

**Determinación de residuos de
oxitetraciclina en hígado de res
sacrificado en Tegucigalpa**

Pedro Valiente Villalba

Honduras
Noviembre, 2002

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Determinación de residuos de oxitetraciclina en hígado de res sacrificado en Tegucigalpa

Trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Pedro Valiente Villalba

Honduras
Noviembre, 2002

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Pedro Valiente Villalba

Honduras
Noviembre, 2002

Determinación de residuos de Oxitetraciclina en hígado de res sacrificado en Tegucigalpa

presentado por:

Pedro Valiente Villalba

Aprobada:

Gladys Fukuda, M.Sc.
Asesor Principal

Claudia García, Ph.D.
Coordinadora de Carrera de
Agroindustria

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Pamela Jaramillo, Ing.
Asesor

Mario Contreras, Ph.D.
Director General

DEDICATORIA

A mi querida familia.

A mis queridos compatriotas.

A mis queridos compañeros.

A Dios.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres y hermanos por sus consejos y por estar siempre a mi lado.

A mis asesores por su tiempo, paciencia, consejos y por la confianza depositada en mi.

Al Dr. Wilfredo Galeas por su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros que me apoyaron durante las largas jornadas de laboratorio, en especial a José R., Arturo, Gabriela, Reina, Lesly, Jaime, Daniel E., Eva, Ligia, Regina, José F. y Yury.

A mis compatriotas, en especial a Pánfilo, Jover y Cecilio por su gran colaboración en los trabajos de laboratorio.

Al personal de laboratorio por su valiosa ayuda.

Al personal de la carrera por su apoyo logístico para transportar las muestras.

Al Ing. Lino Argüello por sus enseñanzas y sugerencias.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Al Fondo Dotal Suizo por su apoyo financiero en los tres primeros años de estudios.

A la Fundación Nipón por el financiamiento de mi último año de estudio.

A mi querida familia que en todo momento me apoyó.

RESUMEN

Valiente, Pedro. 2002. Determinación de residuos de oxitetraciclina en hígado de res sacrificado en Tegucigalpa. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 26 p.

Los productores pecuarios utilizan antibióticos para prevenir o combatir enfermedades y también como promotor de crecimiento. La presencia de residuos de estos medicamentos en los alimentos puede traducirse en problemas de variada índole y gravedad para la salud, como alergias y resistencia microbiana. La mayoría de los países latinoamericanos no han abordado este problema; en Honduras no se han publicado estudios sobre niveles de residuos de medicamentos veterinarios, aunque existen regulaciones sobre los Límites Máximos de Residuos (LMR). La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico de amplio espectro y de bajo costo, lo que hace muy común su uso en las fincas; el LMR permitido para la OTC en hígado es de 300 µg/kg (0.3 ppm). Con este estudio se pretende aportar información sobre las amenazas a la salud del consumidor con respecto a la presencia de residuos. Se estudió la presencia de residuos de OTC en hígado de res sacrificado en Tegucigalpa y se compararon los resultados entre las épocas seca y lluviosa. Los muestreos se realizaron en la Procesadora Municipal de Carnes (PROMDECA) que maneja el 90% de los sacrificios en Tegucigalpa. Generalmente estos estudios se realizan en músculo, hígado y riñón; en este estudio se eligió tomar muestras de hígado por ser ésta una víscera de consumo popular y el órgano detoxificador donde se acumulan los residuos. Se colectaron 60 muestras de 500 g de hígado en cada época, que fueron analizadas el mismo día del muestreo. Se utilizó cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para la cuantificación de residuos (AOAC). Se obtuvo 65% de recuperación del antibiótico, con el cual se ajustó los resultados. Sólo se detectaron seis muestras positivas de las 120 analizadas, dos en época seca y cuatro en época lluviosa, pero en una concentración menor al LMR y sin diferencias entre la época seca y lluviosa ($P > 0.10$). Se concluye que no hubo presencia de OTC en la carne proveniente de PROMDECA.

Palabras claves: antibióticos, cromatografía, HPLC, LMR, salud del consumidor.

Nota de Prensa

¿Existen residuos de antibióticos en los hígados que se consumen en Tegucigalpa?

Los ganaderos que se dedican a la crianza de ganado para consumo humano, utilizan una gran variedad de medicamentos, entre ellos los antibióticos. Estos medicamentos se utilizan con el fin de combatir y evitar enfermedades y como promotores de crecimiento.

Si se realiza una buena práctica veterinaria, se puede evitar que estos medicamentos queden como residuos en los tejidos de los animales. La presencia de residuos de antibióticos en la carne puede traducirse en problemas de variada índole y gravedad para la salud de los consumidores, ocasionando problemas de toxicidad, alergias y resistencia bacteriana.

La acción de los residuos de antibióticos es acumulativo y su efecto es a largo plazo, ya que son ingeridos con los alimentos y se van acumulando en el organismo con el paso de los años, hasta que llega a un nivel que supera el límite y provoca un efecto en la salud. Las cantidades extremadamente pequeñas de los residuos hacen que el hombre no pueda detectarlos por medio de los sentidos, por lo que es necesario un análisis de laboratorio.

La oxitetraciclina es uno de los antibióticos más utilizados por los ganaderos, es por eso que en Zamorano se realizó un estudio para determinar el nivel de residuos de oxitetraciclina, en hígado de res que se consume en Tegucigalpa, usando el método de Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC). Las muestras fueron obtenidas de la Procesadora Municipal de Carne (PROMDECA), las muestras se tomaron durante la época seca (enero y febrero de 2002) y la lluviosa (julio y agosto de 2002), con el objetivo de comparar ambas estaciones.

Se analizaron 60 muestras en cada estación, la mayoría de ellas provenientes de los departamentos de Olancho y El Paraíso. El 95% de las muestras resultaron negativa y en el 5% restante no se detectó concentración de residuos superior al límite máximo permitido (0.3 µg/g). Tampoco existen diferencias apreciables entre las dos estaciones del año.

En conclusión, en los meses establecidos y bajo las condiciones de este estudio, los animales sacrificados en PROMDECA estuvieron libres de residuos de oxitetraciclina, indicando que probablemente las carnes que se consumen en Tegucigalpa no representan riesgos para la salud.

