



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

Evaluación de un método de análisis de residuos de sulfamidas, en miel de abejas (*Apis mellifera* L.), a través de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), en fase reversa

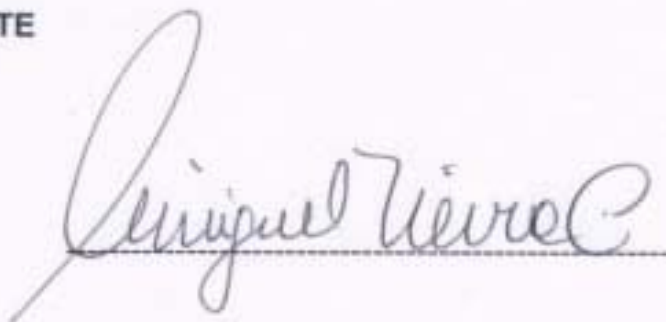
Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Jessica Lourdes Pozo Klenner

Valdivia Chile 2002

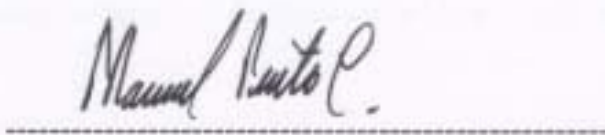
PROFESOR PATROCINANTE

Miguel Neira C,
Ing. Agr,

A handwritten signature in black ink, reading "Miguel Neira C.", written over a horizontal dashed line.

PROFESORES INFORMANTES

Manuel Pinto C,
Prof. Química., M. Sc.

A handwritten signature in black ink, reading "Manuel Pinto C.", written over a horizontal dashed line.

Rafael Burgos A.
Med Vet., M. Sc

A handwritten signature in blue ink, reading "Rafael Burgos A.", written over a horizontal dashed line.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Miel de Abeja	3
2.2	Residuos de sulfamidas	3
2.3	Cromatografía Líquida de Alta Precisión	7
2.4	Metodología propuesta	9
2.4.1	Método propuesto por Belliaro (1981)	9
2.4.1.1	Preparación de la muestra	9
2.4.1.2	Condiciones de la cromatografía	9
2.4.2	Método propuesto por Barry y MacEachern (1983)	10
2.4.2.1	Preparación de la muestra	10
2.4.2.3	Condiciones de la cromatografía	10
2.4.3	Método propuesto por Pagliuca et al, (1999)	10
2.4.3.1	Preparación de la muestra	10
2.4.3.2	Condiciones de la cromatografía	10
2.5	Validación	11
2.5.1	Especificidad	11
2.5.2	Linealidad	11
2.5.2.1	Curva de calibración	11
2.5.3	Precisión	11
2.5.4	Exactitud	12
2.5.4.1	Recuperación del analito	12

Capítulo		Página
2.5.5	Sensibilidad	13
2.5.5.1	Límite de detección	13
2.5.5.2	Límite de cuantificación	13
3	MATERIAL Y METODO	14
3.1	Ubicación del estudio	14
3.2	Material	14
3.3	Metodología	15
3.3.1	Técnica A	15
3.3.2	Técnica B	16
3.3.3	Técnica C	16
3.3.4	Técnica D	16
3.4	Método de análisis Técnica D	17
3.4.1	Método de extracción de muestras	17
3.4.2	Preparación de los estándares	18
3.4.3	Método de corrida de los estándares	18
3.4.4	Pruebas de recuperación	18
4	RESULTADOS Y DISCUSION	19
4.1	Tiempos de Retención (TR)	20
4.2	Cromatograma	22
4.3	Curva de calibración	24
4.4	Gráfico de la curva de calibración	24
4.4.1	Coefficientes de determinación (R^2) y ecuaciones de la curva	25
4.5	Precisión	26
4.5.1	Límites de confianza	27
4.6	Exactitud	29

Capítulo		Página
4.6.1	Recuperación	29
4.7	Sensibilidad	31
4.8	Análisis de muestras de miel	33
5	CONCLUSIONES	35
6	RESUMEN	36
	SUMMARY	37
7	BIBLIOGRAFIA	38
	ANEXOS	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mezcla de los solventes de la fase móvil, en forma de gradiente	17
2	Tiempo de retención promedio y su desviación estándar para cada sulfamida	21
3	Concentraciones elegidas para confección de la curva de calibración	24
4	Tabla para la curva de calibración de sulfanilamida (SD)	25
5	Coefficientes de determinación y ecuación de la recta para cada una de las sulfamidas	26
6	Análisis de una miel en la que se detectaron y cuantificaron 3 sulfas, en cada réplica (R)	27
7	Análisis de una mezcla de los 8 estándares a una concentración de 0,05 ppm	28
8	Límites de confianza del 95% de la media	29
9	Recuperación, para cada sulfa estudiada, expresada en porcentaje de recuperación, agregando 1 ppm, 2 ppm y 10 ppm de estándar a la miel	30
10	Límites de detección y cuantificación para cada sulfa	32
11	Concentraciones promedio (ppm), de cada sulfa encontrada, en 10 muestras de miel	33

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Perfil cromatográfico de los estándares de 8 sulfamidas	22
2	Cromatograma de miel contaminada con 1,0 ppm de estándar	23
3	Gráfico de la curva de calibración para Sulfanilamida (SD)	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Definición de sulfamidas	43
2	Longitudes de onda en que se obtiene la máxima absorción (λ_{\max}) de las 8 sulfamidas estudiadas	44
3	Características químicas de las 8 sulfamidas estudiadas	45
4	Recuperación de las sulfamidas, en porcentaje, para cada técnica ensayada	46
5	Tiempos de retención (min) para cada sulfamida, promedio (PROM) y desviación estándar (DE), para cada nivel de concentración de la curva de calibración	47
6	Curvas de calibración para cada sulfa	48
7	Recuperación según diversos autores, expresada en porcentaje	49
8	Cálculo de los límites de detección y cuantificación	50
9	Origen geográfico de las 10 mieles analizadas	51

1. INTRODUCCION

La presencia de residuos de antibióticos⁽¹⁾ y/o quimioterapéuticos en alimentos pueden provocar hipersensibilización en los consumidores, causando en algunos casos reacciones alérgicas, trastornos gastrointestinales y erupciones en la piel, entre otros

El comité de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud en el 34º informe reconoció que la información sobre las reacciones de hipersensibilidad causadas por la ingesta de tejidos que contienen sulfamidas sería sumamente difícil, si no imposible, de asociar y por ello, recomendó que se mantuvieran al mínimo posible las concentraciones de tales residuos (FAO/OMS,1989).

Es por este motivo que FAO/OMS recomienda establecer los límites máximos de residuos (LMR)⁽²⁾ para asegurar la salud de la población. La Unión Europea según la Regulación EU 2377/90 no permite el uso de antibióticos ni quimioterapéuticos en apicultura. En el caso de las sulfamidas los límites máximos de detección fluctúan, según la técnica utilizada, en 10 partes por billón (ppb) o sobre 50 ppb. Es en estos países europeos donde la reglamentación se aplica rigurosamente y se sanciona aquel embarque de miel que no cumple o excede las concentraciones indicadas, lo que se traduce en

⁽¹⁾ «residuos de medicamentos»: todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios.

⁽²⁾ «límite máximo de residuos»: el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en mg/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio y que no producirá daño al ser humano a lo largo de su vida.

una disminución del precio de pago y en casos extremos al rechazo de la partida.

En Chile la actividad apícola se ha proyectado al mercado europeo con una exportación de 19.236.265 dólares FOB en los últimos 5 años.

Sin embargo, nada se sabe de la presencia de sulfamidas en la producción nacional de miel y menos aún de su concentración (según consulta realizada a varios productores y asesores de la zona). Por lo que algunos apicultores realizan un mal manejo de las abejas aplicando dosis inadecuadas e inoportunas, contaminando de esta manera la miel.

Debido a que en Chile no existe un control del tipo de sulfamida utilizada, se pretende implementar una técnica de detección y cuantificación de estos residuos.

Hipótesis de trabajo: La determinación simultánea de un grupo de residuos de sulfamidas en miel de abejas, es posible, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) en fase reversa.

El objetivo general de este trabajo es evaluar una técnica de HPLC en fase reversa para determinar residuos de sulfamidas en mieles de abeja.

Como objetivo específico se plantea: implementar una técnica en HPLC-fase reversa para la detección simultánea de las siguientes sulfamidas en mieles de abejas: sulfametiozol, sulfadimetoxina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridazina y sulfametazina.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Miel de Abeja

Por definición, la miel es un producto puramente natural, es autosuficiente y no contiene ningún aditivo ni preservante. La miel es en primer lugar un verdadero concentrado de energía. Su alta concentración en azúcares (casi 70%) simples y perfectamente asimilables (fructosa, glucosa y sacarosa) hacen de ella la fuente de energía por excelencia.

Según la legislación europea, la simple palabra "miel" sobre un embalaje es suficiente para asegurar al consumidor un origen 100% natural, sin embargo en Chile el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) en el artículo 393 define la miel como "el producto natural elaborado por la abeja *Apis mellifera*, con el néctar de las flores y exudados de plantas aromáticas" (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 1997). Pero dentro de las características que le exige no hace mención a la presencia o ausencia de residuos medicamentosos.

