

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**“DETERMINACION DE RESIDUOS DE TETRACICLINA  
EN CARNES DE POLLO QUE SE CONSUMEN  
EN LA CIUDAD DE GUATEMALA: PLAN PILOTO”**

**INFORME DE TESIS**

Presentado por:

**BESSIE ABIGAIL OROZCO RAMIREZ**

Para optar al Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO**

Guatemala, febrero de 1997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca

## ACTO QUE DEDICO

A DIOS

El temor de Jehová es principio de sabiduría, Y el conocimiento del Santísimo es la inteligencia.

A MIS PADRES

Pedro Rafael Orozco Orozco  
Isabel Ramírez Turcios de Orozco

A MIS HERMANOS

Jorge Alberto  
Míriam Noemí  
Ana Edith

A MI SOBRINO

Elías Jacobo

A LAS FAMILIAS

Carrera Turcios, Orozco Cabrera,  
Ramírez-Turcios, Orozco Morales  
y Orozco Trujillo.

A

Dottie Haeussler, y Dale Ryan

AL INSTITUTO LINGUISTICO DE VERANO

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS



## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. Rubén Velásquez,  
su valiosa guía, gran capacidad de investigación,  
amplios conocimientos, dedicación y paciencia  
hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Licda. Blanca Samayoa, MSc.,  
su amplia experiencia en el campo de la salud,  
sus valiosos aportes, su co-asesoría y su ayuda oportuna  
fueron la base fundamental de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia  
de la Universidad de San Carlos de Guatemala,  
en particular al  
Departamento de Bioquímica  
de la Escuela de Química Biológica.

A Ruth, Miriam, y a  
todas aquellas personas que de una u otra forma  
colaboraron, haciendo posible  
la realización de esta investigación.

## INDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
1. RESUMEN	01
2. INTRODUCCION	02
3. ANTECEDENTES	04
4. JUSTIFICACION	13
5. OBJETIVOS	14
6. HIPOTESIS	15
7. MATERIALES Y METODOS	16
8. RESULTADOS	24
9. DISCUSION DE RESULTADOS	32
10. CONCLUSIONES	36
11. RECOMENDACIONES	37
12. REFERENCIAS	38
13. ANEXOS	41

## 1. RESUMEN

El uso de antibióticos en medicina veterinaria conlleva ciertos problemas, uno de ellos es la contaminación mediante la cadena alimenticia y consecuentemente, al apareamiento de poblaciones bacterianas resistentes a determinados antibióticos. Por ello, es necesario investigar la presencia de antibióticos residuales en la carne de animales sacrificados que es destinada al consumo humano.

A nivel nacional el consumo de pollo es grande y el uso de tetraciclinas en las Granjas Avícolas es generalizado, por lo que el principal objetivo de este trabajo fue determinar, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la presencia de residuos de tetraciclinas en pechugas de pollo provenientes de una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala. Como requerimiento previo para cumplir este objetivo fue necesario establecer un método para la detección, identificación y cuantificación de dichos residuos, el cual se derivó de la modificación de dos métodos previamente descritos en la literatura científica.

El estudio se realizó con pechugas de pollo por ser la mayor porción muscular del ave; se investigaron las tetraciclinas porque su uso en medicina veterinaria es avalado ampliamente por la literatura, además de que su venta es libre. Para este estudio piloto se analizaron 30 pechugas de pollo provenientes de una de las granjas avícolas más grandes del País, la que surte a expendios de la Ciudad Capital. Tres de las treinta muestras analizadas presentaron residuos de Oxitetraciclina (0.492, 0.568 y 3.697 ppm respectivamente) que corresponden a cantidades mayores a los Niveles Máximos de Residuos establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA).

De acuerdo a los resultados de este estudio se recomienda que las instituciones encargadas de regular el uso de medicamentos y alimentos destinados a aves de corral, también realicen evaluaciones periódicas (diarias, semanales, mensuales, bimensuales, semestrales, etc.) de los productos comercializados por las granjas avícolas. También se recomienda que se realicen estudios similares sobre otros antibióticos y drogas que se administran a los animales destinados al consumo humano, los cuales podrían llegar en forma residual al consumidor.

## 2. INTRODUCCION

El consumo de carne de pollo tiene un papel importante en la economía de Guatemala, situación que hace necesario que su producción sea en suficiente cantidad para satisfacer las demandas de la población, a la par de esto, su adquisición se favorece por el hecho de ser hasta un 50% más barata que las carnes rojas [1]. Esta alta demanda genera avances en su producción y paralelamente al uso, a veces indiscriminado, de antibióticos en los piensos (alimentos concentrados) y en el agua de bebida.

Los antibióticos se usan comercialmente en la industria aviar para eliminar brotes de enfermedades graves, disminuir el índice de mortalidad y promover el crecimiento [2, 3].

Estudios realizados en Estados Unidos y en el Reino Unido detectaron residuos de distintas drogas no aprobadas en leches y en carnes para consumo humano [4, 5]. Los residuos ilegales de esas drogas en carnes de animales bovinos, se encontraron concentrados en los riñones, hígado o en la grasa, y en menores concentraciones en la carne o músculo, por lo que algunos programas para el monitoreo de residuos se llevan a cabo en esos órganos. Los límites establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) están expresados en esos órganos, aunque también pueden encontrarse expresados en carne y músculo comestibles [6].

El uso de tetraciclina en forma masiva e indiscriminada puede producir problemas potenciales de sobredosis y de resistencia por parte de microorganismos patógenos, lo que afecta tanto a los animales como a los humanos. Una bacteria se hace resistente a agentes antimicrobianos por cambios cromosómicos o por intercambio de material genético vía plásmidos o transposones; las mutaciones ocurren cuando la bacteria se ve expuesta a un antibiótico en dosis tan bajas que permiten que algunas de ellas no mueran y desarrollen resistencia, la que posteriormente les ayuda a sobrevivir incluso a un tratamiento con otras drogas existentes [7].

En Guatemala, la “Ley de Fomento Avícola” indica que se debe mantener vigilancia sobre la calidad de los medicamentos y alimentos destinados para aves de corral [8, 9], y la norma NGO 34 170 elaborada por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), regula el uso de antibióticos en alimentos para aves a sólo los autorizados por la Dirección Técnica de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [10].

Sin embargo, aunque en Guatemala existan esas regulaciones para el uso de antibióticos en animales criados para la obtención de productos cárnicos, no se cuenta con técnicas establecidas para un control sistemático de los productos que consume la población. La información sobre estudios realizados para verificar la presencia de residuos de antibióticos en carnes de pollo y en otros alimentos es limitada [11, 12]; se han hecho algunos estudios usando métodos microbiológicos [13] como la Difusión en Agar [14], a pesar que se conoce que éstos métodos no son específicos y tampoco lo suficientemente sensibles para la determinación de residuos de antibióticos en muestras alimenticias [15].

Es por ello que en el presente trabajo de investigación se cuantificaron, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [15, 17], los residuos de tetraciclinas en carne de pollo producida por una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala, verificando que se encontraron dentro de los límites establecidos como niveles máximos de residuos para consumo humano [16].

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 GENERALIDADES**

##### **3.1.1 CRIANZA DE AVES DE CORRAL**

En Guatemala, la avicultura nacional es vital dentro del marco socio-económico y productivo, encontrándose diferentes empresas encargadas de transformar determinadas materias primas en productos alimenticios esenciales para la nutrición de los guatemaltecos [1]. Con el afán de obtener una producción óptima, en el manejo y crianza de aves en las distintas granjas avícolas se desarrolla especialmente el aspecto de alimentos para las aves. El alimento, constituido por una mezcla de varios ingredientes y que puede o no contener aditivos, debe satisfacer los requerimientos nutricionales para las aves que lo consumen [18].

Los piensos o alimentos especializados tienen la finalidad de sustentar el cuerpo del ave y hacerle capaz de producir otros productos, como los huevos. Al combinar cinco o seis ingredientes principales se suplen las necesidades de vitaminas, minerales y de la nutrición en general; además, la adición de antibióticos favorece un desarrollo rápido de las aves y ayuda a controlar las infecciones clínicas y aún las no visibles [18].

##### **3.1.2 PROCESO DE DIGESTION DE ALIMENTOS EN AVES**

EL alimento, luego que el ave lo recoge por medio del pico, sufre las etapas de mezcla previa, almacenamiento, mezcla química, y molienda para un aprovechamiento final [18].

Al observar de cerca la cavidad bucal de un ave no se ven dientes, sino una espesa materia salival que acompaña a los alimentos cuando entran al esófago, realizando así la mezcla previa, y llegan hasta el buche o almacén. El agua, la saliva, las enzimas del alimento y las secreciones del buche se encargan de reblandecer las materias alimenticias, iniciar la acción digestiva, y preparar los alimentos para la mezcla química [18]. En la cara interna del verdadero estómago o proventrículo se encuentra una gran cantidad de aberturas diminutas de donde salen el ácido clorhídrico y los fluidos digestivos que contienen pepsina, que aumentan la acidez de toda la mezcla.

La etapa de mezcla se realiza en la molleja, que tiene unos músculos fuertes que se doblan y hacen girar los materiales ingeridos por el ave. Los alimentos ya reblandecidos quedan molidos y totalmente mezclados, mientras que la acción muscular peristáltica empuja la



mezcla alimenticia de un lado a otro sobre las superficies interiores de tipo rugoso que posee la molleja. Mientras que el alimento recorre el tramo duodenal, el jugo pancreático, la bilis del hígado y las enzimas realizan los procesos digestivos y pasan la mezcla al estado alcalino [18].

En las paredes interiores del intestino y en el interior del torrente sanguíneo se lleva a cabo la asimilación de los factores o elementos nutritivos en las fases finales de la digestión. En el tracto digestivo del ave se lleva a cabo una acción peristáltica, rítmica y lenta, que favorece el avance del alimento dentro de él [18].

### **3.1.3 USO DE ANTIBIOTICOS EN ALIMENTOS PARA AVES**

Como aditivos para alimentos se usan por lo menos cinco antibióticos (penicilina, clortetraciclina, oxitetraciclina, bacitracina, y estreptomina), encargados de promover el crecimiento en las aves y disminuir el riesgo de contraer enfermedades. Entre estos antibióticos hay grandes diferencias, no sólo porque pertenecen a distintas familias sino porque cada uno es capaz de combatir determinados tipos de bacterias, y a pesar de ello son usados sin tomar en cuenta esas diferencias, ni la respuesta del ave a su ingesta [3].

El uso de los medicamentos veterinarios sólo es aprobado cuando se comprueba que son seguras para: (a) el animal al cual son destinados; (b) el consumidor del animal sacrificado; (c) el operador durante su manufactura o proceso y, (d) el medio ambiente [5].

En 1992, la Oficina General de Contadores (General Accounting Office, GAO) de Estados Unidos encontró que entre el 20-30% de leches para consumo humano analizadas contenían residuos de drogas, incluyendo sulfametazina (sospechoso de ser carcinogénico) y otras drogas no aprobadas [4]. Estudios realizados en el Reino Unido encontraron residuos de tetraciclinas, entre 8 y 40 µg/kg, en 8 de las 56 muestras estudiadas (riñones de animales bovinos) [5]. Los residuos no permitidos se han encontrado concentrados en los riñones, hígado, o en la grasa de los animales y en menores concentraciones en la carne o músculo [6].

### **3.1.4 LEYES EN GUATEMALA CONCERNIENTES AL USO DE ANTIBIOTICOS COMO ADITIVOS EN ALIMENTOS PARA ANIMALES**

En Guatemala, el Decreto del Congreso No. 1331 “Ley de Fomento Avícola” en su Artículo 14 indica, entre otros aspectos, que los fabricantes o distribuidores de medicamentos y alimentos destinados a aves de corral son los responsables de vigilar por la calidad de esos

insumos [8, 9]. Además, la norma NGO 34 170 elaborada por COGUANOR dice en su Inciso 6.7.1. "Antibióticos. Se podrán agregar antibióticos a los alimentos para aves, excepto para aves ponedoras; los antibióticos que podrán incorporarse no deberán ser los empleados para uso terapéutico en humanos sino que serán los autorizados por la Dirección Técnica de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación y se emplearán en la cantidad que dicha Dirección establezca" [10].

A pesar de que existen estas regulaciones para el uso de antibióticos en alimentos para animales, ninguna organización gubernamental o no gubernamental (ONGs) del país tiene técnicas establecidas para un control sistemático de las carnes o de los productos cárnicos que consume la población guatemalteca.

### **3.1.5 RESIDUOS DE DROGAS EN ANIMALES**

En farmacología veterinaria se reconoce que el destino de las drogas dentro del cuerpo del animal es variable; algunos compuestos son metabolizados o eliminados del cuerpo muy rápidamente, como las prostaglandinas, pero hay otros que son mucho más persistentes, como los antibióticos. Esta persistencia dentro del cuerpo depende de distintos factores como los siguientes: 1. la naturaleza química de la sustancia; 2. la vía de administración (oral, intravenosa, subcutánea, etc.); 3. la formulación (de corta o larga duración); 4. la distribución en los tejidos y la forma de unirse a ellos; 5. el destino metabólico, es decir, si son excretadas sin sufrir cambios, si son convertidas en otros metabolitos, etc. [5].

Para la seguridad del consumidor es importante establecer la tolerancia de residuos aceptables (niveles máximos de residuos) de una droga y sus metabolitos. Los efectos que preocupan más son la toxicidad aguda y cualquier efecto crónico, que incluyen genotoxicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, habilidad para afectar la función reproductiva, y efectos inmunopatológicos como las alergias [5].

En los estudios de las drogas, se determina la dosis máxima que no produce efectos tóxicos y se le denomina '*nivel sin efectos*'. El menor nivel sin efectos determinado en varios estudios se usa para calcular la '*ingesta diaria aceptable*' y los '*niveles máximos de residuos*'.

Los estudios de residuos se hacen normalmente en las distintas especies animales, e incluyen datos de los músculos, grasa, hígado, riñón, el sitio de inyección, leche y huevos (si es apropiado). La tolerancia, o niveles máximos de residuos, se determina en relación al tejido con la mayor concentración de residuos [5].

