocinética es menos favorable que en las de tercera generación. En estudios

comparativos con enrofloxacin en pollo de engorda, el Ciprofloxacino tuvo buen volumen de distribución y eliminación rápida. (18)

Ninguna de las fluoroquinolonas se encuentran significativamente enlazadas a proteínas plasmáticas, y además es independiente de la concentración y del pH. El bajo grado de ionización, baja unión a las proteínas plasmáticas y alta solubilidad acuosa de todas las quinolonas fluoradas sirve para aumentar su transporte a los tejidos periféricos. (20)

6. TIEMPO DE RETIRO

También llamado periodo de suspensión, el cual indica el tiempo en horas o días entre el final de una terapia sistémica o local y el momento en que las concentraciones de antibióticos en leche se encuentra en niveles de máxima tolerancia de acuerdo a las normas dictadas por la organización mundial de la salud indicando cuando la leche se encuentre apta para el ser humano. El periodo de retiro es variable, debido a factores como la estructura fisicoquímica del antibiótico, excipientes, condiciones de administración, farmacodinamia y cinética en la vaca lechera. (21)

Para el caso de Tetraciclina el tiempo de retiro debe ser posible de tres a seis días y para el Ciprofloxacino que se encuentran menos en tejidos, su tiempo de vida media es más breve que la de enrofloxacin (que es de 3-5h). (17)

7. DESARROLLO DE RESISTENCIA

Los microorganismos, pueden desarrollar resistencia frente a los antibióticos, por su gran capacidad de adaptación. La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico, y es debida a la modificación de carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La resistencia transmisible es la más importante, esta mediada por plásmidos y transposones, que pueden pasar de una bacteria a otra. Los mecanismos de resistencia son fundamentalmente tres: (20)

- a) Inactivación del antibiótico por enzimas. La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico. (resistencia de Tetraciclina).
- b) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana. Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos o alteran los sistemas de transporte. En otras ocasiones provocan la salida del antibiótico por expulsión activa, evitando que se acumule la cantidad suficiente para que actúe eficazmente.
- c) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas).

8. ANÁLISIS DE RESIDUOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

8.1 ETAPA DE EXTRACCIÓN

El método químico consta de una etapa de extracción y otra de purificación del extracto obtenido, suelen presentar una buena sensibilidad y en la mayoría de los casos son más selectivos que el método microbiológico y de inmunoensayo (20). La extracción se obtiene con solventes orgánicos de polaridad intermedia tales como acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, acetona y acetonitrilo. El Ciprofloxacino y Tetraciclina por sus características ácido-base, emplean la extracción líquido-líquido como método de limpieza en las que el analito se transfiere de una fase a otra por control de pH. (22)

8.2 ETAPA DE DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Varios artículos han informado de la aplicación de diferentes herramientas analíticas para detectar antibióticos en la leche, la mayoría de técnicas cromatográficas (23) como capa fina (24), LC-UV (25) (26), cromatografía de iones (27) y LC-MS (28).

El análisis de antibióticos en leche por HPLC es más específico y más fiable (26). En el 2010 Azañero G. y Chiroque M. (29) determinó y cuantificó residuos de antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados por HPLC dando con certeza las identidades de los antimicrobianos, así como la cantidad presente en

la muestra analizada mediante picos característicos a cada sustancia y a longitudes de onda específicas y en el 2011 Hu Yu, Hui Mu, Ying-Mei Hu (30) determinó en tejido de porcino simultáneamente residuos de fluoroquinolonas y Tetraciclinas por MSPD y HPLC donde se aplicó limpieza de muestra, extracción y concentración previa de residuos. En el caso de antibióticos residuales en leche se recomienda que el HPLC se introduzca en los otros métodos de análisis porque este método es ampliamente utilizado por su sensibilidad y precisión, con una excelente recuperación y la calidad de los datos en el análisis cuantitativo.

9. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía es un método de separación donde los componentes de la muestra se distribuyen en diferentes fases de diferente naturaleza, debido a la variación de la velocidad que se establece al ser arrastrado por una fase móvil gaseosa o líquida mediante una fase estacionaria sólida o líquida. (31)

La cromatografía líquida de alta eficacia, es una técnica que se usa para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica. (32)

El proceso cromatográfico se puede definir como la técnica de separación de transferencia de masa entre la fase estacionaria y móvil. El componente es disuelto en un disolvente y luego forzado a fluir a través de una columna cromatográfica bajo una presión alta, en la columna la mezcla se separa en sus componentes. La interacción del soluto con las fases móviles y estacionarias puede ser manipulada a través de diferentes opciones de disolventes y fases estacionarias, como resultado el HPLC adquiere un alto grado de versatilidad que no se encuentra en otros sistemas cromatográficos y tiene la capacidad de separar gran variedad de mezclas químicas. (33)

9.1 COMPONENTES DEL HPLC

- **Depósito de solvente.** Recipiente que almacena suficiente cantidad de solventes de HPLC para la operación continua del sistema, que están

constituidos de un sistema de desgasificación y filtros especiales para evitar la contaminación del medio ambiente.(33)

- **Bomba.** Permite el flujo constante y continuo de la fase móvil a través del sistema, deben estar construidas de materiales resistentes a la presión y a las agresiones químicas, deben de ser de fácil manejo y mantenimiento. (32)
- **Sistema de inyección.** Es usado para introducir muestras en la columna, suele ser el paso que limita el carácter repetitivo de las medidas con el fin de que la columna no se sature, los volúmenes al inyectar deben de ser pequeños y al ser introducidos en la columna no han de perder presión. De todas formas este sistema está limitado a presiones máximas de 1500 Psi. (34)

El sistema más utilizado en HPLC son las válvulas de inyección que poseen bucles de volumen conocido.

- **Columna.** En ella se produce la separación de los analitos de la mezcla. Es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria, formando un interfaz con una superficie enorme. Actualmente en la mayoría de los casos son un tubo de acero inoxidable lleno de partículas de material poroso rígido (1-5 μ m), el material de empaque se mantiene dentro de la columna con un especial accesorio final equipado con fritas permeables, que permite ofrecer la fase móvil a la columna.(33)
- **Detector.** En HPLC es un espectrofotómetro modificado que está equipado con una pequeña celda de flujo, que monitorea la concentración de analitos eluidos. Al pasar el efluente de la columna a través del detector, algunas propiedades químicas o físicas del analito se traduce en un señal eléctrica, y los solutos se controlan a medida que se eluyan de la columna. El detector de absorbancia de UV visible controla la absorción de luces UV o visibles por analitos en el eluyente de HPLC. (34)(35)
- **Recopilación y procesamiento de datos.** Comprenden desde un registrador de gráficos en banda, un integrador, una estación de trabajo basada en ordenador personal (PC) hasta un sistema de red cliente-servidor. La

mayoría de las PCs también incorpora control total e instrumental del sistema HPLC incluidos los de otros fabricantes.

Un dispositivo de recolección y salida de datos está conectado a la salida electrónica del detector. El dispositivo de recogida de datos toma la señal electrónica producida por el detector y emite un gráfico de respuesta en función del tiempo. Este cromatograma resultante puede evaluarse para información tanto cualitativa como cuantitativa. (34)(35)

9.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

9.2.1 CROMATOGRAFÍA DE FASE NORMAL

Se realiza sobre sílice no modificada que separa los analitos de acuerdo a su polaridad intrínseca, también se puede operar en gradiente isocrático, escalonado o modo de elución en gradiente, donde las fases de retención móvil contienen disolventes orgánicos menos polares y la fase de elución móvil radica en disolventes orgánicos más polares. (36)

9.2.2 CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

La cromatografía de fase reversa consisten en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada, donde una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl (cloroalquisilano) donde R es una cadena alquil tal como grupo funcional octadecilo u octilo. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápido. (37)

9.2.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

En la Cromatografía de intercambio iónico se separa analitos iónicos en HPLC con columna de fase inversa. Esta cromatografía se basa en la adición de compuestos iónicos (reactivos de par iónico) a la fase móvil para promover la

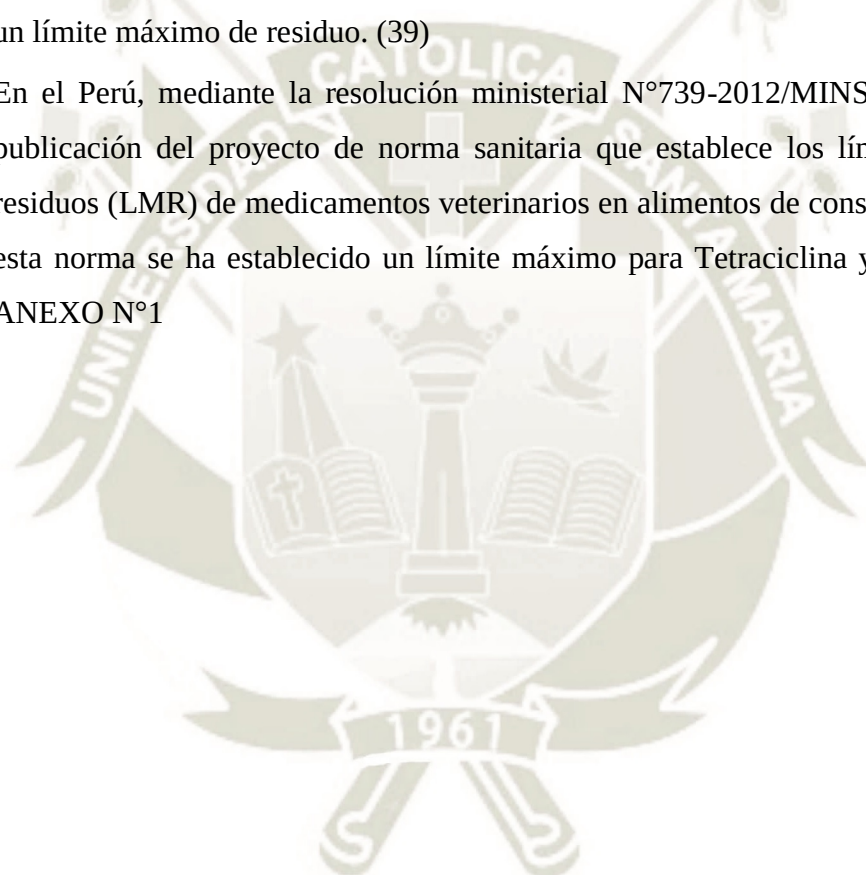
formación de pares iónicos con los analitos de la muestra. Con el nuevo par formado se modula la retención de los analitos y así se mejora su separación. (38)

10. FUNDAMENTO LEGAL DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO

En Europa el uso de estas sustancias viene regulado por la normatividad 2377/90 de la comunidad EUROPEA, en los anexos II, y sus posteriores modificaciones. En esta normativa aparecen sustancias cuyo uso está regulado y para las que se ha establecido un límite máximo de residuo. (39)

En el Perú, mediante la resolución ministerial N°739-2012/MINSA, se dispuso la publicación del proyecto de norma sanitaria que establece los límites máximo de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano. En esta norma se ha establecido un límite máximo para Tetraciclina y Ciprofloxacino.

ANEXO N°1



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1. INSTRUMENTAL DE VIDRIO

- Fiolas de 5, 25, 100, 250 y 500 mL
- Pesa filtros
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 1000 mL

1.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza 0.1 mg – 210 g. OHAUS®
- Balanza 0.01 mg – 220 g. SARTORIUS BASICLITE.
- Espectrofotómetro con lector de 96 celdas. BIOTEK SYNERGY HT
- Equipo de centrifugación. (FISHERSCIENTIFIC® MARATHON 16 KM
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). LACHROM, con una bomba L7100, Interfase d-7000, inyector manual de 20µL (loop) y detector UV L-7400 MERK HITACHI®
- Equipo EASYPURE II®
- Potenciómetro, METHROM®
- Equipo de desgasificación. MERK®
- Baño ultrasónico. BRANSONIC
- Agitador Vórtex mini 230V

1.3. REACTIVOS

- Tetraciclina Estándar de referencia HPLC de 96.28%
- Ciprofloxacino Estándar de referencia HPLC de 93.22%

- Acetonitrilo grado HPLC. MERCK®
- Ácido orto-fosfórico. MERCK
- Trietilamina. J. T. BAKER
- EDTA
- Agua ultrapura

1.4. OTROS

- Columna Chromolith RPe-18, 10cm
- Filtros anotop PTFE modificado para filtración de solventes orgánicos
- Frascos de vidrio de 200 ml
- Gorro de laboratorio
- Guantes de nitrilo
- Mandil de laboratorio
- Jeringa de tuberculina
- Mascarilla
- Micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L.
- Propipeta
- Punteras amarillas y azules
- Tubos cónicos descartables

2. METODOLOGÍAS

2.1 PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

2.1.1 UBICACIÓN ESPACIAL

El desarrollo de la presente investigación en su fase analítica se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, pabellón H-202 en el laboratorio de Investigación Docente “Proyecto Mercurio” en el departamento de

Arequipa. Las actividades de recolección de leche fueron llevadas a cabo en los establos correspondientes, que se listan en las unidades de estudio.

2.1.2 UNIDADES DE ESTUDIO (ANALITOS)

Para el estudio se utilizó leche de vacuno de 20 establos diferentes como se muestra en la Figura 2.1 de la ciudad de Arequipa. Listado de muestras tomadas en el ANEXO N°2



Figura 2. 1 Lugares de muestreo.

3. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

3.1 TÉCNICA

La técnica fundamental del presente estudio fue la cromatografía de líquidos de alta resolución.

3.2 INSTRUMENTO

El instrumento utilizado fue el cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Este instrumento operó bajo los siguientes parámetros cromatográficos, tanto para las muestras y los estándares de Ciprofloxacino y Tetraciclina.

- Fase estacionaria: Columna RP-18
- Tiempo de estabilización: 20 minutos.

- Flujo: 1.0 ml/min.
- Longitud de onda: 280 nm.
- Tiempo de corrida: 10 minutos.

3.3 METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

3.3.1 SELECCIÓN

Se realizó visitas a diferentes ganaderías que se encuentran en la campiña de Arequipa, con la finalidad de seleccionar “fuentes” de leche de vacuno que presentaron los criterios de inclusión planteados para evaluar nuestro método de análisis:

- Fuentes de leche que contengan estas secreciones lácteas recientemente ordeñadas.
- Fuentes de leche que contengan estas secreciones lácteas provenientes de animales que estén recibiendo como tratamiento Ciprofloxacino y Tetraciclina.

3.3.2 TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra se realizó utilizando el muestreo compuesto, que consiste en una mezcla de varias muestras puntuales de una misma fuente, tomadas a intervalos por periodos determinados utilizando un agitador, esto aseguró una mezcla completa del producto. Los volúmenes fueron iguales o proporcionales durante el periodo de muestreo, se recolectó aproximadamente 1 litro de leche de vacuno para la muestra y contra muestra en un frasco de vidrio con tapa hermética. Para este proceso portamos con la indumentaria necesaria. (40)

3.3.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Debido a que este estudio tiene fines de evaluación de nuestro método de análisis y no con fines de control de calidad, se procedió a tomar 20 muestras de leche de vacuno con una contra muestra de cada punto de muestreo.

