

TESIS PREMIADA PRIMER LUGAR: ESCUELA QUIMICA FARMACEUTICA

DETERMINACION DE RESIDUOS DE TETRACICLINA
EN CARNES DE POLLO QUE SE CONSUMEN
EN LA CIUDAD DE GUATEMALABessie Abigail Orozco Ramírez¹
Rubén Velásquez Miranda²

I. SUMARIO

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de oxitetraciclina y clortetraciclina en pechugas de pollo provenientes de una de las principales granjas avícolas que surten a expendios de la Ciudad de Guatemala. Para el efecto se desarrolló un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de fase reversa y detección ultravioleta. Este método fue una adaptación de los descritos por Y. Onji y col. y por D. Fletouris y col. [2,3], e incluye una extracción con HCl y cromatografía de adsorción con Amberlita WAD-2 previo al análisis por HPLC.

Tres de las 30 muestras analizadas presentaron residuos de tetraciclinas; estando presente en todas ellas la oxitetraciclina (0.067 - 0.567 ppm) y en una la clortetraciclina (3.7 ppm). Las tres muestras presentaron contenidos mayores a los Niveles Máximos de Residuos aceptables para consumo humano (≤ 0.25 ppm) establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) [3].

II. INTRODUCCION

La producción de carne de pollo es importante para la economía y la alimentación de la población guatemalteca. Por la demanda existente se hace uso de tecnologías de producción en las que es una práctica común la utilización, a veces indiscriminada, de antibióticos en los piensos (alimentos concentrados) y en el agua de bebida; esto para eliminar brotes de enfermedades graves, disminuir el índice de mortalidad y promover el crecimiento. La oxitetraciclina (OTC) y la

clortetraciclina (TC-HCl) se encuentra entre los antibióticos más utilizados en la medicina veterinaria. [4,5].

La administración de drogas durante la crianza de animales puede causar la presencia de sus residuos en los productos alimenticios derivados de estos animales. Residuos de drogas no aprobadas se han detectado en carnes de animales bovinos destinadas al consumo humano en países como Estados Unidos y el Reino Unido [6,7]; los residuos fueron encontrados en riñones, hígado o en grasa y en menor cantidad en carne o músculo. En países desarrollados se han establecido límites máximos de residuos de drogas permitidos en alimentos de origen animal [8]. En Guatemala no se controla ni regula la presencia de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal. Esto se debe en parte a las dificultades técnicas que implica su detección, así como a la falta de estudios que reporten casos específicos de presencia de antibióticos en alimentos para consumo humano.

La presencia de residuos de tetraciclinas en la carne de pollo puede representar una ingesta constante de dosis subterapéuticas para las personas que la consumen. El principal problema asociado con una ingesta de dosis subterapéuticas de un antibiótico es la aparición de cepas bacterianas resistentes al antibiótico en cuestión. Una bacteria se hace resistente a agentes antimicrobianos cuando se ve expuesta en dosis tan bajas, que algunas de ellas no mueren y desarrollan diversos mecanismos de resistencia. Estas adaptaciones permiten a las bacterias resistentes sobrevivir a un tratamiento posterior con el antibiótico e incluso, a otras drogas a las que no ha sido expuesta [9].

El Principal objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de residuos OTC y TC-HCl en

¹ Licenciada Química Farmacéutica

² Licenciado en Biología, Doctor en Biología Humana (Dr.rer.hum.biol). Departamento de Bioquímica, Escuela de Química Biológica, Facultad de San Carlos de Guatemala, USAC. rvelasqz@concyt.gob.gt

la carne de pollo proveniente de una granja avícola que surte a expendios de la Ciudad de Guatemala. Previamente, fue necesario desarrollar un modo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) que permitiera la detección y cuantificación de estos antibióticos.

