



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETECCION DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN
ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

ANALHIA MONTSERRAT RIOS LOPEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas.

PROFESOR GUIA: Dra. BETTY SAN MARTIN NUÑEZ

SANTIAGO, CHILE
2009

INDICE:

- Resumen	2
- Summary.....	3
- Introducción	4
- Revisión bibliográfica	6
- Características de las sulfonamidas.....	6
- Origen e historia.....	6
- Estructura química.....	7
- Mecanismo y espectro de acción.....	8
- Mecanismos de resistencia.....	9
- Farmacocinética.....	10
- Aplicaciones terapéuticas.....	11
- Efectos adversos en salud humana.....	13
- Interacciones medicamentosas.....	14
- Inocuidad alimentaria.....	15
- Medicamentos veterinarios.....	15
- Residuos farmacológicos.....	17
- Límite máximo para residuos.....	18
- Período de suspensión o período de resguardo.....	19
- Normativas internacionales.....	19
- Normativa chilena.....	21
- Validación del método analítico.....	21
- Determinación de residuos de sulfonamidas.....	24
- Objetivos	26
- Material y método	27
- Material.....	27
- Metodología.....	28
- Validación del método analítico.....	29
- Resultados	37
- Discusión	47
- Conclusiones	52
- Bibliografía	53
- Anexos	57

Resumen:

Las sulfonamidas fueron los primeros antimicrobianos sintéticos usados ampliamente para combatir enfermedades infecciosas. El uso rutinario provocó un rápido establecimiento de resistencia bacteriana, siendo reemplazada por otros antibióticos y antimicrobianos de mayor eficacia. Su uso terapéutico es principalmente junto a las aminopirimidinas ya que actúan sinérgicamente inhibiendo la síntesis del ácido fólico, un precursor de las purinas en las bacterias, logrando en conjunto ser bactericidas.

La administración de antibióticos y sulfamidas en los animales de abasto ha provocado que en los productos finales como: leche, carne, huevos y miel se encuentren residuos farmacológicos. Los organismos internacionales han declarado que estos residuos farmacológicos afectan la salud de los consumidores y, por lo tanto, deben encontrarse dentro de los rangos tolerables para que no afecten la salud y la vida. El control de los residuos farmacológicos se realiza rutinariamente en los laboratorios acreditados por organismos internacionales, donde se determinan los límites máximos residuales para cada tipo de fármaco y analito. Los métodos analíticos que determinan cualitativa y cuantitativamente a los residuos farmacológicos deben estar validados siguiendo las pautas de recomendación internacional.

Este trabajo validó un método analítico para 7 sulfonamidas según los parámetros internacionales del Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002/657/CE); donde el análisis de la especificidad del método resultó adecuada sin observarse alteraciones ni interferencias en los puntos de lectura; a la vez se determinó la recuperación, repetitividad, precisión y robustez resultando conforme a lo exigido por la normativa señalada, finalmente se calcularon el límite decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$), lográndose en forma exhaustiva la validación del método analítico.

Palabras claves: sulfonamidas, residuos farmacológicos, límite máximo residual, método analítico, validación.

Summary:

Sulphonamides were the first synthetic antibiotics used widely against infectious disease. Their use as routine caused an incredible fast development of resistant bacterias, being replaced for most efficient antibiotics. Its therapeutic use is next to the aminophirimidines by acting synergistically stopping the metabolism of folic acid, a precursor of nucleic acids in bacteria, getting together be an important bactericide.

The use of antibiotics and sulphonamides in animals feedingstuffs has caused in final products like milk, meat, eggs and honey we can find pharmacologic products. Several International organizations has sided that these drug residues affect the health of consumers and therefore must be found within the tolerable range for which do not affect the health and life. The control of these pharmacologic residues is done routinely in laboratories accredited by international organization, which determine the maximum residual for each type of drug and analyte. Analytical methods that determine qualitatively and quantitatively to drug residues must be validated under international recommendations.

This work validated an analytical method for 7 sulfonamides according to international parameters of the Official Journal of the European Communities (2002/657/EC), where the analysis of the specificity of the method was appropriated, without observed alterations or without interference at the point of reading to once it was determined recovery, repeatability, precision and trueness under it as required by the rules outlined above, the limit decision was finally calculated ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$), resulting in a comprehensive manner the validation of analytical method.

Keywords: sulphonamides, pharmacologics residual, maximum residual limits, analytical method, validation.

INTRODUCCION:

En la actualidad, el uso de fármacos como los antibióticos y las sulfamidas y otros aditivos químicos en las especies animales productoras de alimento, han llegado a adquirir tal importancia que son fundamentales en la economía del sistema. Esto es gracias a la obtención final de grandes proporciones de producto alimenticio, el cual se logra generando una apropiada condición de salubridad en las grandes masas ganaderas mediante el control de enfermedades infecciosas o bien, mediante medidas profilácticas, importante por el confinamiento permanente en que se encuentran. La producción y utilización de estos productos farmacéuticos y aditivos químicos se realiza bajo estrictas normas establecidas tanto en el ámbito internacional como nacional.

Las normativas que aseguran un producto inocuo para los consumidores incluyen los protocolos de uso, que establecen los períodos de carencia, dosificación, límites máximos residuales, medicamentos permitidos y prohibidos, etc.; además, establecen los mecanismos por los cuales se determina qué alimento es apropiado para el consumo y cual no lo es, mediante exámenes de residuos de fármacos, determinando sus niveles y contenidos.

Existen diferentes métodos analíticos para determinar la presencia de residuos de fármacos; estos pueden ser cuantitativos o cualitativos. Estos métodos analíticos se desarrollan y se realizan en laboratorios debidamente acreditados a nivel nacional e internacional para asegurar la veracidad de sus resultados, por lo tanto la validación de un método debe seguir la pauta de recomendación de organismos internacionales para demostrar que cumplen con sus objetivos y que son reproducibles en sus resultados.

Las sulfonamidas fueron los primeros antibacterianos sintéticos utilizados en el control y prevención de enfermedades infecciosas en los humanos, usadas ampliamente en un comienzo, actualmente ha disminuido drásticamente su utilización por presentar una alta proporción de resistencia y por la generación de mejores alternativas farmacéuticas. Su mayor uso es en combinación con las diaminopirimidinas, ya que al estar unidas, ambas se potencian logrando ser bactericidas.

Hay una gran variedad de métodos analíticos que determinan residuos de sulfonamidas, tales como microbiológicos, inmunológicos y químicos, siendo los más sensibles y específicos estos últimos.

El objetivo de este trabajo es validar un método analítico químico orientado a la detección de residuos de sulfonamidas en productos alimenticios de origen animal, de acuerdo a las normativas internacionales de la Unión Europea.

REVISION BIBLIOGRAFICA:

Características de las sulfonamidas:

Las sulfamidas son un importante grupo de antimicrobianos sintéticos, siendo usados en la terapéutica humana y veterinaria desde hace 60 años. Hace algunos años estas drogas se han introducido extensamente en animales de producción, y sus residuos son de gran preocupación debido a la posibilidad de riesgo en la salud humana, tal como son el desarrollo de resistencia y toxicidad (Pecorelli *et al.*, 2004).

1.- Origen e historia:

Las sulfamidas constituyen el primer ejemplo de sustancia química con propiedades antibióticas sintetizadas por el hombre. En 1908, Paul Gelmo descubrió la primera sulfonamida de forma accidental buscando mejores colorante para teñir lana. En 1935, Gerhard Domagk publicó el primer informe acerca de la capacidad antimicrobiana de este tinte el cual sería conocido como Prontosil. Foerster, en 1933, publicó el resultado de la primera prueba clínica de las sulfonamidas en un lactante con sepsis estafilocócica, donde se determinó su eficacia. Posteriores investigaciones revelaron que el Prontosil se metaboliza en el organismo humano produciendo sulfanilamida, siendo este metabolito el responsable de la actividad antimicrobiana; este descubrimiento llevó a Domagk a la consecución del premio Nobel de medicina en 1938. La primera sulfamida sintetizada comercialmente fue la sulfanilamida, la cual cristaliza en la orina del paciente, provocando lesiones irreversibles en los riñones. El desarrollo de sulfamidas hidrosolubles en la década de los 30', acabó con este problema. Desde entonces y hasta mediados de los 40' se sintetizaron más de 500 derivados de la sulfanilamida con actividad antimicrobiana (Martín-Jiménez, 2002).

La enorme importancia que tuvo el descubrimiento de las sulfonamidas en medicina y salud pública, se reflejaron rápidamente en la disminución neta de las cifras de morbilidad y mortalidad de enfermedades infecciosas tratables. Con el advenimiento de la penicilina y los antibióticos, disminuyó la utilización de las sulfonamidas como tratamiento único antimicrobiano y, en la actualidad su importancia es relativamente pequeña en el instrumental terapéutico del médico (Petri, 2003).

Posteriores observaciones demostraron un efecto sinérgico entre las sulfamidas y las diaminopirimidinas, sustituyendo paulatinamente el uso de las sulfamidas solas; actualmente el uso habitual de las sulfamidas es en combinación con trimetoprim, ormetoprim o aditoprim en lo que se conoce como sulfamidas potenciadas (Martín-Jiménez, 2002).

2.- Estructura química:

El término sulfonamida se utiliza como nombre genérico para derivados de la paraaminobenzenosulfonamida (sulfanilamida) (Petri, 2003). Todas las sulfamidas comparten en su estructura el grupo p-aminobenceno sulfonamida, clave para la acción antibacteriana dado que se parece al ácido p-aminobenzoico, precursor del ácido fólico y de los ácidos nucleicos en las bacterias (Martín-Jiménez, 2002); en la figura 1 se compara la estructura química del ácido paraaminobenceno con la sulfanilamida y en la figura 2 se muestran distintas estructuras químicas de sulfonamidas. El grupo amida (SO_2NH_2) no es esencial en sí, pero es importante que se encuentre unido al anillo benceno; las sustituciones a nivel del radical sulfonilo modifican las características farmacocinéticas pero no la actividad antibacteriana. El grupo para- NH_2 (grupo amino) puede sustituirse solo por radicales que se transformen “in vivo” en grupo amino libre (Petri, 2003). Las sulfamidas se comportan como anfóteras, sin embargo en formulaciones comerciales con sales de sodio se comportan como ácidos débiles; por esto, la alcalinización de la orina aumenta la solubilidad de las sulfamidas en la misma, ayudando a prevenir el problema de la cristalización de las antiguas formulaciones en los túbulos renales (Martín-Jiménez, 2002).

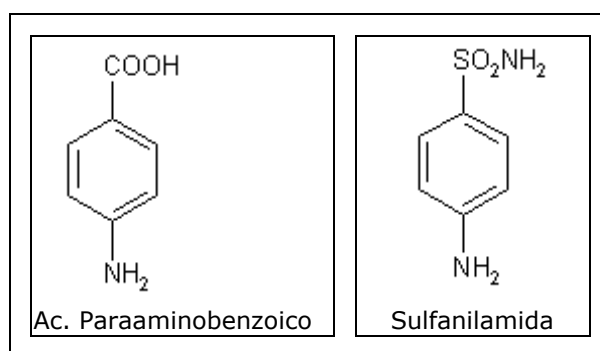


Figura 1: Comparación de estructura de sulfonamidas y ácido para-aminobenzoico.

Fuente: Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Bogotá.

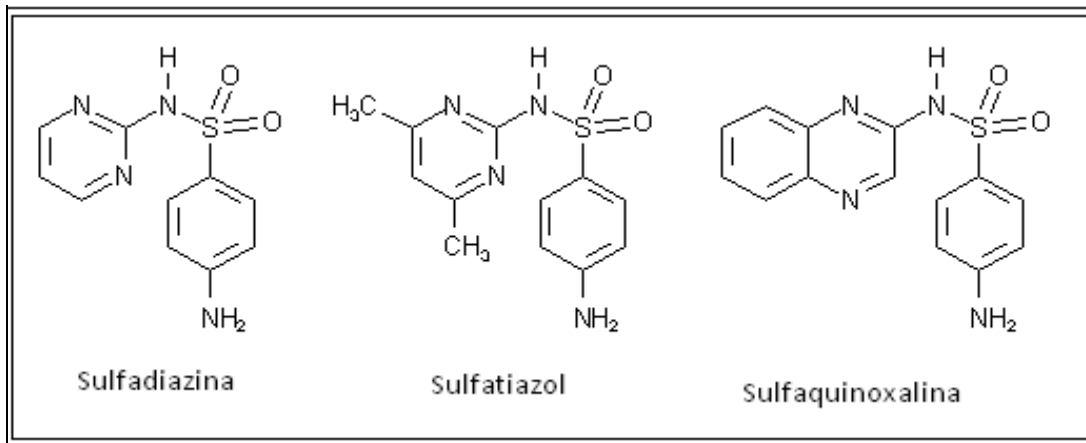


Figura 2: Estructuras de distintas Sulfonamidas.