3.3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Se colocó tanto en la muestra y contra muestra un rótulo (40) con cinta masking con la siguiente información:

- Codificación de muestra
- Hora de muestreo
- Código de la hacienda productora
- Volúmen (mL)

3.3.5 TRANSPORTE DE LA MUESTRA

La muestra se transportó en una caja de doble pared o enchaquetada de plástico (cooler) conteniendo pequeñas bolsas de hielo como soporte de frío (4-5°C). (40)

4. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA EN LECHE DE VACUNO MEDIANTE HPLC

El desarrollo de una metodología para la detección y cuantificación de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina, se organizó en tres etapas consecutivas:



4.1 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Inicialmente de acuerdo a Hu Yu, Hui Mu (30) se utilizó la columna Chromolith performance RP-18 endcapped 100-4.6 mm se probó con Ácido acético 0.1% – Metanol (75:25 v/v) por 10 min., a una longitud de onda de 280 nm a un flujo de 1.5 mL/min.

La Tetraciclina y Ciprofloxacino fueron eluidos con un sistema gradiente de tres etapas:

- Ácido acético 0.1% – Metanol (75:25 v/v) en 0 min.
- Ácido acético 0.1% – Metanol (55:45 v/v) en 8 min.
- Ácido acético 0.1% – Metanol (75:25 v/v) en 15 min.

Con un tiempo de corrida de 15 min a un flujo de 1.0 mL/min. Se observó señales de picos unidos los cuales no podían ser integrados, por lo que fue necesario cambiar la fase móvil.

Se procedió a cambiar los solventes de acuerdo a la USP 40, utilizando la misma columna Chromolith performance RP-18 endcapped 100-4.6 mm de la siguiente forma :

- Solución A: Ácido fosfórico en agua 0.025M a pH 2.0 ± 0.1
- Solución B: Acetonitrilo/Solución A (13:87)
- Solución C: Ácido fosfórico en agua 0.025M a pH 3.0 ± 0.1 (alcalinizado con trietilamina)

Donde la solución A sirve para la preparación de la solución B, luego la solución B sirve para preparar las diferentes diluciones con concentración de 100µg/L, 500µg/L, 1000µg/L, 1500µg/L y 2000µg/L de los estándares Tetraciclina y Ciprofloxacino y la solución C sirve como fase móvil.

La determinación de Tetraciclina y Ciprofloxacino fueron realizados con un sistema gradiente, la columna Chromolith performance RP-18e 100-4.6 mm fue equilibrada por un periodo de 20 min. Usando: Acetonitrilo - Solución C (13:87 v/v).

Con una longitud de onda de 280 nm., un flujo 1.5 mL/min, una concentración de 10000 µg/L de ambos estándares y con un tiempo de corrida de 15 min, se observó gran mejoría del cromatograma; en el que se logró separar los picos de Tetraciclina y Ciprofloxacino, decidiéndose trabajar con sistema isocrático, para obtener la proporción constante del solvente y la solución.

Con la intención de poder lograr que los picos de Tetraciclina y Ciprofloxacino se encuentren en la línea base del cromatograma, se disminuyó el flujo a 1.0 mL/min; con dicho cambio se mejoró los resultados, obteniéndose picos que se visualizaron en los tiempos 4.10 min para la Tetraciclina y 4.50 min para el Ciprofloxacino.

Al inyectar la extracción de los estándares con una concentración de 2000 µg/L, se observó como señales los picos cromatográficos, el cual se hacía visible a las 4.10 min para la Tetraciclina y 4.50 min para el Ciprofloxacino, visualizándose mucho mejor. Al inyectarse la extracción de Tetraciclina y Ciprofloxacino de la muestra los picos de estos antimicrobianos se visualizaron en los mismos tiempos. Definiéndose, así como tiempo de corrida de 10 min.

Con el procedimiento anterior se definieron las condiciones cromatográficas, con lo cual se cuantificó trazas de Tetraciclina y Ciprofloxacino como se muestra en la tabla N° 2.1 y 2.2.

Tabla N° 2. 1 Fase Móvil y su proporción

Fase Móvil (v/v)	
Acetonitrilo	Solución C*
13	87

FUENTE: Registro de investigación propios

Tabla N° 2. 2 Condiciones cromatográficas

Parámetros	Estándar	Muestra
Fase estacionaria	Columna Chromolith RP-18e	Columna Chromolith RP-18e
Tiempo de estabilización	30 min	30 min
Flujo	1.0 mL/min	1.0 mL/min
Longitud de onda	280 nm	280 nm
Tiempo de corrida	10 min	10 min

FUENTE: Registro de investigación propios

Después de haber conseguido los parámetros ideales para la determinación de Tetraciclina y Ciprofloxacino, se procedió a la estandarización del método verificando los parámetros correspondientes.

4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

4.2.1 LINEALIDAD

4.2.1.1 FUNDAMENTO

La linealidad es la proporcionalidad entre la concentración y la respuesta del método en un intervalo de concentraciones. El ensayo de linealidad puede efectuarse sobre soluciones de concentraciones crecientes o sobre muestras problema a las que se han adicionado cantidades crecientes de un patrón del analito. En ambos casos el procedimiento lleva a la construcción de una curva de calibración. (41)

La linealidad se evaluó preparando tres curvas de calibración por triplicado con los estándares de Ciprofloxacino y Tetraciclina de pureza 93.22 % y 96.28 % HPLC respectivamente, en cinco niveles de concentración (100, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/L), partiendo de una solución stock de 50000 µg/L para

Ciprofloxacino y 50000 µg/L para Tetraciclina. Como se muestra en la Figura 2.2

Con la finalidad de evaluar el coeficiente de regresión lineal de las tres curvas de calibración, en un intervalo de confianza de 95%. Las disoluciones patrón pasaron por el mismo método de extracción que las muestras, para luego ser filtradas e inyectadas al equipo HPLC, y así obtener las áreas correspondientes.

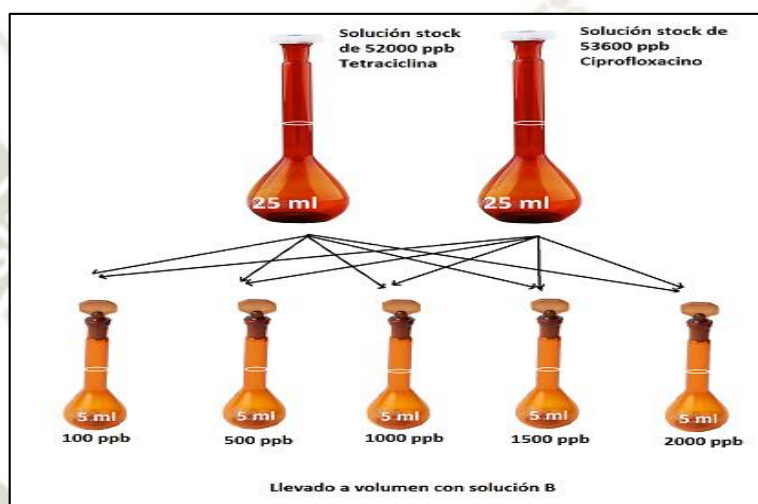


Figura 2. 2 Elaboración de la curva de calibración.

4.2.1.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se realizó el cálculo de la pendiente b , del intercepto a , y del coeficiente de regresión r . Estos parámetros de regresión son necesarios para la determinación de línea de regresión o curva de calibración y su respectiva ecuación de regresión, a continuación las fórmulas (41)(42)(43)

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n}$$

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right) \left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}}$$

Donde:

n: número de repeticiones

b: pendiente

a: intercepto

x_i : concentración

y_i : área medida en el equipo

Test de Cochran. Igualdad de varianzas

$$G_{exp} = \frac{S^2_{max}}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2}$$

Donde:

S^2 : varianza

4.2.2 PRECISIÓN

4.2.2.1 FUNDAMENTO

La precisión del método analítico consta de un conjunto de mediciones que está íntimamente relacionada con la presencia de errores indeterminados (o aleatorios) y se considera como una medida de repetibilidad de los resultados. Para describir la precisión se utiliza fundamentalmente la desviación estándar; si bien también se usa la desviación estándar relativa de la media, el coeficiente de variación y la varianza. (44)

4.2.2.2 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE CIPROFLOXACINO

Se pesó 1.25 mg del estándar Ciprofloxacino y se transfirió a una fiola de 25 mL, se completó con la solución B, logrando una concentración stock de 50000 µg/L. A partir de esta solución se tomó 100 µL y se transfirió a una fiola de 5 mL, se completó hasta su aforo con la solución B; obteniéndose de este modo una disolución con una concentración teórica de 1000 µg/L. Esta disolución se extrajo nueve veces y cada una se inyectó en el equipo HPLC. (45)

4.2.2.3 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE TETRACICLINA

Se pesó 1.25 mg del estándar Tetraciclina y se transfirió a una fiola de 25 mL, se completó con la solución B, lográndose una concentración stock de 50000 µg/L a partir de esta solución se tomó 100 µL y se transfirió a una fiola de 5 mL, se completó hasta su aforo con la solución B; obteniéndose de este modo una disolución con una concentración teórica de 1000 µg/L. Esta disolución se extrajo nueve veces y cada una se inyectó en el equipo HPLC. (46)

4.2.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

- a. Desviación estándar (47)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

n: número de repeticiones

x_i : valor medido en la prueba i.

$\bar{x}$: Media aritmética

- b. Desviación estándar relativa

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

S: Desviación estándar

$\bar{x}$: Media aritmética

4.2.3 EXACTITUD

4.2.3.1 FUNDAMENTO

La exactitud es el acercamiento de los resultados experimentales obtenidos, al valor verdadero. Se expresa como el porcentaje de recuperación por el ensayo de cantidades conocidas adicionadas al analito.

En el caso de análisis de impurezas, la exactitud debería ensayarse en muestras a la que se ha añadido cantidades conocidas de impurezas. Si no es posible obtener muestras de ciertas impurezas o productos de degradación, se deben comparar los resultados con aquellos obtenidos por un método independiente. En la ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de una impureza basada en la comparación de su respuesta a la materia prima o principio activo; debería usarse si se conoce, la relación de las respuestas de cantidades iguales de la impureza y de la materia o principio activo (factor de respuesta). (48)(49)

4.2.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE MUESTRA

Primeramente, se realizó tres extracciones, cada una de 5 mL de muestra de leche mediante nuestra metodología analítica, filtramos esta solución para posteriormente ser inyectada al equipo y obtener las áreas correspondientes. Estas muestras se llamaron “muestras sin fortificar”. (28)

Seguidamente a otros 5 mL de la misma muestra de leche se le añadió 300 µg/L, 1000 µg/L y 1700 µg/L de la solución stock de ambos antimicrobianos,

que corresponde a 30 µL, 100 µL y 170 µL para Ciprofloxacino y las mismas alícuotas para Tetraciclina. Dicha adición se realizó antes de la extracción que se hizo por triplicado, filtramos y finalmente las muestras fueron inyectadas al equipo para obtener las áreas correspondientes. Estas muestras enriquecidas con la solución stock, se les llamo “muestras fortificadas”.

4.2.3.3 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE ESTÁNDAR DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA PARA EXACTITUD

a. Preparación de la solución con adición de estándar 300 µg/L

Se tomó 30 µL del stock de estándar Ciprofloxacino y 30 µL de la solución stock del estándar de Tetraciclina y se transfirió a una fiola de 5 mL, posteriormente se enrasó con la solución B. (45) (46)

b. Preparación de la solución con adición de estándar 1000 µg/L

Se tomó, 100 µL del stock de estándar Ciprofloxacino y 100 µL de la solución stock del estándar de Tetraciclina y se transfirió a una fiola de 5 mL, posteriormente se enrasó con la solución B. (45) (46)

c. Preparación de la solución con adición de estándar 1700 µg/L

Se tomó 170 µL del stock de estándar de Ciprofloxacino y 170 µL de la solución stock del estándar de Tetraciclina y se transfirió a una fiola de 5 mL, posteriormente se enrasó con la solución B. (45) (46)

4.2.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

a. Porcentaje de recuperación (49)

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \times 100$$

Donde:

$\bar{x}$: Valor promedio

$\hat{x}$: Valor verdadero

b. Valor t experimental

Se calculó el valor t experimental, con la finalidad de ser comparado con valor de t_{tabla} a n-1 grados libertad, a un nivel de confianza del 95%. Ello con la finalidad de establecer semejanzas o diferencias con la concentración conocida. El valor de $t_{\text{experimental}}$ se halla mediante la siguiente fórmula. (48)

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100-R| \times \sqrt{n}}{RSD}$$

Donde:

R: Porcentaje de recuperación

n: número de repeticiones

RSD: Desviación estándar relativa

4.2.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

4.2.4.1 FUNDAMENTO

El límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración mínima detectable que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco. (49)

El límite de cuantificación (LOQ) o límite de determinación, puede definirse como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuestos a la detección cualitativa. (49)

4.2.4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se utilizará la siguiente fórmula descrito en el libro: “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry” a partir de la siguiente formula:

$$LOD = y_B + 3S_B$$

Para el límite de cuantificación (LOQ) se utilizará la siguiente fórmula (49)

$$LOQ = y_B + 10S_B$$

Fórmula que al ser desarrollada completamente, se convierte en la siguiente expresión:

$$LOD = \frac{\left[\bar{y} - \left[\frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum i (x_i - \bar{x})^2} \right] \bar{x} \right] + 3 \left(\sqrt{\frac{\sum i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \right) - \left[\bar{y} - \left[\left(\frac{\sum i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum i (x_i - \bar{x})^2} \right) \bar{x} \right] \right]}{\left[\frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum i (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

La expresión y_B es el valor “a” de la ecuación de la recta, el cual es calculado utilizando la siguiente formula:

$$a = \bar{y} - [(b)\bar{x}]$$

Donde “b” es calculado de la siguiente forma:

$$b = \left(\frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum i (x_i - \bar{x})^2} \right)$$

Quedando la expresión y_B de la siguiente manera:

$$y_B = \bar{y} - \left[\left(\frac{\sum i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum i (x_i - \bar{x})^2} \right) \bar{x} \right]$$

Las expresiones “a” y “b” son de la ecuación de la recta, representada también como:

$$y = a + bx$$

La expresión S_B según descrito en el libro es la expresión $S_{y/x}$, la cual es igual a:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$$

Entonces a la fórmula $LOD = y_B + 3S_B$ y $LOQ = y_B + 10S_B$ se le reemplaza adecuadamente con los términos ya desarrollados.

4.3 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA POR HPLC

Para la determinación y cuantificación de Ciprofloxacino y Tetraciclina, se construyó la curva de calibración con los respectivos estándares, en las concentraciones de 100, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/L, a partir de una solución stock de 50000 µg/L de Ciprofloxacino y 50000 µg/L de Tetraciclina.

El intervalo de la curva de calibración se dió en función del límite máximo permisible. (45) (46)

4.3.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE CIPROFLOXACINO

Para preparar la solución stock se pesó 1.25 mg del estándar de Ciprofloxacino 93.22 % HPLC y se transfirió a una fiola de 25 mL completada a volumen con solución B, para lograr una concentración stock de 50000 µg/L.

Cálculo de la solución stock de Ciprofloxacino: (45) (46)

$$\frac{1.25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ µg}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times \frac{93.22}{100} = 46610.00 \text{ µg/L}$$

4.3.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE TETRACICLINA

Se pesó 1.25 mg del estándar de Tetraciclina 96.28 % HPLC y se transfirió a una fiola de 25 mL completada a volumen con solución B, para lograr una concentración stock de 50000 µg/L. (45) (46)

Cálculo de la solución stock de Tetraciclina:

$$\frac{1.25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ µg}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times \frac{96.28}{100} = 48140.00 \text{ µg/L}$$

La preparación del estándar debe ser similar a la muestra siendo así, se prepararon 5 mL de disoluciones patrón con concentraciones de 100, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/L procediendo de la siguiente forma:

- ✓ Se tomó cierta cantidad en microlitros de la solución stock, equivalente a la concentración requerida, como se muestra en la Tabla N°2.3
- ✓ Se llevó a volumen con la solución B.
- ✓ La solución stock inicialmente preparada se protegió de la luz forrando la fiola con papel aluminio, de la misma forma se protegieron las disoluciones patrón. Los tubos para extracción también fueron forrados con papel aluminio para proteger a la solución estándar de la luz.