### 3.2 LAS TETRACICLINAS: SU USO EN AVES

Mayor información respecto a las características químicas y farmacológicas de las tetraciclinas se dan en los Anexos 13.1, 13.2, y 13.3.

Las tetraciclinas son conocidas porque poseen amplio espectro antibacteriano, son eficaces por vía oral y tienen un favorable índice terapéutico en aves. Son bacteriostáticas, excepto a concentraciones muy elevadas; su uso puede modificar en algunos casos la infección y no erradicarla por completo [19].

Son activas contra ciertas enfermedades aviares asociadas con micoplasma, rickettsia, clamidia y las asociadas con bebesia, anaplasma y eperitrozoa. La minociclina, un derivado semisintético [20], tiene actividad especial contra *Norcadia* y *Staphylococcus aureus*. En infecciones por protozoarios e infecciones bacterianas intracelulares, el tratamiento tal vez controle la enfermedad pero no eliminará por completo la infección [2].

Estudios *in vitro* han encontrado 88 cepas de bacterias gram-positivo sensibles a la clortetraciclina y a la oxitetraciclina, mientras que 120 cepas de bacterias gram-negativo fueron más sensibles a la clortetraciclina que a la oxitetraciclina [3].

#### 3.2.1 FARMACOCINÉTICA EN AVES

La absorción de las tetraciclinas luego de la administración oral en aves se da con rapidez, dando como resultado niveles máximos en sangre y tejidos en 2 a 4 horas, lo que es adecuado para tratar la mayoría de las infecciones. Son excretadas en un período de 12 a 24 horas sin cambio hasta en un 30% a través de la orina. Forman quelatos no absorbibles con metales pesados, por lo que la presencia de sales de calcio, magnesio y aluminio alteran su absorción [1, 2, 21].

La oxitetraciclina, debido a su amplio espectro de actividad, se recomienda para el tratamiento inicial de enfermedades infecciosas de etiología indeterminada o de síntomas de infección múltiple [2].

### 3.2.2 DOSIS EN MEDICINA VETERINARIA

Sin duda lo más importante en avicultura es mantener a las aves en el mejor estado de salud y goce de sus facultades orgánicas. Este equilibrio redundará en mayor producción de huevos, mejor carne y mayor rendimiento en general. Para lograrlo, se deben seguir reglas de higiene necesarias para prevención y defensa de la salud de los animales sanos, aislamiento y atención de los enfermos en tiempo oportuno. Para esto, se deben conocer las causas de las enfermedades o agentes que las producen, sus síntomas, propagación, evolución, los medios de preveer o disminuir los estragos que causan, y los medios para restablecer la salud de las aves que la perdieron [22].

Las tetraciclinas son usadas por sus propiedades como antibióticos que actúan contra la mayoría de bacterias que atacan a las aves, y tienen la ventaja que pueden ser administradas por vía parenteral o diluídas en el agua de bebida y en el alimento [23]. Para indicaciones específicas y dosis ver Anexo 13.4. Al ser absorbidas en el tracto gastrointestinal producen concentraciones antimicrobianas en el torrente sanguíneo y en los demás tejidos del organismo del animal [3].

Para evitar residuos indeseables en productos cárnicos para consumo humano, los alimentos obtenidos de aves tratadas con antibióticos, podrán empezar a consumirse 48 horas después que al ave fue sacrificada.

Se deben usar bajos niveles de tetraciclina (2-10 g por tonelada) en raciones de los animales, particularmente en los que presentan un crecimiento rápido, para lograr una significativa promoción del crecimiento y conversión de los alimentos [24].

Estudios experimentales han mostrado que niveles bajos de penicilinas (de 4 a 10 g por tonelada de alimento) son más efectivos cuando se administran a pollos y aves durante el primer mes de vida. La administración de clortetraciclina ha dado resultados similares [3].

Respecto a la alimentación de aves con alimentos que contienen antibióticos, Couch afirma que “se acepta generalmente que los antibióticos, bajo ciertas condiciones, no incrementan el crecimiento ni tampoco mejoran la conversión de los alimentos de pavos o de pollos cuando se añaden a la fórmula. Es posible que el ambiente en las fincas se esterilice, en cierta forma, con el uso contínuo de antibióticos en el alimento. Esto no implica que los antibióticos deban ser eliminados de los alimentos. Actualmente se incluyen en los alimentos con el propósito de prevenir infecciones subclínicas o cierto nivel de enfermedad y debe continuarse su uso si se desea mantener el rango de crecimiento del momento y la conversión favorable de los alimentos.” [3].

### **3.2.3 OTROS USOS DE LAS TETRACICLINAS EN LAS GRANJAS AVICOLAS**

Cuando los pollos están en edad de ser consumidos, se sacrifican, se introducen en tanques con agua cercana al punto de congelación, se despluman y se les extraen las vísceras, o se sigue el procedimiento determinado por la granja avícola. Si al agua donde se congelan se le agregan 10 ppm de clortetraciclina o terramicina, el tiempo en que los pollos sacrificados pueden ser almacenados se duplica. Este proceso también puede seguirse con el pollo que ha sido desmenuzado. Al tratar los cadáveres de pollos con antibióticos, deben hacerse exámenes periódicos para investigar la presencia de mohos y levaduras, pues el proceso favorece su crecimiento. Se recomienda que el uso de antibióticos se combine con refrigeración [25].

Otro método aconsejable para extender la vida comestible de aves sacrificadas es alimentarlas con cantidades extremadamente altas de antibióticos por un período limitado y breve previo a la matanza. Los antibióticos permanecerán en el cadáver e inhibirán continuamente el crecimiento de microorganismos. Los residuos de oxitetraciclina y de clortetraciclina serán destruidos por los métodos normales de cocción [26] y se encontrarán en concentraciones menores a 4 ppm.

Hay otro método en el cual la clortetraciclina es muy útil cuando las aves han sido evisceradas. El ave se remoja en una solución que contiene 10 ppm, y al almacenarse entre 1.11-2.78°C, la vida de anaquel se extiende de 7-14 hasta 10-21 días. En la carne de pollo el antibiótico permanece en forma residual en 2 ppm, lo restante se reduce durante la cocción [27].

En Estados Unidos durante muchos años el tratamiento de carnes frescas de aves con antibióticos fue permitido bajo ciertas regulaciones de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés), restringiendo que los residuos en o sobre las aves sacrificadas no excediera de 7 ppm, tanto para oxitetraciclina como para clortetraciclina [28]. A mediados de la década de 1980 este permiso fue revocado, y a la fecha se ha establecido que los residuos deben estar en concentraciones menores, y lo ideal es la no presencia de dichos residuos [26, 29].

### **3.2.4 NIVELES DE TETRACICLINAS PERMITIDOS EN ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO**

El gobierno de Estados Unidos, a través de la FDA regula la tolerancia para residuos de tetraciclinas en aves destinadas a consumo humano, y establece un rango de 0.25 ppm en músculo, hígado, riñones, grasa, y piel de las aves, y 0 para huevos [29]. En Canadá, se aceptan 5 ppm en peces y en productos del mar [27].

En Guatemala, las normas COGUANOR no tienen un límite establecido para la presencia de residuos de tetraciclinas en carnes de animales o en productos cárnicos. La Oficina de Control de Alimentos de la Dirección Técnica de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación tiene como referencia los datos de Estados Unidos para regular las cantidades de antibióticos que pueden ser administrados a las aves de corral, dejando a criterio del Médico Veterinario encargado, la cantidad de antibiótico que se administrará a las aves, dependiendo de la morbilidad que enfrente.

### **3.5 VALIDACION DEL METODO**

La validación es un proceso por el cual estudios de laboratorio establecen que las características de ejecución del método, expresadas en términos de parámetros analíticos, cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas propuestas. Entre estos parámetros están la *Linealidad y Rango*, el *Límite de Detección*, la *Exactitud*, el *Límite de Cuantificación*, la *Precisión* y la *Especificidad* [30].

#### **3.5.1 LINEARIDAD Y RANGO**

**3.5.1.1 Definición:** La linealidad de un método analítico es la habilidad de producir resultados de pruebas que son directamente, o que son proporcionales a la concentración de analito en muestras dentro de un rango dado. Por lo general se expresa en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la línea de regresión, calculada de acuerdo a una relación matemática establecida de los resultados de las pruebas obtenidos del análisis de las muestras con concentraciones variables de analito.

**3.5.1.2 Definición:** El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles más altos y más bajos del analito (incluyendo esos niveles) que ha sido demostrado que pueden ser

determinados con precisión, exactitud y linealidad, usando el método según fue escrito. El rango se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de prueba (porcentaje, partes por millón) obtenidos por el método analítico.

**3.5.1.3 Determinación:** La linealidad de un método analítico se determina por el tratamiento matemático de los resultados de las pruebas obtenidos por el análisis de muestras con concentraciones del analito que cruzan el rango atribuido al método. Es el cálculo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados de los resultados de las pruebas versus las concentraciones del analito. La pendiente de la línea de regresión y su varianza proveen una medida matemática de linealidad.

El rango del método se valida verificando que el método analítico de una precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen analito a los extremos del rango, así como dentro del rango.

### **3.5.2 LIMITE DE DETECCION**

**3.5.2.1 Definición:** El límite de detección es un parámetro del límite de los ensayos. Es la menor concentración del analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo ciertas condiciones experimentales dadas. Usualmente se expresa como la concentración del analito (en partes por millón, porcentaje) en la muestra.

**3.5.2.2 Determinación:** La determinación del límite de detección de un método analítico varía dependiendo si es un procedimiento instrumental o no instrumental. Algunos investigadores determinan la razón de señal-de-ruido comparando los resultados de las pruebas de las muestras con concentraciones conocidas del analito con las muestras blanco y establecen un nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado. Se acepta una razón de señal-de-ruido de 2:1 ó 3:1.

En métodos no instrumentales, este límite por lo general se determina analizando las muestras con concentraciones conocidas de analito, y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado.

### **3.5.3 EXACTITUD**

**3.5.3.1 Definición:** La exactitud de un método analítico es la proximidad de los resultados obtenidos por el método a los valores reales. La exactitud casi siempre es expresada como el Porcentaje de Recuperación obtenido del ensayo cantidades conocidas de analito que fueron añadidas. La exactitud es una medida de la certeza del método analítico.

3.5.3.2 *Determinación:* La exactitud de un método analítico puede ser determinada al aplicar ese método a muestras o mezclas de excipientes a las que han sido añadidas cantidades conocidas de analito, tanto arriba como abajo de los niveles normales esperados en las muestras. La exactitud se calcula de los resultados de las pruebas como el porcentaje de analito recuperado del ensayo.

### **3.5.4 LIMITE DE CUANTIFICACION**

3.5.4.1 *Definición:* Es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones experimentales dadas. El límite de cuantificación se expresa como la concentración de analito (porcentaje, partes por millón) en la muestra.

3.5.4.2 *Determinación:* La determinación varía dependiendo si el método es instrumental o no instrumental. Para procedimientos instrumentales se mide la magnitud de la respuesta analítica del último término, analizando un número de muestras blanco y calculando la desviación estándar de esta respuesta. La desviación estándar multiplicada por un factor, usualmente 10, da un estimado del límite de cuantificación. Este límite subsecuentemente se valida por medio del análisis de un determinado número de muestras conocidas cercanas o preparadas en el límite de cuantificación.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina generalmente por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo un nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado con precisión y exactitud aceptables.



#### 4. JUSTIFICACION

Las tetraciclinas se almacenan en forma residual en diferentes órganos y tejidos de las aves, por lo que el humano al consumir carne proveniente de animales que fueron tratados o que fue previamente preservada con ese antibiótico, ingiere los residuos allí presentes. Entonces, cuando el antibiótico se administra a un paciente, el uso terapéutico se ve comprometido ya que éste lo pudo ingerir en forma continuada como residuo en los alimentos, exponiéndose al desarrollo de resistencia bacteriana generada dentro de su propio organismo, o a la ingestión de cepas de bacterias resistentes al antibiótico desarrolladas dentro del organismo del ave.

En Guatemala el consumo de carne de pollo es amplio, y el uso de tetraciclinas y otros antibióticos en las granjas productoras de pollo se considera de gran valor por su papel como antimicrobianos y útiles para el crecimiento. Sin embargo, debido a que no existen regulaciones para el uso de antibióticos en las granjas avícolas, los productores y propietarios no llevan un control diario de las concentraciones que administran en los piensos y en el agua, ni de los residuos presentes en los productos cárnicos que llevan al mercado.

La “Ley de Fomento Avícola” indica que los fabricantes o distribuidores de concentrados y forrajes avícolas, medicamentos y vacunas, son los responsables de vigilar la calidad de los medicamentos y alimentos destinados para aves de corral [8, 9] y COGUANOR norma el uso de antibióticos en los alimentos para aves a los autorizados por la Dirección Técnica de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [10]. Aunque existen estas regulaciones para el uso de antibióticos en animales criados para la obtención de productos cárnicos, ninguna organización relacionada a estas actividades tiene técnicas establecidas para un control sistemático de las carnes o los productos cárnicos que consume la población.

Por lo anterior expuesto, surgió la inquietud de realizar la presente investigación, con el afán de aportar datos objetivos y concretos respecto a los niveles de residuos de Oxitetraciclina y Tetraciclina-HCl en la carne de pollo que se expende en la Ciudad de Guatemala y verificar si los mismos están dentro de los límites establecidos como niveles máximos de residuos, o residuos aceptables para consumo humano ( $\leq 0.25$  ppm) [16, 29].

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVOS GENERALES**

- 5.1.1** Determinar por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la presencia de residuos de tetraciclinas en la carne de pollo producida por una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 5.2.1** Estandarizar el método para el análisis de residuos de tetraciclinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- 5.2.2** Cuantificar la cantidad de tetraciclina residual presente en la carne de pollo producida por una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala.

## **6. HIPOTESIS**

La carne de pollo que se produce en una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala, contiene residuos de tetraciclinas en cantidades iguales o inferiores a los niveles máximos de residuos considerados seguros para el consumo humano ( $\leq$  a 0.25 ppm).

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 UNIVERSO (POBLACION)**

Residuos de tetraciclinas presentes en la carne de pollo producida por una granja avícola guatemalteca.