Fuente: Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Bogotá.

3.- Mecanismo y espectro de acción:

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido p-aminobenzoico (PABA), por tal razón, impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis del ácido fólico. De forma más específica son inhibidores competitivos de la *dihidropteroato sintetasa*, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico (Petri, 2003).

Posteriormente el ácido fólico se transforma en ácido tetrahidrofólico, siendo esta reacción catalizada por la enzima *dihidrofolato reductasa*, la cual es bloqueada por las diaminopirimidinas. Las sulfonamidas junto a las diaminopirimidinas en forma secuencial bloquean la síntesis del ácido tetrahidrofólico bacteriano, precursor de las purinas y de los ácidos nucleicos y consecuentemente, altera la síntesis de proteínas y los mecanismos de replicación bacteriana. Las sulfamidas por sí solas ejercen una acción bacteriostática, pero combinadas con trimetoprim u otras diaminopirimidinas pueden ejercer una acción bactericida (Martín-Jiménez, 2002).

Las células de los mamíferos y de algunas bacterias carecen de las enzimas necesarias para la síntesis de folatos y dependen exclusivamente de una fuente exógena de folato, como la proveniente de la dieta, por eso estos no son susceptibles a las sulfonamidas (Katzung, 2002).

Las sulfamidas son fármacos antimicrobianos de amplio espectro, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas, Gram negativas y ciertos protozoos, como los coccidios. Se consideran ineficaces frente a la mayoría de anaerobios obligados, por lo que no se recomienda su uso para este tipo de infecciones. Entre los organismos habitualmente susceptibles a la acción de las sulfamidas se incluyen: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Brucella*, *Cryptosporidium*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Chlamydia*, *Toxoplasma*, coccidios y *Pneumocystis carinii*. Otros microorganismos como *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium* y *Bacteroides*, son habitualmente resistentes, tanto a las sulfamidas solas como a la combinación con trimetoprima u otras diaminopirimidinas (Martín-Jiménez, 2002).

La combinación trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) es la más común y la de mayor utilización en el tratamiento terapéutico, siendo usualmente activa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*; *Streptococcus pneumoniae* y *S. viridans*; numerosas Enterobacteriaceas como *Salmonella* y *Shigella*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, y *Stenotrophomonas maltophilia*. Los enterococos, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* y los anaerobios suelen ser resistentes o menos susceptibles. El TMP-SMX es también efectivo frente a *Pneumocystis carinii*, *Listeria monocytogenes*, muchas especies de *Nocardia*, *Yersinia enterocolitica* y *Legionella pneumophila* (Instituto Químico Biológico, 2005).

4.- Mecanismos de resistencia:

La resistencia a las sulfamidas es bastante frecuente y debido a la similitud de acción entre los diversos miembros de este grupo, esta resistencia normalmente es cruzada (Martín-Jiménez, 2002). La resistencia a las sulfamidas puede ser por mutación, selección aleatoria y más frecuente la adquirida por plásmidos u otros elementos génicos móviles que, además de la resistencia a las sulfamidas portan genes de resistencia a otros antibióticos. El gen de resistencia a sulfamidas (*su11*) es un elemento constante en los integrones tipo 1, el integrón encontrado con más frecuencia en cepas de casos clínicos con resistencia a sulfamidas y múltiples antibióticos (Perez-Trallelo, 2003). La resistencia una vez que ha alcanzado su máximo suele persistir y es irreversible, particularmente cuando se produce “in vivo”. La resistencia a las sulfamidas podría también ser consecuencia de la alteración de la constitución enzimática de una bacteria, tales modificaciones se caracterizan por: 1) alteración en la

enzima que utiliza PABA, la *dihidropteroato sintetasa*; 2) mayor capacidad de destruir o inactivar al fármaco; 3) una vía metabólica alternativa para la síntesis de un metabolito esencial, o 4) mayor producción de un metabolito esencial o de un antagonista del compuesto. El punto final es el que recibe mayor atención, observándose en algunas bacterias resistentes la capacidad de producir hasta 70 veces más PABA que las cepas originales sensibles (Petri, 2003).

5.- Farmacocinética:

Las sulfonamidas por regla general, atraviesan membranas biológicas con facilidad por ello, su absorción oral es generalmente extensa, rápida y con una amplia distribución en el organismo. La excepción la constituyen las sulfamidas gastrointestinales, cuya acción es local. La biodisponibilidad de las sulfamidas es generalmente alta. Una vez absorbidas, se distribuyen por la mayoría de los tejidos, incluyendo próstata, cavidad articular, ojo, placenta y sistema nervioso central, por lo que se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones de dichos tejidos (Martín-Jiménez, 2002). Las sulfamidas absorbidas se unen a las proteínas séricas, variando en una extensión que va de 20 a más del 90%. Las concentraciones terapéuticas van de un rango de 40 a 100 µg/mL en sangre y las concentraciones sanguíneas máximas, por lo general, se producen de 2 a 6 horas después de la administración oral (Katzung, 2002).

Las sulfamidas se eliminan por una combinación de excreción renal y biotransformación hepática, por lo que las diferencias entre especies son muy altas. La biotransformación es saturable y tiene lugar principalmente por acetilación, glucuronidación e hidroxilación aromática (Martín-Jiménez, 2002).

El tipo y cantidad de metabolitos depende del tipo de sulfamida, la especie, la edad, la dieta, factores clínicos relativos a la enfermedad en curso y el sexo. La excreción renal es la vía principal de eliminación de la mayoría de las sulfamidas y tiene lugar por filtración glomerular, secreción tubular del compuesto original y sus metabolitos y reabsorción pasiva de la forma neutra de la molécula en los túbulos renales (Martín-Jiménez, 2002). Cantidades pequeñas de los fármacos se eliminan en heces, bilis, leche materna y otras secreciones (Petri, 2003).

Las características farmacocinéticas de las sulfamidas son aplicables a un gran porcentaje de ellas, sin embargo existen diferencias extremas entre diferentes fármacos

de este grupo, con niveles de unión a proteínas plasmáticas que oscilan entre el 20 y 95% y fracciones ionizadas en sangre que oscilan entre el 1 y 99%. La proporción más adecuada para las sulfamidas potenciadas con las diaminopirimidinas sería de 20:1 respectivamente, lográndose de este modo eficacia clínica (Martín-Jiménez, 2002).

Las sulfamidas pueden clasificarse en tres grupos dependiendo de la rapidez de absorción y excreción: 1) compuestos que se absorben y se excretan con rapidez como sulfisoxazol y sulfadiazina; 2) medicamentos que se absorben muy poco cuando se administran por vía oral y son activos en el interior del intestino como la sulfasalazina; 3) sulfamidas utilizadas localmente, como sulfacetamida, mafénida y sulfadiazina argéntica, y 4) sulfamidas de acción prolongada, como sulfadoxina que se absorben con rapidez, pero se excretan lentamente (Petri, 2003).

6.- Aplicaciones terapéuticas:

El número de enfermedades infecciosas en las que son útiles las sulfamidas como compuestos terapéuticos y en los que constituyen productos de primera elección han disminuido con la síntesis de antimicrobianos más eficaces y por el incremento gradual en la resistencia de diversas especies bacterianas a ellas. Sin embargo, el uso de sulfamidas ha sido mayor desde que se introdujo en clínica la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol (Petri, 2003).

Entre los fármacos absorbibles por vía oral se encuentran el sulfisoxazol y el sulfametoxazol; estos son fármacos de acción corta a media, utilizados casi exclusivamente para tratar infecciones en vías urinarias; pueden combinarse con fenazopiridina, un anestésico de las vías urinarias. La sulfadiazina, otro fármaco absorbible por vía oral, logra concentraciones terapéuticas en líquido cefalorraquídeo y en combinación con pirimetamina son de primera línea para el tratamiento de toxoplasmosis aguda. La sulfadoxina en combinación con pirimetamina, es utilizada de segunda línea en el tratamiento del paludismo.

La sulfasalazina (salicilazosulfapiridina) es un fármaco oral no absorbible, se utiliza ampliamente en colitis ulcerativa, enteritis y en otras enfermedades inflamatorias del intestino.

Dentro de los fármacos tópicos, la sulfacetamida de sodio en solución oftálmica o en ungüento, es un tratamiento eficaz para la conjuntivitis bacteriana y como terapéutica

adyuvante en el tracoma. El acetato de mafénida se utiliza tópicamente para prevenir la colonización bacteriana y la infección en las lesiones por quemadura. La sulfadiazina argéntica también se utiliza para prevenir las infecciones de las lesiones por quemadura (Katzung, 2002).

En Medicina Veterinaria las sulfonamidas son una de las principales herramientas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales de producción y compañía (mascotas) (Bevill, 1994).

En los rumiantes adultos, dada la escasa absorción oral, se recomienda la vía parenteral, salvo en individuos jóvenes. La combinación de sulfadiazina o de sulfadoxina y trimetoprim es eficaz en el tratamiento de sepsis por colibacilosis, salmonelosis en terneros, infecciones urinarias y procesos respiratorios; la combinación sulfadoxina-trimetoprim también se utiliza en el tratamiento de pododermatitis infecciosa en los rumiantes. En el caso de la mastitis, se necesitan dosis muy altas debido a la escasa distribución del fármaco en la glándula mamaria (Martín-Jiménez, 2002).

En equinos, la combinación sulfamida-trimetoprim constituye una de las pocas alternativas que existen de dosificación oral efectiva, por lo que se utiliza en esta especie en el tratamiento de diversos tipos de infecciones. Las dos combinaciones más comunes para empleo en esta especie son trimetoprim con sulfametoxazol o con sulfadiazina. Esta última es la más utilizada para el tratamiento de infecciones urinarias. También se utiliza en el tratamiento de infecciones respiratorias agudas, como faringitis estreptocócica y es uno de los fármacos más efectivos en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales causadas por gérmenes del género *Salmonella*. Otras infecciones en las que se utilizan en los equinos son las causadas por *Escherichia coli* y *Actinobacillus spp*. Las combinaciones con pirimetamina son especialmente eficaces frente a infecciones protozoarias (Martín-Jiménez, 2002).

Las sulfamidas potenciadas se han utilizado ampliamente en el ganado porcino para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, salmonelosis, colibacilosis, meningitis estreptocócica y neumonía. También se utilizan en el tratamiento y la prevención de la rinitis atrófica y la neumonía por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Martín-Jiménez, 2002).

En perros y gatos, las combinaciones de sulfadiazina y trimetoprim y de ormetoprim con sulfadimetoxina se utilizan en el tratamiento de infecciones respiratorias, cutáneas, urinarias, gastrointestinales ocasionadas por organismos sensibles y en el tratamiento de la sepsis causada por *Streptococcus zooepidemicus*. Estas combinaciones también se utilizan en perros y gatos para el tratamiento de nocardiosis (Martín-Jiménez, 2002).

En aves se utilizan diversas combinaciones de sulfamidas y diaminopirimidinas para el tratamiento y la profilaxis de coccidiosis, pasteurelisis y colibacilosis en gallináceas (Martín-Jiménez, 2002).

7.- Efectos adversos en salud humana:

Los efectos adversos en la población humana después de administrar sulfonamidas son variados y su incidencia global es del 5% aproximadamente (Petri, 2003).

Las reacciones alérgicas inducidas por sulfamidas ocurren entre un 29 a 65% en los pacientes con VIH-SIDA, comparado con un 2 a 4% de ocurrencia en los otros pacientes (Greenberger, 2006).

Entre las reacciones adversas más características se pueden citar:

a.- Alteraciones de las vías urinarias, siendo el peligro principal la cristaluria. Es de baja incidencia en la actualidad, el trastorno ocurre principalmente en individuos deshidratados que presentan un pH urinario notablemente bajo; se debe asegurar un ingreso de líquido mínimo que permita 1.200 mL de orina en individuos adultos además de alcalinizar la orina si su pH es extraordinariamente bajo.

b.- Trastornos del sistema hematopoyético, como la anemia hemolítica aguda que se ha asociado a un fenómeno de sensibilización en algunos pacientes. También la hemólisis se ha relacionado con una deficiencia de la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La agranulocitosis se observa en 0,1% de los pacientes y es posible que se necesite el transcurso de semanas o meses desde la suspensión del tratamiento con sulfamidas para que se normalice el número de granulocitos; casi todos los enfermos presentan una recuperación espontánea con medidas de sostén. La anemia aplásica se presenta solo raras veces y puede ser consecuencia del efecto mielotóxico directo; puede ser fatal.

c.- Reacciones de hipersensibilidad, que pueden ser variadas. Entre las manifestaciones cutáneas y de mucosas atribuidas a la sensibilización a una sulfamida están: erupciones morbiliforme, escarlatínica, urticariana, erisipeloide, penfigoide, purpúrica y petequiral, y eritemas nudosos y multiforme del tipo de Steven-Johnson, el síndrome de Behçet, dermatitis exfoliativa y fotosensibilidad. Por lo general ocurren luego de la primera semana de tratamiento y en individuos con sensibilización previa. La incidencia de efectos dérmicos adversos es de 2% y afecta mayormente a pacientes con SIDA. Puede coexistir con fiebre, malestar generalizado y prurito. En menos de 0,1% de los enfermos, surge necrosis focal difusa del hígado por toxicidad directa del fármaco o sensibilización, de 3 a 5 días después aparecen cefalea, náusea, vómito, fiebre, hepatomegalia, ictericia y disfunción hepatocelular, el síndrome puede evolucionar a atrofia amarilla aguda y muerte.

d.- Reacciones diversas: entre el 1 y 2% de quienes reciben sulfonamidas aparece anorexia, náuseas y vómito, tal vez originados en el sistema nervioso central. La administración en neonatos y particularmente en prematuros, puede desplazar la bilirrubina desde la albumina plasmática y en neonatos la bilirrubina libre puede depositarse en los ganglios basales y núcleos subtalámicos del encéfalo y ocasionar una encefalopatía llamada *kernicterus* (Petri, 2003).

