

# residualidad y detección de antibióticos en camarones

Nelson Montoya ■

V., M.Sc.

nmontoya@cenaim.espol.edu.ec

La inclusión de antibióticos en alimentos utilizados para el cultivo de camarones, junto a irrespeto o desconocimiento de los tiempos de retiro, pueden originar la presencia de residuos de estos fármacos en los tejidos del animal sometido a tratamiento. Estos residuos son en general sustancias farmacológicamente activas (principios activos o metabolitos) que permanecen en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales tratados con la droga. La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad hasta presentar consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas, anatómo-patológicas o incluso, causar la muerte (Ueno et al., 1999; Gancho Grande et al., 2000).

La problemática de la presencia de residuos de antibióticos en camarones no es reciente. Así, en octubre de 1990, muestreos realizados en los mercados de Bangkok establecen la presencia de

residuos de ácido oxolínico y oxitetraciclina, en muestras de *P. monodon*.

A inicios de 1991, las autoridades japonesas detectan residuos de antibióticos en camarones importados desde Tailandia, y amenazan con prohibir el ingreso del crustáceo. También en 1999, la autoridad de salud del puerto de Southampton establece la presencia de respuesta microbiana residual en un 24% de muestras de camarón procesado; detectándose además, residuos de trimetoprim y bajos niveles de gentamicina.

En agosto del 2001, la autoridad de salud alemana detecta residuos de cloranfenicol en un cargamento de camarón procedente de China. A paso seguido se confirma la presencia de residuos de este antibiótico en cargamentos de camarón procedentes de Vietnam e Indonesia. Como resultado de estos hallazgos, el mercado europeo

-en septiembre del mismo año- establece la obligatoriedad en la inspección del camarón importado desde los países mencionados. Por su parte, la FDA a inicios del 2002 incrementa los controles de inspección de los productos acuícolas y realiza un llamado de alerta para el no uso de drogas prohibidas en acuicultura y su prohibición directa.

La FDA, a inicios del 2002, incrementa los controles de inspección de los productos acuícolas y realiza un llamado de alerta para el no uso de drogas prohibidas.

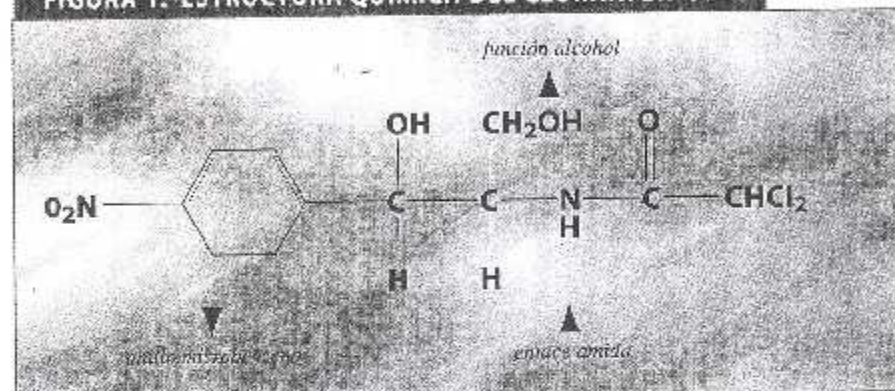
### Residualidad de antibióticos

Las restricciones y los controles al uso de antibióticos en acuicultura derivan de la aplicación no controlada y poco técnica de estas drogas. Entre las consecuencias mayormente estudiadas de este "abuso" se reportan: el desarrollo de resistencia bacteriana, la transmisión de esta resistencia a bacterias patógenas para el hombre (White y McDermott, 2001) y el posible riesgo para la salud humana, debido a la alta toxicidad de los residuos de antibióticos. En este último aspecto destacan las regulaciones impuestas al uso de cloranfenicol (CAP) y nitrofuranos (NF). El uso de estos antibióticos en acuicultura es ilegal, pues se ha

demostrado que la presencia de residuos de CAP en los alimentos produce anemia aplásica en el hombre; mientras que los NF y/o sus metabolitos derivados son considerados como potenciales carcinogénicos y mutagénicos.