Si se considera que el consumo de la miel se sustenta en gran parte en la confianza que el consumidor percibe sobre su origen natural e inocuidad, es necesario entonces investigar la posible presencia de residuos en miel, para así asegurar la demanda y un mayor consumo de este excelente alimento. El conocer y evaluar el tipo y niveles de tales residuos es de fundamental importancia para el futuro de la miel en Chile (NEIRA, 2001).

2.2 Residuos de sulfamidas

Se estima que entre estos contaminantes se encuentran los residuos de sulfamidas (Ver ANEXO 1). La gravedad de su presencia en la miel radica en el

peligro potencial de estas sustancias en la salud de las personas. Las reacciones adversas por sulfamidas son cada vez más frecuentes debido a su uso creciente, a la elevada incidencia de reacciones de rechazo de las mismas y al riesgo de reacciones generalizadas potencialmente fatales.

Las sulfamidas se encuentran en innumerables preparados farmacéuticos destinados a distintas especialidades médicas y quirúrgicas, así como también para uso veterinario, donde figuran como medicación única, o bien asociadas entre sí, o a otros medicamentos. Entre las formas farmacéuticas que con mayor frecuencia ocasionan dermatitis de contacto destacan las pomadas y los polvos de sulfamidas puras, como también las gotas nasales, los colirios y los comprimidos vaginales que las contienen. Con frecuencia se observa dermatitis de contacto provocadas por ejemplo, con pomadas utilizadas en el tratamiento de quemaduras. La sacarina y los ciclamatos sódico y cálcico, edulcorantes sintéticos, son también compuestos sulfamídicos. En ocasiones la dermatitis puede ser inducida cuando el alérgeno es ingerido o el paciente a estado en contacto durante varios años con el fármaco, antes de sensibilizarse a ella. (GRIMALT y ROMAGUERA, 1980).

El manejo de las abejas con fines de producción ha obligado al empleo de sustancias químicas, ajenas a la colmena, que siendo aplicadas con variados fines, ha producido inevitablemente contaminación de los productos de la colmena (NEIRA, 2001).

La mayoría de los países que demandan miel en el mercado mundial hoy día están aumentando las exigencias referentes a normas y control de calidad, especialmente en los diversos productos alimenticios para evitar riesgos en la población que ocasionen daños irreparables por intoxicación, acumulaciones dañinas de residuos o efectos letales en la salud (NEIRA, 2001).

En 1999, por exigencia de la Unión Europea, se diseñó en Chile, un monitoreo de residuos en mieles de exportación, el que se encuentra operativo (CAMPANO, 2001).

En Chile, las patologías que afectan a las abejas de mayor prevalencia e impacto, tanto sanitario como económico son principalmente: varroasis y nosemosis.

La presencia de residuos en la miel se debe, entre otras causas, a la aplicación de productos, acaricidas, antibióticos en la colmena sin haber realizado una evaluación de la presencia de la enfermedad o plaga y de su grado de ataque (NEIRA, 2001). Además otro aspecto distorsionador, generado por los comerciantes apícolas y poco regulado por la autoridad sanitaria, es la venta indiscriminada de supuestas formulaciones o medicamentos apícolas para combatir nosemosis, varroasis y loque americana. Subsiste la oferta de supuestas "recetas magistrales" de dudoso origen y composición, las cuales se ha podido observar, presentan gran cantidad de residuos (CAMPANO, 2001).

Cuando los apiarios se ven afectados por alguna patología los apicultores, acostumbran utilizar sulfas, ya que al ver que sus abejas se mueren aplican los productos disponibles en el mercado, o generalmente por la recomendación de otro productor. En otros casos cuando las colmenas son atacadas por *Nosema apis Zander*, protozoo causante de la nosemosis, en lugar de aplicar fumagilina (Fumidil B), droga de elección, utilizan sulfas ya que se sabe estas drogas ejercen efecto en algunos protozoos y tienen menor costo (HENRIQUEZ, 2002⁽¹⁾).

⁽¹⁾ HENRIQUEZ, E. (2002). Medico Veterinario, gerente de la Cooperativa Campesina Apícola Valdivia Ltda, APICOOP LTDA.(21/01/02), comunicación personal.

Loque americana es la patología de más reciente data en Chile, ya que en Agosto del 2000, en la unidad de bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) se detectaron las primeras partidas de mieles importadas positivas a esporas de *Paenibacillus larvae larvae*, agente productor de esta enfermedad (CAMPANO, 2001). A nivel mundial, los antibióticos comúnmente empleados para el control de loque americana son la oxitetraciclina y el sulfatiazol sódico (FRITZSCH y BREMER, 1975). En algunos países como EEUU y Argentina, el empleo de sulfatiazol sódico se ha eliminado debido a la alta residuosidad del producto en miel (un año o más) y a la aparición de cepas resistentes (ALIPPI, 2000; ALBO, 2001). Se sabe que utilizadas en concentración controlada, son inofensivas para las abejas y no contaminan la miel. Sin embargo, en dosis muy altas el producto puede aparecer en la miel y es necesario controlar una posible contaminación (VIÑAS **et al.**, 1995).

Teniendo en cuenta que en los últimos años la exportación de miel ha experimentado un franco incremento de 4.360 ton en el año 2000 a 5.979 ton el 2001, lo que representa en términos económicos 4,8 millones de dólares FOB y 6,4 millones de dólares FOB respectivamente (PROCHILE, 2002⁽¹⁾) y respecto a la situación puntual de la empresa APICOOP LTDA, empresa beneficiaria del proyecto donde esta inmerso este estudio, ya tienen comprometidos 448 mil kilos de miel para el presente año, superando al 2001 que fue de 326 mil kilos (HENRIQUEZ,2002⁽²⁾). La presencia o el nivel presente de estos residuos de sulfas en las mieles chilenas, podrían significar, según sean las exigencias del país comprador, el rechazo de lotes o de la partida completa y principalmente el desprestigio de este producto.

⁽¹⁾ Dirección de Promoción de Exportaciones-ProChile. Pagina web: www.prochile.cl

⁽²⁾HENRIQUEZ, E. (2002). Medico Veterinario, gerente de la Cooperativa Campesina Apícola Valdivia Ltda, APICOOP LTDA.(25/01/02), comunicación personal.

En resumen, el gran problema de los residuos de sulfas en la miel según J.E. Henríquez radica en que los apicultores nacionales, no saben cuando ni cuanto aplicar a sus colmenas y menos aún la clase de sulfa que utiliza. Es de suma importancia conocer los niveles de residuos de sulfamidas presentes en las mieles de los productores, para lo cual es necesario implementar una técnica, para la detección y cuantificación del mayor número de sulfas posible.

2.3 Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) es la técnica de separación usada para químicos semivolátiles o no volátiles o para analitos que se descomponen con el calor (OROZCO, 2000). HPLC ha sido recientemente propuesta como una alternativa para la determinación de sulfamidas y es usado para el análisis de rutina de residuos de drogas azufradas en mieles comerciales en un nivel de 1 ppm (BELLIARDO, 1981). La separación exitosa por cromatografía líquida requiere que los analitos de interés sean solubles en los solventes seleccionados para su uso como fase móvil. Los métodos por HPLC son categorizados en base a los mecanismos de separación. La partición cromatográfica es la base de la metodología por HPLC de fase reversa. Los analitos son separados en una columna hidrofóbica usando una fase móvil polar bombeada a alta presión a través de una columna de acero inoxidable empacada con sílica. Los tiempos de retención de la HPLC y la separación analítica son afectadas por cambios en la fase móvil y estacionaria. La fase móvil es fácilmente cambiada ajustando la composición de la mezcla de solventes bombeados a través de la columna. En la HPLC de fase reversa aumentando la relación de metanol o acetonitrilo en agua se acortan los tiempos de retención. El agua es el disolvente "más débil", y origina los mayores tiempos de retención. Al aumentar la concentración del disolvente menos polar disminuyen los tiempos de retención (YOST *et al.*, 1980).

Los tiempos de retención pueden ser también cambiados seleccionando una columna con 1) diferente largo, 2) cambiando la fase cargada, 3) un diferente tamaño de partícula (generalmente las partículas más pequeñas incrementan la resolución de la columna). Los métodos de HPLC son particularmente sensibles a pequeños cambios en las condiciones cromatográficas, incluida la temperatura. En fase reversa, la temperatura influye sobre cuatro magnitudes importantes: solubilidad y tiempo de retención de la muestra, viscosidad de la fase móvil y eficacia de la columna. Es conveniente controlar la temperatura debido a que en algunas columnas la eficiencia puede variar con cambios muy pequeños de temperatura ambiente, del orden de 2-4°C (YOST **et al.**, 1980).

Todos los procesos cromatográficos incluyen la separación por una fase móvil sobre otra estacionaria. Los constituyentes son separados por una partición diferente entre las dos fases y por tener diferentes tiempos de retención. Los compuestos que interaccionan fuertemente con la fase estacionaria eluyen lentamente (largo tiempo de retención) y los compuestos que quedan más tiempo en la fase móvil eluyen rápidamente (cortos tiempos de retención)(OROZCO, 2000).

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos (RODRIGUEZ, 2002).

El acetonitrilo es un buen solvente de los medicamentos y permite mantener baja la presión en la columna. Cuando la proporción de acetonitrilo en la fase móvil aumenta, la retención de las sulfamidas disminuye (VIÑAS *et al.*, 1995). Además al utilizarlo en la fase móvil disminuye la retención de la mayoría de las drogas hidrofóbicas y aumenta la eficiencia produciendo una mayor resolución (CABALLERO *et al.*, 2001).

