

**Análisis de Residuos de Tetraciclina y
Oxitetraciclina en Leche Cruda de
Proveedores de la Planta de Lácteos de
Zamorano**

Frank Martín Díaz Ocampo

Honduras
Diciembre, 2004

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Análisis de Residuos de Tetraciclina y Oxitetraciclina en Leche Cruda de Proveedores de la Planta de Lácteos de Zamorano

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

Presentado por:

Frank Martín Díaz Ocampo

Honduras
Diciembre, 2004

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.

Frank Martín Díaz Ocampo

Honduras
Diciembre, 2004

**Análisis de Residuos de Tetraciclina y Oxitetraciclina en Leche
Cruda de Proveedores de la Planta de Lácteos de Zamorano**

Presentado por:

Frank Martín Díaz Ocampo

Aprobada:

Luis Fernando Osorio, Ph. D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph. D.
Coordinador de la Carrera
de Agroindustria

Francisco Javier Bueso, Ph. D.
Asesor Secundario

Aurelio Revilla, M. S. A.
Decano Académico

John Jairo Hincapié, Ph. D.
Asesor Secundario

Kenneth Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia.

A mi novia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por iluminar mi camino y ayudarme en todo momento.

A mis queridos padres Martín Díaz Alonso y Francisca Ocampo Joya y mi hermanito Rubén Díaz por sus consejos, apoyo incondicional, paciencia y amor.

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

Al Sr. Fredman Torres por su apoyo invaluable.

A mi novia Keila Díaz por su ayuda, apoyo y amor incondicional.

A mis amigos y personal del CIAD, A.C. que me apoyaron durante largas jornadas de laboratorio.

Al personal de laboratorio por su valiosa ayuda.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Al Fondo RAPACCO de Zamorano por su apoyo financiero durante mis cuatro años de estudios.

Al Sr. Fredman Torres por su apoyo financiero durante mi pasantía.

RESUMEN

Díaz, Frank. 2004. Análisis de residuos de tetraciclina y oxitetraciclina en leche cruda de proveedores de la planta de lácteos de Zamorano. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 38 p.

Los productores pecuarios utilizan varios antibióticos para el tratamiento y control de infecciones y enfermedades causadas por bacterias patógenas, mejorar el aumento de peso e incrementar la producción de leche. La presencia de residuos de antibióticos en la leche da como resultado enfermedades resistentes a terapia de medicamentos y que son un problema creciente en la salud pública. La mayor parte de los países latinoamericanos no han abordado este problema, aunque existen regulaciones sobre los Límites Máximos de Residuos (LMR). La tetraciclina (TC) y oxitetraciclina (OTC) son antibióticos muy utilizados por los productores pecuarios, debido a sus bajos costos y amplio espectro para controlar enfermedades. El LMR permitido para las tetraciclinas en leche es de 100 µg/kg (0.1 ppm). El objetivo de este estudio fue realizar un diagnóstico del contenido de antibióticos de la leche cruda de cinco proveedores de la planta de lácteos de Zamorano. Se analizó la presencia de residuos de TC y OTC en leche cruda de proveedores de la planta de lácteos. Se colectaron 80 muestras de 10 ml de leche que fueron analizadas el mismo día del muestreo en el Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano. Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de residuos siguiendo el procedimiento oficial 995.04 de la AOAC. El límite de cuantificación fue de 0.01 ppm y se obtuvo 65% de recuperación de OTC y 58% de TC, con el cual se ajustaron los resultados. En el 40% de las muestras analizadas se detectaron residuos de TC mayores al LMR y en 13.75% de las muestras se encontraron residuos de OTC mayores al LMR. También se encontraron diferencias entre los productores para TC y OTC durante mayo y junio de 2004 ($P < 0.05$).

Palabras clave: antibióticos, cromatografía, LMR, salud.

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de cuadros.....	x
	Índice de figuras.....	xi
	Índice de anexos.....	xii
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	OBJETIVOS.....	2
1.1.1.	General.....	2
1.1.2.	Específicos.....	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	TETRACICLINAS.....	3
2.1.1.	Origen.....	3
2.1.2.	Propiedades físicas y químicas.....	4
2.1.3.	Vías de administración.....	4
2.1.3.1.	Intravenosa e intramuscular.....	4
2.1.3.2.	Oral.....	4
2.1.3.3.	Tópica.....	5
2.1.4.	Absorción.....	5
2.1.5.	Metabolismo.....	5
2.1.6.	Distribución.....	6
2.1.7.	Eliminación.....	6
2.1.8.	Farmacodinámica.....	7
2.1.9.	Toxicidad.....	8
2.1.10.	Resistencia bacteriana e implicaciones en la salud pública.....	10
2.2.	ESTUDIOS ANTERIORES.....	12
2.3.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	12

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Materiales.....	13
3.2.	Localización del estudio.....	13
3.3.	Diseño experimental.....	13
3.4.	Muestreo.....	14
3.5.	Análisis cuantitativo de residuos de tetraciclina y oxitetraciclina...	14
3.6.	Preparación de muestra y método cromatográfico.....	14
3.6.1.	Preparación de estándares de tetraciclinas.....	15
3.6.2.	Activación de C18.....	15
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1.	Análisis cuantitativo de residuos de tetraciclina y oxitetraciclina.....	17
4.2.	Análisis comparativo entre productores.....	18
5.	CONCLUSIONES	26
6.	RECOMENDACIONES	27
7.	BIBLIOGRAFÍA	28
8.	ANEXOS	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		
1.	Antibióticos comúnmente administrados.....	7
2.	Modos de acción de los antibióticos en las bacterias, dosis en tratamiento vacuno y tiempo de retiro de ordeño.....	8
3.	Sensibilidad de diferentes cultivos de microorganismos y diferentes concentraciones de antibióticos en mg/kg (ppm).....	11
4.	Distribución de muestreos en el tiempo.....	14
5.	Resultados de la determinación de TC y OTC en muestras y estándares de leche fortificadas a concentración de 0.1 ppm.....	19
6.	Comparación de medias de concentración de residuos de TC entre productores.....	20
7.	Comparación de medias de concentración de residuos de OTC entre productores.....	20
8.	Comparación de medias de concentración de residuos de TC por día.....	21
9.	Comparación de medias de concentración de residuos de OTC por día.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1.	Preparación de muestras para el análisis de tetraciclinas en leche cruda.....	16
2.	Regresión lineal de curva estándar de concentraciones de oxitetraciclina.....	17
3.	Regresión lineal de curva estándar de concentraciones de tetraciclina.....	18
4.	Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor AGAZA	22
5.	Concentración en ppm de TC y OTC en leche del establo de la EAP.....	22
6.	Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Montoya	23
7.	Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Barahona	23
8.	Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Maier	24
9.	Concentración en ppm de OTC en leche de todos los productores.....	24
10.	Concentración en ppm de TC en leche de todos los productores.....	25

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		
1.	Datos de tetraciclina en las muestras analizadas.....	30
2.	Datos de oxitetraciclina en las muestras analizadas.....	32
3.	Análisis de varianza en SAS [®] para resultados de tetraciclina.....	34
4.	Análisis de varianza en SAS [®] para resultados de oxitetraciclina.....	34
5.	Cromatograma de estándar de TC a 0.1 ppm.....	35
6.	Cromatograma de muestra fortificada con TC (control positivo) a 0.1 ppm.....	36
7.	Cromatograma de estándar de OTC a 0.1 ppm.....	37
8.	Cromatograma de muestra fortificada con OTC (control positivo) a 0.1 ppm.....	38

1. INTRODUCCIÓN

Según la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) (2003), los microorganismos causantes de enfermedades que se han hecho resistentes a terapia de medicamentos son un problema de salud pública en aumento. Tuberculosis, gonorrea, malaria e infecciones de oídos en niños son algunas de las enfermedades que se han hecho difíciles de tratar con antibióticos. Parte del problema es que bacterias y otros microorganismos que causan infecciones son notablemente resistentes y pueden desarrollar maneras de sobrevivir a medicamentos que son para matarlos o debilitarlos. Esta resistencia antibiótica, también conocida como resistencia antimicrobiana o resistencia a medicamentos, es debida en gran parte al uso desmedido de antibióticos.

La mayoría de las poblaciones de bacterias contienen mutantes que son naturalmente menos susceptibles a un medicamento, comparado al resto de la población. La resistencia microbiana a antibióticos puede ser debida a adaptación fisiológica (cambio fenotípico) o a mutación y selección (cambio genotípico). Una vez que una bacteria mutante ha emergido en una población bacteriana, la resistencia puede ser transferida a otras células por los mecanismos de transformación o conjugación (Ewing y Cole, 1994).

La planta de lácteos de Zamorano, ha venido haciendo pruebas de análisis rápido cualitativo de antibióticos, como las pruebas SNAP[®]. Dichas pruebas son muy subjetivas, ya que son poco sensibles y dan falsos positivos frecuentemente.

Debido a los diversos problemas ocasionados a la salud por efectos tóxicos, alergias y resistencia microbiana que causan los antibióticos, además de la inhibición de bacterias fermentadoras necesarias en la elaboración de productos fermentados como quesos y yogurt, la presencia de tetraciclina representa un peligro a la salud de los consumidores y un desperdicio de materias primas para la elaboración de dichos productos.

Este estudio permitirá a la planta de lácteos determinar la presencia de residuos de tetraciclina (TC) y oxitetraciclina (OTC), antibióticos muy usados por su amplio espectro y menor costo, así como el nivel de residualidad en la leche de los proveedores, con el fin de conocer si sobrepasan el Límite Máximo de Residuos (LMR), que en leche es de 100 µg/kg (0.1 ppm) para ambos. También tiene como propósito identificar proveedores con problemas de residualidad de antibióticos. Como resultado se reducirán los costos por desperdicios de materias primas y se producirán alimentos lácteos más competitivos e inocuos al consumidor.