Como la mayor parte de las sulfamidas se metabolizan en el hígado, en los pacientes con insuficiencia hepática puede producirse un retraso en su metabolización con acumulación del fármaco y el consiguiente aumento de reacciones adversas (Instituto Químico Biológico, 2005). Es conveniente no usar en embarazadas cerca del fin de la gestación por su posible traspaso a la placenta y leche. Algunas formas de toxicidad posiblemente dependan de diferencias de cada persona en el metabolismo de estos compuestos (Petri, 2003).

8.- Interacciones medicamentosas:

Las sulfamidas presentan diversas interacciones medicamentosas, las principales son que potencian a los anticoagulantes e hipoglucemiantes orales, metotrexato, diuréticos tiazídicos, fenitoína y uricosúricos. Esto se debe a que compiten por las proteínas plasmáticas, siendo desplazados y aumentando su biodisponibilidad. Las sulfamidas son

potenciadas a su vez por: indometacina, fenilbutazona, salicilatos y probenecid; ellos desplazan a las sulfamidas de su sitio de fijación proteica (Lima, 2005).

Inocuidad alimentaria:

La inocuidad de los alimentos es un elemento fundamental de la salud pública y un factor determinante del comercio de alimentos. Involucra a los productores primarios, los manipuladores de alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria, los servicios oficiales de control de alimentos y a los consumidores. La amenaza a la inocuidad alimentaria está determinada por una serie de factores como: la utilización de pesticidas en sistemas agrícolas y sus residuos tóxicos en alimentos y agua potable; el uso de hormonas y medicamentos veterinarios con fines profilácticos o como promotores del crecimiento que dejan residuos en los productos finales; prácticas antihigiénicas en plantas procesadoras, en el transporte y/o en el comercio de los productos alimentarios. El establecimiento de legislación y reglamentación alimenticia es un componente esencial de un sistema moderno de control de los alimentos (Red Sanitaria, 2005).

Para los productos pecuarios (carne, pescado, leche, huevos y miel) en el marco del desarrollo de la inocuidad de los alimentos, se consideran los compromisos derivados de una serie de acuerdos internacionales que han establecido los principios generales de control de la seguridad alimentaria en materia de comercio internacional. Los principales compromisos internacionales derivan del acuerdo de la OMC (Organismo Mundial del Comercio) de 1995 y corresponden al Acuerdo Sanitario y Fitosanitario (SPS) y al Comité del Codex Alimentarius para la higiene alimentaria (Servicio Agrícola y Ganadero, 2005).

El comercio internacional de productos de origen pecuario, es cada vez más exigente y en la actualidad, a las restricciones de tipo sanitario deben agregarse aquellas relacionadas al uso de insumos químicos en la producción, sean éstas, hormonas, pesticidas, antibióticos y metales pesados entre otros (Servicio Agrícola y Ganadero, 2007).

1.- Medicamentos Veterinarios:

El uso de productos farmacéuticos veterinarios ha llegado a ser cada vez más importante en la industria de la alimentación animal. El gran número de las operaciones

económicas en la alimentación animal en cerdos, aves de corral, y ganado en general aumentó perceptiblemente durante los años 90'. La cercana proximidad de una gran cantidad de animales en estas instalaciones y por la potencialidad de una rápida extensión de las enfermedades, ha hecho necesario el uso rutinario de productos farmacéuticos para mantener la viabilidad de estas transacciones económicas (Sarmah *et al.*, 2006).

El uso de agentes antimicrobianos en los animales productores de alimentos requiere de una autorización de comercialización que es otorgada por las autoridades competentes sólo si se cumplen los criterios de inocuidad, calidad y eficacia. Los exámenes de autorización para los medicamentos veterinarios deberán incluir una evaluación de los riesgos, tanto para los animales como para los humanos. La evaluación de inocuidad debe incluir además el examen del impacto que puede tener en la salud humana el uso propuesto en los animales productores de alimentos, incluyendo las consecuencias sanitarias de la resistencia bacteriana que se desarrolla en los animales productores de alimentos y en el ambiente (Códex Alimentarius, 2005).

Los medicamentos veterinarios que se incluyen en la terapia animal, tienen una serie de efectos, muchos de ellos pueden ser negativos, tanto para los animales como para los humanos consumidores de alimento proveniente de estos animales; los efectos negativos que podrían ocurrir a los animales están dados por:

a) El bajo margen de seguridad que tiene el compuesto para las especies de destino (ejemplo: ionóforos coccidiostatos); o también b) por interacción con otros productos o fármacos provocando toxicidad en la especie animal. Los efectos potencialmente perjudiciales para los consumidores incluyen la transferencia de residuos y la exposición a concentraciones supra LMR (Límite Máximo Residual), que pueden tener efectos farmacológicos y/o efectos microbiológicos (Mc Evoy, 2002).

Los Médicos Veterinarios deben tener presente que el uso no controlado e ilimitado de productos medicinales puede conducir a la acumulación de residuos indeseables en los animales tratados y en el medio ambiente, y que el uso continuo de productos anticoccídicos, antimicrobianos y antihelmínticos, puede favorecer el desarrollo de resistencia a los mismos. El rol del Médico Veterinario, y de las autoridades competentes, es preparar programas de medicina preventiva para el agricultor y

subrayar la importancia de los procedimientos administrativos correctos y de las buenas prácticas ganaderas a fin de reducir la posibilidad de enfermedades en los animales. Se debe hacer todo lo posible para utilizar solamente los medicamentos de conocida eficacia para el tratamiento de la enfermedad específica (Codex Alimentarius, 1993).

2.- Residuos farmacológicos:

¿A qué se le considera residuo farmacológico? Es todo aquel compuesto que está presente en los tejidos comestibles de los animales de abasto, como resultado de la utilización en éstos de un fármaco con fines profilácticos o terapéuticos. Esto incluye tanto la molécula original del fármaco como cualquier metabolito, o cualquier otra sustancia que se forme en el producto animal como consecuencia del uso del fármaco (Arboix y Martín-Jiménez, 2002). El Codex Alimentarius (1993), indica que los residuos de medicamentos veterinarios incluyen los compuestos de origen y/o sus metabolitos presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como los residuos de impurezas relacionados con el medicamento veterinario correspondiente.

Existen antecedentes científicos que demuestran que estos residuos farmacológicos pueden ser perjudiciales para la salud de los consumidores y que pueden causar: alergias, sinergismo o inhibiciones terapéuticas, resistencia microbiana, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y cambios morfo-fisiológicos por inducción de sustancias hormonales, etc. (Davicino, 2005). Por esto, se ha visto un incremento en la preocupación de los consumidores por la posibilidad de que los residuos de medicamentos veterinarios presente en la carne y la leche, se incorpore al organismo humano y lleve a la ocurrencia de alguno de los efectos anteriormente señalado. La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha recomendado la eliminación progresiva del uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal, donde estos se usen a la vez en la terapéutica humana o se tenga conocimiento de resistencia cruzada con medicamentos de uso común en los humanos (Mc Evoy, 2002).

Los grupos de residuos farmacológicos que son analizados rutinariamente en el laboratorio son: fármacos veterinarios (incluyen todos los que son administrados en los piensos para los animales), estos son monitoreados para determinar los LMR; fármacos veterinarios prohibidos (los que no tienen un LMR por considerarse inadmisibles en los alimentos), estos se encuentran en el anexo IV del consejo de regulación de La Unión

Europea (EU) como los β agonistas y hormonas como promotores del crecimiento que además, presentan una tolerancia cero; y contaminantes ambientales (metales pesados, pesticidas y micotoxinas) (Mc Evoy, 2002).

Además, la presencia de los residuos farmacológicos en la materia prima de los alimentos de origen animal es dependiente también de una serie de otros factores que no se relacionan con la especie animal tratada ni con el propio fármaco veterinario; entre estos factores se incluyen: el error humano, las variadas prácticas productivas y los distintos procedimientos realizados en los piensos de alimentación, durante el transporte a la granja, etc. (Mc Evoy, 2002).

3.- Límite Máximo para Residuos:

El Límite Máximo para Residuos de medicamentos de origen veterinario (LMR), se define como: la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/k o μ g/k sobre la base del peso fresco) que se permite legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo. Se basa en el tipo y la cantidad de residuos considerados como carentes de todo riesgo toxicológico para la salud humana, tal como se expresan en la Ingesta Diaria Aceptable (IDA). También tiene en cuenta otros riesgos pertinentes para la salud pública, así como aspectos tecnológicos de la producción de alimentos (Codex Alimentarius, 1993).

Con la determinación de la Ingesta Diaria Aceptable (IDA) y el Límite Máximo Residual (LMR) para los antimicrobianos, la evaluación de la inocuidad se lleva a cabo en conformidad con las directrices internacionales y debe incluir la determinación de los efectos tanto microbiológicos (por ejemplo: posibles efectos biológicos en la flora intestinal humana) como toxicológicos y farmacológicos. Se debe determinar para cada agente antimicrobiano una IDA y un LMR para productos alimenticios pertinentes (es decir, carne, pescado, leche, huevos y miel). Los LMR son necesarios para que los laboratorios de control, reconocidos oficialmente, puedan vigilar el cumplimiento de los antimicrobianos veterinarios aprobados. A nivel internacional, cada familia, grupo y tipo de antimicrobiano y/o antibiótico tiene determinado una IDA y un LMR; para los fármacos emergentes se deben realizar estudios para determinar sus respectivos niveles de tolerancia. Deben establecerse períodos de suspensión del tratamiento para cada

medicamento veterinario antimicrobiano, lo que hace posible que se produzcan alimentos en conformidad con los LMR (Codex Alimentarius, 2005).

4.- Período de suspensión o período de resguardo:

Para evitar la presencia de residuos sobre el LMR (Límite Máximo Residual) en la carne o en otros productos pecuarios, es esencial que el dueño del ganado observe el período de suspensión establecido para cada producto y su régimen de dosificación. Existen instrucciones sobre el modo de cumplir con este período, incluido el uso de métodos de detección de residuos a nivel de los sistemas productivos cuando sea necesario. Si los animales se venden antes del término del período de suspensión, se debe informar al comprador. El período de suspensión o de resguardo, según el Codex Alimentarius (1993), se define como el período que transcurre entre la última administración de un medicamento y la recolección de tejidos comestibles o productos provenientes de un animal tratado, que asegura que el contenido de residuos en los alimentos se ajusta al Límite Máximo de Residuos para los medicamentos (LMR).

5.- Normativas Internacionales:

A nivel internacional, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) crearon la Comisión del Codex Alimentarius para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y códigos de prácticas alimentarias. El sentido principal de esta comisión es la protección de la salud de los consumidores, asegurar prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales. Anualmente, en las reuniones internacionales del Codex Alimentarius, se intenta armonizar los criterios y niveles de los estudios de toxicidad para cada nuevo compuesto, a partir de los datos generados por diferentes instituciones sanitarias como: Food and Drug Administration (FDA), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) y también con el aporte de estudios de diferentes países como: Japón, Canadá, Australia, etc. (Arboix y Martín-Jiménez, 2002). Otros organismos y programas de protección a los consumidores que actúan a nivel mundial, son The Joint Fao/Who Committee on Food Additives (JEFCA), que es una comisión de expertos en aditivos alimentarios y su regulación, creado también por la FAO/OMS. Otro de los organismos es International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products (VICH) que es un

programa de cooperación internacional sobre la armonización de requisitos técnicos para el registro de medicamentos veterinarios, este es un programa trilateral entre la Unión Europea, Estados Unidos de América y Japón.