### **7.2 MUESTRA**

Treinta (30) pechugas de pollo procedentes de una de las más grandes Granjas Avícolas nacionales, que surte de productos cárnicos para consumo humano a distintos expendios de la Ciudad de Guatemala.

### **7.3 RECURSOS HUMANOS**

- Autora        Br. Bessie A. Orozco R.
- Asesor        Rubén Velásquez, PhD., B.

### **7.4 RECURSOS MATERIALES**

#### **7.4.1 RECURSOS FISICOS**

Laboratorio de Bioquímica, Escuela de Química Biológica.  
Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

#### **7.4.2 MATERIAL Y EQUIPO**

- Columnas cromatográficas de acero inoxidable LiChrospher 100 RP-18
- Inyector manual Mod. LC-Organizer 9125 Merck-Hitachi
- Detector UV/VIS L-4200, Merck-Hitachi, modelo F-1050
- Bomba de inyección HPLC para gradientes, Merck-Hitachi, Modelo L-6200
- Integrador cromatográfico, Merck-Hitachi, modelo D-2500
- Horno
- Cuchillos
- Homogenizador
- Centrífuga
- Filtro de membrana (0.2 µm)

### 7.4.3 REACTIVOS

- Acetona (*Merck*)
- Acetonitrilo (*Merck*)
- Acido  $\beta$ -Mercaptopropiónico (*Merck*)
- Acido Clorhídrico (HCl) (*Merck*) 1N
- Acido Fosfórico (*Merck*) 0.02 M
- Acido Perclórico (HClO<sub>4</sub>) (*Merck*) 0.1 M
- Amberlita XAD-2 (*Sigma Co.*)
- Celite 545
- Metanol (*Merck*)

Patrones de:

- Oxitetraciclina (*Marsing & Co. Ltd. A/S*)
- Tetraciclina-HCl (*Marsing & Co. Ltd. A/S*)

### 7.4.4 CRISTALERIA

- Beakers de 300 y 500 mL
- Erlenmeyer de 200 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos para centrifuga
- Agitadores de vidrio
- Embudo de vidrio
- Columnas de Vidrio de:
  - 20 mm id x 20 cm, y
  - 15 mm id x 15 cm
- Unidad Filtradora
- Unidad Desgasificadora

## **7.5 METODOLOGIA**

### **7.5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente estudio es un PLAN PILOTO en el que NO se hizo comparación de poblaciones, sino es un *estudio descriptivo* a través del cual se pretendió generar una hipótesis y estandarizar un método para el análisis de residuos de tetraciclinas en carnes de pollo. Es por ello que se trabajó con una  $n = 30$ .

En el análisis de resultados, para cuantificar los compuestos encontrados, se usaron ecuaciones de regresión lineal mediante el programa *Quattro-Pro* versión 5.0, en un procesador 386/SX. Además, para la validación del Método se analizaron los parámetros de *Linearidad, Límite de Detección, Exactitud o Porcentaje de Recuperación y Límite de Cuantificación* [30].

### **7.5.2 SELECCION DE LA MUESTRA**

Se colectaron treinta pechugas de pollo en un día determinado por la mañana, todas de un mismo lote, procedentes de animales sacrificados en una de las granjas avícolas más grandes del país que distribuye y comercializa ese producto en la Ciudad de Guatemala.

Las pechugas se adquirieron Departamento de Ventas de dicha granja. Se transportaron en hielo al lugar de almacenamiento. Cada una se cortó en 3 partes iguales que separadamente se envolvieron en papel aluminio, se colocaron en una bolsa plástica y se numeraron correlativamente, colocándoles el número en papel de envolver (papel periódico), adjuntándoles la correspondiente ficha de clasificación. Inmediatamente fueron almacenadas a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Del lugar de almacenamiento fueron trasladadas congeladas al Laboratorio donde serían procesadas.

### **7.5.3 TECNICAS DE OBSERVACION**

Se usó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC); con la que se obtuvo como resultado el tipo y la cantidad de los residuos de tetraciclinas presentes en las muestras analizadas. El método usado se describe a continuación.

## 7.6 PROCEDIMIENTO

Método de HPLC para la identificación y cuantificación de residuos de Tetraciclinas en alimentos [15, 17]:

### 7.6.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO AL ANALISIS EN HPLC

A 50 g de muestra cortada finamente y colocada en un beaker de 500 mL, se le agregó 100 mL de HCl 1 N y se homogenizó por 5 min. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. y se filtró el sobrenadante a través de una columna de vidrio (de 15 mm id x 15 cm) previamente empacada con 5 g de Celite 545. Se repitió la extracción del residuo con 50 mL de HCl 1N, y los filtrados de ambas extracciones se agregaron a una columna de vidrio (de 20 mm id x 25 cm) empacada, hasta un volumen de 10 cc, con Amberlita XAD-2 previamente activada. Esta se lavó con 200 mL de agua y se descartaron los lavados, luego se eluyó la columna con 50 mL de Metanol.

*La activación de la Amberlita XAD-2, un adsorbente polimérico no iónico, se hace de la siguiente manera: En un beaker de 300 cc medir aproximadamente 100 cc de Amberlita XAD-2, agregarle acetona hasta la medida de 200 cc, mezclar con un agitador de vidrio y dejar reposar por varios minutos; decantar la acetona. Cuando la Amberlita XAD-2 está casi seca, agregarle metanol hasta la medida de 200 cc, mezclar con un agitador de vidrio y dejar reposar; decantar el metanol. Cuando la Amberlita XAD-2 está casi seca, agregarle agua destilada hasta la medida de 200 cc, mezclar, dejar reposar, y decantar. La Amberlita XAD-2 ya activada debe mantenerse húmeda, en metanol.*

Se colectaron los 50 mL del eluido metanólico en un erlenmeyer de 100 mL, y se les agregó 1 mL de solución metanólica al 5% de ácido  $\beta$ -mercapto-propiónico, la que constituyó la **solución de prueba**. Finalmente esta solución se filtró a través de un filtro de membrana (0.2  $\mu$ m). Las soluciones de prueba se analizaron cromatográficamente inmediatamente después de preparadas y fueron protegidas de la luz solar directa y de la luz artificial durante todo el análisis.

## 7.6.2 ANALISIS CROMATOGRAFICO

### 7.6.2.1 SOLUCIONES PATRON

Se constituyeron **soluciones madre** de Oxitetraciclina (OTC) y de Tetraciclina-HCl (TC-HCl) en Metanol (ca. 1 mg/mL), se guardaron en balones aforados de 25 mL y se almacenaron a  $-25^{\circ}\text{C}$ , ya que a esa temperatura son estables por un mes. A partir de ellas se prepararon **soluciones stock** diluídas en metanol (100  $\mu\text{g/mL}$ ), inmediatamente antes de su uso. Las **soluciones patrón**, con concentraciones entre 0.064 y 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , se prepararon diluyendo las soluciones stock con la cantidad apropiada de Acido Perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0.1M, y se utilizaron en fresco. Las soluciones madre, stock y patrón fueron protegidas de la luz solar directa y de la luz artificial durante todo el análisis.

### 7.6.2.2 MUESTRAS DE CARNE DE POLLO ENRIQUECIDAS CON CONCENTRACIONES CONOCIDAS DE OTC Y TC-HCl

Para poder validar el método se necesitaba contar con muestras de pollo de corral o pollos criollos que durante su crecimiento no hubieran sido alimentados con antibióticos. A éstas se le agregaron cantidades conocidas de OTC y de TC-HCl. Estas constituyeron las muestras de carne de pollo con concentraciones conocidas de analito.

A partir de dos libras de pechuga de pollo de corral, se pesaron en duplicado, siete muestras de 50 g cada una. Con una jeringa de 10 ó 25  $\mu\text{L}$  se agregó directamente el volumen exacto de solución patrón de 1 ppm de OTC y de TC-HCl a cada una de las muestras, para que mostraran concentraciones de 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ó de 1.0 ppm de cada uno de los analitos. Las muestras enriquecidas fueron procesadas según el método descrito en el inciso 7.6.1.3 y analizadas cromatográficamente.

### 7.6.2.3 ANALISIS CROMATOGRAFICO

Las soluciones de prueba, protegidas de la luz solar y artificial, se analizaron cromatográficamente inmediatamente después de procesadas. El análisis cromatográfico se realizó según las condiciones detalladas en el *Cuadro No. 1*.

Estas condiciones fueron validadas inyectando en el HPLC, en forma separada o mezclada, soluciones patrón de OTC y de TC-HCl a distintas concentraciones, e inyectando los extractos obtenidos de muestras enriquecidas con ambos antibióticos.



### **7.6.3 VALIDACION DEL METODO**

La validación es un proceso por el cual estudios de laboratorio establecen que las características de ejecución del método, expresadas en términos de parámetros analíticos, cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas propuestas. Entre estos parámetros están la *Linealidad y Rango*, el *Límite de Detección*, la *Exactitud o Porcentaje de Recuperación*, el *Límite de Cuantificación*, la *Precisión* y la *Especificidad*.

#### **7.6.3.1 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS**

Anterior a la validación se optimizaron las condiciones cromatográficas indicadas en el *Cuadro No. 1* inyectando en el HPLC, en forma separada o en mezcla, soluciones patrón de OTC y de TC-HCl en concentraciones de 0 a 1.6 ppm. Posteriormente se inyectaron los extractos obtenidos de siete muestras enriquecidas con ambos antibióticos, cada uno en concentraciones finales entre 0.02 y 1.0 ppm. En todos los casos se hicieron más de tres inyecciones para cada muestra, pues se buscaban las condiciones de análisis cromatográfico para una buena separación de la OTC y la TC-HCl.

Para la validación del Método de HPLC para la identificación y cuantificación de residuos de Tetraciclinas en alimentos, se realizaron los análisis y se determinaron los parámetros que se exponen a continuación:

#### **7.6.3.2 LINEARIDAD**

Para determinar la linealidad del método conjunto (extracción + análisis cromatográfico) se prepararon, en duplicado, siete muestras de carne de pollo de corral enriquecidas con OTC y TC-HCl, cada una en concentraciones finales entre 0.02 a 1.0 ppm.

Estas muestras fueron procesadas y posteriormente analizadas cromatográficamente con los procedimientos ya descritos. Con los resultados obtenidos se trazó una gráfica con los valores de concentración de OTC o de TC-HCl en el eje de las *x*, y los valores de absorción de luz UV expresada como áreas debajo del pico en el eje de las *y*. Se calcularon las constantes de la recta resultante y el coeficiente de correlación (*r*) mediante el programa Quattro-Pro versión 5.0, con un procesador 386/SX.

### **7.6.3.3 EXACTITUD O PORCENTAJE DE RECUPERACION**

Para determinar la exactitud o porcentaje de recuperación del método conjunto se utilizaron las siete muestras de carne de pollo de corral enriquecidas con OTC y TC-HCl, cada una en concentraciones finales entre 0.02 a 1.0 ppm.

Estas muestras fueron procesadas y posteriormente analizadas cromatográficamente con los procedimientos ya descritos. Con los resultados obtenidos se trazó una gráfica con los valores de concentración conocida de OTC o de TC-HCl en el eje de las  $x$ , y en el eje de las  $y$  la concentración detectada de cada uno de los analitos. El valor de  $B$  (pendiente) multiplicado por 100 es el porcentaje de recuperación

### **7.6.3.4 LIMITE DE DETECCION**

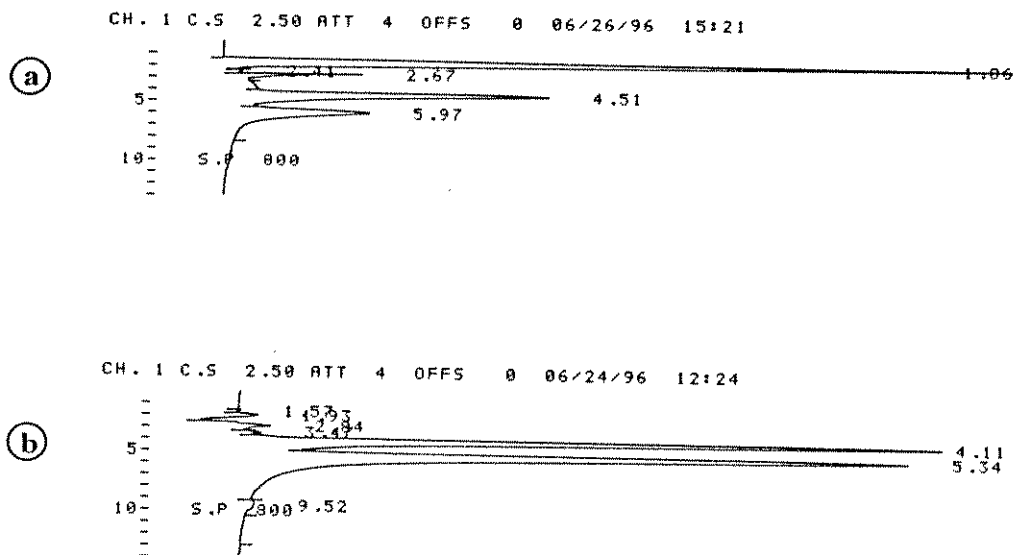
Utilizando las constantes de la recta del Inciso 7.6.3.3 *EXACTITUD*, se calculó la concentración teórica que tendría un cromatograma cuya señal de absorción de luz UV (expresada como altura) sea igual a tres veces mayor que la señal del ruido (razón señal-ruido = 3:1). Esta concentración constituyó el límite de detección para la OTC y la TC-HCl, tanto en las soluciones patrón como en los eluidos obtenidos de las muestras de pollo de corral enriquecidas con los dos analitos.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 VALIDACION DEL METODO

#### 8.1.1 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

El análisis de muestras patrón de OTC y de TC-HCl generó cromatogramas como los que se observan en la *Figura No. 1*. Con estas condiciones se logró la separación de ambos analitos, los que muestran tiempos de retención iguales a  $4.10 \pm 0.025$  y a  $5.23 \pm 0.045$  ( $n = 10$ ) para OTC y TC-HCl respectivamente. Análisis de muestras de carne de pollo enriquecidas con los analitos mostró cromatogramas similares, con tiempos de retención comparables ( $4.52 \pm 0.057$  para OTC y  $5.69 \pm 0.073$  para TC-HCl,  $n = 12$ ).