2.4 Metodología propuesta

En la mayoría de los trabajos encontrados en la literatura especializada los métodos desarrollados se orientan a determinar principalmente sulfatiazol, por ser esta sulfamida, la que junto con oxitetraciclina es utilizada para combatir Loque Americana (ALIPPI, 2000).

2.4.1 Método propuesto por BELLIARDO (1981). Este autor desarrolló un método en HPLC, fase reversa, para determinar 3 residuos de sulfamidas (sulfametazina, sulfamerazina y sulfatiazol) en miel, en un nivel de 1ppm.

2.4.1.1 Preparación de la muestra. 30 g de miel se agitan con acetona (50mL) en un matraz Erlenmeyer por 10 min por dos veces, el extracto se centrifuga (5 min a 2000 rpm). Se remueve el líquido sobrenadante pasándolo a través de una cama de sulfato anhídrido de sodio y en un rotavapor a baja presión se evapora hasta sequedad. Los residuos se redisuelven en 1 mL de agua bidestilada que contiene 10 μ L de NaOH 0,5N.

2.4.1.2 Condiciones de la cromatografía. Columna de 25 x 0,26 cm (diámetro interno) con 13 μ m de HC-ODS Sil-X; la fase móvil utilizada acetonitrilo al 16% en agua bidestilada; con un flujo de 1 mL/min; a una temperatura de 30°C y detector UV/visible con un filtro de 254 nm.

2.4.2 Método propuesto por BARRY y MACEACHERN (1983). Estos autores montaron una técnica en HPLC fase reversa para determinar residuos de sulfatiazol en mieles canadienses con un límite de detección de 0,06 ppm.

2.4.2.1 Preparación de la muestra. A 50 g de miel se le agregan 25 mL de acetona y se mezcla por 2 min en una mezcladora Hamilton Beach controlada con reostato a baja velocidad. El acetona es colectado y filtrado con papel Whatman se repite la extracción con acetona 2 veces y se evapora el acetona a 40°C. Se transfiere cuantitativamente el extracto a un embudo de separación con 20 mL de HCl 1N seguido por 20 mL de éter etílico, se agita suavemente y se separa en dos fases, colectandose la fase ácida que luego se diluye hasta los 30 mL.

2.4.2.3 Condiciones de la cromatografía. Se utiliza una columna 30 cm x 3,9 mm de fenil μ Bondapak; y fase móvil de fosfato de potasio monobásico en acetonitrilo al 10% ajustado a pH 3.0; el flujo fue de 1,1 mL/min y monitoreado a 254 nm (UV/visible).

2.4.3 Método propuesto por PAGLIUCA et al., (1999). Este autor modificó el trabajo de BARRY y MACEACHERN (1983) y obtuvo 0.15 ppm como límite de cuantificación.

2.4.3.1 Preparación de la muestra. Siguió la técnica de BARRY y MACEACHERN (1983), hasta el paso de colectar la fase ácida, luego a diferencia del método anterior, se neutraliza esta fase con NaOH 2N y luego se diluye a 30 mL.

2.4.3.2 Condiciones de la cromatografía. La columna empleada fue una Ultracard 5 ODS 20 (150 x 4,6 mm), la fase móvil fue acetonitrilo más fosfato de

sodio monobásico 20 mM (15:85). Llevado a pH 7,0 con NaOH 1N, el flujo fue 1,0 mL/min y la longitud de onda utilizada fue 254 nm.

2.5 Validación

Una vez desarrollado un método por HPLC debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables. Deben considerarse las siguientes características funcionales:

2.5.1 Especificidad. Es la capacidad de un método para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra. (FAO/OMS, CODEX ALIMENTARIUS, 1994). Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

2.5.2 Linealidad. Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta (QUATTROCCHI *et al.*, 1992). La linealidad se determina a partir de la curva de calibración.

2.5.2.1 Curva de calibración. Define la relación entre concentración y respuesta. La curva de calibración debe ser construida usando 5 valores del rango de concentraciones esperadas (BRESSOLLE *et al.*, 1996).

La aceptación de la linealidad es a menudo juzgada por el coeficiente de correlación y el intercepto de la línea de regresión lineal del gráfico de respuesta versus concentración. Un coeficiente de correlación de $>0,999$ es generalmente considerado como evidencia de una adecuada aceptabilidad de los datos para la línea de regresión (GREEN, 1996).

2.5.3 Precisión. Es el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos en ensayos independientes, a partir de un material de ensayo homogéneo en las

condiciones de empleo estipuladas (FAO/OMS, CODEX ALIMENTARIUS, 1994).

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

- (a) El sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.
- (b) El método, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

2.5.4 Exactitud. Se refiere al grado de coincidencia entre el valor verdadero de la concentración del analito y el resultado medio que se obtiene aplicando un gran número de veces el procedimiento experimental a un conjunto de muestras homogéneas (FAO/OMS, CODEX ALIMENTARIUS, 1994). También conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero (QUATTROCCHI *et al.*, 1992).

2.5.4.1 Recuperación del analito. Se mide como porcentaje de recuperación del analito añadido a una muestra de ensayo en blanco, es una medición afín que sirve para comparar la cantidad revelada por el análisis con la cantidad añadida a la muestra. En concentraciones bajas y en particular con métodos que exigen una serie de fases, entre las que se incluyen la extracción, aislamiento, purificación y concentración, la recuperación puede ser menor al 100% (FAO/OMS, CODEX ALIMENTARIUS, 1994). Siendo aceptable una recuperación de hasta 60% como mínimo.

2.5.5 Sensibilidad. Corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

2.5.5.1 Limite de detección. Según United State Pharmacopeia (USP XXII), la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra (QUATTROCCHI **et al.**, 1992).

2.5.5.2 Límite de cuantificación. Según la misma referencia, la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración (QUATTROCCHI **et al.**, 1992).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Ubicación del estudio

Los análisis de residuos se realizaron en el laboratorio de Fitoquímica perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile.

3.2 Material

El material utilizado en este estudio fue el siguiente:

- ❖ Muestras de miel: muestras provenientes del Proyecto Fondo SAG N° 71, proporcionadas por apicultores de la VII y X regiones, tomadas al azar. Obtenidas por centrifugación, almacenadas a temperatura ambiente, protegidas de la luz, en envases plásticos.
- ❖ Equipo de laboratorio: a continuación se detallan:
 - ◆ Cromatógrafo Líquido de Alta Precisión marca MERCK-HITACHI, modelo.LichroGraph L-6200 A Intelligent pump, Detector UV-VIS modelo L-4250, Chromato-integrador modelo D-2500
 - ◆ Baño ultrasonido marca COLE PARMER. Rango 47 khz.
 - ◆ Baño termorregulado marca HERAUES
 - ◆ Balanza analítica marca SARTORIUS. Modelo A200S. rango: 1mg a 200 g. Grado de precisión: 0.1 mg
 - ◆ Balanza marca SARTORIUS. Modelo BP8100. rango: 1g a 8100 g. Grado de precisión: 1 g.
 - ◆ Evaporador rotatorio digital marca HEIDOLPH. Modelo Laborota 4002. Bomba de vacío marca VACUBRAND. Tipo ME 2C. Rango: 50-60 hz.
 - ◆ pHmetro marca COLE PARMER modelo DigipHase.

- ◆ Material de vidrio: vasos precipitados, embudos de separación, pipetas matraces aforados, probetas, etc.
- ❖ Estándares de 8 sulfamidas marca SIGMA: Sulfametizol, Sulfadimetoxina, Sulfadiazina, Sulfamerazina, Sulfanilamide, Sulfatiazol, Sulfacoloropiridazina, Sulfametazina (Ver ANEXO 2).
- ❖ Reactivos químicos: Acetonitrilo (grado HPLC) (Merck), metanol (grado HPLC) (Merck), fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) (Merck), ácido trifluoracético (TFA) (Merck), NaOH 1N, ácido ortofosfórico concentrado (May & Beker), cloroformo (grado HPLC) (Merck), acetona (grado HPLC) (Merck).
- ❖ Otros: papel filtro Whatman N° 1, filtros de acetato de celulosa ($0.45 \mu\text{m}$), cartridges octodecyl (C_{18}) (Bakerbond spe), cartridges Extrelut N1 (Merck).

3.3 Metodología

Se utilizó un método de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) de fase reversa aplicable a muestras de miel. Se probaron diferentes metodologías encontradas en la literatura hasta modificar, ajustar y probar empíricamente una técnica nueva.

3.3.1 Técnica A. Según PAGLIUCA et al. (1999) modificado:

- Columna: LiChroCART® 250-4, LiChrospher® 100 RP-18 ($5\mu\text{m}$).
- Fase móvil: Acetonitrilo - NaH_2PO_4 (15 : 85), pH 7.0 (NaOH 1N)
- Flujo: 1,0 mL/min
- Long de onda: 254 nm
- Para la extracción se pesaron 50 g de miel en un embudo de separación y se le agregaron 25 mL de acetona pura, se agitó por 2 min a baja velocidad, se dejó decantar y luego se filtró el sobrenadante con Whatman N°1. Nuevamente se agregaron 25 mL de acetona y se repitió el procedimiento. El acetona se evaporó a 40°C al vacío en un rotavapor. Se transfirió cuantitativamente el extracto a un embudo de separación con 20 mL de HCl

1 N y 20 mL de éter etílico, agitando suavemente y se esperó a que se separaran las fases, para luego colectar la fase ácida en una probeta graduada que se llevó a 30 ml, finalmente se filtró en acetato de celulosa (0,45 μm).

