

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PENICILINA G EN LECHE CRUDA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Extraction and Quantification of Penicillin G on Raw Milk by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

José Francisco Faría Reyes¹, María Grazia Allara Cagnasso², Lilia Arenas de Moreno³ y Enrique Márquez Salas²

¹Laboratorio de Industrias Lácteas. ²Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias.

³Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Apartado 15252.

Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. E-mail: allara@cantv.net

RESUMEN

Se desarrolló una metodología para la extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por HPLC, en condiciones isocráticas. La extracción de Penicilina G de la leche cruda se realizó centrifugando la muestra con fosfato diácido de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0,01 M y metanol; el sobrenadante se inyectó en una columna de Fase Reversa C18 (LiChrospher®) a temperatura ambiente, utilizando la mezcla buffer fosfato 0,01 M, pH 7 - metanol (65:35 v/v) como fase móvil. Se utilizó un detector UV-VIS a 230 nm. La metodología se evaluó determinando porcentaje de recuperación, precisión, sensibilidad, especificidad y detección de compuestos interferentes. Los resultados indican que la Penicilina se puede determinar cualitativa y cuantitativamente por cromatografía líquida de alta resolución. Se obtuvo una recuperación de 87,06%, un coeficiente de variación de 4,99% y una sensibilidad de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No se detectó la presencia de picos interferentes. Se considera importante la aplicación en nuestro país de la metodología propuesta, para la implantación de un programa de monitoreo de residuos de antibióticos en leche, extensible a otros alimentos.

Palabras clave: Penicilina G, leche cruda, análisis cromatográfico, HPLC.

ABSTRACT

A method for the extraction and quantification of Penicillin G on raw milk using HPLC in isocratic conditions was developed. For the extraction and quantification of Penicillin G, ammonium

diacid phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) and methanol were added to raw milk, centrifuged and the supernatant was injected on a C₁₈ reversed-phase column (LiChrospher) at room temperature, with 0.01M phosphate buffer, pH 7 - methanol (65:35, v/v) as eluent. Detection was achieved with an UV-VIS detector at 230 nm. The method was evaluated by measuring percentages of recuperation, sensibility, precision, specificity and interfering peaks. Results indicated that Penicillin G was positively determined by high performance liquid chromatography. A percentage of recuperation of 87.06%, a sensibility of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a variation coefficient of 4.99% were obtained. No interfering peaks were detected. The application of the proposed method could be recommended to establish a national program for monitoring of antibiotic residues in milk, and to make it extensible to other foods.

Key words: Penicillin G, raw milk, chromatographic analysis, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La Penicilina G es un antibiótico ampliamente utilizado en el control de la mastitis bovina y en el tratamiento de infecciones del sistema respiratorio, gastrointestinal y urinario [1, 28]; también es adicionada en alimentos concentrados, permitiendo la prevención de enfermedades y aumentando el ritmo de crecimiento del animal [14].

Algunos investigadores [2, 8, 16, 17], han reportado que existe una relación entre los patrones de resistencia de microorganismos aislados de la leche de vacas con mastitis y la presencia de antimicrobianos. Por otro lado, la presencia de antibióticos es considerada un problema de salud pública, no sólo

TABLA I
COMPOSICIÓN DE LAS FASES MÓVILES ENSAYADAS

Proporción Metanol-buffer fosfato	pH	Molaridad
20:80	6,5	0,01
30:70		
35:65	7,0	0,02
40:60		
50:50	7,5	0,03

por el desarrollo de resistencia en microorganismos patógenos, sino por la posibilidad de reacciones alérgicas en personas susceptibles, estimándose que aproximadamente un 5% de la población mundial es sensible a la Penicilina [15]. En 1983, la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) estableció que la concentración máxima permitida de antibióticos en alimentos, es de 0,2 µg/mL [6].

En Venezuela, existe poca información sobre la leche que llega a las plantas procesadoras adulterada con antibióticos; trabajos realizados por Faría y col. y Rivero y col. [9, 10, 24] reportaron porcentajes entre 10 y 22% de inhibidores microbianos en leches crudas producidas en el estado Zulia, y en algunas subregiones de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo hasta un 68,6%. Estas cifras se consideran muy elevadas al compararlas con otros países: en Estados Unidos, como resultado de campañas de concientización en el productor y la aplicación de severas multas, se produjo una reducción significativa en la incidencia de antibióticos en leche, de 5% a 0,54% [1].

Faría y col. [9], reportaron que Bacilos Gram Negativos No Fermentadores de la Glucosa (BGNNFG), aislados de 48 muestras de leche cruda que contenían antibióticos, presentaban un patrón de resistencia a la Penicilina, Novobiocina, Cloxacilina y Nitrofurantoína, antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis bacteriana. En leches procesadas, Santiago [25] detectó la presencia de antibióticos en el 68% de las muestras de leche pasteurizada, en la ciudad de Maracaibo; igualmente, Sulbarán [27] reportó una incidencia de antibióticos en el 100% de las muestras de leche en polvo consideradas en su estudio, porcentajes que se corresponden con los encontrados por otros autores en leche cruda.

