

Validación de una metodología analítica para la cuantificación de la ciprofloxacina en huevos de gallinas mediante HPLC

Validation of an analytical methodology for the quantification of ciprofloxacin in chicken eggs by HPLC

Julio César Benítez-Villalba^{1,*}, Martiniano Barrios¹ & Mercedes Benítez-Peña¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: La ciprofloxacina es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas utilizadas en medicina humana y veterinaria. Este compuesto posee unas características que hacen que la resistencia de las bacterias a las mismas sea reducida, sin embargo, el amplio uso que ello se utiliza en veterinaria puede propiciar que los residuos de los mismos se incorporen en la cadena alimentaria. Por estas razones, el uso de la mayoría de los antibióticos está regulado por diferentes organismos tanto nacionales como internacionales. En este trabajo de investigación se ha desarrollado y validado una metodología analítica para la determinación y cuantificación de este antibiótico en huevos de gallina que son comercializados en la Gran Asunción. Se ha utilizado la cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC-FLD, previamente extracción del analito a partir de la técnica de extracción líquido-líquido. Como columna cromatográfica se utilizó Zorbax C18 (250 mm x 4.5 mm x 5 µm) a una temperatura de 30°C. La detección se realizó con fluorescencia a longitudes de onda de 294 nm (excitación) 500 nm (emisión), empleando una fase móvil de Acetonitrilo:Agua ácido cítrico 50 mM, trietilamina pH 4 (10:90) en modo isocrático. El método analítico ha demostrado ser altamente sensible, con límite de detección inferior a 0,18 µg.g⁻¹. Los resultados comprueban la presencia de este contaminante a concentraciones entre 40.34 y 46.09 µg/Huevo. Los datos obtenidos servirán para sentar un precedente y generar datos de información científica y estadísticamente validadas, que podrá ser útil para dar a conocer a la comunidad científica.

Palabras clave: *Ciprofloxacina, Huevos, Cromatografía de líquido de alta resolución HPLC-DAD.*

Abstract: Ciprofloxacin is a fluoroquinolone antibiotic used in human and veterinary medicine. This compound has some characteristics that make the resistance of the bacteria to them is reduced, however, the wide use that it is used in veterinary medicine can lead to their residues being incorporated into the food chain. For these reasons, the use of most antibiotics is regulated by different national and international organizations. In this research work, an analytical methodology for the determination and quantification of this antibiotic in chicken eggs that are marketed in Greater Asunción has been developed and validated. HPLC-FLD high resolution liquid chromatography has been used, previously extracting the analyte from the liquid-liquid extraction technique. As a chromatographic column, Zorbax C18 (250 mm x 4.5 cm x 5 µm) was taken out at a temperature of 30°C. Detection was performed with fluorescence at wavelengths of 294 nm (excitation) 500 nm (emission), using a mobile phase of Acetonitrile:Water 50 mM citric acid, triethylamine pH 4 (10:90) in isocratic mode. The analytical method has proven to be highly sensitive, with a detection limit of less than 0.18 µg.g⁻¹. The results prove the presence of this contaminant at concentrations between 40.34 and 46.09 µg/Egg. The data obtained will serve to sit down without precedent and generate scientific and statistically validated information data, which may be useful to inform the scientific community.

Key words: *Ciprofloxacin, Eggs, HPLC-DAD High Performance Liquid Chromatography.*

Introducción

Los peligros para la salud humana originados por los productos alimentarios pueden derivar de las materias primas utilizadas, de la manipulación y de todas las fases de elaboración, transporte, almacenamiento y venta de los alimentos (Botsoglou

& Fletouris, 2001; Fajardo *et al.*, 2011). Entre los principales peligros figuran la contaminación microbiana, los aditivos alimenticios, los contaminantes ambientales y los residuos de plaguicidas y de medicamentos de uso veterinario (Montalvo *et al.*, 2004; Takeda & Akiyama, 1991). Los residuos

Recibido: 11/08/2022 Aceptado: 14/04/2023



de antibióticos en alimentos de origen animal pueden provocar reacciones alérgicas en individuos hipersensibles, pero, sobre todo, la administración de bajos niveles de antibióticos puede dar lugar a bacterias resistentes, que pueden llegar al ser humano a través de dichos alimentos (Cancho *et al.*, 2000; García *et al.*, 2005). Por todas estas razones los organismos encargados de la vigilancia de la salud pública, en muchos países, han desarrollado normativas de control de los Límites Máximos de Residuos (LMR) en tejidos animales destinados al consumo humano. El LMR representa aquella concentración permitida de un principio activo en alimentos de origen animal (músculo, hígado, riñón, grasa, leche, huevo, etc.) que al ser ingerida por el ser humano no constituye ningún riesgo para su salud (Alm El Dein & Elhearon, 2010; Farré & Barceló, 2012).