3.3.2 Técnica B. Similar a técnica A con las modificaciones que se indican: se disolvieron 5 g de miel en 5 ml de agua y luego se hizo la extracción con acetona, siguiendo los pasos antes indicados hasta obtener el extracto y se pasó por un cartridge Octodecyl (C_{18}) Bakerbond spe. Como eluyente se utilizó la fase móvil antes mencionada, se llevó a un volumen conocido y se inyectó al equipo HPLC.

3.3.3 Técnica C. Siguiendo la metodología propuesta por el Dr. Iván Saavedra⁽¹⁾ se utilizó una columna Extrelut NT1 (Merck) para 1 mL de muestra de miel con 20 μL de ác. fosfórico concentrado, luego se agregaron 2 mL de cloroformo y posteriormente 1 mL de solución al 5% de MeOH puro. Todos los eluidos se descartaron y luego se eluyó con 6 mL de metanol puro. Este eluido recolectado se evaporó a 40°C en rotavapor. Se llevó a un volumen conocido con fase móvil y se inyectó 100 μL al equipo HPLC.

3.3.4 Técnica D. Basándose en las recombinaciones mencionadas se realizó la extracción con acetonitrilo puro, ya que experimentalmente se probó que todas las sulfas eran solubles en este solvente orgánico (concentraciones de 100 partes por millón (ppm)). Luego se probó una nueva fase móvil con Acido Trifluoracético (TFA) 0,1%⁽²⁾ y acetonitrilo con TFA 0.08% en gradiente, hasta conseguir un cromatograma con 8 sulfas bien separadas y caracterizadas. Finalmente esta técnica siguió el proceso de validación.

⁽¹⁾ Ivan Saavedra S, Prof asociado, Químico Farmacéutico. Laboratorio de Farmacocinética. Facultad de Medicina. Universidad de Chile

⁽²⁾ Por recomendación del Sr. Ricardo Schroeder, Bioquímico . e-mail: ricardoschroeder@hotmail.com

3.4 Método de análisis Técnica D. A continuación se detallan las condiciones de operación del equipo.

- HPLC-UV fase reversa
- Columna :LiChroCART® 250-4 HPLC-Cartridge, LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
- Fase móvil: (a) Ac. Trifluoroacético (TFA) 0.1% : (b) Acetonitrilo+TFA 0.08%.

CUADRO 1 Mezcla de los solventes de la fase móvil, en forma de gradiente

Tiempo (min)	a TFA 0,1%	B Acetonitrilo+TFA 0,08%
0	94	6
5	92	8
8	90	10
10	85	15
16	80	20
30	70	30
40	60	40

- Flujo:1,0 mL/min;
- Longitud de onda: 254 nm;
- Loop: 100 µL
- A temperatura ambiente (20-22°C)

3.4.1 Método de extracción de muestras. 5 g de miel se trataron con 20 mL de acetonitrilo con TFA al 0.1% y se mezclaron manualmente por 30 s, luego se filtró el sobrenadante en un papel Whatman N°1. Se evapora el acetonitrilo a

40°C en un rotavapor, al vacío, luego se resuspendieron en 1 mL de fase móvil (95:5). De este volumen final se inyectaron 100 µL al equipo HPLC.

3.4.2 Preparación de los estándares. Se pesaron 10 mg de cada uno y se solubilizaron en Acetonitrilo, se completó a un volumen de 100 mL. De esta solución se tomaron alícuotas para diluir en las concentraciones necesarias, en fase móvil (95:5) y se determinó la curva estándar en cada caso.

3.4.3 Método de corrida de los estándares. Inicialmente se determinaron los tiempos de retención de los estándares individuales de las sulfamidas y posteriormente se corrieron las ocho mezclas homogéneamente. Se inyectaron 100 µL de cada una de estas soluciones.

3.4.4 Pruebas de recuperación. Se pesaron 5 g de miel por triplicado y se le agregó por separado un volumen de 10 µL, 20 µL y 100 µL de estándar de sulfas de 100 ppm para obtener una concentración final de 1, 2 y 10 ppm respectivamente. Estas fueron tratadas con 20 mL de acetonitrilo-TFA al 0.1% y se mezclaron manualmente por 30 s, luego se filtró el sobrenadante en un papel Whatman N°1. Se evaporó el acetonitrilo a 40°C en un rotavapor, al vacío, luego se resuspendió en 1 mL de fase móvil (95:5). De este volumen final se inyectaron 100 µL al equipo HPLC. Luego se comparó la concentración obtenida al final del procedimiento con la concentración agregada a la muestra.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Considerando que la mezcla precisa de estas 8 sulfas no aparece en ningún trabajo descrito en la literatura específica, se fueron probando las diversas técnicas encontradas hasta montar y validar la más apropiada, pues se presentaron diversos problemas en cada una de ellas. Siendo el principal la solubilidad de las sulfas en los solventes empleados, ya sea en la preparación de los estándares como en las diluciones de estos, o bien en la extracción del analito (sulfas) desde la miel. Lo que influye directa e indirectamente en la calidad de la recuperación, por lo que se fueron descartando considerando principalmente este parámetro.

Según CABALLERO *et al.*, (2001) las sulfas estudiadas presentan su máxima absorbancia a diferentes longitudes de onda, siendo el promedio de ellas cercano a 254 nm, por lo que se mantuvo este valor para la detección de esta mezcla (ANEXO 2).

-Técnica A Esta metodología utiliza acetona como solvente de extracción pero debido a que no todas las sulfas estudiadas en este ensayo son solubles en acetona (ANEXO 3), se obtuvieron porcentajes de recuperación muy bajos (ej. sulfanilamida 4%, sulfadiazina 10%, sulfametizol 22%) para concentraciones inferiores a 10 ppm (ANEXO 4).

-Técnica B A pesar de disolver inicialmente la miel en agua, para luego hacer la extracción con acetona, la recuperación de las sulfas mejora solo en algunas, tales como sulfanilamida (102%) y sulfamerazina (90%), pero en la mayoría sigue siendo muy baja (ANEXO 4).

-Técnica C Utiliza metanol como solvente para eluir las sulfas desde la columna Extrelut NT1, pero por no ser todas las sulfas solubles en metanol, no son completamente extraídas desde ésta, lo que se traduce en una muy baja recuperación en todas ellas, inferior al 60 % , valor que se exige como mínimo (ANEXO 4). Una vez observado esto, se cambió el eluyente por acetonitrilo, la recuperación mejoró levemente en las sulfas poco solubles, sin embargo, en términos generales fue muy deficiente.

Técnica D Finalmente, basados en la experiencia obtenida hasta este punto, se optó por realizar la extracción con acetonitrilo puro, ya que se vió empíricamente que la miel no se disuelve en este solvente y que además los estándares de cada una de las sulfas se solubilizan homogéneamente en acetonitrilo, ya sea en forma individual como mezcladas.

Luego de superada esta etapa se procedió a crear una gradiente que separó apropiadamente una sulfa de otra, lo que mejoró su identificación y cuantificación. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

4.1 Tiempos de Retención (TR)

Inicialmente se corrieron individualmente cada sulfa para identificarla según su TR y luego se fueron agregando una a una las restantes hasta mezclar las 8. Para conseguir una buena separación entre sulfas (mínimo 1 min entre ellas) se probaron distintas gradientes y proporciones en los eluentes (agua-acetonitrilo), Posteriormente se determinaron los tiempos de retención para las 8 sulfas estudiadas en triplicado y en los 5 diferentes niveles que conformaban la curva de calibración (ANEXO 5).

CUADRO 2 Tiempos de retención promedio y su desviación estándar para cada sulfamidas

Nº	Sulfamidas	Sigla	RT (min)
1	Sulfanilamida	SD	3,8 ± 0.08
2	Sulfadiazina	SZ	8,7 ± 0.20
3	Sulfamerazina	SM	10,6 ± 0.23
4	Sulfatiazol	ST	11,7 ± 0.25
5	Sulfametizol	SL	13,1 ± 0.35
6	Sulfametazina	SMZ	17,5 ± 0.16
7	Sulfacloropiridazina	SCL	20,5 ± 0.18
8	Sulfadimetoxina	SX	29,9 ± 0.18

4.2 Cromatograma

Al realizar la corrida de los estándares en las condiciones antes mencionadas (Técnica D), se obtiene el siguiente perfil cromatográfico.