A escala internacional, varios han sido los autores [5, 11, 19, 20, 26, 28, 29] que han realizado estudios utilizando diversas técnicas para la extracción, identificación y cuantificación de penicilina en leche, siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, la técnica analítica más utilizada. En el ámbito nacional, no se han cuantificado los niveles de antibióticos en leche, ya que los métodos disponibles son, en su mayoría, cualitativos. En este sentido, el propósito de esta investigación fue desarrollar una metodología simple y rápida para la extracción y cuantificación de Penicilina G en leche cruda por HPLC, y determinar la especificidad, porcentaje

de recuperación, exactitud, precisión, sensibilidad y presencia de compuestos interferentes necesarios para la validación de un método analítico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de la muestra de leche cruda

Muestras de leche cruda de tres vacas sanas, previamente apartadas del rebaño, alimentadas en pastoreo, sin recibir tratamiento con antimicrobianos durante los últimos dos meses, se recolectaron en envases de vidrio estériles de 1 L. Posteriormente se transportaron al laboratorio en una cava de anime con hielo, en un lapso menor de cuatro horas. A su llegada se mezclaron los 3 L de leche, fueron distribuidos en envases estériles de 200 mL y refrigerados a 4°C. Cada día se utilizaron dos porciones: un "blanco" para verificar que durante el proceso de refrigeración la leche no hubiese sufrido alteraciones, y otra con la finalidad de preparar una solución madre conteniendo 100 µg/mL de Penicilina G a partir de la cual se obtuvieron muestras con 0,01; 0,1; 1; 10, 15 y 20 µg/mL del antibiótico.

Características del sistema cromatográfico

Se empleó un cromatógrafo líquido Shimadzu Corporation® modelo LC6A integrado por una válvula de inyección manual Rheodyne®, con un loop de 100 µL, una bomba peristáltica LC-10AD, un detector UV-VIS modelo SPD-10A y un procesador de datos Chromatopac CR7A. Una columna de acero inoxidable de 125 mm x 4 mm de diámetro interno x 5µm de tamaño de partícula, de fase reversa C18 LiChrospher®, conectada en serie a un guardacolumna (Merck®), se utilizó para la determinación cualitativa y cuantitativa del antibiótico.

Optimización de la fase móvil

Se trabajó con un sistema isocrático constituido por metanol-buffer fosfato, ensayándose diferentes proporciones de los solventes (n= 5), diferentes valores de pH (n= 3) y distintas concentraciones (n= 3), TABLA I, con la finalidad de determinar la composición óptima de la fase móvil que separara eficazmente la Penicilina G.

Para la optimización de la fase móvil se calculó el factor de capacidad k' a partir del tiempo que el antibiótico es retenido en la columna (t_r) y del tiempo que toma la fase móvil en atravesar la columna (t_o), utilizando la ecuación:

$$k' = t_r - t_o / t_o \quad [23]$$

Con la finalidad de determinar diferencias significativas entre las condiciones en estudio, se aplicaron análisis de varianza, bajo el procedimiento Stepwise [3].

Selección de la longitud de onda

Para determinar la máxima absorbancia de Penicilina G se realizaron barridos a longitudes de onda comprendidas entre 200 y 230 nm, con intervalos de 10 nm.

Extracción de la Penicilina G

Se evaluaron dos tipos de soluciones extractoras sobre la base del estudio de los cromatogramas obtenidos del análisis de muestras de leche con y sin antibióticos. La primera estuvo compuesta por agua-acetonitrilo (50:50 v/v), y la otra por fosfato diácido de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 0,01 M - metanol (15:10 v/v), utilizándose 5 y 15 mL respectivamente en cada extracción. En ambas extracciones se colocaron 5 mL de leche en fiolas de 125 mL y se le adicionó la solución extractora, homogeneizándose con un agitador magnético por 3 min. Esta mezcla se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 15 min; se recolectó el sobrenadante con una pipeta y se filtró en papel Whatman No. 2; una alícuota de 100 μL del filtrado se inyectó en el cromatógrafo.

Validación del método

La técnica de extracción seleccionada de acuerdo con los criterios establecidos para la evaluación de los cromatogramas, se aplicó en muestras de leche con diferentes concentraciones del antibiótico, con la finalidad de establecer la especificidad, porcentaje de recuperación, exactitud, precisión, sensibilidad y presencia de picos interferentes.

A objeto de determinar la especificidad del análisis, se procedió a comparar en los diferentes cromatogramas, los tiempos de retención del pico del antibiótico de los estándares de referencia con los de las muestras. Para verificar si el pico que aparecía correspondía a la Penicilina G, a 5 mL de leche con 1 $\mu\text{g/mL}$ de Penicilina G se le adicionó 0,2 mL de una solución acuosa de 1000 Unidades Internacionales/mL de la enzima Penicilinas BBL[®] con el fin de destruir dicho antibiótico. La desaparición del pico de Penicilina G por efecto de la enzima, se utilizó para identificar el pico del antibiótico en los cromatogramas de las muestras [19].

El método del estándar externo [23], se utilizó para determinar el porcentaje de recuperación, comparando el área del pico en la muestra, con el área correspondiente al estándar de referencia, aplicando la ecuación:

$$C_m = A_m C_{st} / A_{st}$$

donde C_m es la concentración de la muestra, A_m es el área de la muestra, A_{st} el área del estándar y C_{st} la concentración del estándar.

Para la evaluación de la exactitud del método, se realizó un análisis de regresión lineal simple con el fin de determinar la relación entre la concentración de antibiótico adicionada y concentración de antibiótico recuperada [3, 21].

Para la precisión se realizaron seis repeticiones de una muestra de leche con 10 $\mu\text{g/mL}$ de Penicilina G. A los resultados obtenidos se les determinó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Al mismo tiempo, se evaluó la precisión intraensayo, que representa la variabilidad asociada con la instrumentación analítica. Para ello se calculó el coeficiente de variación de tres repeticiones de ensayos realizados en dos días diferentes, en muestras de leche con una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$ de Penicilina G.