La contaminación, de los alimentos de consumo humano, se venía produciendo de manera natural, pero con la necesidad de las nuevas prácticas y de nuevos procedimientos industriales, han ido apareciendo nuevos tipos de contaminación, la seguridad de los alimentos que consumimos se ha convertido en una prioridad fundamental tanto para los consumidores como para las industrias productoras, esta atención denota la cobertura de las necesidades alimentarias de la población con productos de valor nutricional adecuado y en un rango de costes asumible (Montalvo *et al.*, 2004; Mottier *et al.*, 2003).

El uso de los antibióticos en veterinaria para el tratamiento de enfermedades en el ganado y sector avícola destinado al consumo humano, así como su utilización como aditivos en granjas industriales, han dado como resultado que deba considerarse su presencia potencial en alimentos de origen animal, cuando se utilizan de forma fraudulenta, indiscriminada y abusiva, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos persistan en el alimento y pasen a la cadena de alimentación humana (Yorke & Froc, 2000; Verdon *et al.*, 2005). Pero como ocurre en medicina humana, los antibióticos son empleados en veterinaria con la finalidad no sólo de curar (terapéutica), sino también de prevenir

enfermedades (Stolker & Brinkman, 2005; Baliz & Hewitt, 2003). Además, en el caso de la veterinaria, los antibióticos son empleados como promotores del crecimiento, así como en horticultura y en agricultura. Los antibióticos pueden mejorar los rendimientos de la explotación ganadera, al incrementar la ganancia de peso y el índice de conversión de los alimentos, que van desde un 3-5% en pollos, un 4-5% en cerdos y terneros, hasta más de un 10% en vacuno de carne (Yoshida *et al.*, 2009; Butaye *et al.*, 2003).

Unos de los antibióticos utilizado de uso veterinario y en seres humano es la **Ciprofloxacina** (Gorla *et al.*, 1997; Nadezhda *et al.*, 2012). Este compuesto pertenece a la clase de antibiótico llamada fluoroquinolona de la segunda generación y posee un amplio espectro de acción, según el nivel de actividad se lo utiliza para tratar o prevenir determinadas infecciones bacterianas. Su nombre químico es 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico-clorhidrato (Griggs *et al.*, 2005; Macarov *et al.*, 2012). Tiene la siguiente estructura química que vemos en la Figura 1.

Su fórmula molecular es $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$, posee un peso molecular de 367.82 g/mol (Gorla *et al.*, 1997; Griggs *et al.*, 2005). La Ciprofloxacina en su estado puro es un polvo de color amarillo pálido, ligeramente higroscópico y cristalino; soluble en agua y muy ligeramente en alcohol deshidratado, ligeramente soluble en metanol, es prácticamente insoluble en acetona, diclorometano y en acetato de etilo. En una solución de 2.5 % en agua tiene

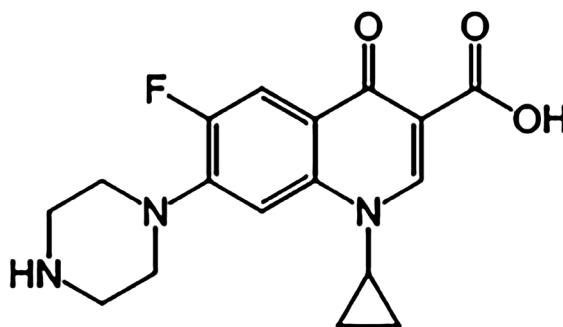


Figura 1. Estructura química de la Ciprofloxacina Clorhidrato.

un pH de 3.5 a 4.5 (Griggs *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 1999). En las aves, pollos de engorde y pavos, actúa contra enfermedades causadas por microorganismos Gram positivos, Gram negativos y *Mycoplasmas* susceptibles a la Ciprofloxacina como neumonía e infecciones gastrointestinales (Gharieb & Atti, 2011; Kowalski, 2008). En este trabajo de investigación se ha desarrollado y validado una metodología analítica para la determinación y cuantificación de la Ciprofloxacina en huevos de gallinas que son comercializados en la zona metropolitana de Asunción utilizando para ello la cromatografía de líquido de alta resolución HPLC y la extracción líquido-líquido para extraer el analito de la matriz.

Materiales y métodos

Productos químicos y reactivos

Para los ensayos correspondientes se han utilizado reactivos de grado analítico. El patrón de Ciprofloxacina fue suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La solución madre del analito fue preparada una sola vez a una concentración de 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y fue almacenado a -20°C en una botella de vidrio oscuro. El acetonitrilo que se utilizó para la preparación de la fase móvil y la extracción del analito fue de grado cromatográfico de la marca J.T. Baker (CAS N° 75-05-8), el agua destilada utilizada fue obtenida del equipo (QUIMIS, Brasil) y posteriormente purificada en un equipo Barnstead™ MicroPure™. La Trietilamina de la marca Fluka (CAS: 121-44-8), el acetato amónico (CAS 631-61-8) de la Marca Merck, el ácido fosfórico (CAS: 7664-38-2) Merck de 85% de pureza, ácido acético de la marca Merck (CAS 64-19-7).

