



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA
DEL LITORAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MARÍTIMA
Y CIENCIAS DEL MAR**

**“Residuos de oxitetraciclina en el camarón
blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas
medicadas a diferentes concentraciones”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de:

ACUICULTOR

Presentada por:

EDUARDO REYES ABAD

2001

Guayaquil – Ecuador

AGRADECIMIENTOS

A quien desde algún lado me ha ayudado a llegar hasta aquí.

A ti, TERE; la persona con quien quiero vivir para siempre. Gracias por darme la tranquilidad que necesitaba, gracias por tu incomparable amor, gracias por todo.

A mis padres, especialmente a mi madre, por haber estado conmigo siempre, por educarme, por empujarme, por permitirme elegir mi destino. A mi hermano, por que no me imagino como hubiera sido todo sino estábamos juntos. A mi abuelita y a mi tía Elena, por todas sus consideraciones.

A las instituciones donde me educado, al Colegio Alemán Humboldt, a la ESPOL y a la AEIMCM. Me han dado mis mejores amigos.

Al CENAIM y su director, por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

A mi director de tesis, M.Sc. Nelson Montoya, por toda la atención y preocupación mostrada en cada etapa de este trabajo, gracias por los consejos.

Al Ing. Eitel Krauss, al Dr. Pablo Intriago y al Ing. Rodolfo Barniol, por darme toda su confianza. Gracias por la tranquilidad que me permitió iniciar esta investigación, así como por la ayuda que me brindaron para que la culmine.

Al Ac. José Melena por la ayuda prestada para conseguir el material biológico (camarones), y a la Camaronera "Jesús del Gran Poder" por la donación de los animales.

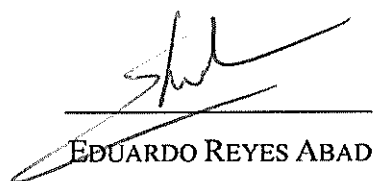
A mi amigo Marcos Espín por la edición inicial de este trabajo y a las personas que formamos el "Cofinaik", por la experiencia en CENAIM.

A mis grandes amigos de la U., Leonardo, Javier, Gustavo, Marco, Pedro Pablo, Marcos, Eduardo, Roberto, Juan, Christian, Karina; recuerden que tenemos que ser unos duros.

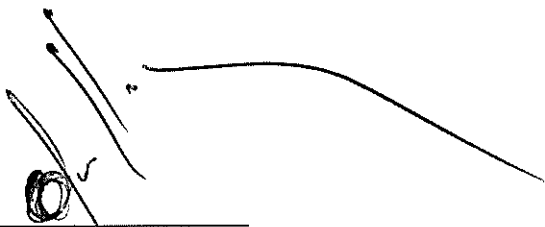
DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, corresponden exclusivamente a su autor, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado corresponderá a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

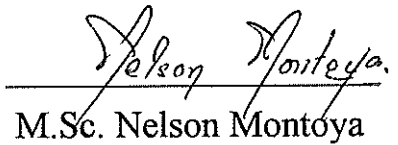
(Reglamento de Exámenes y Títulos Profesionales de la ESPOL)



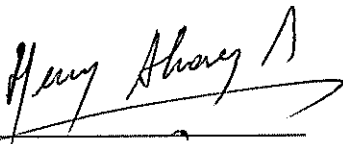
EDUARDO REYES ABAD




Ing. Ecuador Marcillo
Presidente del Tribunal



M.Sc. Nelson Montoya
Director de Tesis



M.Sc. Henry Alvarez
Vocal principal



Biol. Marco Alvarez
Vocal Principal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN	XV
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1. ANTIBIÓTICOS.....	3
1.1.1. Generalidades.....	3
1.1.2. Mecanismos de acción	7
1.1.2.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular	9
1.1.2.2. Lesión de la membrana plasmática	11
1.1.2.3. Inhibición de la síntesis proteica.....	11
1.1.2.4. Inhibición de la síntesis o actividad de los ácidos nucleicos	13
1.1.2.5. Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales	13
1.1.3. Tipos de antibióticos	14
1.1.3.1. Tetraciclinas	14
1.1.3.1.1. Historia.....	16
1.1.3.1.2. Origen.....	17
1.1.3.1.3. Química.....	17
1.1.3.1.4. Acción	18
1.1.4. Oxitetraciclina (OTC)	18
1.2. MEDICACIÓN EN ACUACULTURA.....	20
1.2.1. Objetivos del tratamiento	22
1.2.1.1. Tratamiento profiláctico.....	22
1.2.1.1.1. Promotores de crecimiento.....	23
1.2.1.2. Tratamiento terapéutico	25

1.2.2. Prácticas veterinarias tradicionales	26
1.2.2.1. Baños	26
1.2.2.2. Administración parenteral	27
1.2.2.3. Administración oral.....	28
1.2.2.3.1. Dieta seca	28
1.2.2.3.2. Alimento vivo	29
1.2.3. Antibióticos en el cultivo de camarón.....	30
1.2.3.1. Maduración	30
1.2.3.2. Larvicultura.....	31
1.2.3.3. Engorde.....	33
1.3. PROBLEMÁTICA DEL USO DE ANTIBIÓTICOS.....	35
1.3.1. Factores influyentes en la eficacia de los métodos	35
1.3.1.1. Características del antibiótico.....	36
1.3.1.1.1. Fotosensibilidad.....	36
1.3.1.1.2. Formación de complejos	37
1.3.1.2. Cálculo de dosis.....	38
1.3.1.3. Biodisponibilidad y farmacocinética	38
1.3.1.4. Preparación de dietas	40
1.3.1.5. Palatabilidad	41
1.3.1.6. Lixiviación.....	42
1.3.1.7. Estado del animal.....	43
1.3.2. Residualidad.....	44
1.3.3. Resistencia bacteriana.....	45
1.3.3.1. Adquisición de resistencia	47
1.3.3.2. Mecanismos de resistencia a las tetraciclinas	48
1.3.3.2.1. Expulsión activa del antibiótico.....	48
1.3.3.2.2. Alteración del blanco del antibiótico.....	48
1.3.3.2.3. Destrucción o inactivación del antibiótico	49
1.3.3.3. Resistencia bacteriana en acuicultura	49
1.3.3.4. Resistencia bacteriana a la oxitetraciclina en acuicultura	50
1.4. REGULACIONES	52

1.4.1. LMR: Límites máximos de residuos.....	54
1.4.2. Aprobación de drogas para uso en acuicultura	56
1.4.3. Antibióticos autorizados	58
1.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.....	61
1.5.1. Generalidades.....	61
1.5.2. Componentes del cromatógrafo de líquidos.....	62
1.5.3. Bases del análisis mediante cromatografía líquida.....	64
1.5.4. Aspectos importantes e implementación del análisis cromatográfico.....	68
1.5.4.1. Cromatografía preparativa	69
1.5.4.2. Cromatografía cuantitativa.....	70
1.5.4.2.1. Inyección de la muestra.....	71
1.5.4.2.2. Separación cromatográfica.....	72
1.5.4.2.3. Detección del analito	72
1.5.4.2.4. Integración de la señal y cálculo de la concentración	73
1.5.5. Análisis de antibióticos mediante métodos analíticos	74
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
2.1. BIOENSAYO	77
2.1.1. Sistema.....	77
2.1.2. Animales	78
2.1.3. Dietas medicadas.....	79
2.1.3.1. Elaboración	79
2.1.3.2. Pérdidas por elaboración.....	82
2.1.3.3. Pérdidas por lixiviación.....	83
2.1.4. Protocolos.....	85
2.1.4.1. Parámetros físicos y químicos	85
2.1.4.2. Manejo de la alimentación.....	85
2.1.4.3. Consumo de alimento	86
2.1.4.4. Frecuencia de muda	87
2.1.4.5. Toma de muestras.....	87
2.2. IMPLEMENTACIÓN DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	89
2.2.1. Químicos y reactivos	89

2.2.2. Extracción de OTC.....	90
2.2.2.1. Soluciones de extracción.....	90
2.2.2.2. Procedimiento	91
2.2.2.3. Recuperación del método.....	93
2.2.3. Análisis de OTC vía HPLC.....	94
2.2.3.1. Instrumental	95
2.2.3.2. Condiciones operacionales.....	95
2.2.3.2.1. Flujo	95
2.2.3.2.2. Presión.....	95
2.2.3.2.3. Temperatura	96
2.2.3.2.4. Longitud de onda.....	96
2.2.3.3. Fase móvil	96
2.2.4. Validación del método	97
2.2.4.1. Solución stock de OTC	97
2.2.4.2. Curva de calibración y estándares	97
2.2.4.3. Límite de detección	98
2.2.5. Cálculo de concentración en muestras	99
2.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	100
3. RESULTADOS.....	101
3.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	101
3.1.1. Definición de las condiciones analíticas cromatográficas.....	101
3.1.2. Evaluación del procedimiento de extracción	105
3.1.3. Validación del método	107
3.2. DIETAS	109
3.3. BIOENSAYO.....	112
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	133
RECOMENDACIONES	135
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de antibióticos.....	15
Tabla 2. Concentraciones de OTC tóxicas para larvas de <i>P. vannamei</i>	32
Tabla 3. Biodisponibilidad de la OTC en peces después de su administración oral	40
Tabla 4. Límites máximos de residuos permitidos en el Ecuador.....	55
Tabla 5. Indicaciones de la FDA para el uso autorizado de Terramicina® en la acuicultura	59
Tabla 6. Composición de la dieta CENAIM-40.....	81
Tabla 7. Cantidad de dieta elaborada y la cantidad de OTC adicionada.....	82
Tabla 8. Resultados visuales para calificar aspectos que definen la calidad de los picos graficados en los cromatogramas.....	104
Tabla 9. Condiciones operacionales del sistema HPLC para el análisis de OTC .	105
Tabla 10. Concentración de OTC en las dietas pre y post-elaboración de las dietas	110
Tabla 11. Pérdidas de OTC en cada uno de los pasos del proceso de elaboración de las tres dietas medicadas.....	110
Tabla 12. Concentraciones promedio de OTC en el <i>P. vannamei</i>	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la oxitetraciclina.....	19
Figura 2. Esquema del sistema HPLC.....	63
Figura 3. Representación de la separación en la columna cromatográfica.....	65
Figura 4. Pasos para la implementación de una metodología vía HPLC.....	71
Figura 5. Cromatograma típico.....	73
Figura 6. Esquema del sistema experimental del bioensayo.....	78
Figura 7. Pasos en el proceso de elaboración de las dietas medicadas.....	82
Figura 8. Secuencia de pruebas para implementar parámetros analíticos del HPLC	101
Figura 9. Cromatograma de estándar de OTC con 1 columna, 1 mL.min ⁻¹ a 22 °C	102
Figura 10. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, 0.5 mL.min ⁻¹ a 22 °C	102
Figura 11. Cromatograma de estándar de OTC con 1 columna, 0.5 mL.min ⁻¹ a 30 °C	103
Figura 12. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, 0.5 mL.min ⁻¹ a 30 °C	103
Figura 13. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, 0.7 mL.min ⁻¹ a 30 °C	103
Figura 14. Cromatograma de estándar (0.8 ppm OTC) una vez establecidas las variables analíticas.....	106
Figura 15. Cromatograma de estándar (0.07 ppm OTC) una vez establecidas las variables analíticas.....	106
Figura 16. Cromatograma de extracto de músculo de camarón sin OTC.....	108
Figura 17. Cromatograma de extracto de músculo de camarón con OTC.....	108
Figura 18. Cromatograma de extracto de dieta medicada de 1 ppt.....	108
Figura 19. Curva de calibración de OTC.....	109
Figura 20. Pérdidas de OTC en el proceso de elaboración de las dietas.....	111
Figura 21. Pérdidas de OTC por lixiviación en agua dulce y salada.....	112

Figura 22. Curvas individuales de acumulación y pérdida de OTC en los camarones alimentados con las tres dietas medicadas.	114
Figura 23. Curvas de acumulación y pérdida de OTC (en conjunto) en los camarones alimentados con las tres dietas medicadas.	115
Figura 24. Tendencia de consumo de alimento.....	117
Figura 25. Relación entre el consumo de alimento diario y la frecuencia de muda....	118
Figura 26. Comparación de las C_{max} obtenidas por Corliss <i>et al.</i> (1979) y las del presente trabajo	129
Figura 27. Relación de los niveles de C_{max} entre la dieta A del presente trabajo y aquellos obtenidos por otros autores.....	130
Figura 28. Relación de los niveles de C_{max} entre las dieta A, B y C del presente trabajo y aquellos obtenidos por otros autores.....	131

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDA	Aprobación para una nueva droga animal
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARN	Ácido ribonucleico
CEE	Comunidad económica europea
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía líquida
C_{max}	Concentración máxima
C_{min}	Concentración mínima
CVM	Center for Veterinary Medicine
d.i.	Diámetro interno
EDTA	Etilén diamino tetraacético
EFS	Extracción en fase sólida
FAO	Food and Agrigucultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INP	Instituto Nacional de Pesca
LMR	Límite máximo de residuos
MIC	Mínima concentración inhibitoria
NDIA	Nueva droga para investigación animal
nm	Nanómetro

ODS	Octadecilsilano
OTC	Oxitetraciclina
OTC•2H ₂ O	Dihidrato de oxitetraciclina
OTC•HCl	Clorhidrato de oxitetraciclina
pg	Picogramo
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por mil
PR	Porcentaje de recuperación
R ²	Coefficiente de correlación
RPM	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
T_{max}	Tiempo en que se alcanza la C_{max}
T_{min}	Tiempo en que se alcanza la C_{min}
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La inclusión de oxitetraciclina (OTC) en concentraciones de 1, 5 y 10 ppt, en dietas para camarones, generó concentraciones máximas (C_{max}) en el tejido muscular de *Penaeus vannamei* de: 3.1, 12.2 y 16.6 ppm de OTC, respectivamente, luego de transcurrir 5 días de medicación. Después de completar 14 días de tratamiento, los niveles de OTC se mantuvieron relativamente estables. Finalizado el tratamiento, se determinó una rápida pérdida del antibiótico en todos los animales; esto permitió obtener niveles inferiores al límite máximo de residuos (LMR) establecido por la FDA (2.0 ppm) tras la primera semana de retiro. Luego de un periodo de eliminación del antibiótico de 10 días, concentraciones por debajo del LMR vigente en Europa para la OTC (0.1 ppm), se determinaron en los animales alimentados con la dieta de menor concentración.

Paralelamente, se estudió la tasa de lixiviación del antibiótico a partir del alimento medicado, observándose como la mayor parte de la OTC se pierde en las primeras 2 horas de permanencia en el agua. Adicionalmente, se determinó la alta influencia de la salinidad en la lixiviación de este medicamento.

Los resultados aquí descritos muestran una parte de las aplicaciones, que el desarrollo del método cromatográfico para la detección y cuantificación de OTC puede brindar, una vez que se tiene la capacidad de analizar concentraciones de hasta 0.05 ppm de esta tetraciclina en muestras de diferente naturaleza.

INTRODUCCIÓN

En los inicios de la actividad camaronera, el acelerado incremento de la producción no fue de la mano con el desarrollo de tecnologías y prácticas de manejo sustentables. Es así como este sector, procedió de manera independiente con el fin de satisfacer sus legítimas necesidades, especialmente en lo referente al control de las enfermedades infecciosas (Bell, 1992).

Como consecuencia de esto, un indiscriminado y equivocado uso de una gama de antibióticos se registró tanto en piscinas camaroneras, como en laboratorios de larvas del Ecuador (Baptista, 1998); problema que ha sido similar al experimentado por otras industrias dedicadas a la cría de animales en cautiverio (Feedings Times, 2000).

Es así como, el incremento de la resistencia bacteriana, la creciente preocupación internacional sobre la calidad de los alimentos y las presiones de grupos ecologistas que amenazan con restricciones a los productos en los cuales se utilicen sustancias que puedan afectar al medio ambiente, están generando que en la actualidad el empleo veterinario de los antibióticos sea revisado (Subasinghe *et al.*, 1999).

Preocupaciones de este tipo han impulsado que instituciones gubernamentales de diferentes países tomen una serie de medidas, como el establecimiento de límites máximos de residuos (LMR) para los alimentos que ingresan por sus fronteras (GESAMP, 1997). Estos nuevos requerimientos, intentan asegurar la inocuidad de los productos provenientes de naciones donde las regulaciones veterinarias son irrespetadas.

La camaronicultura ecuatoriana, la cual exporta la mayor parte de su producción a Estados Unidos y Europa, se encuentra sometida a este tipo de controles, siendo necesario para asegurar el futuro de la industria el desarrollo de: a) protocolos de medicación que aseguren la ausencia de residuos químicos en los camarones y b) métodos analíticos que permitan determinarlos.

Uno de los focos de las preocupaciones gira alrededor de la aplicación de antibióticos, los cuales son empleados por el 100% de las camaroneras en el Ecuador (CENAIM, 1998). Dentro de estos, la oxitetraciclina, uno de los antibióticos más utilizados en el país y en la acuicultura a nivel mundial, ha sido objeto de numerosos estudios destinados a evaluar su residualidad en peces y crustáceos (Ueno *et al.*, 1999), así como al desarrollo y optimización de las técnicas de detección y cuantificación (FDA, 1998).

Tradicionalmente los residuos de medicamentos presentes en una gran variedad de muestras biológicas han sido determinados mediante métodos microbiológicos, sin embargo, hace más de una década, es reconocida la mayor especificidad y sensibilidad de los métodos cromatográficos para este tipo de análisis (Medina, 1994).

De esta forma, la presente investigación pretende mediante el desarrollo de una técnica cromatográfica utilizando un sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), estudiar en un bioensayo la acumulación y pérdida de la oxitetraciclina en el camarón *Penaeus vannamei*, empleando una de las principales técnicas de medicación en acuicultura, es decir, el suministro de antibióticos vía el alimento balanceado.

1. ANTECEDENTES

1.1. ANTIBIÓTICOS

1.1.1. Generalidades

La antibiosis es el mecanismo mediante el cual un microorganismo es capaz de inhibir o suprimir las funciones vitales de otro microorganismo. Este concepto, contrario al de simbiosis, fue postulado en 1877 por Pasteur y Joubert, quienes, basados en los resultados de sus investigaciones, llegaron a la conclusión de que entre las especies inferiores, la vida es capaz de destruir a la vida (Goodman *et al.*, 1981).

A pesar de que Pasteur y Joubert especularon sobre la singular importancia de sus observaciones en el futuro control de las enfermedades originadas por infecciones bacterianas, no llegaron a conocer los mecanismos ni los compuestos involucrados en los procesos que describieron (Goodman *et al.*, 1981).

Aproximadamente 30 años después, Paul Erlich planteaba la existencia de unas “balas mágicas” capaces de encontrar y eliminar a los patógenos sin afectar al huésped portador de la infección. Las ideas de este científico fueron la base para el futuro concepto de quimioterapia (Litter, 1973 *fide* Tortora *et al.*, 1998).

Posteriormente, Alexander Flemming observó en 1928 como el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* que cultivaba, fue inhibido por un tipo de moho que había

contaminado accidentalmente una sección de la caja Petri utilizada. El investigador analizó detenidamente el cultivo para tratar de entender que había impedido el crecimiento de las bacterias. Este acierto, junto con la identificación del moho causante de la inhibición: *Penicillium notatum*, y el posterior aislamiento del compuesto activo responsable de la antibiosis, generaron el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina (Tortora *et al.*, 1998).

Doce años después, un grupo de científicos de la Universidad de Oxford, comenzaba a buscar las especies de *Penicillium* más efectivas como fuente del antibiótico, una vez que habían conseguido tener éxito en las pruebas clínicas utilizando la droga en humanos. Poco después, la producción a gran escala de la penicilina había comenzado, marcando el inicio de la denominada “época dorada” de la medicina (Tortora *et al.*, 1998).

En la actualidad, desde el descubrimiento de la estreptomycinina en 1944, muchos otros antibióticos han sido obtenidos a partir de diferentes bacterias, actinomicetos y hongos. Más de la mitad de los agentes son producidos por *Streptomyces spp.*, género de bacteria filamentosa que habita comúnmente los suelos. También se han desarrollado los antibióticos semisintéticos, que resultan de alteraciones químicas de algunos antibióticos (Goodman *et al.*, 1981).

Si bien, actualmente existe una gran variedad de químicos antibacterianos, fueron los primeros antibióticos desarrollados los que permitieron frenar las masivas mortalidades causadas por enfermedades, tales como tuberculosis, fiebre tifoidea, difteria, entre otras

(Salysers & Whitt, 1994). Una de las principales razones que elevó la imagen de los médicos hasta su actual status de profesionales respetados, fue precisamente el hecho de que los antibióticos les permitieron combatir enfermedades que previamente eran incurables, en una época que fue considerada inicialmente como la era dorada de la medicina. No obstante, la aplicación de los antibióticos no estuvo libre de problemas y desventajas.

Los principales inconvenientes se han centrado en el uso indiscriminado de estos medicamentos y la consecuente generación de una amplia gama de bacterias quimiorresistentes (Threlfall, 1992).

La generalización de esta inefectividad sobre las bacterias, es producto de una serie de equivocaciones en la aplicación de los antibióticos. Entre las prácticas generalmente señaladas como responsables de este fenómeno, se cuentan (Ratdesky, 1998):

- a) Exceso de tratamientos profilácticos,
- b) Aplicación de antibióticos en casos que no ameritan (cualquier fiebre o resfrío),
- c) Desconocimiento de las dosis adecuadas (niveles subóptimos básicamente),
- d) Irrespeto de los tratamientos y automedicación por parte de los pacientes.
- e) Uso generalizado de los antibióticos en la cría de animales en cautiverio.

En la actualidad, la continua formación y propagación de cepas resistentes es una preocupación de carácter global. Para evitar el incremento de este problema, se han planteado diferentes soluciones, apoyadas en dos puntos fundamentales. El primero

consiste en campañas educativas, que concienticen a la población y a los profesionales responsables de las quimioterapias, sobre los riesgos que se corren si se mantienen las prácticas de medicación tradicionales. La segunda opción busca el desarrollo de nuevos antibióticos, especialmente de fuentes no tradicionales, tales como los océanos y ciertos vegetales y animales terrestres (Discover, 1999). El inconveniente de este enfoque radica en que las compañías farmacéuticas han recortado significativamente sus programas de investigación, debido a los altos costos que estos trabajos representan, y al hecho de que se necesitan alrededor de 20 años para que un antibiótico llegue al mercado, luego de haber sido descubierto (Salyers & Whitt, 1994).

Otras investigaciones que buscan reducir el empleo de químicos para el control de los microorganismos patógenos en humanos y animales, son aquellas dirigidas al desarrollo de los probióticos. Estos son células microbianas vivas que se administran como suplemento en la dieta con el objetivo de mejorar la salud (Tannock, 1997 *fide* Gatesoupe, 1999). En acuicultura, el uso de los probióticos es reciente (Kozasa, 1986), por lo que en la actualidad se están generando las publicaciones que científicamente intentan corroborar los resultados analizados empíricamente en las primeras pruebas (Gatesoupe, 1999).

De esta forma, se observa con claridad que soluciones inmediatas no se encuentran a la disposición, lo que ha obligado a las instituciones gubernamentales de control de diferentes países, a adoptar medidas regulatorias y restrictivas, que comiencen a detener la masiva y exagerada aplicación de los antibióticos a todo nivel. Salyers y Whitt (1994), mencionan en su libro, que es una realidad la presencia de bacterias patógenas resistentes

a casi todos los antibióticos en hospitales norteamericanos. Podría ser cuestión de tiempo para que estas cepas bacterianas adquieran inmunidad a los pocos agentes antimicrobianos aún efectivos contra ellas. Por lo tanto, el momento para actuar y comenzar a utilizar los antibióticos racionalmente es ahora, comentan los investigadores señalados, de lo contrario la humanidad posiblemente regresaría a la "Era pre-antibióticos".

1.1.2. Mecanismos de acción

En la naturaleza existe una gran variedad de antibióticos, desafortunadamente no todos pueden ser utilizados en los tratamientos de enfermedades infecciosas. Un aspecto a considerar es la toxicidad selectiva del fármaco, característica que radica en la inocuidad que debe tener el agente antimicrobiano sobre los tejidos del huésped (Goodman *et al.*, 1981).

Esta inocuidad sobre el organismo atacado por un patógeno, se explica porque los antibióticos actúan principalmente sobre procesos celulares particulares de las bacterias, mismos que a pesar de también presentarse en las células de humanos y animales (células eucarióticas), se diferencian de los realizados por las células bacterianas (procarióticas) en los aspectos básicos que se detallan a continuación:

a) *Generación de la pared celular:* recubrimiento de las bacterias, adicional a la membrana celular que rodea el citoplasma.

- b) *La síntesis de proteínas:* a pesar de ser igual en todas las células, se diferencia por la estructura de los ribosomas (maquinaria responsable del proceso) entre células procarióticas y eucarióticas.
- c) *Ciertos procesos metabólicos:* si bien pueden ser muy similares, se distinguen por la secuencia que siguen y los compuestos que utilizan.

Como se puede observar de lo descrito anteriormente, la mayoría de antibióticos ejercen sus efectos en el interior de las células. Esto determina que el primer obstáculo que deben traspasar estos fármacos, son la pared y la membrana celular del patógeno. Debido a que no todas las bacterias tienen el mismo tipo de pared celular, es importante revisar como estas diferencias pueden afectar el espectro de acción de un antibiótico determinado.

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y Gram positivas. Esta clasificación se basa exclusivamente en la habilidad de los microorganismos para teñirse superficialmente con un determinado colorante. Dicha capacidad está relacionada directamente con la estructura de la pared celular (Salyers & Whitt, 1994).

Las bacterias Gram negativas, a diferencia de las Gram positivas, poseen una pared celular de mayor complejidad, por lo que son más selectivas al permitir el paso de sustancias hacia su interior. Esta selectividad es válida para variadas sustancias, incluyendo a ciertos antibióticos. Las bacterias Gram positivas en cambio, poseen una pared celular más porosa, que permite el paso de compuestos de mayor tamaño. Esta

característica es responsable de que las bacterias Gram positivas sean susceptibles a una mayor variedad de antibióticos (Salyers & Whitt, 1994).

De esta forma, una primera clasificación de los antibióticos se da en función de su capacidad para atravesar la pared celular. Aquellos agentes antimicrobianos capaces de ingresar en la mayoría de bacterias patógenas, son denominados antibióticos de amplio espectro, contrariamente a los antibióticos de espectro reducido, caracterizados por tener un rango limitado de acción antibacteriana (Tortora *et al.*, 1998).

Otra clasificación de los antibióticos está vinculada por sus efectos sobre los microorganismos patógenos. Partiendo de esta premisa existen dos tipos de antibióticos: los bacteriostáticos, capaces de detener la multiplicación celular; y los bactericidas, caracterizados por originar la muerte de las bacterias. No obstante, esta división no es determinante, ya que el efecto de un antibiótico puede variar con relación a la dosis suministrada y al tipo de patógeno (Goodman *et al.*, 1981). Por esta razón, la clasificación más utilizada para agrupar a los antibióticos, está basada en sus principales mecanismos de acción.

1.1.2.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular

La forma e integridad de todas las bacterias es responsabilidad de la pared celular. Esta pared previene además la incontrolada expansión de la membrana celular producida por la constante captación de agua por procesos osmóticos.

A pesar de las diferencias estructurales entre la pared celular de las bacterias Gram negativas y positivas, ambos tipos están constituidos fundamentalmente por los peptidoglucanos. Consecuentemente, todos los antibióticos que trabajan deteriorando la estructura de los peptidoglucanos son bactericidas, ya que generan la lisis celular.

Entre los antibióticos más representativos de este grupo se encuentran las penicilinas, cefalosporinas y los glucopéptidos. La mayoría actúan sobre las bacterias Gram positivas (penicilinas y glucopéptidos), aunque algunos afectan particularmente a las Gram negativas (cefalosporinas).

Este tipo de fármacos ejerce sus efectos mediante dos mecanismos básicos; interfiriendo en los procesos enzimáticos que producen los peptidoglucanos, o también, activando las enzimas internas encargadas de destruirlos. Estas enzimas son propias de los microorganismos y son necesarias para viabilizar la mitosis (división celular).

Como las células humanas y animales carecen de paredes o membranas formadas por peptidoglucanos, la toxicidad de este tipo de antibióticos no perjudica significativamente a los tejidos del huésped (Tortora *et al.*, 1998). Inclusive, muchos mecanismos inmunitarios de defensa de una serie de animales, se basan en el reconocimiento de los peptidoglucanos bacterianos para atacar y fagocitar a los patógenos.

1.1.2.2. Lesión de la membrana plasmática

Este grupo de antibióticos altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana, interactuando con los fosfolípidos presentes en ella. Los efectos bactericidas de este tipo de drogas son inmediatos y producen la pérdida de importantes metabolitos intracelulares.

La polimixina es el agente antibacteriano más representativo de esta clasificación y concentra su acción sobre las bacterias Gram negativas, especialmente el género *Pseudomonas*.

1.1.2.3. Inhibición de la síntesis proteica

La síntesis de proteínas es una función vital, tanto en células eucarióticas como procarióticas. Este proceso se realiza exclusivamente en los ribosomas, componentes celulares que se encuentran dispersos en el citoplasma. Los ribosomas elaboran las proteínas celulares uniendo los distintos tipos de aminoácidos en una secuencia codificada en el ADN.

Cada ribosoma o unidad ribosomal está compuesto por dos subunidades desiguales. Svedberg desarrolló un sistema de comparación para diferenciar las unidades ribosomales y las subunidades que los conforman, basándose en su tasa de sedimentación durante una ultracentrifugación. Los valores obtenidos se determinan en función del

tamaño, forma y peso de los ribosomas y se simbolizan con la letra S (Tortora *et al.*, 1998).

Mediante esta caracterización, se puede explicar la inocuidad de los antibióticos de este grupo sobre las células del huésped, ya que las unidades ribosomales de células procarióticas y eucarióticas son estructuralmente diferentes, 70 y 80S respectivamente. De igual forma las subunidades que los conforman son distintas, 50 y 30S para células bacterianas y 60 y 40S para células animales y vegetales.

Los antibióticos que interrumpen la síntesis de proteínas, tienen efectos bacteriostáticos en su mayoría, aunque pueden llegar a ser bactericidas en concentraciones muy elevadas (Goodman *et al.*, 1981).

El sitio de acción de estos fármacos puede dirigirse a cualquiera de las dos subunidades ribosomales. Las tetraciclinas y los aminoglucósidos, por ejemplo, se unen a la porción 30S de los ribosomas; en cambio, los antibióticos pertenecientes al grupo de los macrólidos actúan sobre la subunidad 50S. El cloranfenicol es un antibiótico que también se adhiere a la porción 50S de los ribosomas bacterianos, no obstante, su uso no es generalizado, ya que puede tener efectos tóxicos al ser capaz de interferir en la producción de proteínas mitocondriales en los mamíferos (Goodman *et al.*, 1981).

La mayoría de estos agentes antibacterianos tienen un amplio espectro de acción. La eritromicina (macrólido) es una excepción, ya que no puede traspasar adecuadamente la

pared celular de las bacterias Gram negativas, concentrando su acción en las Gram positivas.

1.1.2.4. Inhibición de la síntesis o actividad de los ácidos nucleicos

Dentro de esta clasificación se incluyen una serie de antibióticos que interfieren en los procesos de replicación y transcripción de los microorganismos. Algunas drogas de este grupo no son de utilidad por su capacidad inhibitoria sobre la síntesis del ADN y ARN en células de mamíferos.