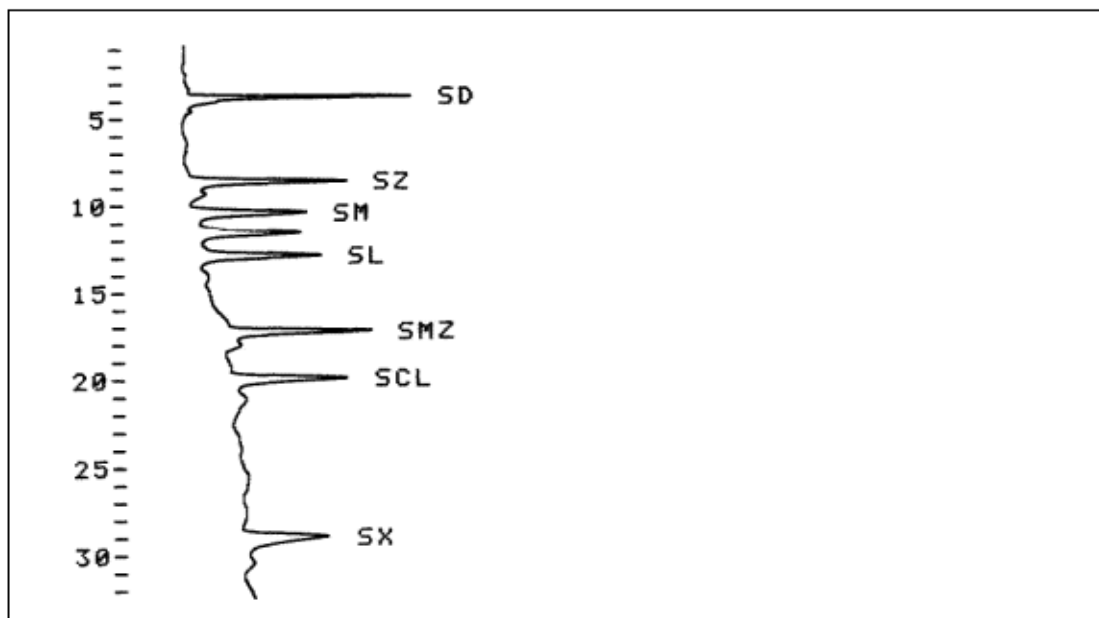


FIGURA 1 Perfil cromatográfico de los estándares de 8 sulfamidas

En el perfil cromatográfico (FIGURA 1) se observa que las ocho sulfas estudiadas pueden separarse, con una buena resolución, bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente.

Respecto de las modificaciones realizadas, tiene mayor importancia el uso de acetonitrilo, como el solvente utilizado, para la extracción de los residuos desde la matriz (miel), la cual por ser rica en azúcares resulta una matriz con muchas impurezas. El empleo de acetonitrilo, probado empíricamente, es capaz de solubilizar las sulfas estudiadas y no así la miel (insoluble en acetonitrilo), lo que permite obtener un extracto con menos contaminantes.

A una muestra de miel se le agregó o contaminó con una cantidad conocida de estándar (1,0 ppm) y se obtuvo el cromatograma de la FIGURA 2.

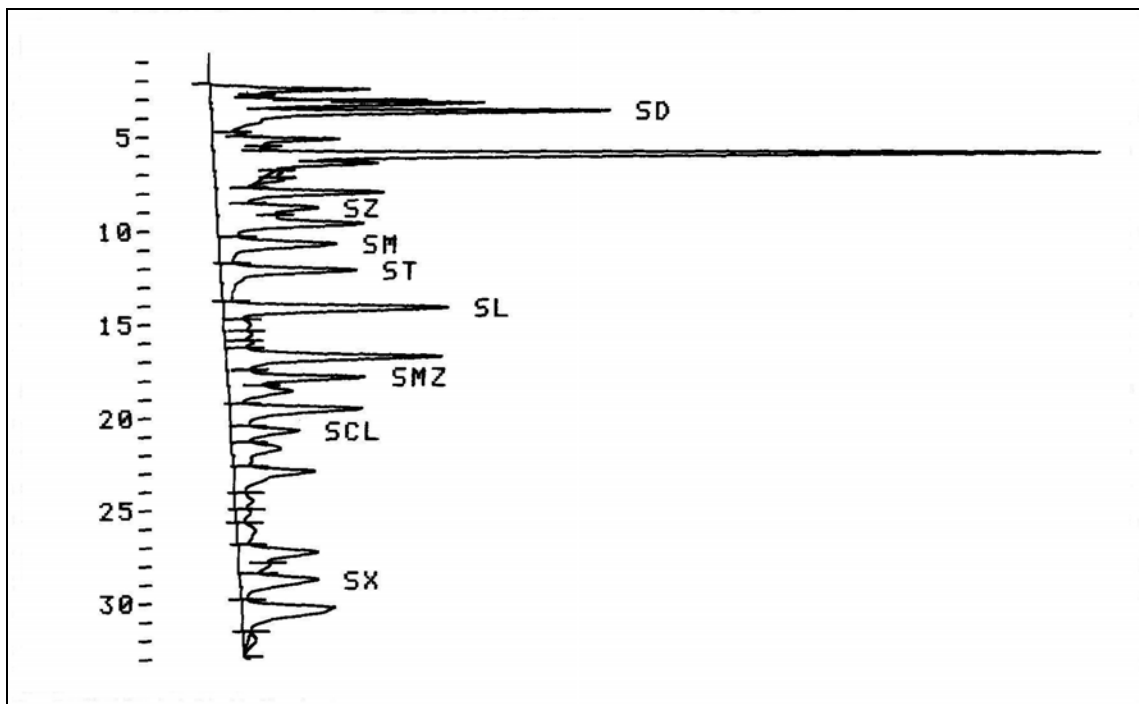


FIGURA 2 Cromatograma de miel contaminada con 1,0 ppm de estándar

La FIGURA 2 demuestra que el extracto de la muestra presenta otros picos a diferentes tiempos de retención, siendo más altos en los primeros 10 minutos de corrida la cromatografía y a medida que aumenta la proporción de acetonitrilo en la fase móvil, los contaminantes van desapareciendo o dicho de otra forma estos son eluidos por el agua presente en la primeras etapas de la corrida. Durante el transcurso de este trabajo se observó que no todas las muestras presentaban el mismo perfil. Si una muestra de miel presentó demasiada interferencia por contaminantes y quedaba la duda sobre si el pico correspondía o no a una de las sulfas estudiadas, se agregó una cantidad conocida de estándar y se verificó si el área correspondiente al tiempo de retención aumentaba proporcionalmente. En la mayoría de los casos el perfil cromatográfico se va aplanando después de los primeros 15 minutos.

4.3 Curva de calibración

Se preparó con la mezcla de las 8 sulfas, en 5 concentraciones o niveles distintos y por triplicado.

CUADRO 3 Concentraciones elegidas para la confección de la curva de calibración

Nivel	Concentración (ppm)
1	0,05
2	0,10
3	0,20
4	0,40
5	1,00

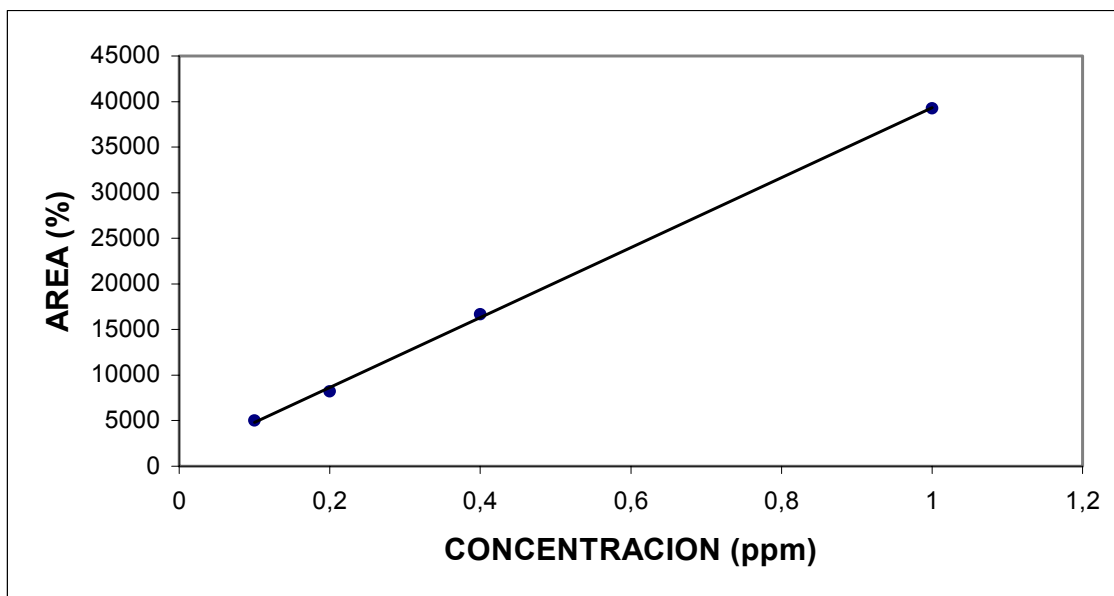
4.4 Gráfico de la curva de calibración

Para cada sulfamida se realizó su curva de calibración y a continuación, a modo de ejemplo, se muestra el gráfico de esta curva para sulfanilamida (SD), los gráficos para las sulfamidas restantes se pueden ver en el ANEXO 6.

CUADRO 4 Tabla para la curva de calibración de sulfanilamida (SD)

Concentración (ppm)	Area (%)
0,1	5.022
0,2	8.199
0,4	16.675
1,0	39.274

Nota: De las 5 concentraciones utilizadas para construir cada una de las curvas de calibración se eliminó una por presentar un comportamiento errático. En este caso para SD se eliminó 0,05 ppm.

**FIGURA 3** Gráfico de la curva de calibración para Sulfanilamida (SD)

4.4.1 Coeficientes de determinación (R^2) y ecuación de las curvas. Estos fueron calculados y partir de la curva de calibración para cada sulfamida analizada.