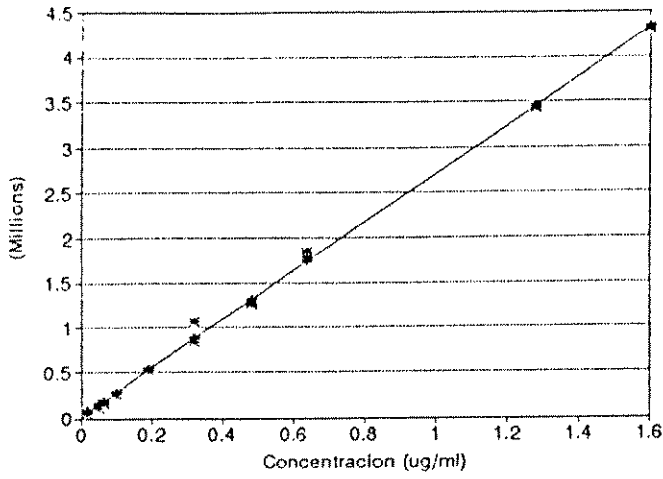
**Figura 1.** Cromatogramas del análisis por HPLC de (a) muestras patrón de OTC y TC-HCl en concentraciones de 1 ppm cada una y (b) muestras de carne de pollo enriquecidas con 0.2 ppm de OTC y 0.2 ppm de TC-HCl, posterior a su procesamiento. Condiciones cromatográficas descritas en el Cuadro No. 1.

### 8.1.2 LINEARIDAD

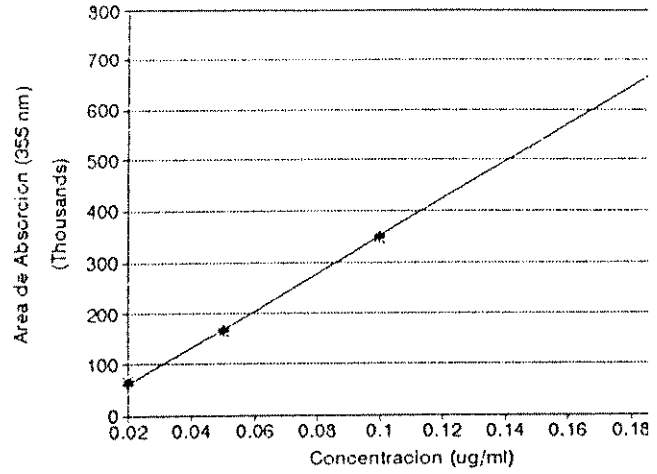
Los resultados del análisis de las soluciones patrón de OTC y de TC-HCl (0.2 a 1.6 ppm cada una), así como el de soluciones de prueba obtenidas del procesamiento de muestras de pollo enriquecidas con OTC y TC-HCl (0.02 a 1.0 ppm) mostraron gráficas que generan líneas rectas ( $r \geq 0.982$ ) al graficar la concentración en el eje de las  $x$  versus los valores de absorción de luz ultravioleta (expresados como áreas debajo del pico) en el eje de las  $y$ , como puede observarse en la *Tabla I* y en la *Figura No. 2*.

**TABLA I  
LINEARIDAD DEL METODO DE ANALISIS POR HPLC  
Y DEL METODO CONJUNTO (EXTRACCION + ANALISIS HPLC)**

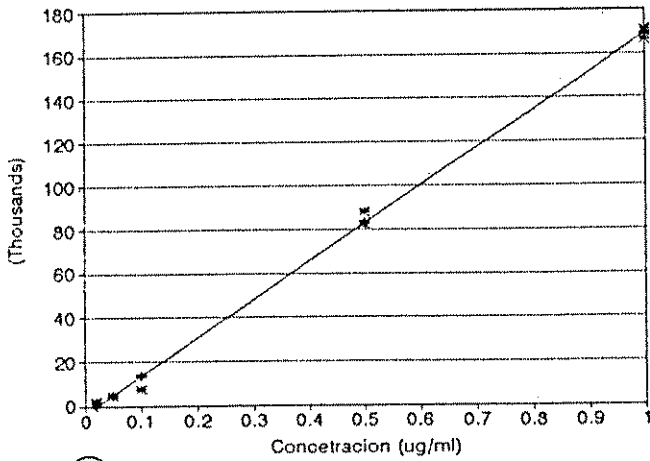
MUESTRA / PARAMETRO	OTC	TC-HCl
<i>Solución Patrón:</i>		
Ecuación de la Recta	$y = 2687177.6x - 20114.4$	$y = 3646377.5x - 13281.9$
Coefficiente de Correlación	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 0.999$
<i>Extracto a partir de Muestras Enriquecidas:</i>		
Ecuación de la Recta	$y = 172873.1x - 3758.1$	$y = 2494.4x - 129.8$
Coefficiente de Correlación	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 0.982$



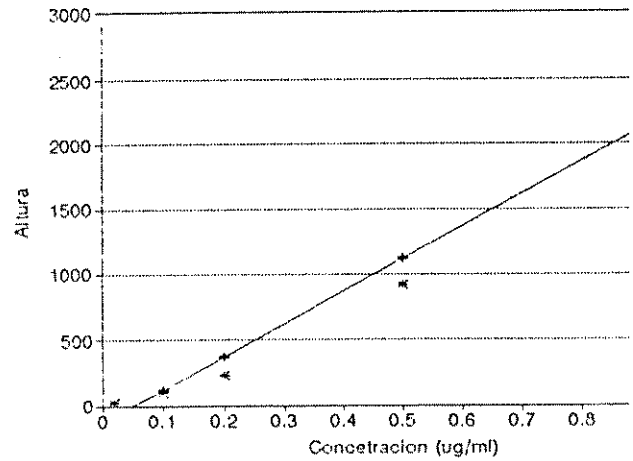
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 2.** CURVAS DE CALIBRACION para residuos de Tetracilinas a partir de Soluciones Patrón de: (a) OTC (rango 0.02 a 1.6 ppm,  $r = 0.998$ ); (b) TC-HCl (rango 0.02 a 0.2 ppm,  $r = 0.998$ ); Soluciones de Prueba obtenidas por el procesamiento de muestras de pollo enriquecidas con residuos de (c) OTC (rango 0.02 a 1.0 ppm,  $r = 0.998$ ) y (d) TC-HCl (rango 0.02 a 1.0 ppm,  $r = 0.98$ ).

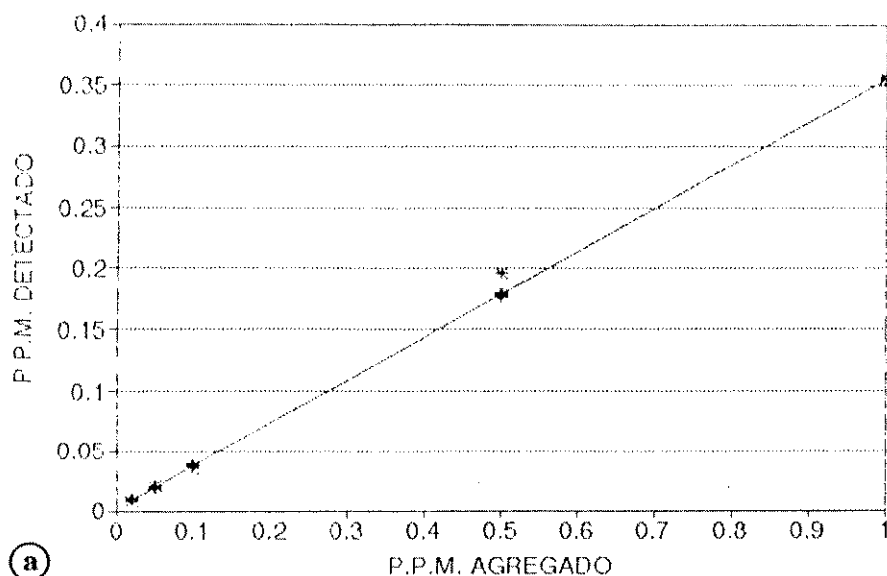
### 8.1.3 EXACTITUD O PORCENTAJE DE RECUPERACION

Como puede observarse en la *Tabla II*, el porcentaje de recuperación de OTC y de TC-HCl, extraída de carne de pollo, es bajo ( $37.2 \pm 2.6$  y  $32.2 \pm 0.7$  por ciento,  $\pm 0.63$ , respectivamente).

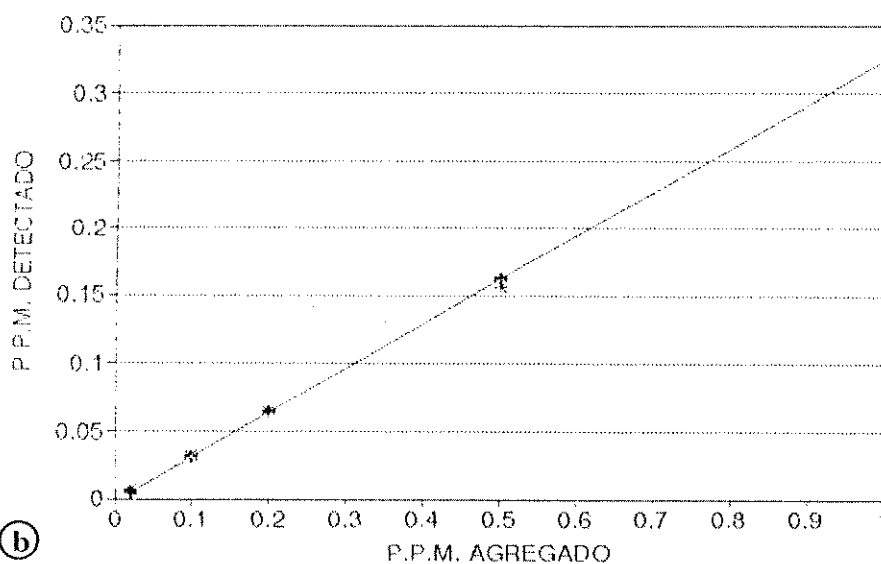
**TABLA II**  
**PORCENTAJE DE RECUPERACION DE OTC Y TC-HCl**  
**EN LA EXTRACCION DE MUESTRAS DE POLLO**  
**ENRIQUECIDAS CON LOS ANALITOS**

<i>Cantidad Agregada (en ppm)</i>	<b>RECUPERACION DE</b>			
	<b>OTC</b>		<b>TC-HCl</b>	
	<i>Cantidad Detectada (en ppm)</i>	<i>% Recuperación</i>	<i>Cantidad Detectada (en ppm)</i>	<i>% Recuperación</i>
0.02	0.0075	37.5	0.0065	32.5
0.02	0.0071	35.5	--	--
0.05	0.021	42.0	--	--
0.10	0.035	35.0	0.0320	32.1
0.20	--	--	0.0642	32.1
0.50	0.196	39.2	0.1545	30.9
0.50	0.176	35.2	--	--
1.00	0.357	35.7	0.3256	32.6
1.00	--	--	0.3296	32.9

SMN: 0.63



(a)



(b)

**Figura 3.** PORCENTAJE DE RECUPERACION del método de análisis por HPLC (extracción + análisis cromatográfico), determinado mediante el análisis de muestras de pollo enriquecidas con: (a) OTC (rango de 0.02 a 1.0 ppm,  $b = 0.3546$ ,  $r = 0.999$ ) y, (b) TC-HCl (rango de 0.02 a 1.0 ppm,  $b = 0.3279$ ,  $r = 0.999$ ).

### 8.1.4 LÍMITES DE DETECCIÓN Y LÍMITES DE CUANTIFICACION

La menor cantidad de ambos analitos agregada a las muestras de pollo libres de antibiótico fue de 0.02 y 0.05 ppm. Las concentraciones de 0.02 ppm fueron detectables pero no cuantificables con exactitud, debido a que por el tamaño y la forma del pico se presentaron problemas de integración, lo que no permitió conocer con exactitud el área de los picos generados por esas cantidades.

Los límites de detección, calculados para una razón señal-ruido de 3:1, son de 0.0075 ppm para OTC y de 0.0037 ppm para TC-HCl para el análisis a partir de soluciones patrón, y de 0.022 ppm para OTC y 0.076 ppm para TC-HCl para el análisis de los extractos obtenidos de las muestras de pollo enriquecidas. Lo anterior puede observarse con mayor detalle en la *Tabla III*.

**TABLA III  
CALCULO DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN PARA OTC Y TC-HCl  
(razón señal-ruido de 3:1)**

MUESTRA / PARAMETRO	OTC	TC-HCl
<i>Soluciones Patrón:</i>		
Ecuación de la Línea Recta	$y = 2687177.6x - 20114.4$	$y = 3646377.5x - 13281.9$
Donde	$x = 60 + 20114.4 / 2687177.6$	$x = 60 + 13281.9 / 3646377.5$
Límite de Detección	= 0.0075 ppm	= 0.0037 ppm
<i>Extracto a partir de muestras enriquecidas:</i>		
Ecuación de la Recta	$y = 172873.1x - 3758.1$	$y = 2494x - 129.8$
Donde	$x = 60 + 3758.1 / 172873$	$x = 60 + 129.8 / 2494$
Límite de Detección	= 0.022 ppm	= 0.076 ppm



## 8.2 ANALISIS DE LAS MUESTRAS DESCONOCIDAS

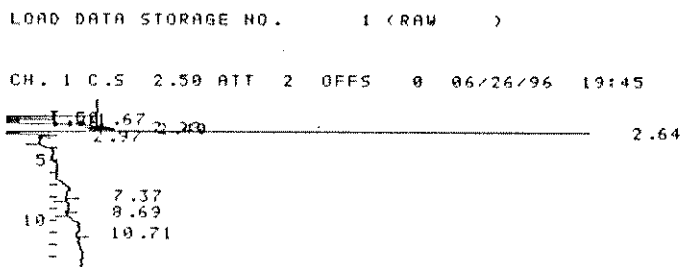
El análisis de las muestras de pechuga de pollo reveló que tres de éstas contenían residuos de tetraciclinas, como puede observarse en la *Tabla IV*, y en la *Figura No. 4*.