III. MATERIALES Y METODOS

APARATOS

HPLC: Se utilizó un sistema Merck-Hitachi consistente en una bomba modelo L-6200A, un detector UV/VIS modelo L-4200 y un integrador modelo D-2500. El sistema estaba equipado con un inyector manual Rheodyne modelo 715 con un bucle de 20ml y columnas de acero inoxidable Merck LiChrocart.

REACTIVOS Y MATERIALES

Químicos: Como patrones de OTC y de TC-HCl se usó materia prima de la compañía Marsing & Co. Ltd. A/S. Se prepararon soluciones madre ($\mu\text{g/ml}$) en metanol, a partir de las cuales se prepararon en fresco las soluciones patrón ($0.064\text{-}1.6 \mu\text{g/ml}$ en ácido perclórico 0.1 mol/l). Para la cromatografía de adsorción se utilizó Amberlita XAD-2 de la compañía Sigma Co. El resto de químicos fueron de la compañía Merck.

Muestras de carne de pollo enriquecido con OTC y TC-HCl: Muestras con concentraciones conocidas de OTC y TC-HCl fueron preparadas usando carne de pollos que no ingirieron antibióticos durante su crianza (pollos de corral). A estas se les agregó OTC y TC-HCl para lograr concentraciones finales entre 0.02 y 1.0 ppm . Las muestras así preparadas se utilizaron para la optimización de las condiciones cromatográficas y la validación del método.

METODOLOGÍA ANALITICA. Procesamiento de las muestras: La carne de pollo (50 gramos) se extrajo dos veces con un total de 150 ml de HCl 1 N . Después de centrifugación, los sobrenadantes se filtraron a través de una columna empacada con 5 gramos de Celites 545. El filtrado se agregó a una columna empacada con 10 ml de Amberlita previamente activada, la columna se lavó con un total de 200 ml de agua destilada y posteriormente las tetraciclinas fueron eluidas con 50 ml de etanol. Al eluido se le agregó 1 ml de solución metanólica al 5 por ciento (v/v) de ácido mercapto-

propiónico y se filtró (poro 0.2 mm) previo a su inyección en el cromatógrafo.

Análisis cromatográfico (HPLC): Las condiciones cromatográficas del método desarrollado se describen en el **Cuadro No. 1**. Estas condiciones fueron validadas mediante el análisis de soluciones patrón de OTC y de TC-HCl ($0.064\text{-}1.6 \mu\text{g/ml}$) y de tetraciclinas extraídas a partir de muestras de carne de pollo enriquecidas con ambos antibióticos. Los resultados de los análisis fueron procesados estadísticamente para establecer los valores de reproducibilidad, linealidad, exactitud, porcentaje de recuperación y los límites de detección.

CUADRO # 1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE TETRACICLINAS

Columna	Acero Inoxidable, $250 \times 4 \text{ mm DI}$. Lichrocart, Merck
Fase Estacionaria	Lichrospher 100, $5 \mu\text{m}$ RP- 18
Fase Móvil	Acetonitrilo/Ácido Fosfórico 0.02 M , $\text{pH } 3$, ($24/76, v/v$)
Temperatura	Ambiente ($23\text{-}28^\circ\text{C}$)
Volumen de Inyección	20 ml
Flujo	1.2 ml/min
Detección	UV (355 nm)
Volumen de Celda	12 ml

ANÁLISIS DE LA CARNE DE POLLO

Colecta: Treinta pechugas de pollo de un mismo lote fueron adquiridas en el Departamento de Ventas de una de las granjas avícolas más grandes del país, la cual comercializa sus productos en la Ciudad de Guatemala. Las muestras fueron transportadas en hielo y almacenadas a -10°C hasta el momento de su análisis.

Procesamiento y análisis: Cada una de las muestras fue procesada y analizada con los procedimientos anteriormente descritos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO

El método desarrollado en este trabajo se derivó de los dos descritos previamente por Y. Onji y col. [1] y por D. Fletouris y col. [2]. Con algunas modificaciones, se utilizó el procedimiento de extracción de las muestras

del primero y las condiciones cromatográficas del segundo.