El costo elevado de los análisis, el poco tiempo y la falta de materiales son las principales limitantes de este estudio.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. General

Determinar cuantitativamente la presencia de residuos de tetraciclina y oxitetraciclina en leche cruda de proveedores de la planta de lácteos de Zamorano.

1.1.2. Específicos

Comparar la presencia de residuos de tetraciclina entre los proveedores de leche de la planta de lácteos.

Comparar la presencia de residuos de oxitetraciclina entre los proveedores de leche de la planta de lácteos.

Determinar si la cantidad de residuos de tetraciclina en la leche alcanza el límite máximo de residuos.

Determinar si la cantidad de residuos de oxitetraciclina en la leche alcanza el límite máximo de residuos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 TETRACICLINAS

Según Ewing y Cole (1994), los antibióticos son compuestos químicos, que en pequeñas cantidades son dañinos a los organismos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza pero el término es generalmente usado para compuestos que son de origen microbiano, particularmente aquellos usados para controlar microorganismos dañinos (generalmente bacterias).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos, que originalmente se obtuvieron de ciertos *Streptomyces spp.* Se caracterizan por tener el mismo núcleo tetracíclico, naftaceno y propiedades similares. Se pueden administrar por vía oral y a las concentraciones usuales son generalmente bacteriostáticas, actuando por interferencia de la síntesis proteica en microorganismos susceptibles al fijarse en la subunidad 30s del ribosoma. Tienen un espectro de acción amplio, que incluye bacterias gram positivas y gram negativas, clamidias, rickettsias, micoplasmas y espiroquetas; pero sus reacciones adversas y el desarrollo de cepas resistentes y de otros agentes antimicrobianos han reducido su utilización (Revista cubana de medicina general integral, 1999).

La primera tetraciclina que se obtuvo fue la clortetraciclina en 1948, e inmediatamente después la OTC y la TC. Las tres tienen propiedades similares, aunque la clortetraciclina se absorbe menos en el tracto gastrointestinal y la OTC mancha menos los dientes. Las tetraciclinas más recientes se han obtenido por vías semisintéticas (Revista cubana de medicina general integral, 1999).

2.1.1 Origen

El primer antibiótico en ser descrito fue penicilina, por Sir Alexander Fleming. Es un clásico ejemplo de un descubrimiento científico importante por accidente, más que el resultado de investigación objetiva. En 1928, un plato de cultivo de *Staphylococcus* fue contaminado con esporas de *Penicillium notatum*. Alrededor del moho que estaba contaminando el plato, los *Staphylococcus* fueron destruidos. El cultivo puro fue aislado y se encontró que producía una sustancia con un poderoso efecto antibacterial, fue llamado penicilina (Ewing y Cole, 1994).

El desarrollo de las tetraciclinas fue el resultado de una selección sistemática de muestras de suelos recogidas en muchas partes del mundo en busca de microorganismos productores de antibióticos. El primero de estos compuestos, la

clortetraciclina se introdujo en 1948; dos años después se conoció la OTC. La elucidación de la estructura química de estos agentes confirmó la semejanza y sirvió de base para la producción de un tercer miembro de este grupo, la TC, en 1952. La clortetraciclina y la OTC son elaboradas por *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*, respectivamente. Los antibióticos se producen en caldo por fermentación. La TC se produce semisintéticamente con clortetraciclina y también se ha obtenido de una especie de *Streptomyces* (Goodman y Gilman, 1988).

2.1.2 Propiedades físicas y químicas

Las bases de tetraciclinas son cristalinas, inodoras, amarillas y ligeramente amargas. Aunque son muy estables en forma de polvos secos, casi todos estos agentes pierden actividad con relativa rapidez cuando están en solución (Goodman y Gilman, 1988).

Las propiedades físicas y químicas de las tetraciclinas permiten su administración por vía parenteral, en cápsulas, como polvos, aditivo alimentario y en pomadas. El pH del tracto gastrointestinal y el pK_a de las tetraciclinas permiten a estos antibióticos absorberse y producir concentraciones antibacterianas en el organismo entero (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.3 Vías de administración

En los herbívoros, las tetraciclinas se administran por vía parenteral, oral y tópica. La administración tópica debe evitarse si pueden utilizarse otros agentes adecuados, a causa del riesgo de resistencias. Inicialmente se suprime la fermentación normal bacteriana de las fibras vegetales en los herbívoros por la administración de tetraciclinas por vía oral. En los carnívoros, omnívoros y herbívoros recién nacidos pueden administrarse estos fármacos por vía oral con fines terapéuticos con unos efectos colaterales mínimos. La inyección intravenosa e intramuscular son vías comunes de administración de algunas tetraciclinas en medicina veterinaria. Se dispone de preparados especiales de tetraciclinas tamponadas con glicinato sódico en forma de polvo para inyecciones intravenosas (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.3.1 Intravenosa e intramuscular. Las dosis sugeridas para la inyección intravenosa o intramuscular son de 4.4 a 11 mg/kg de peso vivo, diaria. En ocasiones en algunas enfermedades la dosis se aumenta dos o tres veces. Para la OTC se han propuesto dosis intravenosas de 10 mg/kg seguida de dosis de mantenimiento de 7.5 mg/kg con 12 horas de intervalo (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.3.2 Oral. Las tetraciclinas se administran a los animales pequeños, por vía oral, a dosis de 33-110 mg/kg de peso vivo, diario. También se administran a animales grandes a niveles subterapéuticos. Aunque se añaden al pienso para mejorar su eficacia y beneficio, realizan una prevención terapéutica de la enfermedad (Booth y Mc Donald, 1987). La leche interfiere en la absorción de los medicamentos y no deben ingerirse al mismo tiempo que una tetraciclina (Goodman y Gilman, 1988).

2.1.3.3 Tópica. La infusión intramamaria es la vía rutinaria utilizada para el tratamiento de la mastitis de la vaca con tetraciclinas. Una dosis con 440 mg de clorhidrato de cualquiera de las tetraciclinas se usa para el tratamiento de dicha infección. En las membranas conjuntivales puede usarse una pomada oftálmica que contenga 1 mg de tetraciclina por gramo. Los procesos oculares pueden tratarse también con una solución tamponada de tetraciclina que contenga 5 mg/ml (Booth y Mc Donald, 1987).

La limitante del uso de la TC vía intramamaria es que son irritantes, pueden provocar respuesta inflamatoria posterior y agravar el cuadro. Además, los iones de calcio de la leche y la caseína son capaces de quelar a la OTC reduciendo su eficacia, por lo tanto no toda la OTC presente en la glándula mamaria es activa. Otra desventaja es que se requieren muchos días de la línea de retiro de ordeño al usar OTC de elevada liposolubilidad (Sumano, 1996).

2.1.4 Absorción

Después de la administración oral, las tetraciclinas se absorben fácilmente por el estómago y la primera porción del intestino delgado para producir un pico en la concentración plasmática a las 2 a 4 horas. Parte del fármaco es concentrado en el hígado, se excreta por la bilis y se reabsorbe por el intestino por lo cual una pequeña cantidad persiste en la sangre debido al ciclo enterohepático (Booth y Mc Donald, 1987).

La absorción de TC se deteriora en grado variable con la leche y los productos lácteos. Los mecanismos responsables son la quelación y un aumento del pH (Goodman y Gilman, 1988).

La persistencia de la TC en la sangre después de su absorción presenta un sorprendente contraste con otros antibióticos los cuales se eliminan más rápidamente (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.5 Metabolismo

Las tetraciclinas sufren diversos grados de metabolismo. La sustancia identificada con mayor frecuencia en la orina, heces y tejidos es la TC (Booth y Mc Donald, 1987). El metabolismo de las tetraciclinas se lleva a cabo en el hígado (Sumano, 1996).

Las tetraciclinas se unen de forma reversible a las proteínas plasmáticas y se distribuyen ampliamente. Las tetraciclinas son aclaradas de la sangre por el hígado que almacena altas concentraciones en el parénquima y en la bilis (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.6 Distribución

Según Sumano (1996), las tetraciclinas se distribuyen en todo el cuerpo, principalmente en el hígado, bazo, pulmones e incluso llegan a la circulación fetal. Llegan al cerebro, semen, saliva, líquido pleural, líquido prostático y líquido sinovial. También se pueden depositar en la diáfisis, epífisis y en los dientes.

2.1.7 Eliminación

Las tetraciclinas se excretan principalmente por el riñón. Aproximadamente del 25 al 30% de una dosis única de tetraciclina puede encontrarse en la orina (Booth y Mc Donald, 1987). La eliminación es lenta y por esta razón los niveles plasmáticos persisten por mucho tiempo aunado al círculo entero-sanguíneo-biliar, donde se están absorbiendo en el intestino constantemente (Sumano, 1996),

La eliminación fecal de TC ocurre con independencia de la vía de administración. La cantidad eliminada, después de la administración oral, puede alcanzar el 10% de la dosis (Booth y Mc Donald, 1987). La eliminación del tracto intestinal se produce incluso cuando las drogas se administran por vía parenteral, como resultado de la excreción por la bilis (Goodman y Gilman, 1988).

Las tetraciclinas se eliminan también por la leche; la concentración es la mitad que en el suero materno. Las tetraciclinas administradas por vía oral y parenteral se eliminan con la leche bovina (Booth y Mc Donald, 1987).

Existe un gran interés en el problema de la velocidad de eliminación de los antibióticos de los pacientes sanos y enfermos, es posible que los pacientes enfermos requieran dosis mayores o menores de un determinado fármaco. La mayoría de los antibióticos usados normalmente en medicina veterinaria tienen indicaciones de dosificación que derivan de estudios llevados a cabo en pacientes sanos. Afortunadamente la mayoría de las dosis recomendadas tienen una actividad antibacteriana suficiente para producir un efecto terapéutico en casi todas las enfermedades provocadas por organismos sensibles a las tetraciclinas (Booth y Mc Donald, 1987).