Tabla N° 2. 3 Concentraciones de disoluciones patrón $\mu\text{g/L}$ equivalente a μL de Ciprofloxacino y Tetraciclina

Solución Stock (μL) Ciprofloxacino	Solución Stock (μL) Tetraciclina	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
10	10	100
50	50	500
100	100	1000
150	150	1500
200	200	2000

FUENTE: Registro de investigación propios

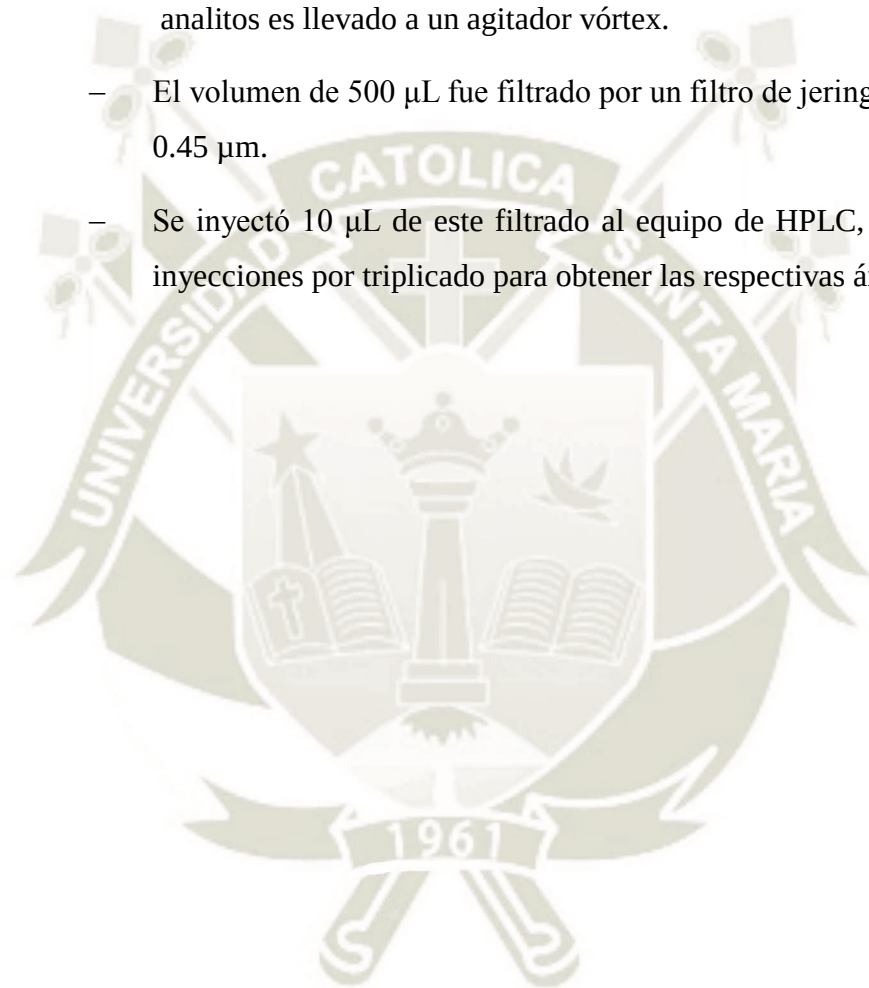
4.3.3 EXTRACCIÓN DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA EN MUESTRAS DE LECHE DE VACUNO

Para la determinación de las trazas en muestras de leche de vacuno, se realizó de igual manera que las disoluciones patrón. La extracción se realizó precipitando proteínas y grasas. (28)

El procedimiento de extracción de la muestra de leche se detalla a continuación:

- Se tomó aproximadamente 1 litro de muestra de leche que contenía el tanque de muestreo, esta muestra se vertió en una botella previamente cubierto de papel aluminio, para luego ser etiquetado y codificado. Las muestras se refrigeraron hasta su respectivo análisis.
- Se tomó una alícuota de 5 mL de la muestra de leche a un tubo centrifuga.
- Se añadió 0.1 mg de EDTA, para luego llevar a vórtex por 3 min.
- Después se agregó 5 μL de ácido orto fosfórico, para luego llevar a vórtex por 5min.
- Posteriormente al mismo tubo se agregó 3 mL de acetonitrilo.

- Luego se centrifugó por 10 min. a 6000 rpm.
- Se tomó 500 μL del sobrenadante, para luego secar y concentrar a flujo de aire.
- El residuo se disolvió con 500 μL de la solución B.
- Posteriormente estos 500 μL que contienen la extracción de los analitos es llevado a un agitador vórtex.
- El volumen de 500 μL fue filtrado por un filtro de jeringa anotop de 0.45 μm .
- Se inyectó 10 μL de este filtrado al equipo de HPLC, realizamos estas inyecciones por triplicado para obtener las respectivas áreas.





CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Antes de la estandarización del método cromatográfico se hizo la prueba en la columna Chromolith RP-18e de 100 – 4.6 mm para la identificación de Ciprofloxacino y Tetraciclina guiándonos de Hu Yu, Hui Mu (30) reportando en su trabajo la utilización de la columna cromatográfica Kromasil C18 (150-4.6 mm) y Nájla Mohamad (50) también reportando en su trabajo que utilizó la columna LiChrospher 100 RP-18 (125-4 mm), estudios en los que se observó que si se puede identificar ambos antimicrobianos con un mismo método.

Luego de múltiples pruebas con la columna Chromolith RP-18e de 100-4.6 mm, nos respaldamos de estos estudios para poder resumir lo que se muestra en la tabla N°3.1. En la que se observa que los tiempos de retención de los dos antimicrobianos son favorables para nuestra estandarización del método y para la determinación de Ciprofloxacino y Tetraciclina en leche de vacuno.

1.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA

Se pesó 1.25 mg y 1.25 mg de Ciprofloxacino y Tetraciclina respectivamente disolviendo ambos en diferente fioles de 25 mL con solución B logrando concentraciones stock teóricas de 50000 µg/L y 50000 µg/L respectivamente.

Características comunes de las columnas mencionadas en la tabla N°3.1:

Columna Kromasil 100-5-C18:

- Tamaño del poro: 100 Å
- Tamaño de partícula: 5 µm
- Fase estacionaria: C18 octadecilsilano
- Dimensiones: 150 x 4.6 mm

LiChrospher 100 RP-18 (125x4 mm):

- Diámetro de poro: 100Å
- Diámetro de partícula: 5µm

- Fase estacionaria: C18 octadecilsilano

- Dimensiones: 125 x 4.0mm

Chromolith RP-18e de (100- 4.6 mm)

- Diámetro de poro: 100Å

- Diámetro de partícula: 5µm

- Fase estacionaria: octadecilsilano con tope completo

- Dimensiones: 100 x 4.6 mm

Tabla N° 3. 1 Columnas para la identificación de Tetraciclina y Ciprofloxacino

COLUMNA	FASE MÓVIL	TIEMPO DE RETENCIÓN	ANALITO
Kromasil C18 (150-4.6mm)	Ácido acético 0.1 %:Metanol (gradiente)	7.21 min. 8.93 min.	Ciprofloxacino Tetraciclina
LiChrospher 100 RP-18 (125x4 mm)	Agua:Acetonitrilo: Trietilamina (80:20:0.3)	2.49 min.	Ciprofloxacino
Chromolith RP-18e de (100- 4.6 mm)	Solución C*: Acetonitrilo (13:87)	4.5 min. 4.1 min.	Ciprofloxacino Tetraciclina

FUENTE: Registro de investigación propios.

1.2 PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Preparación de ácido ortofosfórico 0.025M c.s.p. 1000 mL: En una fiola de 1000 mL se agregó 500 mL de agua y 1 mL de ácido ortofosfórico, llevamos a volumen con agua para luego medir el pH. Se separó las proporciones necesarias de esta solución para la preparación de la solución A y solución C respectivamente.

Solución A: ácido fosfórico 0.025 M a pH 2

Solución B: mezcla de acetonitrilo y solución A (13:87)

Solución C*: Solución A ajustar a un pH 3 ± 0.1 con trietilamina.

La propuesta de realizar la determinación de Ciprofloxacino y Tetraciclina con esta fase móvil se apoya en los trabajos denominados “Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal” (51) y “Quantitative determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography” (50) y “Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima”(29). Dando como propuesta un mecanismo de reacción entre la columna y los analitos, obteniéndose así resultados satisfactorios.

El mecanismo sugiere suprimir la ionización con la finalidad de conseguir moléculas en forma no ionizada, de ese modo conseguir el aumento de la interacción del analito con la fase estacionaria. Normalmente se añaden aditivos tales como trietilamina y ácido fosfórico para controlar el pH dentro del rango 2-4, reduciendo de tal forma las colas cromatográficas e incrementado la agudeza de los picos. (52)(53)(54)

La supresión iónica es un tipo de cromatografía de fase reversa que se utiliza para la separación de especies ionizables. Se recomienda el uso de este tipo de cromatografía especialmente para moléculas como nuestros analitos.

1.3 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA POR HPLC

Se procedió a realizar los ensayos preliminares y se establecieron como condiciones cromatográficas para ambos antimicrobianos las siguientes:

- Fase móvil: Acetonitrilo : Solución C (13:87)
- Flujo: 1.0 mL/min
- Longitud de onda: 280 nm
- Tiempo de retención: 4.1 minutos aproximadamente Tetraciclina

4.5 minutos aproximadamente Ciprofloxacino

- Volúmen de inyección: 10 μ L

En la figura N°3.1 se observa el cromatograma de picos de los antimicrobianos y la muestra con mayor área.

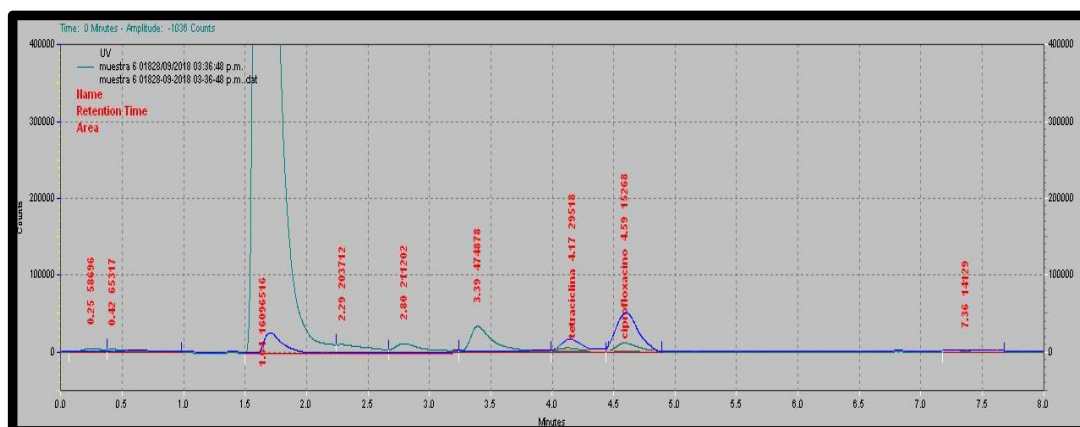


Figura 3. 1 Tiempos de retención de Ciprofloxacino y Tetraciclina.

2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

Luego de establecer las condiciones cromatográficas, se inició el procedimiento de la estandarización de la técnica analítica, evaluándose los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y el límite de cuantificación y detección.

2.1 LINEALIDAD PARA EL ESTÁNDAR DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA

2.1.1 LINEALIDAD PARA EL ESTÁNDAR DE CIPROFLOXACINO

Para la evaluación de la linealidad se preparó la solución stock del estándar de Ciprofloxacino conforme el procedimiento descrito en el capítulo de materiales y métodos.

A partir de la solución stock de 50000 μ g/L se prepararon 5 diluciones estándar a las concentraciones teóricas de 100, 500, 1000, 1500 y 2000 μ g/L. Se extrajo tres repeticiones por cada concentración del estándar, este procedimiento se

realizó a su vez tres veces, lo que permitió hallar tres curvas de calibración promedio en tres días diferentes como se muestra en la tabla N°3.2.

**Tabla N°3.2 Áreas para determinar la linealidad del estándar
Ciprofloxacino**

CURVA	Concentración (µg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Promedio
I	100	36804	36920	36870	36895
	500	179856	179846	179200	179523
	1000	361017	360137	359477	359807
	1500	544802	543122	545177	544150
	2000	717276	712262	718294	715278
II	100	36245	36564	36011	36288
	500	182456	183820	183036	183428
	1000	359478	359225	358745	358985
	1500	538931	546621	548904	547763
	2000	722635	724739	725816	725278
III	100	36248	36988	37149	37069
	500	183461	182938	183879	183409
	1000	367621	367409	368671	368040
	1500	540232	542123	540031	541077
	2000	726917	722491	720215	721353

FUENTE: Registro de investigación propios

La evaluación estadística de la linealidad y proporcionalidad se realizó como se describe a continuación:

a. Recta de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados

Se realizó una curva de calibración ajustada considerando las tres curvas de calibración anteriores en la figura 3.2.

Se evidencia la linealidad del método, que fue construida por la concentración versus el área, en la que la respuesta (Y) es dependiente de la concentración (X).

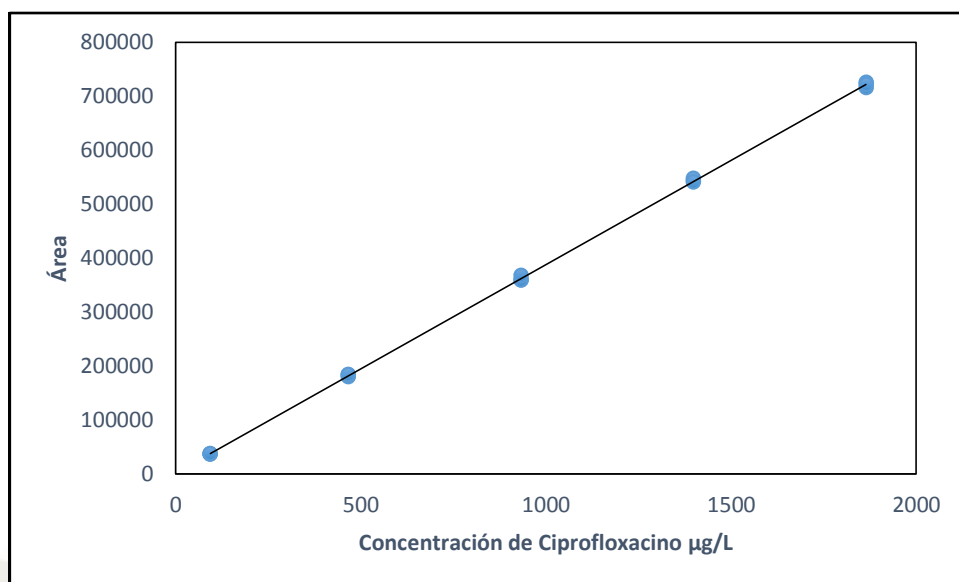


Figura 3. 2 Curva de calibración promedio para la linealidad de Ciprofloxacino.