En cuanto a la sensibilidad, se realizaron análisis cromatográficos de muestras de leche a las que se adicionaron concentraciones del antibiótico entre 0,01 y 20 $\mu\text{g/mL}$; se consideró como límite de detección la concentración por debajo de la cual no es posible diferenciar la señal producida por el pico del antibiótico de la línea base.

Con la finalidad de corroborar si algunos antimicrobianos producen interferencia en el análisis cromatográfico, se disolvió en una muestra de leche conteniendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de Penicilina G, 1 $\mu\text{g/mL}$ de Novobiocina, Eritromicina, Sulfatiazol, Neomicina y Estreptomina para verificar en el cromatograma picos diferentes a lo del antibiótico en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de la fase móvil

La optimización de la fase móvil se presenta en la FIG. 1, donde se muestra el efecto que la proporción de la mezcla metanol - buffer fosfato tiene sobre el factor de capacidad k' . Se observa una recta inversamente proporcional al aumento del volumen de metanol. Para la proporción metanol- buffer fosfato 20:80 k' alcanza un valor de 2,58. A medida que se incrementa el volumen de metanol hasta 50, el valor de k' se hace inferior a 2, indicando que no ocurre retención del antibiótico en la columna, el pico eluye rápidamente y no se separa del frente del solvente, tal como lo señala Quattrocchi y col. [23].

Esto hace necesario estudiar aquellos puntos de la recta donde la proporción de metanol sea óptima. Tomando en cuenta que un aumento del volumen de metanol incrementa el costo de la fase móvil, la misma deberá seleccionarse sobre una base de la proporción de metanol-buffer fosfato que arroje como resultado una buena separación de la Penicilina G del frente del solvente, con un pico bien diferenciado, simétrico, con un tiempo de retención adecuado y un valor de k' ligeramente superior a 2 [23]. La mezcla de metanol-buffer fosfato 35:65, produjo un cromatograma con las características señaladas, con un tiempo de retención de 5,81 minutos, tal como se muestra en la FIG. 2.

Dado que la Penicilina G es soluble a pH neutro, y que el pH (ácido o básico), reduce el tiempo de vida útil del empaque en la columna [23], se estudió un intervalo de pH del buffer fosfato de la fase móvil cercano a la neutralidad. En la FIG. 3 se muestra el efecto del pH del buffer fosfato sobre el

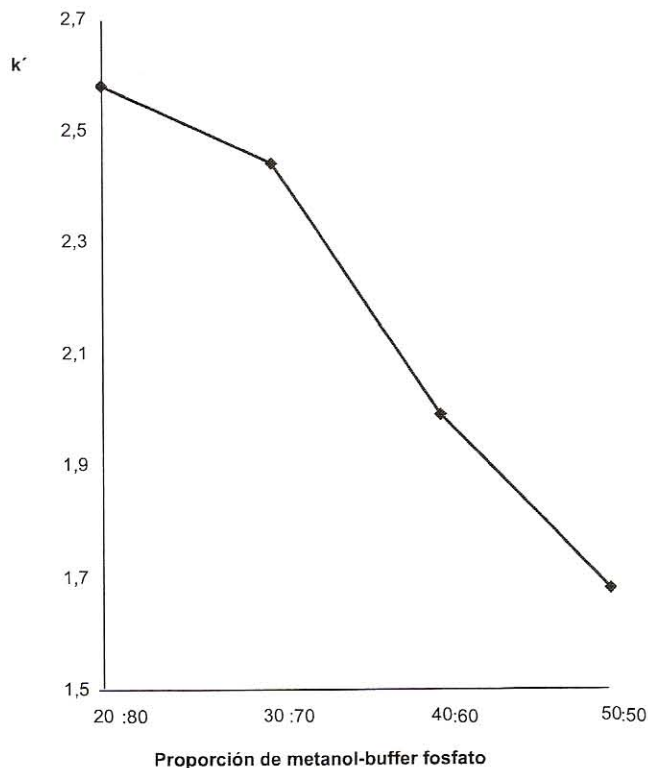


FIGURA 1. EFECTO DE LA PROPORCIÓN METANOL-BUFFER FOSFATO DE LA FASE MÓVIL PARA LA PENICILINA G SOBRE EL FACTOR DE CAPACIDAD K'.

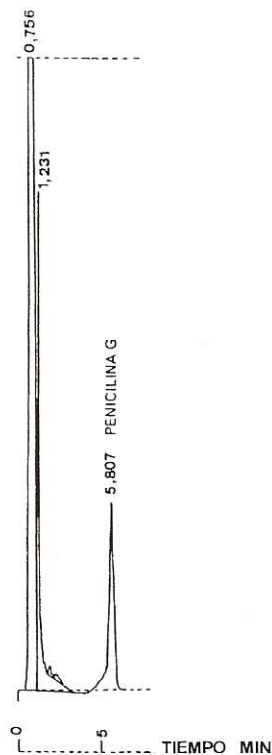


FIGURA 2. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE LECHE CON 10 µg/mL DE PENICILINA G. FASE MÓVIL: METANOL-BUFFER FOSFATO 35:65.