En estudios sobre vacas lecheras y terneros sacrificados de urgencia, se demostró que la característica principal del tratamiento de animales enfermos es que persisten en el suero concentraciones de OTC y que el fármaco se elimina con mayor lentitud (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.8 Farmacodinámica

Las tetraciclinas interfieren con la síntesis de las proteínas bacterianas de desarrollo rápido y reproducción bacteriana celular. Inhiben el metabolismo celular bacteriano bloqueando el enlace de la transferencia aminoacil del ARN de los ribosomas, lo cual interfiere con la síntesis proteica. Solo una pequeña porción del fármaco es ligada de forma irreversible y el antibiótico ligado de forma reversible es responsable de la acción antibacteriana. Las bacterias con el factor resistente a las tetraciclinas se han transformado en eficientes para excluir el fármaco (Booth y McDonald, 1987).

Debido al alto nivel de microorganismos, en sistemas intensivos, se ha hecho común el uso de antibióticos (Cuadro 1), como promotores de crecimiento y a niveles mayores para propósitos terapéuticos, pero su uso indiscriminado incluso ha exacerbado algunas de las condiciones que su desarrollo pensó prevenir (Ewing y Cole, 1994).

Cuadro 1. Antibióticos comúnmente administrados.

Tipo de antibiótico	Ejemplos	Fuente	Mayormente activo contra
Penicilinas y cefalosporinas	Penicilina G	<i>P. chrysogen</i>	Bacterias G+
	Ampicilina	Semisintético	Bacterias G+ y algunas G-
	Cefalexina	Semisintético	Bacterias G+ y algunas G-
Tetraciclinas	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Bacterias G+ y G-
	Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>	Bacterias G+ y G- incluyendo rickettsia
	Tetraciclina	<i>Streptomyces spp</i> o de clortetraciclina	Bacterias G+ y G- incluyendo rickettsia
Macrólidos	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bacterias G+
Aminoglicósidos	Estreptomina	<i>Streptomyces griseus</i>	Bacterias G+ y G- incluyendo bacilo de tuberculosis
Polipéptidos	Neomicina B	<i>Streptomyces fradiae</i>	Bacterias G+ y G-
	Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacterias G+
Otros	Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i> o sintético	Bacterias G+ y G- incluyendo Salmonella y rickettsia
	Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Bacterias G+

Fuente: Ewing y Cole (1994).

Ha habido mucha discusión acerca del modo de acción de los antibióticos (Cuadro 2), ya que hacen efecto a través de una variedad de mecanismos, difiriendo de un producto a otro. Se ha demostrado que inhiben el crecimiento microbiano, metabolismo de azúcares, producción de metabolitos, formación de la pared celular y

síntesis de ácido nucleico y proteínas. El tiempo de retiro de ordeño después del tratamiento intravenoso con penicilina es de 30 días en caso que sea benzatínica y de 7 días para las demás (potásica, procaínica, etc.), el tratamiento de estreptomina puede ser intravenoso o intramuscular, el tiempo de retiro de ordeño después del tratamiento con OTC es de 7 días y 15 días con TC (1 mes si se usan combinadas), el tratamiento con griseofulvina es por vía oral comúnmente y el de las sulfonamidas por vía intravenosa (Ewing y Cole, 1994).

Cuadro 2. Modos de acción de los antibióticos en las bacterias, dosis en tratamiento vacuno y tiempo de retiro de ordeño.

Modo de acción	Antibióticos	Dosis	Tiempo
Pared celular de bacterias	Penicilinas	22 000 u. i./kg de peso	7 a 30 días
Membrana celular de bacterias	Estreptomina	2 a 3 mg/kg de peso	5 días
Síntesis de proteínas	Tetraciclinas	5 a 10 mg/kg de peso	7 a 30 días
Metabolismo de ácido nucleico	Griseofulvina	10 a 16 mg/kg de peso	21 días
Metabolismo intermediario	Sulfonamidas	1 mg/kg de peso	15 días

Fuente: Ewing y Cole (1994), adaptado por el autor.

El sitio de acción de las tetraciclinas es el ribosoma bacteriano, pero dos procesos son por lo menos necesarios para que estos antibióticos ganen acceso a los ribosomas de las bacterias gram negativas. El primero es la difusión pasiva a través de los poros hidrófilos de la membrana celular externa, específicamente dentro de una de las tres proteínas de la envoltura. El segundo proceso incluye un sistema de transporte activo dependiente de la energía que bombean todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Aunque la permeabilización de las bacterias gram positivas por estas drogas se conoce menos, también requiere un sistema dependiente de la energía. Una vez que las tetraciclinas ganan acceso a la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan específicamente a los ribosomas 30S, impidiendo el acceso del aminoacil ARNt al sitio aceptor del complejo ARNm del ribosoma. Esto evita la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Goodman y Gilman, 1988). Una clasificación de tetraciclinas y penicilina puede estar basada en su efecto bacteriostático y bactericida, respectivamente (Ewing y Cole, 1994).

2.1.9 Toxicidad

La toxicidad aguda para la TC intravenosa en el ratón, DL-50, está entre 150 y 180 mg/kg (ppm) (Booth y Mc Donald, 1987). Las tetraciclinas tienen un amplio espectro y se han utilizado como agentes específicos para tratar la mastitis producida por *Aerobacter aerogenes*, algunos tipos de micoplasmas, *Streptococcus uberis*, entre otros. La administración de las tetraciclinas se puede hacer por vía parenteral, así se alcanzan niveles adecuados y homogéneos en toda la glándula mamaria, aunque induce severas irritaciones (Sumano, 1996).

El uso de preparados parenterales de OTC de larga duración puede dar resultados altamente eficaces para el tratamiento de mastitis parenquimatosa, con un período de ordeño no mayor a 96 horas, si la dosis de OTC es de 20 mg/kg/día. Con una concentración mínima inhibitoria de 1mg/ml. Sin embargo, no se alcanzan concentraciones adecuadas en todos los casos, por lo que se requieren concentraciones mínimas inhibitorias de 10mg/ml, las cuales resultan difíciles de obtener por vía sistémica. En este caso y si se considera que se debe usar una TC, es posible que se combine la vía intramamaria de 500 mg/cuarto de OTC más la administración sistémica (Sumano, 1996).

Según Goodman y Gilman (1988), todas las tetraciclinas producen diversos grados de irritación gastrointestinal en algunos pacientes. Puede haber ardor, molestias gástricas y abdominales, náuseas y vómitos. Cuanto más elevada es la dosis mayor es la posibilidad de una reacción irritativa. También se pueden producir reacciones leves a severas en la piel de individuos expuestos a la luz solar, lo cual es una reacción fototóxica; a veces simultáneamente aparecen pigmentación de las uñas, aumentando la frecuencia de la reacción de quemadura solar. Las toxicidades hepáticas de OTC y TC son menores que en los demás medicamentos de este grupo, pero el efecto también es posible con grandes cantidades administradas o acumuladas. Las embarazadas son particularmente susceptibles a daños hepáticos severos inducidos por TC.

Las tetraciclinas pueden agravar la uremia en pacientes con esta enfermedad a través de la inhibición de la síntesis proteica, con la inducción de efectos catabólicos e insuficiencia renal severa. Pacientes que ingieran TC de fecha vencida o en estado degradado presentan un cuadro clínico caracterizado por náuseas, vómitos, acidosis y otros síntomas, los cuales son una forma del síndrome de Fanconi. También se ha observado una lesión facial y sensibilidad a la luz solar. Todas las manifestaciones desaparecen aproximadamente un mes después de cesar la ingesta (Goodman y Gilman, 1988).

Las tetraciclinas pueden causar aumento de presión intracraneal y pseudotumores cerebrales en pacientes infantiles. Estas complicaciones rara vez se producen en pacientes mayores, pero existen reacciones de hipersensibilidad para individuos alérgicos en la piel como picazón, urticaria, erupciones y dermatitis exfoliativa, pero son raras. Entre las respuestas alérgicas más severas figuran angioedema y anafilaxia. Otro efecto atribuido a hipersensibilidad es ardor en los ojos. La causa exacta de estas reacciones es desconocida, pero pueden representar los resultados de cambios sutiles en la flora bacteriana del paciente. Cabe destacar que la sensibilización cruzada entre las diferentes tetraciclinas es sumamente común. Además, el riesgo de presentar coloración marrón de los dientes es máximo cuando la ingieren neonatos e infantiles antes de la primera dentición o durante los 2 meses y 5 años de edad cuando los dientes se están calcificando. Las TC se depositan en el esqueleto del feto y de los individuos. La misma es fácilmente reversible si el período de exposición al medicamento es breve (Goodman y Gilman, 1988).

El uso de las tetraciclinas por infusión intramamaria en vacas lecheras durante el período seco, esta contraindicado porque causa irritación tisular, dejan de lactar después del parto y se observan lesiones en el pezón y en la ubre. La inyección intraarticular de TC u OTC ha producido respuestas inflamatorias y por ellos están contraindicadas. Con la bilis se excreta suficiente TC como para suprimir la fermentación bacteriana en los herbívoros, provocando anorexia y diarrea (Booth y Mc Donald, 1987).

2.1.10 Resistencia bacteriana e implicaciones en la salud pública

Desde que las tetraciclinas se usan extensivamente se ha señalado la existencia de un alto predominio de organismos coliformes multiresistentes, por lo cual, los productores deben considerar los regímenes de dosificación muy cuidadosamente. El factor de resistencia bacteriana a las tetraciclinas se desarrolla con mayor facilidad y persiste por períodos de tiempo más prolongados que con otros antibióticos (Booth y Mc Donald, 1987).