A finales de 1981, la entonces Comunidad Europea (CE) presentó las primeras directivas en relación con los medicamentos de uso veterinario, proponiendo guías para desarrollar estudios fármaco-toxicológicos, establecer y seguir protocolos clínicos, evaluar la calidad y definir todos aquellos parámetros que deberían garantizar la seguridad del uso de medicamentos veterinarios. Para proteger la salud del consumidor de productos de origen animal, uno de los principios básicos es garantizar que estos alimentos no contengan residuos como resultado del tratamiento de los animales con medicamentos (Arboix y Martín-Jiménez, 2002).

A partir de entonces, la Unión Europea ha desarrollado una serie de normas y reglamentos para regular y asegurar la inocuidad y calidad de los productos pecuarios; por ello, bajo la Directiva de la Comisión de la Comunidad Europea, se creó la norma 96/23/CEE que establece las medidas de control de los residuos farmacológicos en los productos pecuarios, se fijan normas específicas relativas a la toma de muestras y establece que el análisis de las muestras debe ser efectuado exclusivamente en laboratorios autorizados por la autoridad competente para el control oficial de residuos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

Por su parte la administración de Estados Unidos de América establece normas, vigila su cumplimiento y sanciona las infracciones por medio de la acción conjunta de agencias adscritas a los departamentos de sanidad, agricultura y medio ambiente. Mediante el departamento de sanidad, la FDA se encarga de investigar los casos de residuos ilegales y de emprender las pertinentes acciones legales contra los infractores y de vigilar que no se superen las tolerancias o niveles máximos de residuos de pesticidas y herbicidas establecidos. El Servicio de Inspección de Seguridad Alimentaria (FSIS), adscrito al Departamento de Agricultura (USDA) tiene por cometido el control anual nacional de la incidencia de residuos, por medio de muestreos aleatorios de tejidos de canales en matadero y su posterior análisis químico. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) se encarga, entre otros, de establecer una normativa que regule los niveles de contaminantes químicos en el ambiente, en el entorno ganadero y en los propios productos finales (Arboix y Martín-Jiménez, 2002).

6.- Normativa Chilena:

En Chile, el Ministerio de Salud bajo la resolución exenta n° 1462 de 1999 (revisada en el 2004), ha determinado utilizar como referencia para el establecimiento de límites máximos residuales para medicamentos veterinarios, las recomendaciones del programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, comisión del Codex Alimentarius sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos y en su defecto, las concentraciones establecidas por la administración de drogas y alimento de Estados Unidos o por la Unión Europea (Ministerio de Salud, 2004).

Para el monitoreo y fiscalización de residuos de antibióticos y sulfamidas en productos de origen animal se necesita la participación y diagnóstico por parte de laboratorios de análisis acreditados. En Chile, el proceso de acreditación de laboratorios se lleva a cabo bajo el programa nacional de control de residuos en productos pecuarios de exportación implementado por el Ministerio de Agricultura por medio del Servicio Agrícola Ganadero (SAG). En este programa los laboratorios que se encuentran acreditados deben contar con métodos analíticos validados para cada tipo de analito. El procedimiento de validación debe basarse en el procedimiento establecido en la directiva del Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002/657/CE, donde se encuentra indicado como debe funcionar el método analítico y como se deben interpretar los distintos resultados del ensayo (Servicio Agrícola y Ganadero, 2006).

7.- Validación del método analítico:

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es idóneo para su propósito inicial: determinar los residuos químicos farmacológicos y/o las sustancias prohibidas que se encuentran en el producto alimenticio y a la vez determinar si está dentro del rango permitido o, ausente en las muestras según sea el caso. Para esto se han creado términos y definiciones comunes, que crean un puente sobre las diferencias que existen entre los compendios y reguladores de La Comunidad Europea, Estados Unidos de América y Japón (VICH, 2004).

Para la validación de la metodología analítica, existen 4 tipos comunes de procedimientos analíticos:

- Pruebas de identificación.

- Pruebas cuantitativas para determinar el contenido de impurezas.
- Pruebas de límite para el control de impurezas.
- Pruebas cuantitativas del metabolito activo de la droga en muestras u otros productos o componentes seleccionados.

Las pruebas de identificación son para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto se alcanza normalmente por la comparación de una característica de la muestra (ej. el espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) con la de un estándar de referencia. Las pruebas para las impurezas pueden ser una prueba cuantitativa o una prueba de límite. Las pruebas cuantitativas determinan la cantidad exacta del residuo o del metabolito activo presente en el compuesto, se lleva a cabo con una muestra inyectada con una concentración conocida del metabolito.

Cualquier prueba es para reflejar con exactitud las características de la pureza de la muestra.

Para concretar la validación se deben medir una serie de parámetros definidos a nivel internacional. Los parámetros característicos de un procedimiento de validación son los siguientes:

- Exactitud
- Precisión
- Repetitividad
- Especificidad
- Límite de decisión
- Límite de cuantificación
- Linealidad
- Robustez

La Comunidad Europea, en la decisión de la comisión 96/23/CE, relativo a las medidas de control aplicable respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, y para garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios determinó cómo se debe realizar el método de validación analítico y cuáles son los parámetros que se deben analizar. Para ello publicó la

metodología analítica y sus definiciones con el fin de utilizar criterios y procedimientos comunes para garantizar la trazabilidad con arreglo a normas comunes o consensuadas.

A continuación se detallan los parámetros publicados por el Diario Oficial de la Comunidad Europea (2002) y sus respectivas definiciones:

Exactitud: grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.

Especificidad: capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.

Precisión: grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas o predeterminadas.

Repetitividad: precisión en las condiciones en que un mismo operador obtiene resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.

Reproducibilidad: precisión en las condiciones en que operadores diferentes obtienen resultados de ensayo independientes con el mismo método e idénticas muestras de ensayo, en laboratorios diferentes y con equipos diferentes.

Reproducibilidad intralaboratorio: precisión obtenida en un mismo laboratorio y en condiciones estipuladas o predeterminadas, relativas por ejemplo, al método, los materiales de ensayo, los operadores y el entorno, separados por largos intervalos de tiempo justificados.

Recuperación: porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico. Este factor se determina en la validación cuando no hay material de referencia certificado.

Límite de decisión ($CC\alpha$): límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (5%) que una muestra no es conforme. Si la muestra no es conforme indica que sobrepasa el límite máximo residual permitido.

Capacidad de detección ($CC\beta$): contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error β (5%).

Robustez: susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación de la muestra en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Se debe indicar cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (ej. Estabilidad de los reactivos composición de la muestra, pH o temperatura) que puedan afectar a los resultados analíticos.

8.- Determinación de residuos de Sulfonamidas:

Para las sulfonamidas el Comité de Productos Medicinales Veterinarios de la Unión Europea considera un LMR de 100 $\mu\text{g}/\text{k}$ de la droga original en tejidos animales y de 25 $\mu\text{g}/\text{k}$ en la leche (Committee for Veterinary Medicinal Products, 2007). En lo que respecta a Estados Unidos de América y Japón, no se admite presencia de residuos de sulfamidas en productos pecuarios (Sernapesca, 2006). Las sustancias con LMR permitido están contenidas en el grupo B del anexo I del consejo de la directiva 96/23/Comunidad Europea (Pecorelli *et al.*, 2004).

Para la determinación de sulfamidas en los tejidos de origen animal, se han desarrollado métodos microbiológicos, inmunológicos y químicos. Los métodos microbiológicos son fáciles de realizar y permiten un alto rendimiento de procesamiento de la muestra, pero carecen de sensibilidad y especificidad. Los métodos inmunológicos pueden ser bastante sensibles y satisfacen el LMR para las sulfamidas que es de 100 $\mu\text{g}/\text{k}$, además permiten un alto rendimiento de procesamiento, sin embargo, carecen de la especificidad necesaria. Entre los métodos químicos para la determinación de sulfamidas están disponibles la Cromatografía Gaseosa y HPLC (Cromatografía Líquida

de Alto Rendimiento). Entre estos métodos el HPLC es una herramienta de alta eficiencia, puesto que el rendimiento de procesamiento de la muestra es relativamente alto y la especificidad está satisfecha cuando se usan métodos de detección apropiados como Ultra Violeta (UV), electroquímica o DAD (detección por red de diodos) (Committee for Veterinary Medicinal Products, 2007).

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Validar un método analítico que permita la detección de residuos de sulfonamidas en tejido muscular de diferentes animales productores de carne, conforme a las normativas internacionales.

Objetivos específicos:

1. Implementar una extracción analítica capaz de detectar residuos de sulfonamidas a concentraciones de 5 ppb en tejido muscular de ave, bovino, cerdo y salmón.
2. Validar el método analítico conforme a las normas internacionales vigentes.

MATERIAL Y METODO:

Material:

1.- Equipamiento:

a.- Equipos cromatográficos:

- Columna analítica Chromolith Performance® RP-18e de 100-4,6 mm.
- Autosampler HPLC, Waters® 717 plus.
- Detector de fluorescencia, Waters® 474.
- Software HPLC, Waters® Data module.
- Derivatización post-columna.
- Calefactor de la columna.

b.- Columnas de fase sólida de 3 o 6ml y 500mg SCX, J. Baker®, tipo catiónico, ácido sulfónico.

c.- Otros equipos:

- Homogeneizador Moulinex®, modelo 5561 o similar.
- Centrífuga Eppendorf®, modelo 5416.
- Vortex Heidolph®, modelo Multi Reax.
- Incubadora Barnstead®/Lab-line, modelo Max° mini 4000.
- Sonicador Branson®, modelo 3510.
- Balanza de precisión Precisa®, modelo 125^a.
- Balanza de precisión Sartorius®, modelo bl 610.
- Equipo de filtración de agua HPLC Millipore® Simplicity.
- Pipetas volumétricas tipo A, 10-0.1, 5-0.1, 2-0.1 mL.
- Micropipetas Genes Beta® 10-100 µL.
- Filtros de membrana Gelman Science®, 13 mm x 0.45 µM.
- Matraces aforados Duran®, clase A de 25, 100, 250, 500 mL.

2.- Reactivos y soluciones:

a.- Estándares:

- Sulfadiazina (SDA) 99,9% Sigma®.
- Sulfatiazol (STZ) 100% Sigma®.
- Sulfamerazina (SM) 99% Sigma®.

- Sulfametazina (SMZ) 99% Sigma®.
- Sulfametoxipiridozina (SMP) 99% Sigma®.
- Sulfacloropiridozina (SCP) 99% Sigma®.
- Sulfametoxazol (SMX) 100% Sigma®.

b.- Agua HPLC Millipore®.

c.- Metanol HPLC J.T. Baker®.

d.- Acetato de etilo HPLC grade.

e.- Amoníaco 25% Merck®.

f.- N-hexano Merck®, 98%.

g.- Fase móvil: solución de acetato de sodio, acetonitrilo y metanol.

h.- Derivatizante: fluorescamina, acetonitrilo, tampón fosfato y etanol.

3.- Matrices:

Tejido muscular libre de piel y grasa superficial de: ave, bovino, cerdo y salmón.

Usados como blanco de ensayos, están sin químicos como antibióticos y sulfamidas.

Metodología:

Como referencia para la extracción de sulfonamidas se utilizó la metodología descrita por Ito *et al.*, (2000).

A 5g de matriz (músculo de ave, cerdo, bovino o salmón) se le agregó 10 mL de acetato de etilo y 5 mL de sulfato de sodio, posteriormente se agitó y se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se trató con acetato de etilo agitándose y centrifugándose por 10 minutos a 3.000 rpm por tres veces. La muestra a continuación se concentró a 15 mL bajo flujo de nitrógeno a 50° C; el concentrado se pasó por las columnas de fase sólida previamente acondicionadas con n-hexano y acetato de etilo. La fase de elusión se realizó con metanol/amoníaco, luego se secó lentamente con flujo de nitrógeno a 50° C; posteriormente se reconstituyó en 500 µL de fase móvil constituida por una mezcla de acetato de sodio, acetonitrilo y metanol; luego se traspasó a un tubo Eppendorf® de 1 mL para ser centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm, finalmente se lleva a un vial para ser analizado con el método cromatográfico.

VALIDACION DEL METODO ANALITICO:

Para la validación del método analítico se usó como referencia las normas establecidas por la directiva 2002/657/CE del Diario Oficial de las Comunidades Europeas; según el procedimiento de validación interna o estudio intralaboratorio (estudio analítico por un solo laboratorio que utiliza el mismo método para proceder a análisis, separados por largos intervalos de tiempo justificados, de idénticos o diferentes materiales de ensayo en condiciones distintas). A continuación se detallan los parámetros analizados:

1. - Especificidad:

Se determinó analizando 20 muestras blancos representativas del método, buscando posibles interferencia (señales, picos, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elusión del analito. Para ello se analizaron distintas matrices (músculo de ave, bovino, cerdo y salmón), de las cuales se estudiaron 5 blancos de cada una.

2. - Tiempo de retención del analito:

Para el tiempo de retención del analito, se analizaron las sulfamidas (Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfametoxipiridozina, Sulfacloropiridozina y Sulfametoxazol) en su forma pura para evaluar los tiempos de retención en el cromatograma.