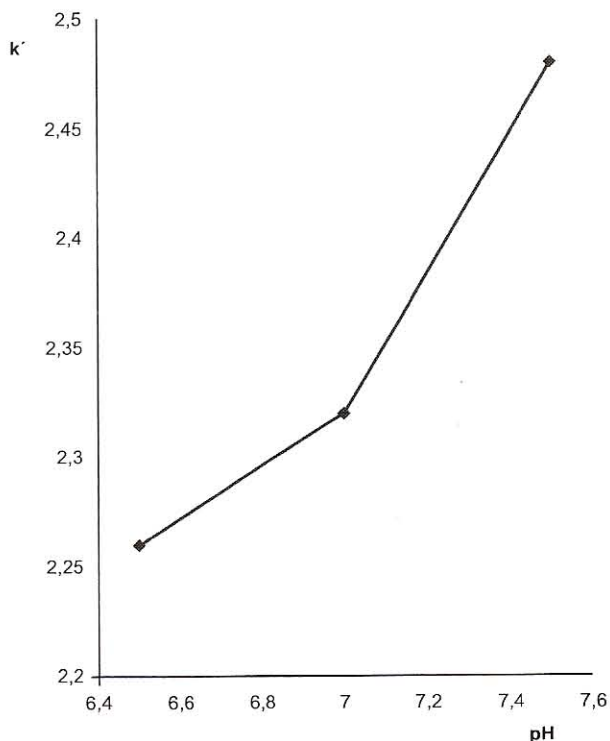


FIGURA 3. EFECTO DEL pH DEL BUFFER FOSFATO DE LA FASE MÓVIL SOBRE EL FACTOR DE CAPACIDAD K'.

factor de capacidad k' . El análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre los valores de k' , por lo que se seleccionó el pH de la fase móvil igual a 7,0. Este valor del pH proporciona, a su vez, estabilidad química a la Penicilina G, que se degrada a valores extremos [13].

De igual forma, se estudió el efecto de la concentración del buffer fosfato sobre k' . El análisis de varianza, no detectó diferencias significativas, por lo que se utilizó el buffer de menor concentración, evitando además, la precipitación de sales de potasio en las tuberías del cromatógrafo. El fosfato es muy utilizado en cromatografía líquida de fase reversa como constituyente de la fase móvil, en forma de sal sódica o potásica, debido a su escasa absorción en longitudes de onda corta [23].

En la FIG. 4 se presentan los cromatogramas de una muestra de leche con 10 µg/mL de Penicilina G a longitudes de onda entre 200 y 230 nm con intervalo de 10 nm, que constituye una banda de absorción del antibiótico, como lo señala Boison [4]. Los análisis se realizaron en las condiciones preestablecidas de la fase móvil metanol-buffer fosfato 0,01 M pH 7 y con una proporción 35:65 y velocidad de flujo de 1,2 mL/min.

Se observa en todos los cromatogramas la aparición de un pico en el tiempo de 5,8 min. Sin embargo en el cromatograma a 200 nm, con una línea base estable, la selectividad fue muy pobre, con una escasa absorbancia por parte de la Penicilina G. Estos resultados son contrarios a los reportados por Boison [4], que señalan que a esa longitud de onda se pro-

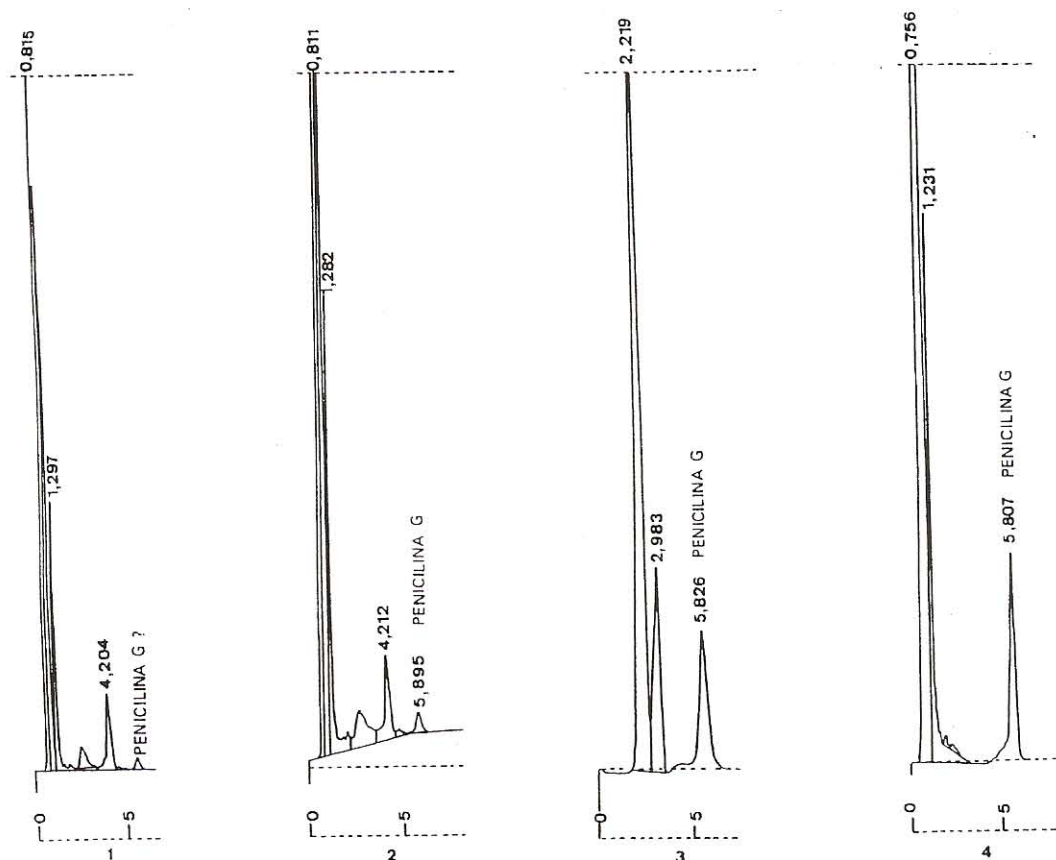


FIGURA 4. CROMATOGRAMA DE LECHE CON PENICILINA G A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA: 200 (1), 210 (2), 220 (3) Y 230 nm (4).