Siendo la ecuación de la recta:

$$Y=1641.274 + 360.334 x$$

Se recalculó las concentraciones finales considerando la pureza del estándar, que fue de 93.22%. Para poder haber hallado la pendiente “b” y el intercepto “a” fue necesario establecer la recta de regresión lineal como se muestra en la tabla N°3.3. Obteniendo un coeficiente de correlación “r” de 0.9999 que se determinó con los valores hallados en la tabla N°3.3.

Este valor nos indica el grado de intensidad de la relación que existe entre las variables “X”e”Y” es casi perfectamente lineal.

Posteriormente se halló el coeficiente de determinación “r²” hallándose un valor de 0.9998, este valor es muy cercano a 1 estableciendo que el modelo lineal es adecuado para describir la relación existente entre las variables “X” e “Y”.

Afirmando que el 99.98% de las variaciones se debe a la influencia de la variable “X”.

b. Coeficiente de variación de los factores de respuesta

Para hallar el coeficiente de variación se calculó primero la media aritmética y la varianza, datos que se muestran en la tabla N°3.3. El coeficiente de variación es la relación que hay entre la varianza y la media aritmética multiplicado por cien.

El valor encontrado para el coeficiente de linealidad fue de 1.120%, este resultado es menor al 5%, por lo tanto el factor respuesta es semejante entre si y cercano al valor de la pendiente.

c. Test de Cochran

Al ser $G_{\text{experimental}}=0.3414$ menor al $G_{\text{tabla}}=0.6830$ para $3(5-2=3)$ grados de libertad a un nivel de confianza del 95%, significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

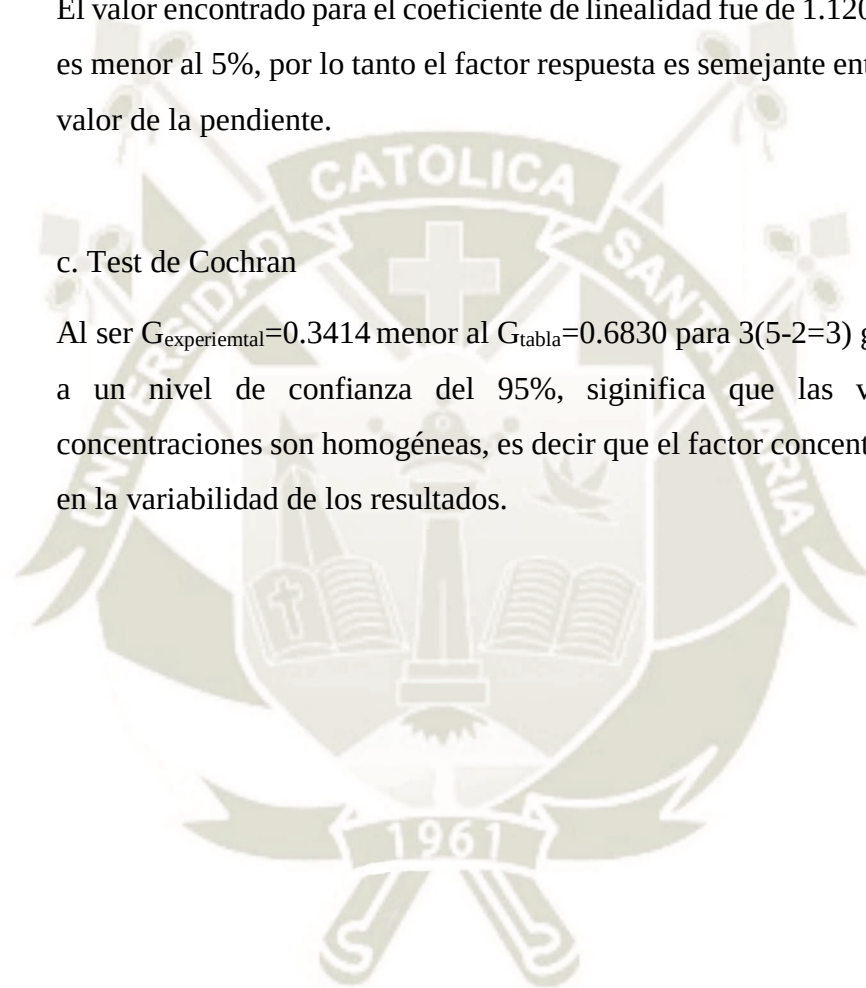


Tabla N°3.3 Datos para determinar la proporcionalidad y linealidad del Ciprofloxacino

Concentración teórica µg/L	N° Replica	Concentración práctica (µg/L) X	Área promedio Y	X×Y	X ²	Y ²	Factor respuesta Y/X (f)	Varianza
100	1	93.220	36895	3439351.900	8689.968	1361241025.000	395.784	1.94E+01
	2	93.220	36288	3382720.750	8689.968	1316782656.251	389.267	
	3	93.220	37069	3455525.570	8689.968	1374073692.251	397.645	
500	1	466.100	179523	83675670.300	217249.210	32228507529.000	385.159	2.33E+01
	2	466.100	183428	85495790.800	217249.210	33645831184.000	393.537	
	3	466.100	183409	85486701.850	217249.210	33638677872.251	393.496	
1000	1	932.200	359807	335412085.400	868996.840	129461077249.000	385.976	2.89E+01
	2	932.200	358985	334645817.000	868996.840	128870230225.000	385.094	
	3	932.200	368040	343086888.000	868996.840	135453441600.000	394.808	
1500	1	1398.300	544150	760884245.850	1955242.890	296098678350.251	389.150	5.73E+00
	2	1398.300	547763	765936303.750	1955242.890	300043756406.251	391.735	
	3	1398.300	541077	756587969.100	1955242.890	292764319929.000	386.953	
2000	1	1864.400	715278	1333564303.200	3475987.360	511622617284.001	383.651	7.30E+00
	2	1864.400	725278	1352207371.000	3475987.360	526027452006.251	389.014	
	3	1864.400	721353	1344890533.200	3475987.360	520350150609.000	386.909	
Σ(sumatoria)		14262.660	5538340	7592151277.670	19578498.805	2944256837617.500	5848.181	8.45E+01
Promedio		950.844	369222.67	Promedio			389.879	1.69E+01
				D.S.			4.371	1.01E+01

FUENTE: Registro de investigación propios

2.1.2 LINEALIDAD PARA EL ESTÁNDAR DE TETRACICLINA

Para la evaluación de la linealidad se preparó la solución stock del estándar de Tetraciclina. Con lo que se preparó 5 diluciones patrón a las concentraciones teóricas de 100, 500, 1000, 1500 y 2000 $\mu\text{g/L}$. Se recalculó las concentraciones finales considerando la pureza del estándar, que fue de 96.28%. Como se muestra los datos en la tabla N°3.4

Tabla N°3.4 Áreas para determinar la linealidad del estándar Tetraciclina

CURVA	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio
I	100	10360	10716	10516	10616
	500	52757	52061	52230	52146
	1000	105160	105578	105456	105517
	1500	151360	152417	151195	151806
	2000	207896	203789	206735	205262
II	100	10836	10472	10521	10497
	500	52425	52448	52894	52671
	1000	103371	103766	104284	104025
	1500	155617	156134	155443	155789
	2000	205478	201347	206337	203842
III	100	11020	10626	10805	10716
	500	53164	52794	52765	52780
	1000	104074	103785	103741	103763
	1500	154396	153070	153044	153057
	2000	206155	205488	204604	205046

FUENTE: Registro de investigación propios

La evaluación estadística de la linealidad y proporcionalidad se realizó al igual que Ciprofloxacino.

a. Recta de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados

Luego se realizó una curva de calibración ajustada considerando las tres curvas de calibración en la figura 3.3. Se evidencia la linealidad del método, que fue construida por la concentración versus el área, en la que la respuesta (Y) es dependiente de la concentración (X).

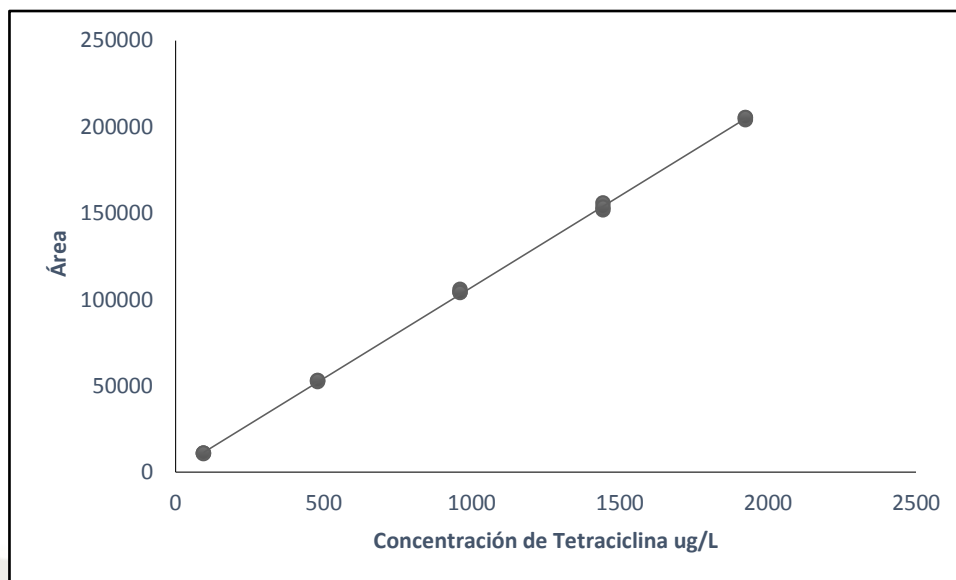


Figura 3. 3 Curva de calibración promedio para la linealidad de Tetraciclina.

Siendo la ecuación de la recta:

$$Y = 1241.894 + 101.889 x$$

Para poder haber hallado la pendiente “b” y el intercepto “a” fue necesario establecer la recta de regresión lineal como se muestra en la tabla N°3.5

Obteniendo un coeficiente de correlación “r” de 0.9999 que se determinó con los valores hallados en la tabla N°3.5

Este valor nos indica el grado de intensidad de la relación que existe entre las variables “X” e “Y” es casi perfectamente lineal.

Posteriormente se halló el coeficiente de determinación “r²” hallándose un valor de 0.9997, este valor es muy cercano a 1 estableciendo que el modelo lineal es adecuado para describir la relación existente entre las variables “X” e “Y”.

Afirmando que el 99.97% de las variaciones se debe a la influencia de la variable “X”.

b. Coeficiente de variación de los factores de respuesta

Para hallar el coeficiente de variación se calculó primero la media aritmética y la varianza, datos que se muestran en la tabla N°3.5.

Se calculó al igual que el Ciprofloxacino.

El valor encontrado para el coeficiente de linealidad fue de 1.670%, este resultado es menor al 5%, por lo tanto el factor respuesta es semejante entre si y cercano al valor de la pendiente.

c. Test de Cochran

Al ser $G_{\text{experimental}}=0.4054$ menor al $G_{\text{tabla}}=0.6830$ para $3(5-2=3)$ grados de libertad a un nivel de confianza del 95%, significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla N°3.5 Datos para determinar la proporcionalidad y linealidad del estándar Tetraciclina

Concentración (µg/L)	N° Replica	Concentración (µg/L) X	Areas promedio Y	X × Y	X ²	Y ²	Factor respuesta Y/X (f)	Varianza
100	1	96.280	10616	1022108.480	9269.838	112699456.000	110.262	1.30E+00
	2	96.280	10497	1010603.020	9269.838	110176512.250	109.021	
	3	96.280	10716	1031688.340	9269.838	114821940.250	111.295	
500	1	481.400	52146	25102843.700	231745.960	2719153170.250	108.321	4.96E-01
	2	481.400	52671	25355819.400	231745.960	2774234241.000	109.412	
	3	481.400	52780	25408051.300	231745.960	2785675620.250	109.638	
1000	1	962.800	105517	101591767.600	926983.840	11133837289.000	109.594	9.66E-01
	2	962.800	104025	100155270.000	926983.840	10821200625.000	108.044	
	3	962.800	103763	99903016.400	926983.840	10766760169.000	107.772	
1500	1	1444.200	151806	219238225.200	2085713.640	23045061636.000	105.114	1.99E+00
	2	1444.200	155789	224989751.700	2085713.640	24270056732.250	107.872	
	3	1444.200	153057	221044919.400	2085713.640	23426445249.000	105.980	
2000	1	1925.600	205262	395252507.200	3707935.360	42132488644.000	106.596	1.58E-01
	2	1925.600	203842	392518155.200	3707935.360	41551560964.000	105.859	
	3	1925.600	205046	394836577.600	3707935.360	42043862116.000	106.484	
Σ(sumatoria)		14730.840	1577531	2228461304.540	20884945.915	237808034364.250	1621.264	4.91E+00
Promedio		982.056	105168.70	Promedio			108.084	9.81E-01
				D.E.			1.804	7.12E-01

Fuente: Registro de investigación propios

Observamos en la figura N°3.4 el cromatograma de los tiempos de retención de Ciprofloxacino y Tetraciclina a diferentes concentraciones.

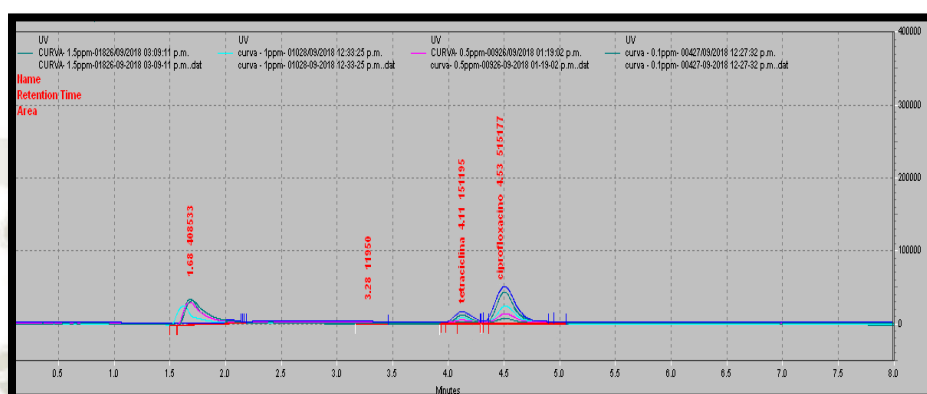


Figura 3. 4 Picos de Ciprofloxacino y Tetraciclina a diferentes concentraciones.

2.2 PRECISIÓN

Después de la linealidad se procedió a determinar la precisión con las condiciones establecidas en el capítulo II de este proyecto. La USP-40 (53) considera que la repetibilidad se evalúe utilizando un mínimo de nueve determinaciones y señala un CV% no más del 2 %, inyectando 9 veces la extracción de la solución estándar.

2.2.1 PRECISIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL CIPROFLOXACINO

La precisión del método se realizó conforme lo descrito en la parte de materiales y métodos de la investigación. Bajo este procedimiento se extrajo nueve veces la misma muestra de leche de vacuno con una concentración de 1000 µg/L de Ciprofloxacino, estas muestras fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuestas áreas respectivas para cada muestra.

La evaluación de la precisión del método se hizo en atención al cálculo de la media, la desviación estándar y la relación entre ambos, es decir, la desviación

estándar relativa (DSR) o coeficiente de variabilidad (CV). Estos resultados son ofrecidos en la Tabla N°3.6.