La resistencia a las tetraciclinas aparece lentamente en forma gradual por etapas. Los microorganismos que se han hecho insensibles a una TC muestran con frecuencia resistencia a las otras y se hacen resistentes solo después de su exposición al medicamento. Los plásmidos que imparten resistencia contienen información genética para numerosas proteínas que afectan el transporte del medicamento al interior de la célula, donde puede interferir en la acumulación dependiente de energía de TC (Goodman y Gilman, 1988).

Los residuos de antibióticos en leche puede dar lugar a efectos nocivos o reacciones alérgicas en los consumidores, tales como: efectos adversos vestibulares que disminuyen los estímulos en los receptores neurotransmisores, erupciones, fiebre o diarrea. Individuos con historial de reacción alérgica o sensibilidad a penicilina pueden experimentar una condición alérgica peligrosa a la salud, llamada choque anafiláctico, dentro de minutos a horas de exposición al antibiótico. Los síntomas de reacciones alérgicas severas incluyen: hinchazón de la garganta y tráquea, así como dificultad en la respiración. Mientras que la OTC provoca alteraciones de la flora bacteriana intestinal y pueden dar lugar a infecciones causadas por hongos y otros microorganismos, las cuales conllevan a problemas gastrointestinales (FDA, 2002).

Según la OEA (2003), los efectos de residuos de antibióticos en la elaboración de productos fermentados provocan grandes pérdidas en la calidad y por ende, económicas. Algunos de los efectos de la presencia de antibióticos en quesos son: demoras en la acidificación, disminución de retención de agua, desarrollo de microorganismos indeseables, demoras y deficiencias en la coagulación. En yogurt provocan textura blanda, sabor amargo y consistencia arenosa. También causan interferencia en la formación de aroma en mantequilla fermentada.

Los cultivos de microorganismos para la elaboración de productos lácteos fermentados tienen diferentes sensibilidades dependiendo del tipo de antibiótico

(Cuadro 3). La mayor sensibilidad es de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, utilizado para la elaboración del yogurt, en presencia de tetraciclinas (OEA, 2003).

Cuadro 3. Sensibilidad de diferentes cultivos de microorganismos y diferentes concentraciones de antibióticos en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppm).

Cultivo	Penicilina (ppm)	Estreptomicina (ppm)	Tetraciclinas (ppm)
<i>Streptococcus cremoris</i>	50	50	50
<i>Lactococcus lactis</i>	50	50	50
<i>Streptococcus salivarius</i> subespecie <i>thermophilus</i>	1.7	500	1
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i>	1.7	500	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	100	100	300
<i>Lactobacillus helveticus</i>	300	100	100
<i>Lactobacillus lactis</i> subespecie <i>lactis</i> y subespecie <i>cremoris</i>	50	50	50

Fuente: OEA (2003).

Según el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2000), el Límite Máximo de Residuos (LMR) para las tetraciclinas permitido en leche bovina es de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (0.1 ppm).

2.2 ESTUDIOS ANTERIORES

La planta de lácteos de Zamorano evalúa constantemente la calidad microbiológica de la leche que recibe; sin embargo, no conoce exactamente que tipo de antibióticos se encuentran y su nivel de residuos en la leche.

Los métodos microbiológicos miden la habilidad del antibiótico para inhibir el crecimiento de la bacteria seleccionada. Estos métodos son muy sensibles a penicilina y en muchos países forman la base del muestreo de carne, leche y otros alimentos para determinar residuos de penicilinas, tetraciclinas y otros antibióticos. Los métodos de ensayos bioquímicos son basados en el uso de penicilinas como sustratos de la enzima penicilinas. Estos métodos son más específicos que algunos métodos microbiológicos y son ampliamente usados. Los métodos fisicoquímicos hacen uso de técnicas cromatográficas, de las cuales el HPLC ha superado a la cromatografía de capa fina, como el método más adecuado (FAO, 1991).

Se han realizado estudios de antibióticos y sus metabolitos en alimentos utilizando metodologías rápidas como radioinmunoensayo y métodos químicos como cromatografía líquida de alta resolución, así como el empleo de espectrometría de masas para propósitos de confirmación publicados por el CIAD, A.C. Asimismo, se han llevado a cabo estudios de micotoxinas (aflatoxinas) en alimentos mediante cromatografía de afinidad/fluorometría y cromatografía líquida de alta resolución (CIAD, A.C., 2004).

2.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada para la separación de sustancias no volátiles. Las razones más importantes son su alta sensibilidad, alta precisión, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. La cromatografía en fase reversa específicamente, tiene las ventajas más sustanciales de esta alternativa, como son: su gran reproducibilidad, tiempos de retención cortos, velocidad de muestreo alta, sistema cromatográfico simple y amplio campo de aplicación. Por todo ello, las aplicaciones son cada vez más numerosas. Esta técnica utiliza un solvente polar como fase móvil y una cadena hidrocarbonada ligada como fase estacionaria. La selectividad del compuesto de interés se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil, ya sea de tipo polar, de formación de puentes de hidrógeno o mediante equilibrios secundarios provocados al variar la composición de la fase móvil (Burriel *et al.*, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos etapas: a) Análisis cuantitativo de residuos de TC y OTC, comparando los resultados con el LMR, y b) Análisis comparativo de cinco productores: Asociación de Ganaderos de Zamorano (AGAZA), establo de la Escuela Agrícola Panamericana, Reiniery Montoya, René Barahona y Julio Maier. Se realizó un muestreo durante 4 días en mayo y 4 días en junio de 2004 de todos los productores, es decir, 8 muestreos en total y dos repeticiones por muestra analizada en el HPLC.

3.1. MATERIALES

- Muestra: 10 ml de leche/productor/día
- Refrigerador y congelador
- Filtros de fibra de vidrio
- Filtros "acrodisk" de 0.45 y 0.2 μm
- Extractores de fase sólida con cartuchos C18
- Equipo HPLC (de siglas en inglés), Sistema Binario Perkin Elmer Serie 200
- Detector UV-VIS PE 785 A
- Columna C18 de fase reversa
- Bomba de vacío CAST
- Sonificador FS 14
- Estándares de TC y OTC
- Solventes grado HPLC: metanol y acetonitrilo
- Solventes grado reactivo: metanol, hexano y diclorometano
- Reactivos: ácido oxálico, EDTA, BHA y BHT
- Cristalería de laboratorio

3.2. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El muestreo se realizó en la planta de lácteos de Zamorano y los análisis se realizaron en el Centro de Evaluación de Alimentos de Zamorano, ubicados en el Valle del Yeguaré, Departamento de Francisco Morazán.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los datos se analizaron con un nivel de confianza de 95%. Para el análisis se utilizó el diseño estadístico de Bloques Completamente al Azar (BCA), donde los bloques son los ocho días de muestreo (4 días por mes) y los datos recolectados fueron analizados por medio del programa estadístico "Statistical Analysis System" (SAS[®] v8.02, 2001). A través de un análisis de varianza se determinó la significancia del

modelo y la separación de medias de residuos de TC y OTC por productor y por día se realizó utilizando la prueba Tukey.

Se realizaron bloques por día (Cuadro 4) conteniendo todos los tratamientos o proveedores de leche de la planta de lácteos de Zamorano.

Cuadro 4. Distribución de muestreos en el tiempo.

Fechas	Mayo						
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
15/05/04						X	
18/05/04		X					
24/05/04	X						
31/05/04	X						
Junio							
02/06/04			X				
14/06/04	X						
21/06/04	X						
26/06/04						X	

3.4. MUESTREO

El muestreo de cinco proveedores y un control negativo (Leche entera Sula, UHT) se realizó un día al azar durante ocho semanas. El número de sub-muestras se extrajo dependiendo del volumen de leche que cada productor aporta y del número de tambos que entrega por día, tomando 10 ml de cada tambo o contenedor para su posterior análisis en HPLC.

3.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RESIDUOS DE TETRACICLINA Y OXITETRACICLINA

Se obtuvo la concentración de residuos de tetraciclina y oxitetraciclina presente en leche por medio de cuantificación del área de picos en HPLC y se usó como parámetro de comparación el LMR permitido por el Codex Alimentarius para las tetraciclinas en leche bovina de 100 µg/kg (0.1 ppm) (Codex Alimentarius, 2000).

3.6. PREPARACIÓN DE MUESTRA Y MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para la preparación de la muestra y del estándar se siguieron los procedimientos del método oficial 995.04 de la AOAC, para detección de residuos de tetraciclinas, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (AOAC, 1997). Las muestras traídas al laboratorio se mezclaron con C18 (Octadecyl 40 µm prep. LC parking, J.T. Baker) activado, buffer-EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y ácido oxálico, se lavaron dos veces con hexano para extraer grasas y proteínas. Después se eluyó el antibiótico con una solución de metanol: acetonitrilo 1:1 (v/v) con 0.06% de BHA y BHT; los eluatos se llevaron a sequedad total con flujo de aire y se

resuspendió el extracto con una solución de ácido oxálico 0.02M: acetonitrilo: metanol (70:25:5), se sonicaron y filtraron para finalmente inyectarlos en el HPLC (Figura 1).

El método fue modificado para mejorar la eficiencia y recuperación de los antibióticos. Los principales cambios fueron modificar la fase móvil y la extracción de los eluatos.