CUADRO 5 Coeficientes de determinación y ecuación de la recta, para cada una de las sulfamidas

Sulfamida	Sigla	R²	Ecuación de la recta
Sulfanilamida	SD	0,9995	Y= 38.335X+1000
Sulfadiazina	SZ	0,9992	Y= 43.322X-991
Sulfamerazina	SM	0,9999	Y= 36.872X-259
Sulfathiazol	ST	0,9982	Y= 36.321X-1051
Sulfametizol	SL	0,9990	Y= 47.068X+228
Sulfametazina	SMZ	0,9976	Y= 38.547X+1044
Sulfacloropiridazina	SCL	0,9995	Y= 41.849X-570
Sulfadimetoxina	SX	0,9993	Y= 40.901X-591

Como se observa en el CUADRO 5, los valores de R² son muy cercanos a 1,0, lo que indica que la curva tiene un comportamiento lineal y directamente proporcional, con una baja dispersión entre los datos obtenidos.

4.5 Precisión

Para estudiar la precisión de un método analítico se evalúa la dispersión de varias preparaciones de la muestra final, determinándose así su repetibilidad. Para ello se tomó una miel y se pesaron 6 muestras de 5 g cada una y luego se procesó para analizarlas por separado, en sextuplicado

CUADRO 6 Análisis de una miel en la que se le detectaron y cuantificaron 3 sulfas en cada repetición (R)

SULFA	R-1 (ppm)	R-2 (ppm)	R-3 (ppm)	R-4 (ppm)	R-5 (ppm)	R-6 (ppm)	Prom (ppm)	DE +/-	DER %
SD	0,010	0,013	0,015	0,015	0,013	0,012	0,013	0,002	15,4
SMZ	0,047	0,030	0,042	0,026	0,029	0,033	0,035	0,008	22,9
SX	0,047	0,049	0,051	0,039	0,041	0,045	0,045	0,005	11,1

R= Repetición; Prom= concentración promedio; DE= Desviación Estándar;
DER= Desviación Estándar Relativa

Al observar los porcentajes de DER, (CUADRO 6), se desprende que el método de extracción permite obtener valores homogéneos, ya que porcentajes menores al 15% indica que no existe diferencia entre una extracción de otra. En el caso de SMZ, si bien el valor supera a 15% no es tan grande esta diferencia, por lo que también se puede considerar como un valor óptimo.

4.5.1 Límites de confianza. Es el intervalo de concentración en el cual se obtiene un resultado con la seguridad, linealidad y precisión aceptable.

A continuación en el CUADRO 7 se muestran las concentraciones determinadas según esta técnica, en un estándar preparado, con una concentración de 0,05 ppm de mezcla de los 8 estándares, de las sulfas estudiadas, en 6 repeticiones.

CUADRO 7 Análisis de una mezcla de los 8 estándares a una concentración de 0,05 ppm

SULFA	R-1 (ppm)	R-2 (ppm)	R-3 (ppm)	R-4 (ppm)	R-5 (ppm)	R-6 (ppm)	Prom (ppm)	DE +/-	DER %
SD	0,06	0,05	0,05	0,08	0,07	0,08	0,063	0,011	18
SZ	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,073	0,005	7
SM	0,09	0,08	0,13	0,09	0,09	0,1	0,096	0,018	19
ST	0,08	0,06	0,09	0,07	0,08	0,08	0,076	0,010	14
SL	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,043	0,006	14
SMZ	0,03	0,05	0,03	0,06	0,05	0,04	0,040	0,013	32
SCL	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,073	0,006	9
SX	0,13	0,09	0,11	0,06	0,1	0,09	0,096	0,025	26

R= Repetición; Prom= concentración promedio; DE= Desviación Estándar;
DER= Desviación Estándar Relativa

Para este caso se trabaja con una significancia del 95% ($p=0,05$) de las medidas de una distribución normal o gaussiana es decir la media ± 2 desviaciones estándar.

Calculándose de acuerdo a la distribución t de Student según:

$$X - \frac{t_{v,\alpha} * S}{\sqrt{n}} < \mu < X + \frac{t_{v,\alpha} * S}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde $t_{v,\alpha}$ es el valor "t de Student", tabulado para n mediciones con $v = n-1$ grados de libertad y para varios niveles α de significación (el nivel más empleado es $p:0,05$, correspondiente a un intervalo de confianza del 95%).

Luego $t = 2,571$ para $6 - 1 = 5$ grados de libertad.

CUADRO 8 Límites de confianza del 95% de la media

Mezcla de estándares (0,05ppm)	Intervalo de confianza
SD	(0,0515; 0,0745)
SZ	(0,0678; 0,0782)
SM	(0,0771; 0,1149)
ST	(0,0655; 0,0865)
SL	(0,0367; 0,0493)
SMZ	(0,0264; 0,0536)
SCL	(0,0667; 0,0793)
SX	(0,0698; 0,1222)

Se tiene un 95% de confianza que la concentración promedio de cada uno de los estándares varía entre los límites indicados en el CUADRO 8.

4.6 Exactitud

Corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero.

4.6.1 Recuperación. Se agregaron los estándares a la miel en (estándar interno) concentraciones conocidas y se determinaron los porcentajes de recuperación para cada una de las sulfas estudiadas

CUADRO 9 Recuperación, para cada sulfamida estudiada, expresada en porcentaje de recuperación, agregando 1 ppm, 2 ppm y 10 ppm de estándar a la miel

SULFA	1 ppm	2 ppm	10 ppm
SD	117	96	111
SZ	67	49	21
SM	83	21	14
ST	49	37	46
SL	79	64	27
SMZ	97	61	25
SCL	85	40	21
SX	94	97	57

En general, a medida que la concentración de estándar disminuye la recuperación se incrementa, es decir que a medida que menos cantidad de sulfas se deba extraer, por este método de extracción, mayor proporción de ella se recupera. Por otra parte indica que esta técnica es aplicable sólo a bajas concentraciones del analito en la matriz, debido a que la linealidad entre concentración y respuesta, según esta técnica, fue probada hasta una concentración máxima de 1,0 ppm.

Si bien la recuperación, por este método, no es muy alta en algunas de las sulfas (CUADRO 9) no dejan de ser interesante los resultados ya que cualquier concentración detectada y/o cuantificada por esta técnica advierte de la presencia de residuos de sulfamidas en la miel y por lo tanto su concentración real es aún mayor. Por lo tanto sería de gran ayuda como método de selección de un gran número de muestras, para conocer si sus niveles sobrepasan el límite máximo permitido. Ya que en la literatura a nivel nacional no se describe un método en HPLC para determinar estos analitos en miel.

Otros autores consiguen porcentajes de recuperación mayores en algunas sulfas específicas (HORIE *et al.*, 1992; VIÑAS *et al.*, 1995; CABALLERO *et al.*, 2001) (ANEXO 7), utilizando otros solventes orgánicos en la extracción de estas o en la composición de la fase móvil o bien incorporando un detector de arreglo de diodo a su equipo HPLC. Pero ninguno analiza una mezcla idéntica o similar a la estudiada en este trabajo. Es así como CABALLERO *et al.* (2001) utilizando una fase móvil micelar de sodio dodecil sulfato (SDS) y mezcla la miel con esta solución micelar antes de inyectar al equipo (previa filtración) obtiene recuperaciones cercanas o superiores al 90 %. Toda la corrida le significan un tiempo de aproximadamente 42 min. Cabe hacer notar que este autor además emplea un sistema automático de inyección de la muestra.

4.7 Sensibilidad

Los parámetros a definir para evaluar la sensibilidad del método fueron: Límite de detección y límite de cuantificación: inicialmente se trató de construir una curva de calibración con concentraciones menores a 0,05 ppm, pero no se obtuvo una respuesta confiable por lo que se determinaron éstos a partir de la curva de calibración de la técnica.

CUADRO 10 Límites de detección y cuantificación para cada sulfa

Sulfa	Clave	Límite de detección	Límite de cuantificación
		(L.D) (ppm)	(L.C) (ppm)
Sulfanilamida	SD	0,02	0,11
Sulfadiazina	SZ	0,03	0,14
Sulfamerazina	SM	0,01	0,06
Sulfatiazol	ST	0,04	0,21
Sulfametizol	SL	0,03	0,16
Sulfametazina	SMZ	0,05	0,24
Sulfacloropiridazina	SCL	0,02	0,11
Sulfadimetoxina	SX	0,03	0,13

Según el CUADRO 10 los valores obtenidos para cada sulfa (ANEXO 8), tanto del límite de detección como cuantificación, difieren unos de otro, especialmente en el caso de sulfamerazina (SM), por lo que se optó por definir un valor cercano al promedio de estos valores. Los límites fijados para la técnica en forma global son los siguientes:

Límite de Detección

LD = 0,05 ppm

Límite de Cuantificación

LC = 0,2 ppm

Sin embargo se debiera encontrar la forma de aumentar la sensibilidad a valores cercanos a 10 ppb (0,01ppm), tal como lo hacen algunos autores que incorporan un detector de fluorescencia al equipo HPLC (LE BOULAIRE *et al.*, 1997).

4.8 Análisis de muestras de miel: para ello se tomaron al azar 10 muestras de miel, provenientes de diferentes orígenes geográficos (ANEXO 9), obteniéndose los resultados que se presentan en el CUADRO 11.