3.- Curvas de Calibración:

Se incorporaron 3 curvas de calibración por cada sulfonamida en estudio, estas cumplieron con las siguientes características:

- Presentar 5 niveles de concentración.
- Un intervalo de trabajo de la curva de: 5-10-15-20-25 ppb.
- Descripción de la fórmula matemática de la curva y la bondad de ajuste de los datos de ésta.
- Descripción de los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.
- Presentar una linealidad de $r^2 \geq 0,9$.

4. - Límite de Decisión $CC\alpha$:

Se le conoce a la vez como límite de detección; es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (5%) que una muestra no es conforme.

Se realizó con un mínimo de 4 curvas de calibración, las cuales presentaban 5 puntos de fortificación o enriquecimiento (ISO 11843, 2003).

Cálculo de $CC\alpha$:

- Cada curva se analizó por separado calculando la ecuación de regresión (se aceptó la curva cuando $r^2 \geq 0,9$).
- Se calculó la pendiente para cada curva y se obtuvo el promedio de las pendientes (de todas las curvas).
- Para cada curva se extrapoló el intercepto en el eje y en área.
- Se calcularon los promedios y desviaciones estándar de los interceptos (en áreas).
- Posteriormente se calculó el $CC\alpha$ (en área) aplicando la siguiente fórmula:

$$CC\alpha \text{ área} = \text{Promedio de los interceptos} + 2,33 \text{ veces desviación estándar de los interceptos}$$

- El resultado de $CC\alpha$ que se obtuvo en área, fue transformado a concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$CC\alpha \text{ concentración} = \frac{CC\alpha \text{ área} - (\text{promedio de los interceptos})}{\text{Promedio de las pendientes}}$$

5. - Capacidad de detección $CC\beta$:

Se le conoce también como “Límite de cuantificación”, es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β (5%).

Se trabajó con 20 muestras blancas, enriquecidas con una concentración equivalente a $CC\alpha$, y se realizó además una curva de calibración (se acepta la curva cuando $r^2 \geq 0,9$).

Cálculo de $CC\beta$:

- Se calcularon los promedios y la desviación estándar de las áreas obtenidas en las muestras.
- Posteriormente se calculó el $CC\beta$ (en área) aplicando la siguiente fórmula:

$$CC\beta \text{ área} = \text{Limite de detección } CC\alpha + 1,64 \text{ veces la desviación estándar de las áreas obtenidas}$$

- El resultado obtenido para la capacidad de detección $CC\beta$ en área, fue transformado a concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$CC\beta \text{ concentración} = \frac{CC\beta \text{ área} - (\text{intercepto curva de calibración})}{\text{Pendiente curva de calibración}}$$

6. - Recuperación:

Reemplaza la veracidad cuando no hay material de referencia certificado disponible.

Como no se dispone del material de referencia certificado se calculó la recuperación con matriz blanco enriquecida con sulfamidas puras.

Se eligieron 18 muestras blancas y se enriquecieron con las sulfamidas siguiendo los siguientes pasos:

- Se eligió la concentración de trabajo, que en este estudio fue de 10 partes por billón (ppb).
- Se enriquecieron las muestras de la siguiente forma:
 - 6 muestras 0.5 veces la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1.0 veces la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1.5 veces la concentración de trabajo

Cuando el método no detectó la concentración mínima señalada, se analizaron concentraciones mayores.

Mediante la siguiente fórmula se calculó la recuperación:

$$\% \text{ recuperación para cada valor medido} = 100 * \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Nivel de enriquecimiento}}$$

Se aceptaron los valores de recuperación obtenidos cuando estos se encuentran entre los siguientes intervalos señalados en la tabla N 1, estipulados por la directiva 2002/657/CE:

Tabla N 1: Intervalos de recuperación aceptados en la Directiva 2002/657/CCE.

FRACCION DE MASA	INTERVALO
$\leq 1 \text{ ug/k}$	-50 a +20 (50-120%)
$> 1 \text{ ug/k a } 10 \text{ ug/k}$	-30 a +10 (70-110%)
$\geq 10 \text{ ug/k}$	-20 a +10 (80-110%)

7. - Repetitividad:

Se eligieron 18 muestras blancos y se enriquecieron con las sulfamidas siguiendo los siguientes pasos:

- Se eligió la concentración de trabajo, en este estudio fue de 10 ppb.

- Se enriquecieron las muestras de la siguiente forma:
 - 6 muestras 0.5 veces la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1.0 veces la concentración de trabajo
 - 6 muestras 1.5 veces la concentración de trabajo

Cálculo de Repetitividad:

Para el cálculo de la concentración cuantificada por el equipo cromatográfico, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Repetitividad} = \frac{\text{Área cromatográfica} - \text{Intersecto}}{\text{Pendiente}}$$

A continuación:

- Se calculó la concentración detectada en cada muestra.
- Se calculó la concentración media, desviación estándar y coeficiente de variación en porcentaje, para cada concentración.

La Repetitividad cumplirá su condición de aceptada cuando el Coeficiente de Variación (CV) de cada concentración medida, este en un rango de valores correspondiente a la mitad o igual al CV de la Precisión.

8. - Precisión: (Reproducibilidad intralaboratorio)

Se utilizaron 6 curvas distintas, enriquecidas a los mismos niveles que en el caso de la Recuperación y Repetitividad, pero realizadas por diferentes analistas y en diferentes días.

Cálculo de Precisión:

- Se calculó la concentración detectada en cada muestra.
- Se calculó la concentración media, desviación estándar y coeficiente de variación en porcentaje, para cada concentración y cada analito para ser comparado con la repetitividad.

Cuando se trabaja con fracciones de masa superiores a 100 ug/k el CV no debe superar al valor obtenido mediante la ecuación de Horwitz:

$$CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

Donde C es la fracción de masa expresada como potencia de 10 (ej. 1mg/g = 10⁻³)

Con fracciones de masa inferiores a 100 ug/k la aplicación de la ecuación de Horwitz conduce a valores inaceptablemente elevados (*, tabla N 2), por lo tanto, los CV de las concentraciones inferiores a 100 ug/k serán los más bajos posibles.

Cuando la fracción de masa es = o > a 100ug/k se utiliza la ecuación de Horwitz y el CV calculado debe ser menor o igual al CV señalado en la tabla N 2.

Tabla N 2: Valores del Coeficiente de reproducibilidad según la fracción de masa de la medición.

Fracción de Masa	CV de Reproducibilidad (%)
1 ug/k	*
10 ug/k	*
100 ug/k	23
1000 ug/k	16

9.- Robustez

El parámetro de Robustez determina la posibilidad de que un método analítico presente alteraciones en sus resultados debido a algún cambio en el procedimiento del ensayo. Para su determinación se utilizó el método de “Youden” el cual implica modificaciones en el procedimiento del laboratorio, dentro de lo razonablemente esperable que pueda ocurrir y se analizaron las consecuencias de estos cambios.

Para cada metodología analítica se seleccionaron 3 factores que puedan influir en el resultado final. En este trabajo se seleccionaron como factores: centrifugación y elución. Como se realizan durante el procedimiento analítico varias etapas de centrifugación, se consideró alterar 2 veces este factor durante el procedimiento analítico para determinar

la robustez del método (centrifugación A y su variante a, centrifugación C y su variante c).

El método de Youden se realizó mediante un diseño factorial fraccional incompleto para detectar las interacciones entre los factores seleccionados. Con los 3 factores seleccionados (centrifugación, elución y centrifugación) se realizaron 8 pruebas distintas, combinando los factores y sus modificaciones. Los experimentos se realizaron al nivel más bajo de la curva de calibración, que en este caso corresponde a 5 ppb. Junto con los experimentos se realizó una curva de calibración a 5 niveles, para cuantificarlos. En la tabla N 3 se muestran las combinaciones posibles de los distintos factores.

Tabla N 3: Combinaciones posibles de los distintos factores, según método de Youden.

FACTOR	EXPERIMENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c

Donde:

A = centrifuga 3000 rpm/10 minutos

a = centrifuga 3000 rpm/5 minutos

B = elución por gravedad

b = elución al vacío

C = centrifuga 3000rpm/10 minutos

c = centrifuga 3000 rpm/5 minutos

Se realizaron las 8 pruebas de Youden para cada Sulfamida (Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfametoxipiridozina, Sulfacloropiridozina y Sulfametoxazol), posteriormente se hizo una comparación de los valores promedio y se calculó la diferencia entre las medias y se elevó al cuadrado, calculándose la Desviación estándar de los valores obtenidos.

- Comparación de medias:

$$\Sigma A/4 = \text{Valor promedio}$$

$$\Sigma a/4 = \text{Valor promedio}$$

$$\Sigma B/4 = \text{Valor promedio}$$

$\Sigma b/4 =$ Valor promedio

$\Sigma C/4 =$ Valor promedio

$\Sigma c/4 =$ Valor promedio

- Luego se calculó la diferencia entre estas medias y se elevaron al cuadrado:

$$(A - a)^2$$

$$(B - b)^2$$

$$(C - c)^2$$

- Posteriormente se calculó la desviación estándar de los valores obtenidos.

Cuando la desviación estándar de la robustez es significativamente mayor que la desviación estándar de la Reproducibilidad intralaboratorio (Precisión) en el punto más bajo de la curva se puede interpretar como que el método no es lo suficientemente robusto.

RESULTADOS:

A continuación se detallan los resultados obtenidos para la validación del método analítico químico de las sulfamidas de acuerdo a los parámetros establecidos por el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002).

1. - Especificidad:

El análisis cromatográfico (HPLC), no mostró interferencias en la región de elusión de los analitos (Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfametoxipiridozina, Sulfacoloropiridozina y Sulfametoxazol) en las matrices de aves, bovinos, cerdos y salmón.

2.- Tiempo de retención de los analitos:

Los tiempos de retención para cada sulfamida en estudio (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridozina, sulfacoloropiridozina y sulfametoxazol) se observan en la tabla N 4 y en cromatograma de la figura 3. El ensayo se realizó a una concentración de 5ppb.

Tabla N 4: Tiempo de retención promedio en minutos de Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfacoloropiridozina (SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFAMIDAS	TIEMPOS DE RETENCION
SDA	6,12
STZ	8,06
SM	9
SMZ	13,85
SMP	16,27
SCP	18,5
SMX	23,29

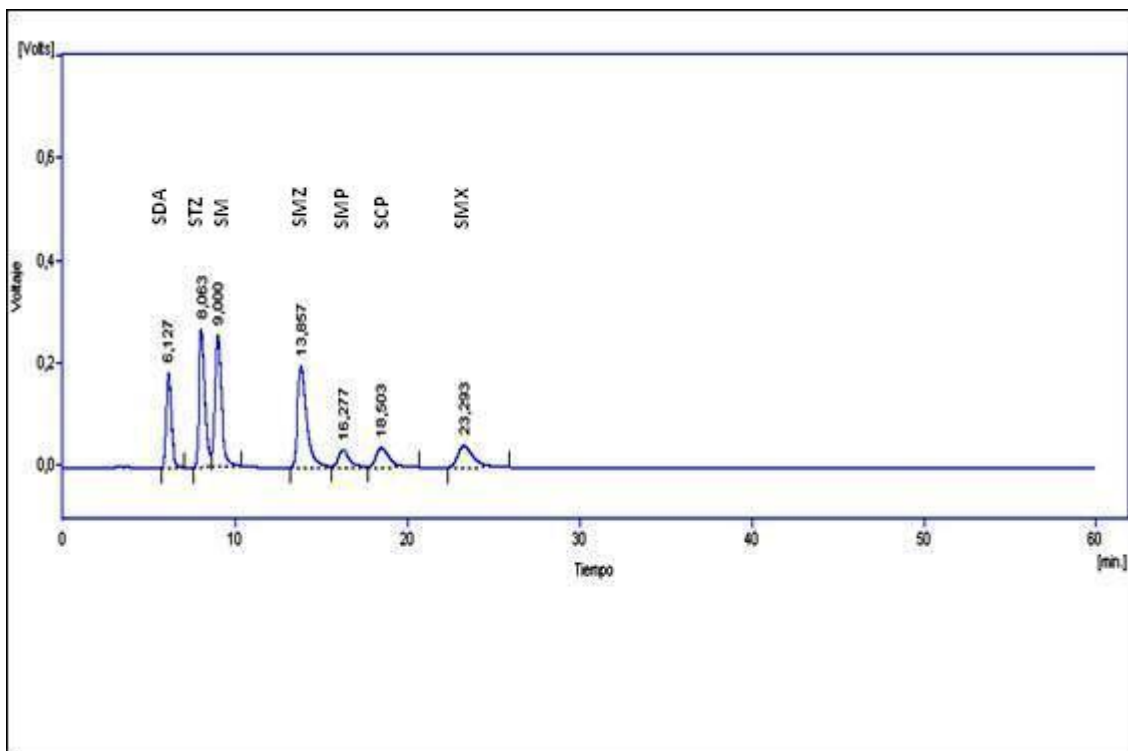


Figura 3: Cromatograma de droga pura de 7 sulfonamidas: sulfadiazina (SDA), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SM), sulfametazina (SMZ), sulfametoxipiridozina (SMP), sulfacloropiridozina (SCP) y sulfametoxazol (SMX).