Lic. Sobeyda Alvarez

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a Patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de Prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de Cuadros.....	xi
	Índice de Anexos.....	xii
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	SITUACIÓN DE LA GANADERÍA EN HONDURAS.....	3
2.1.1	Producción y consumo de carne en Honduras.....	4
2.2	OXITETRACICLINA.....	4
2.2.1	Absorción.....	5
2.2.2	Distribución.....	6
2.2.3	Excreción.....	6
2.3	ESTUDIOS ANTERIORES.....	7
2.4	MÉTODOS PARA DETERMINAR RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS	7
2.5	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)..	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1	MATERIALES.....	10
3.2	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	10
3.3	TOMA DE MUESTRAS.....	10
3.4	VARIABLE MEDIDA.....	11
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	11
3.6	PREPARACIÓN DE MUESTRA Y MÉTODO CROMATOGRÁFICO	11
3.6.1	Extracción.....	11
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1	ORIGEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.....	12
4.2	MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO.....	12
4.3	NIVEL DE OXITETRACICLINA EN LAS MUESTRAS.....	13

4.4	COMPARACIÓN DE NIVELES DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN ÉPOCA SECA Y LLUVIOSA	13
5	CONCLUSIONES	15
6	RECOMENDACIONES	16
7	BIBLIOGRAFÍA	17
8	ANEXOS	19

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Número de explotaciones ganaderas por propósito en Honduras	3
2.	Número de explotaciones y cabezas de ganado bovino por región existentes en Honduras.....	4
3.	Número de explotaciones que usan insumos agropecuarios en Honduras	4
4.	Niveles de tolerancia de residuos químicos en músculo (ppm)	5
5.	Origen de las muestras analizadas por época	12
6.	Comparación de la concentración esperada del estándar OTC y la detectada por el HPLC (ppm).....	13
7.	Frecuencia de muestras analizadas y residuos detectados	14

INDICE DE ANEXOS

Anexos

1.	Preparación de muestras.....	20
2.	Preparación del estándar de OTC.....	22
3a.	Datos de las muestras analizadas en época seca	23
3b.	Datos de las muestras analizadas en época de lluvia	24
4.	Cromatograma del estándar de OTC.....	26

1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de medicamentos veterinarios, entre ellos los antibióticos, son muy utilizados por los ganaderos para mejorar la salud animal; se utilizan para combatir enfermedades, pero también con fines profilácticos y como promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano. El gran reto es mantener una buena práctica veterinaria en las fincas, para evitar que estos antibióticos queden como residuos en los tejidos animales que se usan para consumo humano.

Según el Laboratorio de Residuos Químicos de Argentina (2001), la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos puede traducirse en problemas de variada índole y gravedad para la salud de los consumidores. Los efectos tóxicos pueden agruparse en directos e indirectos. Son directos aquellos producidos por la utilización de antibióticos en condiciones terapéuticas, se manifiestan en variadas formas clínicas: toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves. Los efectos indirectos son los asociados a los fenómenos de resistencia bacteriana y a las formas de alergias. Es importante mencionar que las alergias se refieren a una reacción clínica, en un individuo sensibilizado a una sustancia, que resulta inocua para la mayoría de los individuos.

En Honduras no existen estudios documentados sobre la presencia de residuos de antibióticos en alimentos. Esta situación no sólo se da en este país, sino que la mayoría de los gobiernos de los países latinoamericanos están despreocupados por este problema, por lo que es motivo de estudio por parte del sector privado, académico y científico. Sin embargo, en otros países como México, Argentina y EEUU, existen organizaciones gubernamentales y ONG's que se encargan de regular y monitorear estos residuos.

Generalmente la acción de los residuos químicos es acumulativo y su efecto es a largo plazo, ya que son ingeridos con los alimentos y se van acumulando en el organismo durante años, hasta que llega a un nivel que supera el límite y provoca un efecto sobre la salud. Las cantidades extremadamente pequeñas de los residuos hacen que el hombre no pueda detectarlos por medio de los sentidos, por lo que es necesario un análisis de laboratorio.

Según el Laboratorio de Residuos Químicos de Argentina (2001), la literatura médica describe pocos casos comprobados en los que se ha identificado a los residuos químicos, presentes en los alimentos, como nocivos para la salud de los consumidores. En la mayoría de los casos los efectos a largo plazo son imposibles de rastrear, o bien se trata de reacciones leves y no de intoxicaciones agudas. Sin embargo, la preocupación pública respecto a la presencia de residuos en los alimentos es muy grande justamente por su accionar silencioso, y porque está claro que la falta de estudios en humanos no prueba la inocuidad de estos productos.

La falta de información en el ámbito local, el costo elevado de los análisis y el poco interés de las autoridades nacionales son las principales limitantes en este tipo de estudio. No habiendo actualmente una institución local que controle el uso de antibióticos, se ha efectuado este estudio con el objetivo de determinar la presencia de residuos de oxitetraciclina, en hígado de

reses sacrificadas en Tegucigalpa y obtenidas de la Procesadora Municipal de Carnes (PROMDECA), y de comparar los niveles de residuos en dos épocas del año (seca y lluviosa).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 SITUACIÓN DE LA GANADERÍA EN HONDURAS

La ganadería en Honduras es una actividad tradicional. Un número razonable de productores que tienen una visión de empresa se especializan en la producción de carne o de leche. Sin embargo, en Honduras la mayor parte recurre al sistema de doble propósito (Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1999); específicamente el 36.6% de las explotaciones son de doble propósito, sólo el 2.8% de ellas son especializadas en la producción de ganado de carne (Cuadro 1) (Dirección General de Estadística y Censos, 2000).

Cuadro 1. Número de explotaciones ganaderas por propósito en Honduras.

Propósito	No. de explotaciones	%
Carne	2,735	2.8
Leche	37,455	38.7
Carne y Leche	35,455	36.6
Otros	21,452	22.2
Total	96,813	100

Fuente: Dirección General de Estadística y Censos (2000), adaptado por el autor.

A partir de la ganadería de doble propósito y la especializada, se han establecido industrias a lo largo de la cadena de producción de carne. También en este caso existen dos tipos de industrias, la artesanal rural (mataderos rurales) y las plantas industriales formalmente establecidas que procesan carne para los mercados nacionales e internacionales. Adicionalmente existen también importadores de carne que abastecen a los restaurantes y hoteles (Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1999).

Según la Dirección General de Estadística y Censos (2000) en Honduras, el número de cabezas de ganado existente es de 1,715,386 de las cuales el 26% se concentra en la región sur y centro oriental (Cuadro 2). Existen 96,813 explotaciones ganaderas, que en promedio cuentan con 17.7 cabezas de ganado bovino. Sólo el 2.9% de las explotaciones cuenta con más de 100 cabezas que constituyen el 31.8% de la existencia de ganado bovino.

Cuadro 2. Número de explotaciones y cabezas de ganado bovino por región existentes en Honduras.