Las quinolonas y fluoroquinolonas, en cambio, tienen una mayor toxicidad selectiva. Son agentes bactericidas de relativo amplio espectro de acción (no afectan a bacterias anaerobias). Trabajan inhibiendo la actividad de la ADN-girasa, enzima esencial para la síntesis y plegamiento del ADN.

Por otro lado, las rifamicinas agrupa una familia de fármacos bactericidas, caracterizados por interferir en las funciones de la ARN-polimerasa, enzima responsable de la síntesis del ARN.

1.1.2.5. Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales

Las enzimas son compuestos que catalizan las reacciones químicas, actuando con una determinada sustancia (sustrato) para producir un complejo. Son catalizadores muy eficientes y reconocen a los sustratos específicamente. En este sentido, antibióticos que

sean estructuralmente similares a ciertos sustratos enzimáticos, pueden interferir en el normal desarrollo de una reacción.

Por ejemplo, el ácido fólico (PGA) es una vitamina esencial que actúa como coenzima en la formación de algunos aminoácidos y en la síntesis de las bases pirimidínicas y purínicas de los ácidos nucleicos. Compuestos como las sulfonamidas previenen la formación del PGA, por ser análogas del ácido para-aminobenzoico (PABA), precursor en este importante proceso. Como la síntesis del PGA es común en una extensa gama de microorganismos, este tipo de agentes presentan un amplio espectro de acción.

Ormetropin es otro antibiótico dentro de esta clasificación, que ha demostrado tener un importante efecto sinérgico cuando actúa en conjunto con ciertas sulfonamidas. La toxicidad selectiva de estos antibióticos radica en la imposibilidad que tienen los animales superiores de sintetizar el ácido fólico.

1.1.3. Tipos de Antibióticos

Los principales grupos de antibióticos y su mecanismo de acción son resumidos en la Tabla 1.

1.1.3.1. Tetraciclinas

Dentro de los antibióticos desarrollados por la ciencia médica, aquellos que se caracterizan por poseer un amplio espectro de acción y una elevada toxicidad selectiva,

han sido preferidos. Las tetraciclinas, al cumplir con estos dos requisitos, se mantienen como uno de los grupos de antibióticos mayormente utilizados.

Tabla 1. Principales tipos de antibióticos

Familia	Antibiótico	Mecanismo de acción
β-lactanos	Penicilina G	Inhibición de la síntesis de la pared celular
	Gentamicina	
Glicopéptidos	Vancomicina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Aminoglucósidos	Kanamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas
	Gentamicina	
Tetraciclinas	Tetraciclina	Inhibición de la síntesis de proteínas
	Clortetraciclina	
	Oxitetraciclina	
Macrólidos	Eritromicina	Inhibición de la síntesis de proteínas
Quinolonas	Ácido nalidíxico	Inhibición de la replicación del ADN
	Ácido oxolínico	
	Flumequina	
	Sarafloxacina	
	Norfloxacina	
Sulfonamidas	Ácido aminobenzoico	Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales
	Sulfonamida	
	Cloranfenicol	
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas

Adicionalmente, los reducidos niveles de toxicidad de estos medicamentos, han facilitado su administración por la vía oral y han permitido también que sean aplicados inclusive para el tratamiento de infecciones superficiales de la piel (tratamiento del acné).

Desafortunadamente, estas son las características que han difundido su empleo y abuso en las prácticas médicas (Tortora *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas han sido también ampliamente utilizadas como promotores de crecimiento y como terapéuticos en la cría de animales en cautiverio. En la actualidad, más del 65% de los antibióticos prescritos para los tratamientos veterinarios dentro de la Comunidad Europea, 2294 de 3494 toneladas, pertenecen al grupo de las tetraciclinas (Kühne *et al.*, 2000).

1.1.3.1.1. Historia

El desarrollo de las tetraciclinas fue el resultado de una selección sistemática de muestras de suelos recogidas en muchas partes del mundo en busca de microorganismos productores de antibióticos. El primero de estos compuestos, la clortetraciclina, se introdujo en 1948, dos años después se conoció la oxitetraciclina. La elucidación de la estructura química de estos agentes confirmó su semejanza y sirvió de base para la producción de un tercer miembro del grupo, la tetraciclina. Estos tres miembros del grupo, son conocidos como las tetraciclinas clásicas.

Posteriormente, a partir de 1957 se desarrolló una nueva familia de tetraciclinas, la primera de ellas, la demeclociclina, se incorporó al uso general en 1959. La metaciclina, derivado de la oxitetraciclina, se introdujo en 1961, la doxiciclina en 1966 y la minociclina en 1972 (Goodman *et al.*, 1981).

1.1.3.1.2. Origen

La clortetraciclina y la oxitetraciclina son elaboradas por *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*, respectivamente. La tetraciclina se produce semisintéticamente a partir de la clortetraciclina, aunque también se ha obtenido de una especie de *Streptomyces*. La democlociclina es el producto de un mutante de la cepa de *Streptomyces aureofaciens* de la que se obtuvo por primera vez la clortetraciclina. Metaciclina, doxiciclina y minociclina son derivados semisintéticos.

1.1.3.1.3. Química

La estructura característica de este grupo de antibióticos, cuatro anillos aromáticos, es la que les confiere su denominación. Sus bases cristalinas son compuestos ligeramente amarillos, inodoros y algo amargos. Son poco solubles en agua a pH 7, pero forman sales de sodio y clorhidratos solubles de color amarillo más intenso. Aunque las bases y los clorhidratos son muy estables en forma de polvo seco, casi todos estos agentes pierden actividad antimicrobiana con relativa rapidez cuando están en solución, debido a la formación de epímeros (epi-tetraciclinas).

La habilidad de las tetraciclinas para formar complejos con cationes di- y trivalentes es largamente conocida (Albert, 1953 *fide* Lunestad & Goksoyr, 1990). Esta característica es más pronunciada en los miembros hidrofílicos del grupo, tetraciclina y oxitetraciclina. Esta particularidad, junto con la alta fotosensibilidad de estos antibióticos, son factores que reducen significativamente su actividad antimicrobiana.

1.1.3.1.4. Acción

Para entender el mecanismo de acción de las tetraciclinas, hay que revisar el proceso de síntesis de las proteínas, este se da cuando los aminoácidos son conducidos por el ARN de transferencia (ARNt) hacia la subunidad 30S del ribosoma. En este sitio, los aminoácidos se irán encadenando de acuerdo al tipo de proteína que se esté formando. Este orden está determinado por las instrucciones codificadas en el ARN mensajero (ARNm), el cual es capaz de reconocer a cada ARNt de acuerdo a una secuencia específica que posee para cada tipo de aminoácido.

Las tetraciclinas inhiben este proceso, interfiriendo en la unión del ARNm con el complejo ARNt + aminoácido reconocido, impidiendo la formación de la cadena proteica. De esta forma, las bacterias no podrán replicarse al no poder sintetizar nuevas proteínas, aunque no morirán.

En lo referente al espectro de acción de las tetraciclinas, este abarca una amplia gama de microorganismos, donde se incluyen: bacterias Gram negativas y Gram positivas, rickettsias (bacterias intracelulares), micoplasmas, micobacterias y espiroquetas, virus grandes, actinomicetes y plasmodium.

1.1.4. Oxitetraciclina (OTC)

Llamada también Terramicina, tiene un peso molecular de 460.4 en forma de polvo seco ($C_{22}H_{24}N_2O_9$). Dos de sus presentaciones más comunes son el dihidrato y el clorhidrato.

aunque esta última es mayormente utilizada por su alta hidrosolubilidad. Otra forma comercial del antibiótico, caracterizada contrariamente por su baja solubilidad en el agua, es la sal de amonio mono alquilo trimetilo.

La estabilidad del clorhidrato de oxitetraciclina en soluciones acuosas depende de algunos factores, como la alcalinidad y la temperatura. Por ejemplo, a pH 3 – 9 y a una temperatura de 5 °C permanece estable durante 4 semanas (Dawson *et al.*, 1990). En cambio, a mayor temperatura (25 °C) puede mantener su actividad por el mismo tiempo siempre y cuando el pH se encuentre entre 1 y 2.5 (The Merck Index, 1989).

Las demás características de la OTC serán tratadas ampliamente en los siguientes capítulos de este trabajo.

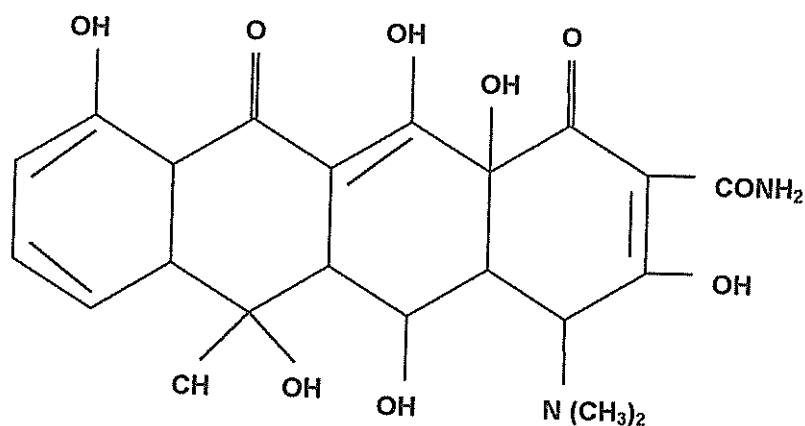


Figura 1. Estructura química de la oxitetraciclina.

1.2. MEDICACIÓN EN ACUACULTURA

Cuando se cultivan animales de forma intensiva, las enfermedades que naturalmente están presentes en las poblaciones salvajes, se vuelven más evidentes en los sistemas de producción. Condiciones estresantes junto con una mayor probabilidad de transmisión de las infecciones debido a las densidades de cultivo, brindan a los patógenos una situación ventajosa sobre el huésped. Adicionalmente, siendo el agua un medio apropiado para la transmisión de microorganismos, las enfermedades infecciosas representan un factor determinante en el éxito de cualquier sistema acuícola.

A diferencia de la producción ganadera por ejemplo, donde cada animal es una unidad valiosa y la viabilidad de los tratamientos preventivos o terapéuticos individuales se basa en un retorno económico importante, en acuicultura generalmente, el valor de cada pez o crustáceo no justifica inversiones en manejos veterinarios individuales. De esta forma, los tratamientos suelen realizarse sobre toda la población, ya sea tratando el agua cuando los volúmenes lo permiten, o mediante dietas medicadas, técnica reconocida como la forma más práctica de suministrar antibióticos y demás drogas a los animales (Alderman, 1988).

No obstante, el uso de químicos en el cultivo de peces estuvo relacionado inicialmente a los intentos de controlar los ectoparásitos con sal (cloruro de sodio), y al empleo de formalina para aquellas infecciones donde los baños salobres no frenaban las infecciones. El uso de compuestos antimicrobianos se inició con el trabajo de Gutsell en 1946, quien

reconoció la efectividad de las sulfonamidas para combatir la furunculosis en peces (Austin & Austin, 1987).

Poco después, una vez que los antibióticos estuvieron disponibles para la medicina humana y la veterinaria, se observó una rápida expansión de su uso en estaciones piscícolas, luego de comprobar su reducida toxicidad y su efectividad. Estas prácticas incluyeron inicialmente al cloranfenicol en 1950 y a la oxitetraciclina (OTC) en 1951; tan solo un año después de la introducción de este último en el mercado (Alderman, 1988).

Posteriormente, el surgimiento de la resistencia bacteriana impulsó nuevamente el interés por desarrollar vacunas, el cual había sido temporalmente rezagado por la efectividad mostrada por los antibióticos. Luego de muchos años de investigación se pudo reducir significativamente el empleo de estos químicos, gracias a la introducción de nuevas vacunas y prácticas sanitarias mejoradas en industrias tradicionales, tales como las del cultivo de salmónidos (Alderman & Hastings, 1998).

Un ejemplo de este comportamiento puede observarse en la piscicultura noruega, industria que en 1991 redujo aproximadamente hasta la mitad el total de antibióticos consumidos 4 años antes (49 TM). Esto fue posible luego del desarrollo de una vacuna eficaz contra el patógeno (*Vibrio salmonicida*) responsable de la mayor parte de las prescripciones de 1987. Más tarde, la introducción de vacunas con antígenos en contra de la furunculosis en el año de 1993, logró que para 1996 la acuicultura noruega haya sólo empleado 1.04 TM de antibióticos (Grave *et al.*, 1999).

Una situación diferente se vive en las naciones donde la acuicultura es una actividad joven o donde las regulaciones sobre el uso de químicos son limitadas. En estos países, el acelerado incremento de la producción no fue de la mano con el desarrollo de tecnologías y prácticas veterinarias sustentables, tal como fue el caso de la camaronicultura ecuatoriana (Baptista, 1998).

1.2.1. Objetivos del tratamiento

La clara definición de los objetivos perseguidos al momento de aplicar químicos antimicrobianos, es una de las bases para desarrollar una correcta estrategia de medicación. Para combatir diversas bacterias patógenas se han clasificado dos tipos principales de tratamientos: profilácticos y terapéuticos. Las variables que los diferencian se centran en la duración del tratamiento, la dosis del fármaco y el estado de la enfermedad.

1.2.1.1. Tratamiento profiláctico

Es una estrategia que utiliza la aplicación rutinaria de uno o varios antibióticos antes de que los signos clínicos de la enfermedad sean detectables. Usualmente la utilización de este tipo de régimen intenta evitar el ataque de infecciones comunes mediante dosis bajas durante períodos relativamente prolongados.

Ventajas

- a) Minimizan la posibilidad de una infección.
- b) Aminoran el riesgo de una reducción en el consumo de alimento (importante en la medicación oral) por la falta de apetito de los animales enfermos.
- c) Permiten la adquisición temprana de los antibióticos, evitando la pérdida de tiempo originada por la compra y transporte de los químicos.
- d) No requieren de un diagnóstico previo.

Desventajas

- a) Incrementan el riesgo de generar resistencia bacteriana.
- b) Los procedimientos suelen transformarse en rutinas de manejo, dejando de lado el análisis de la verdadera necesidad y efectividad de los antibióticos.
- c) Si no se monitorean los resultados del tratamiento, se puede transformar en un costo adicional innecesario.

1.2.1.1.1. Promotores de crecimiento

El incremento de la tasa de crecimiento en los animales criados en cautiverio (del 3 al 9%), así como la reducción de la conversión alimenticia (del 3 al 12%), debido al suministro de dosis subterapéuticas de antibióticos, es uno de los argumentos que intenta justificar el empleo de fármacos bajo conceptos profilácticos (Corpet, 2000).

En un reporte inicial, aves de corral a las que se les incluía agentes antimicrobianos en el agua, mostraron un incremento de peso más acelerado, alcanzando las tallas comerciales antes que los animales desprovistos del tratamiento (Herwig, 1979).

Este tipo de resultados impulsaron estudios similares en cultivos acuícolas. Ahmad y Matty (1988) observaron un mayor aumento de peso y longitud en la carpa (*Cyprinus carpio*) al utilizar virginiamicina como aditivo en la dieta artificial. Suministrando el mismo fármaco, Treviño *et al.* (1995), intentaron corroborar el efecto promotor del antibiótico en *Penaeus vannamei*, no obstante, no detectaron diferencias significativas en los valores de supervivencia y crecimiento. En el bagre de canal, dietas medicadas con niveles preventivos de OTC y Romet-30[®] (sulfadimetoxina-ormetropin; Roche), no produjeron un aumento en la ganancia de peso en comparación con los controles (Rawles *et al.*, 1997). De igual forma, el consumo de una dieta con 250 mg de OTC y 250 mg de sulfametazina por kg de balanceado, no generó ningún beneficio adicional en la tasa de crecimiento del *P. monodon* (Higuera-Ciajara *et al.*, 1991).

El incremento del aprovechamiento del alimento, es la hipótesis mas común para explicar el efecto promotor de las dosis subterapéuticas de ciertos fármacos en la producción pecuaria. A su vez, varios mecanismos involucrados en este proceso han sido sugeridos, aunque siguen siendo especulativos (Corpet, 2000; Visek, 1978 *fide* Treviño *et al.*, 1993). Entre estos se cuentan:

- a) Reducción de la producción de toxinas microbianas depresoras del crecimiento. ✓
- b) Reducción de la destrucción microbiana de los nutrientes esenciales en el tracto digestivo. ✓
- c) Aumento en la absorción y utilización de los nutrientes. ✓
- d) Eliminación de bacterias que compiten por los nutrientes. ✓
- e) Reducción del grosor de la pared intestinal. ✓

De todas formas, este tipo de prácticas, antes que generar más estudios que aclaren su verdadera utilidad como estimuladores del crecimiento, están siendo revisadas, debido al reconocido riesgo que representan para la salud humana, especialmente en lo referente a la generación de bacterias resistentes. Por ejemplo, en muchos países europeos la práctica del uso de antibióticos y promotores de crecimiento sintéticos para mejorar el desempeño animal está prohibida (Feedings Times, 2000).

1.2.1.2. Tratamiento terapéutico

Se basa en el empleo de los medicamentos una vez que se ha confirmado la presencia de los signos clínicos de la enfermedad. De forma contraria a la prevención, estos métodos curativos se aplican por lapsos cortos y con mayores concentraciones de uno o más antibióticos.

Ventajas

- a) Pueden reducir la mortalidad.
- b) Minimizan el riesgo de generar cepas resistentes.

Desventajas

- a) Los tratamientos pueden llegar a ser tardíos.
- b) Requieren un diagnóstico temprano.

1.2.2. Prácticas veterinarias tradicionales

Al momento de combatir un patógeno, es importante definir el sitio donde se requiere la acción bacteriostática o bactericida de las drogas; ya sea en el huésped o en el medio que lo rodea. En acuicultura, junto con el establecimiento de los objetivos del tratamiento, se requiere establecer el sitio donde se ubica el patógeno, en los animales o en el medio de cultivo. Para ambos casos existe una variedad de métodos, los cuales son escogidos principalmente por su practicidad en cada uno de los diferentes sistemas de cultivo y especies con que se trabaja. A continuación se revisan las características de las principales técnicas de medicación.

1.2.2.1. Baños

Es una práctica común en acuicultura, debido básicamente a su simpleza, aunque se limita al uso de antibióticos hidrosolubles. Se emplea para eliminar o reducir el número de bacterias presentes en el agua o, como herramienta para suministrar agentes antimicrobianos cuando otros métodos no son viables. Por ejemplo, cuando la administración por vía oral no es posible; debido al estadio del animal o por el tiempo que involucra la preparación del alimento medicado. Sin embargo, en ocasiones los baños no son una alternativa factible, especialmente cuando se trabaja con grandes

volúmenes de agua, donde su uso resulta muy costoso y poco compatible con el medio ambiente.

Dentro de este tipo de terapias, existen dos variantes principales: la inmersión y el reflujo. La primera utiliza concentraciones elevadas del fármaco durante un tiempo reducido, normalmente en sistemas independientes. El segundo, por lo contrario, suele realizarse en el mismo sistema de producción, mientras el ingreso constante de agua disuelve la concentración inicial del antibiótico. Este tipo de tratamientos son preferentemente empleados con químicos desinfectantes.

1.2.2.2. Administración Parenteral

La inyección de soluciones antibióticas es una alternativa poco viable en la mayoría de cultivos acuícolas. La cantidad y el tamaño de los animales, son los principales factores limitantes, inclusive a pesar de trabajar con un número reducido de organismos de tamaño adecuado, el estrés provocado por la captura y la punción suele limitar el uso de esta técnica.

No obstante, los estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad de diferentes antibióticos en peces (Abedini *et al.*, 1998; Uno, 1996; Uno *et al.*, 1997) y crustáceos (Park *et al.*, 1995), han preferido el tratamiento parental como herramienta para estudiar la distribución de los fármacos en los organismos, debido ha que a diferencia de otros métodos, permite conocer con relativa certeza la real cantidad de droga suministrada inicialmente.

1.2.2.3 Administración Oral

Así como en la medicina humana, es el método de medicación preferido. La generalidad de prácticas se basa en la inclusión del agente antimicrobiano en el alimento, aunque existen otras posibilidades menos comunes. La ingestión voluntaria o forzada de tabletas (Takahashi *et al.*, 1985) y la inducción a la toma de agua por la pérdida de líquidos corporales, mediante baños medicados hipersalinos (Herwig, 1979), han sido reportadas.

1.2.2.3.1. Dieta seca

Permite suministrar antibióticos a grandes poblaciones, sin requerir mayores modificaciones en las operaciones estándares del sistema de cultivo. Se pueden utilizar fármacos hidrosolubles, aunque son más recomendables aquellos compuestos insolubles en agua. Un importante aspecto de esta técnica, es la reducción de las interacciones droga-medio de cultivo, al aislar en parte el antibiótico de la carga orgánica e inorgánica del agua.

Existen dos formas básicas de incluir antibióticos en las dietas secas. Recubrir el alimento con el fármaco o, mezclar el agente antes de la compactación del pellet. El primer método es práctico cuando se escogen fármacos altamente susceptibles a las temperaturas generadas en los procesos de peletización: 75 – 95 °C (Cuzon *et al.*, 1994). La preparación requiere de un mediador que incremente la eficacia del revestimiento. Se suelen utilizar diferentes agentes aglutinantes, tales como el aceite de hígado de bacalao, alginatos, almidón, entre otros. Un aspecto positivo de esta técnica

radica en que el recubrimiento puede ser realizado en la misma estación de cultivo, permitiendo una respuesta terapéutica relativamente rápida. Sin embargo, las pérdidas que se producen por la lixiviación del antibiótico en el agua son importantes.

La inclusión de los químicos antibacterianos en el proceso de elaboración de las dietas es la otra opción disponible. Si bien, se esperan menores pérdidas por lixiviación, la degradación térmica del fármaco y la posible quelación con los ingredientes de la formulación que se da durante la elaboración del alimento, así como el tiempo que representa el traslado de las dietas, suelen reducir la efectividad del tratamiento.

1.2.2.3.2. Alimento vivo

Es una técnica donde el antibiótico es bioencapsulado en organismos normalmente utilizados como fuente de alimento: *Artemia sp.*, rotíferos y nemátodos, principalmente (Mohney *et al.*, 1990). Esta es una técnica muy útil cuando se requiere medicar de forma directa estadios tempranos de especies acuáticas, especialmente con químicos insolubles en agua. No obstante, el uso de mediadores (Touraki *et al.*, 1995) y emulsiones (Dixon *et al.*, 1998; Roque *et al.*, 1998; Touraki *et al.*, 1996) para bioencapsular drogas en la *Artemia sp.*, ha sido reportado a nivel investigativo.

1.2.3. Antibióticos en el cultivo de camarón

La captura de camarón marino ha sido relativamente constante a partir de 1985, 2'000,000 de TM/año; fruto de haber alcanzado los rendimientos máximos de los océanos (Krauss *et al.*, 1998).

La contribución de la acuicultura a la producción mundial del crustáceo en 1985 fue de 210,000 TM. En cambio, para 1998 este monto se triplicó (660,200 TM), reflejando el acelerado crecimiento de la industria a nivel mundial. Un ejemplo de esta tendencia es el Ecuador, país que exportó en 1985 tan solo un equivalente al 15% de su producción total de 1998 (Krauss *et al.*, 1998).

Este dinámico inicio de la actividad, no permitió el desarrollo de respuestas eficientes y comprobadas, cuando surgieron los problemas patológicos. Para el caso de las infecciones bacterianas, el uso de antibióticos fue la herramienta escogida (Lightner, 1983). Esta situación fue común en cada una de las fases del cultivo del camarón; como se desprende de la siguiente revisión.

1.2.3.1. Maduración

Pobre es la información que existe sobre el empleo de antibióticos en las instalaciones de producción de nauplios de peneidos. Agentes desinfectantes, tales como la formalina y el yodo, son ampliamente utilizados para la limpieza externa de los huevos (Brock & Main, 1994). En las instalaciones del CENAIM se ha incluido OTC en el pellet de

maduración para tratar exitosamente vibriosis severas en los reproductores de *Penaeus vannamei* (Mendoza, com. pers.)

1.2.3.2. Larvicultura

Dentro de las bacterias marinas, los vibrios son identificados como uno de los principales patógenos en la larvicultura de peneidos (Brock & Main, 1994). Lamentablemente, cuando problemas infecciosos se presentan, urgen determinaciones rápidas debido a la velocidad con la que se desarrollan las patologías. Los resultados de los análisis toman de 24 a 36 horas, lo que se considera un tiempo excesivo para tomar decisiones. Ante esta situación la mayoría de laboratorios productores de postlarvas recurre a los antibióticos (Peeters & Rodríguez, 1999).

Oxitetraciclina, furazolidona, eritromicina, cloranfenicol y ácido oxolínico son los antibióticos más utilizados en los laboratorios de larvas ecuatorianos (CENAIM, 1999). Los baños representan la forma de tratamiento casi exclusiva, debido principalmente al reducido tamaño de las larvas y al poco interés por desarrollar nuevos métodos.

A pesar de que Brock y Main (1994) recomiendan de entre 5 a 25 ppm de OTC para controlar la vibriosis en larvas y postlarvas de camarón, y que Stuck y colaboradores (1992) señalan que larvas de *P. vannamei* tuvieron una mejor tasa de crecimiento al ser sometidas a un tratamiento profiláctico de 25 y 50 ppm de OTC en el último estadio naupliar, el 73% de los laboratorios ecuatorianos emplean regularmente dosis de entre 1 y 2 ppm del medicamento como estrategia de manejo preventivo (CENAIM, 1998).

Por otro lado, Williams y colaboradores (1992), estudiaron la toxicidad de 11 antibióticos en larvas de *P. vannamei*, encontrando los niveles letales (LC50) y tóxicos (EC50; mortalidad + letargia) para el 50% de la población después de 24 horas de exposición (Tabla 2). La OTC resultó ser el segundo medicamento mas seguro, luego de una fluoroquinolona no especificada.

Tabla 2. Concentraciones de OTC tóxicas para larvas de *P. vannamei* (Williams *et al.*, 1992)

Estadio	LC50 ($\mu\text{g OTC.mL}^{-1}$)	EC50 ($\mu\text{g OTC.mL}^{-1}$)
Nauplio 1	> 160	> 160
Zoea 1	135.7	61.1
Zoea 3 – Mysis 1	238.4	214.1
Mysis 1	> 160	> 160
Postlarva 1	> 160	> 160

En lo referente a resultados obtenidos por investigadores nacionales, Intriago (1998) comenta que con 40 ppm de OTC se obtuvo un 100% de desinfección bacteriana en nauplios de *P. vannamei*, acompañado por una ligera reducción en la supervivencia del 6.5%.

Claramente se observa, que la aplicación de antibióticos en la larvicultura ecuatoriana de peneidos, es un área que no se ha beneficiado de la información publicada tanto internacional, como nacionalmente.

1.2.3.3. Engorde

En el país, el sistema semi-intensivo es aplicado en la mayoría de las 200,000 hectáreas disponibles para el cultivo del crustáceo. Caracterizado por siembras iniciales de entre 80,000 y 150,000 postlarvas/ha, el sector fundamenta buena parte del crecimiento animal en el suministro de alimento balanceado.

Según los resultados de la encuesta realizada por el CENAIM en 1998, la totalidad de las aproximadamente 1,800 camaroneras utilizan antibióticos en la formulación del alimento, siendo preferidos los métodos preventivos por el 60% de las empresas. Las formas genéricas de OTC, cloranfenicol y furazolidona se cuentan entre los antibióticos más usados, en tanto que las quinolonas, sulfonamidas y algunas tetraciclinas se comercializan bajo diferentes marcas (Peeters & Rodríguez, 1999).

En lo referente a los patógenos, los principales responsables de enfermedades infecciosas en los estanques de engorde son las bacterias del género *Vibrio* junto con las bacterias tipo-rickettsias (Lightner, 1996). El “Síndrome de la Gaviota” en 1989–1990 y la hepatopancreatitis necrotizante (HPN) en 1993–1995, originadas por vibrios y bacterias intracelulares, respectivamente, dieron fuertes golpes a la industria camaronera ecuatoriana (Jiménez, 1997). Identificados los agentes causales de las patologías, el tratamiento aplicado consistió en la inclusión de antibióticos en la dieta.

No obstante, pruebas de resistencia llevadas a cabo con los microorganismos responsables de la vibriosis han demostrado la sensibilidad que poseían ante la OTC, el

ácido oxolínico, la nitrofurantoina y el Romet 30[®] (Mohney *et al.*, 1994). En cambio, la OTC resultó ser el arma más efectiva contra las rickettsias (Frelier, 1995).

Brock y Main (1994), recomiendan dietas medicadas con 1.6 g OTC/kg alimento durante 10 a 14 días para juveniles y adultos de peneidos infectados por vibrios. Por otro lado, para HPN los tratamientos con 3 g OTC/kg dieta durante 14 días (Frelier, 1995), o 2.5 – 4 g/kg dieta durante 7 – 10 días (Jiménez, 1995), han sido recomendados especialmente cuando se ha diagnosticado tempranamente la enfermedad.

En el Ecuador, las concentraciones más comunes de OTC en las dietas medicadas se encuentran entre 1 y 5 ppt, utilizándose mayoritariamente la sal en forma de clorhidrato (Peeters & Rodríguez, 1999). Sin embargo, el sector productor nacional en momentos de apremio, ha aplicado dosis de hasta 7 y 8 ppt de OTC en el alimento, de forma muy similar como lo hicieron los camaroneros tailandeses (Chanratchakool *et al.*, 1995).

Si bien no existen estadísticas, la OTC ha dejado de ser en la actualidad el antibiótico preferido por la industria camaronera para el tratamiento de infecciones bacterianas; debido al incremento de la resistencia bacteriana y a la comercialización de nuevos antibióticos. Sin embargo, su eficacia en el combate de las rickettsias la mantendrá vigente.

1.3. PROBLEMÁTICA DEL USO DE ANTIBIÓTICOS

En este numeral se tratarán las principales características de un antibiótico junto con los factores que deben tomarse en cuenta si se desea efectuar una medicación efectiva. La influencia de factores ambientales tales como, la temperatura e intensidad luminosa, sobre la estabilidad, efectividad, hidrosolubilidad y residualidad del fármaco, por ejemplo, serán tratados. Lamentablemente, varios son los puntos que deben analizarse a la vez, lo que hace que el empleo de antibióticos sea relativamente complejo.

Más adelante, se tratarán puntualmente los dos principales inconvenientes que se generan por la equivocada aplicación de los antibióticos: la resistencia bacteriana y la presencia de residuos en los alimentos.

1.3.1. Factores influyentes en la eficacia de los métodos

Representantes del Departamento de Pesquerías de la FAO (Food and Agricultural Organization), comentaron en la conferencia mundial de acuicultura organizada por la World Aquaculture Society en Sidney-Australia, que la mayoría de antibióticos utilizados en acuicultura no parecen representar un riesgo potencial para la salud humana y el ambiente, mientras sean aplicados de forma técnica (Subasinghe *et al.*, 1999).

Sin embargo, para ciertos antibióticos comunes en las prácticas veterinarias acuícolas, se han generalizado una serie de regulaciones y restricciones sanitarias a nivel mundial.