**TABLA IV**  
**CONCENTRACIONES DE OTC Y TC-HCl ENCONTRADAS**  
**EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS**

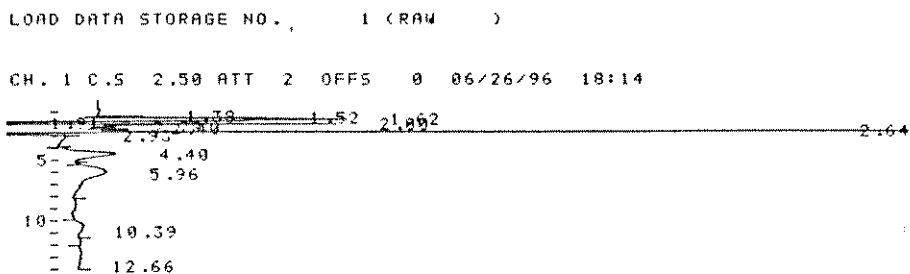
# MUESTRA	OTC (ppm)	TC-HCl (ppm)
02	0.492	n.d.
05	0.568	n.d.
18	0.067	3.7

n.d. = no detectado

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD DE ALIMENTOS



(a)



(b)

**Figura 4.** Cromatograma del análisis por HPLC de (a) *Muestra desconocida No. 11*, que no muestra picos para OTC ni para TC-HCl. Los picos con RT menores o iguales a 2.97 y mayores o iguales a 7.37 son propios de la muestra; (b) *Muestra desconocida No. 18*, que muestra picos en RTs de 4.40 y 5.96 los cuales corresponden a OTC y TC-HCl respectivamente. Los picos propios de la muestra no interfirieron con ninguno de los dos antibióticos.

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

En la validación del Método de HPLC para la identificación y cuantificación de residuos de tetraciclinas en alimentos se partió de dos métodos distintos descritos previamente. Estos métodos son “*Determinación de Residuos de Tetraciclinas en Carne y en Pescado por Cromatografía Líquida*” por Y. Onji y col. (J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1984;67[6]:1135-1136) y, “*Análisis de Trazas de Oxitetraclina y Tetraciclina en Leche por Cromatografía Líquida de Alta Resolución*” por D. Fletouris y col. (J. Agric. Food Chem. 1990; 38:1913-1917).

Para realizar el presente estudio se utilizó el procedimiento de extracción de las muestras como se describe en el método de *Onji* et al, mientras que la preparación de estándares y las condiciones cromatográficas se realizaron según lo describe el método de *Fletouris* et al.

El método de *extracción* sufrió las siguientes modificaciones:

Se pesaron 50 g de muestra (y no 20 g) pues con ello se logró mejorar la extracción de las tetraciclinas (TCs) y aumentar el tamaño de los picos en los cromatogramas. No se llevó a cabo la concentración a aproximadamente 0.5 mL bajo vacío de la solución de prueba porque, según las pruebas realizadas, los cromatogramas obtenidos posteriores a la concentración no mostraban la presencia de las TCs. La solución de prueba previa a ser inyectada en el HPLC, debe ser filtrada en un filtro de membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Aún después de realizado el procedimiento de extracción, los picos observados en el análisis con HPLC no sufrieron ninguna interferencia, lo que permite que la oxitetraclina (OTC) y la tetraciclina-hidrocloruro (TC-HCl) sean identificadas, separadas y cuantificadas adecuadamente.

El método de *análisis cromatográfico* no sufrió modificaciones substanciales, únicamente la siguiente:

La fase móvil fue constituida en un 93% por la mezcla acetonitrilo/ácido fosfórico (240/760 v/v) y en un 7% por agua.

El método obtenido de los dos ya descritos permitió determinar que la OTC y la TC-HCl pueden separarse e identificarse dentro de una mezcla puesto que tienen tiempos de retención (RT) distintos,  $4.52 \pm 0.057$  para OTC y  $5.69 \pm 0.073$  para TC-HCl ( $n = 12$ ). El tamaño de los picos es factible de ser maximizado al optimizar la extracción. En los cromatogramas también se observan picos inespecíficos propios del alimento analizado; los que no interfieren con los compuestos (OTC y TC-HCl) objeto de análisis e identificación, puesto que tienen RTs alejados a los de ambos compuestos.

La *Estadística Descriptiva* establece que un procedimiento debe ser (1) tan útil, claro, y entendible como sea posible; (2) una representación exacta de la realidad; y, (3) tan efectivo y económico como sea posible [51]. El presente plan piloto cumple con las tres características mencionadas; la tercera se cumple con el tamaño de la muestra ( $n=30$ ).

#### Validación del Método descrito:

Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) promedio para todas las lecturas, tanto de patrones como de muestras enriquecidas, fue de 0.994 lo que indica que el método es *Linear*. Usando una razón de 3:1 como señal-de-ruido, se encontró que los *Límites de Detección* para las muestras de pollo con concentraciones conocidas de analito eran de 0.022 ppm para OTC y 0.076 ppm para TC-HCl. Para los patrones de OTC y TC-HCl los límites eran de 0.0075 ppm y 0.0037 ppm respectivamente. El método validado es capaz de detectar residuos de tetraciclinas en concentraciones menores a los Niveles Máximos de Residuos que la FDA permite en la carne de pollo ( $\leq 0.25$  ppm). Para el Método microbiológico *CHARM TEST II* los límites de detección para las TCs reportados son de 250 ng/m; mientras que con *Cromatografía Líquida* los límites son de 20 ng para OTC y TC; y 60 ng para CTC. Estos límites son menores a las concentraciones detectadas en el presente Método [26, 15].

Al someter las muestras de pollo de corral enriquecidas con analito al proceso de extracción y análisis cromatográfico descritos, se determinó un *Porcentaje de Recuperación* del 35.46% para OTC y del 32.8% para TC-HCl. Aunque este porcentaje es relativamente bajo, su desviación también es pequeña (0.63) además, el método permite que se puedan detectar concentraciones muy por debajo de los Niveles Máximos de Residuos aceptables; además, la literatura reporta que algunos métodos microbiológicos presentan un porcentaje de recuperación entre el 48-67% [31].

En las muestras de pollo enriquecidas con concentraciones conocidas de analito se encontró que el *Límite de Cuantificación*, o el mínimo nivel al cual el analito era detectado, fue de 0.05 ppm, tanto para OTC como para TC-HCl, que es muy cercano al límite de detección. Ambas sustancias fueron detectables y cuantificables a esta concentración.

El método validado tiene un procedimiento simple, específico para tetraciclinas y capaz de distinguir cromatográficamente el tipo de TC presente. Tiene un límite de detección bajo, lo que lo hace útil para el análisis sistemático de TCs en alimentos, y es aplicable a otros alimentos de origen animal.

Tres de las treinta muestras analizadas presentaron residuos de TCs. Las cantidades detectadas (0.492, 0.568 y 3.697 ppm para OTC, y 0.0674 ppm para TC-HCl) son bajas --una persona ingiere 3.697 mg de OTC al comer 1 kg de pechuga de pollo--, por lo que el riesgo de una intoxicación es mínimo. La cantidad ingerida disminuye si se toma en cuenta que una pechuga pesa alrededor de 300 g y la cantidad de antibiótico presente disminuye por el proceso de cocción. El riesgo se hace patente cuando la ingesta diaria del antibiótico ha provocado la formación de cepas resistentes de ciertos microorganismos dentro del ave, que al ser ingeridas por el humano, ponen en peligro la salud de éste.

Las dosis recomendadas de TCs para adultos son de 500 mg 2 ó 4 veces al día, por lo que el paciente está ingiriendo de 1000 a 2000 mg de TC por día [30]. La cantidad de TC que un bebé lactante puede ingerir en un día es un mínimo del 0.5% y un máximo del 1.2% de la dosis diaria que ingirió la madre. Un bebé lactante ingiere durante el amamantamiento, un máximo del 1.6% de una dosis que tome la madre [34].

Los residuos mayores a los Niveles Máximos de Residuos de antibióticos y de otras drogas presentes en alimentos provenientes de animales, se concentran mayormente en riñones, hígado o grasa y en menor grado en el músculo. Al encontrar residuos en músculo, se puede inferir que se detectarán a mayores concentraciones en riñones, hígado o grasa.

Si las dosis terapéuticas útiles en veterinaria no se cumplen en los pollos, puede existir sub-dosificación, lo que conduce a la formación de cepas de microorganismos resistentes al antibiótico dentro del organismo del ave, y que al entrar a formar parte de la cadena alimenticia, llegan hasta el consumidor final, en este caso, al humano.

Los procesos de cocción aseguran la pérdida considerable de TCs por descomposición, pero también de una gran parte de los minerales y las vitaminas que contiene la carne de pollo. Concentraciones de TCs menores o iguales a 0.25 ppm, aseguran que los procesos de cocción van a dejar al alimento libre de residuos que impliquen riesgo a la salud humana, siempre que a cocción haga que la temperatura en la parte interna del pollo alcance aproximadamente los 165°F (unos 74°C) [33]. Los procesos de cocción y de exposición a la luz solar o al aire van a descomponer a las TCs; los compuestos formados (metabolitos) no representan ningún daño a la salud humana [22]. La OTC se descompone a temperaturas mayores a 180°C, la TC-HCl tiene una temperatura de fusión de 227°C con fuerte descomposición. Ambas disminuyen su potencia a  $\text{pH} \leq 2$ , y se obscurecen, por sufrir descomposición, al estar expuestas al aire, a la luz solar fuerte, o a temperaturas superiores a 90°C, en atmósfera húmeda [32].

Las dosis recomendadas para el control de sinovitis en aves indican 400 mg de TC por galón de agua de bebida disponible, durante un tiempo no mayor de 14 días. Si un pollo ingiere en un día 15 mL de agua, ingerirá aproximadamente 1.5 mg del antibiótico. Si se administra el antibiótico por un tiempo mayor al indicado, o no se suspende el tratamiento previo al sacrificio, el organismo del animal no puede depurar todo el antibiótico, lo que aumenta los residuos en la carne destinada al consumo humano.

La Norma COGUANOR NGO 34 170, que dice que en aves no se usarán los antibióticos que se emplean para uso terapéutico en humanos, no se cumple en Guatemala, ya que en el presente estudio se identificaron y cuantificaron residuos de OTC Y TC-HCl presentes en carne de pollo. Ambos antibióticos son usados para consumo humano.

El consumo indiscriminado de antibióticos en Guatemala debe considerarse seriamente. En el presente estudio se observa que el consumo indiscriminado se da no solo en humanos sino también en animales (pollos específicamente). Si el Químico Farmacéutico es el responsable de velar por el uso racional de medicamentos a nivel humano y el Médico Veterinario lo es a nivel animal, es necesario que su presencia se haga notoria. Deben velar por el uso racional de los medicamentos (entre ellos los antibióticos) y realizar evaluaciones periódicas para el control de la calidad del alimento destinado a consumo humano. Estos controles incidirán en una mejor calidad de vida de los humanos, y en un trato racional de los animales criados en las Granjas.

## 10. CONCLUSIONES

**10.1** La carne de pollo producida por una granja avícola que surte a expendios de la ciudad de Guatemala contiene residuos de tetraciclinas en cantidades superiores a los niveles máximos de residuos considerados seguros para consumo humano ( $\leq$  a 0.25 ppm). Tres de las treinta muestras analizadas presentaron residuos de Oxitetraciclina (0.492, 0.568 y 3.697 ppm respectivamente) mayores a dichos niveles. Una de las treinta muestras analizadas presentó residuos de Tetraciclina-HCl dentro de los límites considerados como seguros para consumo humano (0.0674 ppm).

**10.2** El Método estandarizado de HPLC para la identificación y cuantificación de residuos de Tetraciclinas en alimentos, cumple con los parámetros establecidos de *Linealidad*, *Límite de Detección*, *Porcentaje de Recuperación (Exactitud)* y *Límite de Cuantificación*.

**10.3** El uso indiscriminado de Tetraciclinas y de otros antibióticos es un problema real en Guatemala que afecta directamente al humano, ya sea que éste las consuma en forma directa o a través de la alimentación diaria.

**10.4** La Norma COGUANOR NGO 34 170, que indica que en aves no se deben usar antibióticos empleados para uso terapéutico en humanos no se cumple en Guatemala, ya que en presente estudio se identificaron y cuantificaron residuos de oxitetraciclina y tetraciclina-HCl presentes en carne de pollo. Ambos antibióticos son usados para consumo humano.

## 11. RECOMENDACIONES

**11.1** Investigar la posibilidad de aplicar el método validado en el presente estudio para la identificación y cuantificación de otros antibióticos u otras drogas que sean administradas a animales que son criados para el consumo humano.

**11.2** En posteriores estudios, identificar y cuantificar los residuos de tetraciclinas presentes en otros tejidos y órganos de las aves.

**11.3** Continuar estudios para mejorar la extracción de las tetraciclinas, optimizando con ello el *Porcentaje de Recuperación* y la *Detección* del método validado en este estudio.

**11.4** Es indispensable el funcionamiento de un ente gubernamental que verifique en forma sistemática que las aves destinadas como alimento para consumo humano, cumplan con los requisitos establecidos para ser consideradas seguras para su consumo.

**11.4** La Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, debe mediar para que se cumpla la Ley de Fomento Agrícola y las Normas COGUANOR en lo referente a la vigilancia de la calidad de los medicamentos y alimentos destinados para aves de corral, así como de la calidad de alimento destinado al consumo humano.

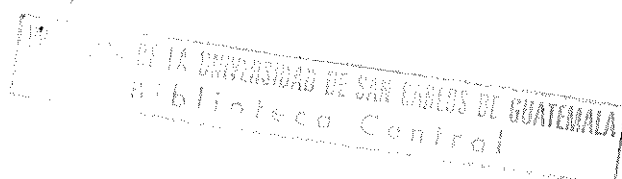
**11.5** La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia debe establecer y brindar a los guatemaltecos, Centros de Referencia que velen por el bienestar y la salud de la población.

**11.6** La Universidad de San Carlos de Guatemala debe crear organismos de control gubernamental que aseguren la calidad de los productos destinados a consumo humano, haciendo uso de los avances de la tecnología mundial y además, promover el uso de aparatos altamente sensibles, como el HPLC, en el campo de la investigación científica.