Región	No. de cabezas	%	No. de explotaciones
Sur	153,670	8.9	12,462
Centro Occidental	80,133	4.7	9,784
Norte	325,260	18.9	16,141
Litoral Atlántico	271,133	15.8	10,364
Nor Oriental	363,105	21.2	19,508
Centro Oriental	291,213	16.9	15,313
Occidental	230,871	13.5	13,241
Total Nacional	1,715,386	100	96,813

Fuente: Dirección General de Estadística y Censos (2000), adaptado por el autor.

No existe reporte del uso de antibióticos específicos, pero la Dirección General de Estadística y Censos en el año 2000 reportó que más del 55% de las explotaciones usan algún tipo de medicamentos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de explotaciones que usan insumos agropecuarios en Honduras.

Insumos	No. de explotaciones	%
No usa insumo	7,161	7.4
Usa Insumo	89,652	92.6
▪ Vacunas	66,541	68.7
▪ Desparasitantes	66,027	68.2
▪ Vitaminas	53,858	55.6
▪ Sal común	82,432	85.2
▪ Sales minerales	26,149	27.1
▪ Alimentos concentrados	15,711	16.2

Fuente: Dirección General de Estadística y Censos (2000), adaptado por el autor.

2.1.1 Producción y consumo de carne en Honduras

Se estima que en los países en desarrollo la ingesta de carne de vacuno se mantiene estable en 6.3 kg *per capita* por año (FAO, 2002). En Honduras el consumo de carne es de 5.0 kg *per capita* por año (Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1999). La producción anual de carne es de 22,000 toneladas métricas con el sacrificio de 144,000 cabezas de ganado bovino al año (FAO, 2001).

2.2 OXITETRACICLINA

Las tetraciclinas químicamente están caracterizadas por un octahidronaftaceno conjugado en un esqueleto de cuatro anillos con un grupo funcional carboxiamida. Son compuestos anfotéricos solubles en solventes polares y moderadamente polares, muestran la habilidad de formar complejos fuertes con cationes di y trivalentes (Brandsteterová *et al.*, 2000).

La oxitetraciclina (OTC) es altamente efectiva contra numerosas bacterias gram-positivas y gram-negativas; por eso es considerada como un antibiótico de amplio espectro, con extenso rango de aplicación (Brandsteterová *et al.*, 2000). En las fincas se utiliza para combatir enfermedades infecciosas en general, con fines profilácticos y como promotor de crecimiento. Es un antibiótico de bajo costo y de mucha disponibilidad en los mercados.

En Honduras se han establecido niveles de tolerancia de residuos químicos (Cuadro 4), cuyo control está a cargo del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA) de la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG), a través del artículo 261 de las Regulaciones de Sanidad Agropecuaria.

Cuadro 4. Niveles de tolerancia de residuos químicos en músculo (ppm).

Antibióticos	Bovinos	Cerdos	Pollos
Sulfachlorpyridazine	0.1	0.1	--
Sulfadimethoxine	0.1	--	0.1
Sulfabromomethazine	0.1	--	--
Sulfaethoxypyridazine	0.1	0.1	0.1
Sulfamethazine	0.1	0.1	0.1
Sulfathiazole	--	0.1	--
Penicilina	0.05	0.04	0.04
Clortetraciclina	0.1	1	1
Oxitetraciclina	0.1	0.1	1
Estreptomina	--	0.5	0.5
Eritromicina	0.3	0.1	0.125
Neomicina	0.25	0.25	0.25

Fuente: Centro Cívico Gubernamental (2000), adaptado por el autor.

Los Límites Máximos de Residuos (LMR) han sido estipulados para muchos alimentos pecuarios como carne, pescado, mariscos, huevos, leche y grasa. Respecto a la evaluación de residuos de antibióticos en carne, los tejidos usados son el músculo, el hígado y los riñones tal como establece el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1995). El hígado es el tejido detoxificador del cuerpo, en donde es muy probable encontrar residuos; este órgano es consumido en los países latinoamericanos y por su bajo costo (respecto a los cortes de carne) y valor nutricional resulta bastante popular.

Según Meyer (1982), la administración de este antibiótico se puede realizar por vía oral directa, se inyecta intramuscularmente o se dosifica en los alimentos, en una cantidad de 1 ml por cada 10 kg de peso vivo en todas las especies.

2.2.1 Absorción

Después de la administración bucal, las tetraciclinas se absorben pronto en el estómago y en la primera parte del intestino delgado, llegando al nivel máximo en el plasma después de dos a cuatro horas de administrado (Goodman *et al.*, 1988). Este máximo persiste durante seis o más horas y es seguido por un descenso gradual, hasta que a las veinticuatro horas sólo hay indicios de antibiótico en la sangre. Parte del medicamento se concentra en el hígado, se excreta en la

bilis y se reabsorbe en el intestino, por lo cual una pequeña cantidad persiste en la sangre largo tiempo después de la administración (Meyer, 1982).

Por vía intravenosa existe una disminución rápida de la concentración del antibiótico en la sangre, en veinticuatro horas sólo quedan indicios. La persistencia de las tetraciclinas en la corriente sanguínea ofrece sorprendente contraste con los otros antibióticos, que se eliminan con mucha más rapidez. La dosis recomendada de tetraciclinas produce niveles importantes en el plasma durante las 24 horas después de su administración (Meyer, 1982).

Según Goodman *et al.* (1988), la OTC administrada por vía intramuscular es detectable en el plasma a los quince minutos, alcanza el máximo en una hora, la sangre mantiene niveles significativos durante doce horas y luego declina gradualmente hasta sólo indicios a las 24 horas después de la inyección.

2.2.2 Distribución

Las tetraciclinas se difunden y se almacenan generalmente por todo el cuerpo, en mayores concentraciones en los riñones, bazo, hígado y pulmones, ligándose en grado variable a las proteínas del plasma (Goodman *et al.*, 1988). Se hallan en concentraciones antibacterianas en todo el cuerpo, incluso en la circulación fetal. También se encuentran cantidades considerables de tetraciclinas en las heces del animal al que se administra parenteralmente el antibiótico, éste se concentra rápidamente en el hígado y se elimina con la bilis en proporción de cinco a quince veces más que en plasma del paciente normal (Meyer, 1982).

2.2.3 Excreción

Las tetraciclinas se excretan principalmente por los riñones y las heces, y la vía principal para casi todas es el riñón. Aproximadamente del 10 al 35% de una sola dosis de OTC puede encontrarse en la orina, aunque se observan variaciones más grandes con dosis extremas (Goodman *et al.*, 1988). Las tetraciclinas se excretan lentamente por los riñones, lo que explica la persistencia de estos antibióticos en el plasma por tiempo relativamente largo. Después de la administración bucal, la concentración más alta de tetraciclinas en la orina ocurre entre la segunda y la octava hora; pero puede descubrirse actividad antibacteriana durante tres o más días después de suspendido el tratamiento (Meyer, 1982).