Estas han sido impulsadas por la forma inaceptable como se han manejado las enfermedades infecciosas en la industria, donde se han reconocido como puntos perjudiciales (Subasinghe *et al.*, 1999):

- a) La escasez de personal capacitado
- b) El abuso de los métodos profilácticos
- c) La ausencia de regulaciones nacionales
- d) El insuficiente entendimiento del modo de acción
- e) La eficacia de ciertos fármacos

1.3.1.1. Características del antibiótico

La oxitetraciclina (OTC) posee ciertas propiedades físico-químico-biológicas que deben tomarse en cuenta a la hora de emplearla de manera preventiva o terapéutica.

1.3.1.1.1 Fotosensibilidad

La fotosensibilidad es el proceso mediante el cual un componente es alterado por acción de la luz visible (300 – 800 nm). Lunestad y colaboradores (1995), examinaron la fotosensibilidad de 8 soluciones antibióticas en tubos de cuarzo sumergidos un metro en agua de mar. La OTC perdió toda su actividad antibacteriana después de 7 días de exposición. Aunque en este trabajo no se tomaron en cuenta los valores de la temperatura, Samuelsen (1989) ha demostrado la influencia de la misma en el desarrollo del proceso fotodegradativo.

1.3.1.1.2. Formación de complejos

Se destacó con anterioridad la conocida habilidad de las tetraciclinas para formar complejos con cationes di y trivalentes. Considerando este hecho, Goodman *et al.* (1981) mencionaron que la pérdida de la actividad antibacteriana por parte de la OTC unida con los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} , debe producirse por la alteración de la carga molecular del antibiótico, lo que impide su paso a través de las membranas biológicas lipídicas, junto con la consecuente incapacidad de ingresar en las células bacterianas para actuar sobre los ribosomas.

Posteriormente, Lunestad y Goksoyr (1990) demostraron que al diluir OTC en concentraciones de 0.5 a 100 ppm en agua de mar, tan solo el 5% del antibiótico se mantiene libre, debido a que el restante 95% demostró su capacidad de quelación con los iones de calcio y magnesio presentes en el agua. Basados en estos resultados, los autores recomiendan que la preparación de medios de cultivo, destinados a determinar las concentraciones inhibitorias del fármaco en bacterias marinas, debe incluir un 70% de agua salada natural, de lo contrario, se subestimarán los resultados entre 4 y 32 veces.

Dentro del mismo tópico, Vaughan y Smith (1996) observaron una inactivación similar de la OTC en agua dulce ante la presencia de sedimentos disueltos. Aunque no plantean el probable mecanismo responsable de este proceso, sugieren la posibilidad de que la inhibición de la actividad antibacteriana del fármaco por la unión con iones o

sedimento, sea un proceso reversible, aunque al momento no hay datos que lo demuestren.

1.3.1.2. Cálculo de dosis

La estimación inicial del tipo de antibiótico y su dosis requerida para combatir un microorganismo específico, debe combinar la siguiente información:

- a) Mínima concentración inhibitoria (MIC, siglas en inglés) para los patógenos de interés.
- b) La farmacocinética y biodisponibilidad del antibiótico en el animal infectado.
- c) El conocimiento de la influencia de las variaciones ambientales en los dos primeros literales.
- d) El nivel tóxico de la droga en el animal, tomando en cuenta su estadio.

Sin embargo, el desconocimiento de estos datos, ya sea por la falta de interés o por el tiempo que se requiere para los análisis, no ha limitado la aplicación de dietas medicadas en la acuicultura.

1.3.1.3. Biodisponibilidad y farmacocinética

La biodisponibilidad de un antibiótico se refiere a la fracción del compuesto que es retenida en el organismo; mientras que la farmacocinética estudia la distribución del fármaco en los tejidos y fluidos del animal.

El conocimiento de estos parámetros es parte fundamental para obtener concentraciones medicinales apropiadas en los sitios de acción, ya que los niveles alcanzados dependen de (Goodman *et al.*, 1981):

- a) Cantidad de droga administrada
- b) Grado y velocidad de la absorción/distribución
- c) Deposición en los tejidos
- d) Biotransformación
- e) Excreción

En acuicultura el estudio de la farmacocinética y biodisponibilidad de la OTC en peces es amplio (Doi *et al.*, 1998; Namdari *et al.*, 1996 y 1999; Rogstad *et al.*, 1991; Uno *et al.*, 1992 y 1997). Mediante estos trabajos, los investigadores han reconocido que variaciones en las condiciones ambientales (temperatura y salinidad), ruta de administración, metodología de extracción-análisis, talla y especie del animal, entre otras, juegan un papel importante en la disimilitud de los datos de biodisponibilidad calculados para peces (Tabla 3). Igualmente, mencionan que factores como la alta capacidad que tiene el antibiótico de formar complejos con iones metálicos y proteínas del alimento, son los responsables de los bajos valores obtenidos (Abedini *et al.*, 1998; Elema *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1995).

En lo referente a crustáceos, Park *et al.* (1995) encontraron que la biodisponibilidad de la sulfadimetoxina y la ormetropina en el *P. vannamei* fue del 30 y 32%,

respectivamente. Estudios similares utilizando la OTC en algún otro tipo de peneido no han sido publicados hasta el momento.

Tabla 3. Biodisponibilidad de la OTC en peces luego de su administración por la vía oral.

Especie	Biodisponibilidad	Fuente
<i>Salmo salar</i>	2%	Elema <i>et al.</i> , 1996
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	30.3 %	Abedini <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24.84 %	Abedini <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	5.60%	Björklund & Bylund, 1991
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1.25%	Nouws <i>et al.</i> , 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	0.38%	Nouws <i>et al.</i> , 1992
<i>Cyprinus carpio</i>	0.60%	Grondel <i>et al.</i> , 1987

1.3.1.4. Preparación de dietas

La inclusión del antibiótico previo al proceso de peletización suele reducir el porcentaje de compuesto activo, debido al incremento de la temperatura que degrada y afecta de diferente manera a los distintos antibióticos. Para el caso de la OTC, Frelier (1995) menciona que la degradación del fármaco está influenciada por la humedad, presión y el tiempo de manufacturación del alimento, pudiéndose obtener pérdidas de entre el 10 y 40%. No obstante, las fábricas de alimentos balanceados suelen compensar este desperdicio agregando mayor cantidad de antibiótico a la mezcla inicial.

1.3.1.5. Palatabilidad

Es conocida la reducción en el consumo de alimento por parte de especies acuáticas sometidas a cambios en el tipo de dieta (Bell, 1992). Con más razón aún, se puede observar este fenómeno al utilizar antibióticos en el alimento, ya que estos disminuyen la palatabilidad del balanceado. Este efecto ha sido demostrado por Hustvedt *et al.* (1991), quienes determinaron una reducción del 61% en la captación de alimento medicado con OTC por parte de la trucha arco iris.

Estudios con el *P. aztecus* demostraron una decreciente captación de alimento en relación con una ascendente concentración de OTC en la dieta (Corliss *et al.*, 1977). Mohny *et al.* (1997) argumentan que uno de los motivos por los que juveniles de *P. stylirostris* consumen en menor medida pellets con 1.5 g de OTC/kg de balanceado en comparación con aquellos sin fármaco, es la disminución en la palatabilidad del alimento.

Tratando de reducir el impacto de este fenómeno, se han planteado una serie de recomendaciones:

- a) Detener la alimentación antes de iniciar el tratamiento, y así incrementar el apetito.
- b) Utilizar dietas de diferente composición, eligiendo aquellas con mayor grado de atractabilidad.
- c) Recubrir con sustancias atractantes (aceite de pescado calamar, por ejemplo) los pellets con el fin de enmascarar el efecto del fármaco.

1.3.1.6. Lixiviación

La medición de la tasa de lixiviación de los compuestos hidrosolubles de las dietas es un indicativo de su calidad (Lim & Cuzon, 1994). De igual forma, alimentos medicados que mantengan por mayor tiempo los antibióticos en su composición, permitirán un incremento en el aprovechamiento del tratamiento.

Varios factores influyen en la tasa de lixiviación de una droga. En el caso de la OTC, las pérdidas del medicamento desde el alimento balanceado han demostrado estar influenciadas por la temperatura, el pH y la relación volumen-área de los pellets (Fribourgh *et al.*, 1969 *fide* Duis *et al.*, 1995). En forma específica, Sermwatanakul y Ounkon (1997) señalan que el incremento de la lixiviación del antibiótico está relacionado con el aumento del área superficial del pellet y de la salinidad.

De las publicaciones sobre el tema, la mayoría describen trabajos en que la droga es utilizada como un recubrimiento medicinal. Pearson y Charatchakool (1994) determinaron una pérdida de OTC en la dieta artificial mayor al 40% después de 30 minutos de inmersión en agua salobre a 27 °C. De igual forma, un trabajo que comparó el efecto aglutinante del aceite de hígado de bacalao versus el alginato en dietas recubiertas con OTC, obtuvo pérdidas del 50.5 y 24.1%, respectivamente, después de 15 minutos de lixiviación en agua dulce a 12 °C, pH 6.5, con aireación constante (Duis *et al.*, 1995).

Recientemente, Rigos y colaboradores (1999) comprobaron como el alimento medicado pierde más OTC (47%) si esta es aplicada como recubrimiento del pellet junto con aceite de pescado, antes que si se la incluye en la mezcla (pérdida del 6%) después de haber permanecido 3 minutos en agua salada a 24 °C. Los autores concluyen que la inclusión del antibiótico en la mezcla de los ingredientes de las dietas origina una reducción importante en las pérdidas por lixiviación.

1.3.1.7. Estado del animal

Las quimioterapias curativas, a diferencia de las preventivas, deben tomar en cuenta el estado de salud del animal. Es frecuente la pérdida del apetito en peces enfermos. Uno (1996) determinó una reducción del 60% en la biodisponibilidad de la OTC en peces (*Plecoglossus altivelis*) infectados por vibriosis en comparación con los animales sanos. Para camarones se asumen efectos similares, aunque no existen publicaciones al respecto.

Dentro del tratamiento oral voluntario de camarones, poco se ha estudiado sobre la influencia del ciclo de muda en el consumo del alimento medicado. Los crustáceos se caracterizan por suspender su alimentación antes, durante y poco después de la exuviación. No obstante, los estudios destinados a cuantificar la acumulación y pérdida de antibióticos en peneidos sometidos a tratamientos orales (Bermúdez-Almada *et al.*, 1999; Corliss, 1979; Higuera-Ciapara *et al.*, 1991; Mohny *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1995), no han analizado el papel de la muda en la variación de los niveles corporales del fármaco.

1.3.2. Residualidad

La seguridad de los alimentos destinados al consumo humano, es un tema que en la actualidad ha sobrepasado las esferas científicas, llegando a ser una preocupación de los consumidores. La presencia de residuos de antibióticos en los animales comestibles y sus productos, ha generado que por ejemplo en Europa, algunos países soliciten la prohibición total del uso de estos químicos en la producción ganadera, avícola y porcina (Feedings Times, 2000).

Los residuos de antibióticos generan preocupación por dos razones básicas. Primero, por los posibles efectos tóxicos o alérgicos que tienen algunas de estas drogas sobre los humanos, y segundo, por el incremento de bacterias resistentes que su generalizado mal uso fomenta (Threlfall, 1992).

En acuicultura, la aplicación de antibióticos es probablemente el tema más controversial sobre el manejo de químicos en la industria (Golburg & Triplett, 1997), por lo que constantemente se están desarrollando y perfeccionando las metodologías para la determinación de sus residuos en especies cultivadas (Houglum *et al.*, 1998; Meinertz *et al.*, 1998; Stehly *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 1999).

Parte de las investigaciones han estudiado algunos de los efectos de los residuos químicos, señalando por ejemplo, como el uso de dietas medicadas incrementan las concentraciones de antibióticos en los sedimentos (Björklund *et al.*, 1991), al mismo

tiempo que fomentan la resistencia bacteriana (Kerry *et al.*, 1995) e inhiben el proceso de nitrificación (Klaver & Matthews, 1994).

No obstante, la mayor parte de los trabajos han sido enfocados a la cuantificación de los residuos en peces y crustáceos de interés comercial, considerándose dentro de estas el cálculo de los tiempos de retiro, necesarios para asegurar la eliminación del antibiótico del tejido muscular animal antes de la cosecha (Corliss, 1979; Du *et al.*, 1995; Mohney *et al.*, 1997; Xu & Rogers, 1995).

Otros en cambio, han estudiado la presencia de los fármacos en los productos que se expenden al público. Por ejemplo, entre octubre de 1990 y octubre de 1991 se detectó una incidencia de hasta el 37% de residuos de ácido oxolínico y OTC, en muestras de *P. monodon* obtenidas mensualmente de mercados en Bangkok (Saitanu *et al.*, 1994). De igual forma, presencia de niveles superiores a los permitidos de estos mismos antibióticos, fueron detectados en salmones y truchas comercializados en el Reino Unido (Woodward, 1996).

1.3.3. Resistencia bacteriana

La resistencia que han desarrollado las bacterias a uno o varios antibióticos fue explicada inicialmente como un mecanismo de defensa generada por estos microorganismos, a partir del uso masivo de los químicos antimicrobianos en la medicina. Sin embargo, la diversidad genética mostrada por los distintos tipos de resistencia, señala un proceso de evolución prolongado. Esto ha llevado a formular dos

hipótesis alternativas para explicar este fenómeno. La primera plantea que los genes de resistencia siempre se han encontrado presentes en las bacterias productoras de antibióticos, tales como *Streptomyces spp.*, con el único objetivo de protegerlas de sí mismas. La otra explicación indica que los genes de resistencia pudieron haber evolucionado a partir de genes responsables de funciones vitales en la célula, como por ejemplo, las proteínas que bombean las tetraciclinas fuera de las bacterias, pudieron haber evolucionado a partir de las proteínas encargadas del transporte de nutrientes (Salyers y Whitt, 1994).

No obstante, existe un consenso a nivel mundial sobre las razones del por qué la resistencia bacteriana es un problema en la actualidad. El uso indiscriminado de los antibióticos en la medicina humana, en la veterinaria, en la agricultura, en los productos caseros de limpieza, entre otros, es señalado como la principal causa que ha fomentado la selección de las cepas bacterianas más capacitadas para resistir el ataque químico.

Sumado a esto, la relativa facilidad con que las bacterias adquieren y transmiten los genes de resistencia, agrava el problema. Cepas de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* (patógenos humanos), han desarrollado resistencia a casi la totalidad de los antibióticos en algunos hospitales de los Estados Unidos (Ratdesky, 1998).

1.3.3.1. Adquisición de resistencia

Las bacterias pueden volverse inmunes a los antibióticos debido a la mutación de genes propios o, como en la mayoría de casos, por la obtención de nuevos genes. La adquisición de material genético ajeno puede darse por *transducción* vía bacteriófagos o por la toma de genes libres (transformación). Este tipo de procesos tiende a ocurrir entre bacterias de la misma especie, sin embargo la transferencia de resistencia entre diferentes géneros podría generar un problema clínico mayor. La *conjugación*, el traspaso de ADN por poros formados al unirse las membranas de dos bacterias, representa la mayor preocupación sobre el intercambio de resistencia entre microorganismos de diferente género, al poder transmitirse la resistencia a bacterias que no han sido expuestas previamente a los medicamentos.

Los principales elementos conjugativos son: los plásmidos y los transposones. Los plásmidos son pequeñas piezas circulares de ADN (1 – 5% del tamaño de un cromosoma bacteriano) caracterizados por su capacidad de autorreplicación y traslado entre células. Aquellos plásmidos que llevan genes de resistencia son denominados factores (R), y pueden contener genes de resistencia a una serie de antibióticos a la vez. Los transposones son pequeños fragmentos de ADN capaces de moverse o saltar de una región del cromosoma a otra, o incluso, entre cromosomas y plásmidos.

1.3.3.2. Mecanismos de resistencia a las tetraciclinas

Existen 3 tipos principales de mecanismos con lo que las bacterias inactivan la acción antibacteriana. La acción de las tetraciclinas ha sido afectada en mayor o menor medida por cada uno de estos.

1.3.3.2.1. Expulsión activa del antibiótico

El principal método como las bacterias evitan alcanzar niveles inhibidores de una tetraciclina en el citoplasma, consiste en el bombeo constante del agente hacia el exterior. Este mecanismo de resistencia es catalizado por una enzima citoplasmática capaz de producir la expulsión del antibiótico mediante un gasto energético. Desde el descubrimiento de esta proteína, se han identificado otros genes que codifican similares tipos de resistencia en bacterias Gram negativas (*tetA* - *tetG*) y Gram positivas (*tetK*, *tetL*) (Tortora *et al*, 1998).

1.3.3.2.2. Alteración del blanco del antibiótico

Se caracteriza por la protección del ribosoma bacteriano, gracias a una proteína citoplasmática que impide la acción del fármaco. No se conoce bien como funciona la alteración a nivel del ribosoma, pero se han identificado tres genes que codifican este tipo de resistencia: *tetM*, *tetO* y *tetQ*. Este es un mecanismo poco diseminado entre las bacterias patógenas (Tortora *et al*, 1998).

1.3.3.2.3. Destrucción o inactivación del antibiótico

Se ha identificado una enzima capaz de inactivar a las tetraciclinas. Se ignora la naturaleza de la modificación, pero se sabe que la reacción requiere de oxígeno (Tortora *et al.*, 1998). Esto limita la relevancia clínica de la resistencia a las bacterias aeróbicas.

1.3.3.3. Resistencia bacteriana en acuicultura

Existen numerosas evidencias del aumento de la proporción de bacterias quimiorresistentes en los cultivos acuícolas (Aoki *et al.*, 1990; Björklund *et al.*, 1991; Dixon, 1994; Herwig *et al.*, 1997; Inglis *et al.*, 1997; Karunasagar *et al.*, 1994; Kerry *et al.*, 1997; McPhearson *et al.*, 1991; Nygaard *et al.*, 1992; Samuelson *et al.*, 1992; Spanggaard *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996).

Si bien, es preocupante la generación de nuevas cepas resistentes que podrían colapsar la industria acuícola de algún país o región específica, es verdad también que el constante movimiento de personas, alimentos y demás bienes alrededor del planeta, podrían diseminar los patógenos resistentes sobre distintas áreas del globo (FAO, 1998).

Pero más grave aún, es el peligro potencial que representa para los humanos el aumento de este tipo de bacterias. Con bases en los distintos mecanismos de adquisición de resistencia, posibles interacciones entre patógenos humanos y bacterias influenciadas por la actividad acuícola podrían darse.

Reportes sobre este tipo de preocupaciones han sido publicados. Rhodes *et al.* (2000) señalan haber encontrado evidencias de que plásmidos con genes de resistencia hacia las tetraciclinas han sido diseminados entre bacterias (*Aeromonas spp.*) aisladas a partir de humanos y microorganismos del mismo género presentes en granjas acuícolas inglesas.

1.3.3.4. Resistencia bacteriana a la oxitetraciclina en acuicultura

La OTC ha sido probablemente el antibiótico mayormente utilizado en la acuicultura, debido a su amplio rango de acción y por ser una de las pocas drogas autorizadas para el cultivo de ciertos peces.

No obstante, su efectividad se está viendo reducida por la creciente resistencia bacteriana que se registra. En 1990, Baticados *et al.* reportaron como diferentes especies de vibrios patógenos de larvas de *P. monodon* mostraron una baja sensibilidad a la OTC. Igualmente, Williams *et al.* (1992) comentaban que el incremento de la frecuencia de nuevas cepas resistentes a la OTC, limita la aplicación de este antibiótico en el cultivo de camarón.

Chanratchakool *et al.* (1995), recuerdan como los camaroneros tailandeses obtenían buenos resultados en 1985, al tratar la vibriosis con dietas medicadas con 1 – 3 g OTC/kg. No obstante, tan solo tres años más tarde la dosis tuvo que incrementarse a 5 – 7 g OTC/kg de balanceado, para poder combatir con éxito a los patógenos.

En 1993, los niveles de sensibilidad a la oxitetraciclina fueron determinados en bacterias del género *Aeromonas* y *Vibrio* provenientes de facilidades acuícolas de 5 países asiáticos. La resistencia a la OTC (30 µg/mL) fue elevada tanto en las aeromonas de Malasia (49%), Tailandia (48%) y Bangladesh (49%), así como en los vibrios de Malasia (46%) y Tailandia (42%) (Inglis *et al.*, 1997).

En el mismo año, Ruangpan *et al.* reportaron que 38 de 135 especies de vibrios aislados en 1994 a partir del sedimento de piscinas camaroneras tailandesas, mostraron ser insensibles a concentraciones de 100 ppm de OTC. Además, detectaron dos cepas bacterianas capaces de transmitir la resistencia al antibiótico, mediante plásmidos o factores (R).

Inconvenientes similares se observan y comentan en el Ecuador, aunque existen muy pocos trabajos sobre el tema. Por ejemplo, niveles de resistencia a concentraciones de 60 ppm de OTC han sido detectados en vibrios asociados a camarones juveniles muestreados en el Golfo de Guayaquil (Peeters & Rodríguez, 1999).

1.4. REGULACIONES: ORGANISMOS DE CONTROL

A inicios de 1991, las autoridades japonesas detectaron residuos de antibióticos en el camarón importado desde Tailandia, amenazando con prohibir el ingreso del crustáceo proveniente de este país. El gobierno tailandés, como respuesta, introdujo un sistema de monitoreo en granjas y plantas procesadoras, para detectar y sancionar la presencia de residuos químicos. El efecto de esta medida fue inmediato, ya que si en marzo del mismo año 16% de las muestras resultaron contaminadas, los análisis realizados 4 meses después no detectaron antibióticos en el camarón (Csavas, 1993). Este antecedente, podría considerarse como una advertencia para los países que no cuentan con regulaciones y sistemas de monitoreo de residuos de antibióticos.

La GESAMP (Grupo de Expertos de los Aspectos Científicos para la Protección del Ambiente Marino) reunida en Roma en 1997, recomienda que se eliminen las prácticas profilácticas en la acuicultura e insta a los gobiernos a que adopten programas de monitoreo de residuos de antibióticos. Igualmente, solicitan que se desarrolle la legislación necesaria para que los países puedan regular el uso de los químicos en la acuicultura.

En los Estados Unidos de Norteamérica, la FDA (Food and Drug Administration) es el organismo federal responsable de asegurar la inocuidad y salubridad de los productos alimenticios, así como de la efectiva y segura aplicación de las drogas en los tratamientos destinados, tanto a humanos como animales.

El Centro para la Medicina Veterinaria (CVM, siglas en inglés), entidad suscrita a la FDA; se encarga de regular la manufactura, distribución y uso de las drogas en los animales, específicamente. Es responsable de asegurar que los químicos utilizados para tratar animales comestibles sean seguros, efectivos y no produzcan residuos potencialmente peligrosos (Texas Agricultural Extension Service, 1994).

Ambas instituciones están regidas bajo el Acta Federal sobre los Alimentos, Drogas y Cosméticos (FFDCA, siglas en inglés), ley básica sobre el tema en los EE.UU. Este cuerpo legal es aplicable tanto a las instituciones públicas, como a las industrias privadas.

En lo concerniente a la Comunidad Económica Europea (CEE), Woodward (1996) menciona que los criterios sobre los cuales se evalúan las medicinas veterinarias son los de calidad, eficacia y seguridad. En general, califica a la regulación europea y la norteamericana como muy similares, señalando que probablemente la única diferencia se observa en la rigidez como se establecen los límites máximos de residuos (LMR) por parte de la CEE, contrastando con el enfoque de niveles tolerables que se les brinda en los EE.UU.

En el Ecuador, el INP (Instituto Nacional de Pesca) es el organismo estatal encargado de controlar la calidad de los productos acuícolas. En el “Plan para el Control y Evaluación de Residuos en los Productos de Acuicultura en el Ecuador” presentado por este organismo en marzo del 2000, se menciona que durante 1999 no se realizaron análisis de residuos de antibióticos y pesticidas en muestras de camarón. Sin embargo, indican que han enviado muestras a tres calificados laboratorios de los EE.UU. para que efectúen los

respectivos análisis, ya que en la actualidad el Instituto carece del instrumental y el personal capacitado para realizar este tipo de análisis mediante cromatografía.

1.4.1. **LMR: Límites máximos de residuos**

La falta de control estatal sobre la actividad acuícola en las naciones subdesarrolladas como el Ecuador, así como las nuevas tendencias mundiales sobre la seguridad alimenticia, han generado que los países importadores de estos productos establezcan nuevos requerimientos hacia los alimentos que ingresan por sus fronteras.

En marzo de 1998, por ejemplo, se instauró con carácter obligatorio en las plantas procesadoras ecuatorianas de camarón el sistema HACCP (Siglas en inglés, Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control). Este plan de prevención establecido por los EE.UU., brinda básicamente las pautas para producir alimentos seguros para los consumidores (Morales, 1997).

Dentro de los puntos de control que se han instaurado para asegurar la inocuidad de los alimentos se cuentan los límites máximos de residuos (LMR), destinados a definir los niveles seguros de cada uno de los químicos en los alimentos.

Para el caso de la oxitetraciclina (OTC), el LMR en el músculo de especies acuáticas es igual tanto para la regulación europea (Woodward, 1996), como para la definida en el Ecuador (Tabla 4). Por su lado, la FDA ha establecido un límite tolerable de residuos de 2.0 ppm para la OTC en los tejidos crudos comestibles de las especies donde se ha

autorizado el empleo del antibiótico (salmónidos, langosta y pez gato). No obstante, a pesar de que la OTC no ha recibido la aprobación para ser empleado en el cultivo de camarón, el organismo de control ha establecido un “límite de seguridad” de 2.0 ppm para el camarón (FDA, 1998).

Tabla 4. Límites máximos de residuos permitidos en el Ecuador (INP, 2000).

Familia	Antibiótico	LMR*
Quinolonas	Sarafloxacina	0.1 mg.kg ⁻¹
Tetraciclinas	Tetraciclina y 4 epímeros	0.1 mg.kg ⁻¹
	Oxitetraciclina y 4 epímeros	0.1 mg.kg⁻¹
	Clortetraciclina y 4 epímeros	0.1 mg.kg ⁻¹
Amoxilinas	Amoxilina	0.05 mg.kg ⁻¹
	Benzilpenicilina	0.05 mg.kg ⁻¹
Ampicilinas	Ampicilina	0.05 mg.kg ⁻¹

*Límite máximo de residuos

Desde 1996 las regulaciones de la CEE han establecido que el LMR para la OTC (0.1 ppm en el músculo) en los alimentos, debe calcularse sumando los residuos del antibiótico junto con sus 4 epímeros (Commission Regulation, 1996 *fide* Blanchflower *et al.*, 1997). Esta especificación se observa también en las disposiciones del INP, en cambio esta ampliación del concepto de LMR no ha sido contemplada por la FDA hasta el momento.

1.4.2. Aprobación de drogas para uso en acuicultura

La lista de los químicos autorizados por la FDA para ser empleados dentro del territorio norteamericano, brinda una guía para los demás países productores de peces, crustáceos y moluscos que dependen del mercado estadounidense para comercializar sus productos.

Si bien la prohibición legal que pueda existir para algún antibiótico en los EE.UU. u otro país, no se extiende para nuestra industria dentro de la legislación nacional, esta influye significativamente en el manejo que debe dársele al fármaco por parte de los productores y exportadores. Por ejemplo, aquellos antibióticos prohibidos por la FDA para su empleo en cualquier industria productora de animales comestibles, como el cloranfenicol (Munns *et al.*, 1994) y la furazolidona (Rupp *et al.*, 1994), no deberían ser utilizados por empresas camaroneras conscientes de las nefastas consecuencias que podría tener el hallazgo de residuos de estos medicamentos en el camarón.

Para que una droga obtenga la aprobación de la FDA y pueda por lo tanto, ser utilizada en algún tipo de cultivo acuícola, debe cumplir con tres requisitos básicos (Bell, 1995):

- a) Ser segura para la salud humana.
- b) Ofrecer un tratamiento seguro para el animal que lo recibe.
- c) Ser segura para el ambiente.

Estos puntos deben ser demostrados científicamente por un auspiciante interesado en obtener la aprobación para un nuevo químico. El auspiciante puede ser una compañía

farmacéutica, una agencia federal del área ambiental, una universidad y hasta un productor individual (Texas Agricultural Extension Service, 1994).

La FFDCa establece que es ilegal utilizar un químico no autorizado, a menos que esté calificado como una “nueva droga para investigación animal” (NDIA). Excepción que se aplica tan solo para que se genere la información necesaria para obtener la aprobación. Una vez completados los requisitos se presentan los datos al CVM, el cual los revisará y podrá extender una “aprobación para una nueva droga animal” (ANDA).

Desafortunadamente, es limitada la cantidad de drogas aprobadas para la acuicultura, principalmente porque la inversión económica y el tiempo requerido para completar los requisitos y obtener un ANDA, es muy elevado comparado con el retorno que genera la comercialización del fármaco. Esto ha tratado de ser superado por la FDA calificando a los químicos utilizados en las especies acuáticas, como de “uso menor” (Greenlees, 1997). De esta forma, la información de un químico aprobado en las industrias de “uso mayor”, como la ganadera o la avícola, puede extenderse a la acuicultura, reduciendo significativamente la necesidad de desarrollar nuevos datos.

El CVM igualmente reconoce que existen patologías para las cuales no hay tratamientos aprobados. Para estos casos, se estipuló una legislación (Guía Política de Complacencia, 7125.06) que permite la aplicación de una droga autorizada de una forma diferente a la indicada en el ANDA respectivo. Esta excepción puede ser solo empleada por un veterinario registrado y para los casos en que los animales tengan una alta probabilidad de morir. No se incluyen dentro de esta concesión tratamientos para

prevenir enfermedades (profilaxis), incrementar la tasa de crecimiento y aumentar la reproducción o la fertilidad (Texas Agricultural Extension Service, 1994).

1.4.3. Antibióticos autorizados

La extensión del ANDA para el empleo de un químico es muy específico, ya que establece claramente (Bell, 1995):

- a) Caso para el cual se debe aplicar el tratamiento
- b) Animal que recibe el tratamiento
- c) Dosis del químico
- d) Tiempo del tratamiento
- e) Tiempo de retiro del tratamiento

Las regulaciones de la FDA han autorizado hasta el momento solo cuatro antibióticos para el uso en la acuicultura. Estos son: Romet-30[®], sulfamerazina, nifurpirinol y OTC. De estos, ninguno ha recibido la aprobación que le permita ser empleado en el cultivo de camarón específicamente (Greenlees, 1997).

Hasta enero del 2000, la FDA había aprobado 46 diferentes compuestos cuyo agente activo es la OTC (FDA, 2001), de los cuales solamente uno, la Terramicina[®]-para peces (ANDA # 038-439, Pfizer, Inc.), ha sido admitida para ser utilizada en el cultivo de distintas especies acuáticas (Tabla 5).

Williams y Lightner (1988), mencionan que en 1984 la FDA emitió un NDIA a la compañía Pfizer para que colaborando con la Empresa de Cultivos Marinos (Hawai, EE.UU.) y la Universidad de Arizona, inicien los trabajos para obtener la aprobación para el uso de OTC en el cultivo de peneidos. Igualmente los autores comentan que para la fecha de la publicación del trabajo, el 50% del proceso de aprobación había sido revisado y aceptado por la FDA.

Tabla 5. Indicaciones de la FDA para el uso autorizado de Terramicina® en la acuicultura.