Con las condiciones descritas se logró una buena separación cromatográfica de ambas tetraciclinas (**Figura 1**), con tiempos de retención (t_R) reproducibles, 4.10 ± 0.025 y 5.23 ± 0.045 minutos ($n = 10$) para OTC y TC-HCl, respectivamente. Los análisis de muestras enriquecidas tuvieron resultados similares, con t_R de 4.52 ± 0.057 minutos para OTC y 5.69 ± 0.0073 minutos para TC-HCl, ($n = 12$).

El análisis de las soluciones patrón de OTC y de TC-HCl y de las muestras enriquecidas mostraron resultados reproducibles, lineales ($r \geq 0.982$), con porcentajes de recuperación de 37.2 ± 2.6 y 32.2 ± 0.7 por ciento para OTC y TC-HCl, respectivamente. Los

límites de detección, calculados para una razón señal-ruido de 3:1, son de 0.0075 ppm (OTC) y 0.0037 ppm (TC-HCl) a partir de soluciones patrón, y de 0.022, ppm (OTC) y 0.076 ppm (TC-HCl) para el análisis de los extractos obtenidos de las muestras enriquecidas. Las concentraciones más bajas de tetraciclinas (0.02 ppm) en las muestras enriquecidas fueron detectables pero fuera de los límites de cuantificación del método.

El método resultante permitió el análisis simultáneo de OTC y TC-HCl en un tiempo reducido. El análisis cromatográfico de las tetraciclinas extraídas a partir de la carne de pollo mostró picos inespecíficos propios del alimento, pero con tiempos de retención que no interfirieron con el análisis de OTC y TC-HCl. El método de HPLC aquí descrito, estandarizado para la detección, 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.

TETRACICLINAS EN LAS MUESTRAS DE CARNE DE POLLO

El análisis de las muestras de pechuga de pollo reveló que tres de éstas contenían residuos de tetraciclinas, como puede observarse en la **Figura 2** y en la **Tabla 1**. El consumo de una de tales piezas (aprox. 300 gramos) podría significar la ingesta de un poco más de 1 miligramo de tetraciclinas. Esta cantidad podría ser significativamente menor, si se considera la descomposición de las tetraciclinas al ser expuestas al aire o a temperaturas superiores a los 90°C en atmósfera húmeda. Estudios previos de la presencia de residuos de antibióticos en bovinos reportan concentraciones mayores en riñones, hígado o grasa; en menor grado en músculo. Los contenidos de tetraciclinas en vísceras de pollo y en otro tipo de piezas podrían ser mayor que el encontrado en las pechugas.

Las tetraciclinas detectadas en la carne de pollo pone en evidencia que la Norma COGUANOR NGO 34 170 no se acata, ya que ésta establece que en aves no se deben usar los antibióticos que se emplean para uso terapéutico en humanos [10]. Tanto la OTC como la TC-HCl son usadas en la terapéutica humana.