Tabla N° 3. 6 Determinación de la Precisión (Áreas y Concentraciones) para el estándar Ciprofloxacino

Repeticiones	Área	µg/L
1	360011	994.440
2	360123	994.750
3	359921	994.190
4	359940	994.240
5	359796	993.840
6	359945	994.250
7	359738	993.910
8	360040	994.520
9	360017	994.450
Promedio	359837	993.955
D.E.	421.973	1.171
C.V. %	0.118	0.118

Fuente: Registro de investigación propios

La tabla N°3.6 ofrece los resultados del coeficiente de variabilidad para la precisión del método analítico que se expresa como las desviación estándar relativa o coeficiente de variación, de las mediciones realizadas se obtuvo un valor de 0.118% como coeficiente de variación, el cual indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentra con un grado de dispersión de 0.118%.

Según la USP-40 establece que el valor de coeficiente de variación 0.118% es aceptable ya que el límite para esta ocasión fluctúa menor al 2 % por lo tanto se encuentra que el método es preciso para Ciprofloxacino. (53)

2.2.2 PRECISIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TETRACICLINA

Se realizó como mínimo nueve extracciones de una misma muestra de leche de vacuno para poder evaluar la repetibilidad del método para Tetraciclina. Bajo este procedimiento se extrajo la muestra de leche de vacuno con una concentración de 1000 µg/L, después de haberse realizado las nueve extracciones las muestras fueron inyectadas al equipo para obtener las áreas respectivas.

La evaluación de la precisión del método se hizo en atención al cálculo de la media y la desviación estándar y la relación entre ambos, es decir, la desviación estándar relativa o coeficiente de variabilidad.

La tabla N°3.7 muestra los resultados de los coeficientes de variabilidad para la precisión del método analítico, obteniéndose un coeficiente de variación de 0.350%. El límite de repetibilidad, que también indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentra con un grado de 0.350% de dispersión.

Tabla N° 3. 7 Determinación de la Precisión (Áreas y Concentraciones) para el estándar Tetraciclina

Repeticiones	Área	µg/L
1	101393	982.940
2	101304	982.070
3	101207	981.120
4	101291	981.940
5	100999	979.070
6	101195	981.000
7	101281	981.840
8	101292	981.090
9	101285	981.110
Promedio	101154	980.59
D.E.	346.128	3.400
C.V. %	0.342	0.350

Fuente: Registro de investigación propios

Según la USP-40 el valor de 0.350% de dispersión es aceptable ya que el límite para esta ocasión es C.V menor al 2 % por lo tanto se encuentra que el método es preciso. (53)

2.3 EXACTITUD

Para determinar la exactitud se consideró nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración según la USP-39. (54)

2.3.1 EXACTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DEL CIPROFLOXACINO

La evaluación de la exactitud se realizó mediante el método de enriquecimiento de la muestra con la adición de concentraciones conocidas del estándar de Ciprofloxacino, conforme se detalló en materiales y método. Bajo este procedimiento se realizaron las extracciones de la muestras sin fortificar, las tres extracciones de las muestras fortificadas y las extracciones de los estándares.

Se obtuvieron como respuestas las áreas que están detalladas en la tabla N°3.8, así como las respectivas concentraciones en $\mu\text{g/L}$ que corresponde a cada muestra. Cada muestra fortificada y sin fortificar se inyectó al equipo por triplicado.

Tabla N° 3. 8 Datos de las Muestras fortificadas con Ciprofloxacino

Área	Muestra (M)	M + 300 $\mu\text{g/L}$	M + 1000 $\mu\text{g/L}$	M + 1700 $\mu\text{g/L}$
Área 1	51717	168441	440125	700635
Área 2	51730	161928	439658	697686
Área 3	51781	167872	439279	686945

Fuente: Registro de investigación propios

Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación conforme el método descrito. Con este fin primero se calcularon las áreas experimentales netas, de las tres concentraciones evaluadas, y luego se halló las respuestas verdaderas, interpolando en la ecuación de regresión lineal de la exactitud del método para las tres concentraciones en evaluación, siendo así los datos de los estándares extraídos se muestran en la tabla N°3.9.

Tabla N°3.9 Datos del estándar extraído por el método para la exactitud

Concentración (µg/L)	Área 1	Área 2	Área promedio
300	108063	108487	108275
1000	362205	363243	362724
1700	612075	613891	612983

Fuente: Registro de investigación propios

Tabla N° 3. 10 Porcentaje de recuperación del método para Ciprofloxacino

Concentración (µg/L)	N° Réplicas	Área Neta	Área Teórica	Porcentaje de recuperación (%R)
300	1	116724	116841	99.900
	2	110198	116841	94.315
	3	116091	116841	99.358
1000	1	388408	387552	100.221
	2	387928	387552	100.097
	3	387498	387552	99.986
1700	1	648918	658263	98.580
	2	645956	658263	98.130
	3	635164	658263	96.491
			Promedio	98.564
			D.E.	1.888
			C.V. %	1.915

Fuente: Registro de investigación propios

La tabla N° 3.10 muestran los porcentajes de recuperación de las tres réplicas de concentraciones estos porcentajes se ubican muy poco distantes del 100%, sin embargo, la muestra estuvo conformada por leche proveniente de tanque de recolección de este producto lácteo, esto es, se trata de un producto cuyo contenido del analito es errático, eso a diferencia del contenido de antimicrobianos presentes en formas farmacéuticas como por ejemplo soluciones parenterales, en donde es uniforme y constante. Por lo que para efectos de este estudio se debe aceptar márgenes amplios, cuando se trata de matrices de composición compleja cualitativa y cuantitativamente como son las leches de vacuno. (54)(55)

Los datos y resultados obtenidos en la determinación de la exactitud, fueron evaluados por medio de la prueba tabla t_{student} , para comprobar que el valor medio no difiere significativamente del aceptado como referencia.

Obteniendo como resultado un valor $t_{\text{experimental}}$: 2.249 y encontrándose como un valor t_{tabla} : 2.306 para 8 ($9-1=8$) grados de libertad, con un nivel de confianza de 95%.

Se observa en la tabla N°3.11 que el $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , demostramos que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% siendo la exactitud apropiada la media del porcentaje de recuperación de la metodología fue 98.564%. Se determinó un coeficiente de variación de 1.915%, indicando el grado de dispersión del conjunto de datos respecto a su media.

Según la AOAC la recuperación de 98.564% del antimicrobiano podría ser un resultado aceptable, ya que se ubica dentro del rango (80 – 110%) como se observa en la tabla N°3.16.

**Tabla N° 3. 11 Prueba t para el porcentaje de recuperación del estándar
Ciprofloxacino**

N° Rep:	9.000
GL=	8.000
Significancia	0.050
Valor t tablas=	2.306
t_{exp}	2.249

Fuente: Registro de investigación propios

2.3.2 EXACTITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TETRACICLINA

La evaluación de la exactitud se realizó mediante el método de enriquecimiento de la muestra con la adición de concentraciones conocidas del estándar de Tetraciclina, conforme se detalló en la parte de materiales y métodos de la presente investigación. Bajo este procedimiento se preparó y añadió tres concentraciones de soluciones stock de 300, 1000 y 1700 $\mu\text{g/L}$ del estándar de Tetraciclina. Cada muestra fortificada y sin fortificar se inyectó al equipo por triplicado. Como se muestra en la tabla N°3.12.

Tabla N° 3. 12 Datos de las muestras fortificadas con Tetraciclina

Área	Muestra (M)	M + 300 $\mu\text{g/L}$	M + 1000 $\mu\text{g/L}$	M + 1700 $\mu\text{g/L}$
Área 1	65840	95646	167347	235421
Área 2	66902	95689	169016	234411
Área 3	64660	94425	166766	233650

Fuente: Registro de investigación propios

Posteriormente se calculó el porcentaje de recuperación conforme el método descrito. Con este fin primero se calcularon las áreas experimentales netas, para las tres concentraciones diferentes, y luego se halló las respuestas verdaderas, interpolando en la ecuación de regresión lineal que se halló para la exactitud del método, siendo así, los datos de los estándares extraídos se muestran en la tabla N°3.13.

Tabla N°3.13 Datos del estándar extraído por el método para la exactitud

Concentración (µg/L)	Área 1	Área 2	Área promedio
300	31248	30951	31100
1000	104285	105243	104764
1700	178075	176891	177483

Fuente: Registro de investigación propios

En la tabla N° 3.14 muestran los porcentajes de recuperación de las tres réplicas de las tres concentraciones, estos porcentajes se ubican muy poco distantes del 100%. Los datos muestran que se determinó un coeficiente de variación de 1.919%, indicando el grado de dispersión del conjunto de datos respecto a su media.

Tabla N° 3. 14 Porcentaje de recuperación del método para Tetraciclina

Concentración (µg/L)	N°Replicas	Área Neta	Área Teórica	Porcentaje de recuperación (%R)
300	1	29806	30591	97.434
	2	28787	30591	94.103
	3	29765	30591	97.300
1000	1	101507	101711	99.800
	2	102114	101711	100.396
	3	102096	101711	100.379
1700	1	169581	172831	98.120
	2	167509	172831	96.921
	3	168990	172831	97.778
			Promedio	98.026
			D.E.	1.881
			C.V.%	1.919

Fuente: Registro de investigación propios

La recuperación de Tetraciclina fue de 98.026%, según la AOAC también se ubica dentro del rango (80 – 110%).

El porcentaje de promedio, podría considerarse satisfactoria, sin embargo, se requiere una prueba t para verificar esta exactitud, tal como se describió en el apartado metodológico capítulo II, se calcula la $t_{\text{experimental}}$, y se halla el t_{tabla} para n-1 grados libertad a un nivel de confianza del 95%. A continuación, tabla N° 3.15.

Tabla N° 3. 15 Prueba t para el porcentaje de recuperación del estándar Tetraciclina

N° Rep:	9.000
GL=	8.000
Significancia	0.050
Valor t tablas=	2.306
t_{exp}	2.289

Fuente: Registro de investigación propios

Para la prueba t de Student se observa que el $t_{\text{experimental}}$ es de 2.289 menor al t_{tabla} para 8 ($9-1=8$) grados de libertad con un nivel de confianza de 95%. Por lo tanto se concluye que no existe diferencia significativa entre la recuperación medio y el 100%, siendo la exactitud apropiada la media del porcentaje de recuperación del método analítico fue 98.026%.

Según la AOAC la recuperación de 98.026% del antimicrobiano podría ser un resultado favorable, ya que se ubica dentro de los rangos (80 – 110%) como se observa en la tabla N°3.16.

Tabla N° 3. 16 La recuperación prevista como una función de la concentración del principio activo

Unidad	Rango aceptable %
100 % - 10%	98-102
1%	97-103
0.1%	95-105
100 ppm (mg/Kg) - 10 ppm (mg/Kg)	97-103
1 ppm (mg/Kg) - 100 ppb (µg/Kg)	80-110
10 ppb (µg/Kg)	60-115
1ppb(µg/Kg)	40-120

FUENTE: AOAC internacional (56)

2.4 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

2.4.1 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL CIPROFLOXACINO

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizó conforme el método descrito, utilizando la información proveniente del promedio de las tres repeticiones realizadas para la linealidad, construyendo también la curva de calibración promedio. Estas áreas promedio son las siguientes.

Tabla N° 3.17 Datos para determinar la linealidad promedio de las tres repeticiones del Ciprofloxacino

Conc. µg/L	Prom Rep 1 (área)	Prom Rep 2 (área)	Prom Rep 3 (área)	Promedio (área)	D.S.
100	36895	36288	37069	36750.677	410.017
500	179523	183428	183409	182120.000	2249.088
1000	359807	358985	358985	362277.333	5007.511
1500	544151	547763	547763	544330.000	3346.631
2000	715278	725278	725278	720636.333	5038.374

Fuente: Registro de investigación propios

La tabla N° 3.17 tiene los siguientes datos: en el eje “x” (concentración): 100, 500, 1000 y 1500 y 2000 µg/L y en el eje “y” (desviación estandar): 410.018, 2249.088, 5007.511, 3346.631, 5038.374 respectivamente.

De esta forma se reemplaza los valores calculados con la fórmula mostrada en el capítulo II y se calcula, los valores de “a”, “b”, LOD y LOQ, para este ensayo.

Posteriormente se confeccionó con los datos de la desviación estándar para cada concentración, una curva y su respectiva ecuación de regresión lineal.

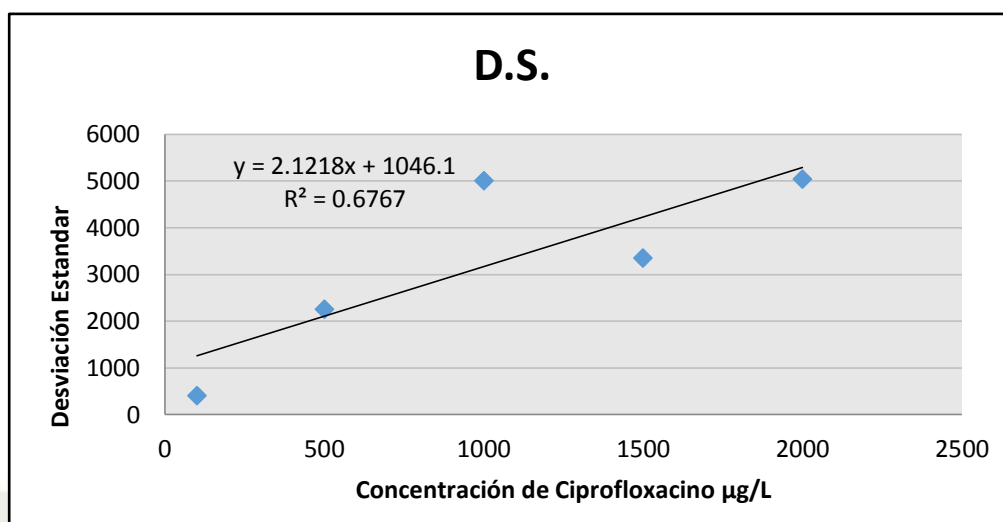


Figura 3. 5 Desviación estándar versus concentración de Ciprofloxacino.

La ecuación de regresión lineal para la desviación estándar vs concentración queda como sigue:

$$y = 1046.1 + 2.1218 x$$

Reemplazando en esta ecuación para una desviación estándar a concentración cero (0) se halla el valor de S_B de:

$$S_B = 1046.1$$

Con los valores de Y_B y S_B reemplazando en la fórmula descrita anteriormente se tiene los valores de límite de detección y cuantificación.

$$\text{Límite de detección} = 5.925 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 15.003 \mu\text{g/L}$$

Según Ibarra Samuel en su trabajo Aplicación de extracción en fase sólida magnética acoplada a sistemas de separación instrumental para el análisis de residuos de antibióticos en leche entre ellos Ciprofloxacino, en dicho trabajo resalta la validación de los métodos, en cuanto a su límite de cuantificación para

Ciprofloxacino obtuvo 30 µg/L, en comparación a este trabajo que obtuvo 15.003 µg/L. En ambos trabajos se observa resultados válidos. (57)

2.4.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINA

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizó conforme el método descrito, utilizando la información proveniente del promedio de las tres repeticiones realizadas para la linealidad, construyendo también la curva de calibración promedio. Estas áreas promedio son las siguientes.