Especies	Usos	Dosis y tiempo del tratamiento	Tiempo de retiro
Pez gato	Septicemia hemorrágica bacteriana e infección por <i>Pseudomonas</i>	2.5 – 3.75 g.100 lb.día ⁻¹ por 10 días	21 días
Langosta	Gaffkemia	1 g.lb ⁻¹ alimento medicado por 5 días	30 días
Salmónidos	Ulceración, furunculosis, septicemia hemorrágica bacteriana e infección por <i>Pseudomonas</i>	2.5 – 3.75 g.100 lb.día ⁻¹ por 10 días	21 días
Salmón del pacífico	Marcaje del esqueleto	250 mg.kg.día ⁻¹ por 4 días	7 días

Sin embargo, en la actualidad no existe ningún antibiótico autorizado para ser empleado en laboratorios y granjas camaroneras norteamericanas. Los únicos químicos aprobados para el cultivo de peneidos son la formalina y el Aquatrine® (compuesto de sulfato de

cobre quelado), aunque se pueden encontrar casos en los que la OTC ha recibido la aprobación federal, seguramente amparada en alguna de las excepciones que facultan la aplicación de una droga en acuicultura.

Por ejemplo, Frelier *et al.* (1992 y 1994) señalan que el único tratamiento antibiótico eficaz contra las bacterias intracelulares causantes de la hepatopancreatitis necrotizante (HPN), es la aplicación de OTC. Según los autores, la administración durante 10 días de una dieta medicada con 1.5 g OTC/kg y su posterior retiro 15 días antes de la cosecha como mínimo, es el protocolo autorizado por la FDA para evitar la alta mortalidad que originaban las rickettsias en el *P. vannamei*.

Posteriormente, el mismo autor menciona que dosis terapéuticas de 3 g OTC/kg de alimento durante 14 días parecen ser efectivas contra el HPN en piscinas sembradas con 12 – 50 animales/m², aunque la FDA sugiere un tiempo mayor de retiro del tratamiento, 3 semanas (Frelier, 1995).

1.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

1.5.1. Generalidades

La cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra. La separación se logra mediante la distribución de las sustancias en dos fases, una estacionaria y otra en movimiento o fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil, en cambio, suele ser líquida o gaseosa.

La naturaleza de la fase móvil separa a esta técnica analítica en dos grandes grupos: la cromatografía gaseosa (CG) y la cromatografía de líquidos (CL). Dentro de este último grupo se incluyen la cromatografía de capa delgada, la cromatografía líquida en columna abierta, y la cromatografía líquida de alta performance o resolución, o más conocida por sus siglas en inglés, HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

En la actualidad la HPLC representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea éste dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, bromatológica o biológica (Quattrocchi *et al.*, 1992). Esta versatilidad ha sido posible por el notorio avance que ha experimentado esta técnica, en especial en lo referente al desarrollo de nuevas fases estacionarias, a la introducción de equipos de alta precisión y al empleo de microprocesadores y computadoras que automatizan los procesos.

Básicamente, los equipos de HPLC pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes (reservorio de la fase móvil, bomba, inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que permiten no solo armar el equipo según las necesidades, sino aumentar su complejidad según los requerimientos. Además, esta conformación permite la visualización de cada componente, lo que brinda mejores posibilidades al momento de aislar y resolver problemas en el equipo.

1.5.2. Componentes del cromatógrafo de líquidos

La CL es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna (que contiene a la fase estacionaria), puede considerarse como el corazón del sistema. Alrededor de esta se monta un equipo de mayor o menor complejidad, que en los casos más simples consta de los siguientes componentes (Figura 2):

- *Reservorio:* para la fase móvil (o soluciones tampón).
- *Inyector:* para la introducción de la muestra.
- *Bomba:* para forzar la circulación de la fase móvil y la muestra a través de la columna.
- *Detector:* para monitorear la solución que emerge de la columna luego de recorrerla.
- *Registrador:* para graficar y/o procesar la información generada por el detector.

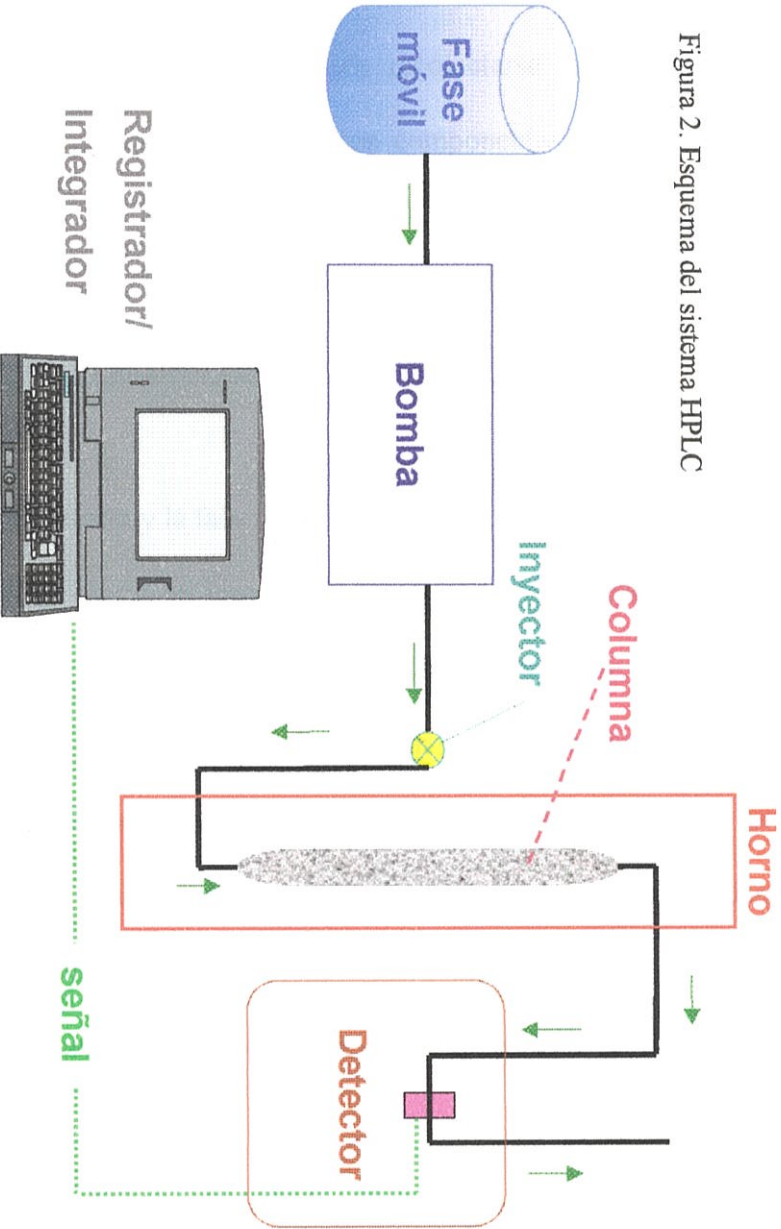


Figura 2. Esquema del sistema HPLC

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos: el cromatograma y el eluido o eluato. El primero, es un gráfico que relaciona la concentración de las sustancias separadas, en función del tiempo de elución. El segundo, es el fluido proveniente de la columna, que de recolectarse en diferentes intervalos de tiempo, contiene separadamente los distintos componentes de la muestra disueltos en la fase móvil.

1.5.3. Bases del análisis mediante cromatografía líquida

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria (relleno de la columna), entran en juego distintos tipos de interacciones entre cada uno de estos componentes. Estas interacciones son responsables de la mayor o menor afinidad de cada una de las sustancias presentes en la muestra, por la fase móvil o por la fase estacionaria. De esta forma, los compuestos mas afines a la fase estacionaria se retienen mayor tiempo (variable denominada “tiempo de retención”) y tardarán mas en recorrer la columna. En cambio, los componentes con mayor afinidad hacia la fase móvil, se retendrán menos tiempo y fluirán mas rápidamente a través de la fase estacionaria (Figura 3).

De acuerdo, al tipo de interacciones que ocurren entre los componentes de la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria, la CL se divide en 4 grupos básicos, descritos a continuación:

- Cromatografía de *Fase Normal*
- Cromatografía de *Fase Reversa*
- Cromatografía de *Intercambio Iónico*
- Cromatografía de *Exclusión Molecular*

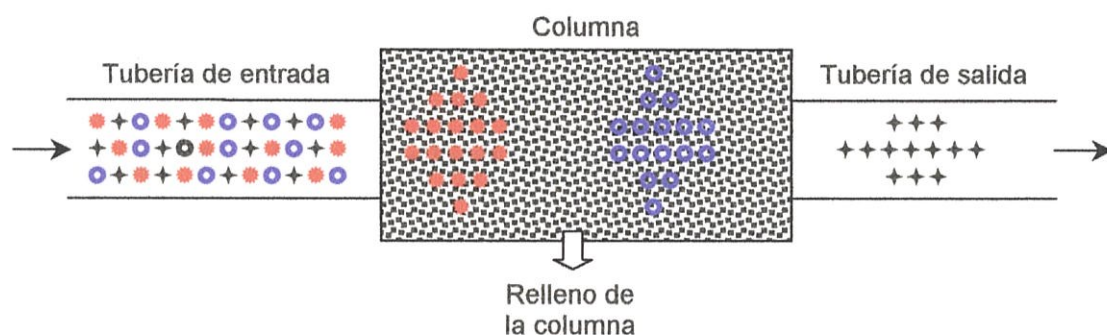


Figura 3. Representación de la separación cromatográfica. En el ejemplo, la muestra se encuentra compuesta de tres analitos: ●, + y ○; disueltos homogéneamente en la fase móvil que circula en el sistema. Una vez que ingresa a la columna experimenta la separación de sus componentes. El compuesto con menor capacidad para interactuar con la fase estacionaria (+) eluye primero. Luego, tomando en cuenta la fuerza de la interacción, el compuesto más afín al material de relleno (●) recorrerá más lentamente la columna, eluyendo al final. El compuesto con una afinidad intermedia (○) eluirá en segundo lugar. Las flechas negras representan el flujo de la fase móvil.

La *CL de fase normal* es la modalidad cromatográfica más antigua. Sus orígenes se remontan a los trabajos del botánico M. Tswett publicados en 1906 (Quattrocchi *et al.*, 1992). Esta técnica produce la separación de las sustancias de acuerdo a su polaridad, característica de ciertos compuestos que se genera cuando los electrones que comparten los átomos que conforman una molécula, se encuentran mayormente concentrados en torno a uno de los extremos de esta. En consecuencia, un extremo de la molécula es relativamente negativo (donde se concentran los electrones) y el otro positivo (donde la concentración de electrones es menor).

Inicialmente, las fases estacionarias estaban compuestas por materiales con una alta polaridad (polares), y las fases móviles se caracterizaban por ser de baja polaridad (no polares). Así, sustancias polares podían ser separadas por su afinidad con la fase estacionaria. Mas adelante, cuando se presentó la necesidad de analizar sustancias de reducida polaridad, se utilizaron los mismos compuestos empleados para las fases estacionarias polares, como la silicagel (óxido de silicio hidratado), pero recubiertos con químicos que formaban una película superficial que invertía las características del material, volviéndolo no polar. Debido a la profunda variación entre ambas modalidades, los métodos que utilizaban fases estacionarias polares y fases móviles no polares, fueron denominados como de *fase normal*, por haber sido utilizados inicialmente. En cambio, las técnicas que se basaban en el empleo de una fase estacionaria no polar junto con una fase móvil polar, se denominaron como de *fase reversa*.

A partir de la década de los setenta, la cromatografía de *fase reversa* comenzó a ser preferida sobre la de *fase normal*, debido al desarrollo de un material de recubrimiento no polar de muy buena calidad, conocido comercialmente como ODS o C₁₈ (Octadesilsilano), que permitió prescindir del riguroso control que se requería sobre la humedad presente en los sistemas (equipos, reactivos y ambiente) con fases estacionarias polares. El agua, al ser un compuesto polar, puede ocupar los sitios de interacción de la fase estacionaria, reduciendo su capacidad de retención de solutos y dificultando a la vez la obtención de resultados reproducibles. Mediante la *fase reversa*, el agua pasó a ser el solvente preferido antes que un problema, disminuyendo los costos, mejorando la reproducibilidad y reduciendo los controles (Lindsay, 1992).

En la actualidad, el recubrimiento de matrices de silicagel (el material más utilizado para la elaboración de fases estacionarias) con compuestos de variados niveles de polaridad, ha conducido al desarrollo de la denominada *cromatografía de fase ligada*, y puede ser empleada tanto para *fase normal* como para *fase reversa*. Sin embargo, más del 70% de los análisis se efectúan mediante esta última, pudiéndose trabajar con una gran variedad de compuestos, como alcaloides, ácidos carboxílicos, carbohidratos, aminoácidos, pesticidas, hormonas, vitaminas, antibióticos, etc. (Quattrocchi *et al.*, 1992).

La *cromatografía de intercambio iónico* se basa en las características iónicas (carga eléctrica) de los compuestos que intervienen en la separación. Debido a que los polos con carga eléctrica opuesta se atraen, la separación se da cuando la carga eléctrica de la fase estacionaria es opuesta a la de las sustancias disueltas en la muestra (soluto). En esta modalidad, la fase móvil contiene iones afines a la fase estacionaria, por lo que las moléculas del soluto deberán desplazar a los iones de la fase móvil que se encuentran interactuando con la fase estacionaria. Esta competencia por los sitios de interacción de la fase estacionaria, genera la separación de las sustancias presentes en la muestra, ya que las moléculas con mayor fuerza iónica podrán permanecer mayor tiempo dentro de la columna, mientras que aquellas moléculas que interactúan débilmente con la fase estacionaria serán reemplazadas nuevamente por los iones de la fase móvil.

Finalmente, la *cromatografía de exclusión molecular* separa sustancias sobre la base de su tamaño mientras se encuentran en solución. Esta variante cromatográfica se utiliza básicamente para el análisis de compuestos de alto peso molecular (> 2,000), los cuales suelen presentar problemas con los otros métodos de CL. En esta técnica la separación

ocurre debido a que los solutos de mayor peso molecular toman mas tiempo en recorrer la columna, rellena normalmente con un gel de diferentes grados de porosidad. Como el tamaño de una molécula en solución y su peso molecular son parámetros proporcionales, esta modalidad suele utilizarse para la determinación del peso molecular de los compuestos. La exclusión molecular es considerada una de las técnicas de cromatografía líquida mas simples, ya que requiere menor esfuerzo en cuanto al desarrollo de nuevas metodologías (Quattrocchi *et al.*, 1992).

1.5.4. Aspectos importantes e implementación del análisis cromatográfico

Para definir los pasos a seguir en un trabajo cromatográfico, se requiere primero determinar los objetivos perseguidos; 1) obtener una sustancia pura de interés separándola mediante métodos cromatográficos, o 2) detectar y cuantificar compuestos para generar datos.

Para el primer caso o cromatografía preparativa, el objetivo primordial es la obtención de la mayor cantidad posible de una sustancia determinada. En estos procesos, la variable mas importante es la capacidad de carga de la columna, es decir, la cantidad de sustancia que se podrá separar y purificar de la muestra inicial. Por el contrario, la eficiencia del sistema y la geometría del pico que se grafica en el cromatograma, son los factores mas trascendentales para el análisis cromatográfico cuantitativo.

1.5.4.1 Cromatografía preparativa

Los procedimientos de extracción, paso previo para la cromatografía cuantitativa, son decisivos para poder obtener las sustancias que se desean analizar y suelen incluir algún tipo de procedimiento cromatográfico preparativo. Para estos trabajos, es básico el conocimiento de algunas características del analito, como las que se describen a continuación:

- Propiedades físico químicas:
 - Estructura química
 - Peso molecular
 - Solubilidad
 - Propiedades ácido-bases
 - Respuesta frente a los detectores
- Concentración del analito en la muestra
- Naturaleza de la matriz de la muestra
- Compatibilidad de los medios de solubilización y el sistema HPLC
- Tipo de detector
- Compatibilidad de los medios de solubilización y el detector

Una vez que se conocen las características propias de las sustancias de interés, se definen las operaciones tradicionales de la química analítica que se emplearán para el tratamiento de las muestras, entre las que se cuentan: la liofilización y evaporación para concentrar el analito, la filtración y centrifugación para separar los líquidos de los sólidos, y la precipitación para separar al analito de sustancias que puedan interferir, contaminar las columnas o el equipo cromatográfico. Sin embargo, la purificación final de los extractos suele estar representada por técnicas de cromatografía preparativa.

Una modalidad de cromatografía preparativa ampliamente difundida es la extracción en fase sólida (EFS). Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna o cartuchos de plástico, rellenos con cantidades variables de distintos materiales similares a los empleados en las columnas de HPLC (C_{18} , C_8 , silicagel), de mayor granulometría (típicamente de 40 μm) y con una pequeña distribución de tamaños de partícula. Mediante esta técnica la separación puede lograrse bajo los mismos conceptos de la CL de fase normal, reversa o de intercambio iónico.

1.5.4.2. Cromatografía cuantitativa

Aunque en muchos casos, el desarrollo de un método de cromatografía cuantitativa se encara desde un punto de vista empírico, mediante ensayos de prueba-error, es preferible emplear caminos sistemáticos (figura 4), tratando de evitar el desperdicio de tiempo y recursos. Consecuentemente, el primer paso debería consistir en una revisión bibliográfica, con lo que se podrían reemplazar semanas de trabajo por unos pocos minutos de consulta.

Dentro de los aspectos más importantes de la cromatografía cuantitativa, se cuentan una serie de pasos. El primero es la preparación de la muestra, tema que se trató en el numeral anterior, por lo que a continuación se describen los siguientes.

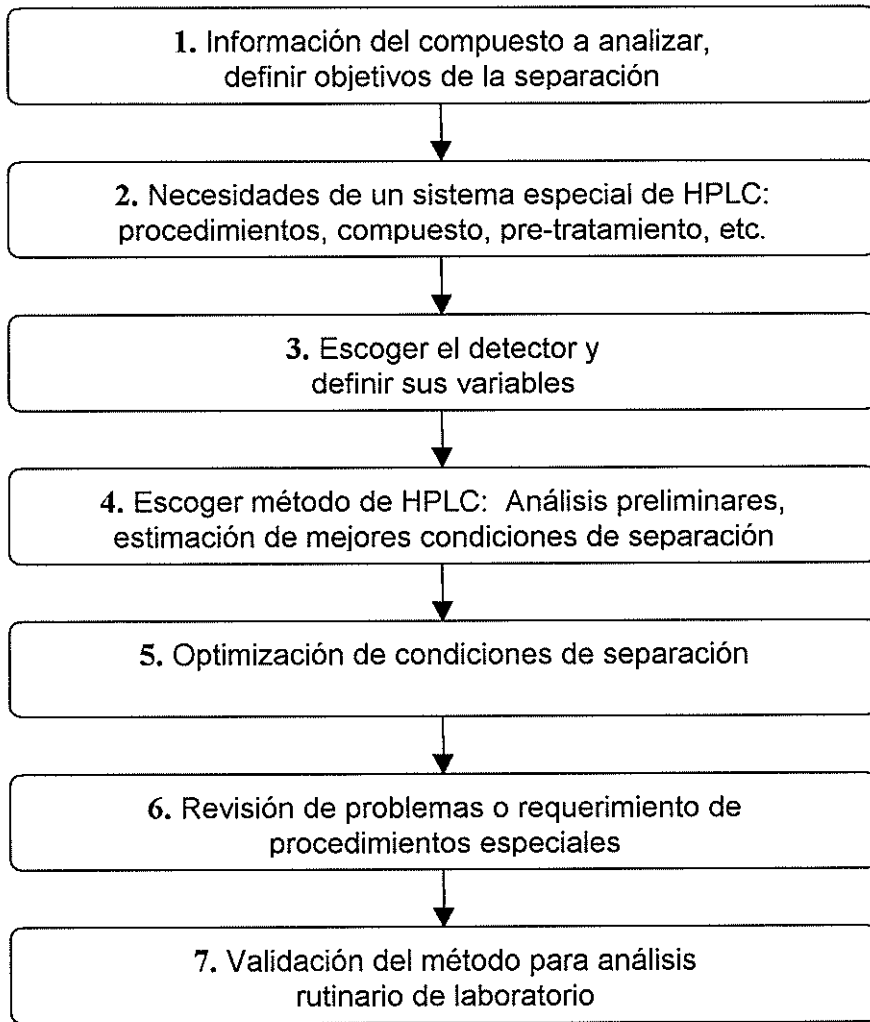


Figura 4. Pasos fundamentales para el desarrollo de una metodología analítica vía HPLC (Snyder *et al.*, 1988)

1.5.4.2.1. Inyección de la muestra

Uno de los requerimientos para obtener resultados confiables en un sistema de HPLC, es la capacidad de inyectar muestras con la menor variabilidad posible. Para esto, existen dos tipos básicos de inyectores: los manuales y los automáticos. Los primeros, como su nombre lo indica, se basan en el empleo de jeringas volumétricas por parte de un operador, tanto para introducir la muestra directamente en el cromatógrafo, como para

llenar un bucle (volumen nominal de 20, 50 o 100 μL) que transferirá su contenido al sistema. Los segundos, operan bajo los mismos principios básicos que los inyectores manuales, aunque su precisión generalmente es mejor, ya que dependen en menor medida de la habilidad y experiencia del operador.

1.5.4.2.2. Separación cromatográfica

Si bien, ya se comentó sobre los fundamentos de la separación cromatográfica, existen algunos factores que pueden afectar este proceso. Por ejemplo, las interacciones entre el analito y el cromatógrafo, han sido un problema al trabajar con sustancias afines a las tuberías de acero inoxidable, como en el caso de las tetraciclinas y sus derivados. Para evitar que los ~~antibióticos se complejen~~ con las tuberías, se agrega EDTA (siglas en inglés de, ácido etilén diamino tetraacético) a las fases móviles, y así ~~quedar~~ los posibles sitios de interacción del acero inoxidable.

1.5.4.2.3. Detección del analito

Para sistemas de HPLC se pueden emplear una serie de detectores, los cuales son escogidos de acuerdo a la naturaleza del analito con que se trabaja. Los más utilizados son los espectrofotómetros UV y UV-Visible, siendo capaces de emitir longitudes de onda de entre los 190-350 nm, o llegando hasta los 700 nm, respectivamente. Estos equipos se caracterizan por poseer una buena sensibilidad y linealidad, permitiendo detectar analitos en el orden de los nanogramos. Buscando obtener una mayor sensibilidad, la longitud de onda de trabajo suele fijarse en las proximidades del máximo

utilizados, son los espectrofotómetros de fluorescencia y los espectrofotómetros de masas.

1.5.4.2.4. Integración de la señal y cálculo de la concentración

En la figura 5 se puede observar un cromatograma típico. En este, el eje X representa al tiempo y el eje Y representa la respuesta del detector. Cada pico es originado por una sustancia en particular y el área bajo estos es directamente proporcional a su concentración en la muestra. Los integradores se encargan de calcular esta área empleando unidades adimensionales, así como de establecer el tiempo de retención, que constituye el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima altura del pico. Cada sustancia, siempre y cuando se mantengan constantes las condiciones analíticas, posee un tiempo de retención particular, por lo que este se utiliza para identificarla. Finalmente, la concentración de cada analito en la muestra, puede obtenerse al relacionarla con el área que genera un pico de concentración conocida. El método más común incluye la elaboración de una curva de calibración.

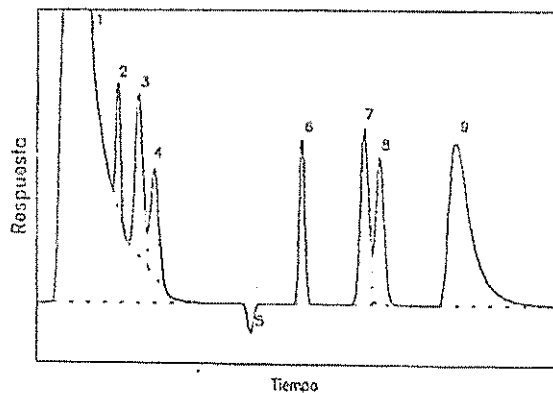


Figura 5. Cromatograma típico. Pico 1: Analito muy concentrado; 2 y 3: picos montados sobre cola pico 1; 4: pico sin buena separación de pico 3; 5: pico negativo; 6: pico ideal; 7 y 8: picos sin buena separación; 9: pico con cola y forma inadecuada. Eje X: tiempo, Eje Y: respuesta.

1.5.5. Análisis de antibióticos mediante métodos analíticos

Tradicionalmente, los residuos de antibióticos presentes en los alimentos, tejidos u otro tipo de muestras biológicas han sido determinados mediante métodos microbiológicos (FDA, 1968). En estos, una cepa bacteriana de reconocida sensibilidad hacia un antibiótico en particular, es cultivada en cajas Petri. Sobre el agar nutritivo se colocan discos de sensibilidad, previamente humedecidos con el extracto de la muestra donde presumiblemente se encuentra el medicamento. Tal como sucede con los análisis MIC (Mínima concentración inhibitoria, siglas en inglés), se espera que la presencia del antibiótico sea evidente por la inhibición del crecimiento bacteriano ocurrida alrededor del disco. A su vez, la determinación de la concentración del antibiótico en el extracto, se obtiene luego de relacionar el tamaño del halo de inhibición, con el obtenido previamente con niveles conocidos de la droga.

Como se puede observar, este tipo de métodos analizan los antibióticos únicamente de forma cuantitativa, ya que son incapaces de separar entre diferentes medicamentos de una misma familia. Por ejemplo, la cepa de *Bacillus cereus* (Código 11778, American Type Culture Collection) establecido como el microorganismo estándar para la cuantificación de los residuos de oxitetraciclina (OTC) en los alimentos mediante el método oficial 968.50 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990), es una bacteria sensible también frente a otras tetraciclinas: clortetraciclina, tetraciclina, minociclina, doxiciclina y democlociclina.

Desde más de una década atrás, es reconocida la mayor especificidad y sensibilidad de los métodos cromatográficos comparados con los microbiológicos (Austin & Austin, 1987), ya que los primeros permiten analizar individualmente los diferentes antibióticos de una misma familia.

Para el caso de las tetraciclinas, técnicas que emplean equipos de HPLC han sido utilizadas para la detección y cuantificación de residuos de estos antibióticos en muestras de leche (McEvoy *et al.*, 2000; Podhorniak *et al.*, 1999), miel (Kochansky *et al.*, 1999), huevos (Furusawa, 1999), tejidos de origen vacuno, porcino y avícola (Holland *et al.*, 1991; Posyniak *et al.*, 1999) y alimento balanceado (Houglum *et al.*, 1998).

La *CL de fase reversa* ha sido preferida para estos análisis, a pesar de haberse reportado la utilización de una técnica de *intercambio iónico* (Knox & Jurand, 1979). White y colaboradores (1993) publicaron un estudio comparativo de los métodos de fase reversa para la determinación de tres tetraciclinas, oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina. En este, los autores basándose en la forma de los picos, la separación de estos y el porcentaje de recuperación de los estándares inyectados, determinaron los tipos de fase móvil y estacionaria más apropiados.

La FDA publicó en 1998 un método de cromatografía líquida para el análisis de residuos de OTC en el tejido crudo de camarones. Si bien, el método no es oficial, básicamente porque el antibiótico no ha recibido la autorización para ser empleado en el cultivo de camarón, la agencia consideró necesario disponer de un método para poder monitorear la presencia del medicamento en el crustáceo.

De igual forma, instituciones gubernamentales nacionales como el INP, han establecido que para el estudio de residuos de una serie de antibióticos en muestras de alimentos de origen acuícola, los sistemas cromatográficos deben ser los escogidos (INP, 2000).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. BIOENSAYO

El bioensayo fue dirigido a estudiar la acumulación y pérdida de la oxitetraciclina (OTC) en juveniles de *Penaeus vannamei*, alimentados con dietas medicadas de distintas concentraciones, empleando además como control una dieta no medicada (libre de OTC). Las tres concentraciones nominales del antibiótico utilizadas en la dieta: 1, 5 y 10 ppt de OTC, representan niveles bajos, normales, y elevados aplicados en las piscinas camaroneras del país, respectivamente.

2.1.1. Sistema

El sistema constó de 12 tanques rectangulares de fibra de vidrio, divididos en dos grupos, 8 tanques con un volumen operativo de 500 L y un área de 0.95 m² y 4 tanques con un volumen operativo de 300 L y un área de 0.74 m².

El efecto de cada dieta se evaluó por triplicado, otorgándole a cada tratamiento y al control, dos tanques de 500 L y un tanque de 300 L. De esta forma, los tanques se ubicaron en tres bloques de cuatro tanques cada uno (dos bloques conformados por los ocho tanques de 500 L y el restante con los cuatro tanques de menor capacidad). Cada bloque recibió aleatoriamente cada uno de los tres tratamientos y un control (Figura 6).

Dentro de las facilidades experimentales cada tanque constó de: una línea de entrada de agua salada regulada para obtener un recambio diario del 200% para mantener la calidad del agua, un drenaje lateral superficial que mantuvo constante la altura operativa y una línea de aire con una piedra difusora al final. Adicionalmente, una malla que recubría los tanques impidió el escape de los animales y el salto de estos entre tanques.

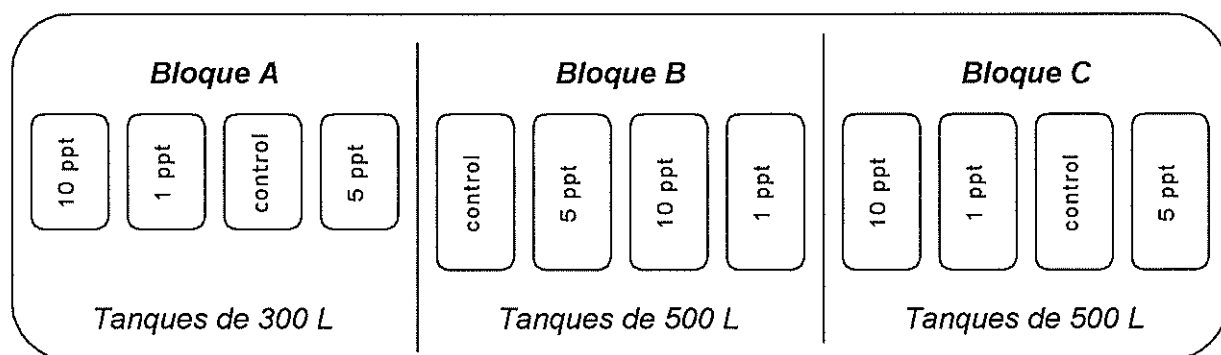


Figura 6. Diagrama del diseño experimental del bioensayo.

2.1.2. Animales

Juveniles de *P. vannamei* fueron cedidos por la camaronera “Jesús del Gran Poder”, cercana a la población de Palmar, Península de Santa Elena. Los camarones fueron cosechados de una piscina de 8 has, sembrada con larva de laboratorio. Hasta el momento de la captura, los animales no habían recibido ningún tipo de antibiótico como parte de la rutina de manejo de la camaronera.

A su llegada al CENAIM los animales fueron colocados en 4 tanques de 500 L, donde se mantuvieron por un lapso de tres semanas mientras se aclimataban a las condiciones del sistema experimental. Durante este periodo los animales fueron alimentados *ad libitum*

con la dieta CENAIM-40 sin OTC. Diariamente se sifonearon los tanques y se removieron los animales muertos.

Para el inicio del bioensayo, se repartieron en cada tanque experimental 37 animales.m⁻², los cuales fueron pesados individualmente y escogidos en base a su peso. Camarones de entre 4.5 y 6.5 g fueron seleccionados, con lo que se obtuvo un peso promedio inicial de $5.6 \text{ g} \pm 0.89$.