Instrumentación y software

Para la extracción de la Ciprofloxacina de la matriz estudiada se utilizó una la técnica de extracción líquido-líquido, también conocida como extracción con solventes o extracción con disolventes, para ello se utilizó una variedad de materiales de vidriería como vasos de precipitados, embudos, varilla de vidrio entre otros. Un vortex marca LW Scientific y una centrífuga de mesa de la marca Presvac DCS-16

RV. Para la detección y cuantificación del analito se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC – FLD. La detección se realizó con fluorescencia a longitudes de onda de 294 nm (excitación) 500 nm (emisión). La separación cromatográfica del analito en estudio se obtuvo utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm; 5 μm). El manejo del instrumento, la detección de los picos y la integración de los mismos se llevaron a cabo utilizando el software LCsolution.exe (versión 1.0). Se utilizó una balanza analítica RADWAG (modelo 310.R2) made in Polan (EU) para realizar el peso del estándar, reactivos y las muestras. Se utilizó un software Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU., 2000) para el tratamiento estadístico de los datos. Paquetes Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint® 2010.

Toma y Preparación de las Muestras

La técnica de muestreo utilizada fue el no probabilístico del tipo conveniencia. Los huevos de gallinas fueron muestreados de supermercados que se encuentran en el área metropolitana de Asunción, se adquirieron tres diferentes marcas comerciales y huevos de procedencia casera que se utilizó como blanco. Cada muestra contó con 6 huevos que fueron tratadas. Primeramente, se determinó la cantidad del contenido por cada huevo y el promedio total por marca, luego se realizó un pull de cada marca agregando las yemas y las claras en un recipiente. Una vez determinada el contenido de cada huevo, el promedio y el pull de todas las marcas, se traspasó en tubos Falcon (Fig. 2), se identificaron las marcas y fueron guardadas en el refrigerador a una temperatura de 4°C para evitar su descomposición hasta el momento de su análisis.

La técnica de extracción utilizada fue la de líquido-líquido. Se pesó 1 gramo de cada pull de las marcas de huevos estudiadas, todas por triplicado. A cada muestra de le adicionó 4 mL de una solución de ácido acético/etanol absoluto, en una proporción 1:99 y fueron agitadas durante 5 minutos en un vortex. Posteriormente se le agregó 500 μL de ACN y se agitaron otros 5 minutos. El extracto

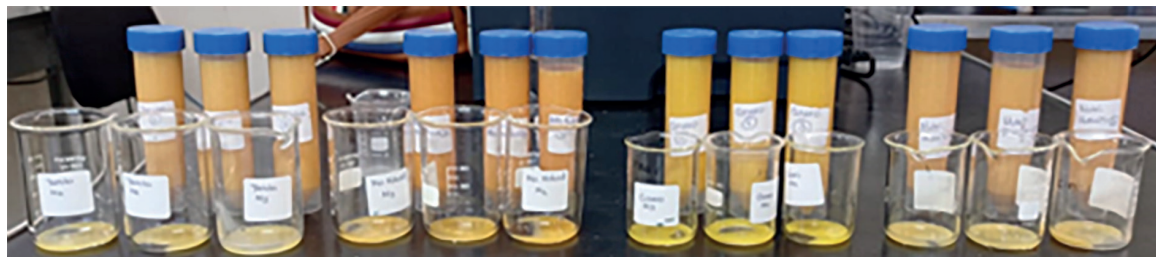


Figura 2. Muestras preparadas para la extracción líquido-líquido.

fue centrifugado durante 20 minutos a 3220 g el sobrenadante fue filtrado por filtro minisart de 0,45 μm y traspasadas a un vial de vidrio de HPLC para su posterior lectura cromatográfica.

Preparación de las muestras patrones

Primeramente, se preparó una disolución patrón de Ciprofloxacina a partir de 50 mg que se disolvieron en un matraz de 100 mL (500 $\mu\text{g/mL}$) con fase móvil, seguidamente se traspasaron 10 mL a un matraz de 100 mL (50 $\mu\text{g/mL}$) a partir de esta última disolución patrón se prepararon 6 disoluciones más diluidas de concentraciones 1, 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g/mL}$ (3 réplicas por cada nivel):

- 2 mL de solución patrón de Ciprofloxacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ en 100 mL con fase móvil (1 $\mu\text{g/mL}$).
- 4 mL de solución patrón de Ciprofloxacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ en 100 mL con fase móvil (2 $\mu\text{g/mL}$).
- 4 mL de solución patrón de Ciprofloxacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ en 50 mL con fase móvil (4 $\mu\text{g/mL}$).
- 6 mL de solución patrón de Ciprofloxacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ en 50 mL con fase móvil (6 $\mu\text{g/mL}$).
- 8 mL de solución patrón de Ciprofloxacina de 50 $\mu\text{g/mL}$ en 50 mL con fase móvil (8 $\mu\text{g/mL}$).