## 12. REFERENCIAS

- 12.1. Weastler de Ruiz, E. **Orientación a la Quimioterapéutica de Colicepticemia en Pollos**. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia) 1990. (p. 27-30)
- 12.2. Blood DC, et al. **Medicina Veterinaria**. 6a. ed. Colchero, F. trad. México: Interamericana, 1987. (p. 140-141).
- 12.3. Brackett S, Delappe I, and Maddock H. **Feeding Aureomycin to Poultry**. American Cynamid Company, U.S.A. Revised edition. (p. 14-29).
- 12.4. Trum Hunter B. **Low-level drug residues in food**. Consumer's Research Magazine. 1994; 77:4(8-9)
- 12.5. Haresing W, Cole DJA. **Recent Advances in Animal Nutrition**. London: Butterworth. University of Nottingham School of Agriculture, 1989. (p. 8-9)
- 12.6. Carnevale RA. **Illegal residues in meat and poultry**. Consumers' Research Magazine. 1992; 75:1(33-36)
- 12.7. Neu HC. **The Crisis in Antibiotic Resistance**. Science. 1992; 257:1064-1072.
- 12.8. Artículo No. 14 del Decreto No. 1331 del Congreso de la República de Guatemala. Publicado en el Diario Oficial el 28 de diciembre de 1959.
- 12.9. Búcaro, JM. **Documento de Recopilación de Leyes y Reglamentos de la Industria Cárnica de Guatemala**. Tomos I y II. Recopilado por PROMECA. Doc. Téc. Guatemala: 1994.
- 12.10. COGUANOR NGO 34 170. **Concentrados para Animales. Alimentos para Aves. Especificaciones**. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), Ministerio de Economía, Guatemala, C.A. 1988. 15p. (p. 1, 6).
- 12.11. Echeverría WJ. **Determinación de arsénico en carne de pollo, disponible en la Ciudad de Guatemala para consumo humano**. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacia) 1986. (p. 9-10)
- 12.12. Véliz YE. **Determinación de residuos de antibióticos, sulfamidas, hormonas y arsénico en carne bovina de exportación para consumo humano**. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia) 1987.
- 12.13. Cajas HR. **Determinación de residuos de antibióticos en carnes de pollo de consumo en la Ciudad de Guatemala**. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia) 1985.
- 12.14. Escalante BI. **Detección de Antibióticos en Leche Utilizando el Método de Difusión en Agar con Discos de Papel y Bacillus subtilis ATCC 6633**. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 51p. (p. 3 - 4, 17 - 19).



- 12.15. Onji Y., Uno M and Tanigawa K. **Liquid Chromatographic Determination of Tetracycline Residues in Meat and Fish.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984; 67[6]:1135-1136.
- 12.16. Cole DJA, Haresing W. **Recent Advances in Animal Nutrition.** London: Butterworth. University of Nottingham School of Agriculture, 1989. (p. 9)
- 12.17. Fletouris DJ, Psomas JE, Botsoglou NA. **Trace Analysis of Oxytetracycline and Tetracycline in Milk by High-Performance Liquid Chromatography.** J. Agric. Food Chem. 1990; 38:1913-1917.
- 12.18. Goodman JW, Tudor DC. **Industria Avícola - Explotación en Grande y Pequeña Escala.** 1a. ed. en español, Palazón R. trad. México: Herrero. 1965. (p. 463 - 465).
- 12.19. Goth A. **Farmacología Médica.** 8a. ed. St. Louis, EUA: Mosby, 1979. ix+742. (p. 589-591).
- 12.20. Goodman Gilman A. **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.** México: Panamericana, 1991.
- 12.21. Bevan JA. **Farmacología.** 2a. ed. México: Hispanoamericana. 1978. (p.455-461).
- 12.22. Bender AE, comp. **Dictionary of Nutrition and Food Technology.** 5th. ed. London: Butterworth. 1984. (p. 56, 259).
- 12.23. Escamilla Arce L. **Manual Práctico de Avicultura Moderna.** México: Continental. 1985. (167-168).
- 12.24. **That Way We May Eat.** U.S. Department of Agriculture. 1975 (p. 85-98).
- 12.25. **Antibiotics misuse could create a public health nightmare.** Newsletter ed. USA Today. 1994:123 (p. 16)
- 12.26. Vázquez-Moreno L, et al. **Antibiotic Residues and Drug Resistant Bacteria in Beef and Chicken Tissues.** J. of Food Science. 1990; 55 [3]: 632-634.
- 12.27. Furia TE ed. **Handbook of Food Additives.** 2nd. ed. U.S.A.: CRC, 1975. (p. 166-167)
- 12.28. Francke EL and Neu HC. **Chloramphenicol and Tetracyclines.** Medical Clinics of North America. 1987; 71[6]:11558-1168.
- 12.29. **Food and Drug Administration.** Residues in Meats. U.S.A.: April, 1994.
- 12.30. United States Pharmacopeia. XXII ed. The United States Pharmacopeia. 1990.
- 12.31. Ryan J and Dupont JA. **Chemical Analysis of Tetracycline Residues in Animal Tissues.** J. of the AOAC. 1974; 57 [4]: 828-831.
- 12.32. **Pruebas Básicas para Sustancias Farmacéuticas.** Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 1986.
- 12.33. **The 1989 Yearbook of Agriculture.** Food from Farm to Table. U.S. Department of Agriculture.

- 12.34. Bennett PN Editor. **Drugs And Human Lactation**. Elsevier, Amsterdam. 1988. (p. 204-205)
- 12.35. American Medical Association. **AMA Drug Evaluations**. 4th ed. USA. 1990. xix+1470. (p. 1265-1278)
- 12.36. Meyer Jones L. **Farmacología y Terapéutica Veterinarias**. México: Hispanoamericana. 1975 (p. 439-445)
- 12.37. Soto M. **Farmacología Aplicada a la Terapéutica**. Tomo II. 6a. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1954. (p. 768-771).
- 12.38. Mycek MJ and Gertner SB and Menna Perper M. **Pharmacology**. U.S.A.: J.B. Lippincott. Lippincott's Illustrated Reviews. 1992. (p. 459)
- 12.39. Sewester SC, publ. **Drugs. Facts and Comparisons**. 1990 ed. U.S.A.: Facts and Comparisons Division, J.B. Lippincott. 1990. 2573 (p. 1583).
- 12.40. Berkow R. ed. **The Merck Manual of Diagnosis and Therapy**. 18th. ed. U.S.A.: Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, 1982: (p. 2314-2316)
- 12.41. Barnhart ER, publisher. **Physicians' Desk Reference**. PDR. 43 ed. U.S.A.: Medical Economic, 1989. 2418 (p. 1099-1100)
- 12.42. Davic J. **Another look at antibiotic resistance**. J. of General Microbiology. 1992; 138:1553-1559.
- 12.43. Rossoff IS. **Handbook of Veterinary Drugs**. New York: Springer. 1974: XXI+730. (p.111-115, 404-407)
- 12.44. Schopfloch R. **Enciclopedia Agropecuaria Práctica**. Tomo II. Buenos Aires: El Ateneo. 1967. 436 (p. 37).
- 12.45. Skoog DA, West DM. **Análisis Instrumental**. 2a ed. Calcagno M. trad. México: McGraw-Hill. 1989. 806 (p. 721, 725).
- 12.46. Robards K, Haddad PR and Jackson PE. **Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods**. London: Harcourt Brace. 1994. (p. 227-250).
- 12.47. García del Pozo EA. **Estandarización de un Método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la Cuantificación de Aminas Biogénicas**. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Examen General de Integración, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 89p. (p. 9-10)
- 12.48. McNair HM, Esquivel B. **Cromatografía Líquida de Alta Presión**. 2a. ed. Chile: Sec. Gral de los Estados Americanos, Programa Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1980. Monografía No. 10. Serie de Química. 72p.
- 12.49. Seiden R. **Enciclopedia Práctica de Ganadería y Veterinaria**. Dietrich EI. trad. Argentina: Cabor. 1959. (p. 31, 35).
- 12.50. Onji . **The Crisis in Antibiotic Resistance**. Science. 1992; 257:1064.
- 12.51. Havlicek L, RD Crain. **Practical Statistics for the Physical Analysis**. USA: Am. Chem. Society. 1988. (pp. 35-36).

### **13. ANEXOS**

### 13.1 LAS TETRACICLINAS

El descubrimiento y desarrollo de la penicilina y la estreptomicina originó la búsqueda de otros antibacterianos extraídos de cultivos de microorganismos que tuvieran valor terapéutico. En 1948, Benjamín M. Duggar descubrió la primera de las tetraciclinas, la clorotetraciclina, y de cientos de compuestos relacionados, sólo muy pocos han sido desarrollados para el tratamiento de enfermedades infecciosas [35].

Las tetraciclinas son compuestos anfotéricos que forman sales con ácidos o con bases. Las bases son inodoras, ligeramente amarillas y de sabor amargo, insolubles en agua destilada y otros solventes, aunque al combinarlas con sodio o con clorhidratos forman sales muy solubles; poseen un pH ácido en soluciones acuosas, y disminuyen su potencia al ser expuestas a la luz, al aire o a compuestos alcalinos. Las soluciones acuosas neutras de clortetraciclina pierden su actividad en un día, las de oxitetraciclina en 3 a 4 días y las de tetraciclina en 3 semanas, ya que son inestables cuando se incrementan la temperatura y el pH de la solución. El polvo permanece estable durante largos períodos [36].

Los miembros del grupo que se emplean con mayor frecuencia son tetraciclina, oxitetraciclina y clorotetraciclina (y en menor cantidad la rolitetraciclina, una tetraciclina pirrolidinometilica). Tienen propiedades similares y son conocidas como *antibióticos de amplio espectro* porque muestran un amplio intervalo de actividad antibacteriana que traslapa los efectos antibacterianos de la penicilina, estreptomicina y cloranfenicol, aunque difieren en su farmacocinética [2, 36].

#### 13.1.1 CLORHIDRATO DE TETRACICLINA

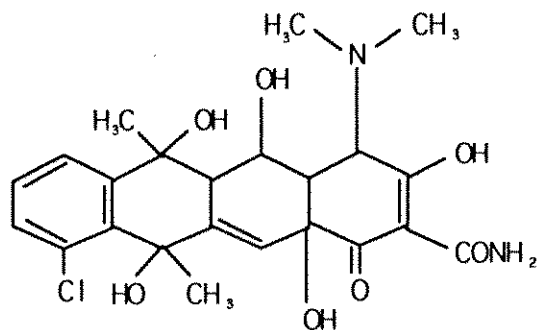
El clorhidrato de tetraciclina (*Aureomicina*), ver fórmula química en el Anexo 13.2, fue descubierta por Duggan en 1948 al hacer experimentos en *aureofaciens*, una especie de *Streptomyces*. Es un polvo cristalino, de color amarillo oro (de allí deriva su nombre) e inodoro, muy soluble en agua (100 a 150 µg/mL); al estado puro se conserva durante meses sin necesidad de refrigeración; el polvo es higroscópico aunque moderadamente estable al aire, y se torna de color oscuro al exponerse a la luz solar. La solución al 1% en agua tiene un pH aproximado de 2.5, es inestable a temperatura ambiente; y se destruye en soluciones alcalinas fuertes o en soluciones ácidas con pH 2. En el ratón, la DL<sub>50</sub> es de 350 mg/kg por vía subcutánea [36, 37].

### 13.1.2 OXITETRACICLINA

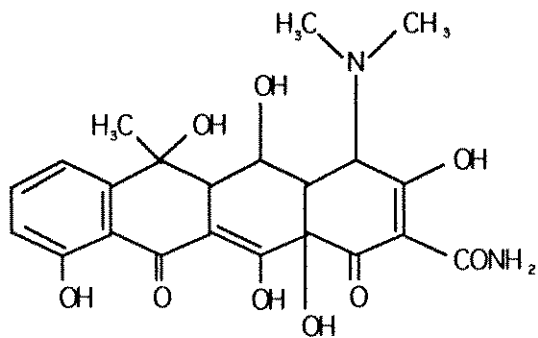
La oxitetraciclina (*Terramicina*), ver fórmula química en el Anexo 13.2, es un compuesto anfotérico, cristalino, extraído del *Streptomyces rimosus*, un actinomiceto del suelo. Su poder anfótero le permite dar sales con ácidos (clorhidrato de terramicina) y sales con bases (sal sódica de terramicina). La sal ácida es más soluble que la sódica, por lo que se absorbe mejor en el aparato digestivo. Tiene baja toxicidad; en ratones la DL<sub>50</sub> es 192-280 mg/kg por vía endovenosa, 7200 mg/kg por vía bucal, y 892 mg/kg por vía subcutánea [37].

## 13.2 FORMULAS QUIMICAS [20]

### 13.2.1 CLORTETRACICLINA



### 13.2.2. OXITETRACICLINA (*Terramicina*):



### 13.3 FARMACOLOGIA DE LAS TETRACICLINAS

#### 13.3.1 MECANISMO Y MODO DE ACCION

Se sabe muy poco del mecanismo antimicrobiano de las tetraciclínas. Puede ser que se desarrolle en cualquiera de las siguientes formas:

1. Interfiriendo en la síntesis de las proteínas celulares en las bacterias que crecen y se reproducen rápidamente, uniéndose en forma específica a las sub-unidades 30S de los ribosomas.
2. Por inhibición de sistemas enzimáticos activos encargados de actuar en la formación de proteínas en los ribosomas.
3. Por formación de agentes quelantes, que son producidos mediante la captación de metales que son vitales a las reacciones enzimáticas de la célula bacteriana [20, 36].

La clortetraciclina, a concentraciones altas, interfiere en la acumulación del glutamato en el interior de la célula, y se sugiere, aunque no se ha podido probar, que interfiere en el metabolismo oxidativo de la célula bacteriana por inhibición del metabolismo del acetato. Se sabe que las concentraciones de clortetraciclina que inhiben la proliferación bacteriana reducen considerablemente la conversión del glutamato en proteínas celulares por la bacteria [36].

La entrada de las tetraciclínas a organismos susceptibles está mediada por el transporte de proteínas localizado en la membrana citoplásmica interna bacteriana. Se cree que el enlace de la droga a la sub-unidad 30S del ribosoma bacteriano bloquea el acceso del amino-acil-tRNA al complejo ribosoma mRNA en el sitio receptor, inhibiendo así la síntesis protéica bacteriana [38].