El experimento constó de dos etapas de alimentación, la primera desde el inicio del bioensayo hasta el día 14, donde se emplearon las tres dietas medicadas junto a la dieta control. Luego, a partir del día 15 se suspendió el suministro del alimento con OTC, empleando únicamente la dieta control hasta completar 4 semanas de experimentación.

2.1.3. Dietas Medicadas

2.1.3.1. Elaboración

Al momento de la elaboración de las dietas medicadas en la planta piloto del CENAIM, se desconocían dos parámetros básicos para lograr las concentraciones deseadas de OTC: 1) el porcentaje de pureza del fármaco (porcentajes de clorhidrato de OTC y excipientes) y 2) la magnitud de la pérdida de OTC originada por la manufactura del alimento medicado. De esta forma, y dado que al momento de iniciarse el bioensayo, no se había definido aún la metodología para la determinación cromatográfica de la OTC, lo que habría permitido calcular anticipadamente tanto el porcentaje de pureza del

medicamento, así como las pérdidas debidas al proceso de elaboración de las dietas, se decidió trabajar con valores estimados. Así, para el porcentaje de pureza se utilizó el 88%, valor recomendado por la persona que donó el antibiótico grado técnico; y para el porcentaje de pérdida se decidió utilizar el valor mínimo del rango recomendado por Frelier (1995), 10 – 40%, ya que estas pérdidas de OTC fueron determinadas en plantas comerciales, donde la condiciones de presión y temperatura son más exigentes que las de la planta piloto del CENAIM.

Adicionalmente, para calcular la cantidad final de clorhidrato de OTC (OTC•HCl) que se necesitó para elaborar las dietas, se debió realizar una corrección adicional, tomando en cuenta que la sal del antibiótico (clorhidrato) posee un 90.6% de OTC.

La fórmula balanceada (tabla 6) que se utilizó para la aclimatación y el desarrollo del bioensayo fue la dieta CENAIM-40. Inicialmente, se mezclaron todos los ingredientes de la formulación para elaborar 4 kg de alimento. Una vez terminada la mezcla se pesaron tres porciones de 670 g, cantidad que se obtuvo estimando la cantidad de dieta de cada una de las concentraciones que requería el bioensayo. Así, se agregó la cantidad de OTC•HCl grado técnico correspondiente (en forma de polvo seco a la mezcla de los ingredientes), luego de realizar los siguientes cálculos:

$$OTC_a = (M \times D)$$

Donde:

OTC_a = OTC•HCl necesaria (g) sin tomar en cuenta la pureza y las pérdidas

M = Concentración nominal de la dieta medicada (g OTC.kg⁻¹)

D = Total de alimento preparado (kg)

$$OTC_b = [(OTC_a/P_1)/(100\%-P_2)]/P_3$$

Donde:

OTC_b = OTC•HCl necesaria (g) para preparar las dietas

P_1 = Porcentaje de pureza de la OTC•HCl

P_2 = Porcentaje de pérdida por elaboración

P_3 = Porcentaje OTC en el clorhidrato de OTC

Tabla 6. Composición de la fórmula base para las dietas experimentales (CENAIM-40).

Componentes	gramos/ 100 g de dieta seca
Harina de cabeza de camarón	31.50
Harina de pescado	10.75
Harina de calamar	4.25
Harina de trigo	5.00
Salvado de trigo	5.00
Harina de soya	18.20
Aceite de pescado	4.20
Lecitina de soya	1.00
Colesterol	0.50
Almidón de maíz	13.00
Premezcla de vitaminas	4.50
Premezcla de minerales	2.00
Poliacrilato de sodio	0.10

Tomado de: Manual de técnicas de nutrición acuícola, 1997.

Definida la cantidad de antibiótico correspondiente para cada una de las dietas (Tabla 7), se prepararon los pellets mediante un molino de carne casero. Este equipo comprimió la masa dándole una forma a manera de “spaghetti”, mientras atravesaba una matriz de 2.5 mm de diámetro a una temperatura de 35 – 40 °C. Luego, se secaron las dietas durante 4 horas a 60 °C en una secadora de granos y se trocearon manualmente en pedazos de entre 1 y 1.5 cm. Finalmente, se enfundaron, se saturaron con nitrógeno y se mantuvieron a –20 °C. La dieta control, sin el antibiótico, fue elaborada siguiendo el mismo procedimiento.

Tabla 7. Cantidad de dieta elaborada, junto con el correspondiente peso de antibiótico adicionado.

Dietas	Conc. nominal (ppt OTC)	Cantidad de alimento (g)	Cantidad de OTC·HCl (g)
Control	0	1500	0
A	1	670	0.94
B	5	670	4.70
C	10	670	9.41

2.1.3.2. Pérdidas por elaboración

Para la determinación de la pérdida real de OTC ocurrida en el proceso de elaboración del alimento medicado, se tomaron muestras por duplicado tal como se presenta en la Figura 7. Estas muestras fueron liofilizadas, guardadas en fundas saturadas con nitrógeno y mantenidas en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta ser analizadas.

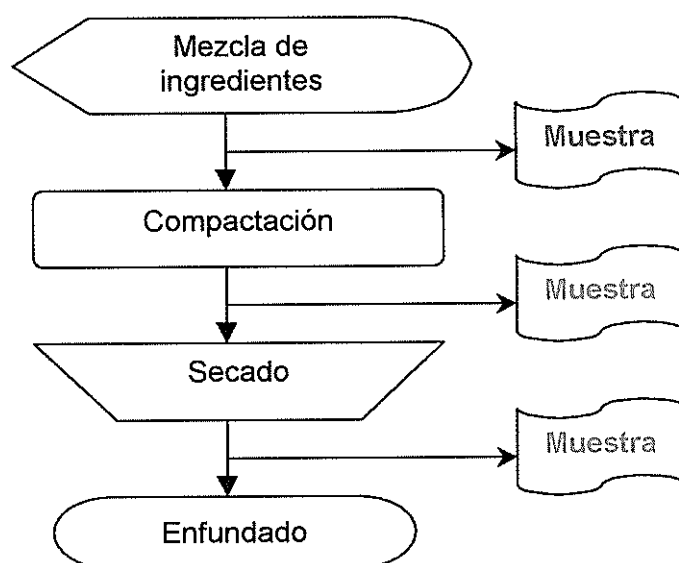


Figura 7. Esquema del muestreo realizado para determinar los valores reales de pérdida del antibiótico en la elaboración de las dietas.

La humedad del alimento fue determinada de acuerdo al procedimiento estándar del laboratorio de nutrición del Centro (CENAIM, 1997).

2.1.3.3. Pérdidas por lixiviación

En términos generales, la cantidad de una sustancia que se disuelve en el agua a partir del alimento medicado por lixiviación, puede cuantificarse mediante dos métodos: *a)* midiendo la cantidad de medicamento que permanece en el alimento luego de haber estado sumergido en el líquido, o *b)* determinando la concentración de la droga alcanzada en el agua, debida a la disolución del fármaco. Para nuestra investigación, la segunda alternativa de cuantificación fue la escogida, debido a que no se dispuso para el momento del ensayo, de todo el material necesario para extraer la OTC de las dietas medicadas.

De esta forma, el procedimiento de evaluación de la pérdida del antibiótico en el alimento, se basó en la metodología aplicada regularmente en el CENAIM para determinar la estabilidad de las dietas artificiales. La adaptación de este procedimiento, se describe a continuación:

a) Nueve fiolas de 125 mL de capacidad (prueba realizada por triplicado), son adicionadas con 100 mL de agua. Para el ensayo con agua dulce, se utilizó agua grado HPLC, en cambio, para la prueba con agua salada se empleó agua de mar filtrada por 50 μm .

- b)* Se colocaron las fiolas en el agitador, y se esperó hasta que la temperatura del “baño María” se regule en 23 ± 1 °C.
 - c)* Aproximadamente se utilizó 1.0 g de dieta por fiola.
 - d)* Homogenizar manualmente el tamaño de los pellets (entre 0.5 y 1 cm) y agregarlos a cada una de las fiolas.
 - e)* Encender el agitador y ajustarlo a 70 RPM.
 - f)* Luego de los primeros 15 minutos, detener el agitador e iniciar el muestreo del agua. Tomar 500 μL de líquido con una micropipeta automática. Filtrar la muestra por 0.2 μm (filtro descartable Schleicher & Schuell®) y recogerla en un vial ámbar.
 - g)* Inmediatamente después de concluir con el primer muestreo, reiniciar la agitación.
 - h)* Continuar con la toma de muestras después de media, 1, 2 y 6 horas de haberse iniciado la prueba.
 - i)* Guardar los viales en un congelador a -5 °C (si se va a inyectar en pocas horas).
 - j)* Inyectar 20 μL de las muestras de líquido en el cromatógrafo.
 - k)* Efectuar los cálculos para cuantificar la pérdida de OTC sufrida por el alimento balanceado.
- Es importante que durante el periodo del ensayo, se protega el sistema de la luz (natural y artificial) para evitar la degradación del antibiótico.

Luego de inyectar las muestras en el cromatógrafo, los valores de cuentas de área arrojados por el integrador del equipo, se transformaron en un valor de concentración (μg de OTC. mL^{-1}), mediante la ecuación de regresión lineal obtenida para el antibiótico durante la calibración del sistema (el método empleado para obtener esta ecuación se

explicará mas adelante). Con este valor, se continuó con los cálculos de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$OTC_{\text{agua}} = C_{\text{agua}} \times V$$

Donde:

OTC_{agua} = Cantidad de OTC desprendida de la muestra de alimento (μg)

C_{agua} = Concentración de OTC en la muestra de agua ($\mu\text{g OTC.mL}^{-1}$)

V = Volumen de agua en la fiola antes de tomar la muestra (mL)

$$P_L = [OTC_{\text{agua}} / (C_{\text{pellet}} \times A)] \times 100$$

Donde:

P_L = Porcentaje de OTC perdido en el agua por lixiviación

C_{pellet} = Concentración real de OTC en la dieta (mg OTC.g^{-1})

A = Peso de muestra de alimento (mg)

2.1.4. Protocolos

2.1.4.1. Parámetros físicos y químicos

Diariamente se monitoreó la temperatura del agua en cada tanque con un termómetro de mercurio. Para medir el oxígeno disuelto se utilizó un oxigenómetro HORIBA® 660 (Japón) y para el pH un medidor de pH TOA® HM-55 (Japón). Ambos parámetros se midieron cada 4 días.

2.1.4.2. Manejo de la alimentación

Dos días antes del inicio del bioensayo, se suspendió la alimentación buscando incrementar el apetito de los animales. Por esta razón, sólo en el primer día del

experimento se suministro el 7.5% de la biomasa. Para la continuación del bioensayo los animales recibieron el 5% de su biomasa, dividida en dos raciones iguales, la primera entre las 8 y las 9 de la mañana y la segunda entre las 6 y las 7 de la tarde.

El cálculo de la alimentación diaria se basó en la biomasa de cada tanque. Diariamente se hicieron correcciones de la biomasa total presente en los tanques, eliminando de acuerdo a su peso, a aquellos animales que salían del sistema. Adicionalmente, se asumió un crecimiento semanal de 1 gramo para todos los camarones que continuaban en el experimento, debido a que este crecimiento ha sido reportado anteriormente en ensayos realizados en el CENAIM.

Antes de iniciar el bioensayo, se calculó la cantidad aproximada de alimento que se iba a utilizar por día, sobre la base del número y peso de los animales y al porcentaje de biomasa que se iba a suministrar diariamente. Con este dato se pesaron y enfundaron pequeñas porciones de cada una de las dietas, con el objetivo de utilizar una funda diaria para cada uno de los tratamientos y mantener de esta forma la calidad del alimento. Las fundas se saturaron con nitrógeno y se mantuvieron a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El alimento sobrante de cada día de experimentación no fue utilizado posteriormente.

2.1.4.3. Consumo de alimento

Diariamente se limpiaron los tanques mediante el sifoneo. Simultáneamente, este procedimiento fue utilizado para determinar el consumo de alimento, al recuperar el balanceado sobrante del día anterior antes de dar la primera dosis matinal. El alimento

no consumido de cada tanque se acumuló en mallas metálicas, se enjuagó con agua destilada y se limpió de segmentos de muda y heces mediante pinzas. Posteriormente, las mallas con los sobrantes de balanceado se secaron en una estufa durante 24 horas a 60 °C, para finalmente recogerlos y pesarlos en una balanza analítica Mettler® AE-240 (0.0001 g). El consumo de alimento diario se calculó para cada uno de los 12 tanques empleando la siguiente fórmula:

$$A_C = A_S - A_R$$

Donde:

A_C = Alimento consumido (g)

A_S = Alimento suministrado (g, en peso seco)

A_R = Alimento recuperado (g, en peso seco)

2.1.4.4. Frecuencia de muda

A pesar de que los camarones consumen buena parte de los hexoesqueletos desechados durante la muda, la sección aparentemente mas duradera es la del cefalotórax, principalmente el rostrum. Tomando en cuenta esta observación, diariamente se consideró la cantidad de animales que habían mudado en cada tanque de acuerdo al número de rostrums recuperados con el sifoneo.

2.1.4.5. Toma de muestras

El monitoreo de los camarones se dio en los siguientes días: inicio o día 0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 28. Luego de limpiar los tanques y recuperar el alimento sobrante del día anterior, se tomaron dos animales por tanque en cada día de muestreo. Aunque la

elección de los animales fue aleatoria, tan solo aquellos camarones que claramente mostraban haber mudado recientemente fueron devueltos al tanque y no fueron tomados en cuenta como muestra del día.

Todos los animales seleccionados fueron enjuagados con agua destilada, pesados en una balanza OHAUS[®] (0.01 g), guardados en fundas, etiquetados y mantenidos en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser analizados.

2.2. IMPLEMENTACIÓN DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

✓ El método analítico implantado para la determinación cualitativa y cuantitativa mediante HPLC de la oxitetraciclina (OTC), incluyó una serie de pasos entre los cuales se cuentan: muestreo, almacenaje, extracción y análisis.

Debido a la conocida fotosensibilidad de la OTC, es importante evitar durante el desarrollo de los análisis cualquier exposición del antibiótico ante la luz y altas temperaturas, principalmente. De igual forma, esta precaución debe tomarse en cuenta con soluciones o extractos que contengan OTC.

2.2.1. Químicos y reactivos

Los reactivos utilizados para el procedimiento de extracción de la OTC, como para su análisis cromatográfico, se detallan a continuación: ácido cítrico hidratado 99.8% (Riedel-de Häen. Seelze 1, Alemania); acetonitrilo, n-Hexano, y metanol >99.5% (E. Merck, Darmstadt, Alemania); ácido oxálico dihidratado 99.5%, ácido tricloracético 99.5% y fosfato ácido disódico 99% (Mallinckrodt Baker, Inc., Kentucky 40361); EDTA disódico dihidratado 99.5% (Dojin, Japón); solución de amonio 29% (Kanto Chemical Co., Inc., Japón); oxitetraciclina dihidratada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); y clorhidrato de oxitetraciclina 85.5% (genérico).

La totalidad del agua utilizada en la preparación de soluciones, el enjuague final de la vidriería y la limpieza de las líneas del cromatógrafo, provino de un purificador Milli-Q

SP Waters[®]. Para la continuación del trabajo el producto del equipo será referido como: agua grado HPLC.

2.2.2. Extracción de OTC

2.2.2.1. Soluciones de extracción

Debido a que no se contaba con un método para la extracción de OTC en el CENAIM, se procedió primeramente a revisar los procedimientos publicados. Luego de esta investigación se observó que la principal variante entre metodologías se centraba en la composición de la solución de extracción. De esta forma, previo a la definición de la solución de extracción mas apropiada para la obtención de la OTC a partir del camarón, se probaron tres soluciones que se detallan a continuación:

- a) Solución al 5% de ácido tricloracético + 0.5% de EDTA-Na₂ (Ueno *et al.*, 1989).
- b) Solución 0.1 M de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), pH 4.5 (Mohney *et al.*, 1997).
- c) Solución tampón McIlvaine (McBuffer): 0.1 M de ácido cítrico y 0.2 M de fosfato ácido de disódico en una relación 62:38, respectivamente, + 0.1 M EDTA-Na₂, pH 4.0 (AOAC, 1990).

La elección de la solución para la extracción rutinaria de la OTC, se basó principalmente en los siguientes puntos:

- Estabilidad de la solución (formación de precipitados).
- Facilidad de trabajo con el extracto de la muestra.
- Nivel de limpieza del extracto una vez que se inyectaba en el cromatógrafo, especialmente la posible interferencia de impurezas con el pico de la OTC.

2.2.2.2. Procedimiento

Para la extracción de la OTC, tanto del músculo de camarón como del alimento balanceado, la metodología escogida fue la publicada por Ueno *et al.* (1989). Como se mencionó anteriormente el único punto que varió fue la composición de la solución de extracción.

En el caso del alimento balanceado, éste se pulverizó en un mortero y se tamizó a través de una malla de 500 – 700 μm . En cambio para músculo de camarón, el procedimiento tomó en cuenta algunas recomendaciones de Medina (1994). Este se describe a continuación:

- a) Desprender el cefalotórax del animal.
- b) Retirar la cutícula y los pleópodos del abdomen.
- c) Cortar el abdomen en pequeños trozos mediante una tijera de acero inoxidable, mientras el animal se mantiene semicongelado.
- d) Triturar el tejido en un homogenizador mientras se mantiene la temperatura baja con un baño de hielo.

Para el análisis del alimento balanceado se pesaron 0.5 g de muestra (triturada y tamizada), para el músculo de camarón se utilizaron 3 g de homogenizado. Así, pesadas las muestras en una balanza analítica Mettler[®] AE-240 (0.0001 g), ambas muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga Nalgene[®] de 50 mL. Los siguientes pasos del procedimiento, se aplicaron por igual para ambos tipos de muestra.



- a) Agregar 15 mL de solución de extracción al tubo de centrifuga con la muestra.
- b) Proceder a la extracción mediante el uso de un biohomogenizador Ultra Turrax T25 durante 2 minutos a 13,500 RPM, manteniendo la temperatura baja con un baño de hielo.
- c) El homogenizado resultante fue centrifugado durante 15 minutos a 15,000 RPM manteniendo la temperatura a 4 °C mediante una centrifuga refrigerada Kokusan 2000 (Tokyo, Japón).
- d) Recoger el sobrenadante en un tubo de centrifuga nuevo.
- e) Agregar 15 mL de solución de extracción al remanente de la muestra original.
- f) Biohomogenizar durante 1 minuto a 13,500 RPM, para extraer cualquier residuo de OTC adicional.
- g) Centrifugar 15 minutos a 4 °C y 15,000 RPM.
- h) Recoger el sobrenadante y unirlo al anterior.
- i) En los sobrenadantes colectados agregar 8 mL de n-hexano y mezclar vigorosamente durante 3 minutos.
- j) Centrifugar 10 minutos a 4 °C y 3,000 RPM.
- k) Desechar el sobrenadante junto con cualquier residuo que se encuentre en esta fase.
- l) Repetir dos veces más este lavado y conservar la fase acuosa.

- m) La fase acuosa obtenida es filtrada por un cartucho Sep-Pak C₁₈ (Waters Assoc. Milford, MA., USA) previamente activado*, para eliminar impurezas del extracto.
- n) Lavar el filtro con 10 mL de agua grado HPLC y desechar todo el líquido.
- o) Repetir este lavado dos veces más.
- p) Eluir la OTC retenida en el cartucho con 20 mL de metanol, mientras se recoge el eluyente en una pera de vidrio.
- q) Evaporar la totalidad del metanol a 35 °C utilizando un evaporador rotatorio Büchi[®] H2000B.
- r) Rediluir el remanente de la pera con 1 mL de fase móvil.
- s) Recuperar este concentrado en una jeringa descartable de 1.5 mL y pasarlo por un filtro descartable de 0.2 µm (Schleicher & Schuell[®]).
- t) Recoger el filtrado en un vial ámbar con tapa rosca de teflón.

* *Activación de los cartuchos Sep-Pak C₁₈*: Lavarlos con 10 mL de metanol, luego 10 mL de agua grado HPLC y finalmente con 10 mL de una solución al 5% de EDTA-Na₂.

2.2.2.3. Recuperación del método

El porcentaje de recuperación (PR) es un valor que define la capacidad extractiva del método. Este porcentaje fue determinado mediante una técnica conocida en inglés como “spiking”, que consiste en la comparación de la concentración de OTC cuantificada en el extracto final de una muestra, con la cantidad conocida de medicamento incluida previamente en la misma muestra antes de procesarla.

Para el caso del procedimiento de extracción descrito en este documento, 20 μL de un stock de 10 ppm de OTC (2 μg de OTC/tubo) fueron agregados en el tubo de centrifuga con la muestra justo después de haber añadido los primeros 15 mL de solución de extracción. Luego, el PR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PR} = \text{OTC}_f / (\text{OTC}_i / V_e) \times 100$$

Donde:

PR = Porcentaje de recuperación

OTC_i = Cantidad de OTC adicionada a la muestra antes de la extracción (μg)

OTC_f = Concentración de OTC en el extracto ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

V_e = Volumen del extracto (mL)

2.2.3. Análisis de OTC mediante HPLC

El primer trabajo cromatográfico, consistió en verificar la capacidad del HPLC para detectar la OTC empleando la fase móvil propuesta por Ueno *et al.* (1989). Una vez que se comprobó la efectividad del sistema para detectar el antibiótico, se procedió a definir las principales variables cromatográficas, tales como: velocidad de flujo de la fase móvil, longitud y temperatura de la columna y longitud de onda del detector, con el objetivo de obtener un pico de forma apropiada, que permitiera una confiable cuantificación de la OTC.

2.2.3.1. Instrumental

Para el análisis se utilizó un sistema cromatográfico HPLC modular que consistió en: una bomba LC-10AT Shimadzu (S. Seisakusho, Japón), un inyector manual Rheodyne 7725i Shimadzu con un bucle de 20 μL y un detector UV/VIS SPD-6AV Shimadzu. El mecanismo de separación de fase reversa utilizado consistió en dos columnas Shim-pack CLC-ODS de 15 cm de longitud y diámetro interno de 0.6 cm, ubicadas en serie dentro un horno CTO-6A Shimadzu. Los datos generados por el detector fueron registrados y analizados por un integrador/registrador Shimadzu CR-501.

2.2.3.2. Condiciones operacionales

2.2.3.2.1. Flujo

Para el análisis de OTC un sistema de flujo isocrático, es decir, donde el flujo de la fase móvil es constante durante todo el análisis, fue aplicado. Este se fijó en $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.2.3.2.2. Presión

La presión, al no ser una constante en nuestro sistema, fue utilizada como un indicativo de las condiciones del cromatógrafo. Valores entre $94 - 97 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ mostraron ser los típicos en el sistema una vez estabilizadas las condiciones de temperatura, principalmente.

2.2.3.2.3. Temperatura

La temperatura a la que se mantuvieron las columnas en el horno fue 30 °C. Este valor fue bastante constante, mientras la temperatura ambiental del laboratorio fue de 22 °C.

2.2.3.2.4. Longitud de onda

El detector, que para el análisis de OTC fue un espectrofotómetro UV-VIS (con un espectro luminoso que comprende la luz ultravioleta y el rango de luz visible) fue fijado a una longitud de onda de 365 nm.

2.2.3.3. Fase móvil

La fase móvil utilizada fue la propuesta por Ueno *et al.* (1989), cuya preparación se describe a continuación:

a) *Preparación:* Elaborar una solución 0.2 M de ácido oxálico. Mediante un agitador magnético mezclar esta solución con metanol y acetonitrilo en una relación 3:1:1 (ácido oxálico 0.2 M: metanol: acetonitrilo) y ajustar el pH a 2.0 con una solución de amonio al 29%. Es importante agregar lentamente la solución básica mientras la fase móvil se mantiene en movimiento, ya que de no hacerse de esta forma, la lectura del medidor de pH puede ser irreal. Además, la formación de un precipitado puede ser otro resultado negativo si se adiciona rápidamente la solución de amonio.

- b) *Filtración:* Preparada la fase móvil, esta fue pasada por un filtro 0.45 μm (Whatman[®]) con la ayuda de un sistema Kitasato.
- c) *Desgasificación:* Hay varios métodos para realizarla, aunque el disponible en el laboratorio de Cromatografía del CENAIM utiliza un sonicador Branson 5200 (Bransonic, Japón) junto con una bomba de vacío. El sonicador emite ondas de baja frecuencia que desprende los gases disueltos, mientras el vacío provocado simultáneamente por la bomba, eleva la tasa de desgasificación

2.2.4. Validación del método

2.2.4.1. Solución stock de OTC

Todas las soluciones stock, tanto para el cálculo del porcentaje de recuperación, como para la elaboración de curva de calibración, fueron preparadas con dihidrato de oxitetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99.5% de pureza). Para la solución stock de OTC, se pesaron 10 mg de $\text{OTC} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en una balanza analítica Mettler[®] AE-240 (0.00001 g) y se disolvieron en un matraz aforado color ámbar con 50 mL de fase móvil previamente filtrada por 0.2 μm . La solución stock de OTC se mantuvo en el refrigerador a $-5\text{ }^\circ\text{C}$ y se utilizó para preparar las soluciones estándar del antibiótico en el mismo día.

2.2.4.2. Curva de calibración y estándares

Para la preparación de los estándares y el cálculo de la curva de calibración, se siguieron las recomendaciones de Passey *et al.* (1986), quienes sugieren utilizar no menos de cinco

puntos con cuatro réplicas cada uno, para evaluar la linealidad de la respuesta de una técnica analítica.

Basados en esto, la solución stock de OTC (185.5 ppm de OTC), fue empleada para obtener mediante dilución los estándares del antibiótico. A partir de 4 diferentes diluciones de la solución stock del fármaco, se prepararon ocho diluciones con distintas concentraciones por cuatriplicado: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 ppm, agregando mediante una micropipeta automática la cantidad requerida de solución stock a un vial ámbar con 1.0 mL de fase móvil previamente filtrada por 0.2 μm . Estas soluciones estándar de OTC, fueron inyectadas aleatoriamente en el HPLC obteniéndose las lecturas de cuentas de área para cada una de las concentraciones y sus respectivas réplicas.

De esta forma, los 32 resultados obtenidos se emplearon para elaborar una curva de regresión lineal, con la que se relacionó la lectura del integrador con la concentración de cada estándar.

2.2.4.3. Límite de detección

Para que la técnica cromatográfica implantada demuestre su utilidad en el monitoreo de residuos de oxitetraciclina, esta debe ser capaz de detectar niveles tan bajos como el límite máximo de residuos (LMR) establecido internacionalmente para los productos acuícolas. Este valor, 0.1 μg de OTC.g⁻¹ de tejido comestible de camarón, consecuentemente fue la base para definir que el equipo debía ser capaz de separar y

detectar adecuadamente la mitad de esta concentración. Simultáneamente, y tomando en cuenta el concepto cromatográfico que determina el límite de detección, la señal producida por esta concentración debía generar una altura de pico que corresponda a por lo menos tres veces el nivel de ruido del equipo.

2.2.5. Cálculo de concentración en muestras

La determinación de la cantidad de OTC presente, ya sea en las dietas o en el músculo de camarones, requiere primero del empleo de la ecuación de regresión lineal (descrita en los resultados), que transforma el dato de cuentas de área en un valor de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) antibiótica en el extracto. Luego de tener este valor, se aplica la siguiente fórmula para obtener el resultado de concentración de la OTC en la muestra original:

$$\text{OTC}_{\text{muestra}} = (\text{OTC}_f / M \times V_e) / \text{PR}$$

Donde:

- $\text{OTC}_{\text{muestra}}$ = Concentración de OTC en la muestra original (ppm o $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
- M = Peso de muestra sometido al proceso de extracción (g)
- OTC_f = Concentración de OTC en el extracto (ppm o $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
- V_e = Volumen del extracto (mL)
- PR = Porcentaje de recuperación

2.3. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

Se analizaron los resultados de: supervivencia, consumo de alimento y pérdidas de OTC en el proceso de elaboración de las dietas, por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA). El intervalo de confianza empleado fue de $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.1.1. Definición de las condiciones analíticas cromatográficas

La experimentación de diferentes variables del sistema cromatográfico tuvieron como objetivo primario la obtención de un cromatograma donde el pico generado por la OTC sé graficara de forma adecuada y no tuviera interferencia con picos endógenos de la muestra.

El desarrollo de este trabajo se basó en ensayos de prueba y error, manejando tres variables: temperatura de la columna, longitud de la columna (cantidad de columnas) y la velocidad de flujo de la fase móvil. La figura 8 muestra la secuencia como se probaron estos parámetros analíticos.

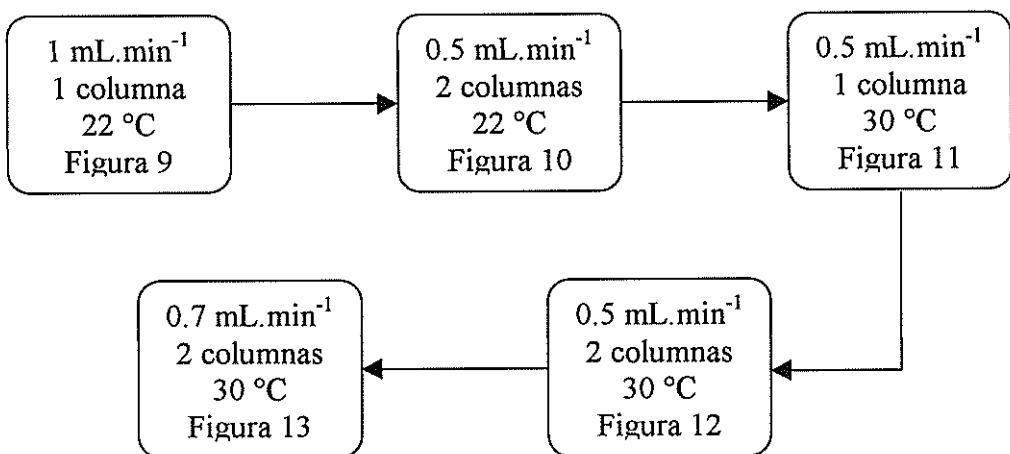


Figura 8. Secuencia de pruebas para definir las condiciones analíticas del HPLC. En todas las pruebas se trabajó con un estándar de 0.5 ppm de OTC. El cromatograma correspondiente a cada prueba se muestra en las figuras de acuerdo a la numeración indicada.