Las condiciones del método fueron las siguientes:

- Fase estacionaria: Columna C18 DB, Supelco, fase reversa (15 cm x 4.6 mm x 5 μ m) y precolumna C8, Perkin Elmer
- Fase móvil con ácido oxálico 0.02M: acetonitrilo: metanol (70: 25: 5)
- Flujo isocrático: 1ml/min
- Detector UV a 360 nm

3.6.1. Preparación de estándares de tetraciclinas

- a) Solución estándar stock (100 μ g/ml): Pesar 10 mg de cada tetraciclina en balones volumétricos de 100 ml envueltos en papel aluminio. Llevar a volumen con metanol grado HPLC. Mezclar hasta disolver. Soluciones stocks estables por 2 meses a 10°C.
- b) Solución estándar stock combinado de trabajo (1 μ g/ml): Transferir 0.5 ml de cada solución estándar stock "1" en un balón volumétrico de 50 ml envuelto en papel aluminio. Diluir a volumen con metanol grado HPLC. Almacenar solución ≤ 5 a 10°C.
- c) Solución estándar cromatográfica (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11, 0.2 μ g/ml): Transferir 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 0.1, 0.11 y 0.2 ml de solución "2" en un balón volumétrico de 10 ml envuelto en papel aluminio. Soluciones no estables; prepararlas el día del análisis.
- d) Filtración e inyección de 40 μ l en el cromatógrafo de líquidos

3.6.2. Activación de C18

Se pesaron 22 gramos de C18 (Octadecyl 40 μ m prep. LC parking, J.T. Baker) y se lavó, con ayuda de vacío, con 50 ml de hexano, 50 ml de diclorometano y 50 ml de metanol grado reactivo a través de una jeringa, previa colocación de filtros de fibra de vidrio en el fondo y en la parte superior. Finalmente se guardó en el desecador o se usó.

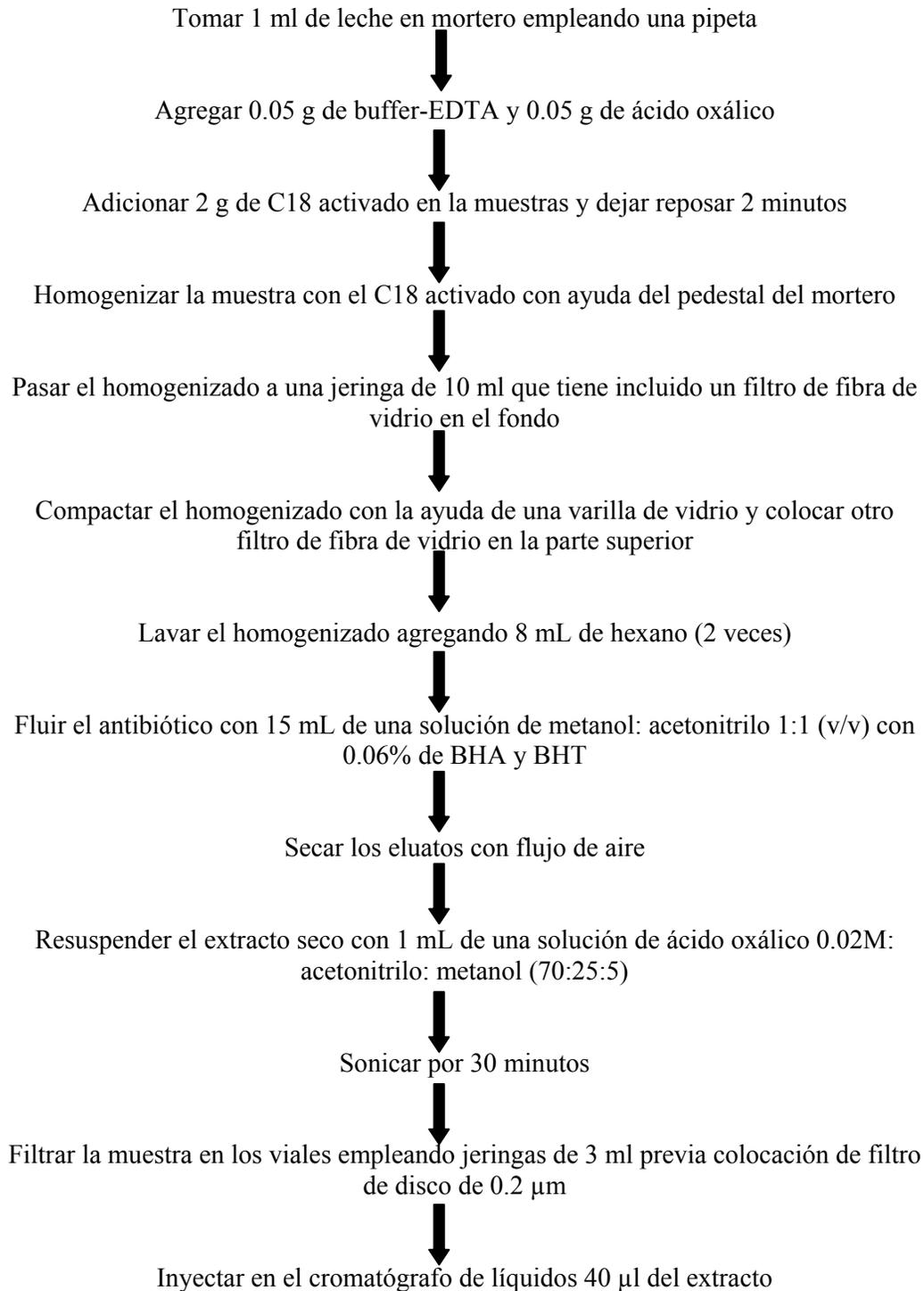


Figura 1. Preparación de muestras para el análisis de tetraciclinas en leche cruda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RESIDUOS DE TETRACICLINA Y OXITETRACICLINA

Se elaboraron curvas estándares de TC y OTC para calibrar el equipo HPLC y obtener regresiones lineales para calcular las concentraciones de OTC (Figura 2) y TC (Figura 3) de las muestras y porcentaje de recuperación de TC (Figuras 4 y 5) y OTC (Figuras 6 y 7).

Como podemos observar en la figura 2, se inyectaron concentraciones conocidas de diferentes estándares de oxitetraciclina entre 0 y 0.1 ppm para calcular la concentración de las muestras analizadas por medio de regresión lineal.

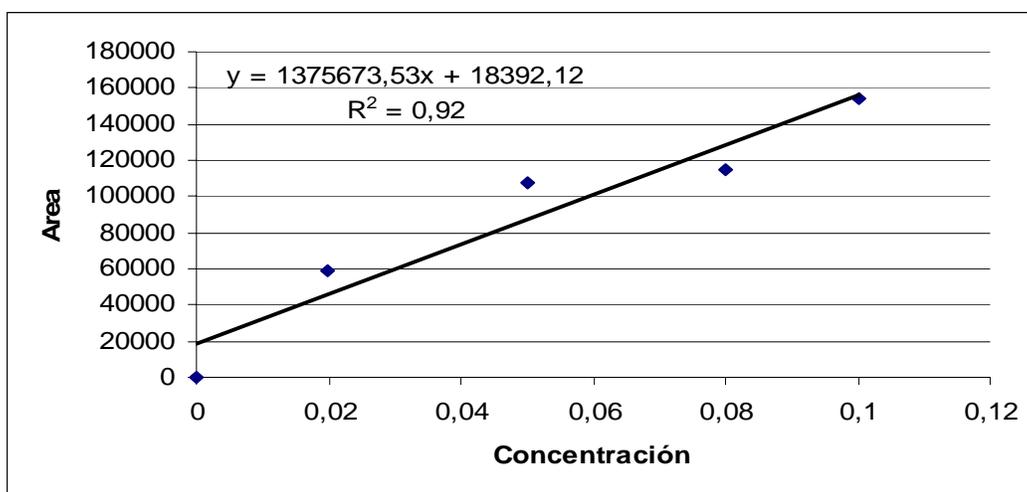


Figura 2. Regresión lineal de curva estándar de concentraciones de oxitetraciclina.

Como se observa en la figura 3, se inyectaron concentraciones conocidas de diferentes estándares de tetraciclina entre 0 y 0.2 ppm para estimar la concentración de las muestras analizadas por medio de regresión lineal.

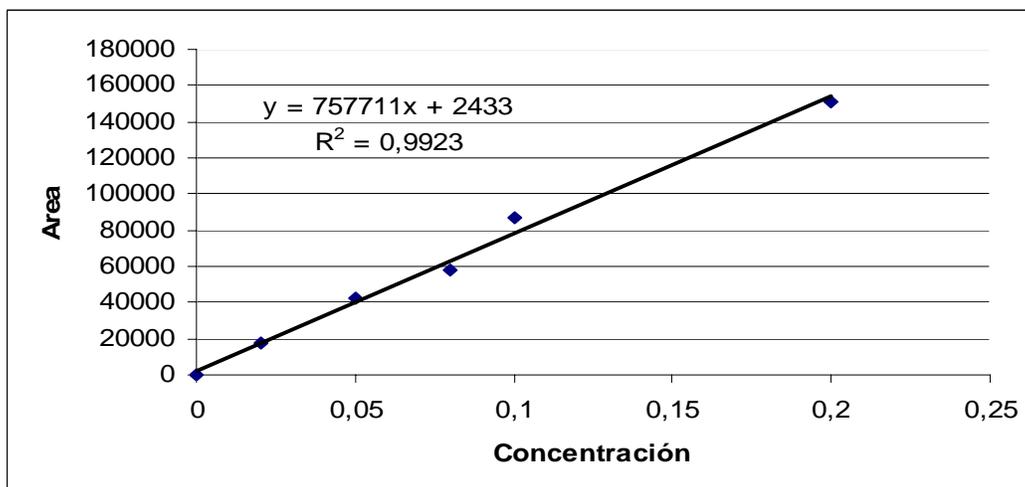


Figura 3. Regresión lineal de curva estándar de concentraciones de tetraciclina.

En el 40% de las muestras analizadas se detectaron residuos de TC mayores al LMR, es decir, en 32 de las 80 muestras, mientras que en 16 se detectaron residuos de TC en concentraciones menores al LMR y en las restantes 32 no se detectaron residuos de TC.