3.- Curvas de Calibración:

Con las curvas de calibración, se demostró la linealidad de las matrices fortificadas con sulfamidas de alta pureza. Esto fue realizado en dosis ascendente de 5, 10, 15, 20 y 25 ppb. Como se muestra en las figuras 4 a la 10, en todas las curvas se obtuvieron $r^2 \geq 0,9$, lo que indica que el método analítico puede además ser cuantitativo.

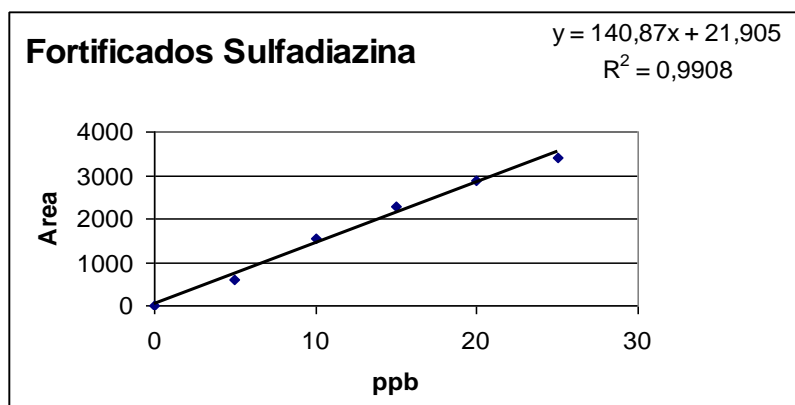


Figura 4: Curva de calibración de Sulfadiazina.

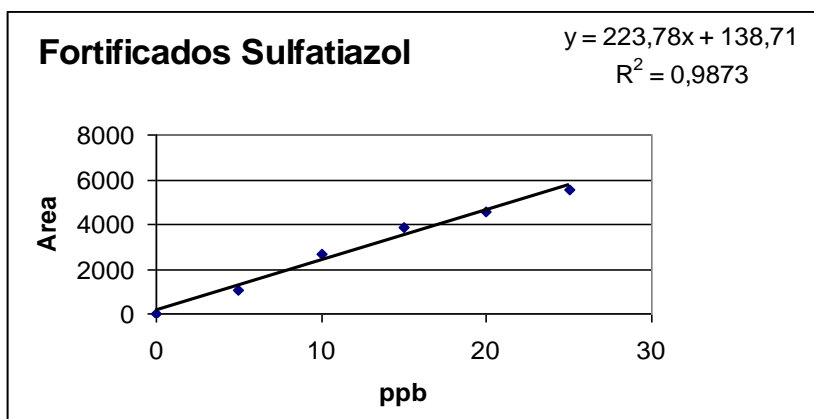


Figura 5: Curva de calibración de Sulfatiazol.

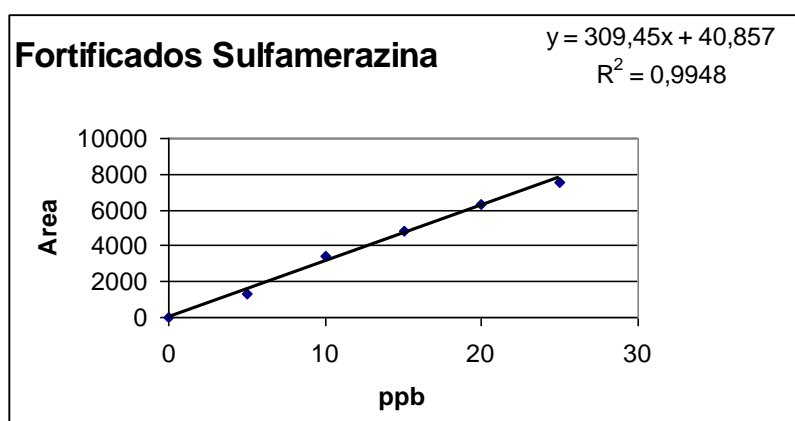


Figura 6: Curva de calibración de Sulfamerazina.

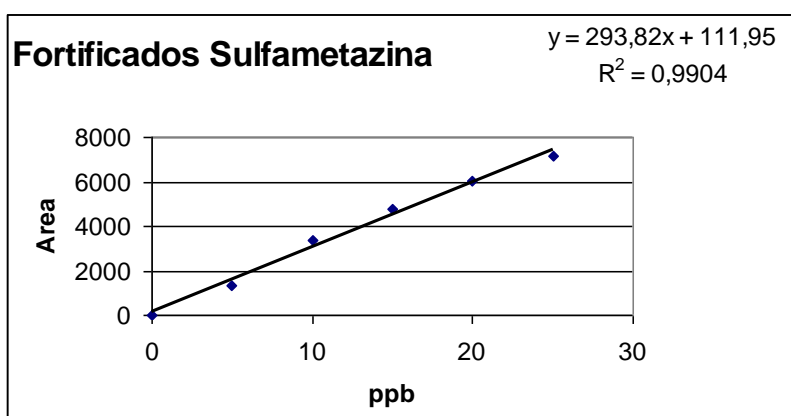


Figura 7: Curva de calibración de Sulfametazina.

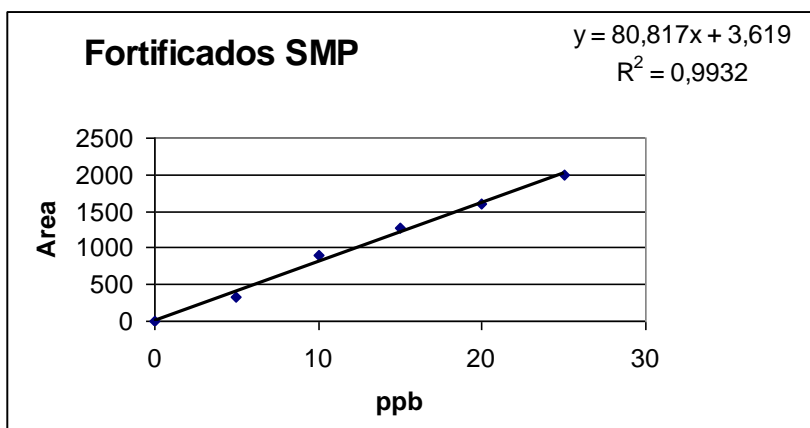


Figura 8: Curva de calibración de Sulfametoxipiridozina.

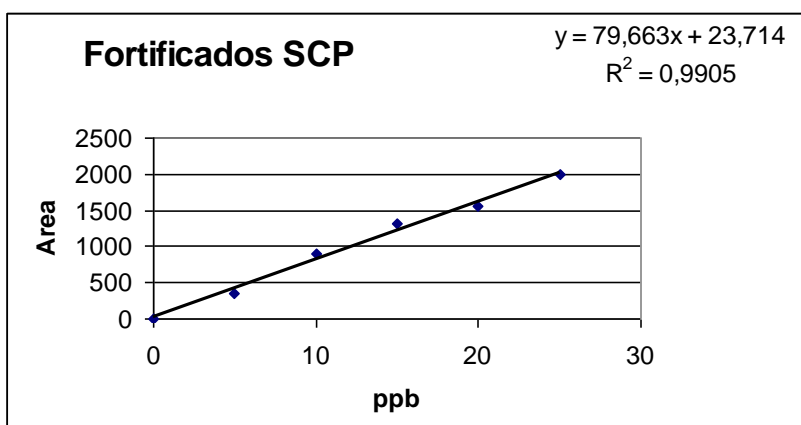


Figura 9: Curva de calibración de Sulfacloropiridozina.

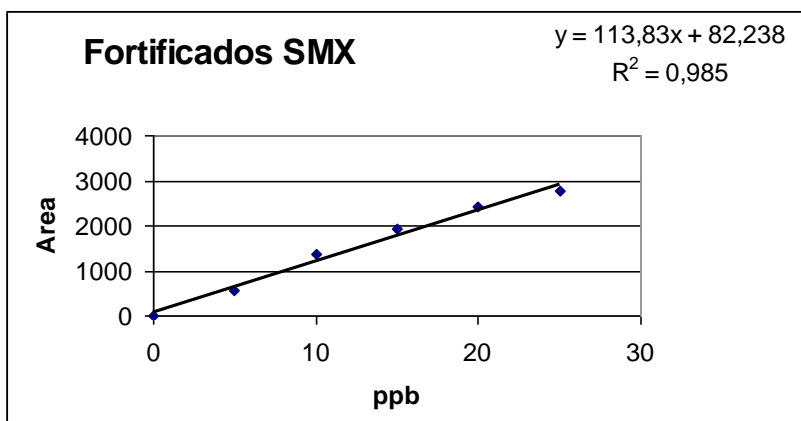


Figura 10: Curva de calibración de Sulfametoxazol.

4. - Limite de Decisión $CC\alpha$:

Los valores obtenidos para el $CC\alpha$ son el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (5%) que una muestra no es conforme. A continuación en la tabla N 5 se detallan los resultados obtenidos en concentración (ppb) para cada sulfonamida.

Tabla N 5: Limite de decisión $CC\alpha$ para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfaclopiridozina (SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFAMIDAS	LIMITE DECISION ppb
SDA	3,21
STZ	2,74
SM	3,16
SMZ	3,07
SMP	3,72
SCP	3,65
SMX	3,11

5. - Capacidad de detección $CC\beta$:

El valor que fue obtenido para el $CC\beta$ que corresponde al contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%).

A continuación en la tabla N 6 se presentan los resultados obtenidos de $CC\beta$ para las 7 sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridozina, sulfaclopiridozina y sulfametoxazol) expresados en concentración (ppb).

Tabla N 6: Capacidad de detección CC β para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfaclopiridozina SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFAMIDAS	CAPACIDAD DETECCION ppb
SDA	12,49
STZ	11,02
SM	10,79
SMZ	10,96
SMP	16,77
SCP	14,98
SMX	12,56

1. - Recuperación:

Los resultados mostraron que el promedio de los porcentajes se encuentran dentro del rango establecido por la Directiva 2002/657/CEE, excepto por 2 valores de enriquecimiento de 10 ppb que se encuentran fuera de rango, uno por sobre el valor aceptado por la directiva y el otro por debajo del rango establecido.

A continuación se muestran en la tabla N 7 los valores de recuperación con los porcentajes promedio y los rangos obtenidos para cada sulfonamida analizada.

Tabla N 7: Valores de recuperación para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfaclopiridozina (SCP) y Sulfametoxazol (SMX), se muestran los valores promedio expresados en porcentajes (X%), los rangos de variación y el número de repeticiones (N°).

SULFONAMIDAS									
	5ppb	N°						X %	RANGOS %
		1	2	3	4	5	6		
SDA		106	97	103	94	103	95	99,67	94 - 106
STZ		108	93	93	96	109	96	99,17	93 - 109
SM		107	93	97	97	106	94	99	93 - 107
SMZ		107	92	105	96	107	94	100,17	92 - 107
SMP		107	94	105	95	108	93	100,33	93 - 108
SCP		108	96	102	89	108	96	99,83	89 - 108
SMX		107	95	107	101	110	94	102,33	94 - 110
10ppb									
SDA		94	103	97	106	97	105	100,33	94 - 106
STZ		92	107	107	104	91	104	100,83	91 - 107
SM		93	107	103	103	64	106	96	64 - 107
SMZ		93	108	95	104	93	106	99,83	93 - 108
SMP		93	106	95	105	92	107	99,67	92 - 107
SCP		92	104	98	111	92	104	100,17	92 - 111
SMX		93	105	93	99	90	105	97,67	90 - 105
15ppb									
SDA		102	99	101	98	101	98	99,83	98 - 102
STZ		103	98	98	98	103	99	100	98 - 103
SM		102	98	99	99	102	98	99,67	98 - 102
SMZ		102	97	102	99	102	98	100	97 - 102
SMP		102	98	102	98	103	98	100,17	98 - 103
SCP		103	99	101	96	103	99	100,17	96 - 103
SMX		102	98	102	100	103	98	100,5	98 - 103

2. – Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):

Los coeficientes de variación de la precisión de las sulfamidas analizadas se encuentran en un rango de variación de 2 – 11 %. En la tabla N 8 se muestran los resultados obtenidos para cada concentración de enriquecimiento y su porcentaje de variación.