También hay eliminación fecal de tetraciclinas cualquiera que sea la vía de administración, la cantidad eliminada después de la inyección puede alcanzar 10% de la dosis total. También se encuentran en las heces pequeñas cantidades de tetraciclinas procedentes de administración parenteral, debido a la concentración biliar y al paso del antibiótico de la bilis al intestino (Meyer, 1982).

Después de inyecciones intravenosas repetidas, la bilis excreta una cantidad suficiente de tetraciclinas para reprimir la fermentación bacteriana en los herbívoros, por lo que el paciente muestra trastornos digestivos, falta de apetito y a veces diarrea (Meyer, 1982).

2.3 ESTUDIOS ANTERIORES

Se han realizado diversos estudios de monitoreo de niveles de residuos de OTC en diferentes tejidos animales, usando métodos cualitativos como bioensayos y métodos cuantitativos como HPLC. El estudio más concreto usando el método de HPLC en medición de residuos de OTC fue publicado por la FAO.

En este estudio de la FAO (1991) se aplicó intramuscularmente una sola dosis de 20 mg de OTC por kg de peso vivo; luego se midieron los niveles de residuos en varios tejidos como músculo, riñón, hígado, grasa y sitio de inyección, a intervalos de tiempo durante 21 días. En hígado y músculo ya no se detectaron residuos a los 14 días. En riñón, grasa y sitio de inyección se detectaron residuos hasta el día 17, pero ya no a los 21 días.

En el mismo estudio de la FAO (1991), se realizaron varios análisis con la aplicación de una dosis de 11 mg/kg de peso vivo durante cuatro días; se detectó residuos en riñón hasta el día 27 y en hígado hasta el día 23. Con base a esto se recomienda que un animal, al que se le ha aplicado OTC, debe tener un mínimo de 30 días de descanso previo al sacrificio.

En el Laboratorio Nacional de Residuos (LANAR) de Honduras se han realizado análisis durante varios años sobre niveles de residuos de antibióticos, utilizando métodos de tamizaje como ensayos radio inmunológicos (RIA). El tejido analizado es el riñón, ya que en este órgano se acumula la mayor cantidad de residuos, durante todos esos años de análisis no se han detectado presencia de residuos de antibióticos¹.

Bermúdez *et al.* (1999) publicaron un estudio en donde se analizaron residuos de OTC en tejido de camarón por método HPLC y por bioensayo (Charm II test); los análisis se realizaron durante varios días en el transcurso de los tratamientos y luego de los mismos. Estos tratamientos consistieron en diferentes concentraciones de OTC en los alimentos (500, 250 y 100 mg/kg) de los camarones. Los niveles más altos de residuos de OTC fueron encontrados en los primeros días del tratamiento, estos niveles tuvieron una tendencia decreciente tan pronto fue suspendida la alimentación. Los niveles más altos de residuos se encontraron en el tratamiento con 500 mg/kg de OTC en el alimento.

Los análisis estadísticos muestran que la concentración de OTC en el músculo de camarón fue influenciada por las dosis de OTC en los alimentos y por el periodo del tratamiento. La diferencia entre el método HPLC y Charm II no fue significativa, es por eso que se concluye que la prueba Charm II es una alternativa válida para el HPLC, en detección de residuos de OTC en músculo de camarón. El Charm II es rápido pero menos sensible (Bermúdez *et al.*, 1999).

2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAR RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Según Moats (1997), monitorear antibióticos en muestras de alimentos involucra métodos analíticos y bioensayos. Las pruebas inmunológicas o por inhibición microbiana son pruebas de tamizaje que comúnmente se utilizan para la determinación de estos medicamentos. Los métodos de tamizaje, excepto algunos pocos inmuno ensayos, no permiten la identificación

¹ Rivera. 2002. Análisis de Antibióticos por Immuno Ensayos (Comunicación personal). Tegucigalpa. LANAR.

individual de los antibióticos y frecuentemente dan falsos positivos. Sin embargo, algunos antibióticos pueden ser detectados por debajo de los LMR sin la complicación causada por los pasos de la preparación de la muestra. Técnicas analíticas han sido desarrolladas exitosamente para identificar y cuantificar compuestos.

Para la caracterización y cuantificación de los residuos de medicamentos, los componentes deben ser separados unos de otros de la matriz del alimento. La cromatografía líquida y la de gases y la separación electroforética han sido usadas para monitorear antibióticos. Existen otra técnica emergente como la electroforesis capilar de zona, que todavía no tiene éxito en la determinación de residuos. De las técnicas cromatográficas, el HPLC es generalmente preferido para la determinación de residuos de antibióticos. Existe pocos reportes del uso de cromatografía de gas y cromatografía de capa fina. La cromatografía de fluidos supercríticos es otra técnica emergente que no trabaja bien con muchos antibióticos, pero ha sido aplicada en la determinación de sulfonamida. La cromatografía capilar electrocinética micelar también ha sido probada para el análisis de algunos antibióticos; comparado con el HPLC ofrece la ventaja de ser más rápida y más sensible, pero el HPLC se desempeña mejor para análisis cuantitativos. Existe también la cromatografía a contracorriente para la separación de algunos antibióticos. En síntesis el HPLC y los bioensayos son las técnicas más usadas para el monitoreo de residuos de antibióticos (Brandsteterová *et al.*, 2000).

2.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)

Según la Red Latinoamericana de Química (2002), el HPLC es en la actualidad una de las técnicas de laboratorio más importantes como herramienta analítica, para separar y detectar compuestos químicos estrechamente relacionados. Se utiliza además para la identificación cualitativa y la cuantificación de los compuestos separados.

Según Brandsteterová *et al.* (2000), el HPLC normalmente se utiliza para cuantificar los niveles de residuos en muestras que han resultado positivas según los métodos de tamizaje (ensayos microbiológicos cualitativos). Esta técnica da la oportunidad de separar simultáneamente todos los compuestos analizados junto con sus respectivos metabolitos. En muchos casos permite la determinación de niveles de concentración bajos de los analitos estudiados y la presencia de muchos otros componentes interferentes. Es muy eficiente cuando se combina con una técnica efectiva de preparación de muestras y aplicando apropiadamente todos los principios cromatográficos.