Tabla N° 3.18 Datos para determinar la linealidad promedio de las tres repeticiones de la Tetraciclina

Conc µg/L	Prom Rep 1 (área)	Prom Rep 2 (área)	Prom Rep 3 (área)	Promedio (área)	D.S.
100	10616	10497	10716	10609.677	109.637
500	52146	52146	52780	52532.333	338.984
1000	105517	104025	103763	104435.000	946.152
1500	151806	155789	153057	153550.670	2036.873
2000	205262	203842	205046	204716.677	765.144

Fuente: Registro de investigación propios

La tabla N° 3.18 tiene los siguientes datos: en el eje “x” (concentración): 100, 500, 1000 y 1500 y 2000 µg/L y en el eje “y” (desviación estandar): 100.637, 338.984, 946.152, 2036.873, 765.144 respectivamente.

De esta forma se reemplaza los valores calculados en la fórmula mostrada en el capítulo II inicio y se calcula, los valores de “a”, “b”, LOD y LOQ, para este ensayo.

Con esta información se encontró la ecuación de regresión lineal:

$$y = 101.889 x + 1241.895$$

El valor de Y_B se obtiene reemplazando en la ecuación considerando como valor de concentración a cero (0), y el b toma el valor de la pendiente de la curva.

$$Y_B = 1241.895$$

$$b = 101.889$$

Posteriormente se confeccionó con los datos de la desviación estándar para cada concentración, una curva y su respectiva ecuación de regresión lineal. Figura 3.6

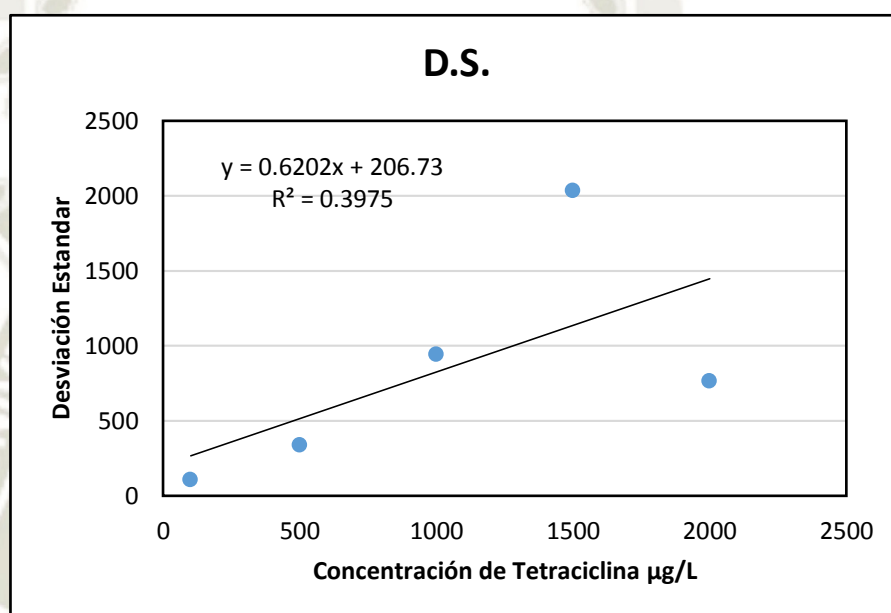


Figura 3. 6 Desviación estándar versus concentración de Tetraciclina.

La ecuación de regresión lineal para la desviación estándar vs concentración queda como sigue:

$$y = 0.6202 x + 206.73$$

Reemplazando en esta ecuación para una desviación estándar a concentración cero (0) se halla el valor de S_B de:

$$S_B = 206.73$$

Con los valores de Y_B y S_B reemplazando en la fórmula descrita en el capítulo anterior se tiene los valores de límite de detección y cuantificación.

$$\text{Límite de detección} = 8.173 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 14.525 \mu\text{g/L}$$

Comparando los resultados con Ibarra Samuel (58) Aplicación de extracción en fase solida magnética acoplada a sistemas de separación instrumental para el análisis de residuos de antibióticos en leche entre ellos Tetraciclina, obtuvo como límite de cuantificación 27 $\mu\text{g/L}$ resaltando en su validación del método, en comparación a nuestro método que nos da un límite de cuantificación de 14.525 $\mu\text{g/L}$, siendo favorable ambos resultados.

3. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CIPROFLOXACINO Y TETRACICLINA EN LAS MUESTRAS DE LECHE

Para la determinación y cuantificación de Ciprofloxacino y Tetraciclina se procedió a la toma de las muestras de leche previa coordinación con los encargados y/o propietarios de los establos, esta toma fue conforme el método descrito, y se les asigno un código, con la finalidad de no tener sesgos en la interpretación de resultados. Figura 3.7



Figura 3. 7 Codificación de las muestras.

La tabla N°3.19 recoge los códigos asignados a las muestras según la fecha de colecta, como se aprecia en el cuadro se trabajó con 20 muestras provenientes de establos diferentes.

Tabla N° 3. 19 Codificación de las muestras de leche de vacuno evaluadas

Código	Fecha de colecta
M - 01	10/09/18
M - 02	11/09/18
M - 03	14/09/18
M - 04	18/09/18
M - 05	19/09/18
M - 06	23/09/18
M - 07	23/09/18
M - 08	24/09/18
M - 09	27/09/18
M - 10	27/09/18
M - 11	28/09/18
M - 12	28/09/18
M - 13	03/10/18
M - 14	04/10/18
M - 15	04/10/18
M - 16	10/10/18
M - 17	10/10/18
M - 18	11/10/18
M - 19	21/10/18
M - 20	22/10/18

Fuente: Registro de investigación propios

3.1. CUANTIFICACIÓN DE CIPROFLOXACINO

Tabla N° 3. 20 Concentración en $\mu\text{g/L}$ del contenido de Ciprofloxacino en las muestras de leche de vacuno

Muestra	Área Rep1	Área Rep2	Cc. Prom $\mu\text{g/L}$	D.S.	C.V.
M-01	9854	9855	84.529	0.007	0.821%
M-02	7602	7600	62.412	0.014	2.224%
M-03	4530	4529	32.266	0.007	2.151%
M-04	8526	8527	71.495	0.007	0.971%
M-05	9805	9801	84.024	0.028	3.304%
M-06	4519	4520	32.168	0.007	2.157%
M-07	11825	11836	103.923	0.076	7.346%
M-08	15646	15641	141.346	0.035	2.455%
M-09	5993	5997	46.650	0.028	5.951%
M-10	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-11	15018	15012	135.177	0.042	3.080%
M-12	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-13	9277	9278	78.866	0.007	0.880%
M-14	10784	10785	93.657	0.007	0.741%
M-15	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-16	12352	12355	109.056	0.021	1.909%
M-17	10808	10805	93.873	0.021	2.218%
M-18	6988	6987	56.391	0.007	1.231%
M-19	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-20	9735	9737	83.366	0.014	1.665%

Fuente: Registro de investigación propios

La tabla N°3.20 ofrece los resultados para la concentración de Ciprofloxacino en μg calculada utilizando la ecuación de regresión. Se observa que el mayor nivel de concentración corresponde a la muestra M-11 con 135.177 $\mu\text{g/L}$; como nivel de

concentración más bajo de Ciprofloxacino tenemos a la muestra M-06 con 32.168 $\mu\text{g/L}$ del antibacteriano, también no se detectó trazas de Ciprofloxacino en las muestras codificadas como M-10, M-12, M-15 y M-19 por el método analítico.

Además, esta misma tabla muestra el coeficiente de variabilidad, se calculó este valor para verificar la variación entre el resultado de la concentración de la muestra y contra muestra, como se observa en todos los casos los coeficientes de variabilidad no son mayores a 2%.

3.2. CUANTIFICACIÓN DE TETRACICLINA

La tabla N°3.21 ofrece los resultados para la concentración en $\mu\text{g/L}$ calculada utilizando la ecuación de regresión. Se observa que el mayor nivel de concentración de tetraciclina corresponde a la muestra M-11 con 134.765 $\mu\text{g/L}$, como nivel de concentración más bajo de tetraciclina tenemos a la muestra M-16 con 49.182 $\mu\text{g/L}$ del antibacteriano, cabe notar que las muestras codificadas como M-10, M-15 y M-19 no se detectó la presencia de Tetraciclina por el método bajo estudio.

Del mismo modo que el anterior se realizó el cálculo del coeficiente de variabilidad, se calculó este valor para verificar la variación entre el resultado de la concentración de la muestra y contra muestra, como se observa en la tabla N°3.21 los coeficientes de variabilidad son aceptables.

Finalmente se procedió a establecer si la concentración de trazas de Ciprofloxacino y de Tetraciclina hallados en las muestras de leche de vacuno, mediante el método estandarizado que utiliza Cromatografía Líquida de Alta Resolución, se encuentran dentro de los límites máximo permisibles, que es de 100 $\mu\text{g/L}$, establecido por la norma técnica sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano NTS N° 120 MINSA/DIGESA en el Perú.

Tabla N° 3. 21 Concentración en $\mu\text{g/L}$ del contenido de Tetraciclina en las muestras de leche de vacuno

Muestra	Área Rep1	Área Rep2	Cc. Prom $\mu\text{g/L}$	D.S.	C.V.
M-01	10709	10705	92.896	0.028	2.988%
M-02	6602	6600	52.597	0.014	2.639%
M-03	14543	14544	130.550	0.007	0.532%
M-04	7566	7567	62.073	0.007	1.118%
M-05	12705	12701	112.486	0.028	2.468%
M-06	7897	7895	65.307	0.014	2.125%
M-07	10653	10656	92.381	0.021	2.254%
M-08	11646	11641	102.088	0.035	3.399%
M-09	8993	8991	76.064	0.014	1.825%
M-10	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-11	14974	14972	134.765	0.014	1.030%
M-12	7306	7305	59.512	0.007	1.166%
M-13	9035	9038	76.501	0.021	2.722%
M-14	14733	14735	132.420	0.014	1.048%
M-15	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-16	6252	6254	49.182	0.014	2.822%
M-17	11996	11995	105.542	0.007	0.658%
M-18	9289	9287	78.969	0.014	1.758%
M-19	0	0	0.000	0.000	0.000%
M-20	6785	6787	54.413	0.014	2.551%

Fuente: Registro de investigación propios

La figura N°3.8 describe la comparación entre las muestras y el valor máximo permisible de Ciprofloxacino, en donde el valor mayor fue de 141.346 $\mu\text{g/L}$ perteneciente a la muestra M-08, y el valor mínimo fue de 32.168 $\mu\text{g/L}$ de la muestra M-06.

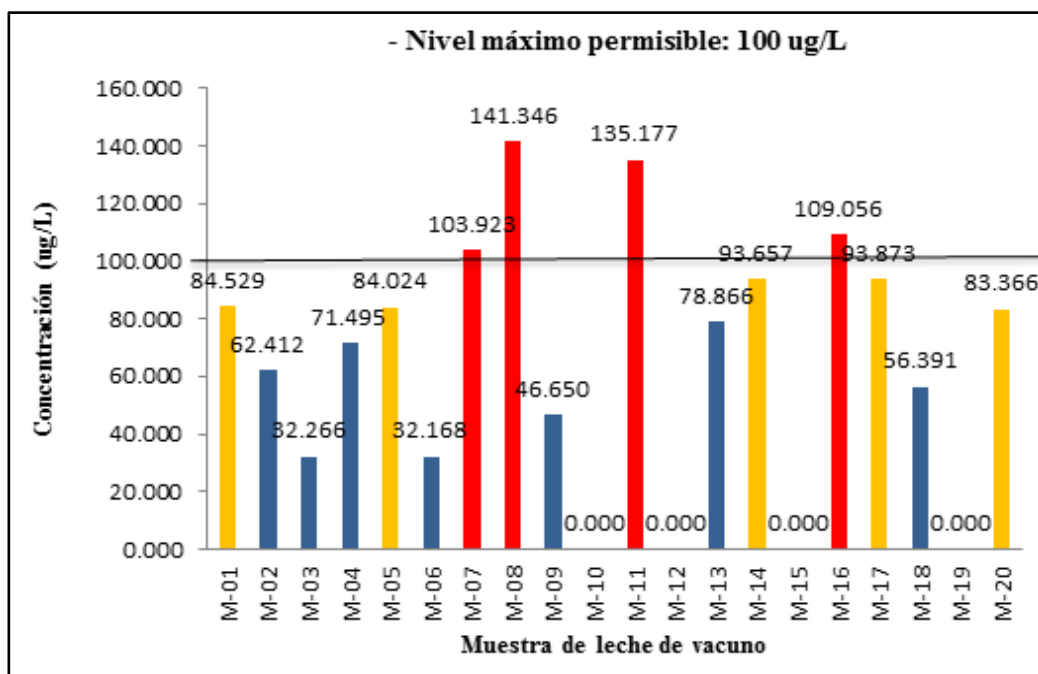


Figura 3. 8 Comparación de muestras de leche que contienen Ciprofloxacino.

En la figura N° 3.9 la Tetraciclina mostró datos que sobrepasan el nivel máximo permisible, teniendo como concentración máxima 134.765 $\mu\text{g/L}$ de la muestra M-11 y el valor mínimo fue de 49.182 $\mu\text{g/L}$. que pertenece a la M-16.

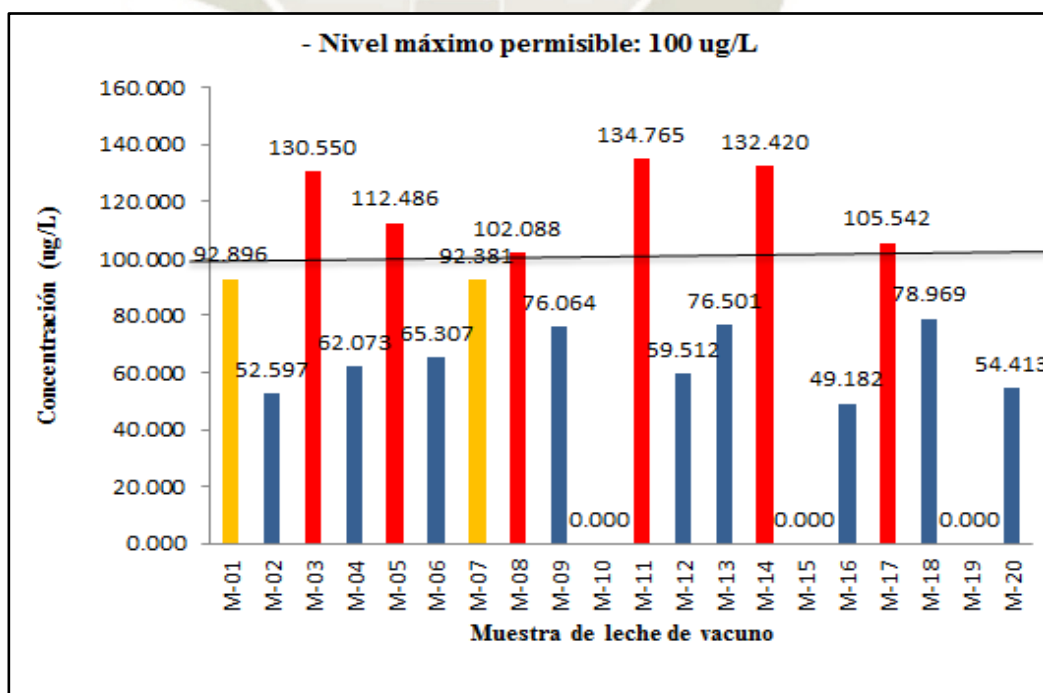


Figura 3. 9 Comparación de muestras de leche que contienen Tetraciclina.