Optimización de las condiciones cromatográficas HPLC

Para la optimización del método cromatográfico del HPLC se empleó una disolución de la Cipro-

floxacina en fase móvil a una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$. En primer lugar, se fijó la detección del analito en el equipo que fue del tipo fluorescencia a unas longitudes de onda de excitación de 294 nm y de emisión 500 nm. En el desarrollo de la metodología propuesta se empleó la cromatografía en fase reversa (fase estacionaria menos polar que la fase móvil). Se seleccionó una columna con relleno ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm; 5 μm) de dimensiones y tamaño de partícula; todo ello de acuerdo a la afinidad, la muy buena resolución y las características fisicoquímicas del analito con la misma.

Se ensayaron las principales variables que afectan a la separación cromatográfico y a la intensidad de la señal, se evaluaron diferentes fases móviles de acuerdo a la naturaleza del analito, se ensayaron mezclas de acetonitrilo y una solución acuosa ajustada a pH 4 con ácido cítrico 50 mM y trietilamina, las diferentes proporciones ensayadas fueron (50:50), (30:70) y (10:90). También se evaluó el efecto del caudal, la temperatura de la columna y volúmenes de inyección en la detección de la Ciprofloxacina. Se ensayaron velocidades de flujo isocrático desde 1 a 2,5 mL.min⁻¹; las temperaturas de la columna de 30 °C a 50 °C. Finalmente se evaluó el volumen de inyección desde 5 a 30 μL .

Validación del método analítico

Para la validación del método analítico propuesto en este trabajo de investigación se siguieron las recomendaciones de la “Guía de validación para métodos bioanalíticos” propuesta por la FDA. Los parámetros de validación que fueron evaluados a partir del calibrado son: linealidad, límites de detección y cuantificación, rango dinámico lineal,

sensibilidad analítica y exactitud del método expresada en términos de precisión y veracidad (USP 29, 2005).

Los requisitos de la validación del método analítico se establecieron de la siguiente manera: (a) Linealidad, el coeficiente de determinación (R^2) debe ser igual o mayor que 0,999 y la desviación residual máxima debe ser menor al 25%. (b) La precisión, expresada como desviación estándar relativa DER (precisión entre días) debe ser $\leq 30\%$. (c), la veracidad, expresada como recuperación media, debe estar en el rango 70 a 120%. (d) El límite de cuantificación (LC) debe cumplir con los requisitos (b) y (c). Estos requisitos se ajustan a la Decisión 2002/657 / CE de la Comisión de la Comunidad Europea (Benítez-Villalba *et al.*, 2013).

La calidad, confiabilidad y consistencia de un método analítico validado se determina en base a la sensibilidad, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud y precisión del analito estudiado. Para ello se han preparado 5 disoluciones estándar partiendo de la solución madre de concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ para obtener otras disoluciones de concentraciones de 1 – 2 – 4 – 6 – 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como disolvente la fase móvil detallado su preparación en el ítem **Preparación de las muestras patrones**. Cada parámetro de validación se define como sigue: **linealidad** que es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración del o los analitos en una muestra dentro de un intervalo determinado; **límite de detección LD** es la cantidad más baja del analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto; **límite de cuantificación LC** es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable; **Rango Dinámico Lineal (RDL)** es la que se establece como el intervalo de concentraciones que comprenden entre el límite de cuantificación de los métodos y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado al método analítico (IUPAC 1978); **la**

sensibilidad analítica de un método analítico o sensibilidad de la calibración mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibración (González *et al.*, 1996); **la exactitud** es la cercanía del acuerdo entre el valor que se acepta ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado; y la precisión es la cercanía del acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una homogénea muestra en las condiciones prescritas.

Los parámetros de validación fueron calculados de la siguiente manera: **la linealidad** se calculó a partir de seis concentraciones de los estándares en un rango de concentración de 1 - 10 $\mu\text{g/mL}$; para evaluar la linealidad, se construyó un gráfico de la señal producida por el analito en función de la concentración del mismo y la regresión lineal se calculó por el método de los mínimos cuadrados. Calculando el coeficiente de correlación y el intercepto para la Ciprofloxacina. **El límite de detección** se determinó mediante la fórmula $LD = 3.3 \times S_o$ y el **Límite de cuantificación** se determinó mediante la fórmula $LC = 10 \times S_o$, donde

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}}$$

($S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, b = pendiente, n = puntos de calibración (Benítez-Villalba *et al.*, 2018).

El **Rango Dinámico Lineal (RDL)** se estableció entre el límite de cuantificación del método y el límite superior del intervalo de concentraciones en la que fue aplicado al método. **La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad** de la calibración se propuso como la sensibilidad analítica ($S_{\text{Analítica}}$) que se calcula por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (b), según la ecuación $S_{\text{Analítica}} = S_{y/x} / b$ (Benítez-Villalba *et al.*, 2021; Mandel & Stiehler, 1954).