En cuanto al nivel de OTC, en 11 de las 80 muestras se encontraron residuos de OTC mayores al LMR, en 17 se encontraron residuos de OTC en concentraciones menores al LMR y en las restantes 52 muestras no se detectaron residuos de OTC.

Esto implica que la leche de recibo de la planta de lácteos de Zamorano no estuvo libre de residuos de TC ni OTC, por lo menos en el período de mayo a junio del 2004.

4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE PRODUCTORES

El límite de cuantificación fue de 0.01 ppm. La recuperación de tetraciclina fue de 58% (anexo 5 y 6) con desviación estándar de 0.002 y de oxitetraciclina de 65% (anexo 7 y 8) con desviación estándar de 0.024 (Cuadro 5), con la cual se ajustaron los resultados. El porcentaje de recuperación reportado por el método de la AOAC es de 75% con desviación estándar de 12 en OTC y 73% con desviación estándar de 13 en TC.

Como se observa en el cuadro 5, las concentraciones de OTC presentaron el mayor coeficiente de variación debido a la inestabilidad del antibiótico durante la preparación del estándar por acción de la luz.

Cuadro 5. Resultados de la determinación de TC y OTC en muestras y estándares de leche fortificadas a concentración de 0.1 ppm

Antibiótico	Concentración (ppm)	Promedio (ppm)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Oxitetraciclina	0.084	0.101	0.024	24.21
Oxitetraciclina	0.119			
Oxitetraciclina	0.164	0.164	0	0
Oxitetraciclina	0.164			
Tetraciclina	0.113	0.1137	0	0
Tetraciclina	0.113			
Tetraciclina	0.199	0.198	0.002	1.248
Tetraciclina	0.196			

Los tiempos de retención fueron de 3.5 minutos en tetraciclina y 2.9 minutos en OTC, con pequeñas variaciones debidas a cambios en la composición de la fase móvil, equilibrado de la columna y cambios en la temperatura del ambiente, afectando la columna.

El tiempo de retención de estándar de TC a 0.1 ppm fue de 3.037 minutos con un área de 153902 unidades de absorbancia (Figura 4), mientras que el tiempo de retención de la muestra fortificada con TC a 0.1 ppm fue de 4.1 minutos con un área de 88634 unidades de absorbancia (Figura 5).

El tiempo de retención de estándar de OTC a 0.1 ppm fue de 2.937 minutos con un área de 244678 unidades de absorbancia (Figura 6), mientras que el tiempo de retención de la muestra fortificada con OTC a 0.1 ppm fue de 2.503 minutos con un área de 182600 unidades de absorbancia (Figura 7).

Se encontró diferencia significativa entre la concentración de antibióticos en las muestras de leche ($P < 0.05$), indicando que la leche de los diferentes productores contienen concentraciones significativamente diferentes de TC (cuadro 6) y OTC (cuadro 7).

Cuadro 6. Comparación de medias de concentración de residuos de TC en leche de proveedores de la planta de lácteos de Zamorano.

Productor	Concentración (ppm) MSD = 0.0006
EAP	0.245a
Montoya	0.197b
AGAZA	0.191c
Barahona	0.124d
Maier	0.096e

Solamente la leche del productor Maier obtuvo una concentración promedio significativamente menor al LMR. En la columna de concentración promedio de TC, las letras diferentes indican que las concentraciones de leche por productor son significativamente diferentes entre sí ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Comparación de medias de concentración de residuos de OTC entre productores.

Productor	Concentración (ppm) MSD = 0.0007
Montoya	0.043a
Barahona	0.038b
EAP	0.026c
AGAZA	0.026c
Maier	0.020d

La leche de todos los proveedores obtuvieron una concentración promedio significativamente menor al LMR (cuadro 7). En la columna de concentración promedio de OTC, las letras diferentes indican que las concentraciones de leche por productor son significativamente diferentes entre sí ($P < 0.05$).

También se encontró diferencia significativa entre la concentración de antibióticos en las muestras de leche ($P < 0.05$), indicando que la leche de los diferentes días contienen concentraciones significativamente diferentes de TC (cuadro 8) y OTC (cuadro 9).

Cuadro 8. Comparación de medias de concentración de residuos de TC por día.

Día	Concentración (ppm) MSD = 0.0009
26/06/04	0.524a
21/06/04	0.512b
02/06/04	0.114c
18/05/04	0.101d
15/05/04	0.052e
24/05/04	0.034f
14/06/04	0.023g
31/05/04	0.006h

La leche de los días 18 de mayo, 2, 21 y 26 de junio obtuvieron una concentración promedio significativamente mayor al LMR. En la columna de concentración promedio de TC, las letras diferentes indican que las concentraciones de leche por día son significativamente diferentes entre sí ($P < 0.05$).

Cuadro 9. Comparación de medias de concentración de residuos de OTC por día.

Día	Concentración (ppm) LSD = 0.001
14/06/04	0.103a
02/06/04	0.066b
31/05/04	0.036c
15/05/04	0.020d
18/05/04	0.018e
21/06/04	0.001f
26/06/04	0.001f
24/05/04	0.001f

Como se puede observar en el cuadro 9, solamente la leche del día 14 de junio obtuvo una concentración promedio significativamente mayor al LMR. En la columna de concentración promedio de OTC, las letras diferentes indican que las concentraciones de leche por día son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Considerando que el LMR es 0.1 ppm, en la figura 4 se puede observar que la leche del productor AGAZA presenta una tendencia a usar TC durante y después del tratamiento con OTC, presentando cantidades mayores al LMR.

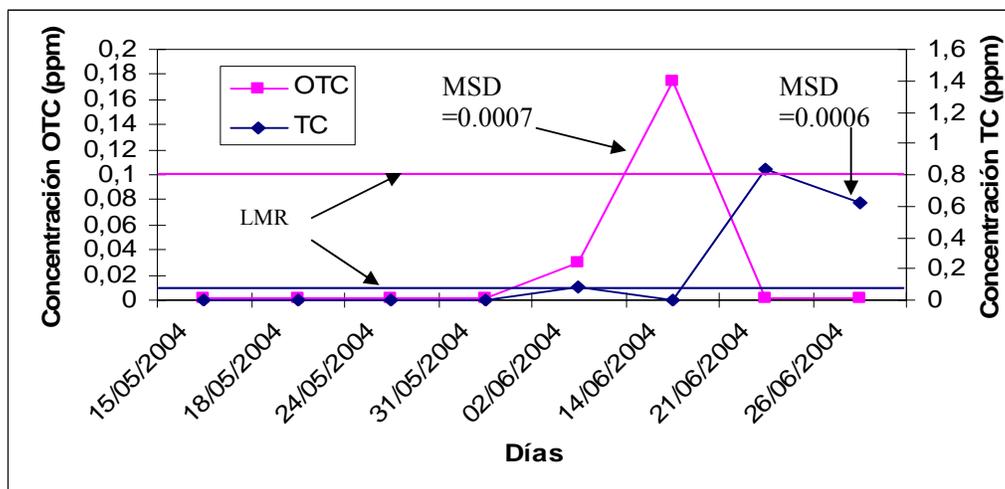


Figura 4. Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor AGAZA.

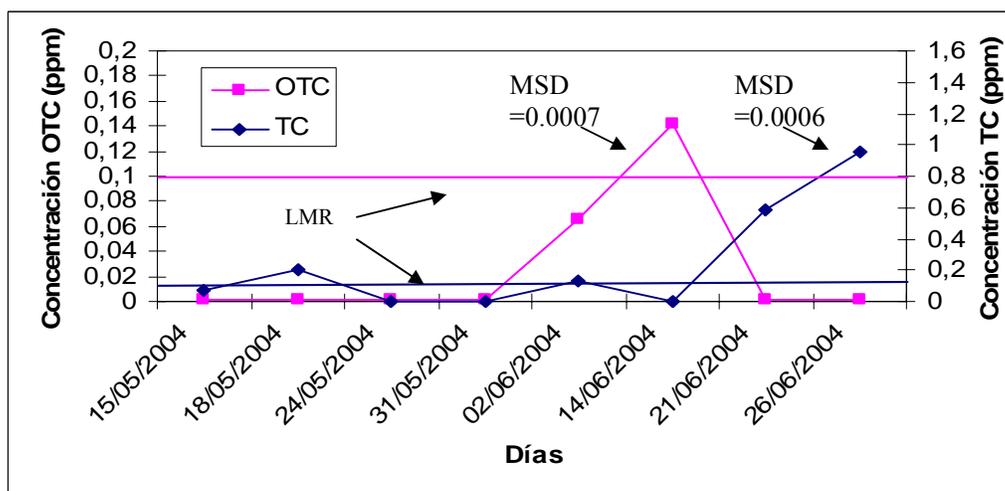


Figura 5. Concentración en ppm de TC y OTC en leche del estable de la EAP.

En la figura 5 se puede observar que la leche del estable de la EAP presenta una tendencia a usar TC antes, durante y después del tratamiento con OTC, presentando cantidades mayores al LMR.

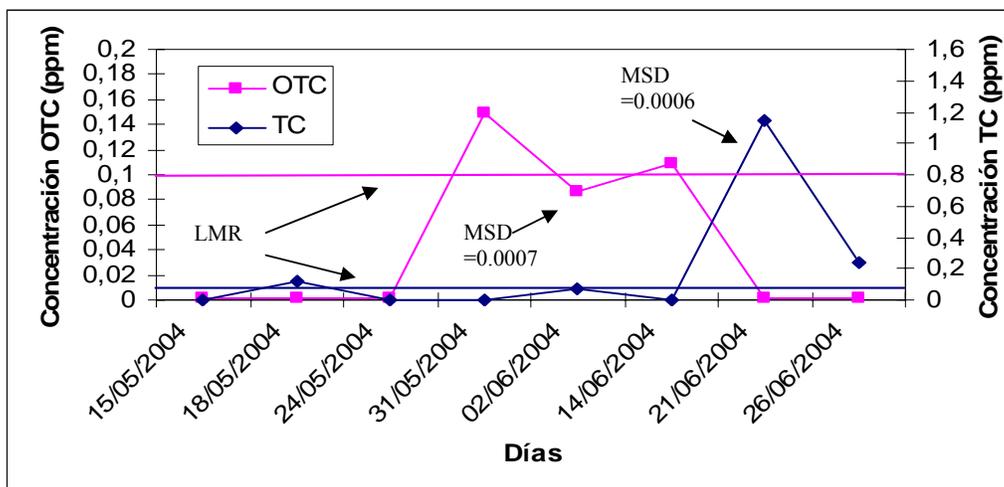


Figura 6. Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Montoya.