Estos resultados indican que existe un alto número de animales que presentan residuos de antibióticos en leche, y que según el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) estos niveles encontrados superan los límites máximos permisibles de residuos de antimicrobianos Ciprofloxacino y Tetraciclina en leche, según las normas europeas. Esto significa que leche con residuos de antimicrobianos ingresa al tanque de producción de cada uno de los establos evaluados y que por tanto se está destinando al consumo humano leche contaminada con estos residuos. Además, se ha podido notar que dichos establos no realizan monitoreos para controlar la presencia de residuos en la leche de vacuno.

Hay varios trabajos de investigación relacionados a la detección de Ciprofloxacino y Tetraciclina no sólo por la técnica de HPLC, sino por otras técnicas como magnetoinmunosensor amperométrico desechable para la determinación de residuos de Tetraciclina en leche, empleando un anticuerpo selectivo frente a esta familia de antibióticos. (59) Se seleccionó un esquema de tipo competitivo directo, en el que las Tetraciclina en la disolución analizada compiten con una concentración fija del trazador enzimático TC-HRP por los sitios de enlace antigénico de los anticuerpos. También se empleó la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución con detector de arreglo de diodos para la determinación de 11 sulfonamidas, 14 quinolonas entre ellas ciprofloxacino en agua mineral y agua de lluvia donde se utilizó una columna Hypersil Gold C18(100x2.1 mm, 1.9 μ m) (60).

En Perú se realizó un estudio de Frecuencia de tetraciclinas en leche fresca en la Cuenca de Arequipa, las muestras se analizaron con la prueba cualitativa CH ATK microplate P&S (COPAN, Italia) donde se obtuvo una frecuencia de 61.6% para tetraciclinas. El estudio demostró que los antibióticos pertenecientes al grupo de tetraciclinas son una importante fuente de contaminación de leche fresca en la cuenca lechera de Arequipa (61). Otro estudio donde las muestras se sometieron a una prueba rápida para detección de residuos de antibióticos con el dispositivo Beta Star se encontró que el 73.9% corresponde a Tetraciclinas siendo la familia de las Tetraciclinas la de mayor presencia. Los trabajos mencionados muestran datos

semejantes a los de esta investigación, teniendo cada uno su método y análisis de datos respectivos, basándonos principalmente en la determinación y cuantificación de Tetraciclina y Ciprofloxacino, en una nuestra investigación trabajamos ambos analitos con la nueva metodología desarrollada. (62)



CONCLUSIONES

Primera

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron: Tiempo de estabilización 20 min, flujo, 1 mL/min., longitud de onda 280 nm. y tiempo de corrida de 10 min. En cuanto a las fases móviles fue de acetonitrilo y Solución C (ácido fosfórico 0.025 M pH 3.0 ± 0.1 , en una proporción de 13:87 partes respectivamente.

Segunda

Se estandarizó el método para determinar y cuantificar trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dando como resultado $R^2=0.9998$ de linealidad tomando puntos de 100 µg/L, 500 µg/L, 1000 µg/L, 1500 µg/L y 2000 µg/L para la curva de calibración, una precisión con CV% de 0.118%, la exactitud obtuvo como recuperación 98.564% para Ciprofloxacino, un LDD de 5.925 µg/L y LDC de 15.003 µg/L. Del mismo modo para la tetraciclina presentando un $R^2= 0.9997$ de linealidad, CV%= 0.350 %, porcentaje de recuperación de 98.026 %, LDL de 8.173 µg/L y LDC de 14.525 µg/L datos aceptables por la USP 40 y AOAC.

Tercera

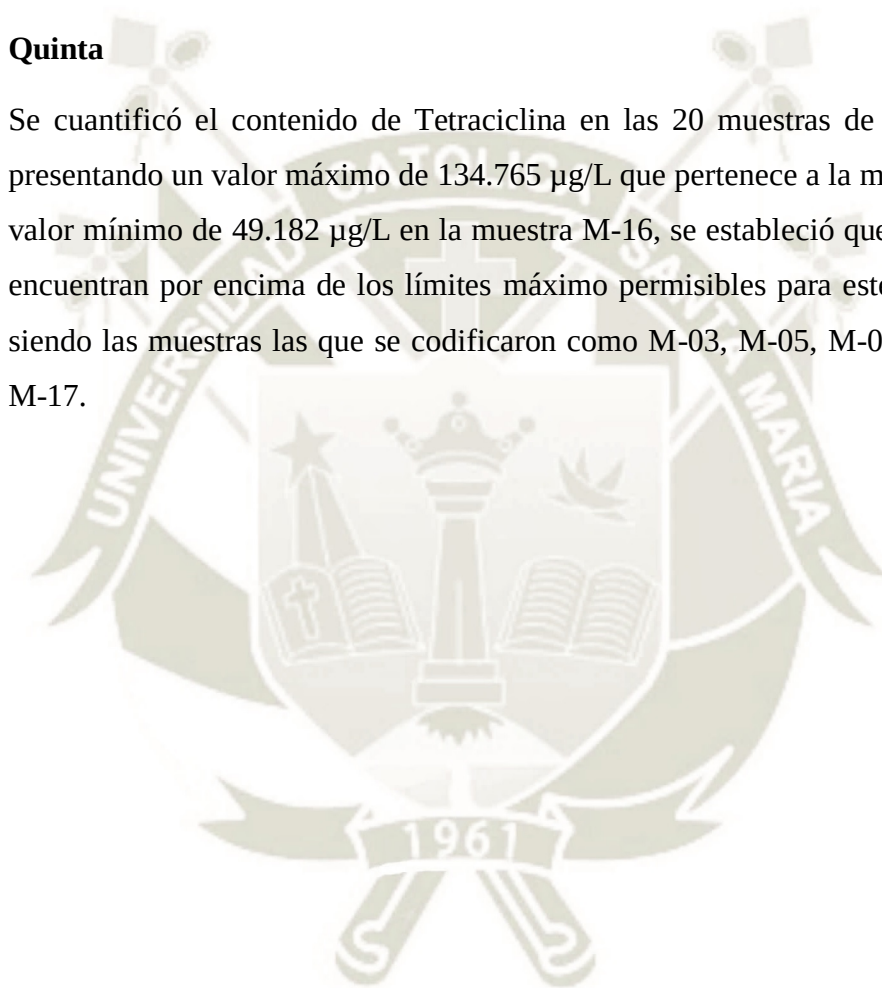
Se desarrolló la metodología analítica para determinar la concentración de trazas de Ciprofloxacino y Tetraciclina con el método ya estandarizado que utiliza cromatografía líquida de alta resolución en leche de vacuno al cual se le aplicó limpieza, extracción y concentración de los analitos, a muestras provenientes de 20 establos diferentes que desarrollan sus actividades de producción lechera en la ciudad de Arequipa. Demostrando ser un método rápido, eficaz y factible a diferencia de otras metodologías.

Cuarta

Se cuantificó el contenido de Ciprofloxacino en las 20 muestras de leche de vacuno presentando un valor máximo de 141.346 $\mu\text{g/L}$ de la muestra M-08 y un valor mínimo de 32.168 $\mu\text{g/L}$ de la muestra M-06 casi indetectable, se estableció que cuatro muestras se encuentran por encima de los límites máximos permisibles para este antimicrobiano, siendo las muestras las que se codificaron como M-07, M-08, M-11 y M-16.

Quinta

Se cuantificó el contenido de Tetraciclina en las 20 muestras de leche de vacuno presentando un valor máximo de 134.765 $\mu\text{g/L}$ que pertenece a la muestra M-11 y un valor mínimo de 49.182 $\mu\text{g/L}$ en la muestra M-16, se estableció que seis muestras se encuentran por encima de los límites máximo permisibles para este antimicrobiano, siendo las muestras las que se codificaron como M-03, M-05, M-08, M-11, M-14 y M-17.



SUGERENCIAS

Primera

Determinar las concentraciones de Ciprofloxacino y Tetraciclina en derivados de leche mediante el método validado que utiliza cromatografía líquida de alta resolución.

Segundo

Determinar las concentraciones de otros antibacterianos utilizados en veterinaria que se encuentren presentes en leche, utilizando métodos validados mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Tercero

Realizar un estudio bromatológico de la leche de vacuno a fin de verificar otras características de calidad de este tipo de producto.

Cuarto

Realizar un seguimiento de salud pública que impliquen la utilización de antimicrobianos en las ganaderías de la Ciudad de Arequipa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Greenlees KJ, Friedlander LG, Boxall A. Antibiotic residues in food and drinking water, and food safety regulations, Food and Agricultural Immunology. T and FO. [Internet]. 2015 [6 enero 2018]. v. 26(6): p 821-834. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540105.2015.1036357>.
2. Codex Alimentarius [Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura]. Leche y Productos Lácteos, 2ª ed. Roma, 2011: p 217.
3. Alvarado - Ortiz C, Blanco. Cronología de los Alimentos en el mundo. T. Alimentos Bromatología. v. 1(1): 2ª ed. Lima: Ediciones UPC. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2008.
4. Primo YE. Química de los Alimentos. v. 1(1). Edición Madrid. España: Editorial Síntesis, S.A, 1997.
5. Kuklinski C. Nutrición y bromatología. v. 1(1). Edición Abebooks. España: Editorial Omega; 2003.
6. Cadavid G. J. Granja Integral Autosuficiente. v. 1(1). Edición Colombia, Editorial. Colombia: Editorial Grania Ltda; 2010.
7. Obregón M. Presencia de Residuos de antibióticos y su relación con las propiedades fisicoquímicas de la leche fresca de los comités del programa del vaso de leche de los distritos de San Jerónimo y Andahuaylas. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional José María Arguedas; 2017.
8. Carrazco J, Obando A. Determinación de residuos de antibióticos y peróxidos de hidrogeno en leche fresca comercializada en el distrito de Chiclayo. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2013.
9. Salas P, Calle S. Determinación de Residuos de Antibióticos Betalactámicos Mediante un Ensayo Inmunoenzimático en Leche de vacas tratadas contra Mastitis. Rev Inv Vet. 2013; v. 24(2): 252-255.
10. Giménez A. Desarrollo y Validación de un Método Analítico de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Detección por Espectrometría de Masas para la

Determinación de Antiinflamatorios No Esteroides en Leche y Tejido Muscular de Origen Animal. . [Tesis]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2012.

11. Sánchez AI. Calidad Higiénico Sanitaria de la Leche de vaca en los Establos de la Cuenca Lechera de La Libertad. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.

12. Korolkovas A, Burckhalter JH. Compendio esencial de química farmacéutica. V. 1(1). 1ªed. Barcelona: Editorial Reverté; 1978.

13. Katzung G. Farmacología Básica y Clínica. v. 12(1). 12ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2013.

14. USP, The United States Pharmacopeia -40-NF35 The National Formulary, Chapter<2747>, 2017

15. Sumano HS, Ocampo L. Farmacología veterinaria. v. 3(1). 3ª. ed. México: Editorial MC Graw Hill; 2006.

16. Pascuzzo - Lima C, Farmacología Básica. v. 4(1); 1ª ed. Lima : Editorial Carmine Pascuzzo; 2008.

17. Sumano HS, Ocampo L, Farmacología veterinaria; v. 3(1). 3ª ed. México: Editorial MC Graw Hill; 2006.

18. Alagarsamy V, Textbook of Medicinal Chemistry; v. 2(1). 2ª ed. India: Editorial Elsevier; 2013.

19. USP, The United States Pharmacopeia -40-NF35 The National Formulary, Chapter<2702>, 2017

20. Hassouan M, Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal. [Tesis]. v. 2(1). Granada. Universidad de Granada; 2014.

21. Zurich Z, Lázaro. Mastitis bovina: Análisis actualizado de la terapia sistémica y sus bases farmacológicas. [Tesis]. Chile: Universidad de Chile; 1992.

22. Majdi N , Al-Hasan, Wilson J. Isolation and purification procedure of B-lactam, aminoglycoside, chloramphenicol, fluoroquinolone, macrolide and tetracycline antibiotics from biological materials. P. M .C. 2009; v. 53(4): p 1386-1394.

23. Schenck FJ, Callery PS. Chromatographic Methods of Analysis of Antibiotics in Milk. N.C.B.I. 1998; v. 812(1-2): p 99-109.
24. Bossuyt R, Van Renterghem R, Waes G. Identification of antibiotic residues in milk by thin- layer chromatography. N.C.B.I. 1976; v. 124(1): p 37-42.
25. Moats WA, Romanowski RD: Multiresidue Determination of B-lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high- performance liquid chromatographic fractionation for clean up. N.C.B.I. 1998; v. 812(1-2): p 237-47.
26. Cinquina AL, Largo F, Anastasi G, Gianetti L: Cocción R. Journal of Chromatographic. N.C.B.I. 2003; v. 987(1-2): p 227-33.
27. Ding X, Mou S: Corregendum to Simultaneous determination of itraconazole, hydroxy itraconazole, keto itraconazole and N-desalquil itraconazole concentration in human plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. N.C.B.I. 2016; v.1020(1) p 111-9.
28. Helio AM, Kussumi TA, Wang AY, Hare DT: A Rapid Method to Determine Antibiotic Residues in Milk usind Liquid Chromatography Coupled to Electrospray tandem Mass Spectrometry. SCIELO. 2017; v.18(2). p 1678- 4790.
29. Azañero GP, Chiroque MA. Detección y Cuantificación de Residuos Antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima cercado. [Tesis]. Perú: Universidad Mayor de San Marcos; 2010.
30. Yu H., Mu H., Hu YM.; Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD. JPA. 2012; 2(1): 79-81.
31. Zavala CH. Caracterización de compuestos livianos de petróleo y pesticidas organoclorados por cromatografía de gases: Universidad Nacional de Ingeniería. Perú-Lima; 2012. p. 11.
32. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40). The National Formulary, Chapter<621> Cromatography. EEUU – 2017.
33. Kazakevich Y, Lobluto R. editors. HPLC for pharmaceutical Scientists. Vol 1. 1a ed. New Jersey: WILEY-INTERSCIENCE; 2007

34. Dong MW editors. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Vol 6. 1a ed. Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
35. Haddad PR, Poole CF, Riekkola M-L, editors. Liquid Chromatography-General instrumentation in HPLC. Vol 1. 2da ed. EEUU: Elsevier Academic Press; 2017.
36. Boysen RI, Hearn MTW. 9.02 - High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. Comprehensive Natural Products II. Oxford: Elsevier; 2010. p. 5-49
37. Esquivel Soto EE, Leal Guadarrama LI. Cromatografía de Fase Reversa. Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
38. Reagents PRAC-I. Reactivos para Cromatografía de Par Iónico. 2018.
39. Azañero GP.; Chiroque MA.; Detección y Cuantificación de Residuos Antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima cercado; Peru. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS; 2010. ANEXO II: Lista de sustancias farmacológicamente activas cuyos LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (modificación del 23.12.99 del R2377/90)
40. Inta.gob.ar (internet). Argentina: INTI; 2000 [actualizado abril 2005; citado 4 abr 2018]. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_inti_procedimiento_de_muestreo_leche.pdf
41. Patiño Herrera R, Quintana Hernández P. Química Analítica Cuantitativa. Teoría y Práctica. Vol 1. 1a ed. Buenos Aires: Materiales para la enseñanza; 2007.
42. Diacu E, Ene CP. Study of analytical parameters of the HPLC method for tartrazine and sunset yellow analysis in soft drinks. RevChim. 2010;61 (12):1177-82.
43. Quattrocchi O, Abelaira S, Felipe Laba R. Introduccion a la HPLC Aplicacion y Practica 1992.
44. Badii M, Castillo J, Rodríguez M, Wong A, Villalpando P. Experimental Designs and Scientific. ResearchGate. 2007; v. 4(2): p. 283-330.
45. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40). General Information volume , Chapter<3> Validation of Compendial Procedures, p.3706 - 3707. EEUU - 2017.

46. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40). General Information Validation of Compendial Procedures, p. 6903 - 6905. EEUU - 2017.
47. Hernández Hernández L, González Pérez C. Introducción al análisis instrumental. Vol 1. 1ª ed. Barcelona: Ariel S.A; 2002.
48. Choque Cerón LJ. Validación de una Técnica Analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), para la cuantificación de clorhidrato de clorhexidina + benzocaína + enoloxona en comprimidos orales. [Tesis]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.
49. Pacheco Torreblanca GJ. Evaluación de los niveles de Benzo pireno por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en pollos a la brasa. [Tesis maestría]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.
50. Mohammed KH. Desarrollo de Nueva Metodología Analítica para la Determinación de Quinolonas en Alimentos de Origen Animal. Tesis: Universidad de Granada; 2006 pág. 51
51. Esteban C, Rodrigues CA, de Souza Nascimento E. Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal. Universidad de Sao Paulo. vol 43 (Nº2). 2007; Pag 206-213.
52. Kassab NM, Kumar Singh A, Kedor- Hackmam ERM, Rocha Miritello Santoro MI. Quantitative determination of ciprofloxacin and norfloxacin in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. Universidad de Sao Paulo. 2005; vol 41(Nº4): p 508-511.
53. Hernández JM. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. S.E.Q.C. 2005; v. 8(1): p 49-62.
54. Esquivel EE. Cromatografía de Fase Reversa. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
55. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40) Monografías oficiales, p. 3371. EEUU – 2017.
56. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 39). Validación de Procedimientos Farmacopéicos. EEUU - 2016.

57. Épshtein NA. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. Vol 38. 4a ed. EEUU: Pharmaceutical Chemistry Journal, 2004.
58. Analysis AOMo. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.
59. Ibarra Ortega IM. Aplicación de extracción en fase solida magnética acoplada a sistemas de separación instrumental para el análisis de residuos de antibióticos en leche. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Repository. Uaeh. 2013; Pág. 90-91.
60. Ibarra Ortega IM. Aplicación de extracción en fase solida magnética acoplada a sistemas de separación instrumental para el análisis de residuos de antibióticos en leche. [Tesis].Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Repository. Uaeh. 2013; Pág. 125-126.
61. Fernandez FC. Bioplataformas electroquímicas para la detección de antibióticos en leche. [Tesis]. Universidad Complutense de Madrid. Repository Ucm; 2014
62. Herrera Herrera AV, Hernández BJ, Borges TM. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 75. 2013; Pag 130-137.
63. Ortiz C, Vera R, Cayro J. Frecuencia de β -lactámicos y tetraciclinas en leche fresca en la Cuenca de Arequipa. Rev. investig. vet. v.19 n.2. Perú Departamento de Campo; 2008.
64. Rodríguez Silva LA, Mendoza Zeledón GJ. Residuos de antibióticos (tetraciclinas y betalactámicos) en leche entera de acopios de Matiguás – Matagalpa, mediante la prueba de Beta Star Combo en el período de noviembre 2010 a abril 2011. [Tesis].Universidad Nacional Agraria Facultad de Ciencia Animal dpto. de veterinaria. Managua; 2011

ANEXOS

ANEXO 1: Norma Legal de Medicamentos Veterinarios en alimentos de consumo humano

PROYECTO DE NTS N°120 –MINSA/DIGESA-V.01

NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR) DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO

Tabla N° 4. 1 Límites Máximos de Residuos (LMR) de Medicamentos Veterinarios en Alimentos

ANTIMICROBIANOS				
PRINCIPIO ACTIVO	RESIDUO MARCADOR	ESPECIE ANIMAL	MATRIZ	LMR (µg/kg)
QUINOLONAS				
ENROFLOXA CIN	Suma de Enrofloxacin y de Ciprofloxacino	Bovinos/Ovinos/C aprinos	Músculo	100
			Grasa	100
			Hígado	300
			Riñón	200
			Leche (/L)	100
		Porcinos/Conejos	Músculo	100
			Grasa(piel en porcinos)	100
			Hígado	200
			Riñón	300
		Aves	Músculo	100
			Piel y grasa	100
			Hígado	200

			Riñón	300
		Peces	Músculo/piel(*)	100
TETRACICLINAS				
CHLORTETRA CICLINE/OXYT ETRACYCLINE /TETRACYCLI NE	CHLORTETRACI CLINE/OXYTET RACYCLINE/TE TRACYCLINE	Bovino	Leche (/L)	100
			Músculo	200
			Hígado	600
			Riñón	1200
		Cerdo	Hígado	600
			Riñón	1200
			Músculo	200
		Oveja	Músculo	200
			Leche (/L)	100
			Hígado	600
			Riñón	1200
		Aves	Músculo	200
			Riñón	1200
			Hígado	600
			Huevos	400
OXYTETRACY CLINE	OXYTETRACYC LINE	Peces y crustáceos	Músculo	200

CHLORTETRA CICLINE/ /TETRACYCLI NE	Suma de medicamento base y su 4-epimero	Peces	Músculo/piel(*)	100
---	---	-------	---------------------	-----

ANEXO 2.

Tabla N° 4. 2 Codificación de las muestras de leche de vacuno evaluadas

Código	Fuente de muestra	Fecha de colecta
M – 01	Rubén Cárdenas	10/09/18
M – 02	Agroindustria Ganadera Don Rómulo	11/09/18
M – 03	Santa Lucia	14/09/18
M – 04	José María Linares Díaz	18/09/18
M – 05	Industria Agropecuario Alto Cural	19/09/18
M – 06	Víctor Manuel	23/09/18
M – 07	Fundo la Inmaculada	23/09/18
M – 08	Ganadería JR	24/09/18
M – 09	Tres Molles	27/09/18
M – 10	San Antonio	27/09/18
M – 11	Chachani	28/09/18
M – 12	Santa Úrsula	28/09/18
M – 13	La Esperanza	03/10/18
M – 14	Hacienda Uyupampa S.A.C.	04/10/18
M – 15	R y R	04/10/18
M – 16	Valdivia	10/10/18
M – 17	La Perla H.G.	10/10/18
M – 18	Molle 2	11/10/18
M – 19	San Miguel	21/10/18

M – 20	F y F Corporación Láctea	22/10/18
--------	--------------------------	----------

FUENTE: Registro de investigación propios

ANEXO 3.

Tabla N° 4. 3 Concentraciones para la curva de calibración de Tetraciclina y Ciprofloxacino

	CONCENTRACIÓN
Solución stock	$\frac{1.25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 50000 \mu\text{g/L}$
Disoluciones para la curva de calibración	$\frac{50000 \mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{0.00001 \text{ L}}{0.005 \text{ L}} = 100 \mu\text{g/L}$
	$\frac{50000 \mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{0.00005 \text{ L}}{0.005 \text{ L}} = 500 \mu\text{g/L}$
	$\frac{50000 \mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{0.0001 \text{ L}}{0.005 \text{ L}} = 1000 \mu\text{g/L}$
	$\frac{50000 \mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{0.00015 \text{ L}}{0.005 \text{ L}} = 1500 \mu\text{g/L}$
	$\frac{50000 \mu\text{g}}{\text{L}} \times \frac{0.0002 \text{ L}}{0.005 \text{ L}} = 2000 \mu\text{g/L}$

ANEXO 4.

Figura 4. 1 Recolección de muestras de leche.



ANEXO 5.



Figura 4. 2 Procedimiento para la extracción de Ciprofloxacino y Tetraciclina a partir de la muestra de leche de vacuno.

84



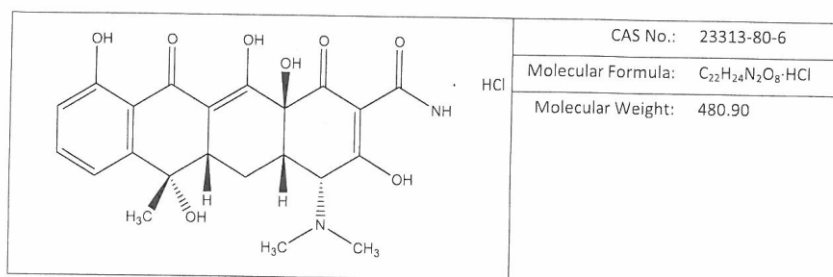
Certificate

EPITETRACYCLINE HYDROCHLORIDE

((4*R*,4*a**S*,5*a**S*,6*S*,12*a**S*) 4-(Dimethylamino)-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-octahydro-3,6,10,12,12*a*-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenecarboxamide monohydrochloride)

USP Catalog No.: 1237509

USP Lot No.: R095C0



Copyright 2017 The United States Pharmacopeial Convention. All rights reserved.
USP Certificate
Page 1 of 3

Certificate Date: 20Aug2018
USP Template No. CERT1-05
Effective 07Sep2017



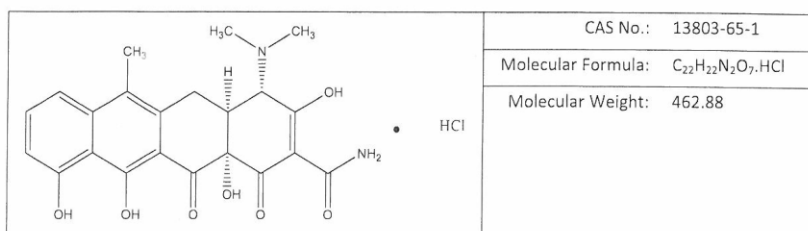
Certificate

ANHYDROTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE

((4S,4aS,12aS)-4-(Dimethylamino)-3,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-1,12-dioxo-1,4,4a,5,12,12a-hexahydrotetracene-2-carboxamide monohydrochloride)

USP Catalog No.: 1035708

USP Lot No.: R07100



Copyright 2016 The United States Pharmacopeial Convention. All rights reserved.
USP Certificate
Page 1 of 2

Certificate Date: 25Apr2017
USP Template No. CERT1_4-04
Effective 21Jan2016



LABEL TEXT

USP REFERENCE STANDARD ANHYDROTETRACYCLINE HYDROCHLORIDE 25 mg ((4S,4aS,12aS)-4-(Dimethylamino)-3,10,11,12a-tetrahydroxy-6-methyl-1,12-dioxo-1,4,4a,5,12,12a-hexahydrotetracene-2-carboxamide monohydrochloride) Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.64 mg of anhydrotetracycline hydrochloride per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Hygroscopic. Store in a refrigerator. USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, *1-301-681-0666 Cat. No. 1035708 Material mfd. in India		LOT: R07100 
<i>Juri L. Ioth</i> Quality Assurance		

Calculation Value

If a value is not provided on the label or accompanying documentation and the Reference Standard has a quantitative USP compendial application, a value of 100.0% is used. The purity value is not applicable for qualitative uses. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABLE QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2016 The United States Pharmacopeial Convention. All rights reserved.

USP Certificate

Page 2 of 2

Certificate Date: 25Apr2017

USP Template No. CERT1_4-04

Effective 21Jan2016

ZHEJIANG GUOBANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.

质量检验报告书
CERTIFICATE OF ANALYSIS

證字號(Serial No.) A1051R11035

检验项目 (Test)		标准规定 (Acceptance Criteria)	结果 (Result)	
性状 (Character)	Appearance	微黄色至淡黄色结晶性粉末 Faintly yellowish to light yellow crystalline powder	微黄色结晶性粉末 Faintly yellowish crystalline powder	
	Solubility	在水中略溶, 溶于乙醇和苯, 在乙醚中微溶, 几乎不溶于丙酮、乙酸、乙酸乙酯、正己烷和二氧甲烷。Slightly soluble in water, slightly soluble in ethanol and benzene, very slightly soluble in dehydrated alcohol, practically insoluble in acetone, in acetonitrile, in ethyl acetate, in butane, and in methyl ethyl ketone.	-	
鉴别 (Identification)		(1) IR: 红外光谱吸收应与对照品的图谱一致。 (2) Co-forms to the spectrum of Ciprofloxacin hydrochloride RS. (3) HPLC: 在含量测定项下, 供试品溶液主峰保留时间应与对照品溶液主峰保留时间一致。 HPLC: The retention time of the major peak of the sample solution corresponds to that of the Standard solution, as obtained in the Assay. (4) 与氯化物反应: 供试品溶液与氯化物反应。	符合 Conforms	
含量测定 (Assay)		3.9~4.5 (2% in water)	3.8	
水分 (Water)		4.7~6.7%	6.2%	
炽灼残渣 (Residue on ignition)		≤ 0.1%	0.01%	
重金属 (Heavy metals)		≤ 0.002%	< 0.002%	
杂质检查 (HPLC) (Chromatographic purity)		(1) 乙二胺类衍生物杂质 Ciprofloxacin ethylenediamine analog	≤ 0.1%	0.08%
		(2) 喹诺酮酸 Fluoroquinolonic acid	≤ 0.1%	0.09%
		(3) 其它单个杂质 Any other individual impurity	≤ 0.2%	0.07%
		(4) 所有杂质 The sum of all impurities	≤ 0.5%	0.15%
含量 (HPLC Assay)		98.0%~102.0% of $C_{17}H_{19}FN_3O_3 \cdot HCl$ (On the anhydrous salt basis)	100.0%	
残留溶剂 (Residual solvents)		(1) 乙醇 (Ethanol)	≤ 500ppm	338ppm
		(2) 甲苯 Toluene	≤ 85ppm	未检出 Not detected

每升质量 (bulk density) 0.33g/ml 审核人: 王强 2018.11.21	紧密度 (Tapped density) 0.52g/ml ▲ 审核人: 王强 2018.11.21	核准人: 周金生 2018.11.21
---	--	------------------------

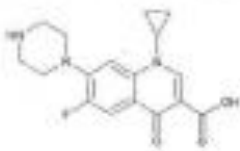


Certificate

CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE

(7-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperidinyl)-3-quinolinecarboxylic acid, monohydrochloride, hydrate)

USP Catalog No.:	1134335
USP Lot No.:	R05170

	CAS No.:	N/A
	Molecular Formula:	$C_{17}H_{19}F_2N_2O_3 \cdot HCl \cdot xH_2O$
	Molecular Weight:	N/A

Copyright 2016 The United States Pharmacopoeial Convention. All rights reserved.
USP Certificate
Page 1 of 2

Certificate Date: 07Sep2016
USP Template No. CERT1_4-04
Effective 21Jan2016



LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests.
Not for use with other tests. See USP prior to use
at www.usp.org/en.



Lot: R05170

USP REFERENCE STANDARD

CIPROFLOXACIN HYDROCHLORIDE 400 mg

Warning! Causes serious eye irritation.
Do not dry. For quantitative applications, use a value of
0.935 mg of ciprofloxacin hydrochloride per mg of material on
the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from
light.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0866
Cat. No. 1134-335 Material mfd. in Germany

Wash thoroughly after handling. Wear eye/face
protection. If in eyes: Rinse cautiously with water for
several minutes. Remove contact lenses, if present and
easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists:
Get medical advice/attention.

Jeri L. Ioth

Quality Assurance

Calculation Value

If a value is not provided on the label or accompanying documentation and the Reference Standard has a quantitative USP compendial application, a value of 100.0% is used. The purity value is not applicable for qualitative uses. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2016 The United States Pharmacopeial Convention. All rights reserved.

USP Certificate

Page 2 of 2

Certificate Date: 07Sep2016

USP Template No. CERT1_4-04

Effective 21Jan2016