Tabla N 8: Concentración de enriquecimiento, número de repeticiones (N°), promedio (X), Desviación Estándar (DS), Coeficiente de Variación (CV) y porcentaje de coeficiente de variación (CV %) para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfaclopiridozina (SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFONAMIDAS										
CONCENTRACION DE ENRIQUECIMIENTO										
	5ppb						X	DS	CV	CV %
	N°									
	1	2	3	4	5	6				
SDA	4,4	5,3	4,9	5,1	4,7	4,8	4,87	0,31	0,06	6,5
STZ	4,4	5,4	5,2	4,7	4,8	4,8	4,88	0,36	0,07	7,4
SM	4,4	5,3	5	4,9	4,8	4,7	4,85	0,3	0,06	6,2
SMZ	4,4	5,4	5,9	5,3	4,8	4,7	5,08	0,55	0,11	10,8
SMP	4,3	5,3	5,2	5,3	4,8	4,7	4,93	0,4	0,08	8,2
SCP	4,3	5,4	5,3	5,1	4,4	4,8	4,88	0,46	0,09	9,5
SMX	4,4	5,3	5,1	5,4	5	4,7	4,98	0,38	0,08	7,6
10ppb										
SDA	11,2	9,4	10,1	9,7	10,6	10,5	10,25	0,65	0,06	6,4
STZ	11,2	9,2	9,7	10,7	10,4	10,4	10,27	0,71	0,07	7
SM	11,1	9,3	10	10,3	10,3	10,6	10,27	0,6	0,06	5,9
SMZ	11,2	9,3	8,1	9,5	10,4	10,6	9,85	1,11	0,11	11,3
SMP	11,4	9,3	9,7	9,5	10,5	10,7	10,18	0,82	0,08	8
SCP	11,4	9,2	9,3	9,8	11,1	10,4	10,2	0,92	0,09	9
SMX	11,2	9,3	9,9	9,3	9,9	10,6	10,03	0,75	0,07	4,4
15ppb										
SDA	14,4	15,3	14,9	15,1	14,7	14,8	14,87	0,31	0,02	2,1
STZ	14,4	15,4	15,2	14,7	14,8	14,8	14,88	0,36	0,02	2,4
SM	14,4	15,3	15	14,9	14,8	14,7	14,85	0,3	0,02	2
SMZ	14,4	15,4	15,9	15,3	14,8	14,7	15,08	0,55	0,04	3,6
SMP	14,3	15,3	15,2	15,3	14,8	14,7	14,93	0,4	0,03	2,7
SCP	14,3	15,4	15,3	15,1	14,4	14,8	14,88	0,46	0,03	3,1
SMX	14,4	15,3	15,1	15,4	15	14,7	14,98	0,38	0,03	2,5

8. - Repetitividad:

La repetitividad cumple su condición de aceptada cuando el Coeficiente de Variación (CV) de cada concentración medida, está en rango de valores correspondientes a la mitad o igual al CV de la Precisión. En la tabla N 9 se muestran los resultados de

repetitividad obtenidos para cada sulfonamida el promedio, la desviación estándar y los coeficientes de variación.

Tabla N 9: Concentración cuantificada, número de repeticiones (N°), promedio (X), Desviación estándar (DS), Coeficiente de variación (CV) y porcentaje del coeficiente de variación para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfacoloropiridozina SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFONAMIDAS

	CONCENTRACION CUANTIFICADA (ppb)						X	DS	CV	CV %
	5ppb									
	N°									
	1	2	3	4	5	6				
SDA	5,3	4,9	5,1	4,7	5,2	4,8	5	0,24	0,05	4,7
STZ	5,4	4,6	4,7	4,8	5,4	4,8	4,95	0,36	0,07	7,2
SM	5,3	4,6	4,9	4,8	5,3	4,7	4,93	0,3	0,06	6,1
SMZ	5,4	4,6	5,3	4,8	5,3	4,7	5,02	0,35	0,07	7,1
SMP	5,3	4,7	5,3	4,8	5,4	4,7	5,03	0,33	0,07	6,6
SCP	5,4	4,8	5,1	4,4	5,4	4,8	4,98	0,39	0,08	7,9
SMX	5,3	4,7	5,4	5	5,5	4,7	5,1	0,35	0,07	6,9
10ppb										
SDA	9,4	10,3	9,7	10,6	9,7	10,5	10,03	0,5	0,05	5
STZ	9,2	10,7	10,7	10,4	9,1	10,4	10,08	0,74	0,07	7,3
SM	9,3	10,7	10,3	10,3	9,4	10,6	10,1	0,6	0,06	6
SMZ	9,3	10,8	9,5	10,4	9,3	10,6	9,98	0,69	0,07	6,9
SMP	9,3	10,6	9,5	10,5	9,2	10,7	9,96	0,7	0,07	7
SCP	9,2	10,4	9,8	11,1	9,2	10,4	10,02	0,75	0,08	7,5
SMX	9,3	10,5	9,3	9,9	9	10,6	9,76	0,67	0,06	6,9
15ppb										
SDA	15,3	14,9	15,1	14,7	15,2	14,8	15	0,24	0,02	1,6
STZ	15,4	14,6	14,7	14,8	15,4	14,8	14,95	0,36	0,02	2,4
SM	15,3	14,6	14,9	14,8	15,3	14,7	14,93	0,3	0,02	2
SMZ	15,4	14,6	15,3	14,8	15,3	14,7	15,02	0,35	0,02	2,4
SMP	15,3	14,7	15,3	14,8	15,4	14,7	15,03	0,33	0,02	2,2
SCP	15,4	14,8	15,1	14,4	15,4	14,8	14,98	0,39	0,02	2,6
SMX	15,3	14,7	15,4	15	15,5	14,7	15,1	0,35	0,02	2,3

9. – Robustez:

Mediante la comparación entre la desviación estándar de la robustez y la desviación estándar de la precisión de cada sulfonamida en estudio, se pudo determinar si el método analítico es robusto. Al analizar las desviaciones estándar de los distintos factores modificados, se identificó cuál es el factor que más afecta a la robustez del método.

Los resultados comparativos entre la Desviación estándar (DS) de la robustez del método y la DS de la precisión obtenidos en el estudio se encuentran en la tabla N 10.

Tabla N 10: Comparación entre la desviación estándar (DS) de la robustez del método analítico y la DS de la precisión para Sulfadiazina (SDA), Sulfatiazol (STZ), Sulfamerazina (SM), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxipiridozina (SMP), Sulfaclopiridozina SCP) y Sulfametoxazol (SMX).

SULFAMIDAS	DS ROBUSTEZ	DS PRECISION
SDA	0,000003	0,31
STZ	0,000001	0,36
SM	0,000006	0,3
SMZ	0,000006	0,55
SMP	0,000003	0,4
SCP	0,000001	0,46
SMX	0,00029	0,38

La comparación entre la desviación estándar de la robustez del método analítico y la desviación estándar de la precisión, muestra claramente que el método es robusto ya que la DS de la precisión es mayor. El análisis de la DS de los factores modificados indica que el factor que más podría afectar al método es el centrifugado.

En el anexo I se observa el detalle de los experimentos y sus resultados para la robustez del método analítico.

DISCUSION:

Chile, al igual que muchos países, intercambia sus productos agrícolas y ganaderos dentro del contexto del comercio internacional. Por ello, asegurar la inocuidad de estos productos es un factor determinante para conseguir la transacción y, por lo tanto, debe estar bajo las normativas de los programas internacionales de control de los alimentos. Entre estos programas participan conjuntamente la FAO/OMS mediante la Comisión del Codex Alimentarius y a través del JEFCA. Todos estos programas coinciden en que para que un alimento sea considerado inocuo se debe analizar y determinar los niveles de residuos químicos presentes en él, los cuales deben realizarse con métodos analíticos debidamente validados por los laboratorios.

Este trabajo validó un método analítico para 7 sulfonamidas (sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxipiridozina, sulfacloropiridozina y sulfametoxazol) ampliamente usadas en el control y prevención de enfermedades infecciosas en animales de abasto, por ello el análisis de sus residuos químicos en los productos pecuarios es de suma importancia para determinar si se encuentran dentro de los márgenes permitidos. Este trabajo uso como referencia para la extracción de sulfonamidas la metodología descrita por Ito *et al.*, (2000); esta metodología analítica fue seleccionada por coincidir en insumos y nivel tecnológico aplicado en el laboratorio de farmacología de la facultad, además por la determinación de sulfonamidas coincidentes con las que habitualmente se analizan en este laboratorio. La selección también discriminó sencillez, rapidez y factibilidad de realización por los técnicos del laboratorio.

La validación se realizó de acuerdo al Diario Oficial de las Comunidades Europeas, publicada en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, la cual detalla cómo se debe realizar el método analítico y cómo se deben evaluar sus resultados.

La determinación y análisis de 20 muestras blanco de matriz de tejido muscular de diferentes especies (bovino, cerdo, pollo y salmón), dejó manifiesta la especificidad del método por no observarse interferencias o indicio de alguna señal ajena alrededor de los tiempos de retención para cada sulfonamida analizada. No se realizaron pruebas

comparativas con sustancias de similar actividad química a las sulfonamidas para determinar si el método las confundía, solo se cercioró que no hubiera contaminantes ajenos desde el laboratorio que afectaran la lectura de los resultados.

Los gráficos de calibración obtenidos al calcular el área versus la concentración muestran un coeficiente de correlación lineal ($r^2 \geq 0.9$) para todas las sulfonamidas en estudio, ajustándose a lo requerido para la validación.

Los gráficos con los tiempos de retención promedio de las drogas puras para las 7 sulfonamidas, determinó en qué tiempo y en qué orden se encuentran las drogas, estos resultados son comparables y similares a los obtenidos por Pecorelli *et al.* (2004), quien desarrolló una validación de método analítico a 10 sulfonamidas utilizando High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection (HPLC-DAD), arrojando los siguientes resultados en minutos: Sulfadiazina 8.98, Sulfatiazol 9.64, Sulfamerazina 11.39, Sulfametazina 13.32, Sulfaclopiridozina 16.58 y Sulfametoxazol 18.87. Gehring *et al.* (2006), realizó una metodología similar a este trabajo determinando residuos de sulfonamidas con HPLC y detector de fluorescencia; en los resultados obtenidos de los tiempos de retención en minutos promedio se observa: sulfadiazina 6.0, sulfatiazol 6.6, sulfamerazina 7.5, sulfametazina 9.3 sulfametoxipiridazina 10.7, sulfaclopiridazina 13.6 y sulfametoxazol 15.6 minutos. Al realizar una comparación de los tiempos de retención de las drogas entre Pecorelli *et al.* (2004) y Gehring *et al.* (2006), queda de manifiesto que entre uno y otro trabajo varían los tiempos de retención en que se señala cada peak de las sulfonamidas, pudiendo deberse a diferencias propias de cada laboratorio, variación de la temperatura, etc., sin embargo, el orden de las distintas sulfonamidas siempre es el mismo.

El límite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) se encuentran definidas por el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002) como: “Límite de decisión ($CC\alpha$): límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme”, donde el error α indica el índice de los falsos positivos y, por lo tanto, indica el riesgo de pérdida de los productores ; la “Capacidad de detección ($CC\beta$): es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β ”, donde el error β indica el índice de los falsos negativos y, por lo tanto, representa el riesgo de los

consumidores. Ambos, α y β son $\leq 5\%$ por tratarse en este caso de sulfonamidas, fármacos que presentan un Límite Máximo Residual (LMR) definido y determinado por distintas instituciones sanitarias internacionales, ellas pertenecen al grupo de sustancias B del anexo I del consejo de la directiva 96/23/Comunidad Europea, las que se consideran como sustancias admisibles en los alimentos, pero dentro de ciertos rangos.

Para la determinación de $CC\alpha$ y $CC\beta$ existen 2 metodologías de cálculo definidas según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE: el procedimiento de la curva de calibración y el procedimiento matriz blanco. Este trabajo realizó el primer procedimiento para $CC\alpha$ y la segunda metodología para $CC\beta$.

La determinación de $CC\alpha$ se llevó a cabo realizando 4 curvas de calibración para cada sulfonamida, siendo aceptadas las curvas cuando son de linealidad ($r^2 \geq 0.9$). Utilizando la fórmula, se determinó $CC\alpha$ en área y posteriormente se transformó a concentración. Con los resultados de $CC\alpha$ se calculó $CC\beta$, realizando fortificados de 20 muestras blanco hasta el límite de decisión $CC\alpha$ para cada sulfonamida, además se realizó una curva de calibración de linealidad de $r^2 \geq 0.9$ y con los datos obtenidos se calculó $CC\beta$ en área, transformándolo posteriormente a concentración.

Los resultados obtenidos para $CC\alpha$ por Pecorelli *et al* (2004) en ppb son: sulfadiazina 109.3, sulfatiazol 116.2, sulfamerazina 105.2, sulfametazina 106.6, sulfacloropiridazina 108.8 y sulfametoxazol 107.1. La gran diferencia con el presente estudio es que los niveles de fortificación del trabajo de Pecorelli *et al* (2004) son alrededor de los 100 $\mu\text{g/K}$ que es el LMR de las sulfamidas, en cambio este trabajo fortificó como límite máximo hasta los 25 $\mu\text{g/K}$.