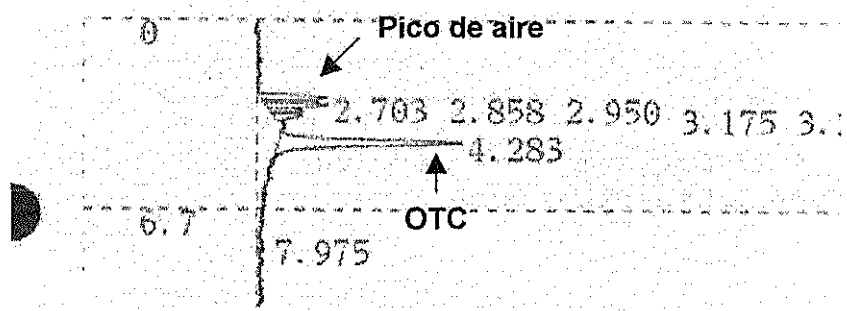


Figura 9. Cromatograma de estándar de OTC con 1 columna, 1 mL.min⁻¹ a 22 °C

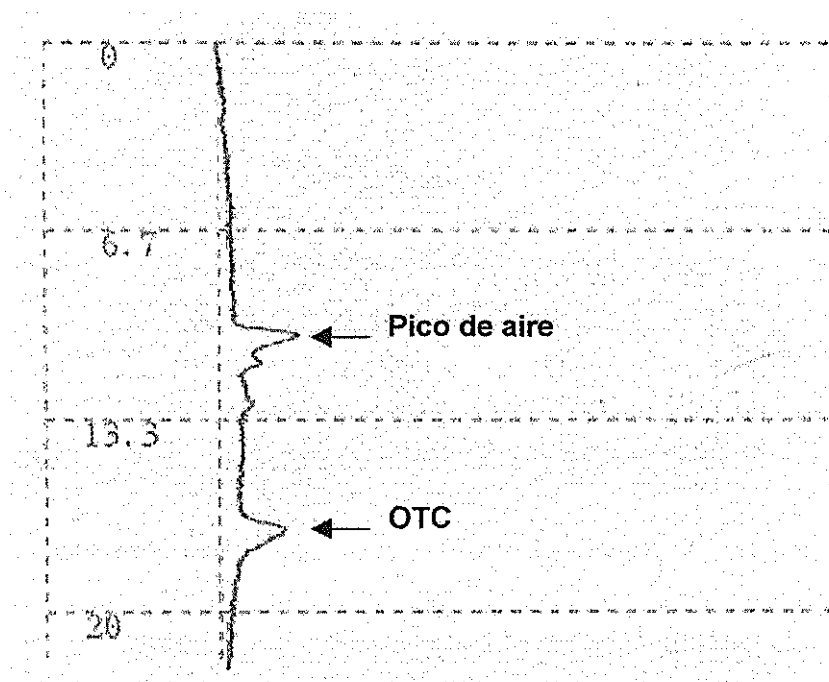


Figura 10. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, 0.5 mL.min⁻¹ a 22 °C

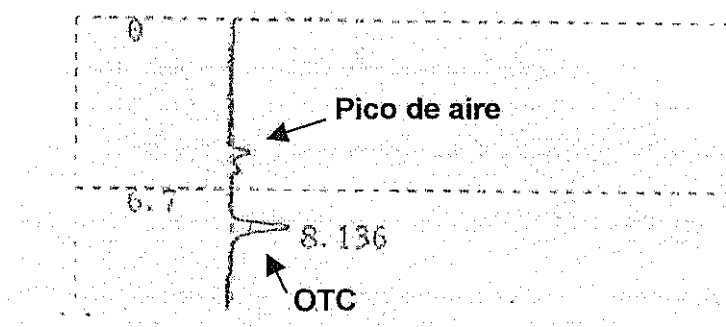


Figura 11. Cromatograma de estándar de OTC con 1 columna, $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$

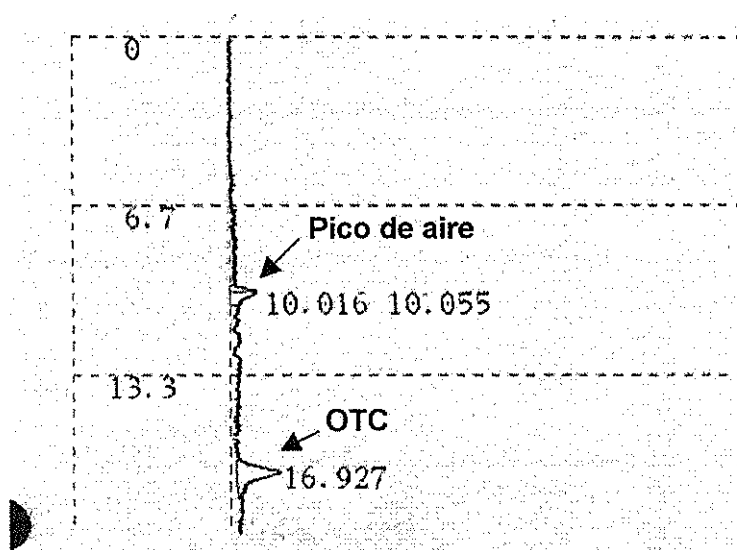


Figura 12. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$

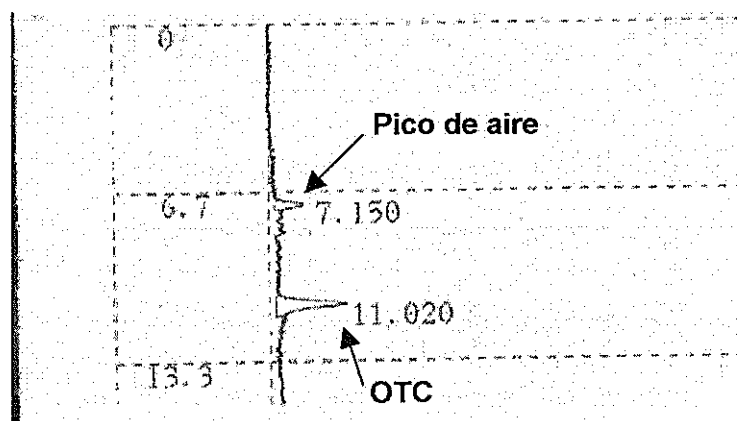


Figura 13. Cromatograma de estándar de OTC con 2 columnas, $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$
Condiciones analíticas escogidas para la implantación del método.

Como se trató previamente en los antecedentes de esta tesis, la elección de las condiciones analíticas de un sistema cromatográfico, suele ser un trabajo donde no existen valores o datos que comparar, sino es una elección basada en la comparación visual de los picos que se grafican en el cromatograma. Así, la forma del pico originado por el analito es un factor muy importante, ya que de esta depende el correcto cálculo del área bajo la curva que efectúe el integrador (Lindsay, 1992; Snyder *et al.*, 1988).

La tabla 8 muestra los resultados de las 5 pruebas realizadas, basados en la calificación visual de cada uno de los cromatogramas. Luego de estudiar los resultados, se definieron las condiciones analíticas del sistema, siendo estas las empleadas en el análisis cromatográfico que se muestra en la figura 13.

Tabla 8. Resultados visuales para calificar dos aspectos que definen la calidad de los picos graficados en el cromatograma.

Figura	Forma de pico	Separación con el pico de aire
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
11	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
12	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Otra variable que se evaluó, fue la longitud de onda a la que operó el espectrofotómetro. De la revisión bibliográfica, se obtuvieron las longitudes de onda mayormente empleadas con sistemas similares de HPLC, 355, 360 y 365 nm para el análisis de OTC. Se probaron estos valores, sin obtener diferencias en su capacidad de detección.

Finalmente, se resumen las condiciones establecidas para el análisis cuali y cuantitativo de la OTC mediante HPLC en el laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría del CENAIM (Tabla 9). Cromatogramas de dos estándares de OTC se muestran en las figuras 14 y 15.

Tabla 9. Condiciones operacionales del sistema HPLC para el análisis de OTC.

Temperatura de columna	30 °C
Columnas (2)	ODS (15 cm x 6 mm d.i.)
Presión	94 - 97 Kg.cm ⁻²
Flujo	0.7 mL.min ⁻¹
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda (detector)	365 nm
Tiempo de elución	11 ± 0.05 min

3.1.2. Evaluación del procedimiento de extracción

Inicialmente el procedimiento de extracción empleado fue el desarrollado por Ueno *et al.* (1989). Al aplicarlo, la solución de extracción presentó un problema recurrente de precipitación, lo que generó la búsqueda de otras soluciones alternativas. Se probó la solución empleada por Mohny *et al.* (1997) para extraer OTC de *P. stylirostris*, pero originó complicaciones en el procedimiento de extracción, específicamente en el lavado del extracto con hexano. Adicionalmente, se estimó que esta solución de extracción no era apropiada, ya que no fue utilizada junto con métodos de detección y cuantificación cromatográficos, sino microbiológicos, donde los extractos no requieren un alto grado de pureza. Finalmente, la solución tampón McIlvaine, fue evaluada por haber sido utilizada ampliamente para la extracción de OTC de varios tejidos.

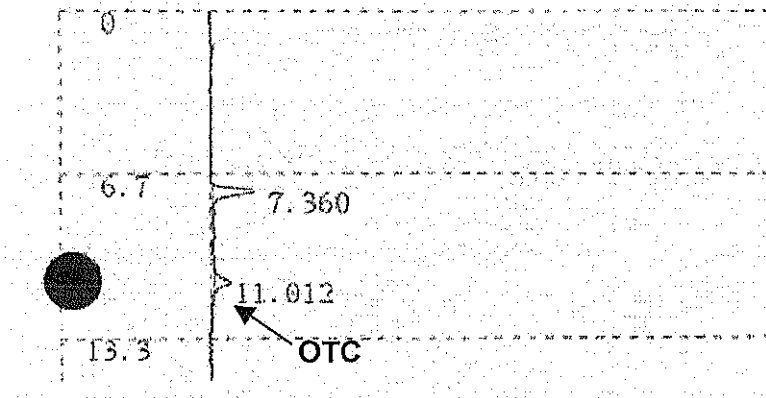


Figura 14. Cromatograma de estándar (0.07 ppm OTC) una vez establecidas las variables analíticas. El tiempo de elución se observa sobre el pico (11.012 min)

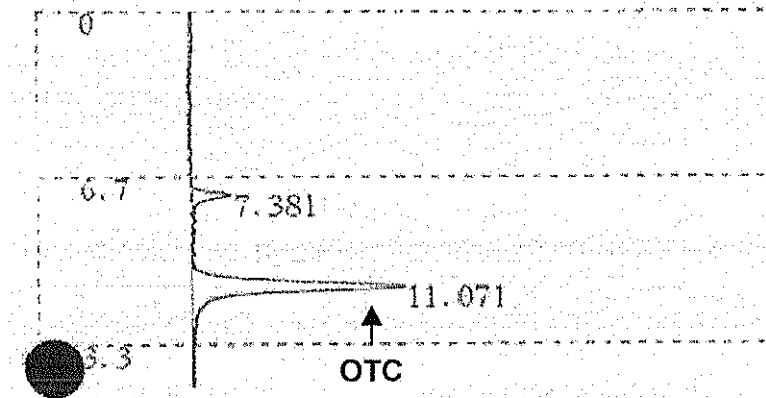


Figura 15. Cromatograma de estándar (0.8 ppm OTC) una vez establecidas las variables analíticas. El tiempo de elución se observa sobre el pico (11.071 min)

Los principales beneficios de esta solución se observaron en el procedimiento de extracción, que si bien no tuvo variaciones metodológicas, generó la obtención de un extracto con menores dificultades de manejo, especialmente en cada uno de los tres lavados con hexano de las muestras de tejido de camarón. El mismo procedimiento de extracción fue utilizado para las dietas medicadas.

En la figura 16 se muestra un cromatograma típico a partir de extractos de músculo de animales sin OTC, en cambio, en la figura 17 se muestra un cromatograma de un extracto de camarón alimentado con las dietas medicadas. En la figura 18 se muestra un cromatograma típico a partir de un extracto de la dieta A (1 ppt OTC).

3.1.3. Validación del método

Establecidas las condiciones operacionales para el análisis de la OTC, se elaboró la curva de calibración (figura 19). La ecuación de la regresión lineal calculada: $4.84084 \times 10^{-5} \cdot X + 2.2609 \times 10^{-2}$, mostró una respuesta lineal ($r^2 = 0.9978$) entre las concentraciones de 0.05 y 6.4 ppm de OTC.

El límite de cuantificación se estableció en una concentración de 0.05 ppm de OTC en el extracto. De acuerdo a la capacidad del bucle que define el volumen de muestra inyectado en el cromatógrafo, 20 μL , el límite de cuantificación del método establecido es de 1 ng de OTC.

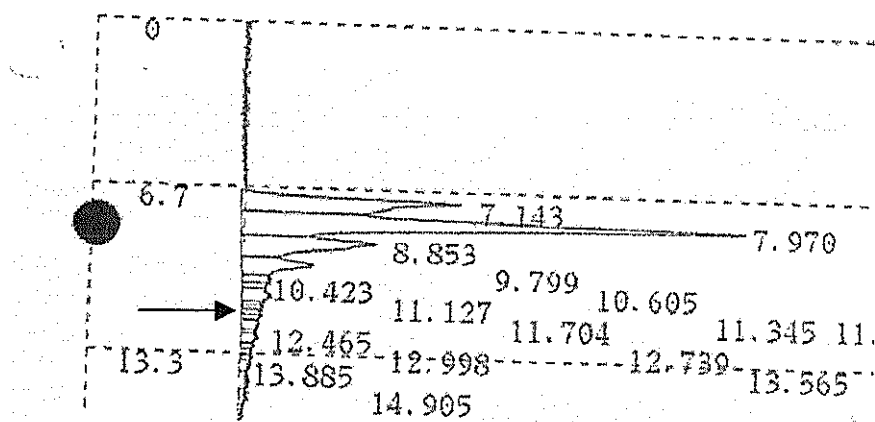


Figura 16. Cromatograma de extracto de músculo de camarón sin OTC. La flecha señala el sitio en el gráfico (tiempo de elución), donde el pico de OTC debe aparecer. No se observa el pico.

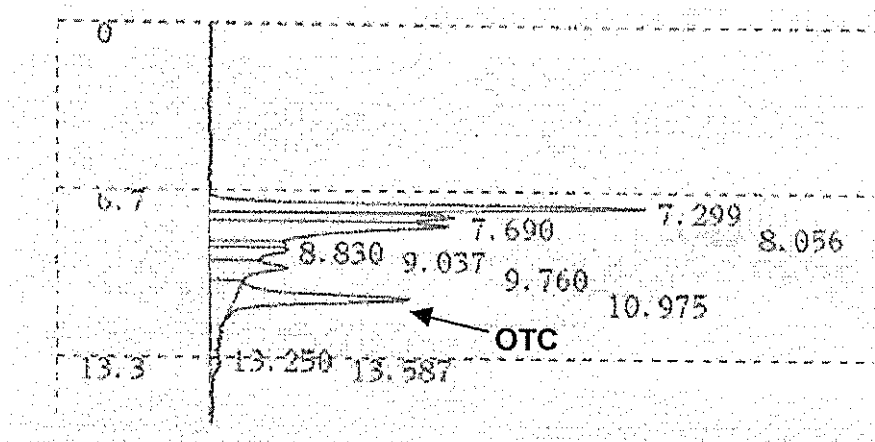


Figura 17. Cromatograma de extracto de músculo de camarón con OTC. Se observa el pico de OTC eluyendo a los 10.975 min.

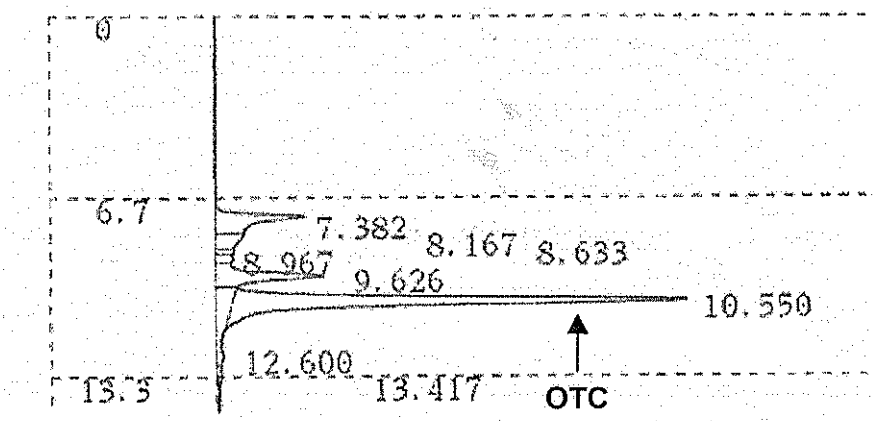


Figura 18. Cromatograma de extracto de dieta medicada de 1 ppt.

Los porcentajes de recuperación (PR) del procedimiento de extracción, mostraron ser dependientes de la matriz sometida a análisis. Para el caso de las dietas el PR promedio fue de 94.8%. En cambio, para las muestras de músculo la técnica de extracción recuperó en promedio el 68.1% del antibiótico.

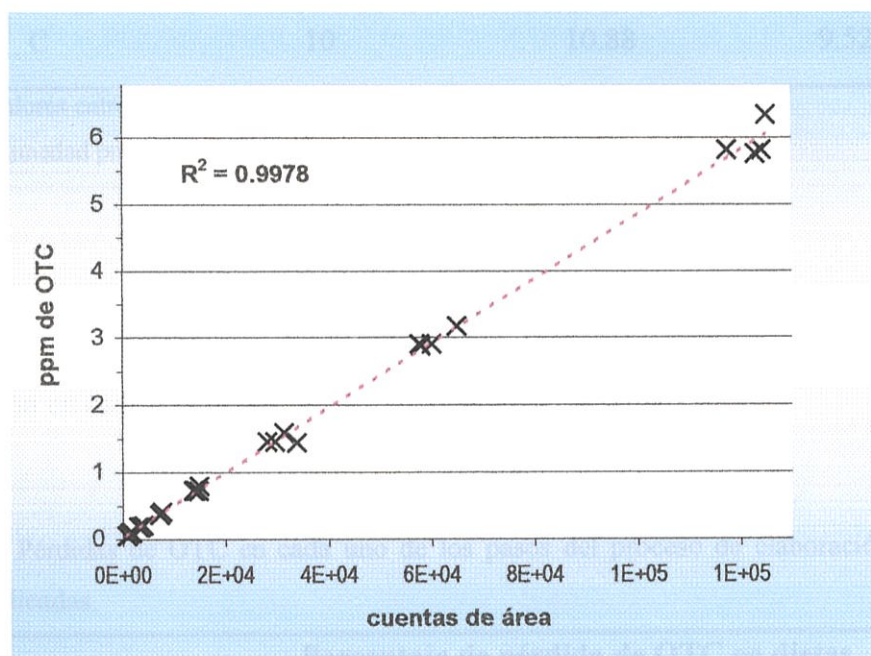


Figura 19. Curva de calibración para la OTC en el sistema cromatográfico empleado.

3.2. DIETAS

En la tabla 10 se muestran las concentraciones nominales de las tres dietas medicadas, junto con la respectiva concentración de antibiótico que se adicionó previo a la elaboración, y la concentración final presente en el alimento cuantificada mediante cromatografía.

Tabla 10. Concentración de OTC en las dietas pre y post-elaboración de las dietas.

Dietas*	Concentración (g OTC.kg ⁻¹ de dieta)		
	Nominal	Agregada	Final
Control	0	0	0
A	1	1.04	0.81 (0.06)
B	5	5.44	4.47 (0.1)
C	10	10.88	9.52 (0.4)

Valores entre paréntesis = desviación estándar

* Humedad promedio: 6.5%

Las pérdidas acumuladas del antibiótico que se originaron como efecto del proceso de elaboración en cada una de las dietas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Pérdidas de OTC en cada uno de los pasos del proceso de elaboración de las tres dietas medicadas.

Dieta	Porcentaje de pérdida de OTC en dietas			
	Mezcla	Compactación	Secado	Acumulada
A	6.1	-0.4	20.7	25.8
B	3.4	-2.3	12.1	17.8
C	9.8	-0.8	6.5	12.5

Luego del proceso de compactación, el cual incrementó la temperatura de la mezcla a no más de 40 °C, la pérdida acumulada del antibiótico fue negativa (promedio: -1.16%). Esto quiere decir, que no se degradó OTC en este paso del proceso de elaboración, ya que la pérdida que se cuantificó fue inferior a la determinada en la mezcla de las dietas.

El número negativo se originó probablemente por la variabilidad intrínseca del método de extracción. En el proceso de secado, en cambio, la pérdida promedio fue significativamente superior a la de los pasos anteriores ($P < 0.05$), aunque no fue homogénea para cada una de las dietas.

Estos resultados denotan como la mayor parte de las pérdidas de OTC se produjeron en el secado de las dietas, como muestran los datos de pérdida individuales promedio de las tres dietas medicadas (Figura 20).

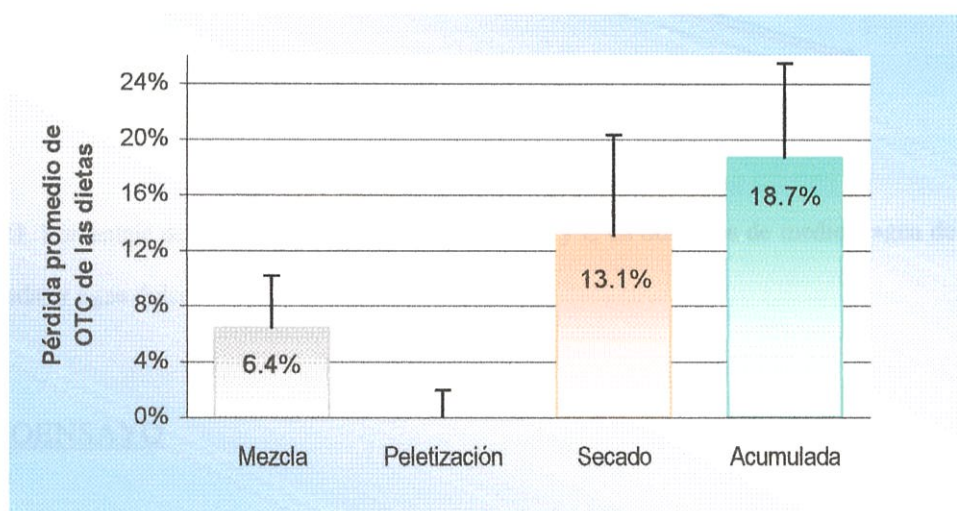


Figura 20. Porcentajes promedio de antibiótico perdido de las dietas en cada una de las etapas del proceso de elaboración.

La lixiviación de la OTC fue un parámetro adicional evaluado. Los resultados no mostraron una relación entre la concentración del antibiótico en el alimento y el porcentaje de OTC que se desprendió de este. En cambio, se observó una mayor lixiviación del antibiótico cuando se sumergían las dietas en agua de mar, comparado con las pruebas utilizando agua dulce, como se muestra en la figura 21.

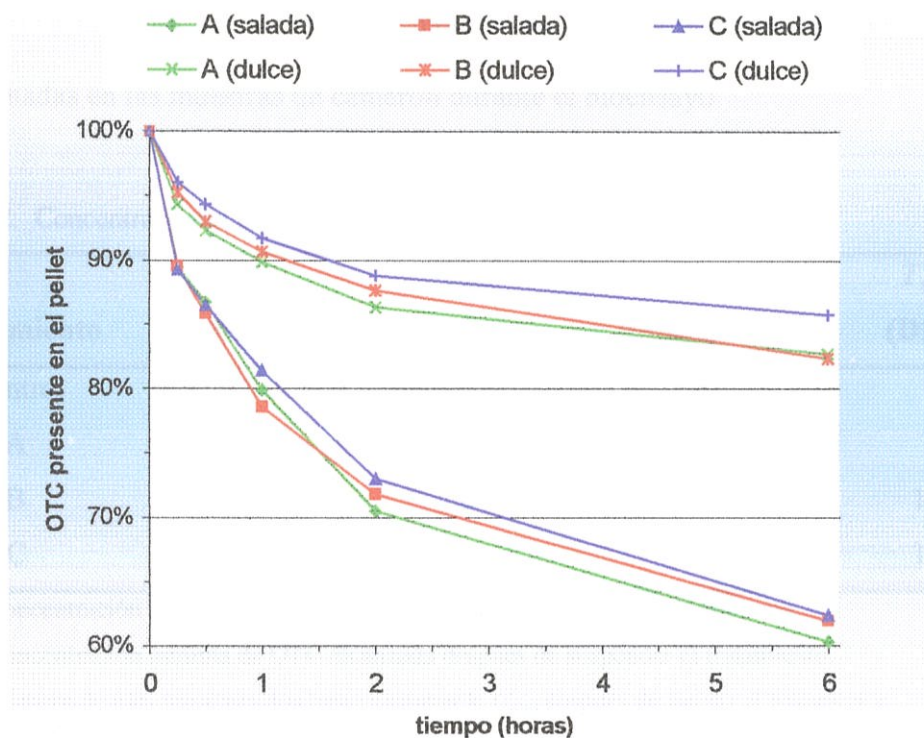


Figura 21. Porcentaje de OTC lixiviado en las dietas A, B y C en dos tipos de medios, agua de mar a 35 ups (salada) y agua dulce.

3.3. BIOENSAYO

Durante los 28 días de duración del bioensayo la temperatura del agua se mantuvo a 23.3 ± 0.9 °C, y la concentración de oxígeno disuelto se estableció en un nivel de 5.2 ± 0.6 mg.L⁻¹. La supervivencia de los animales en los tanques fue alta, 94, 95, 95, y 84%, para el control y los tratamientos A, B y C, respectivamente. De estos, tan solo el tratamiento con la mayor dosis de antibiótico (C) mostró un porcentaje de supervivencia significativamente inferior al del control y los demás tratamientos ($P < 0.05$).

Las curvas de acumulación y pérdida de la OTC del músculo del *P. vannamei* se muestran en la figura 22. La tabla 12 muestra las concentraciones máximas y mínimas determinadas en las muestras de camarón durante el bioensayo.

Tabla 12. Concentraciones promedio de OTC en el *P. vannamei*

Tratamiento	C_{max} (ppm OTC)	T_{max} (Días)	C_{min} (ppm OTC)	T_{min} (Días)
Control	0.0		0.0	
A	3.1	4	0.07	7
B	12.2	6	0.13	10
C	16.6	4	0.17	10

C_{max} : Concentración máxima de OTC alcanzada después de iniciar el tratamiento.

C_{min} : Concentración mínima de OTC alcanzada después de suspender el tratamiento.

T_{max} : Número de días transcurridos hasta alcanzar la C_{max} después de iniciar el tratamiento.

T_{min} : Número de días transcurridos hasta alcanzar la C_{min} después de suspender el tratamiento.

En todos los tratamientos se pudo observar una rápida acumulación del antibiótico después de iniciar el bioensayo. Transcurridos los primeros 6 días de medicación, ya se habían alcanzado las máximas concentraciones de OTC en los tres tratamientos.

Pocos días después de suspender el suministro de alimento con OTC (promedio: 5.3 días), en todos los tratamientos se determinaron concentraciones musculares del antibiótico, por debajo de 2 ppm, nivel tolerado por la FDA para las muestras de camarón cultivado.

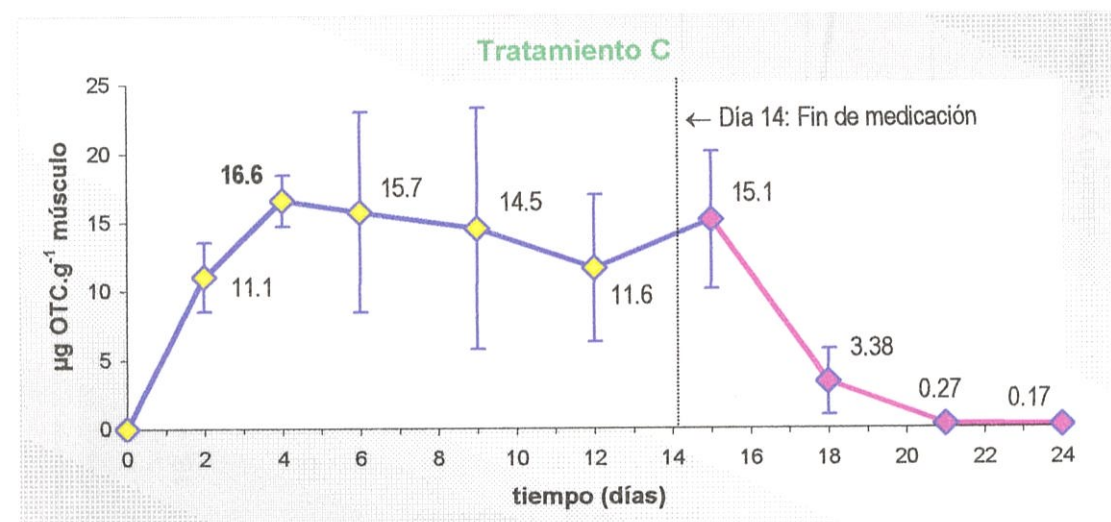
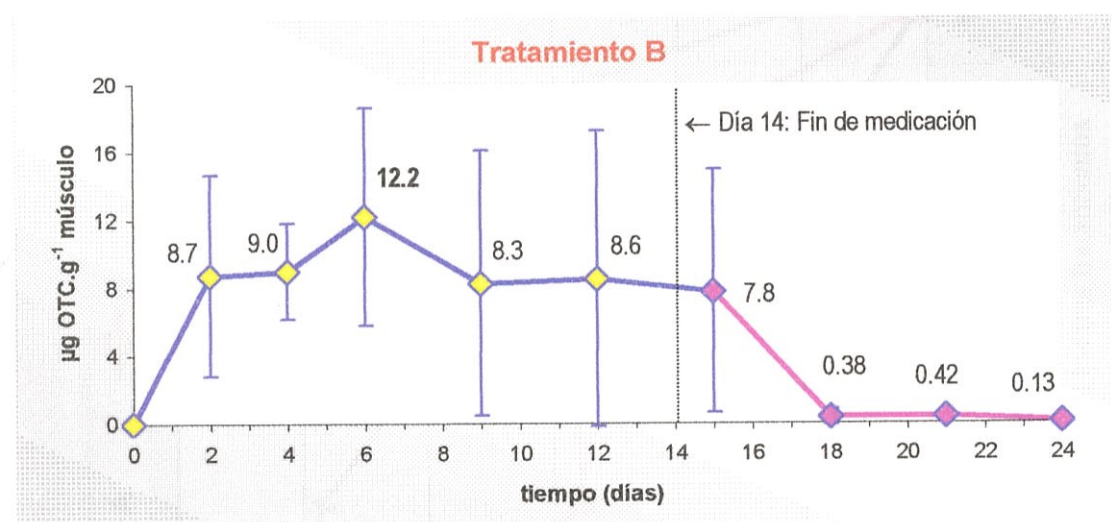
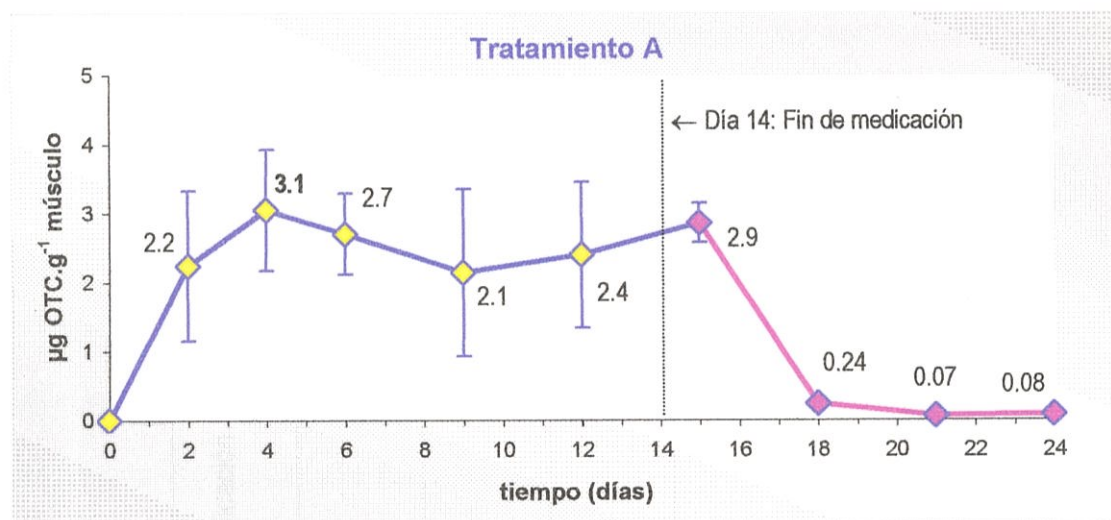


Figura 22. Concentración promedio de OTC en los camarones alimentados con las tres dietas medicadas. Las líneas azules con rombos amarillos representan el periodo de medicación. La línea y los rombos de color lila representan el periodo sin antibiótico en la dieta.