duce la máxima absorbancia de este antibiótico. Se observaron varios picos debido a que muchos compuestos absorben a esta longitud de onda, por lo cual no fue posible identificar con precisión el pico del analito estudiado en este trabajo. De igual manera se observa que los picos interferentes se presentan a 210 nm, con una línea base inestable. En los cromatogramas a 220 y 230 nm la línea base es más estable; dejan de aparecer picos interferentes, siendo 230 nm la longitud de onda donde se observó una buena selectividad de la absorbancia, con un pico bastante simétrico que parte de la línea base, a un tiempo de retención de 5,807 min. Todas estas razones indujeron a que 230 nm se seleccionara como la longitud de onda a la que se observó la máxima absorbancia.

Extracción de la Penicilina G

Una de las dificultades que se presenta en la determinación analítica de cualquier antibiótico en leche por HPLC es su extracción, por su tendencia a formar complejos con las proteínas, particularmente con la albúmina y la globulina [22]. La formación de estos complejos puede disminuir el porcentaje de recuperación del antibiótico. Mediante la desproteinización de la leche, las proteínas se separan y se agregan por acción de solventes orgánicos, entre los que están el cloruro de metileno [11], el tungstato de sodio [5] y el acetonitrilo [19, 26], los que

agregados en una solución acuosa, disminuyen la solubilidad de las proteínas e inducen su precipitación.

El análisis del contenido de antibióticos, debe tomar en cuenta que la leche constituye una matriz biológica compleja, conformada por proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, que además de afectar la separación de los compuestos de interés, puede reducir considerablemente la vida útil de la columna y dañar inyectores, bombas y detectores. La presencia de algunas de estas sustancias en el extracto final usualmente tiene efectos dañinos en los componentes cromatográficos, incrementan el ruido de la línea base y hacen imposible determinar niveles traza de una droga. Por ello el filtrado debe tener pocas sustancias interferentes o estar libre de ellas.

En la FIG. 5 se muestran los cromatogramas de los diferentes tratamientos de extracción aplicados a la leche conteniendo 5 µg/mL de Penicilina G. Al ensayar las técnicas utilizadas por Moats y por Straub y Voyksner [19, 26], que proponen una mezcla de agua-acetonitrilo, se produjo un sobrenadante turbio, aunque fue convenientemente filtrado. En los cromatogramas de este extracto se observaron varios picos interferentes, que dificultaron la identificación de la Penicilina G (Cromatograma 1).

Moats y Leskinen [18], ensayaron el fosfato diácido de amonio, pH 4,6 y metanol para la extracción de Novo-



FIGURA 5. CROMATOGRAMAS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE EXTRACCIÓN APLICADOS A UNA MUESTRA DE LECHE CON 5 µg/mL DE PENICILINA G: AGUA-ACETONITRILLO (CROMATOGRAMA 1), FOSFATO DIACIDO DE AMONIO-METANOL (CROMATOGRAMA 2).

biocina en leche, obteniendo, además de una buena extracción, filtrados con menos impurezas. Según estos autores, el fosfato diácido de amonio, aproxima a las proteínas a su punto isoeléctrico, produciendo su precipitación e igualmente contribuye a la eliminación de compuestos interferentes.

En el cromatograma 2, FIG. 5, se observa la inexistencia de interferencias; el antibiótico aparece como un pico bien diferenciado, con una línea base estable, en un tiempo de retención de 5,8 min. Se consideró entonces, que el fosfato diácido de amonio y el metanol son apropiados para desproteínizar la leche y realizar la extracción de Penicilina G.

Validación del método

Especificidad del análisis: La FIG. 6, cromatograma 1, corresponde a la muestra de leche libre de Penicilina G; solamente se observa el pico del frente del solvente. En la misma figura, los cromatogramas 2 y 3 pertenecen a una muestra de leche conteniendo con 5 µg/mL de Penicilina G y un estándar de 10 µg/mL de Penicilina G, respectivamente. En ambos

cromatogramas el pico del antibiótico aparece bien diferenciado, separado del frente del solvente con un tiempo de retención cercano a 5,81 min. El tiempo de retención del pico de la muestra coincide con el estándar de referencia, con lo que se logró la identificación del antibiótico.

En el cromatograma 4 de la leche con 5 µg/mL de Penicilina G pero mezclada con penicilinas, se observa que el pico del antibiótico que eluye a los 5,81 min, desapareció por la acción de la enzima sobre el anillo β-lactámico que origina pérdida de actividad del antibiótico [12]. Se puede concluir entonces, que la metodología aplicada tiene buena especificidad para la Penicilina G.

Porcentaje de recuperación: La TABLA II contiene los resultados del porcentaje de recuperación del método propuesto; se obtuvo un promedio de 87,06%. Algunos autores han reportado porcentajes de recuperación entre 82,9% y 87% [28, 11], que son ligeramente inferiores a los valores obtenidos en esta investigación. En muestras biológicas complejas, como la leche, es difícil lograr la recuperación total del antibiótico; se ha reportado que un porcentaje de recuperación mayor de 80% es aceptable [5]. Sólo en aquellos métodos que utilizan la evaporación para la concentración del extracto, se ha logrado obtener porcentajes de recuperación de hasta 92% [19]. Al realizar una evaporación al vacío a 50°C, se observó degradación de la Penicilina, por lo que se desistió su utilización.