Con respecto a $CC\beta$, Pecorelli *et al* (2004) obtuvo en ppb los siguientes resultados: sulfadiazina 120.0, sulfatiazol 134.9, sulfamerazina 110.9, sulfametazina 113.9, sulfacloropiridazina 119.1 y sulfametoxazol 115.0. Estos resultados difieren enormemente con los obtenidos en este trabajo y al igual que $CC\alpha$, esto se debió a los distintos niveles de fortificación usados en ambos trabajos.

En el trabajo realizado por Kishida *et al* (2005) para la determinación de 6 sulfonamidas con LC-MS-DAD (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with

Photodiode Array Detection), se calculó, entre otros parámetros, el límite de cuantificación que es el equivalente a $CC\beta$, obteniendo los siguientes resultados: sulfadiazina 6 ppb y sulfametoxazol 17 ppb, únicas sulfonamidas coincidentes con este trabajo. A pesar de tener un cálculo distinto, los resultados del límite de cuantificación son muy similares a los resultados de $CC\beta$ de este estudio.

Los porcentajes de recuperación para ser aceptados deben estar dentro de ciertos márgenes según lo definido por la Decisión de la Comisión (2002/657/CEE), siendo de 70 - 110% cuando las concentraciones van de 1 a 10 $\mu\text{g/K}$ y de 80 - 110% cuando las concentraciones son $\geq 10 \mu\text{g/K}$. Los resultados de recuperación obtenidos para las 7 Sulfonamidas analizadas en los 3 puntos de fortificación realizados (5, 10 y 15 ppb) se encuentran en promedio entre un 99 y 100%, los rangos de variación de las recuperaciones obtenidas en los distintos días de cálculo se encuentran dentro de los parámetros establecidos para cada nivel de concentración, a excepto de 2 valores de recuperación en el nivel de concentración 10 ppb donde hay una recuperación de 64 % para sulfamerazina y de 111% para sulfaclopiridozina; estos resultados no son tan marcados y pudieron deberse a un error de técnica en el fortificado o en el desarrollo de la extracción, para los resultados en general solo significan un pequeño desajuste y se toman en cuenta el buen resultado en promedio obtenidos dentro de los rangos establecidos.

En el trabajo realizado por Li *et al* (2006) en el cual se determinaron 18 drogas distintas incluyendo 6 sulfonamidas mediante LC-QIT-MS (Liquid Chromatography-Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry) se reportaron porcentajes de recuperación para sulfadiazina >75, sulfamerazina >90, sulfametazina >85 y sulfaclopiridazina >75. Estos resultados se encuentran dentro de los márgenes establecidos para la validación, sin embargo no son mejores que los obtenidos en este estudio el cual presenta un promedio de recuperación cercano al 100%. En cuanto al trabajo realizado por Pecorelli *et al* (2004), los porcentajes de recuperación medidos variaron ampliamente desde un 72-92% y para el sulfatiazol, no se logró una recuperación dentro de los márgenes establecidos para 150 $\mu\text{g/K}$ de fortificación.

La Repetitividad del método analítico es adecuada ya que al comparar los Coeficientes de Variación (CV) de cada concentración, éstos fueron la mitad o iguales a los CV de la

Precisión, y por lo tanto, cumplen con la normativa de la Comisión 2002/657/CE. El porcentaje del Coeficiente de Variación (CV %) de la repetitividad varió entre 1.6-7.9% para todas las sulfonamidas. El CV % de la repetitividad del trabajo de Pecorelli *et al* (2004) fue de un 15%, mostrando una variación mayor que en este estudio.

El método analítico se considera Robusto, ya que ante cambios mínimos en la metodología analítica en lo que respecta a la centrifugación con variable tiempo (5 y 10 minutos) y la elusión con variables bomba de vacío y gravedad, no se produjeron alteraciones perceptibles en sus resultados. Esto quedó de manifiesto al comparar la Desviación Estándar (DS) de la robustez con la DS de la Precisión siendo esta última muy superior y determinante en la aprobación de la robustez del método. Una vez identificados el o los factores que podrían afectar los resultados, estos se dejan establecidos en cada instructivo de las metodologías analíticas. Entre los puntos a considerar como medida precautoria de la metodología analítica, es la centrifugación, debiéndose respetar el tiempo determinado en el instructivo de la metodología analítica.

Con el recuento de los resultados de los distintos puntos analizados en este estudio se puede determinar que el método analítico para la detección de residuos de 7 Sulfonamidas (Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfametoxipiridozina, Sulfacloropiridozina y Sulfametoxazol) se encuentra debidamente validado ya que cumple con la normativa internacional exigida por la Comunidad Europea en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE.

CONCLUSIONES:

- 1.- La implementación del método analítico para la detección de residuos de sulfonamidas en el laboratorio de farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile, se encuentra validado de acuerdo a la normativa internacional de la Comunidad Europea 2002/657/CE.
- 2.- El método analítico utilizado en este trabajo es específico para la determinación de sulfonamidas.
- 3.- Se determinó una sensibilidad de al menos 5 ppb para las sulfonamidas con el método analítico implementado.
- 4.- La metodología analítica es capaz de detectar residuos de Sulfonamidas de tejido muscular animal de distintas especies, entre ellos: bovino, cerdo, pollo y salmón.
- 5.- Los parámetros recuperación, repetitividad, precisión y robustez determinados en este trabajo están conforme a la normativa internacional de la Comunidad Europea 2002/657/CE.

BIBLIOGRAFIA:

- **ARBOIX, M.; MARTÍN-JIMENEZ, T.** 2002. Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. **In:** Farmacología y Terapéutica Veterinaria 1ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp: 681-689.

- **BEVILL, R. F.** 1994. Sulfonamidas. **In:** Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 5ª ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp: 29-40.

- **CODEX ALIMENTARIUS.** 1993. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, comisión del Codex Alimentarius. Glosario de términos y definiciones. [En línea]<http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es> [Consulta: 6-06-2005].

- **CODEX ALIMENTARIUS.** 2005. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, comisión del Codex Alimentarius. Código de prácticas para reducir al mínimo y contener la resistencia a los antimicrobianos. [En línea] <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP_061s.pdf> [Consulta: 11-10-2007].

- **COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.** 2007. The European agency for the evaluation of medicinal products. Sulphonamides summary report (2). [En línea] <<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002695en.pdf>> [consulta: 6-06-2007]

- **DAVICINO, R.** Residuos de medicamentos veterinarios y anabólicos en carnes: enfoque técnico-legal en Argentina y el MERCOSUR. [En línea]. <<http://www.comersinriesgos.com.ar/residuos.htm>> [consulta: 27-04-2005].

- **DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 2002. Decisión de la comisión en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Bruselas, Bélgica, 12 de Agosto. L221-8, L221-35.

- **GEHRING, T.; GRIFFIN, B.; WILLIAMS, R.** 2006. Multiresidue determination of sulphonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 7p.

- **GREENBERGER, P.** 2006. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 117:465-470.

- **INSTITUTO QUÍMICO BIOLÓGICO.** Vademécum: Trimetoprim y Sulfametoxazol. [En línea].<<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a013.htm-38k> > [consulta: 07-07-2005].

- **ISO 11843.** 2003. International Organization for Standardization. ISO 11843-4:2003. Capability of detection. Part 4: Methodology for comparing the minimum detectable value with a given value.

- **ITO, Y.; OKA, H.; IKAI, Y.** 2000. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 898:95-102.

- **KATZUNG, B.** 2002. Sulfonamidas, Trimetoprim y Quinolonas. **In:** Farmacología básica y clínica. 8ª ed. Editorial México D.F. pp: 893- 902.

- **KISHIDA, K.** 2005. Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*. 6p.

- **LI, H.; JAMES, P.; TURNIPSEED, S.** 2006. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 836: 22-38.

- **LIMA, E.** 2005. Sulfonamidas. [En línea]. <<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/sulfo/sulfonamidas.htm>.> [consulta: 27-04-2005].

- **MARTIN-JIMENEZ, T.** 2002. Sulfamidas y diaminopirimidinas. **In:** Farmacología y Terapéutica Veterinaria 1ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp: 447- 454.

- **Mc EVOY, J.** 2002. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta.* 473: 3-26.

- **MINISTERIO DE SALUD, CHILE.** 2004. Fija limites maximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. Resolución exenta N° 1462 de 1999. Modificaciones resolución exenta N° 423 del 2004. [En línea]. <http://www.minsal.cl/juridico/RESOLUCION_1462_99.doc> [consulta: 10-10-2007].

- **PECORELLI, I.; BIBI, R.;FIORONI, L.; GALARANI, R.** 2004. Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A.* 1032: 23-29.

- **PEREZ-TRALLELO, E.** 2003. Tetraciclinas, Sulfamidas y Metronidazol. Servicio de microbiología. Formación medica continuada. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 21:520-9.

- **PETRI, W. A.** 2003. Sulfonamidas, Trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas y fármacos contra infecciones de vías urinarias. **In:** Goodman, A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Ciudad de México, México. pp: 1189-1206.

- **RED SANITARIA.** 2005. Foro mundial sobre inocuidad alimentaria. [En línea]. <http://www.cofepris.gob.mx/RevistaRED/portada2005julio/num2_art_5.htm> [consulta: 05-10-2007].

- **SARMAH, A.; MEYER, M.; BOXALL, A.** 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. *Chemosphere.* 35p.

- **SERNAPESCA.** 2006. Programa de control de fármacos. Programa de control de residuos. [En línea]. <<http://www.sernapesca.cl/>> [consulta: 18-04-2007].

- **SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2005. Boletín veterinario oficial. La inocuidad alimenticia en los productos cárnicos con particular referencia a los productos avícolas. [En línea].
<http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/febrero_2005/articulos_informes/lainocuidad_alimenticia.pdf>

- **SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2006. Programa de control de residuos en productos pecuarios. [En línea].
<http://www.sag.gob.cl/.../bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf>

- **SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2007. Programa de control de residuos en productos pecuarios. [En línea].
<http://www.sag.gob.cl/.../bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf>

- **VICH.** 2004. International cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products. Validation of analytical procedures: Definition and Terminology.

Anexo I: Resultados de experimentos combinados para la determinación de la robustez de 7 sulfonamidas.

FACTORES	EXPERIMENTOS								
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	
	C: 3000rpm /5'	C: 3000rpm /10'	C: 3000rpm /5'	C: 3000rpm /10'	C: 3000rpm /5'	C: 3000rpm /10'	C: 3000rpm /5'	C: 3000rpm /10'	C: 3000rpm /10'
	E: bomba Vacio	E: bomba vacio	E: gravedad	E: gravedad	E: bomba vacio	E: bomba vacio	E: gravedad	E: gravedad	E: gravedad
	C Epp.: 3000rpm /5'	C Epp.: 3000rpm /5'	C Epp.: 3000rpm /5'	C Epp.: 3000rpm /5'	CEpp.: 3000rpm /10'	CEpp.: 3000rpm /10'	C Epp.: 3000rpm /10'	C Epp.: 3000rpm /10'	C Epp.: 3000rpm /10'
	RESULTADOS								
	SULFADIAZINA								
	0,0042 mg/K	0,0052 mg/K	0,0042 mg/K	0,0043 mg/K	0,0037 mg/K	0,0031 mg/K	0,0038 mg/K	0,0044 mg/K	
	SULFATIAZOL								
0,0031 mg/K	0,0049 mg/K	0,0032 mg/K	0,0032 mg/K	0,0021 mg/K	0,0012 mg/K	0,0019 mg/K	0,0029 mg/K		
SULFAMERAZINA									
0,0045 mg/K	0,0057 mg/K	0,0047 mg/K	0,0047 mg/K	0,0038 mg/K	0,0029 mg/K	0,0039 mg/K	0,0049 mg/K		
SULFAMETAZINA									
0,0041 mg/K	0,0053 mg/K	0,0044 mg/K	0,0043 mg/K	0,0035 mg/K	0,0025 mg/K	0,0035 mg/K	0,0044 mg/K		
SULFAMETOXIPIRIDOZINA									
0,0038 mg/K	0,0063 mg/K	0,0058 mg/K	0,0058 mg/K	0,0054 mg/K	0,0045 mg/K	0,0054 mg/K	0,0057 mg/K		
SULFACLOROPIRIDOZINA									
0,0209 mg/K	0,0047 mg/K	0,0026 mg/K	0,0025 mg/K	0,0011 mg/K	0,0004 mg/K	0,0013 mg/K	0,0023 mg/K		
SULFAMETOXAZOL									
0,0042 mg/K	0,0049 mg/K	0,0045 mg/K	0,0047 mg/K	0,0038 mg/K	0,0035 mg/K	0,0039 mg/K	0,006 mg/K		

Donde:

C = centrifuga

E = elusión

C Epp. = centrifuga Eppendorf®