Los componentes básicos del sistema HPLC son:

- Fase móvil
- Inyector
- Columna, puede ser de diferente material, de fase normal o reversa, con sus respectivas medidas (longitud, diámetro, tamaño de partículas y porosidad) (Red Latinoamericana de Química, 2002)
- Bomba
- Detector, existen tres tipos: Ultravioleta, Fluorescencia y Electroquímico, con sensibilidad específica.

El éxito de esta técnica está en la buena preparación de la muestra, existe amplia literatura que recomienda posibilidades de preparación efectiva de las muestras, antes de analizar por HPLC

los niveles de antibióticos en tejidos biológicos y alimentos. Uno de los pasos más complicados del análisis de antibióticos es la extracción y limpieza del analito de una matriz biológica. Los métodos de tamizaje normalmente requieren sólo de un simple proceso de extracción y limpieza. Los métodos cuantitativos, comparativos y confirmativos como los ensayos cromatográficos y espectrométricos, particularmente de residuos en tejidos biológicos, requieren un tratamiento extensivo antes de estar listos para el análisis (Brandsteterová *et al.*, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

- Muestra: 500 g de hígado de res
- Hielera
- Bolsas con cierre
- Hielo seco
- Trituradora (procesador de alimento)
- Homogenizador de tejidos
- Centrífuga
- Congelador y cuarto frío a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Filtro GF/B 5.5 cm y “acrodisk” 0.45 μm
- Extractor de fase sólida (SPE, de sus siglas en inglés) con cartuchos C18
- Equipo HPLC (de siglas en inglés), Sistema Binario Perkin Elmer Serie 200
- Detector UV-VIS PE 785 A
- Columna C18 fase reversa
- Estándar de oxitetraciclina (Sigma 05875)
- Solventes grado HPLC: metanol, acetonitrilo
- Reactivos: ácido oxálico, ácido cítrico, fosfato de sodio y EDTA
- Cristalería de laboratorio

3.2 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El muestreo se realizó en la Procesadora Municipal de Carnes de Tegucigalpa (PROMDECA). Los análisis se realizaron en el Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano, ubicado en el valle del Yeguaré, Departamento de Francisco Morazán.

3.3 TOMA DE MUESTRAS

El cálculo del número de muestras se hizo con un 90% de confianza usando el programa STATS. La población tomada es la cantidad de ganado sacrificado en Tegucigalpa mensualmente, que en promedio es de 4,700 cabezas aproximadamente, de acuerdo a PROMDECA. Según estos datos, se tomó 60 muestras de hígado (n) en cada periodo.

El muestreo se hizo semanalmente, tomando entre 10 y 15 muestras por semana en las dos épocas: seca (Enero a Febrero 2002) y lluviosa (Julio a Agosto 2002), recogiendo 60 muestras durante cada estación. Estas muestras se envasaron en bolsas con cierre, se transportaron al laboratorio en hieleras con hielo seco y se procesaron inmediatamente.

Las muestras fueron tomadas al azar por el jefe de inspección de PROMDECA. Se tomó una muestra de 400-500 g de hígado de cada animal elegido al azar, tratando de que sea representativa del hígado entero como recomienda el Codex Alimentarius (FAO; OMS,1995).

3.4 VARIABLE MEDIDA

En este estudio se midió el nivel de residuos de oxitetraciclina presentes en el hígado. Según el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1995), el Límite Máximo de Residuos de Oxitetraciclina (LMR) permitido en hígado de bovinos es de 300 µg/kg (0.3 ppm), el mismo que se usó como parámetro de comparación.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la comparación de los resultados entre la época seca y lluviosa se utilizó la comparación de muestras independientes (Prueba t) utilizando el programa Microsoft Excel.

3.6 PREPARACIÓN DE MUESTRA Y MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para la preparación de la muestra se siguió los procedimientos recomendados por la AOAC, que es el método oficial 995.09, mediante Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) (AOAC, 1997). La muestra traída al laboratorio se trituró en un procesador de alimentos y se tomó 5 g de muestra para realizar el análisis. Esta se homogenizó durante 30 segundos y se centrifugó con buffer-EDTA (ácido etilendiaminotetracético), se lavó varias veces hasta obtener un extracto del hígado; éste se filtró y los residuos de antibiótico se separaron con cartuchos C18 en el extractor de fase sólida, luego se extrajo con metanol y ácido oxálico para finalmente inyectarlos en el HPLC (Anexo 1).

Las condiciones del método fueron las siguientes:

- Columna C18 DB, Supelco, fase reversa (15 cm x 4.6 mm x 5 µm)
- Precolumna C8, Perkin Elmer
- Fase móvil con 70% de ácido oxálico y 30% de metanol: acetonitrilo (50:50)
- Flujo: 1.5 ml/min
- Detector UV a 350 nm
- Curva estándar de calibración con 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 µg/g (ppm) de OTC.

3.6.1 Extracción

El método fue modificado para mejorar la eficiencia y recuperación del antibiótico. El principal cambio fue aumentar el volumen del solvente para extraer el residuo que quedó atrapado en el extractor de fase sólida. De la curva estándar de cinco niveles de calibración se pasaron a cuatro porque la concentración más baja (0.05 µg/g) no llegó a detectarse bien en el aparato. Los pasos de preparación del estándar se presentan en el Anexo 2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Más del 56% de las muestras analizadas provino de Olancho, que es el departamento ganadero más grande del país y el 25% provino de El Paraíso, también un departamento importante para la ganadería; las demás muestras se distribuyeron entre otros departamentos de la región centro-sur de Honduras (Cuadro 5). En el Anexo 3 se puede observar los datos de estas muestras respecto a departamentos y municipios de procedencia, sexo del animal y presencia de OTC.

Cuadro 5. Origen de las muestras analizadas por época.

Departamentos de Origen	Epoca seca	Epoca de lluvia	Total	%
Choluteca	1	0	1	0.8
Colón	2	0	2	1.7
Comayagua	0	2	2	1.7
El Paraíso	8	22	30	25.0
Francisco Morazán	11	6	17	14.2
Olancho	38	30	68	56.6
Total	60	60	120	100

4.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO

No se pudo reproducir fielmente el método de la AOAC, se trabajó con columnas de menor longitud y por lo tanto los tiempos de retención fueron menores. El método original propone una corrida con columna C8 primero y luego una confirmativa con C18; en este estudio se hizo únicamente con la C18 (15 cm) por carecer de una C8 del tamaño adecuado (25 cm).

Debido a lo anterior se modificó también la proporción de los solventes en la fase móvil, de manera que se tuvieran tiempos de retención (TR) apropiados; en el método original se utilizaba una proporción de 65% de ácido oxálico, 15% de acetonitrilo y 20% de metanol como fase móvil. En este caso se cambió la proporción a 70, 15 y 15%, respectivamente.