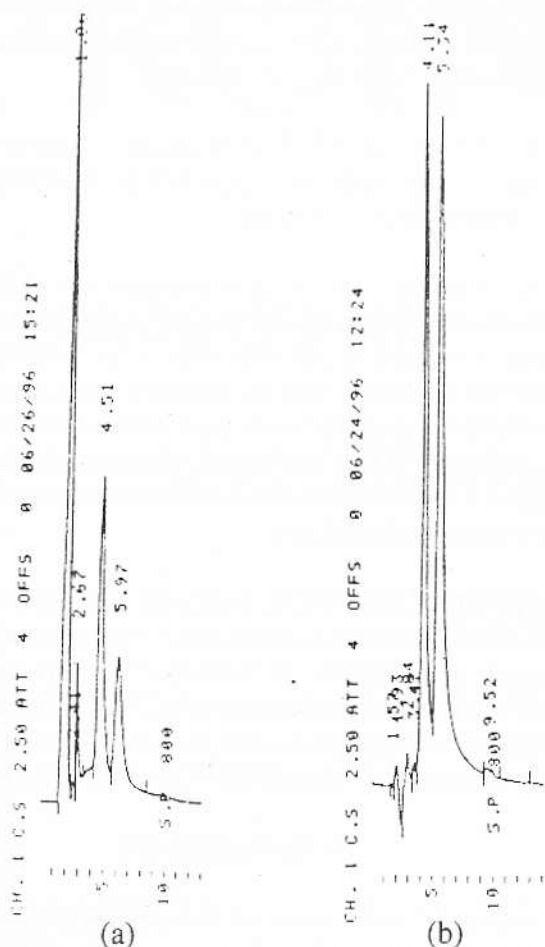


Figura 1. Cromatogramas del análisis por HPLC de (a) muestras patrón de OTC y TC-HCl en concentraciones de 1 ppm cada una y, (b) muestras de carne de pollo enriquecidas con 0.2 ppm de OTC y 0.2 ppm de TC-HCl. Condiciones cromatográficas descritas en el **Cuadro No. 1**.

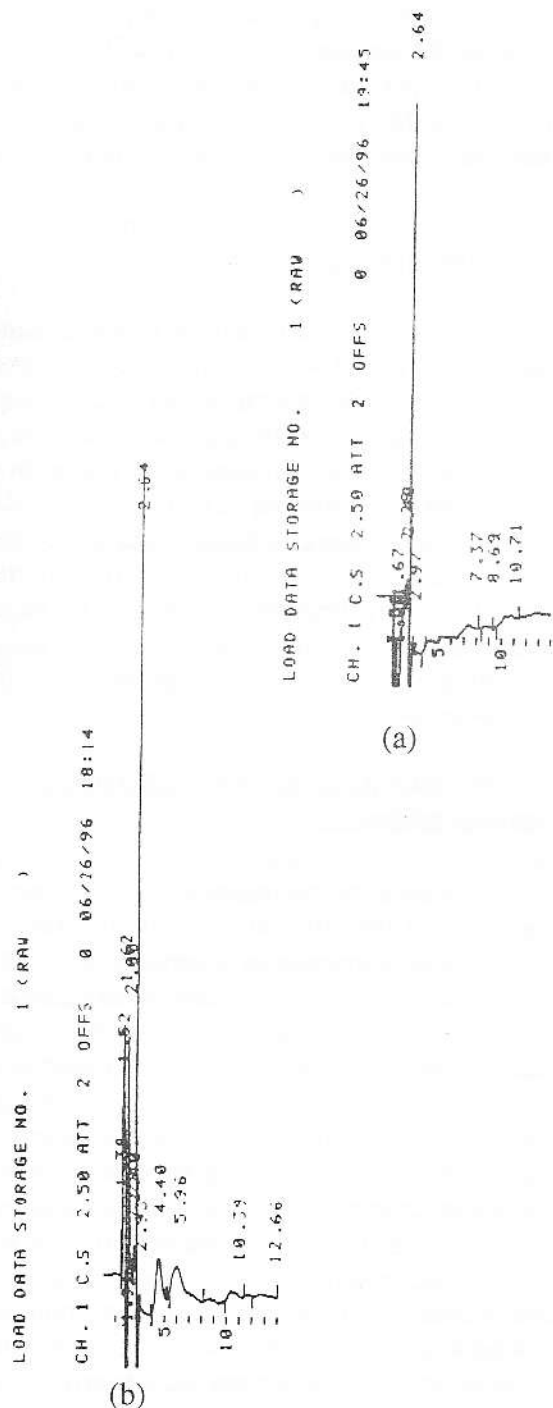


Figura 2. Cromatograma del análisis por HPLC de (a) *Muestra desconocida No. 11*, que no muestra picos para OTC ni para TC-HCI. Los picos con RT menores o iguales a 2.97 y mayores o iguales a 7.37 son propios de la muestra; (b) *Muestra desconocida No. 18*, que muestra picos en RTs de 4.40 y 5.96 los cuales corresponden a OTC y TC-HCI respectivamente. Los picos propios de la muestra no interfieren.