En la figura 6 se puede observar que la leche del productor Montoya presenta una tendencia a usar TC antes, durante y después del tratamiento con OTC, presentando cantidades mayores al LMR.

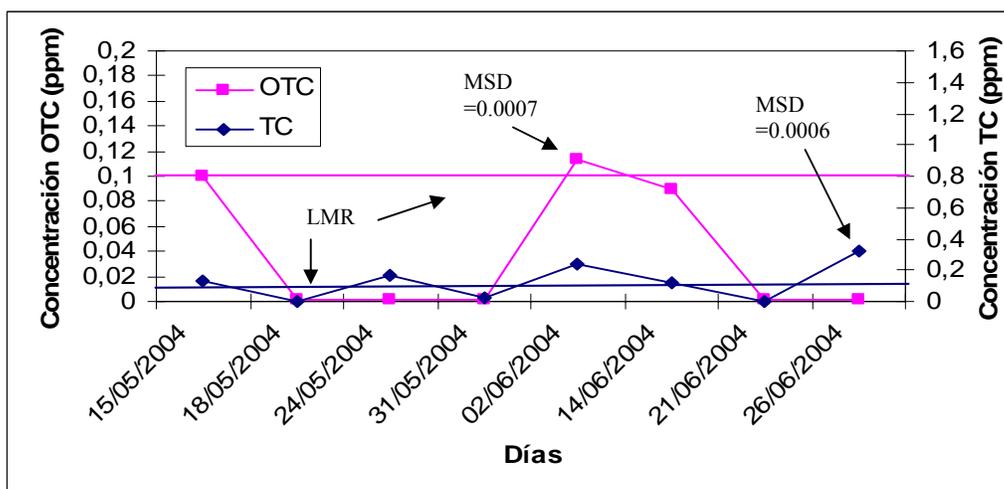


Figura 7. Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Barahona.

En la figura 7 se puede observar que la leche del productor Barahona presenta una tendencia a usar TC durante y después del tratamiento con OTC, presentando cantidades mayores al LMR.

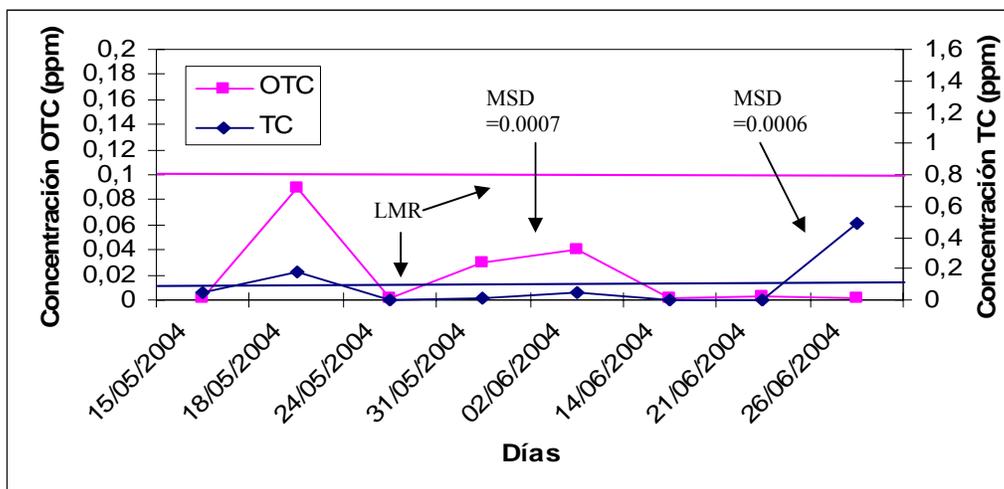


Figura 8. Concentración en ppm de TC y OTC en leche del productor Maier.

En la figura 8 se puede observar que la leche del productor Maier presenta una tendencia a usar TC durante y después del tratamiento con OTC, presentando cantidades mayores al LMR solamente en TC.

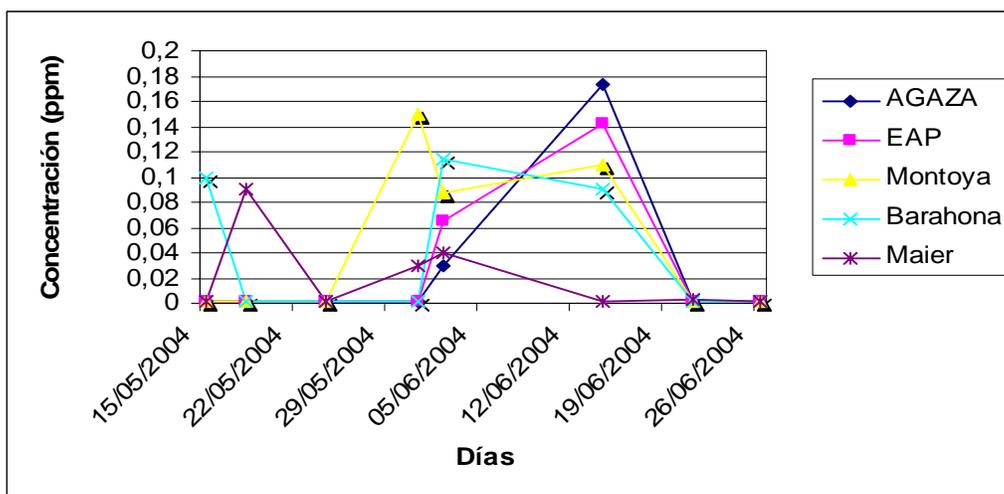


Figura 9. Concentración en ppm de OTC en leche de todos los productores.

En la figura 9 se puede observar que la leche de todos los productores presenta una tendencia a usar OTC durante los meses de mayo y junio.

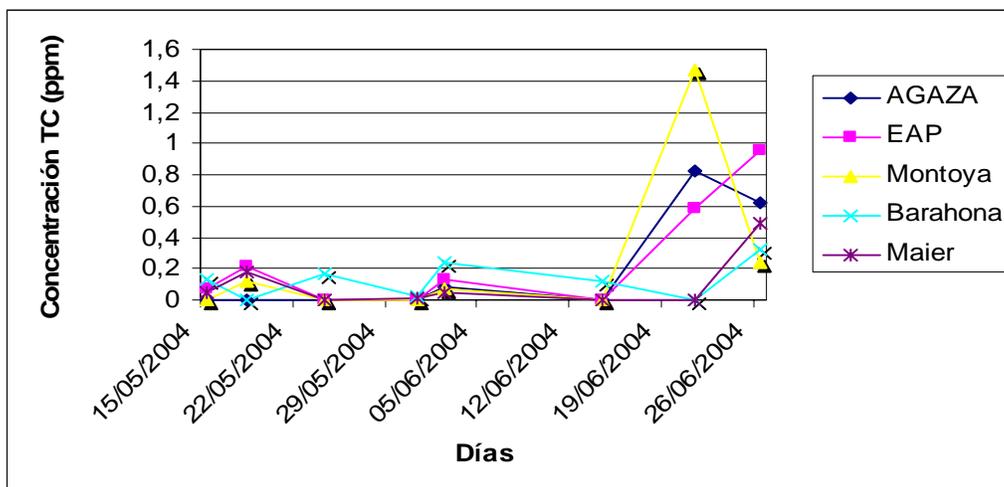


Figura 10. Concentración en ppm de TC en leche de todos los productores.

En la figura 10 se puede observar que la leche de todos los productores presenta una tendencia a usar TC durante el mes de junio, es decir, durante y después del tratamiento con OTC.

5. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio se detectaron residuos de tetraciclina (TC) mayores al Límite Máximo de Residuos (LMR) en un 40% de las muestras analizadas.
- Se detectaron residuos de oxitetraciclina (OTC) mayores al Límite Máximo de Residuos (LMR) en un 13.75% de las muestras analizadas.
- Bajo las condiciones del estudio, la mayor concentración promedio de tetraciclina (0.245 ppm) se detectó en la leche del establo de la EAP y la menor concentración promedio de tetraciclina (0.096 ppm) se detectó en la leche del productor Maier.
- La mayor concentración promedio de oxitetraciclina (0.043 ppm), se detectó en la leche del productor Montoya y la menor concentración promedio de oxitetraciclina (0.020 ppm) se detectó en la leche del productor Maier.
- Los proveedores con concentraciones promedio significativamente mayores al LMR ($P < 0.05$) de tetraciclina en la leche, bajo las condiciones del estudio, son los productores Montoya, AGAZA, Barahona y el establo de la EAP.
- La leche de ninguno de los proveedores obtuvo concentraciones promedio significativamente mayores al LMR ($P < 0.05$) de oxitetraciclina, bajo las condiciones del estudio.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios en otros productos animales, como huevos, camarones, aves o cerdos.
- Analizar otros tipos de antibióticos que también son utilizados en la ganadería.
- Analizar hormonas utilizadas en la ganadería.
- Analizar aflatoxinas en productos pecuarios.
- Realizar estudios en leche de productos terminados.
- Realizar comparación durante la época seca y lluviosa.
- Realizar análisis en cromatógrafo con otro detector.