Los TR fueron en promedio de 3.4 minutos en la época seca y 3.7 minutos en la época lluviosa, esta variación puede ser debido a un deterioro de la columna, resultante del uso intensivo que se le dio. El TR reportado por el método de la AOAC es de 5 minutos, usando una columna de 25 cm. En el Anexo 4 se puede observar un cromatograma de estándar.

El desempeño del método modificado fue muy satisfactorio, los TR de los picos fueron bastante consistentes dentro de cada periodo de estudio. A pesar de utilizar pipetas manuales para medir

volúmenes extraordinariamente pequeños, en la preparación de los estándares, las lecturas de concentración en los cromatogramas fueron muy similares a los esperados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de la concentración esperada del estándar OTC y la detectada por el HPLC (ppm).

Concentración esperada	Concentración detectada
0.10	0.11
0.25	0.26
0.50	0.51
1.00	1.01

El método de extracción y purificación de la OTC a partir del hígado fue seguido según las recomendaciones de la AOAC (1997), por ello se asumió que no habría problemas con la recuperación del analito. Sin embargo, al final del periodo de estudio, se decidió correr una prueba para verificar el porcentaje de recuperación de la OTC. Esto se realizó siguiendo el mismo proceso de preparación de las muestras, solamente que en este caso se utilizó hígado control (libre de residuo de OTC) proveniente de un animal que no había recibido antibióticos. Después del pesado de la muestra triturada y antes de homogenizar, se le agregó una cantidad conocida de OTC, posteriormente se siguió todo el proceso de extracción recomendado y al final se cuantificó. Esta concentración se comparó con la cantidad agregada de OTC al tejido al principio del proceso.

En promedio sólo se obtuvo 65% de recuperación de la OTC, esto indica la ineficiencia del proceso de extracción del residuo del tejido. Este valor es bajo comparado con el esperado según el método, que es de 80% (AOAC, 1997). Se observó que parte de la OTC quedó atrapada en el cartucho C18 durante la extracción en fase sólida.

En las muestras que salieron positivas, la concentración se corrigió por el 65% de recuperación, multiplicando los resultados por 1.35, aun así las concentraciones de OTC no llegaron al LMR (0.3 ppm).

4.3 NIVEL DE OXITETRACICLINA EN LAS MUESTRAS

En el 95% de las muestras analizadas no se detectaron residuos de OTC, solamente en seis de las 120 muestras analizadas se detectaron residuos, pero en concentraciones menores al LMR. Esto implica que la carne de los animales sacrificados en PROMDECA y que se expenden en el área están libres de residuos de OTC, por lo menos en los periodos de enero a febrero y de julio a agosto del 2002.

4.4 COMPARACIÓN DE NIVELES DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA EN ÉPOCA SECA Y LLUVIOSA

En las muestras analizadas en la época seca se detectaron dos muestras con residuos, mientras que en las muestras de la época lluviosa se detectaron residuos en cuatro muestras (Cuadro 7); aunque ninguna de ellas presentó niveles importantes de OTC (<0.05 ppm). Considerando que

el LMR es 0.3 ppm, el análisis estadístico indica que no hay diferencia entre presencia de residuos de OTC debida a la época del año.

Cuadro 7. Frecuencia de muestras analizadas y residuos detectados.

Presencia de residuos	Epoca seca	Epoca de lluvia	Total
Negativos	58	56	114
Positivos	2	4	6
Positivos con residuos > LMR	0	0	0
Total	60	60	120

Esto podría señalar que no hay cambios en el uso de antibióticos durante el año, ya sea porque la época lluviosa no resulta en un incremento de enfermedades infecciosas en el ganado de carne, o porque simplemente no se trata con antibióticos, o porque se respeta la disposición de no sacrificar animales antes de cumplir el tiempo de retiro obligatorio (periodo de espera post-aplicación del antibiótico) que es de 21 días (Centro Cívico Gubernamental, 2000).

5. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio sólo se detectó residuos de oxitetraciclina (OTC) en un 5% de los hígados analizados.
- Ninguna de las muestras detectadas con residuos de OTC tiene concentración superior al límite máximo de residuos permitido (0.3 ppm).
- No existe diferencias en niveles de residuos de OTC entre la época seca y lluviosa ($P > 0.10$)
- Bajo las condiciones de este estudio, los animales sacrificados en PROMDECA están libres de residuos de OTC, por lo tanto las carnes consumidas en Tegucigalpa no representan riesgos por este antibiótico.
- Con el método utilizado sólo se llegó a obtener 65% de recuperación de la OTC, parte de ella queda atrapada en las columnas de extracción de fase sólida.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar una prueba de tamizaje (pruebas microbiológicas) antes de analizar por métodos cromatográficos, para reducir costos, porque sólo se analizaría por HPLC las muestras sospechosas.
- Aumentar el volumen a 20 ml de solvente, durante la extracción en fase sólida, para aumentar el porcentaje de recuperación, ya que la OTC está quedando retenida en el cartucho C18.
- Si se realiza lo anterior, aumentar el volumen de inyección para mejorar la sensibilidad del aparato.
- Experimentar con otros cartuchos (C8) en la extracción de fase sólida para mejorar el porcentaje de recuperación.
- Realizar estudios en carne de otras especies, como las aves, camarones y en productos animales como los huevos o leche.
- Analizar otros tipos de medicamentos como los antiparasitarios y hormonas, que también son utilizados en la ganadería y son perjudiciales para la salud, cuando se acumulan como residuos.

7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 1997. Official Methods of Analysis; Association of Official Analytical Chemists. 15 ed. V. USA.

Bermudez, C.; Pérez, M.; Valenzuela, A.; Vázquez L. 1999. Oxytetracycline Residues in Cultured White Shrimp Tissue by HPLC and a Microbial Receptor Assay. *J. Food Sci.* 64(4):638-640.

Brandsteterová, E.; Kubalec, P.; Bovanová L. 2000. HPLC Determination of Antimicrobial Residues in Edible Animal Products. Editor Nollet, L. 2000. *Food Analysis by HPLC*. 2nd ed. Marcel Dekker. New York. 1049 p.

Centro Cívico Gubernamental. 2000. *La Gaceta*. Tegucigalpa, Honduras, Mar. 8:35.

Dirección General de Estadística y Censos. 2000. *Encuesta Agrícola Nacional 1998-1999: Ganadería*. Tomo III. Tegucigalpa, Honduras.