Exactitud del Método, Precisión y Veracidad, para establecer la exactitud del método propuesto, se ha estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación con muestras dopadas y su

Fase estacionaria	Zorbax (C18) 250 mm x 4.5 mm x 5 µm
Fase móvil	Acetonitrilo:Agua ácido cítrico 50 mM, ajustado a pH 4 con trietilamina (10:90)
Modalidad	Isocrática
Flujo	2 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de la columna	30 °C
Detección	Fluorescencia: 294 nm (excitación) 500 nm (emisión)

Tabla 1. Valores óptimos de las condiciones cromatográficas.

precisión en términos de variabilidad inter e intra-día. Para el estudio de exactitud del método en términos de veracidad se llevó a cabo un estudio de recuperación a tres niveles de concentración (4, 6, 8 µg/mL).

Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento operatorio descrito a lo largo del artículo y la concentración del analito se determinó por interpolación a la curva de calibrado dentro del rango dinámico lineal. Los valores de recuperación se obtuvieron por comparación con la cantidad de analito que fue añadida a las muestras de huevo casero (blanco), previamente fueron cuantificada la Ciprofloxacina realizando todo el procedimiento de extracción (Benítez Villalba *et al.*, 2018). Cada analito se expresó como porcentaje y se calculó mediante la ecuación: recuperación (%) = $S1 / (S2 + S3) \times 100$, donde S1 = cantidad encontrada (µg/mL) en la muestra enriquecida, S2 = cantidad presente originalmente en la muestra no enriquecida, y S3 = cantidad (µg/mL) de analito agregado a la muestra.

Para evaluar la exactitud del método en términos de **precisión**, se estudió la repetibilidad (precisión “intra-día”) y la reproducibilidad (precisión “inter-día”) (Benítez Villalba *et al.*, 2013). Para ello, se realizaron diversas réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, durante un mismo día y durante tres días consecutivos. Cada muestra dopada o enriquecida fue extraída y analizada por triplicado (previamente cuantificada la Ciprofloxacina), es decir tres réplicas de cada punto en el mismo día para evaluar la variabilidad “intra-día” y se repitió en tres días consecutivos para evaluar

la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) (Norma ISO 5725 1994; European Commissio, 2002; Massart *et al.*, 1997).

Resultados y discusión

Condiciones del cromatográficas HPLC

De las condiciones cromatográficas que fueron optimizadas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC la fase móvil seleccionada fue el Acetonitrilo : Agua ácido cítrico 50 mM, ajustado a pH 4 con trietilamina (10:90) por dar una muy buena señal analítica; la velocidad de flujo óptimo fue el de 2 mL/min ya que mejoró significativamente la resolución y la forma del pico, la intensidad de respuesta y tiempo de retención; la temperatura optima de la columna fue 30 °C que mostró una muy buena forma del pico mientras que el volumen de inyección optimo fue de 20 µL y la detección fluorescencia fue de 294 nm (excitación) 500 nm (emisión). Los resultados de los valores óptimos se pueden observar en la Tabla 1 así como el cromatograma obtenido a partir de estas condiciones óptimas en la Fig. 3.

Validación del método analítico

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de la validación del método analítico para la determinación y cuantificación de la Ciprofloxacina en muestras de huevos que son comercializados en centros comerciales de la Gran Asunción. Se realizó la extracción del analito mediante la técnica de extracción líquido-líquido; a continuación, la validación del método analítico y seguido la detección

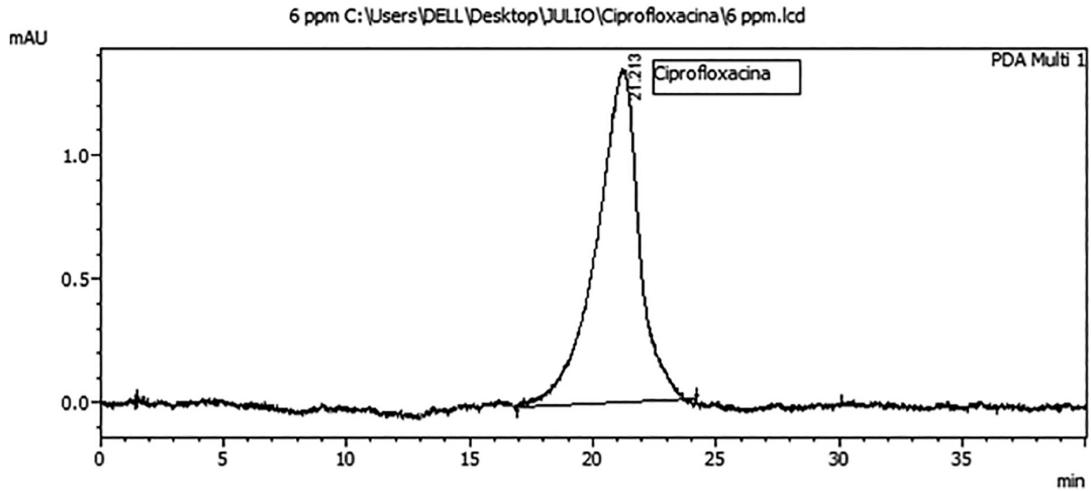


Figura 3. Cromatograma de la Ciprofloxacin con las condiciones óptimas estándar 6 mg/mL.

y cuantificación de la Ciprofloxacin por la técnica de cromatografía de líquido de alta resolución HPLC. En la Tabla 2 se observan los resultados de los parámetros de calibración de la técnica analítica en estudio, donde R^2 (%) es el coeficiente de correlación, n = puntos de calibración, b = pendiente, S_b = desviación estándar de la pendiente, a = intercepto, S_a = desviación estándar del intercepto,

Tabla 2. Parámetros de calibración en la técnica analítica HPLC.