CUADRO 11 Concentraciones promedio (ppm), de cada sulfa, encontradas en 10 muestras de miel

MIEL		SD	SZ	SM	ST	SL	SMZ	SCL	SX
M1	Promedio DER						bld	bld	bld
M2	Promedio DER	blc	0,42 3	bld	blc		blc	blc	bld
M3	Promedio DER	blc	0,29 5	bld	bld		blc	blc	bld
M4	Promedio DER	blc				bld	0,37 6		
M5	Promedio DER	blc	bld			blc	0,48 7	bld	
M6	Promedio DER	blc					blc	bld	bld
M7	Promedio DER	0,34 25	bld				blc	bld	bld
M8	Promedio DER	0,45 9	bld				blc	bld	bld
M9	Promedio DER		bld				bld	bld	bld
M10	Promedio DER								bld

bld= bajo límite de detección (0,05 ppm)

blc= bajo límite de cuantificación (0,20 ppm)

Según los valores encontrados en las muestras de diferentes mieles (CUADRO 11), en un 60% de ellas se encontraron residuos de al menos una sulfa y en concentraciones que superan considerablemente las normas europeas (0,05 ppm), además en el 40% restante no se pudo cuantificar o determinar la presencia de residuos de sulfamidas por estar estos valores bajo los límites de cuantificación o detección fijados para esta técnica.

Si bien 10 muestras no son representativas de la población de mieles de la zona menos aún de la producción nacional, nos deja la inquietud respecto a la real situación que estas presentan.

En resumen, el análisis de las 8 sulfas se realiza en un lapso de 33 min por muestra, si consideramos el costo económico que esto significa se traduce en un menor gasto en reactivos, ya que el acetonitrilo es de uso común en un laboratorio, de igual forma no se requieren equipos muy sofisticados para obtener el extracto desde la miel, sólo se necesita un rotavapor para evaporar el acetonitrilo y no así filtros o sistemas de filtros especiales, ni columnas de separación, las que encarecen y vuelven mas complejas la manipulación de la muestra (HORIE **et al.**, 1992), aumentando la probabilidad de perder parte de ella por efectos de dilución.

Es posible separar sulfas adecuadamente y en concentraciones mucho menores gracias al uso de accesorios más avanzados, donde se mejora la especificidad y sensibilidad, añadiendo por ejemplo, un detector de arreglo de fotodiodos (photodiode array detector, PAD) o un detector de fluorescencia, cuyo costo significarían alrededor de 8,5 millones de pesos y específicamente, en el caso de agregárselo al equipo HPLC utilizado en este trabajo, se deben comprar además la tarjeta GPIB y el software HMS, cotizados ambos (15/04/02) por una cantidad superior a los 2 millones de pesos además de un PC pentium III y un monitor de 17", entre otras cosas.

Encareciéndose los costos enormemente, lo que finalmente se vería reflejado en el valor del análisis y en perjuicio directo del apicultor o de la sociedad comercial interesada en conocer el estado de su producto.

5. CONCLUSIONES

Es posible determinar simultáneamente un grupo de residuos de sulfamidas en miel de abejas mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) en fase reversa.

Se implementó y evaluó una técnica de HPLC - fase reversa por la cual se pudo detectar y cuantificar las siguientes sulfamidas: sulfametiozol, sulfadimetoxina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridazina y sulfametazina.

El método desarrollado es simple, rápido, reproducible y permite evidenciar estas drogas en la miel, con exactitud y precisión aceptables.

6. RESUMEN

Se validó una metodología de análisis por HPLC, para la detección y cuantificación simultánea de residuos de sulfamidas en mieles de abejas: sulfametiozol, sulfadimetoxina, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfanilamida, sulfatiazol, sulfacloropiridazina y sulfametazina. Se utilizó acetonitrilo con TFA al 0,1%, tanto en la extracción de los residuos de sulfamidas como para la fase móvil, en gradiente de elusión.

Los porcentajes de recuperación presentaron un rango entre 49 a 117%, con un límite de detección promedio de 0,05 ppm. El método validado es simple, rápido y confiable.

SUMMARY

A method of analysis using HPLC for simultaneous detection and quantification of residues of sulfonamides in bee honeys was validated: sulfamethiozole, sulfadimethoxine, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfanilamide, sulfathiazole, sulfachloropiridazine and sulfamethazine. Acetonitrile with 0,1% TFA was used for the extraction of sulfonamides residues as well as for mobile phase with elution gradient.

Percentage recoveries lies within a range of 49 to 117%, with a detection limit of 0,05 ppm. The validated method is simple, fast and reliable.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALBO, G. 2001. Enfermedades de la etapa larval loque europea y loque americana *in* Seminario internacional de sanidad apícola 04 de octubre. Temuco. Chile. Pp 24
- ALIPPI, A. 2000. Patología apícola de origen bacteriano en cría de abejas *in* VI encuentro nacional de ciencia y tecnología apícola 12, 13 y 14 agosto de 2000,Valdivia. Chile. Pp 7-22
- BARRY, C. y MACEACHERN, G. 1983. Reverse phase liquid Chromatographic determination of sulfathiazole residues in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* 66 (1): 4-7.
- BELLIARDO, F. 1981. Determination of sulphonamide residues in honey by high pressure liquid chromatography. *Journal of Apicultural Research.* 20: 44-48.
- BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M. y AUDRAN, M. 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B.* 686: 3-10.
- CABALLERO, R.D., TORRES-LAPASIÓ, J.R.; BAEZA-BAEZA, J.J. Y GARCIA ALBAREZ-COQUE, M.C. 2001. Micellar chromatographic procedure with direct injection for the determination of sulfonamides in milk and honey samples. *Journal of Liquid Chromatography. & Related Technologies,* 24(1). 117-131

CAMPANO, S. 2001. Reseña de la situación sanitaria apícola nacional y su relación con presencia de residuos en mieles *in* Seminario internacional de sanidad apícola 4 de octubre. Temuco. Chile. pp:1-2

CHILE, MINISTERIO DE SALUD, REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS (RSA). 1997. Publicado en el Diario Oficial de la República de Chile. Título XVII, Párrafo III, Artículo 393 y 394.

FAO/OMS. ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1994. Codex Alimentarius. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 3 : 54-58.

_____1989. Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos. 34º Informe del Comité Mixto de expertos en Aditivos Alimentarios. Organización Mundial de la Salud, Ginebra

FRITZSCH, W.; BREMER, R. 1975. Higiene y profilaxis en apicultura. Acribia. Zaragoza. España. 200 p.

GREEN, J.M. 1996. A practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry News & Features, Washington, D.C. USA. May 1, 305-309.

GRIMALT F., y ROMAGUERA. C. 1980. Dermatitis de contacto. Fontalba. Barcelona-España. pp 15-151-152

HORIE M.,SAITO K.,y NOSE N. 1992. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International. 75(5): 787-789

LE BOULAIRE, S., BAUDURET, J.C., ANDRE, F.1997. Veterinary drug residues survey in meat: an HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 45: 2134-2142

NEIRA, M. 2001. Residuos que contaminan la miel, origen, detección y formas de evitar su presencia *in* Seminario internacional de sanidad apícola 04 de octubre. Temuco. Chile. pp. 46-50.

OROZCO, P. 2000. Criterios de selección en análisis de hidrocarburos en suelos.
(On Line)<http://www.portal-ambiental.com.ar/apuntes/seccion_notas/criterios_selecci%C3%B3n_de_analisis.htm> (15 nov. 2000).

PAGLIUCA,G.,GAZZOTTI,T.,KINDT,M.,ZIRONI,E.,FORMATO,G.,ROSMINI,R.1999."La vigilancia sanitaria sul miele: proposta di un metodo analitico per la determinazione di residui di ossitetraclina e sulfatiazolo mediante HPLC". Correo personal.< pagliuca@vet.unibo.it > (10 oct. 2000).

QUATTROCCHI,O.,DE ANDRIZZI,S.,LABA,R.1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. Argentina. 407p

RODRIGUEZ, R. 2002. Home page (On Line).Universidad Autónoma de México. Estructura de las proteínas. La cromatografía en fase reversa. <<http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/Eprpc.html>> (11 marzo 2002).

VIÑAS P.,LOPEZ C., HERNANDEZ A., HERNANDEZ M. 1995. Liquid chromatographic analysis of sulfonamides in foods. *Chromatographia*. 40 (7/8) 382-386.

YOST R.W., ETTRE L.S., CONLON R.D. 1980. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Perkin-Elmer Corporation. Norwalk. USA. pp 29-82.

ANEXOS

ANEXO 1

Definición de sulfamidas

Son análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico (PABA) que es un precursor del ácido fólico. Estos antimicrobianos interfieren en la síntesis del ácido tetrahidrofólico que funciona como coenzima en la síntesis de metionina, timina y purinas. Compiten con el PABA por el sitio activo de la enzima y además actúan como sustratos de ésta.

Son activos frente a microorganismos capaces de sintetizar ácido fólico, pero no actúan frente a microorganismos que carecen de la enzima y que requieren el agregado exógeno de ácido fólico preformado. Los microorganismos son impermeables al ácido fólico por lo tanto la presencia de este compuesto en tejidos no interfieren con la actividad de este antimicrobiano. Las células de los mamíferos también requieren de ácido fólico preformado debido a que no pueden sintetizarlo y, por lo tanto, no son afectadas por las sulfamidas mediante este mecanismo.