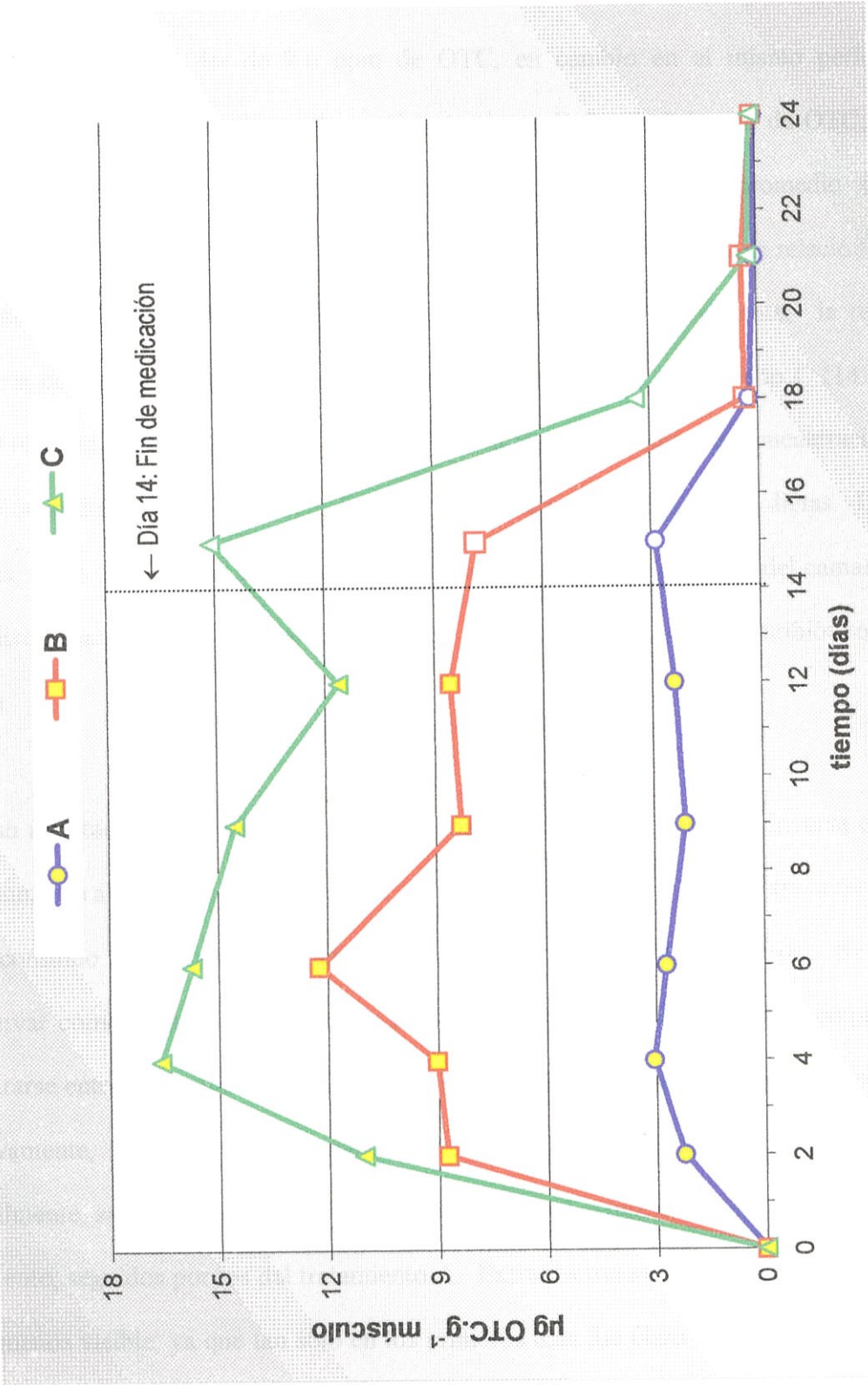


Figura 23. Curvas de acumulación y pérdida de la OTC con los tres tratamientos.

La figura 23 muestra las curvas de acumulación y pérdida del antibiótico en conjunto. La concentración promedio mantenida en los camarones desde el día 2 hasta el día 15 en el tratamiento A fue de 2.6 ppm de OTC, en cambio en el mismo periodo la concentración promedio alcanzada en el tratamiento B fue de 9.1 ppm de OTC. Esto corresponde a una relación de 3.5:1 entre las concentraciones promedio de los tratamientos B y A, valor inferior comparado con el que corresponde a la relación de las concentraciones antibióticas entre las dietas B y A (5.5:1). Igualmente, la relación entre la concentración promedio de OTC en los animales del tratamiento C (14.1 ppm de OTC) con los del tratamiento B, fue menor a la relación entre la concentración del antibiótico de la dieta C y la B; 1.5:1 para los camarones y 2.1:1 en las dietas. De esta forma, no se observa un aumento de los niveles de OTC en el músculo del camarón, en la misma magnitud en que se incrementan las concentraciones del antibiótico en la dieta.

Como resultado de los diferentes tratamientos, se observó una relación inversa entre el consumo de alimento y el nivel de OTC en las dietas. La figura 24 muestra la tendencia del consumo de alimento por animal para cada uno de los tratamientos. Se puede observar como a partir del cuarto día las líneas de tendencia polinomiales empiezan a separarse entre sí, manteniéndose distantes hasta el día 15, donde comienzan a acercarse nuevamente, llegando a igualarse desde el día 21 hasta finalizar el bioensayo. Igualmente, se observa que los tanques control fueron los que siempre consumieron más alimento, seguidos por los del tratamiento A. Entre los tratamientos B y C la diferencia fue menos visible, ya que tan solo en los primeros días fue claro un mayor consumo de alimento por parte de los animales sometidos a la dieta B.

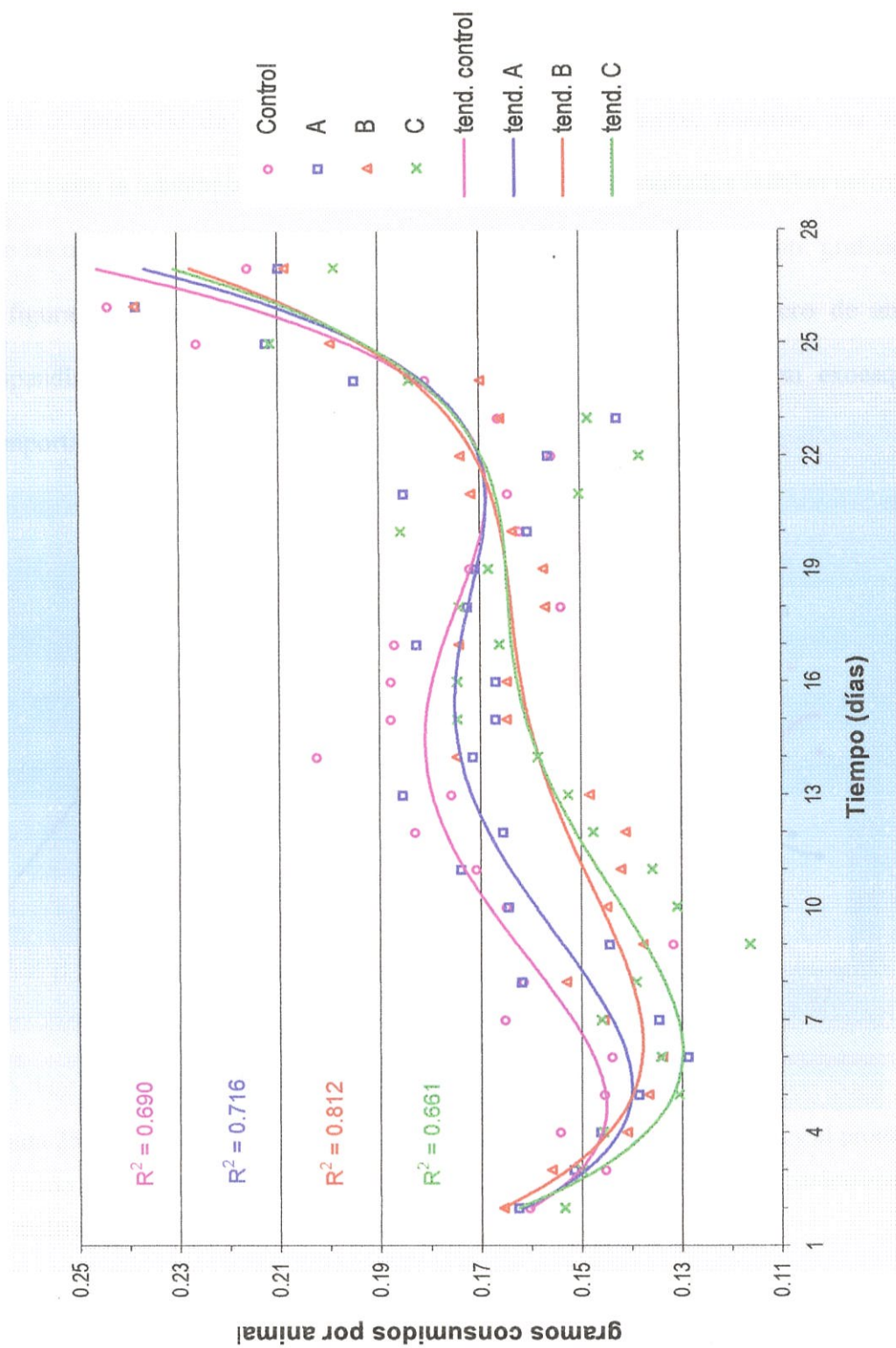


Figura 24. Tendencia del consumo de alimento en los tratamientos y el control durante todo el bioensayo

El incremento de la frecuencia de muda registrada en todos los tanques, es decir, el porcentaje de animales que mudaron en cada día, coincidió con el inicio de los periodos de quiebra (día 3 hasta 10 y, día 18 hasta 24) (Inocar, 1999). En la figura 25 se muestra como el promedio de la tendencia del consumo de alimento, mantuvo una relación inversa con la tendencia de la frecuencia de muda. Estos resultados señalan únicamente, que las oscilaciones observadas en la tendencia del consumo de alimento graficadas en la figura 24, coinciden con los periodos en donde un mayor número de animales suspendían su alimentación para dedicarse al desprendimiento de su exoesqueleto, comportamiento normal de los crustáceos durante los procesos de muda.

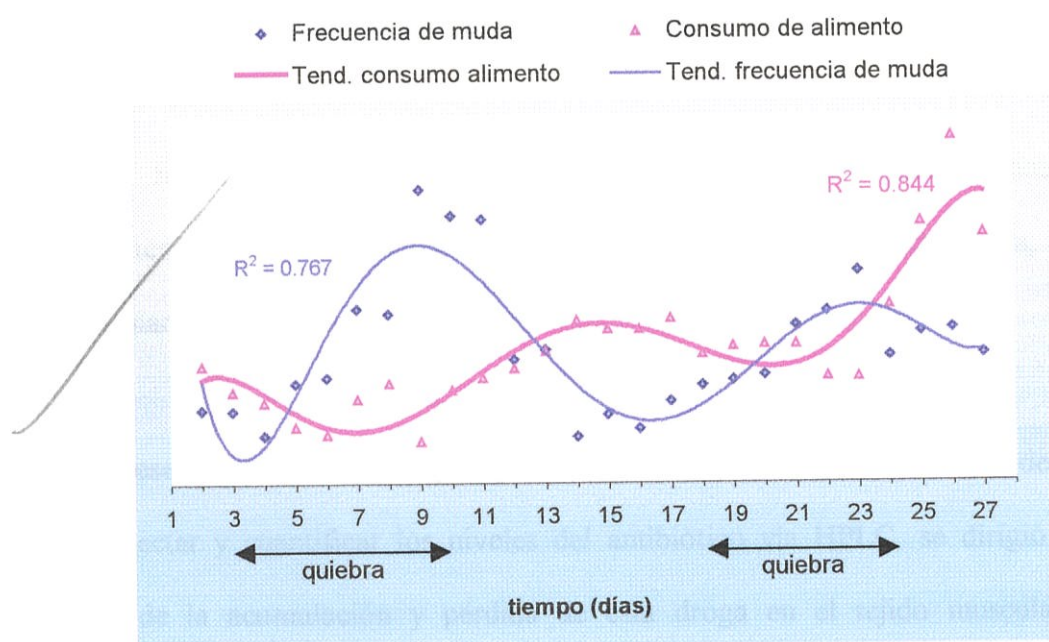


Figura 25. Relación entre la tendencia (polinomial) de la frecuencia de muda y el promedio del consumo de alimento en todos los tratamientos. Los valores de los dos parámetros fueron normalizados, por lo que no tienen unidades.

DISCUSIÓN

El empleo de oxitetraciclina (OTC) para esta investigación, se fundamenta en el hecho de que las tetraciclinas representan aún una de las familias de antibióticos mayormente utilizadas en la industria pecuaria a nivel mundial (Kühne *et al.*, 2000); y que posiblemente llegue a ser uno de los primeros antibióticos autorizados por la FDA para el tratamiento de las enfermedades del camarón cultivado en cautiverio (Williams & Lightner, 1988; Greenlees, 1997). Caso distinto ocurre con otros agentes antibacterianos ampliamente utilizados, como el cloranfenicol y la furazolidona, quienes difícilmente podrán recibir la autorización gubernamental por ser señalados como tóxicos para los humanos (Munns *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1994).

De esta forma, el desarrollo de un método cromatográfico para el análisis del medicamento, incorpora una herramienta analítica no solo para la acuicultura, sino para la veterinaria en general.

En el presente trabajo, el enfoque que se le brindó a la aplicación directa del método para detectar y cuantificar los niveles del antibiótico vía HPLC, se dirigió hacia el estudio de la acumulación y pérdida de esta droga en el tejido muscular del *P. vannamei*, utilizando un procedimiento terapéutico comúnmente empleado por la industria camaronera, como lo es la inclusión de medicamento en el alimento balanceado.

Implementación del análisis cromatográfico

Amplias son las referencias sobre el empleo de técnicas de HPLC para el análisis de residuos de tetraciclinas en diferentes tejidos animales. Estos trabajos en fase extractiva han reportado porcentajes de recuperación (PR) de: 74% (Ueno *et al.*, 1989), 92.5% (Du *et al.*, 1995), 97% (Touraki *et al.*, 1995), 59 – 82% (Blanchflower *et al.*, 1997), 95 – 110% (Bermúdez-Almada *et al.*, 1999). En el presente estudio, el PR para los extractos de tejido de camarón fue del 68.1% (SD = 1.2), valor que se encuentra dentro de los rangos obtenidos por otros investigadores. Para el caso del análisis de dietas, Rigos *et al.* (1999) obtuvieron un 80% de recuperación a partir de pellets con OTC. En lo concerniente a este trabajo, el PR para las muestras de alimento balanceado fue mayor, 94.8% (SD = 4.4).

Las diferencias observadas entre los PR de las muestras de camarón y alimento analizadas, consideramos que podrían ser explicadas, como efecto de la naturaleza de la matriz, ya que el procedimiento de extracción en cada uno de sus pasos fue uniforme. De lo observado durante la realización de los análisis de tejido, es probable que las diferencias en la capacidad extractiva del método, fueran producidas por los lavados con hexano, paso que originó dificultades para eliminar el sobrenadante. De esta forma, optimizando el método y el número de lavados, sería posible incrementar la cantidad de antibiótico recuperado del método aquí descrito.

Métodos microbiológicos para la determinación de residuos de OTC en el *P. stylirostris*, han obtenido límites de cuantificación de 0.4 ppm (Mohney *et al.*, 1997), aunque otros

autores, utilizando metodologías similares, han trabajado con límites de cuantificación inferiores, 0.05 ppm de OTC en el músculo de la tilapia nilótica (Xu & Rogers, 1995). No obstante, estos investigadores reconocen no haber empleado técnicas cromatográficas, únicamente por carecer del instrumental necesario. En líneas generales, los métodos para el análisis de residuos de OTC vía HPLC logran límites de detección de 0.05 ppm en el tejido muestreado (Bermúdez-Almada *et al.*, 1999; Börklund *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1995; Ueno *et al.*, 1989), y este trabajo no fue la excepción.

Análisis de las dietas

Los resultados de la cuantificación cromatográfica de la OTC en las muestras de los tres alimentos medicados, tomadas antes de elaborar los pellets, determinaron un nivel promedio de OTC equivalente al 93.6% (SD = 3.7) del antibiótico agregado inicialmente. Luego de comprimir la masa de alimento, el análisis determinó la presencia del 94.7% (SD = 2.9) de la OTC en los pellets, porcentaje que no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con el valor obtenido en las muestras de alimento tomadas antes de este proceso.

La mezcla manual de las materias primas y el antibiótico, no significó un incremento de temperatura de la masa de alimento, a diferencia de lo ocurrido en la elaboración de los pellets, donde la temperatura de las dietas alcanzó los 40 °C. Tomando en cuenta que la degradación de la OTC puede ocurrir a temperaturas por debajo de su punto de fusión (188 – 200 °C), mediante la contribución de diferentes factores como, el tiempo de

exposición, la humedad y la presión (Frelier, 1995), se esperaban encontrar pérdidas del antibiótico luego de comprimir las dietas, y no en la masa sin compactar. Esto conlleva a pensar, que las pérdidas de OTC registradas luego de mezclar las dietas pudieron haberse originado por: a) el almacenamiento de las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 meses, tiempo que transcurrió hasta que pudieron ser analizadas, o por b) la posible interacción entre el antibiótico y los componentes de las dietas, debido a la conocida capacidad de la OTC de formar complejos con cationes di- y trivalentes (Lunestad & Goksoyr, 1990), y de unirse a proteínas (Kohn, 1961 *vide* Samuelsen *et al.*, 1994). No obstante, la segunda opción es mas probable, ya que anteriormente Mohny *et al.* (1997) no reportaron pérdidas de OTC en una dieta medicada almacenada a la misma temperatura durante 6.5 meses.

Durante el secado de las dietas medicadas, las muestras tomadas luego de este proceso, mostraron mantener el 81.3% (SD = 6.8) del antibiótico agregado inicialmente, lo que representa una pérdida acumulada de OTC durante todo el proceso de elaboración del 18.7%. Si de este porcentaje restamos la pérdida promedio ocurrida previo al secado de los pellets, se observa que las condiciones de operación del secador (4 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) de la planta piloto del CENAIM, representaron la fuente de mayor pérdida de OTC de todo durante el proceso, 12.8% (SD = 6.7).

Frelier (1995), señala como normales valores de entre el 10 – 40% de pérdidas de OTC durante la elaboración de dietas medicadas a nivel comercial (Frelier, 1995). En el presente trabajo, los porcentajes de pérdida de OTC originados por el proceso de elaboración, 25.8, 17.8 y 12.5%, para las dietas A, B y C, respectivamente, se

encontraron dentro del rango señalado. No obstante, cabe recalcar que estos valores han sido obtenidos bajo condiciones no comerciales, por lo que se debe tomar en cuenta que las temperaturas típicamente alcanzadas en los procesos industriales de peletización, son mayores, 75 – 95 °C (Cuzon *et al.*, 1994), de esta forma los resultados aquí obtenidos, podrán ser utilizados como indicadores al momento de ser aplicados para estimar las posibles pérdidas de OTC en la elaboración comercial de la formulación CENAIM 40.

Por otro lado, se notó una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el porcentaje de pérdida de OTC de la dieta A comparado con los calculados para las dietas B y C. Esto puede ser explicado, si se considera que el secado de alimento degrada principalmente el antibiótico ubicado en la superficie de los pellets, afectando en menor medida al medicamento distribuido en la masa de alimento.

El ensayo de lixiviación de OTC de las dietas medicadas, mostró la influencia directa de la salinidad en el incremento del nivel de pérdida del antibiótico (Figura 1), tal como ha sido reportado previamente (Sermwatanakul & Ounkon, 1997). Otros factores descritos como responsables del incremento de la tasa de lixiviación de la OTC: aumento de la temperatura (Duis *et al.*, 1995, Rigos *et al.*, 1999) y mayor área superficial de los pellets (Fribourgh *et al.*, 1969 *fide* Duis *et al.*, 1995), no afectaron los resultados del presente trabajo, ya que en ambas pruebas se empleó el mismo alimento y se mantuvo la misma temperatura (23 ± 1 °C). De esta forma, la afinidad de la OTC por cationes abundantes en el agua de mar, como los de calcio y magnesio (Lunestad & Goksoyr, 1990), seguramente fue el factor que incrementó el desprendimiento del antibiótico en las dietas sumergidas en agua salada.

El porcentaje de pérdida por lixiviación de la OTC, fue independiente de la concentración antibiótica de las dietas (figura 21), tanto para la prueba con agua dulce (0 ups), como para la de agua de mar (35 ups). Esto demuestra, que las pérdidas por lixiviación de un antibiótico hidrosoluble como el clorhidrato de OTC, se originan por el desprendimiento uniforme del medicamento de la masa del pellet, y no tan solo desde la superficie que está en contacto directo con el medio líquido. Caso contrario se observó en las pérdidas por el proceso de secado de las dietas, donde la mayor parte de la degradación de la OTC se dió en la parte externa del pellet.

Durante el ensayo de lixiviación se observó adicionalmente, que las pérdidas de OTC no fueron uniformes con respecto al tiempo. El 73% del antibiótico desprendido, de las dietas medicadas durante las 6 horas de ensayo, se lixivió luego de cumplirse el primer tercio del tiempo de experimentación. Esto concuerda con reportes previos de Fribourgh *et al.* (1969 *fide* Duis *et al.*, 1995) y Rigos *et al.* (1999), quienes señalan que las mayores pérdidas por lixiviación del antibiótico ocurren durante los primeros minutos de exposición al agua.

Estudios del efecto de los métodos de preparación de dietas medicadas sobre la magnitud de las pérdidas de OTC por lixiviación, han determinado que estas pueden ser reducidas significativamente mezclando el medicamento junto con las materias primas del alimento (Xu & Rogers, 1994). Intentando reducir las elevadas pérdidas en las dietas recubiertas con el antibiótico, se han aplicado agentes aglutinantes (aceite de hígado de bacalao, α -almidón) sobre la superficie de los pellets, aunque estos no demostraron disminuir los porcentajes de pérdida significativamente, por ejemplo:

40% después 30 minutos de estar sumergidos en agua salobre (15 ups) a 27 °C (Pearson & Charatchakool, 1994).

Aunque en el presente trabajo las dietas perdieron apenas el 13% de la OTC después de la primera media hora de lixiviación, los resultados no son del todo comparables con los obtenidos por Pearson y Charatchakool, debido a las diferentes salinidades, temperaturas y dietas empleadas durante la prueba. No obstante, Rigos *et al.* (1999) compararon bajo condiciones experimentales homogéneas la lixiviación de la OTC entre dietas recubiertas con el antibiótico y aceite de pescado, y dietas con la droga incluida en la formulación, encontrando pérdidas del 47% y 20%, respectivamente.

Efectos de la OTC en los animales

Los niveles de OTC en dietas medicadas, utilizadas para investigaciones destinadas a evaluar la acumulación y pérdida del antibiótico en diferentes especies de peneidos, han ido desde 0.1 hasta 10 g.kg⁻¹ de alimento (ppt). En uno de los primeros estudios sobre el tema, Corliss (1979) alimentó juveniles de *P. setiferus* con tres dietas medicadas durante tres semanas; 1, 5 y 10 ppt de OTC. De forma similar, Chanratchakool *et al.* (1989) investigaron el tiempo de permanencia de la OTC en el músculo del *P. monodon* luego del suministro de dietas medicadas con 1, 3 y 5 ppt de OTC, mientras que Chien y Chen (1998), realizaron un estudio similar con la misma especie de peneido, pero con dietas de 1.25, 2.5, 5 y 7.5 ppt de OTC.

En el único estudio publicado sobre la acumulación y el tiempo de permanencia del antibiótico en *P. vannamei*, Bermúdez-Almada *et al.* (1999) emplearon dietas medicadas con bajas concentraciones; 0.1, 0.25 y 0.5 ppt de OTC, para determinar el tiempo de residencia de la droga en el animal luego de 21 días de tratamiento.

Claramente se observa, que en este trabajo no se tomó en cuenta la sugerencia de que para lograr niveles antibióticos apropiados en el camarón, las dietas deben contener concentraciones farmacológicas superiores a los 5 g.kg^{-1} de alimento (Higuera-Ciapara *et al.*, 1991).

En lo concerniente a las dosis de OTC utilizadas en las granjas de producción del crustáceo, Chanratchakool *et al.* (1995) señala que para la época, dietas medicadas con 3 – 5 ppt de OTC lograban resultados aceptables en las camaroneras tailandesas, aunque se han llegado a emplear niveles de hasta 7 ppt. En el Ecuador, las concentraciones más comunes de OTC en las dietas medicadas se encuentran entre 1 y 5 ppt (Peeter & Rodríguez, 1999), aunque en momentos de apremio, dosis de hasta 7 y 8 ppt han sido aplicadas.

De esta forma, las tres concentraciones nominales de droga escogidas para las dietas en el presente trabajo; 1, 5 y 10 ppt de OTC, representan niveles bajos, normales, y elevados aplicados por la industria camaronera, respectivamente. Por otro lado, la definición de la duración del tratamiento (2 semanas), se basó en las publicaciones que recomiendan entre 7 y 14 días de medicación para el tratamiento de la

hepatopancreatitis necrotizante (Frelier, 1995; Jiménez, 1995), y de 10 a 14 días para las infecciones bacterianas (Brock & Main, 1994; Mohny *et al.*, 1997).

Palatabilidad

La inclusión de OTC en las dietas redujo ligeramente el consumo de alimento de los animales (figura 24), a pesar de que las diferencias no fueron significativas ($P < 0.05$). En cambio, este efecto fue claramente reportado por Mohny *et al.* (1997), quienes utilizaron una dieta con 1.45 ppt de OTC para alimentar *P. stylirostris* (11 g, peso promedio) durante 14 días. En este trabajo, los autores determinaron un consumo diario de alimento de 0.57 g por animal del grupo control (sin antibiótico), en cambio, los camarones que recibieron el tratamiento, consumieron 19% menos alimento hasta finalizar el periodo de medicación. Esta reducción fue superior a la observada en el tratamiento C del presente trabajo (13% menos consumo que el control), a pesar de que la concentración de OTC de la dieta C fue 6.9 veces mayor que la empleada por Mohny.

Si bien, se ha sugerido que la disminución de la palatabilidad en alimentos medicados con OTC, es la responsable de su menor captación por parte de peces (Hustvedt *et al.*, 1991) y crustáceos (Corliss *et al.*, 1977), desde nuestro punto de vista consideramos que existieron dos factores que pudieron haber reducido este efecto en el presente bioensayo. El primero gira alrededor del método de elaboración de las dietas medicadas; se ha comprobado recientemente que peces (*Dicentrarchus labrax* L.) consumen 74% más alimento medicado (10 ppt de OTC), cuando el antibiótico se adiciona en la mezcla

del alimento artificial, a diferencia de si se lo aplica en forma de recubrimiento junto con aceite de pescado (Rigos *et al.*, 1999). Debido a que la el alimento medicado empleado por Mohny *et al.*, fue igualmente mezclado con los ingredientes, el factor que posiblemente colaboró en mayor grado con el superior consumo de alimento medicado en el presente trabajo, nace de la alta atractabilidad de la dieta CENAIM 40, observada con anterioridad en bioensayos realizados en el CENAIM.

Acumulación y pérdida

En todos los tratamientos se pudo observar que el comportamiento acumulativo de la OTC en el músculo del *P. vannamei* no fue dosodependiente. De igual forma, la velocidad con la que el antibiótico se perdió de los animales, no tuvo relación con los niveles de OTC acumulados durante el tratamiento.

Las C_{max} de OTC en todos los tratamientos se alcanzaron entre el 4^{to} y 6^{to} día de medicación. Comportamientos similares del antibiótico cuando se lo administra junto con el alimento, han sido reportados anteriormente por Mohny *et al.* (1997), quienes encontraron las C_{max} al 7^{mo} día de tratar *P. stylirostris* con una dieta de 1.45 ppt de OTC.

Corliss (1979) utilizando tres dietas medicadas con OTC en concentraciones de 1, 5 y 10 ppt, determinó microbiológicamente niveles de la droga en el músculo muy inferiores en sus juveniles de *P. setiferus*, comparados con los encontrados en el presente trabajo (figura 26). Otros autores alimentado peneidos con dietas con OTC

afirman haber obtenido de igual forma, concentraciones superiores a las de Corliss (Bermúdez-Almada *et al.*, 1999; Mohny *et al.*, 1997).

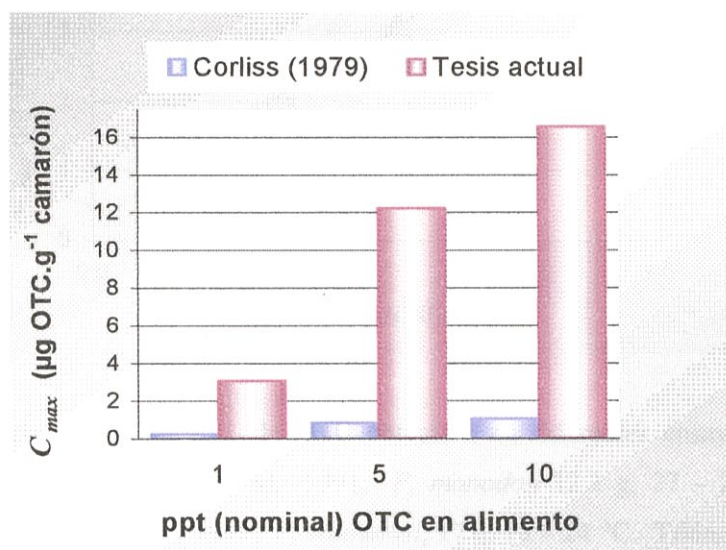


Figura 26. Comparación de las C_{max} obtenidas en el presente estudio y las de Corliss, quien trabajó con *P. setiferus*, peso promedio 3.5 g, temperatura del agua 23 – 27 °C (1979).

En la figura 27 se muestra una comparación de las C_{max} de OTC en el músculo de diferentes especies de peneidos, alimentados con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Se puede observar que el dato generado con la dieta A en el presente trabajo, puede utilizarse junto con las C_{max} de otras publicaciones para calcular una ecuación de regresión que muestra una importante respuesta lineal.