Linealidad	
Ecuación de la recta	$Y=27342 \cdot X - 2772.4$
R^2 (%)	99.95
n	15
b ($\mu\text{g/mL}$)	27339.4
S_b	845.816
A	-2768.450
S_a	171.937
$S_{y/x}$	1705.550
%plof	0.978
LD($\mu\text{g/mL}$)	0.180
LC($\mu\text{g/mL}$)	0.601
Sensibilidad	0.0624
RDL($\mu\text{g/mL}$)	0.601-8

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, % plof = valor P de prueba de falta de ajuste, LD = límite de detección, LC = Límite de cuantificación, RDL = rango dinámico lineal (Benítez Villalba *et al.*, 2013; Mandel & Stiehler, 1954).

Linealidad: Dos aspectos importantes y fundamentales se examinaron en esta validación del método analítico, el **Límite de Detección (LD)** y el **Límite de Cuantificación (LC)** cuyos resultados fueron respectivamente de 0.180 $\mu\text{g/mL}$ y 0.601 $\mu\text{g/mL}$ demostrando en este sentido que en el método propuesto es altamente sensible y puede ser utilizado en la detección y cuantificación del analito en esta matriz. Se detalla también el **Rango Dinámico Lineal (RDL)** del analito en el calibrado que va de 0.601-8 $\mu\text{g/mL}$. El valor obtenido del **Coefficiente de Correlación $\%R^2$** de la curva de calibrado fue de 99.95 demostrando que existe linealidad en los intervalos estudiados; además la **sensibilidad del método analítico** o sensibilidad de la calibración que se ha medido mediante la relación entre señal instrumental y la concentración del analito del rango lineal que viene dada por la pendiente de la recta de calibrado fue de 0.0624 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 4 se observa el gráfico de la curva de calibrado de la Ciprofloxacin.

Exactitud del Método Analítico: se realizó el estudio de recuperación de la técnica analítica de extracción mediante la fortificación de una disolu-

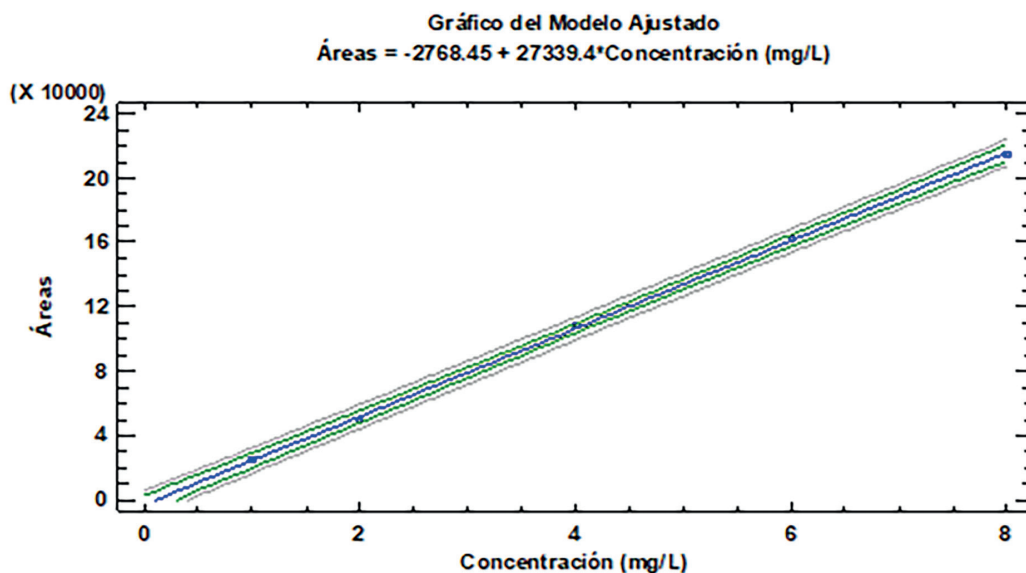


Figura 4. Curva de calibrado de la Ciprofloxacina por HPLC.

ción patrón a las muestras de huevo casero (que previamente analizada no contiene la Ciprofloxacina) a tres niveles de concentración diferentes 4 – 6 y 8 $\mu\text{g/mL}$ (por triplicado). Los cálculos se realizaron de acuerdo a la metodología que esta descrito en el ítem de **validación del método analítico**. En las Tablas 3 y 4 se muestran los valores de recuperación obtenidos en esta técnica.