Son bacteriostáticos que inhiben a un gran espectro de microorganismos Gram positivos, Gram negativos, Clamidias y ciertos protozoarios. Se utiliza en infecciones urinarias, infecciones respiratorias, infecciones meningocócicas, nocardiosis, tracoma y conjuntivitis de inclusión, linfogranuloma venéreo, toxoplasmosis y en profilaxis alternativa de fiebre reumática en pacientes alérgicos a penicilina.

Entre los efectos adversos de las sulfamidas se pueden mencionar fiebre, náuseas, vómitos, reacciones de hipersensibilidad como erupciones cutáneas, trastornos gastrointestinales, efectos tóxicos en el hígado y cristaluria en el tracto urinario.

Fuente: Adaptado de IAÑEZ, E. Curso de Microbiología General. Quimioterapéuticos de síntesis y antibióticos.(On Line) <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/20_Micro.html> (22 nov.2001).

ANEXO 2

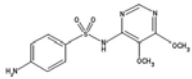
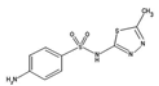
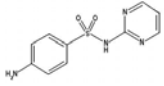
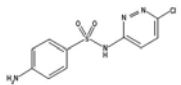
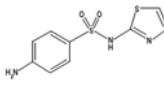
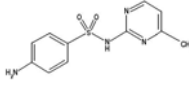
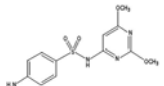
Longitudes de onda en que se obtiene la máxima absorción (λ_{\max}) de las 8 sulfamidas estudiadas

SULFAMIDA	λ_{\max} (nm)
SULFACLOROPIRIDAZINA	266
SULFADIAZINA	218
SULFADIMETOXINA	264
SULFAMERAZINA	246
SULFAMETAZINA	246
SULFAMETIZOLE	274
SULFANILAMIDA	260
SULFATIAZOLE	284

FUENTE: Adaptado de CABALLERO *et al.* 2001

ANEXO 3

Características químicas de las 8 sulfamidas estudiadas

SULFAMIDA	CODIGO SIGMA	FORMULA	ESTRUCTURA	SOLUBILIDAD EN ACETONA
Sulfanilamida	S-9251	$C_6H_8N_2O_2S$		INSOLUBLE
Sulfametizol	S-5632	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$		BAJA
Sulfadiazina	S-8626	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$		BAJA
Sulfacloropiridazina	S-9882	$C_{10}H_9ClN_4O_2S$		SIN INFORMACION
Sulfatiazol	S-9876	$C_9H_9N_3O_2S_2$		ALTA
Sulfamerazina	S-8876	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$		BAJA
Sulfadimetoxina	S-7007			INSOLUBLE
Sulfametazina	S-6256			SIN INFORMACION

FUENTE: Adaptado de SIGMA-ALDRICH (2000-2001) St. Louis,MO. USA.Y THE INDEX MERCK (1994),Ed.11. N.J., USA.

ANEXO 4

Recuperación de las sulfamidas, en porcentaje, para cada técnica ensayada

SULFAMIDA	% recuperación Técnica A (a)	% recuperación Técnica B (b)	% recuperación Técnica C (c)*
Sulfanilamida	4	102	54
Sulfametazina	22	9	50
Sulfatiazol	108	12	16
Sulfametizol	22	36	48
Sulfadiazina	10	15	22
Sulfamerazina	35	90	24
Sulfacloropiridazina	43	24	16
Sulfadimetoxina	37	11	8

Concentración de estándar agregada a la miel para cada técnica:

(a)= 0,2 ppm; (b)= 0,4 ppm; (c)=2,5 ppm

* Empleando metanol como eluyente.

ANEXO 5

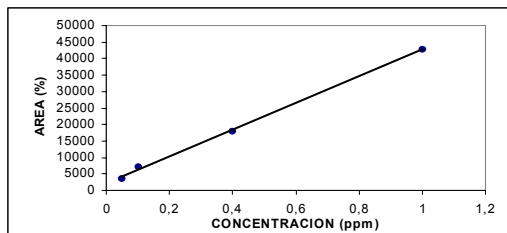
Tiempos de retención (min) para cada sulfamida, promedio (PROM) y desviación estándar (DE), para cada nivel de concentración de la curva de calibración

NIVEL	SD	SZ	SM	ST	SL	SMZ	SCL	SX
1	3,96	8,90	10,82	11,95	13,5	17,75	20,74	30,16
2	3,81	8,63	10,59	11,64	13,04	17,47	20,43	29,90
3	3,82	8,55	10,32	11,42	12,74	17,38	20,35	29,84
4	3,82	8,54	10,34	11,40	12,72	17,39	20,34	29,66
5	3,96	8,88	10,75	11,88	13,32	17,60	20,63	29,94
PROM	3,80	8,70	10,56	11,66	13,06	17,52	20,50	29,90
DE	0,08	0,20	0,23	0,25	0,35	0,16	0,18	0,18

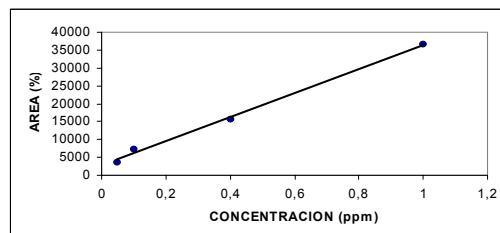
ANEXO 6

Curvas de Calibración para cada sulfá.

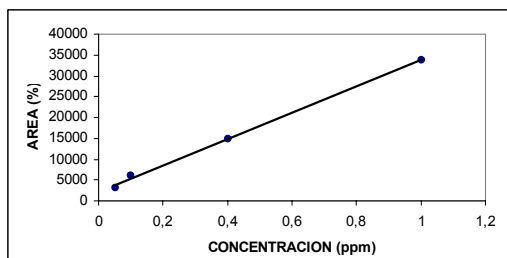
6.1 SULFADIAZINA (SZ)



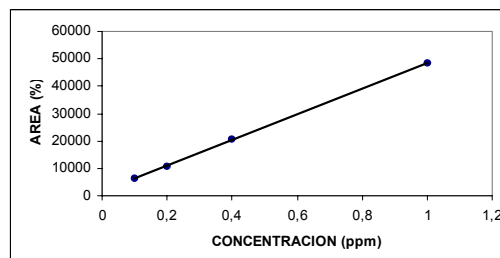
6.2 SULFAMERAZINA (SM)



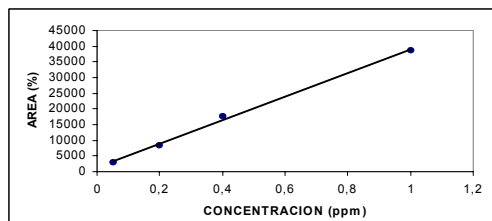
6.3 SULFATIAZOL (ST)



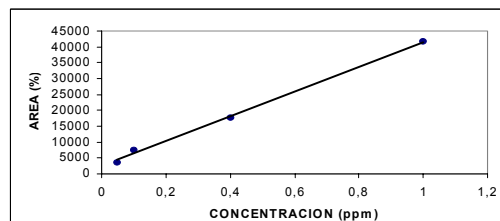
6.4 SULFAMETIOZOL (SL)



6.5 SULFAMETAZINA (SMZ)



6.6 SULFACLOROPIRIDAZINA (SCL)

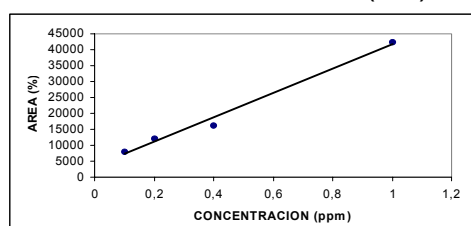


(continúa)

ANEXO 6 continuación

Curvas de Calibración para cada sulfa.

6.7 SULFADIMETOXINA (SX)



ANEXO 7

Recuperación según diversos autores, expresada en porcentaje.

SULFAS	HORIE et al, 1992 (%)	VIÑAS et al, 1995 (%)	CABALLERO et al, 2001 (%)
SULFATIAZOL	62,1	95,1	82
SULFADIAZINA	85,6	99,0	89
SULFAMERAZINA	86,2	-	81
SULFAMETAZINA	86,0	-	-
SULFACLOROPIRIDAZINA	82,5	-	-
SULFADIMETOXINA	85,2	-	82
SULFAMETIZOL	-	-	78
SULFANILAMIDA	-	-	119

ANEXO 8

Cálculo de los límites de detección y cuantificación

Límite de detección

$$LD = (2 \cdot S_{yx})/b$$

Límite de cuantificación

$$LC = (10 \cdot S_{yx})/b$$

Donde **S_{yx}** es el error estándar y **b** es la pendiente de la ecuación de regresión.

Ejemplo de cálculo para la curva de calibración para sulfametiozol (SL).

CONC (ppm) (X)	AREA (%) (Y)
0,10	5.248
0,20	8.608
0,40	18.217
1,00	47.032

De estos datos se obtiene:

ERROR ESTANDAR (S_{yx}) = 744,474935

ECUACION DE LA RECTA: $Y = 47.068X + 228$

INTERCEPTO (a) = 228

PENDIENTE (b) = 47.068

LD = 0,03163402

LC = 0,15817008

De igual manera se calcula para las 7 sulfas restantes sus respectivos límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

ANEXO 9**Origen geográfico de las 10 mieles analizadas**

MIEL	ORIGEN GEOGRAFICO (REGIÓN)
M1	VIII
M2	VIII
M3	VIII
M4	X
M5	X
M6	X
M7	VII
M8	VIII
M9	VIII
M10	X