### 13.3.2 ESPECTRO ANTIBACTERIANO E INDICACIONES EN EL HUMANO

Las tetraciclinas son efectivas *in vitro* contra una gran variedad de bacterias, tanto sobre organismos Gram-positivo como sobre Gram-negativo. Son antibióticos de primera elección en infecciones causadas por *Francisella tularensis*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *V. fetus*, *Haemophilus ducreyi*, *Calymmatobacterium granulomatis*, y *Mycoplasma pneumoniae*. Son alternativos cuando los organismos infecciosos son susceptibles, o cuando el agente de primera elección es ineficaz o no bien tolerado. Otros organismos normalmente susceptibles son el *Streptococcus pneumoniae* y los *Streptococci* grupo B [35, 39]. Las infecciones provocadas por estreptococo  $\beta$ -hemolítico Grupo A no deben ser tratadas con tetraciclinas debido a que en pruebas *in vitro* hasta un 25% de ellas muestran ser resistentes; la resistencia bacteriana a una de las tetraciclinas generalmente es paralela a una resistencia-cruzada con las demás [36, 40]. El clorhidrato de tetraciclina es muy usado en procesos infecciosos favorecidos por trastornos del tracto respiratorio como bronquitis crónica, mucoviscidosis y enfisema; para el tratamiento de infecciones cutáneas como el acné, y contra la amebiasis intestinal aguda [19].

También son drogas de elección en brucelosis severa, granuloma inguinal, y uretritis no específica; para bajar la fiebre causada por *Borrelia novyi* y *B. recurrentis*; y contra todas las infecciones causadas por *Clamidia* (psitacosis, linfogranuloma venéreo, tracoma, conjuntivitis y queratoconjuntivitis) [40, 41].

Un microorganismo se considera susceptible si la CIM (concentración inhibitoria mínima) no supera los 4  $\mu\text{g/mL}$ , e intermedia si la CIM es de 4-12.5  $\mu\text{g/mL}$  [41].

### 13.3.3 FARMACOCINETICA EN EL HUMANO

Las tetraciclinas administradas por vía oral se absorben principalmente por el yeyuno, al que le sigue el duodeno, el íleon y en menor grado, el ciego. Se detectan en el torrente sanguíneo 30 min. posteriores a su administración y alcanzan una máxima concentración 2 a 4 horas después. Persisten concentraciones elevadas de 5 a 6 horas posteriores y a las 24 horas se detectan niveles bajos. Tienen un volumen de distribución mayor que el del agua total del organismo (1.5 L/kg) y debido a que se eliminan principalmente por el riñón, pero como también por el hígado, en el parénquima hepático y en la bilis se encuentran concentraciones hasta 10 a 30 veces mayores que las del plasma; un 60% se une a las proteínas plasmáticas [34]. Cruzan fácilmente la barrera placentaria, llegan al feto, y se observan altas concentraciones en

la leche durante la lactancia. Se cree que debido a sus propiedades quelantes, la tetraciclina se localiza en huesos y dientes donde se detecta por fluorescencia, la que desaparece en unas 24 horas de tejidos normales, pero no del óseo y del dental [19]. La vida media en el plasma es de 8.5 horas.

### 13.3.4 TOXICIDAD Y OTROS EFECTOS ADVERSOS EN EL HUMANO

Se debe considerar una potencial toxicidad cuando se usan estos antibióticos, especialmente en tratamientos largos. Los efectos adversos causados por las tetraciclinas incluyen náuseas, vómitos, enterocolitis, estomatitis y sobreinfecciones, que pueden presentarse hasta en un 20-30% de pacientes. Una terapia prolongada o repetitiva puede resultar en el reemplazo de la flora intestinal normal por cepas resistentes de *S. aureus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Candida* y *Clostridium difficile*, lo que desarrollará una infección secundaria, como la gastroenteritis estafilocócica grave, una superinfección por micrococos productores de exotoxina. Las dosis muy altas pueden ocasionar lesiones hepáticas [19, 39, 40].

Muy raramente ocurren reacciones de hipersensibilidad, y éstas incluyen urticaria, angioedema, dermatitis exfoliativa, y shock anafiláctico [40]. Se reportan algunos casos de fotosensibilidad, manifestada por una quemadura solar exagerada en personas que toman demeclociclina [28] (producto de una cepa mutante de *S. aureofaciens*) [36].

Debe evitarse la administración de tetraciclina a mujeres embarazadas, ya que al ser atraída por el tejido óseo en crecimiento, formará un complejo ortofosfato de tetraciclina-calcio que retarda el desarrollo del esqueleto. Todo tejido fetal que se vea expuesto a calcificación puede provocar un desarrollo anormal, particularmente en dientes y huesos [39].

Bajo ninguna circunstancia debe permitirse el uso de tetraciclina vencida (posterior a la fecha de expiración), ya que los productos de degradación son altamente nefrotóxicos, y en ocasiones han provocado un síndrome parecido al lupus eritematoso sistémico y al síndrome Fanconi [39].

Cuando se sigue una terapia de larga duración, es aconsejable realizar exámenes de laboratorio periódicos del organismo, con estudios renales, hematopoyéticos y hepáticos [39].



### **13.3.5 EFECTOS ADVERSOS PROVOCADOS POR LA INGESTA DE RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN LA ALIMENTACION DIARIA**

El abuso en la administración de tetraciclinas, y la presencia como residuos en el alimento humano, ha conducido al desarrollo de muchas cepas de bacterias resistentes y a la presencia de sobreinfecciones en los pacientes [38]. Entre los posibles problemas asociados con el uso de antibióticos está la contaminación de productos de la cadena alimenticia y selección de poblaciones que son antibiótico resistentes [26].

La resistencia puede ser transferida horizontalmente por plásmidos o por transposones conjugativos a nivel cromosómico. Los agentes antimicrobianos se inactivan por 3 mecanismos mayores: (a) inactivación del antibiótico por destrucción o modificación; (b) impedimento de acceso al blanco -target- y, (c) alteración del sitio blanco -target- del antibiótico [7].

Muchos microorganismos resistentes muestran reducción de la acumulación de las tetraciclinas como resultado de la disminución del flujo del antibiótico o por la adquisición de una vía de eliminación con gasto de energía. La resistencia a las tetraciclinas de la *E. coli* y talvés de las otras especies bacterianas es un rasgo inducible, o sea, las bacterias sólo se hacen resistentes después de la exposición al fármaco [20]. La mayoría de estafilococos productores de penicilinas también son insensibles a las tetraciclinas [38, 42].

Muchas veces la resistencia se asocia con errores al administrar la terapia antibiótica, y médicos y pacientes son parte del problema. Sólo se deben prescribir antibióticos para infecciones debidamente documentadas--no para el resfriado común o para infecciones indefinidas del tracto respiratorio superior. Se debe comprender que los antibióticos no son efectivos contra toda enfermedad, y que son totalmente ineficaces contra las infecciones virales [42].

El paciente, aunque sabe que el antibiótico que ingiere le ayuda a combatir la infección, deja de tomarlo una vez se siente mejor, cuando sólo ha logrado suprimir parte de la enfermedad. Esto provoca que la bacteria mute a un organismo más fuerte, y estos mutantes pasan sus genes resistentes a la siguiente generación de bacterias. Por ello, en Israel se creó el programa Terapia-Directamente-Supervisada, que se encarga de verificar, por medio de visitas personales a su residencia, que el individuo utilice el medicamento.

Y si, además, el paciente sufre una sobreexposición por residuos de antibióticos presentes en la carne o la leche que consume, la formación de bacterias mutantes sigue en progreso [42].

Además, los residuos de drogas presentes en los alimentos afectan el funcionamiento normal del tracto gastrointestinal. La microbiota intestinal está formada por aquella ya establecida

en el tracto, y por la que se introduce por los alimentos. La ya establecida mantiene determinadas relaciones y ocupa sitios específicos en el intestino, su tipo y número varía en las diferentes secciones del tracto.

La microbiota al inicio del intestino delgado es similar a la del estómago, poco abundante y diversa, manteniéndose baja por los movimientos peristálticos que mueven la comida de forma tan rápida que los microorganismos no permanecen el tiempo suficiente para multiplicarse.

En el intestino grueso (colon) es mucho mayor, ya que por el lento movimiento de los alimentos a través del colon, los microorganismos tienen suficiente tiempo para multiplicarse. Un tercio del peso seco de las heces humanas está constituido de bacterias y pueden encontrarse unas 400 distintas especies de microorganismos. Aunque la composición de la microbiota de las heces varía entre individuos, se puede considerar estable a pesar de la introducción continua de nuevos microorganismos. La dieta tiene un efecto mínimo en su composición, aunque tiene efectos importantes sobre las enzimas bacterianas y puede alterar la actividad metabólica de la microbiota intestinal.

La microbiota del tracto intestinal es un ecosistema en el que distintos microorganismos interactúan física y metabólicamente. Entre sus funciones fisiológicas están el mantener el grosor de las paredes, el pH y el funcionamiento del sistema inmune, controlar los mecanismos de resistencia al evitar que las bacterias recién ingeridas formen colonias, y sintetizar determinadas e importantes vitaminas, como la B12. Además, metaboliza los compuestos (drogas) ingeridos y los hace disponibles, o altera su actividad y/o toxicidad [4].

Este ecosistema puede verse alterado por el uso de antibióticos que, al ser mal- absorbidos, causan cambios en la microbiota intestinal. Un crecimiento descontrolado de microorganismos potencialmente patógenos causará diarreas o colitis, especialmente en individuos con sistemas inmunes alterados. Además, un antibiótico mal absorbido será ineficaz en el control de bacterias y provocará la formación de cepas resistentes. Los bajos niveles de residuos de drogas en alimentos pueden interferir en el ecosistema del tracto intestinal, y la ingestión crónica de antibióticos y de otros residuos de drogas en alimentos pueden conducir a serios problemas de salud [4]. En general, los antibióticos de amplio espectro muestran mayor tendencia a inducir sobreinfecciones que los de espectro limitado, lo que reduce sus usos clínicos [38].

## 13.4 TABLAS DE DOSIFICACION EN MEDICINA VETERINARIA

### 13.4.1 OXITETRACICLINA

50-100 g/ton

del alimento total

ayuda a controlar organismos susceptibles durante el crecimiento temprano de los pollos o en tiempos de stress; previene cresta azul.

100-200 g/ton

del alimento total

ayuda a prevenir enfermedad respiratoria crónica y cólera aviar; a controlar complicaciones de la enfermedad crónica respiratoria.

200 g/ton del

alimento total

para controlar sinovitis infecciosa; prevenir hepatitis infecciosa, prevenir y controlar coccidiosis cecal debida a *E. tenella*, controlar brotes de cólera aviar (2 semanas de terapia total); usar en alimentos con baja cantidad de calcio (0.2-0.5% de calcio en la dieta en un máximo de 5 días de alimentación continua).

1.0 g con 1 g de

Carnomicina/gal de

agua de bebida

para gallinas no ponedoras como ayuda para controlar ERC (enfermedad respiratoria central) debida a *Mycoplasma gallisepticum*, e infecciones por *E. coli* asociadas [43].

### 13.4.2 CLORTETRACICLINA

50-100 g/ton. del  
alimento total

para ayudar a prevenir ERC, cresta azul, y durante tiempos de stress.

100-200 g/ton  
del alimento total

tratamiento de cresta azul,; prevención de sinovitis; ERC; usar en alimentos con bajo calcio (conteniendo de 0.4-0.55% de calcio en la dieta - máximo 5 días de alimentación continua); 0.8% de calcio dietario y 1.0-1.5% niveles de sulfato de sodio pueden darse como alimento no más 3 semanas de la vida del pollo.

200 g/ton  
del alimento total

para prevenir y controlar coccidiosis cecal causada por *E. necatrix* y *E. tenella*, usado en alimentos con bajo calcio, no administrar en forma continua por más de 8 semanas (0.8% de calcio dietario en alimentos; si se agrega 1.5% de sulfato de sodio, esta mezcla antibiótica no puede darse como alimento más de las primeras 3 semanas de vida); en el tratamiento de estos protozoos, se indican 5 días de terapia con calcio dietario reducido a 0.4-0.55%.

200 g/ton  
del alimento total

5 días de terapia ayuda a reducir mortalidad por colibacilosis; usar en alimentos con bajo calcio (a nivel de 0.8%); este nivel requiere un retiro de 24 horas previo al sacrificio para prevenir residuos indeseables en tejidos.

100 mg/gal del agua  
de bebida disponible

prevenir ERC, cresta azul, sinusitis infecciosa, y hexamitiasis en aves susceptibles; NO exceder de 14 días de tratamiento continuo.

200 mg/gal de toda el agua de bebida disponible      tratamiento de lo anterior y prevención de sinovitis. NO exceder de 14 días de tratamiento contínuo.

400 mg/gal de toda el agua de bebida disponible      para el control de sinovitis. NO exceder de 14 días de tratamiento contínuo.

1000 mg/gal de toda el agua de bebida disponible      para controlar mortalidad por cólera aviar en pollos en crecimiento; NO exceder 14 días de tratamiento contínuo. Este nivel requiere un retiro de 24 horas previo al sacrificio para prevenir residuos indeseables en tejidos [43].

1 tableta disuelta en 5 lt de agua de bebida      Para controlar cólera aviar, enterohepatitis, coriza (moquillo), diarreas infecciosas, hexamitiasis, tífus y paratífus [44].

### 13.4.3 CARACTERISTICAS FISICAS

Para el diagnóstico de las enfermedades en las aves y el establecimiento de una dosis correcta, se deben tomar en cuenta los siguientes datos: [23]

	Gallinas	Gallos
Temperatura normal media en °C	41 - 41.5	41 - 41.5
Peso en gramos	2495 - 4310	3175 - 5443

## 13.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

### 13.5.1 GENERALIDADES

El método clásico de la cromatografía líquida utiliza un tubo de vidrio con un diámetro de alrededor de 10 a 50 mm que sostiene una columna de partículas sólidas que constituyen la fase estacionaria. Para mantener el flujo, se utilizan partículas sólidas de diámetros mayores de 150 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro; por lo general la porción de líquido por encima del empaque es suficiente para forzar la fase móvil hacia abajo, a lo largo de la columna. El flujo es de unas décimas de mililitro por minuto, por lo que las separaciones requieren de mucho tiempo [45].