Se logró obtener recuperaciones inter e intra día entre 81% y 85% para la Ciprofloxacina en esta matriz lo que nos lleva a deducir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, el valor obtenido en esta técnica analítica la DER fue menor al 2%. Este dato se encuentra dentro de los límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación em-

pleada, según la cual se considera aceptable valores iguales o inferiores al 15% en general y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se puede concluir que el método propuesto de la técnica de extracción líquido - líquido cumple con los requisitos de precisión (Cuadros Rodríguez *et al.*, 1993). Se trata por tanto de un método veraz, preciso y por tanto exacto.

Aplicación del método analítico

Al finalizar el desarrollo y la validación del método analítico se procedió a determinar y cuantificar el contenido de la Ciprofloxacina en las muestras de huevos que fueron procesadas de acuerdo a la preparación de las muestras utilizando la curva de calibrado descrito en la metodología. Los resulta-

Tabla 3. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de veracidad del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Ensayo Intra - día						
Analito	Dopado $\mu\text{g/mL}$	Observado $\mu\text{g/mL}$	DE	Recuperación %	DER %	n
Ciprofloxacina	4	3.39	0.0304	84.75	0.1471	3
	6	4.99	0.0658	83.21	0.0574	3
	8	6.67	0.0075	83.33	0.0357	3

Tabla 4. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de precisión del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Ensayo Inter - día						
Analito	Dopado $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g.mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
Ciprofloxacina	4	3.2552	1.1279	81.38	0.0371	3
	6	4.9591	1.1811	82.65	1.1344	3
	8	6.4915	1.0932	81.14	1.1092	3

dos obtenidos de la extracción de este analito en las muestras de huevos se pueden observar en la Tabla 5.

Como se puede observar en la Tabla 5, la Ciprofloxacina se encontró y cuantificó en las tres marcas de huevos analizadas que fueron muestreadas en supermercados del Gran Asunción, a unos intervalos de concentraciones comprendidos de 40.34 y 46.09 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$, es decir se ha obtenido los siguientes resultados (**Marca 1 = 40.47 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$, Marca 2 = 46.09 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$ y Marca 3 = 40.34 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$**). Por otro lado, el antibiótico objeto de estudio no ha sido detectado en las muestras de huevos caseros, la explicación a este hecho puede radicar en que la Ciprofloxacina se haya metabolizado de forma natural en esta matriz o se encuentre por debajo del

límite de cuantificación o que dicho antibiótico no se encuentre dentro de la dieta del animal en los piensos etc.

Conclusión

La presencia de antibióticos en el medio ambiente y la vida cotidiana se ha convertido en los últimos años en un asunto delicado e importante. La mayor parte de estas sustancias se acumulan en nuestro organismo y entran a través de la medicación y otras veces en la alimentación. Por este motivo es necesario el estudio de estas especies químicas en animales y productos que derivan de ellas ya que estos medicamentos son probablemente uno de los grupos más ampliamente utili-

Tabla 5. Concentración de la Ciprofloxacina encontradas en las muestras. **ND:** no detectado (valor inferior al LD); **D:** detectado, pero no cuantificado (valor entre el LD y el LC).

Concentración de la Ciprofloxacina en muestras de huevos $\mu\text{g.g}^{-1}$				
Marcas	Muestras	Concentraciones $\mu\text{g.g}^{-1}$	Promedio $\mu\text{g.g}^{-1}$	$\mu\text{g}/\text{Huevo}$
Marca 1	Mtra 1	0.8677	0.8432	40.47
	Mtra 2	0.8411		
	Mtra 3	0.8208		
Marca 2	Mtra 1	0.7813	0.8768	46.09
	Mtra 2	0.8391		
	Mtra 3	1.0099		
Marca 3	Mtra 1	0.8247	0.7498	40.34
	Mtra 2	0.7722		
	Mtra 3	0.6524		
Casero	Mtra 1	ND	ND	ND
	Mtra 2	ND		
	Mtra 3	ND		

zados en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades en animales de producción. En nuestro país, el registro de los fármacos tiene autorizado el uso de fluoroquinolonas en pollos en crecimiento. Por otro lado, no contamos con un control sobre el uso extra etiqueta, por lo que no podemos asegurar el no uso de estos fármacos en estas aves y por lo tanto la ausencia de residuos de antimicrobianos en huevos destinados a consumo de la población.

Hemos podido demostrar con nuestra técnica analítica desarrollada la presencia de este compuesto a concentraciones de 40.34 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$, 40.47 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$ y 46.09 $\mu\text{g}/\text{Huevo}$ en las diferentes muestras de las marcas de huevos de gallinas estudiadas. Para ello en este trabajo de investigación se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación y cuantificación de la Ciprofloxacina (antibiótico de uso veterinario) en un tipo de muestra muy compleja como es la del huevo con límites de detección muy satisfactorios. Se ha puesto a punto un método analítico, que incluye una etapa de extracción en fase líquida, previa a su detección y cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC. El método ha sido validado y utilizado con éxito para la determinación y cuantificación de la Ciprofloxacina en muestras de huevos obtenidas de supermercados del Gran Asunción. El método analítico ha demostrado ser altamente sensible en la detección de este antibiótico en las muestras de huevos, con límite de detección inferior a 0,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. El método analítico desarrollado ofrece una importante innovación científica, ya que en la actualidad son muy pocos los métodos publicados sobre estudios de estos compuestos en matrices biológicas, principalmente en huevos de gallina.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Literatura citada