Exactitud del método: En la FIG. 7 se muestran los resultados del análisis de regresión y correlación. La recta obtenida no parte del origen; al mismo tiempo se observa una pendiente de 0,9935 que al someterla a un análisis de T de Student para comparación de medias [21] se evidencia la inexistencia de diferencias significativas. Se interpreta, por consiguiente, que los valores de la Penicilina G adicionada se corresponden con los valores de Penicilina G recuperada, por lo que se concluye que el método aplicado es exacto.

Precisión: En la TABLA III se presentan los resultados obtenidos al inyectar el extracto proveniente de una muestra de leche con 10 µg/mL de Penicilina G, a la cual se le realizaron 6 repeticiones.

Se observa que la medida de la tendencia central corresponde a 7,64, con una desviación estándar de ± 0,38. El valor de la desviación estándar obtenido es ligeramente inferior al reportado por algunos autores, que ha oscilado entre ± 0,4 y 0,7 [11]. El coeficiente de variación de 4,99 es semejante al reportado por otras fuentes (1,17-4,98) [11, 28]. Asimismo, en la TABLA IV se muestra la precisión intraensayo: el efecto de la variabilidad asociada a la instrumentación analítica es muy bajo.

Sensibilidad: La menor concentración de Penicilina G detectada fue 0,1 µg/mL, este valor está por debajo del límite máximo permisible establecido por la OMS de 0,2 µg/mL [6], en alimentos destinados al consumo humano. Otras fuentes [11, 19], han reportado límites de detección más bajos, sin em-

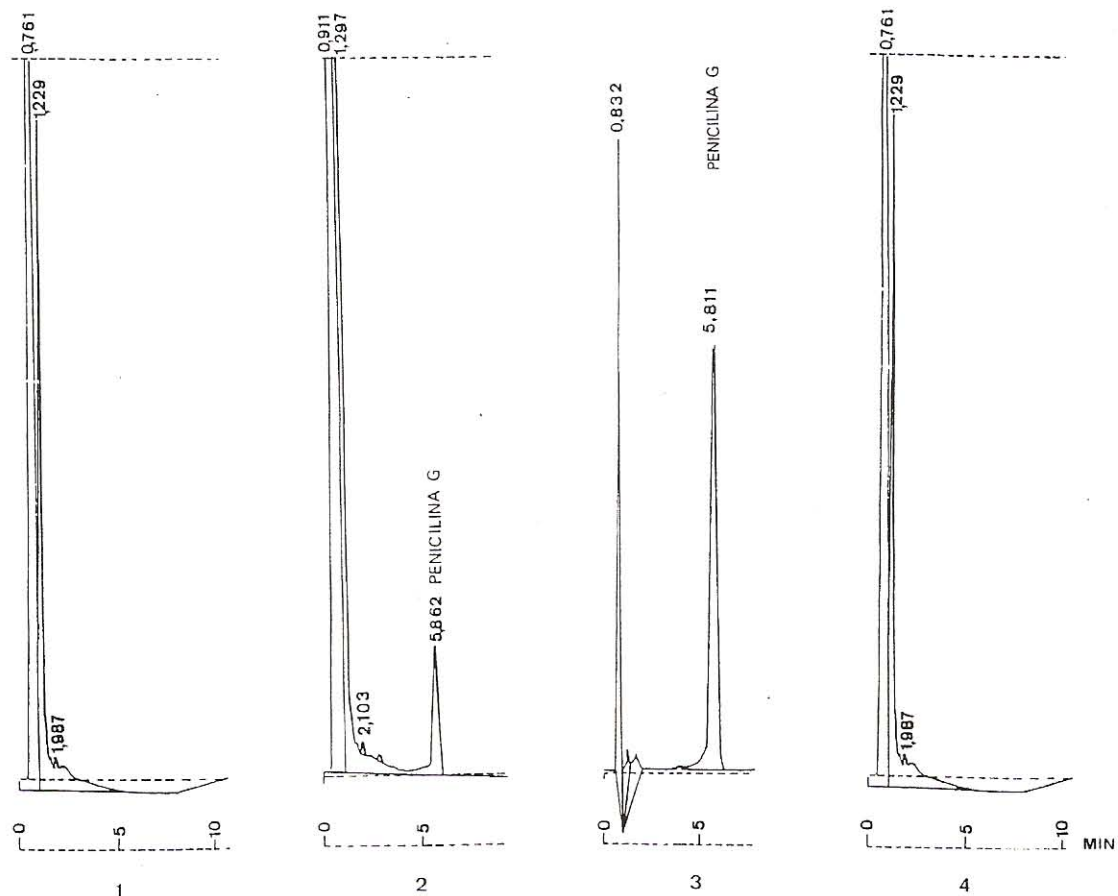


FIGURA 6. ESPECIFICIDAD DEL ANÁLISIS. MUESTRA DE LECHE LIBRE DE PENICILINA G (CROMATOGRAMA 1); MUESTRA DE LECHE CON 5 µg/mL DE PENICILINA G (CROMATOGRAMA 2); ESTÁNDAR DE 10 µg/mL DE PENICILINA G (CROMATOGRAMA 3); MUESTRA DE LECHE CON 5 µg/mL DE PENICILINA G ADICIONADA DE PENICILINASA (CROMATOGRAMA 4).