FAO. 1991. *Residues of some veterinary drugs in animals and foods*. Rome, Italy. 119 p.

FAO. 2001. *Production Yearbook*. No. 156: 251 p.

FAO. 2002. *Carne y productos cárnicos. Perspectivas Alimentarias*. No. 1: 23-26.

FAO; OMS. 1995. *Codex Alimentarius: Residues of Veterinary Drugs in Foods*. 2nd ed. Roma, Italia. 84 p.

Goodman, A.; Goodman, L.; Rall, T.; Murad, F. 1988. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 7th ed. Panamericana. Barcelona. 1725 p.

Instituto Tecnológico de Costa Rica. 1999. *Memoria VIII Simposio Centroamericano y del Caribe sobre procesamiento de carnes*. San José, Costa Rica. 100. p.

Laboratorio De Residuos Químicos. 2001. *Residuos Químicos (en línea) Argentina*. Consultado 15 julio 2001. Disponible en: www.inppaz.org.ar

Meyer, J. 1982. *Farmacología veterinaria*. 2da ed. Barcelona. 1132 p.

Moats, W. 1997. *Advances in Determination of Antibiotic Residues*. *Journal of AOAC International* 80(1):1-4.

Red Latinoamericana de Química. 2002. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (en línea) México DF. Consultado 20 ago. 2002. Disponible en <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm#Tipos>

8. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de muestras

Pesar 5 gramos de hígado triturado y colocarlo en el tubo de 50 ml

Agregar 20 ml buffer – EDTA

Homogenizar durante 30 segundos

Lavar con 2 ml buffer – EDTA (2 veces)

(A) Agitar durante 10 minutos (máxima velocidad)

(B) Centrifugar durante 10 minutos a 3800 rpm

Decantar sobrenadante en otro tubo de 50 ml (a)

Agregar 20 ml buffer – EDTA

(C) Resuspender (vortex)

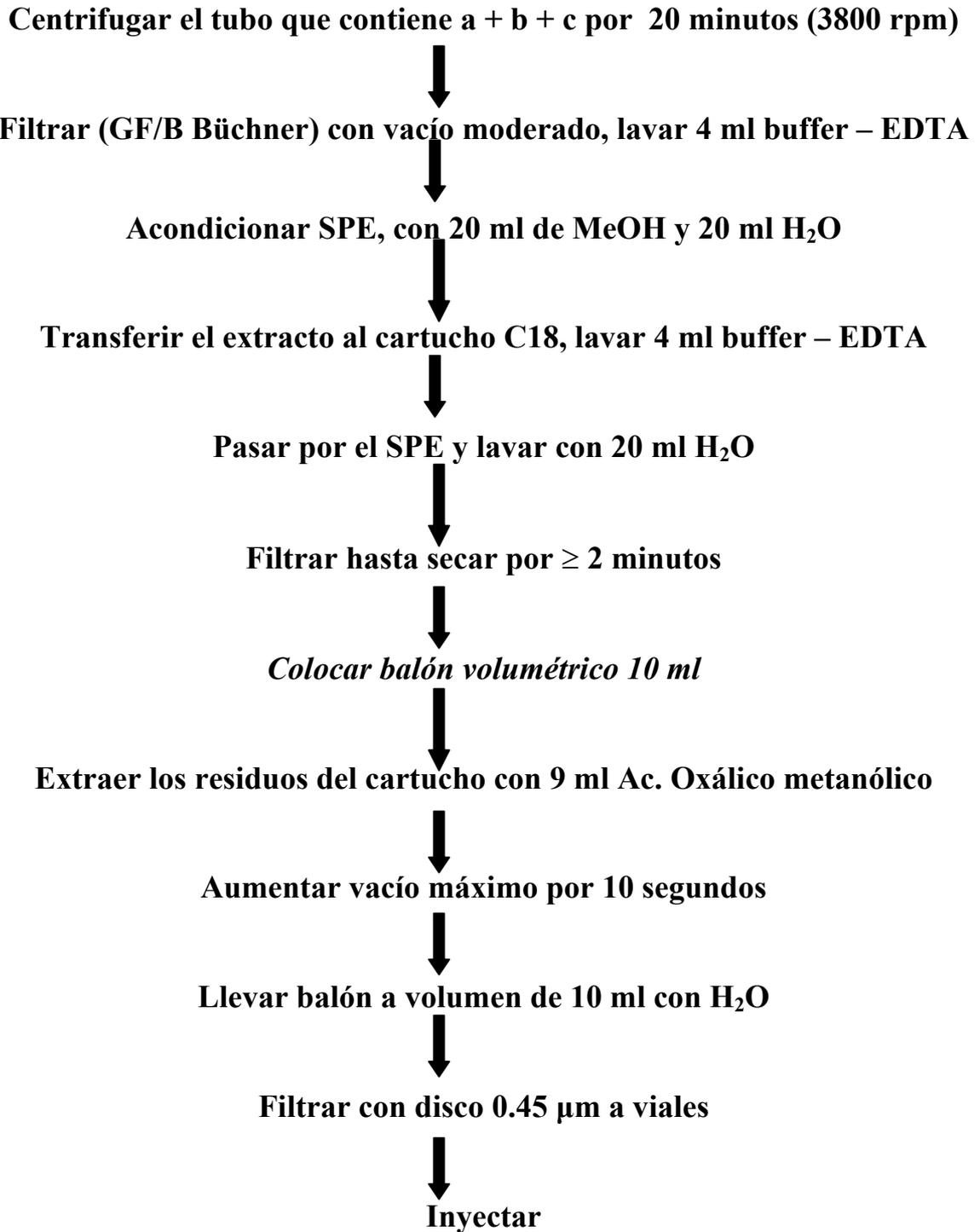
Repetir A y B

Decantar sobrenadante en el mismo tubo de 50 ml (a + b)

Agregar 10 ml buffer – EDTA

Repetir C, A y B

Decantar sobrenadante en tubo de 50 ml (a + b + c)



Anexo 2. Preparación del estándar de OTC

1. **Solución estándar stock (1000 µg/ml):** Pesar 54 ± 0.05 mg de OTC estándar y transferir con metanol grado HPLC en balón volumétrico de 50 ml. Llevar a volumen con metanol grado HPLC.
2. **Solución estándar stock combinado (100 µg/ml):** Pipetear 1 ml de la solución “1” en un balón volumétrico de 10 ml, llevarlo a volumen con metanol grado HPLC y mezclar bien.
3. **Solución estándar de trabajo (25 µg/ml):** Pipetear 2.5 ml de la solución “2” en balón volumétrico de 10 ml y llevarlo a volumen con metanol grado HPLC.
4. **Solución estándar cromatográfica (0.10, 0.25, 0.50, 1.0 µg/ml):** Pipetear 40, 100, 200 y 400 µl de solución “3” en diferentes balones volumétricos de 10 ml. Agregarle a cada balón 9 ml de ácido oxálico metanólico con agua destilada filtrada.
5. **Filtrar e inyectar.**