La cromatografía líquida se ha perfeccionado con el tiempo, por lo que la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, es muy poco parecida al formato original usado para cromatografía de columna-abierta. La demanda por una mejora en su accionar, en términos de eficacia de separación, colocación de la muestra, precisión analítica y facilidad de uso ha contribuido a que a la fecha se cuente con aparatos más automatizados, que utilizan la informática para el análisis de datos [46].

### 13.5.2 COMPONENTES BASICOS

Los componentes básicos de un sistema de HPLC consisten de:

13.5.2.1. Recipiente para solventes (fase móvil o eluente)

13.5.2.2. Sistema liberador del solvente (o bomba)

13.5.2.3. Aparato para introducir la muestra (o inyector)

13.5.2.4. Columna cromatográfica

13.5.2.5. Detector

13.5.2.6. Sistema de datos [46].

13.5.2.1. Recipiente para solventes (fase móvil o eluente)

Puede ser de vidrio, acero inoxidable o de plástico inerte, con capacidad entre 1 y 3 litros. La toma del disolvente se hace a través de un filtro que tiene por objeto remover pequeñas partículas que obstruyen o dañan el sistema de bombeo y la columna [44]. Puede o no estar equipado de un sistema que extrae gases disueltos formadores de burbujas en la columna o en el detector [45, 46].

UNIVERSIDAD DE LA AMERICA CENTRAL  
BIBLIOTECA

GUATEMALA



El *depósito para la fase móvil* es un contenedor usado para almacenar el solvente previo a ser alimentado dentro de la bomba. El contenedor (y la línea de alimentación del solvente) deben ser inertes, esto es, el solvente no debe extraer compuestos orgánicos o inorgánicos del vaso. Si se extrae algún compuesto, este vendrá a formar parte de la fase móvil, y dependiendo del tipo de cromatografía, puede ocasionar problemas como ruidos en la línea base, pérdida de la resolución, etc. Las líneas de alimentación del solvente usualmente están hechas de teflón impermeable y deben ajustarse perfectamente al filtro del depósito, que está hecho de acero inoxidable o de teflón, con poros de 2-10  $\mu\text{m}$  encargados de remover partículas de la fase móvil. Todas las fases móviles usadas en HPLC deben ser desgasificadas, generalmente por una filtración al vacío a través de un filtro de 0.22-0.45  $\mu\text{m}$ , inmediatamente previo a su uso. La desgasificación minimiza los gases disueltos en la fase móvil y reduce la posibilidad de formación de burbujas en las válvulas verificadoras de la bomba y en los detectores. La desgasificación debe hacerse muy cuidadosamente, a fin de prevenir cambios en las concentraciones de solventes volátiles de la fase móvil [46].

#### 13.5.2.2. Sistema liberador del solvente

También llamado bomba, tiene como función principal trasladar la fase móvil a través del sistema de la forma más reproducible posible. La mayoría de bombas de HPLC liberan la fase móvil a un rango de flujo constante, aunque hay otras diseñadas para liberarla a presión constante [44]. Existen dos tipos de bombas: las mecánicas y las neumáticas

##### 13.5.2.2.1. Bombas mecánicas

La bomba de jeringa es una jeringa de cañón con un émbolo conectado a un motor de parado digital. Cuando el émbolo se mueve hacia adelante, empuja el solvente hacia la columna. El rango de flujo del solvente va a cambiar según varíe el voltaje en el motor, y la mayoría de bombas tienen sistemas especiales para un llenado de la cámara vacía [46].

Hay dos tipos de bombas mecánicas. La primera es una jeringa accionada por un tornillo, o *bomba recíproca*, que desplaza flujos de volumen constante en forma no continua sino más bien pulsante. Tiene la desventaja que el flujo se obtiene en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme, lo que puede causar pérdida de la eficacia de la columna e inestabilidad del detector, corrigiéndose esto al usar un amortiguador de las pulsaciones, y además por su baja capacidad es inadecuada para el cambio de solventes [45, 46]. Tiene la ventaja de que a pesar de las variaciones en la caída de presión, produce un flujo de volumen constante. La segunda es una *bomba de desplazamiento continuo*, que produce flujos uniformes y continuos,

libre de pulsaciones. Tiene la desventaja que es de capacidad limitada, y entonces hay que llenar de nuevo la cámara, lo que es dificultoso, haciéndose necesario suspender la operación, y además, son de costo elevado [47].

#### 13.5.2.2.2. Bombas neumáticas

Las bombas neumáticas utilizan gas presurizado que es aplicado sobre el depósito de la fase móvil y forza al solvente a pasar a través de la columna. Esta entrada simple provee un flujo sin pulsación, pero las presiones de operación deben ser gobernadas por los reguladores y por los cilindros de gas usados para suplir la presión. Por esta razón, las presiones de operación son sólo de 100-200 p.s.i., por tanto, este tipo de bomba se utiliza muy poco [46]. Otras desventajas que presentan es tener una capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear, y difundir el gas en el líquido, lo que se corrige al usar algún tipo de interfase entre el líquido y el gas, evitando el contacto directo entre ellos, o, desechando las últimas porciones de líquido que han sido saturadas por el gas.

#### 13.5.2.3. Aparato para introducir la muestra (o inyector)

La función del inyector es introducir la muestra entre la corriente de solvente que está fluyendo antes que llegue a la columna para que pueda ser llevada a la columna y ser posteriormente separada. El inyector puede ser operado manualmente a través de una microjeringa-manual, o automáticamente realizando una inyección no asistida; permitiendo que la muestra sea introducida sin alterar el flujo del solvente, lo que puede dar como resultado en alteraciones de la línea base en los detectores de sensibilidad del flujo, como en el índice de refracción o la conductividad [46]. El líquido inyectado llena el espacio interno de una porción de tubo capilar llamado *loop*, que puede tener un volumen entre 10 y 200  $\mu\text{L}$ , luego se acciona la válvula de forma que el líquido contenido en el *loop* pase a la columna cromatográfica [45].

#### 13.5.2.4. Columna cromatográfica

Esta columna, que consiste de un segmento de tubo de algún material inerte (como acero inoxidable), de diámetro uniforme, y que es capaz de resistir altas presiones, contiene la fase estacionaria sobre la cual se realiza la separación [47]. La longitud de las columnas es por lo general de 10 a 50 cm, aunque se puede alargar al unir varias columnas; el diámetro varía entre 3 y 5 mm, aunque hay algunas hasta mayores de 1 cm [45].

### 13.5.2.5. Detectores

Los detectores pueden ser de tres tipos:

13.5.2.5.1. *Detectores de luz ultravioleta (UV)*, cuyo funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Su respuesta es selectiva, pues sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda ( $\lambda$ ) a la que se opere [47].

Hay dos tipos de detector ultravioleta: (a) de  $\lambda$  variable, de aplicación variada y sensible, aunque de muy alto costo y, (b) fotómetro de luz UV, que funciona a una sola  $\lambda$ , es más sencillo y de menor costo. En el detector ultravioleta de  $\lambda$  variable es posible seleccionar la  $\lambda$  óptima para la muestra, con lo que se evitan problemas de absorción de la muestra, y además, algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado, lo que lo hace ser preferiblemente usado sobre el fotómetro de luz UV [48].

13.5.2.5.2. *Detectores de fluorescencia*, que son altamente sensibles, capaces de detectar cantidades del orden de los picogramos ( $10^{12}$  gramos), se encuentran en dos tipos: (a) los fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión y, (b) los espectrofluorómetros que emplean monocromadores. Presentan la ventaja de que cuando la muestra no es fluorescente, se pueden formar compuestos derivados de la muestra original que sí presenten esa propiedad [48].

13.5.2.5.3. *Detectores de índice de refracción*, que miden la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna, detectando cualquier cambio en la composición de la fase móvil; son de respuesta universal, y de sensibilidad moderada (de  $\mu\text{g}$  o ppm) [48].

Los componentes ya separados pasan (a través de agujero entubado estrecho) hacia el detector donde van a generar una señal, la cual es grabada en el sistema de datos. Es bastante común en HPLC usar uno o más detectores en un mismo sistema, o usar detectores múltiples en serie a fin de maximizar la información de muestra de una sola inyección. La señal en el detector se genera en base a una de las propiedades intrínsecas del soluto o la fase móvil, como por ejemplo, por la absorbancia de luz visible/UV, por fluorescencia, conductancia, etc. [47].

#### 13.5.2.6. Sistema de datos

El sistema de datos es útil no sólo para observar los datos obtenidos, sino también para un control físico de los parámetros reales del aparato (hardware), como rango de flujo de la bomba, volumen de inyección o del detector de la longitud de onda y la sensibilidad, permitiendo que el HPLC sea totalmente operado desde el teclado de la computadora. Los módulos del instrumento normalmente se comunican vía serie RS-232 o interfaces IEEE-488, aunque actualmente algunos fabricantes están usando cables de fibra óptica para la comunicación entre los distintos módulos [46].

Con HPLC se pueden separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos, en cualquiera de las siguientes formas, dependiendo del mecanismo de separación de la muestra:

1. Cromatografía líquido-líquido
2. Cromatografía de fase químicamente unida
3. Cromatografía líquido-sólido
4. Cromatografía líquido por exclusión
5. Cromatografía por intercambio iónico [48]

### 13.7 Modelo de ficha para la clasificación, registro y codificación de datos

**TESIS: DETERMINACION DE RESIDUOS DE TETRACICLINA EN CARNES DE POLLO QUE SE CONSUMEN EN LA CIUDAD DE GUATEMALA: PLAN PILOTO**

FECHA DE COLECTA: \_\_\_\_\_ HORA DE COLECTA: \_\_\_\_\_

PIEZA DEL POLLO: \_\_\_\_\_ CODIGO DE LA MUESTRA: \_\_\_\_\_

PESO (en g) DE LA PIEZA: \_\_\_\_\_

PERSONA QUE COLECTO: \_\_\_\_\_

FECHA DEL ANALISIS EN HPLC: \_\_\_\_\_

RESULTADOS:

	mq	ppm
TETRACICLINA		
OXITETRACICLINA		
CLORTETRACICLINA		

PERSONA QUE REALIZO EL ANALISIS: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 13.8 GLOSARIO

**Antibiótico:** Son sustancias producidas por diversos hongos y microorganismos que impiden el desarrollo de ciertos gérmenes. Además de su importante aplicación terapéutica, si se añaden en cantidades mínimas a los alimentos, ayudan a acelerar el crecimiento de los animales, especialmente de las aves de corral y los cerdos [49].

**Alimento para aves:** Producto alimenticio para consumo oral de aves, constituido por una mezcla de origen vegetal, animal y mineral, con o sin vitaminas, minerales o aminoácidos agregados, con o sin aditivos, capaz de satisfacer los requerimientos nutricionales de la especie para una determinada edad y propósito zootécnico [10].

**Alimentos con suplemento antibiótico:** Productos nutritivos cuyo principal valor es su contenido antibiótico; deben tener uno o más de los antibióticos que favorecen el crecimiento y las cantidades contenidas deben indicarse en el rotulado. Según disposiciones vigentes en Estados Unidos, los productos deben contener como mínimo 1 gramo de antibiótico por libra y llevar la leyenda “*Para uso alimenticio únicamente*”. Las instrucciones para el empleo no han de prever la adición de más de 50 g de antibiótico por tonelada de alimento elaborado. Entre los antibióticos usados como suplemento alimenticio figuran la *terramicina*, *aureomicina*, penicilina y estreptomina [50].

Una de las teorías dadas para explicar el mecanismo por el cual los antibióticos estimulan un crecimiento más rápido, afirma que alteran la flora del aparato digestivo de los animales, eliminando así los microorganismos que rivalizan por los alimentos ingeridos, o los que segregan toxinas que retardan el crecimiento animal.

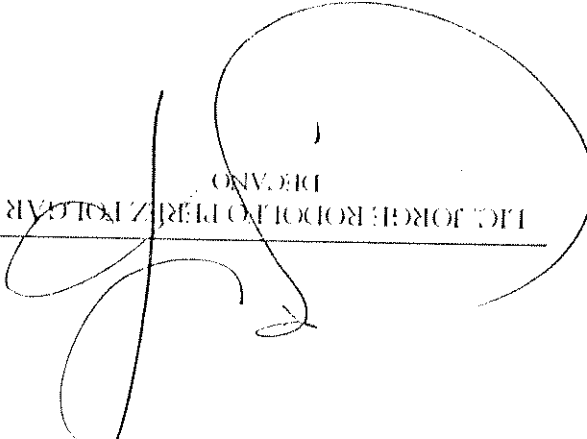
Los antibióticos favorecen el crecimiento de los cerdos y de las aves de corral, acrecientan el poder nutritivo de los forrajes, disminuyen el requerimiento de vitamina B12, ejercen una acción de “ahorro de proteínas” y aumentan su viabilidad” [49].

**Piensos:** Alimento concentrado para aves [11].

**Pollo:** Ave de corral doméstica. Actualmente se han criado estirpes de rápido crecimiento para producir broiler (pollo de rápido desarrollo, o también pollo parrillero o pollo asadero) que en Guatemala se vende aproximadamente a las 7 u 8 semanas de edad, y en Estados Unidos a las 10-12 semanas, y de 3 ó más libras de peso [10, 22].

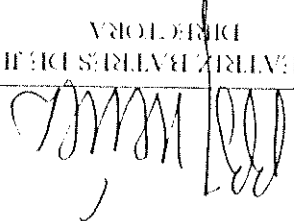
1. J.C. JORGE RODRIGUEZ PÉREZ  
DIRETIVO

---



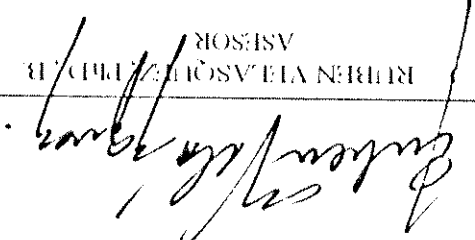
1. D.A. BENTRÍZ BARRÉS DE JIMÉNEZ  
DIRETORA

---



1. RIBEN VILA SQUERRETTI  
ASISOR

---



1. BISSIE ABIGAIL GONZÁLEZ RANIERIZ  
AUTORA

---