**TABLA II
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO**

Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)			\bar{X}	$\pm s$	Porcentaje de Recuperación
20,00	19,16	19,36	19,18	19,23	0,110	96,16
15,00	13,07	13,22	12,91	13,07	0,155	87,11
10,00	9,00	8,03	9,79	8,94	0,881	89,40
1,00	0,80	0,80	0,88	0,83	0,046	83,00
0,10	0,09	0,07	0,08	0,08	0,01	80,00

**TABLA III
PRECISIÓN INTERENSAYO DEL MÉTODO PARA PENICILINA G**

Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	\bar{X}	$\pm s$	Coficiente de variación
10,00	8,09	7,64	0,38	4,99
10,00	8,13			
10,00	7,25			
10,00	7,58			
10,00	7,33			
10,00	7,46			

TABLA IV
PRECISIÓN INTRAENSAYO DEL MÉTODO EN MUESTRA DE LECHE CON 15 µg/mL DE PENICILINA G

Ensayo	Concentración recuperada (µg/mL)			\bar{X}	$\pm S$
1	13,07	13,22	12,91	13,06	0,155
2	12,98	13,51	12,80	12,98	0,175

Variabilidad Intraensayo: 0,43%.

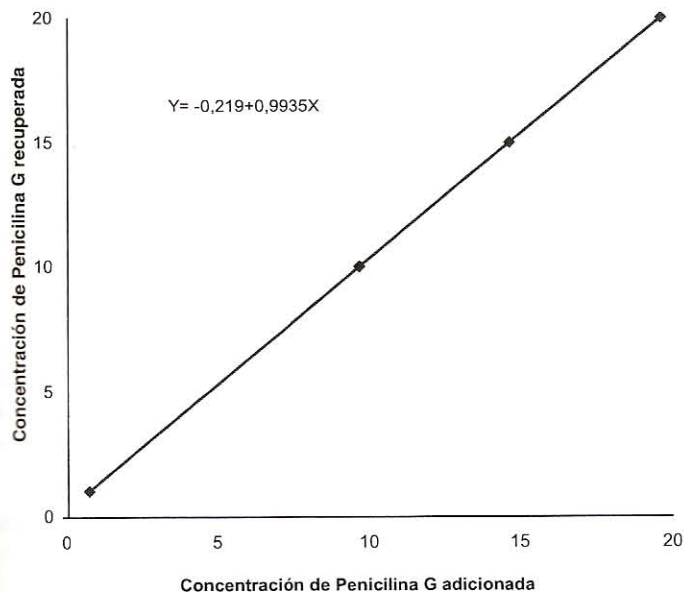


FIGURA 7. ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO PARA PENICILINA G.

bargo consumen un tiempo de análisis prolongado. En la presente investigación, el tiempo de análisis fue de una a dos horas, lo que constituye una ventaja para establecer criterios rápidos de aceptación o rechazo de leche en una planta receptora, si los niveles del antibiótico se encuentran por encima de las normas.

Sustancias interferentes: En la FIG. 8 se presenta el cromatograma de la muestra de leche con Penicilina G a la que se adicionaron varios antimicrobianos. Ninguno de los antimicrobianos adicionados causaron interferencia. Este hecho es de particular importancia, cuando se trata de muestras que contienen más de un inhibidor microbiano, hecho que ha sido reportado en otros países [7]. En Venezuela no se cuenta con investigaciones que puedan demostrar si suceden estas circunstancias, pero debido a la elevada incidencia de antibióticos reportadas en el estado Zulia [9, 10, 24], la leche obtenida de la mezcla de varios productores, pudiera contener más de un antibiótico.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

Las modificaciones y adaptaciones realizadas para la determinación de Penicilina G en leche cruda son altamente

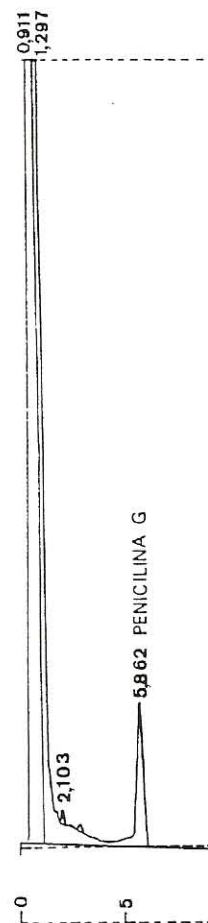


FIGURA 8. CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE LECHE CON PENICILINA G A LA QUE SE ADICIONARON VARIOS ANTIMICROBIANOS: NOVOBIOCINA, ERITROMICINA, SULFATIAZOL, NEOMICINA Y ESTREPTOMICINA.

recomendadas dado que permiten una buena exactitud, precisión en el análisis y sensibilidad de la técnica para detectar los niveles máximos permitidos de antibióticos en el ámbito internacional.

La técnica desarrollada en este trabajo representa un método sencillo, si se confronta con la mayoría de las técnicas propuestas por otros investigadores, ya que utiliza un equipo cromatográfico básico, con reactivos químicos fácilmente disponibles en el laboratorio.

Entre las principales ventajas del método propuesto destaca la obtención de resultados en un lapso de tiempo de una a dos horas.