Anexo 3a. Datos de las muestras analizadas por época seca

Muestra	Fecha	Departamento	Municipio	Sexo	Oxitetraciclina (µg/g)
A	22/02/02	Francisco Morazán	Cofradía	H	ND
A	22/02/02	Olancho	Catacamas Agua Caliente	H	ND
A	22/02/02	Choluteca	El Vanquito	H	ND
A	22/02/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
A	22/02/02	Olancho	Parcelas Patuca	M	ND
A	22/02/02	Olancho	Parcelas Patuca	M	ND
A	22/02/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
A	22/02/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
A	22/02/02	Olancho	El Rosario	M	ND
A	22/02/02	Olancho	El Rosario	M	ND
A	22/02/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
A	22/02/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
A	22/02/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
A	22/02/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
A	22/02/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
B	01/03/02	Olancho	San Francisco de la Paz	M	ND
B	01/03/02	Olancho	San Francisco de la Paz	M	ND
B	01/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
B	01/03/02	Olancho	Gualaco	M	ND
B	01/03/02	Olancho	Catacamas	H	ND
B	01/03/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
B	01/03/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
B	01/03/02	El Paraíso	Los Trojes	M	ND
B	01/03/02	El Paraíso	Los Trojes	M	ND
B	01/03/02	Colón	Bonito Oriental	H	ND
B	01/03/02	Colón	Bonito Oriental	M	ND
B	01/03/02	Olancho	Lepaguare	H	ND
B	01/03/02	Olancho	Lepaguare	H	ND
B	01/03/02	Olancho	Salama	H	ND
B	01/03/02	Olancho	Salama	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
C	08/03/02	El Paraíso	Jamastrán	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Parcelas Patuca	H	ND
C	08/03/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
C	08/03/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
C	08/03/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
C	08/03/02	Olancho	Gualaco	H	ND
D	15/03/02	Francisco Morazán	Orica	H	ND
D	15/03/02	Francisco Morazán	Orica	H	ND
D	15/03/02	Francisco Morazán	Orica	H	ND
D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	ND
D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	ND
D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	ND
D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	ND

D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	<0.05
D	15/03/02	Olancho	Depaguare	H	ND
D	15/03/02	Olancho	San Esteban	H	ND
D	15/03/02	Olancho	San Esteban	H	ND
D	15/03/02	Olancho	San Esteban	H	ND
D	15/03/02	Olancho	Silca	H	ND
D	15/03/02	Francisco Morazán	San Juan de Flores	H	<0.05
D	15/03/02	Francisco Morazán	San Juan de Flores	H	ND

Anexo 3b. Datos de las muestras analizadas en época de lluvia

Muestra	Fecha	Departamento	Municipio	Sexo	Oxitetraciclina ($\mu\text{g/g}$)
A	02/07/02	Olancho	San Esteban	H	ND
A	02/07/02	Olancho	San Esteban	H	ND
A	02/07/02	Olancho	San Francisco de la Paz	H	ND
A	02/07/02	Olancho	San Francisco de la Paz	H	ND
A	02/07/02	Olancho	Yocon	H	ND
A	02/07/02	Olancho	Yocon	H	ND
A	02/07/02	Olancho	Yocon	H	ND
A	02/07/02	Olancho	Yocon	H	ND
A	02/07/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
A	02/07/02	El Paraíso	Los Trojes	H	ND
B	09/07/02	Olancho	Catacamas	H	ND
B	09/07/02	Olancho	Catacamas	H	ND
B	09/07/02	Francisco Morazán	Orica	M	ND
B	09/07/02	Francisco Morazán	Orica	H	<0.1
B	09/07/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
B	09/07/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
B	09/07/02	El Paraíso	Trojes	M	ND
B	09/07/02	El Paraíso	Trojes	M	ND
B	09/07/02	El Paraíso	Morocelí	H	ND
B	09/07/02	El Paraíso	Morocelí	H	ND
C	15/07/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	<0.05
C	15/07/02	Francisco Morazán	El Porvenir	H	ND
C	15/07/02	Olancho	Patuca	M	ND
C	15/07/02	Olancho	Patuca	M	ND
C	15/07/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
C	15/07/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
C	15/07/02	El Paraíso	Valle de Jamastrán	H	ND
C	15/07/02	El Paraíso	Valle de Jamastrán	H	ND
C	15/07/02	Olancho	Catacamas	M	ND
C	15/07/02	Olancho	Catacamas	M	ND
D	22/07/02	Olancho	Culmi	H	<0.05
D	22/07/02	Olancho	Culmi	H	ND
D	22/07/02	El Paraíso	Danli	H	ND
D	22/07/02	El Paraíso	Danli	H	ND
D	22/07/02	El Paraíso	Trojes	M	ND
D	22/07/02	El Paraíso	Trojes	M	ND
D	22/07/02	Olancho	San Francisco de la Paz	H	ND
D	22/07/02	Olancho	San Francisco de la Paz	H	ND
D	22/07/02	Comayagua	Comayagua	M	ND
D	22/07/02	Comayagua	Comayagua	M	ND
E	29/07/02	Olancho	Patuca	H	ND

E	29/07/02	Olancho	Patuca	H	ND
E	29/07/02	Francisco Morazán	Agalteca	H	ND
E	29/07/02	El Paraíso	Danli	M	ND
E	29/07/02	El Paraíso	Danli	H	ND
E	29/07/02	Olancho	Catacamas	H	ND
E	29/07/02	Olancho	Catacamas	H	ND
E	29/07/02	Francisco Morazán	Orica	M	ND
E	29/07/02	Olancho	Guayape	H	ND
E	29/07/02	Olancho	Guayape	H	ND
F	05/08/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
F	05/08/02	El Paraíso	Trojes	H	ND
F	05/08/02	Olancho	Catacamas	M	<0.05
F	05/08/02	Olancho	Catacamas	M	ND
F	05/08/02	El Paraíso	Jamastran	M	ND
F	05/08/02	El Paraíso	Jamastran	M	ND
F	05/08/02	Olancho	Patuca	H	ND
F	05/08/02	Olancho	Patuca	H	ND
F	05/08/02	Olancho	Río Blanco	H	ND
F	05/08/02	Olancho	Río Blanco	M	ND