7. BIBLIOGRAFÍA

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

Booth, N. H.; McDonald, L. E. 1987. Farmacología y terapéutica veterinaria. Zaragoza, España, Acribia, v. 2. 528 p.

Booth, N. H.; McDonald, L. E. 1988. Farmacología y terapéutica veterinaria. Zaragoza, España, Acribia, v. 1. 819 p.

Burriel, O.; Salavera, D.; Gimeno, V. 1997. Análisis del contenido aminoacídico de los alimentos con fines nutricionales (en línea). Consultado 18 de agosto de 2004. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos7/amin/amin.shtml#tec>

CIAD, A.C. 2004. Líneas de investigación en toxicología de alimentos (en línea). Consultado 4 de septiembre de 2004. Disponible en: <http://www.ciad.mx/ciencias/cbermude.htm>

Ewing, W.; Cole, D. 1994. The living gut. Loughborough, UK, *Context*. 220p.

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

FAO-OMS. 2000. Comisión del Codex Alimentarius: Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (en línea). Consultado 3 de agosto de 2003. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7102s/x7102s0q.htm>

FDA. 2002. State Health Director: Antibiotic Found In Recalled Milk (en línea). Consultado 17 de junio de 2003. Disponible en: http://www.fda.gov/oc/po/firmrecalls/CDHS06_02.html

FDA. 2003. Antibiotic Resistance: A growing threat (en línea). Consultado 2 de junio de 2003. Disponible en: http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/anti_resist.html

Goodman, L.S.; Gilman, A.G. 1988. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Buenos Aires, Argentina, Panamericana. 7 ed. 1725 p.

OEA. 2003. Contaminación de la leche por antibióticos (en línea). Consultado 10 de agosto de 2004. Disponible en: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/le_html/cap6_leche.htm

Sumano, H. 1996. Farmacología clínica en bovinos. México DF, México, Trillas. 652 p.

Revista cubana de medicina general integral. 1999. Antibacterianos de acción sistémica. Cuba, Ciencias Médicas, v. 15, N° 2, p2.

8. ANEXOS

Anexo 1. Datos de tetraciclina en las muestras analizadas

<u>Productor</u>	<u>Fecha</u>	<u>Concentración</u> <u>TC µg/kg (ppm)</u>
AGAZA	15/05/04	0.001
AGAZA	15/05/04	0.001
EAP	15/05/04	0.076
EAP	15/05/04	0.077
Montoya	15/05/04	0.003
Montoya	15/05/04	0.003
Barahona	15/05/04	0.128
Barahona	15/05/04	0.128
Maier	15/05/04	0.052
Maier	15/05/04	0.052
AGAZA	18/05/04	0.001
AGAZA	18/05/04	0.001
EAP	18/05/04	0.208
EAP	18/05/04	0.208
Montoya	18/05/04	0.117
Montoya	18/05/04	0.120
Barahona	18/05/04	0.001
Barahona	18/05/04	0.001
Maier	18/05/04	0.181
Maier	18/05/04	0.181
AGAZA	24/05/04	0.001
AGAZA	24/05/04	0.001
EAP	24/05/04	0.001
EAP	24/05/04	0.001
Montoya	24/05/04	0.001
Montoya	24/05/04	0.001
Barahona	24/05/04	0.169
Barahona	24/05/04	0.170
Maier	24/05/04	0.001
Maier	24/05/04	0.001
AGAZA	31/05/04	0.001
AGAZA	31/05/04	0.001
EAP	31/05/04	0.001
EAP	31/05/04	0.001
Montoya	31/05/04	0.001
Montoya	31/05/04	0.001
Barahona	31/05/04	0.019
Barahona	31/05/04	0.019
Maier	31/05/04	0.008
Maier	31/05/04	0.008
AGAZA	02/06/04	0.082
AGAZA	02/06/04	0.082
EAP	02/06/04	0.135
EAP	02/06/04	0.135

Montoya	02/06/04	0.069
Montoya	02/06/04	0.069
Barahona	02/06/04	0.239
Barahona	02/06/04	0.239
Maier	02/06/04	0.047
Maier	02/06/04	0.047
AGAZA	14/06/04	0.001
AGAZA	14/06/04	0.001
EAP	14/06/04	0.001
EAP	14/06/04	0.001
Montoya	14/06/04	0.001
Montoya	14/06/04	0.001
Barahona	14/06/04	0.114
Barahona	14/06/04	0.114
Maier	14/06/04	0.001
Maier	14/06/04	0.001
AGAZA	21/06/04	0.828
AGAZA	21/06/04	0.830
EAP	21/06/04	0.583
EAP	21/06/04	0.583
Montoya	21/06/04	1.147
Montoya	21/06/04	1.150
Barahona	21/06/04	0.001
Barahona	21/06/04	0.001
Maier	21/06/04	0.001
Maier	21/06/04	0.001
AGAZA	26/06/04	0.618
AGAZA	26/06/04	0.620
EAP	26/06/04	0.958
EAP	26/06/04	0.958
Montoya	26/06/04	0.238
Montoya	26/06/04	0.239
Barahona	26/06/04	0.322
Barahona	26/06/04	0.323
Maier	26/06/04	0.484
Maier	26/06/04	0.484

Anexo 2. Datos de oxitetraciclina en las muestras analizadas

<u>Productor</u>	<u>Fecha</u>	<u>Concentración</u> <u>OTC $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppm)</u>
AGAZA	15/05/04	0.001
AGAZA	15/05/04	0.001
EAP	15/05/04	0.001
EAP	15/05/04	0.001
Montoya	15/05/04	0.001
Montoya	15/05/04	0.001
Barahona	15/05/04	0.096
Barahona	15/05/04	0.100
Maier	15/05/04	0.001
Maier	15/05/04	0.001
AGAZA	18/05/04	0.001
AGAZA	18/05/04	0.001
EAP	18/05/04	0.001
EAP	18/05/04	0.001
Montoya	18/05/04	0.001
Montoya	18/05/04	0.001
Barahona	18/05/04	0.001
Barahona	18/05/04	0.001
Maier	18/05/04	0.088
Maier	18/05/04	0.090
AGAZA	24/05/04	0.001
AGAZA	24/05/04	0.001
EAP	24/05/04	0.001
EAP	24/05/04	0.001
Montoya	24/05/04	0.001
Montoya	24/05/04	0.001
Barahona	24/05/04	0.001
Barahona	24/05/04	0.001
Maier	24/05/04	0.001
Maier	24/05/04	0.001
AGAZA	31/05/04	0.001
AGAZA	31/05/04	0.001
EAP	31/05/04	0.001
EAP	31/05/04	0.001
Montoya	31/05/04	0.149
Montoya	31/05/04	0.150
Barahona	31/05/04	0.001
Barahona	31/05/04	0.001
Maier	31/05/04	0.030
Maier	31/05/04	0.030
AGAZA	02/06/04	0.027
AGAZA	02/06/04	0.030
EAP	02/06/04	0.065

EAP	02/06/04	0.065
Montoya	02/06/04	0.087
Montoya	02/06/04	0.087
Barahona	02/06/04	0.114
Barahona	02/06/04	0.114
Maier	02/06/04	0.037
Maier	02/06/04	0.040
AGAZA	14/06/04	0.174
AGAZA	14/06/04	0.174
EAP	14/06/04	0.142
EAP	14/06/04	0.142
Montoya	14/06/04	0.109
Montoya	14/06/04	0.109
Barahona	14/06/04	0.090
Barahona	14/06/04	0.091
Maier	14/06/04	0.001
Maier	14/06/04	0.001
AGAZA	21/06/04	0.001
AGAZA	21/06/04	0.001
EAP	21/06/04	0.001
EAP	21/06/04	0.001
Montoya	21/06/04	0.001
Montoya	21/06/04	0.001
Barahona	21/06/04	0.001
Barahona	21/06/04	0.001
Maier	21/06/04	0.002
Maier	21/06/04	0.003
AGAZA	26/06/04	0.001
AGAZA	26/06/04	0.001
EAP	26/06/04	0.001
EAP	26/06/04	0.001
Montoya	26/06/04	0.001
Montoya	26/06/04	0.001
Barahona	26/06/04	0.001
Barahona	26/06/04	0.001
Maier	26/06/04	0.001
Maier	26/06/04	0.001

Anexo 3. Análisis de varianza en SAS® para resultados de tetraciclina

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Modelo	39	6.23219580	0.15979989	426133	<.0001
Error	40	0.00001500	0.00000037		
Total	79	6.23221080			
R-cuadrado	Coeficiente de variación				
0.999	0.357				

Anexo 4. Análisis de varianza en SAS® para resultados de oxitetraciclina

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Modelo	39	0.19949189	0.00511518	9980.83	<.0001
Error	40	0.00002050	0.00000051		
Total	79	0.19951239			
R-cuadrado	Coeficiente de variación				
0.999	2.302				

Anexo 8. Cromatograma de muestra fortificada con OTC (control positivo) a 0.1 ppm

Pump Fault. Run Terminated Automatically.

File : STD_67.D01 spiked0.lppaozyc Frank Diaz
 Run : 91 Type : Sample
 Path : C:\CHROM Inst : Zakorano
 Collection : 12:44:14 Jun 19 2004 Method : LECHE04 [18:26:36 Jun 14 2004]
 Integration : 12:44:14 Jun 19 2004 Method : LECHE04 [18:26:36 Jun 14 2004]
 Report : 12:48:04 Jun 19 2004 Method : LECHE04 [18:26:36 Jun 14 2004]

Sample Amt : 1.00000e+0 Dilution: 1.00000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	DC	ExpRT	RF	Concn	Name
1.647	285663	T		1.00000e+0	285663.0000	Unknown
2.163	68463	V		1.00000e+0	68463.8750	Unknown
2.503	182600			1.00000e+0	182600.0000	Unknown