Debido a la amplia y extendida utilización en el país de antibióticos en el tratamiento de infecciones en el ganado bovino y la elevada incidencia de antibióticos en leche cruda y procesada reportada en la región zuliana, principal productora de leche en Venezuela, se hace necesario establecer un programa de monitoreo de residuos de antibióticos en leche.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias y al Laboratorio del Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia, donde se llevó a cabo la presente investigación. De igual manera, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de LUZ (CONDES) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por el aporte de los equipos utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBRIGTH, J.; TUCKEY, S.; WOODS, G. Antibiotics in milk. A review. **J. Dairy Sci.** 44: 779-807. 1961.
- [2] ANDERSEN, N. Acute clinical mastitis in agriculture practice. **Dansk Veterinaer.** 79(11): 569-574. 1987.
- [3] BENDER, F.; DOUGLAS, L.; KRAMER, A. Analysis of Variance I. Chapter 7. Linear Regression. Chapter 12. **Statistical Methods for Food and Agriculture.** AVI Publishing Company, INC. 345 pp. 1982.
- [4] BOISON, J. Chromatographic methods of analysis for penicillins in food-animal tissues and their significance in regulatory programs for residue reduction and avoidance. Review. **J. Cromatog.** 624: 171-194. 1992.
- [5] BOISON, J.; KENG, L.; MACNEIL, J. Analysis of Penicillin G in Milk by Liquid Chromatography. **J. AOAC International.** 77(3): 565-569. 1994.
- [6] BOOTH, J.; HARDING, F. Testing for antibiotics residues in milk. **Vet. Rec.** 119: 565-569. 1986.
- [7] BRADY, M.; KATZ, S. Antibiotic/Antimicrobial Residues in Milk. **J. Food Prot.** 51(1): 8-11. 1988.
- [8] COSTA, R.; CARVALHO, F.; ANDRADE, M. Mastite Bovina: sensibilidade de agentes etiologicos a antibioticos e quimioterapicos. **Anais Esc. Agron. e Vet.** 14, 15 y 16: 79-85. 1986.
- [9] FARIA, J.F.; RIVERO, Z.; GALLEGOS, B.; ALLARA, M. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNFG aislados de leche cruda (II). **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX (1): 11-16. 1999.
- [10] FARIA, J.F.; GARCIA, A.C.; MÁRQUEZ, A.; MANZANILLA, B.; MORALES, D.; GARCIA, A. Resistencia a los antimicrobianos de Staphylococcus aislados de leches crudas. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IX(4): 343-348. 1999.
- [11] FLETOURIS, D.; PSOMAS, J.; MANTIS, A. Determination of some monobasic Penicillins in Milk by Ion-Pair Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 40(4): 617-621. 1992.
- [12] HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; MOLINOFF, P.; RUDDON, R.; GOODMAN, A. Antimicrobials Agents. Penicillins, Cephalosporins, and other -Lactam antibiotics. Chapter 45. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** Vol. II. Ninth Edition. Mc Graw-Hill International Edition, 1905 pp. 1996.
- [13] HOU, J.; POOLE, J. β -Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in relation to structure. **J. Pharm. Sci.** 60: 503-532. 1971.
- [14] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Antibióticos en los alimentos. Capítulo 9. **Ecología microbiana de los alimentos.** Vol. I. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 332 pp. 1980.
- [15] KITCHEN, D. Reactions to Penicillin. **Am. J. Syphilis, Gonorrhoea and Venereal Diseases.** 35: 578-594. 1951.
- [16] LANGLOIS, B.; FIZENSTAT, J.; BULL, L.; HEMKEN, R. Antibiotic Resistance of enteric bacteria isolated from milk and faeces. **J. Dairy Sci.** 63(Suppl 1): 124. 1980.
- [17] MACKIE, D.; LOGAN, E.; POLLOCK, D.; RODGERS, S. Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. **Vet. Rec.** 123(20): 515-517. 1988.
- [18] MOATS, W.; LESKINEN, L. Determination of Novobiocin Residues in Milk, Blood, and Tissues by Liquid Chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71(4): 776-778. 1988.
- [19] MOATS, W. Determination of penicillin G in milk by high-performance liquid chromatography with automated liquid chromatographic cleanup. **J. Chromatog.** 507: 177-185. 1990.
- [20] MOATS, W.; HARIK, R. Liquid Chromatographic Determination of -Lactam Antibiotics in Milk: A multiresidue Approach. **J. AOAC International.** 78 (1): 49-54. 1995.
- [21] MONTGOMERY, D. Capítulo 15. Análisis de Regresión. **Diseño y Análisis de Experimentos.** Grupo Editorial Iberoamérica, México. 589 pp. 1991.
- [22] OKA, H.; IKAI, Y.; KAWAMURA, J.; YAMADA, M.; HARADA, K.; ITO, S.; SUSUKI, M. Photodecomposition Products of Tetracycline in Aqueous Solution. **J. Agric. Food Chem.** 37(1): 226-231. 1989.

- [23] QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, R. Desarrollo de Métodos. Capítulo II. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.** Gráficas Farro, Argentina. 407 pp. 1992.
- [24] RIVERO, Z.; FARIA, J.F.; SANTORO, R. Aislamiento de Gram Negativos de Leche Cruda con Antibióticos. **Revista Científica, FCV-LUZ.** IV(1): 11-16. 1994.
- [25] SANTIAGO, B. Determinación de Aditivos Químicos en Leche Pasteurizada. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. (Trabajo Especial de Grado). 46 pp. 1986.
- [26] STRAUB R.; VOYKSNER, R. Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacilin and cephapirin by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **J. Chromatog.** 647: 167-181. 1993.
- [27] SULBARAN, B. Adulteraciones Químicas en Leche en Polvo. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. (Trabajo de Ascenso). 51pp. 1986.
- [28] TERADA, H.; SAKABE, Y. Simultaneous determination of Penicillin G, Penicillin V and Ampicillin in milk by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatog.** 348: 379-387. 1985.
- [29] TYCZKOWSKA, K.; VOYKSNER, R.; ARONSON, A. Development of an analytical method for penicillin in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet visible detection and confirmation by mass spectrometric detection. **J. Chromatog.** 490 (1): 101- 113. 1989.