TABLA I
CONCENTRACIONES DE OTC Y TC-HCI
ENCONTRADAS
EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS

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

n.d. = no detectado

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La carne de pollo producida por la granja avícola estudiada presenta residuos de tetraciclinas en concentraciones que pueden llegar a ser superiores a los niveles máximos de residuos considerados seguros para consumo humano (≤ 0.25 ppm).

El método de HPLC desarrollado puede ser utilizado para detectar y cuantificar residuos de tetraciclinas en carne de pollo.

Se sugiere evaluar la aplicación del método desarrollado para la detección de estos antibióticos en muestras de otro origen. Así mismo, se recomienda continuar con este tipo de estudios para generar información que contribuyan a la implementación de programas de control de residuos de antibióticos y otras drogas en los alimentos consumidos comúnmente por la población guatemalteca.

AGRADECIMIENTOS. A Blanca Samayoa. QB., MSc., por su valiosa ayuda durante la iniciación de este proyecto. A la Escuela de Nutrición, Facultad de CC QQQF por la utilización del detector UV/VIS. Este trabajo se realizó con el equipo donado por la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ) POS. -NL PROJ. 9317.

VI. REFERENCIAS

1. Brackett 5, Delappe I, and Maddock H. **Feeding Aureomycin to Poultry.** American Cynamid Company, U.S.A. Revised edition. (p. 14-29).
2. 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.

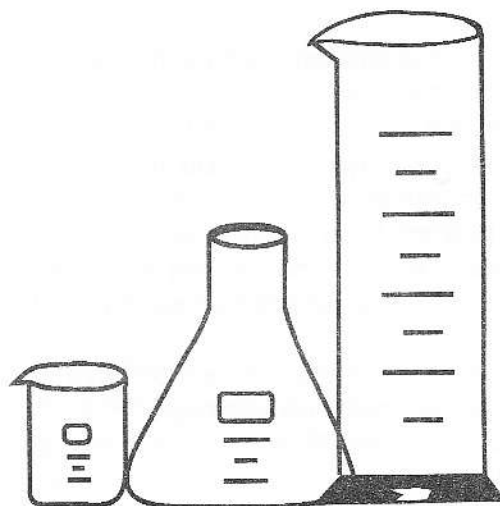
3. Fletouris DJ, Psomas JE, Botsoglou NA. **Trace Analysis of Oxytetracycline and Tetracycline in Milk by High-Performance Liquid Chromatography.** J. Agric.Food Chem. 1990;38:1913-1917.
4. **Food and Drug Administration.** Residues in Meats. U.S.A.: April, 1994.
5. Blood DC, et al. **Medicina Veterinaria.** 6a. ed. Colchero, F. trad. México:Interamericana, 1987. (p. 140-141).
6. Trum Hunter B. **Low-level drug residues in food.** Consumer's Research Magazine.1994; 77:4(8-9)
7. Haresing W, Cole DJA. **Recent Advances in Animal Nutrition.** London: Butterworth. University of Nottingham School of Agriculture, 1989. (p. 8-9)
8. Carnevale RA. **Illegal residues in meat and poultry.** Consumers' Research Magazine. 1992; 75:1(33-36)
9. Neu HC. **The Crisis in Antibiotic Resistance.** Science. 1992; 257:1064-1072.
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).

PROINCA, S.A.

EN EQUIPO DE

LABORATORIO,

TODO.



VISITENOS . . . CON GUSTO LE ATENDEREMOS !

14 Calle 3-70, zona 1. Tels.: 232-3667, 251-5318. Fax.: 238-3103