- Alm El Dein, A.K. & Elhearon, E.R. (2010). Antibiotic residue in eggs of laying hens following injection with gentamicin. *New York Science Journal*, 3(11): 135–140.
- Balizes, G. & Hewitt, A. (2003). Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica*, 492(1-2): 105–131.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N. M. & Vílchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63.
- Benítez-Villalba, J.C., Grau-Torales, M.G., Cristaldo-López, O.D., Bogado-Fernández, A.I., Arrúa-Martínez, L.A. & Villalba-Villalba, N.M. (2021). Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC. *Reportes Científicos de la FACEN*, 12(1): 48–58.
- Benítez-Villalba, J.C., Zafra-Gómez, A., Dorival-García, N., Camino-Sánchez, F.J., Cantarero, S. & Vílchez, J.L. (2013). Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: Comparison of the efficiency of two extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 36(16): 2635–2645.
- Botsoglou, N.A. & Fletouris, D.J. (2001). *Drugs residues in foods, pharmacology, food safety, and análisis*. (1st Ed). New York / Basel: Marcel Dekker Inc. xv + 1200 pp.
- Butaye P., Devriese L.A. & Haesebrouck F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2): 175–188.
- Cancho, G.B., García, F.M. & Simal, G.J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación

- animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(1): 39–47.
- European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EEC. *Official Journal of the European Communities*, L 221: 2–28.
- Cuadros Rodríguez, L., García Campana, A.M., Jimenez Linares, C., & Roman Ceba, M. (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6): 1243–1258.
- Fajardo, A.L., Méndez, F.J. & Molina, L.H. (2011). Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano. *Universitas Scientiarum*, 16(1): 77–91.
- Farré, M. & Barceló, D. (2012). Analysis of emerging contaminants in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 43: 240–253.
- García, J., Pico, Y. & Font, G. (2005). Determinación de residuos de quinolonas en alimentos de origen animal mediante electroforesis capilar espectrometría de masas. *Revista de toxicología*, 22(1): 77–88.
- Gharieb, M.M. & Atti, N.M.A. (2011). Ciprofloxacin drug residue in table egg. *Suez Canal Veterinary Medical Journal*, 16(2): 137–138.
- Gonzalez, A., Cuadros, L., Alonso, E. & Vilchez, J.L. (1996). Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726(1-2): 133–139.
- Gorla, N., Chiostri, E., Ugnia, I., Weyers, A., Giacomelli, N., Davicino, R. & Ovando, H. (1997). HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8(4): 253–256.
- Griggs, D., Johnson, M., Frost, J., Humphrey, T., Jorgensen, F. & Piddock, I. (2005). Incidence and Mechanism of Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter* spp. Isolated from Commercial Poultry Flocks in the United Kingdom before, during, and after Fluoroquinolone Treatment. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 49(2): 699–707.
- IUPAC. (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II data interpretation. Analytical chemistry division. *Spectrochimica Acta B*, 33(6): 241–245.
- Kowalski, P. (2008). Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3): 487–493.
- Macarov, C.A., Tong, L., Martínez, H.M., Hermo, M.P., Chirila, E., Wang, Y.X., Barrón, D. & Barbosa, J. (2012). Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 135(4): 2612–2621.
- Mandel, J. & Stiehler, R.D. (1954). Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 53(3): 155–159.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science. vi + 867 pp.
- Montalvo, M., Olivos, O., Gilabert, S. & Rodríguez, A. (2004). Análisis del riesgo de los medicamentos veterinarios presentes en los alimentos. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*, 2(3): 168–175.
- Mottier, P., Parisod, V., Gremaud, E., Guy, P.A. & Stadler, R.H. (2003). Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 994(1-2): 75–84.
- Sorensen, L.k., Hansen, H. & Snor, L. (1999). Determination of Amoxicillin in Trout by Liquid Chromatography with UV Detection after Derivatization. *Journal of AOAC International*, 82(6): 1345–1352.
- Stoilova, N.A., Surleva, A.R. & Stoev, G. (2012).

- Simultaneous determination of nine quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Food analytical Methods*, 6(3): 803–813.
- Stolker, A.A. & Brinkman, U.A. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals a review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2): 15–53.
- Takeda, N. & Akiyama, Y. (1991). Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. *Journal of Chromatography A*, 558(1): 175–180.
- Verdon, E., Couedor, P., Roudaut, B. & Sanders, P. (2005). Multiresidue Method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/ multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: single laboratory validation study. *Journal of AOAC international*, 88(4): 1179–1192.
- Yorke, J.C. & Froc, P. (2000). Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by High-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2): 63–77.
- Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T. & Miyano, H. (2009). Advantage of LC-MS metabolomics methodology targeting hydrophilic compounds in the studies of fermented food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4): 1119–1126.