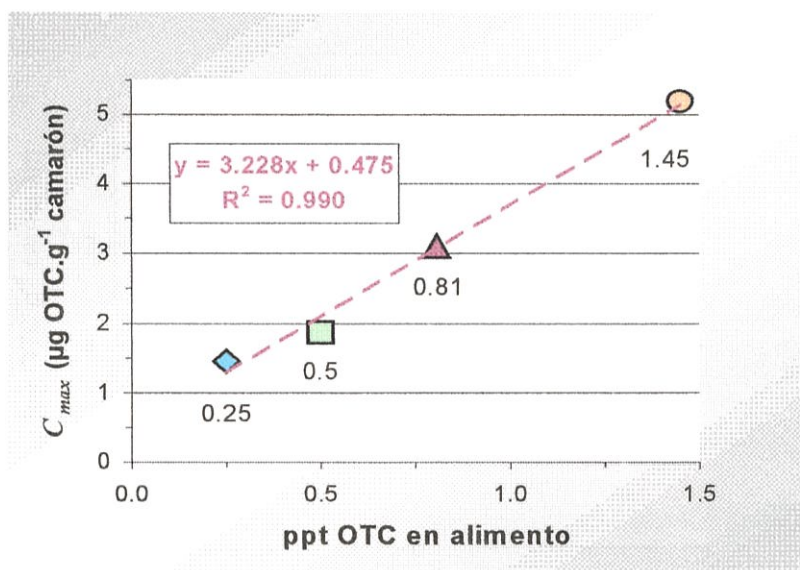


Figura 27. Correlación de las C_{max} de OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos. Rombo celeste: Higuera-Ciapara *et al.*, 1991; *P. monodon* 12.2 g, 27 – 29 °C. Cuadrado verde: Bermúdez-Almada *et al.*, 1999; *P. vannamei*, 17 g, 18 – 24 °C. Triángulo lila: Presente trabajo, *P. vannamei*, 5.6 g, 22 – 24 °C. Círculo naranja: Mohny *et al.* 1997; *P. stylirostris*, 11 g, 23 – 25 °C. Todas las dietas medicadas fueron preparadas mezclando el antibiótico con los ingredientes del balanceado. El nivel de OTC (ppt) de cada una de las dietas se muestra en el gráfico.

Cuando se incluye en la figura 27 el dato de C_{max} correspondiente a la dieta B, la respuesta de la ecuación mantiene su linealidad ($R^2 = 0.99$). No obstante, cuando adiciona la C_{max} originada por la dieta C, la ecuación pierde su respuesta lineal, como se observa en la figura 28, indicando una reducción en la capacidad de acumular el antibiótico a medida que se incrementa la dosis de OTC para el *P. vannamei*.

Reportes sobre la utilización de dietas medicadas con mas de 1.45 ppt de OTC y donde el diseño experimental haya sido similar, no han sido publicados. De esta forma, no existen referencias que permitan corroborar estos resultados con peneidos.

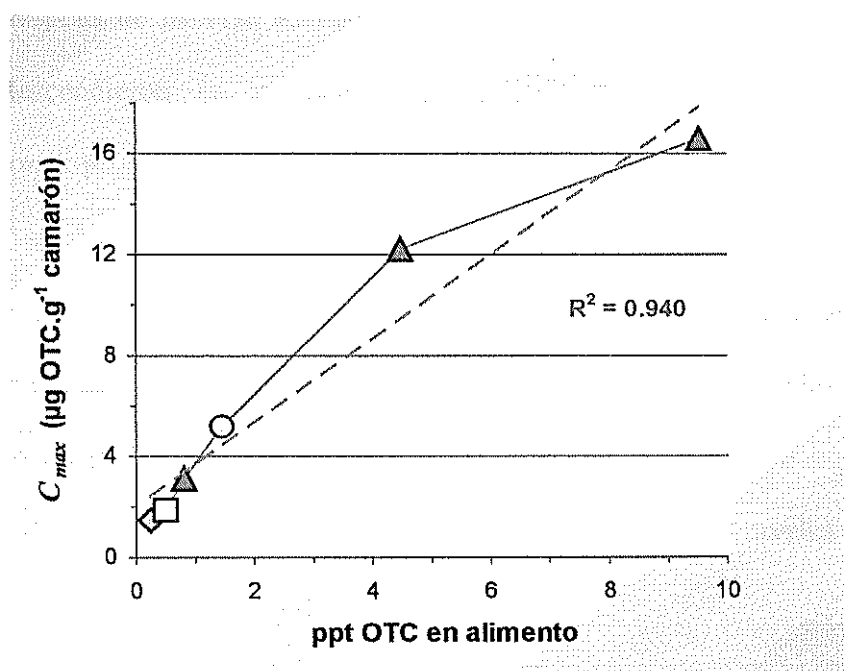


Figura 28. Datos de C_{max} OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos, junto con las C_{max} originadas por las tres dietas medicadas en el presente estudio. La simbología es correspondiente a la descrita en la figura 27.

En lo referente a la eliminación de la droga, esta fue rápida en todos los tratamientos. Los niveles cuantificados en los animales luego de recibir la última dosis de alimento medicado, 2.9, 7.8 y 15.1 ppm de OTC, para los tratamientos A, B y C, respectivamente; redujeron su magnitud en promedio 96.7% (SD = 1.9) después de transcurrir 7 días alimentación con la dieta control. Todas las C_{min} alcanzadas en este periodo se encontraban por debajo del LMR tolerado por la FDA para muestras de camarón crudo (2.0 ppm de OTC), en cambio las concentraciones de los tratamientos B y C no llegaron a ser inferiores al LMR establecido por la CEE, 0.1 ppm de OTC en los tejidos. Únicamente la dieta A permitió obtener niveles de OTC por debajo del LMR europeo después de 7 días de retiro.

Diez días después de haberse suspendido la medicación, los niveles de OTC en los animales descendieron en promedio 98.1% (SD = 1.1) comparados con las concentraciones promedio mantenidas durante el tratamiento. Los niveles de droga alcanzados en los tratamientos A, B y C, fueron de 0.08, 0.13 y 0.17 ppm, respectivamente. A pesar de que en los tratamientos B y C no se alcanzó el LMR europeo, las concentraciones de OTC fueron inferiores a las determinadas 3 días antes (53% menos en promedio), indicando que los animales mantuvieron un proceso de eliminación del antibiótico, que probablemente permitiera obtener niveles inferiores al LMR al cumplirse 14 días de retiro.

CONCLUSIONES

Método analítico

El porcentaje de recuperación del procedimiento de extracción para el músculo de camarón se encuentra dentro de los rangos reportados.

El límite de cuantificación del sistema HPLC empleado (0.05 ppm OTC) se encuentra dentro de los más bajos anteriormente descritos en la bibliografía.

Comparados con los tradicionales métodos microbiológicos, un mayor número de análisis pueden efectuarse mediante la metodología cromatográfica implantada. En 12 horas se pudieron analizar 8 muestras.

Dietas medicadas

Las pérdidas de OTC durante el proceso de elaboración fueron bajas (18.7%), siendo las temperaturas de 60 °C el principal factor que degradó el antibiótico presente en el alimento balanceado.

La lixiviación del medicamento en el agua estuvo altamente influenciada por la salinidad. La afinidad de la OTC por los iones de Ca y Mg, debió jugar un papel importante en este proceso.

Bioensayo

La dieta CENAIM-40 no redujo significativamente su palatabilidad con niveles de 1, 5 y 10 ppt de OTC.

Las C_{max} reportadas en el tejido muscular del *P. vannamei* en el presente trabajo, son las mayores descritas en peneidos.

Las C_{max} para cada tratamiento, se alcanzaron luego de suministrar el medicamento durante aproximadamente 5 días. Los restantes días del tratamiento, sirvieron para mantener la concentración del antibiótico en el animal.

El incremento de las C_{max} de OTC en el tejido, no fue paralelo al aumento de la dosis suministrada, observándose con la dieta C el inicio de una meseta de las C_{max} en el músculo del *P. vannamei*.

Niveles de OTC inferiores a los tolerados por la FDA en el tejido crudo de camarones, fueron cuantificados después de 4 días de suspender el tratamiento con las dietas A y B. Para la dieta C, no obstante, se requirieron 7 días de alimentación sin el medicamento.

Dentro del periodo de eliminación, niveles de OTC inferiores a los establecidos como máximos por las regulaciones de la CEE, solo fueron alcanzados por la dieta A (7 días después de retirar el tratamiento).

RECOMENDACIONES

Las fábricas de alimento balanceado, podrían verificar las pérdidas del antibiótico originadas por sus condiciones particulares de manufactura, mediante el método desarrollado.

La industria, debería reducir al mínimo la aplicación de OTC como recubrimiento en las dietas medicadas. Preferentemente debería ser incluida en el proceso de mezcla de los ingredientes, para reducir las pérdidas por lixiviación y para no afectar la palatabilidad del alimento. No obstante, deberían investigarse agentes aglutinantes alternativos capaces de mejorar la eficiencia de los tratamientos orales mediante alimentos recubiertos con OTC.

Un tiempo de retiro de 2 semanas, es un lapso apropiado para eliminar los residuos de OTC en peneidos cultivados en cautiverio, a temperaturas superiores o iguales a 23 °C.

El generalizado empleo de OTC en los laboratorios de larvas de camarón del Ecuador, debería ser revisado, más aún ahora que se dispone de una herramienta analítica. Un tópico interesante gira alrededor de la bioencapsulación de la OTC en organismos regularmente empleados para alimentar larvas y postlarvas de camarón, *Artemia spp.* por ejemplo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, S., R. NAMDARI & F. LAW, 1998. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon. *Aquaculture*, 162, 23 – 32.

ALDERMAN, D., 1988. *Fisheries Chemotherapy: A Review*. British Crown, England, 3p

ALDERMAN, D. & T. HASTINGS, 1998. Antibiotics use in aquaculture: development of antibiotic resistance - potencial for consumers health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, 33(2), 139 – 155.

AHMAD, T. & A. MATTY, 1989. The effect of feeding antiobiotics on growth and body composition of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 77, 211 - 220.

AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th edition: Agricultural chemicals, contaminats, drugs. K. Helrich (ed), Association of Official Analytical Chemists, INC., Arlington, Virginia, USA, 126p

AOKI, T., K TAKAMI & T. KITAO, 1990. Spread of drug-resistence strains of *Streptococcus sp.* in yellowtail farms. En: *Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum*, Tokyo - Japón, 697 - 699.

AUSTIN, B. & D. AUSTIN, 1987. Control of bacterial fish diseases. En: *Bacterial fish pathogens*, 340 – 348.

BAPTISTA, M., 1998. Uso indiscriminado de antibióticos y sus problemas. *El Mundo Acuícola*, 4(2), 9p.

BATICADOS, M., C. LAVILLA-PITOGO & E. CRUZ, 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of Aquatic Organism*, 9, 133 – 140.

BELL, T., 1992. Principals of shrimp culture chemotherapy. En: J. Wyban (ed.). *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, WAS, Baton Rouge, LA, 227 - 237.

BELL, T., 1995. New animal drug approvals and the United States aquaculture industry: a partnership for growth. *Aquaculture Research*, 26, 679 – 685.

BERMÚDEZ-ALMADA, M.C., M.G. PÉREZ-TELLO, A.I. VALENZUELA-QUINTANAR & L. VÁZQUEZ-MORENO, 1999. Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. *Journal of Food Science*, 64(4), 638 – 640.

BLANCHFLOWER, W., R. McCracken, A. Haggan & G. Kennedy, 1997. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 692, 351 – 360.

BJÖRKLUND, H. & G. BYLUND, 1991. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 21, 1511 – 1520.

BJÖRKLUND, H., C. RÅBERGH & G. BYLUND, 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 97, 85 - 96.

BROCK, J. & K. MAIN, 1994. *A Guide to the common problems and diseases of cultured Penaeus vannamei*. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, 199p

CENAIM, 1997. Manual de técnicas para nutrición acuícola. C. Molina, Y. Paredes, N. Montoya, A. León-Hing, A. Townsend & A. Pedrazzoli. Proyecto JICA – CENAIM.

CENAIM, 1998. Informe interno. Departamento de Monitoreo.

CENAIM, 1999. Informe interno. Departamento de Monitoreo.

CHANRATCHACOO, P., R. ROBERTS & C. LIMSUWAN, 1989. Retention of oxytetracycline in juvenile black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Thailand.

CHANRATCHACOO, P., M. PEARSON, C. LIMSUWAN & R. ROBERTS, 1995. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Journal of Fish Diseases*, 18, 78 - 82.

CHIEN, Y. & I. CHEN, 1998. The distribution of oxytetracycline residues in *Penaeus monodon* culture system. En: *Aquaculture '98*, World Aquaculture Society, Las Vegas, USA, 14 – 19 february, 106p.

CORLISS, J., D. LIGHTNER & Z. ZEIN-ELDIN, 1977. Some effects of oral doses of oxytetracycline on growth, survival and disease in *Penaeus aztecus*. *Aquaculture*, 11, 355 – 362.

CORLISS, J., 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp *Penaeus setiferus*. *Aquaculture*, 16, 1 -6.

CORPET, D., 2000. Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Revue de Medecine Veterinaire*, 151(2), 99 – 104.

CSAVAS, I., 1993. Impact of aquaculture on the shrimp industry. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Maiwan, Thailand, 6 – 18.

- CUZON, G., J. GUILLAUME & C. CAHU, 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacea. *Aquaculture*, 124, 253 – 267.
- DAWSON, R., D. ELLIOT, W. ELLIOT & K. JONES, 1986. Data for biochemical research, Third Edition. Oxford Science Publications, Clarendon Press, New York, 282 y 427p
- DISCOVER, 1999. Medicinas oceánicas. Discover en Español, Reportaje de Portada. Ideas Publishing Group, Miami, FL, 3(4) 26 – 31.
- DIXON, B., 1994. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 60 – 63.
- DIXON, B., R. RAMÍREZ & D. KAWAHIGASHI, 1998. Bioencapsulation of antibacterial drugs in brine shrimp. En: 1st Latin American Shrimp Culture Congress, Panama oct. 6 – 10.
- DOI, A., M. STOSKOPF & G. LEWBART, 1998. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) following different routes of administration. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 21(5), 364 – 368.
- DU, W., W. MARSHALL, M. WHEELER, M. MATHEWS, D. GATLIN, S. RAWLES, D. XU, W. RODGERS & C. WEI, 1995. Oxytetracycline, sulfadimethoxine, and ormetropim residues in channel catfish by HPLC. *Journal of food science*, 60(6), 1220 – 1227.
- DUIS, K., V. INGLIS, M. BEVERIDGE & C. HAMMER, 1995. Leaching of four different antibacterial from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. *Aquaculture Research*, 26, 549 – 556.

- ELEMA, M., K. HOFF & H. KRISTENSEN, 1996. Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) in seawater. *Aquaculture*, 143, 7 - 14.
- FDA, 1968. Antibiotic residues in milk, dairy products, and animal tissues: Methods, reports, and protocols. J. Kramer, C. Carter, B. Arret, J. Wilner, W. Wright & A. Kirshbaum (ed.). National Center for antibiotic and insulin analysis, Washington, D.C. 1 - 53.
- FDA, 1998. Method for the determination of oxytetracycline residues in uncooked shrimp using High Performance Liquid Chromatography, November 6, 1998, 1 - 13.
- FDA, 2001. FDA approved animal drug products. Drug Information Laboratory, Virginia/Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, Virginia, USA, January 15, 2.31 - 2.32.
- FEEDING TIMES, 2000. Cambio de hábitos en el nuevo milenio. *Feeding times*, 5(1), 14 - 15.
- FRELIER, P., J. LOY, T. BELL, R. CREELMAN & Y. JUAN, 1992. Treatment of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. En: G. Pruder (ed). An annotated bibliography of consortium sponsored publications, Gulf Coast Research Laboratory Consortium, Honolulu, HI, 31p
- FRELIER, P., J. LOY, A. LAWRENCE, W. BRAY & G. BRUMBAUGH, 1994. Status of necrotizing hepatopancreatitis in Texas farmed shrimp, *Penaeus vannamei*. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication, 1, 55 - 58.
- FRELIER, P., 1995. Early diagnosis and prevention of rickettsiosis in shrimp farming. College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, USA.

- FURUSAWA, N., 1999. Rapid and simple determination of oxytetracycline in chicken products. *Journal of AOAC International*, 82(3), 770 – 772.
- GATESOUBE, 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147 – 165.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 1997. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. En: *Gesamp Reports and Studies*, No. 65, Roma, 5 - 31.
- GOLDBURG, R. & T. TRIPLETT, 1997. Murky waters: Environmental effects of aquaculture in the United States. *Environmental Defense Fund*.
- GOODMAN, A., L. GOODMAN & A. GILMAN, 1981. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1158 - 1175.
- GRAVE, K., A. LILLEHAUG, B. LUNESTAD & T. HORSBERG, 1999. Prudent use of antibacterial drugs in norwegian aquaculture? Surveillance by the use of prescription data. *Acta vet. scand.*, 40(3), 185 – 195.
- GREENLEES, K., 1997. Laboratory studies for the approval of aquaculture drugs. *The Progressive Fish Culturist*, 59, 141 – 148.
- GRONDEL, J., J. NOUWS, M. De JONG, M. SCHUTTE & A. DRIESSENS, 1987. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. *Journal of Fish Diseases*, 10, 153 – 163.
- HERWIG, 1979. Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. Charles C. Thomas, Springfield, III.

HERWIG, R., J. GRAY & D. WESTON, 1997. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture*, 149, 263 - 283.

HIGUERA-CIAPARA, I., J. BROWN & K. JAUNCEY, 1991. Effect of oxytetracycline and sulphamethazine on weight gain and survival of *Penaeus monodon* under stress. En: C. Michel y D.J. Alderman (ed.) *Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality*. Symposium, Paris, marzo 12 - 15, 59 - 66.

HOLLAND, D., K. FAUL, J. ROYBAL, R. MUNNS & W. SHIMODA, 1991. Liquid chromatographic determination of chlortetracycline hydrochloride in ruminant and poultry/swine feeds. *Journal of AOAC*, 74(5), 780 - 784.

HOUGLUM, J., R. LARSON, D. MUTCHLER & L. WETZLER, 1998. Assay of oxytetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 81(5), 919 - 922.

HUSTVEDT, S., T. STOREBAKKEN & R. SALTE, 1991. Does oral administration of oxolinic acid or oxytetracycline affect feed intake of rainbow trout? *Aquaculture*, 92, 109 - 113.

INGLIS, V., S. ABDULLAH, S. ANGKA, S. CHINABUT, , M. CHOWDHURY, E. LEANO, I. MACRAE, A. SOSONGKO, T. SOMSIRI & A. YAMBOT, 1997. Survey of resistance to antibacterial agents used in aquaculture in five South East Asian countries. En: T. Flegel y I. MacRae (ed.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Asian Fisheries Society, Manila, 331 - 337.

INOCAR. 1999. Datos astronómicos del sol y la luna. Tabla de mareas.

INP, 2000. Plan de control y evaluación de residuos en los productos de acuicultura Ecuador. MCEIP y Subsecretaria de Recursos Pesqueros, 43, 88, 188, 189p

INTRIAGO, W., 1988. Problemas de aislamiento y caracterización de las bacterias asociadas al síndrome de Zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador, 55p

JIMENEZ, R., 1995. Diagnóstico y tratamiento de las bacterias intracelulares. Acuicultura del Ecuador, 11, 19 – 22.

JIMENEZ, R., 1997. Enfermedades registradas en cultivos del camarón *Penaeus vannamei* en el Ecuador. Acuicultura del Ecuador, 20, 51 – 53.

KARUNASAGAR, I., R. PAI, G. MALATHI & INDRANI KARUNASAGAR, 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistance *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128, 203 - 209.

KERRY, J., M. HINEY, R. COYNE, S. NICGABHAINN, D. GILROY, D. CAZABON & P. SMITH, 1995. Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms. Aquaculture, 131, 101 - 113.

KERRY, J., S. NICGABHAINN & P. SMITH, 1997. Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) smolts in a marine environment. Aquaculture, 157, 187 -195.

KLAVER, A. & R. MATTHEWS, 1994. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. Aquaculture, 123, 237 – 247.

KNOX, J. & J. JURAND, 1979. Mechanism of reversed-phase separation of tetracyclines by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 186, 763 – 782.

KOCHANSKY, J., D. KNOX & H. SHIMANUKI, 1999. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. Apidologie, 30, 321 – 326.

KOZASA, M., 1986. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiol. Aliment. Nutr.*, 4, 121 – 135.

KRAUSS, E., R. BARNIOL, P. INTRIAGO & X. SALVADOR, 1998. Panorama general de la acuicultura en Ecuador. En: II Simposium Internacional de Acuicultura, Mazatlán-Sinaloa, México, 166 - 188.

KÜHNE, M., S. WEGMANN, A. KOBE & R. FRIES, 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. *Food Control*, 11, 175 – 180.

LIGHTNER, D., 1983. Diseases in cultured penaeid shrimp. En: P. McEvay (ed.). *Handbook of mariculture, Volumen I: Crustacean Aquaculture*. CRC, Boca Raton, Florida, 295 – 298.

LIGHTNER, D., 1996. Shrimp pathology: Major diseases of concern to the shrimp farming industry in the americas. *Departmente of Veterinary Science, University of Arizona, Tucson, Arizona*, 25 – 34.

LIM, C. & G. CUZON, 1994. Water stability of shrimp pellet: A review. *Asian Fisheries Science*, 7, 115 – 127.

LINDSAY, S., 1992. *High Performance Liquid Chromatography*. Thames Polytechnic, London, UK.

LUNESTAD, B. & J. GOKSOYR, 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 67 – 72.

LUNESTAD, B., O. SAMUELSEN, S. FJELDE & A. ERVIK, 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*, 134, 217 – 225.

McEVOY, J., C. MAYNE, H. HIGGINS & D. KENNEDY, 2000. Transfer of chlortetracycline from contaminated feedingstuff to cows' milk. *Veterinary Record*, 146(4), 102 – 106.

McPHEARSON, R., A. DePAOLA, S. ZYWNO, M. MOTES JR. & A. GUARINO, 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99, 203 - 211.

MEDINA, J., 1994. Problemas en la cuantificación de residuos de antibióticos en tejidos de peces. En: E. Castro (ed.) *Aquila II Control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. Programa cooperativo gubernamental FAO-Italia, 241 – 245.

MEINERTZ, J., G. STEHLY & W. GINGERICH, 1998. Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish. *Journal of AOAC International*, 81(4), 702 – 708.

MERCK INDEX, 1989. *Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, eleventh edition. Merck & Co., INC., Rahway, NJ., USA, 1103p

MOHNEY, L., D. LIGHTNER & R. WILLIAMS, 1990. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of the brine shrimp *Artemia* and in the nematode *Panagrellus redivivus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(3), 186 – 191.

MOHNEY, L., D. LIGHTNER & T. BELL, 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 116 – 125.

MOHNEY, L., R. WILLIAMS, T. BELL & D. LIGHTNER, 1997. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapoda), fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture* 149, 193 - 202.

- MORALES, M., 1997. Ecuador se prepara para el HACCP. *Acuicultura del Ecuador*, 21, 23 – 24.
- MUNNS, R., D. HOLLAND, J. ROYBAL, J. STOREY & A. LONG, 1994. Gas chromatographic determination of chloranphenicol residues in shrimp: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 77(3), 596 – 601.
- NAMDARI, R., S. ABEDINI & F. LAW, 1996. Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment. *Aquaculture*, 144, 27 - 38.
- NAMDARI, R., S. ABEDINI & F. LAW, 1999. A comparative tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 30(4), 279 – 286.
- NOUWS, J., J. GRONDEL, J. BOON & J. van GINNEKEN, 1992. Pharmacokinetics of antimicrobials in some fresh water fish species. En: C. Michel y D.J. Alderman (ed.) *Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality*. Symposium, Paris, marzo 12 – 15, 437 – 447.
- NYGAARD, K., B. LUNESTAD, H. HEKTOEN, J. BERGE & V. HORMAZABAL, 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104, 31 - 36.
- PARK, E., D. LIGHTNER, N. MILNER, M. MAYERSOHN, D. PARK, J. GIFFORD & T. BELL, 1995. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetropin in the penaid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 130, 113 – 128.
- PASSEY, R. D. BEE, A. CAFFO & J. ERIKSON, 1986. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. *NCCLS Document EP6-P*, 6(18), 515 – 522.

PEARSON, M. & P. CHARATCHAKOOL, 1994. Leaching of oxytetracycline from surface coated shrimp feed. En: The AAHRI Newsletter (abstracts), www.agriaqua.ait.ac.th/aahri/seadcp/AAHRI/Newsletter/, 3(Jul).

PEETERS, M. & J. RODRIGUEZ, 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. *El Mundo Acuícola*, 5(1), 13 – 18.

PODHORNIK, L., S. LEAKE & F. SCHENCK, 1999. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *Journal of Food Protection*, 62(5), 547 – 548.

POSYNIK, A., J. ZMUDZKI, R. ELLIS, S. SEMENIUK & J. NIEDZIELSKA, 1999. Validation study for the determination of tetracycline residues in animal tissues. *Journal of AOAC International*, 82(4), 862 – 865.

QUATTROCCHI, O., S. ABELAIRA & R. LABA, 1992. Introducción a la HPLC. Merck.

RADETSKY, 1998. Los últimos días de la medicina maravillosa. *Discover en Español*, diciembre, 46 - 52.

RAWLES, S., A. KOCABAS & D. GATLIN III, 1997. Dietary supplementation of terramycin and Romet-30 does not enhance growth of channel catfish but does influence tissue residues. *Journal of the World Aquaculture Society*, 28, 392 - 401.

RHODES, G., G. HUYS, J. SWINGS, P. MCGANN, M. HINEY, P. SMITH & R. PICKUP, 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied & Environmental Microbiology*, 66(9), 3883 – 3890.

RIGOS, G., M. ALEXIS & I. NENGAS, 1999. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture Research*, 30, 841 – 847.

ROGSTAD, A., V. HOMAZABAL, O. ELLINGSEN & K. RASMUSSEN, 1991. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*, 96, 219 - 226.

ROQUE, A., J. TURNBULL Y B. GOMEZ-GIL, 1998. Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to the marine shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(2), 249 - 251.

RUANGPAN, L., S. PRAPADSORN & K. SANGRUNGRUANG, 1997. Minimal inhibitory concentration of 5 chemotherapeutants against *Vibrio* bacteria and their transfer of R-plasmids. En: T. Flegel y I. MacRae (ed.), *Diseases in Asian Aquaculture III*. Asian Fisheries Society, Manila, 349 – 353.

RUPP, H., R. MUNNS & A. LONG, 1994. Simultaneous determination on nitrofurazone, nitrofurantoin, and furazolidone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77(2), 344 – 350.

SAITANU, K., A. AMORNSIN, F. KONDO & CH. TSAI, 1994. Antibiotic residues in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Asian Fisheries Science*, 7, 47 – 52.

SALYERS, A. & D. WHITT, 1994. *Bacterial Pathogenesis: A molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C., 97 – 110, 339 – 342.

SAMUELSEN, O., 1989. Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture*, 83, 7 - 16.

SAMUELSEN, O., V. TORSVIK & A. ERVIK, 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of Total Environment*, 114, 25 – 36.

SAMUELSEN O., B. LUNESTAD, A. ERVIK & S. FJELDE, 1994. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*, 126, 283 - 290.

SERMWATANAKUL, A. & S. OUNKON, 1997. Oxytetracycline leaching from sinking pellets. En: *World Aquaculture '97, Book of Abstracts*. World Aquaculture Society, Seattle, Washington, USA, 19 – 23 february, 419p

SNYDER, L., J. GLAJCH & J. KIRKLAND, 1988. Practical HPLC method development. John Wiley & Sons, Inc., USA.

SPANGGAARD, B., F. JÖRGENSEN, L. GRAM & H. HUSS, 1993. Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture*, 115, 195 - 207.

STEHLY, G., W. GINGERICH, C. KIESSLING & J. CUTTING, 1999. A bridging study for oxytetracycline in the edible fillet of rainbow trout: Analysis by liquid chromatographic method and the official microbial inhibition assay. *Journal of AOAC International*, 82(4), 866 – 870.

STUCK, K., R. OVERSTREET & J. LOTZ, 1992. Effects of antibiotics on the growth and survival of larval *Penaeus vannamei* in a small-scale experimental system. En: *Aquaculture '92*, World Aquaculture Society, Orlando, Florida, 21 – 25 may, 212p

SUBASINGHE, R., U. BARG, M. PHILLIPS & C. LAVILLA-PITOGO, 1999. Chemotherapeutants in aquaculture: An Asian perspective. En: *Aquaculture '99*, World Aquaculture Society, Sydney - Australia, 737p.

- TAKAHASHI, Y., T. ITAMI, A. NAKAGAWA, H. NISHIMURA & T. ABE, 1985. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured kurama prawns *Penaeus japonicus* Bate. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51(10), 1639 – 1643.
- TEXAS AGRICULTURAL EXTENSION SERVICE, 1994. Guide to drug, vaccine, and pesticide use in aquaculture. Federal Joint Subcommittee in aquaculture, agosto
- THRELFALL, E., 1992. Antibiotic and the selection of food borne pathogens. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 72, 96S – 102S.
- TOURAKI, M., P. RIGAS & C. KASTRITSIS, 1995. Liposome mediated delivery of water soluble antibiotics to the larvae of aquatic animals. Aquaculture, 136, 1 - 10.
- TOURAKI, M., S. MOURELATOS, G. KARAMANLIDOU, S. KALAITZOPOULOU & C. KASTRITSIS, 1996. Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry. Aquacultural Engineering, 15(2), 133 - 147.
- TREVIÑO, L., E. CRUZ & D. RICQUE, 1993. Aplicación del uso de promotores de crecimiento en acuicultura: antibióticos. En: Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de alimentos para acuicultura, Universidad Autónoma de Nuevo León, 293 -320.
- UENO, R., K. UNO, S. KUBOTA & Y. HORIGUCHI, 1989. Determination of oxytetracycline in fish tissues by high performance liquid chromatography. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(7), 1273 - 1276.
- UENO, R., K. UNO & T. AOKI, 1995. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. En: M. Shariff, J. Aethur & R. Subasinghe (ed.), Diseases in Asian Aquaculture II. Asian Fisheries Society, Phuket, Thailand, 25 – 29 october, 523 – 531.

UENO, R., K. SANGRUNGURANG & M. MIYAKAWA, 1999. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 32(9), 629 – 633.

UNO, K., T. AOKI & R. UENO, 1992. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in cultured rainbow trout, amago salmon, and yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(6), 1151 - 1156.

UNO, K., 1996. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 134, 33 - 42.

UNO, K., T. AOKI, R. UENO & I. MAEDA, 1997. Pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following bolus intravenous administration. *Fisheries Science*, 63(1), 90-93.

VAUGHAN, S. & P. SMITH, 1996. Estimation of the influence of a river sediment on the biological activity of oxytetracycline hydrochloride. *Aquaculture*, 141, 67 – 76.

VAUGHAN, S., R. COYNE & P. SMITH, 1996. The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture*, 139, 47 - 54.

WHITE, C., W. MOATS & K. KOTULA, 1993. Comparative study of high performance liquid chromatographic methods for the determination of tetracycline antibiotics. *Journal of Liquid Chromatography*, 16(3), 2873 – 2890.

WILLIAMS, R. & D. LIGHNER, 1988. Regulatory status of therapeutants for penaeid shrimp culture in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19(4), 188 – 196.

WILLIAMS, R., T. BELL & D. LIGHTNER, 1992. Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae. *Journal of aquatic animal health*, 4, 262 – 270.

WOODWARD, K., 1996. The regulation of fish medicines – UK and European Union aspects. *Aquaculture Research*, 27, 725 – 734.

XU, D. & W. ROGERS, 1994. Leaching loss from oxytetracycline medicated feeds. *Journal of Applied Aquaculture*, 4, 29 – 38.

XU, D. & W. ROGERS, 1995. Oxytetracycline residue in the muscle of Nile tilapia. *Asian Fisheries Science*, 8, 113 – 120.