En la actualidad y como consecuencia derivada de este conocimiento, los países importadores de productos acuícolas han introducido varias regulaciones al uso de agentes antimicrobianos en acuicultura. La categorización de los

FIGURA 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CLORANFENICOL



**PlastiCultura®**  
Acuícola

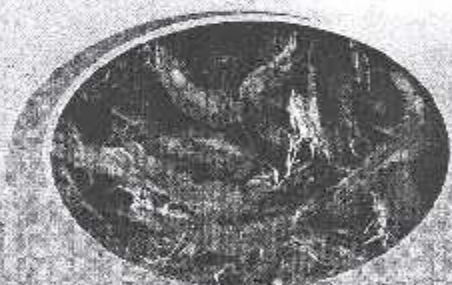
Innovación a plena luz

La máxima diversidad de productos:

- 1.- **Plastiliner:** (Geomembrana) Películas de polietileno de alta densidad, utilizada para impermeabilizar y recubrir piscinas, formar todo tipo de canales y reservorios, recibir tanques, reducir pérdidas, laboratorios.
- 2.- **Plastiroot:** (irva náutica). Película para cubrir piscinas y son utilizadas también para los raceways. En las granjas de trapias ofrece un crecimiento más rápido, generando el calor que se requiere.
- 3.- **Plasticanal:** (Mangas para transporte de agua) Es un producto nuevo en el mercado, el que reemplaza a los canales formados alrededor de cada piscina, transportando el agua sin ningún tipo de desperdicios.
- 4.- **Fundas tipo pañal:** Fundas para empaquetar camarones procesados.
- 5.- **Empaques para balanceados:** Películas convertidas para empaquetar balanceados en diferentes formas y espesores.
- 6.- **Fundas laminadas impresas:** Para empaquetar camarones procesados y congelados, reduciendo el costo (OPE).



**Por fin algo nuevo  
bajo el sol.**



Fabricados por



**plasti-empaques**

GUAYAQUIL: Km. 1.5 vía Durán - Tambío  
PBX: (503-4) 2801600 - 2802225 Fax: 2800081  
QUITO: Los Cipreses s/n. y Av. Real Audiencia  
Telf.: (593-2) 2479734 - 2479853 Fax: 2472780

e-mail: [plastiemp@plastiempaques.com](mailto:plastiemp@plastiempaques.com) <http://www.plastiempaques.com>

antibióticos en prohibidos ("Cero Tolerancia") y aquellos regulados mediante Límites Máximos Residuales (L.M.R.) constituyen ejemplos de estas regulaciones. El L.M.R. es un parámetro de calidad, definido como la concentración máxima de residuos de un antibiótico considerado aceptable o legalmente permitido. Mientras que la denominación de "Cero Tolerancia" se relaciona con un valor de concentración determinado por el límite de detección del método analítico recomendado, y que varía en función del estándar de detección gubernamental. Esta última categoría encierra a todos aquellos antibióticos, cuyo uso no está permitido en alimentos de origen animal por razones de salud pública (cloranfenicol, fluoroquinolonas, nitrofuranos, etc.).

Adicionalmente, ambas regulaciones basados en el conocimiento de los procesos metabólicos que sufren los antibióticos en su paso por el organismo especifican para la estimación del "valor total" de contenido de residuos, la cual cuantificación de la droga parente y el metabolito (marcador traza) de mayor estabilidad. Esto es, la normativa aplicada considera como "valor total" de contenido de residuos a la "suma de la droga parente con sus respectivos marcadores trazas".

#### Residuos de Fenicoles

Los miembros que conforman este grupo de antibióticos son: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. Este grupo de antibióticos se caracteriza por ser bacteriostáticos, con mecanismos de acción basados en la inhibición de la síntesis proteica de la célula bacteriana.

#### Cloranfenicol

Originalmente aislado de *Streptomyces venezuelae*, el CAP es un antibiótico de amplio espectro frecuentemente utilizado en la producción de animales por sus excelentes propiedades bacterianas y farmacocinéticas. El inconveniente de inducir anemia aplásica y producir otros desórdenes sanguíneos a niveles muy reducidos ha determinado la prohibición del CAP para el tratamiento de animales usados en la producción de alimentos.

Como se ilustra en la figura 1, el CAP presenta un anillo nitrobenzeno, un

El CAP base tiene muy baja solubilidad en agua, pero es altamente soluble en lípidos. Las sales de palmitato presentan características similares de solubilidad a diferencia de las de succinato, misma que es altamente soluble en agua.

#### Tianfenicol (TAP)

El tianfenicol, antibiótico derivado del CAP difiere en sus características por su marcada solubilidad en agua. La estructura química del TAP se diferencia de la del CAP por la presencia de un grupo sulfa en reemplazo del grupo nitro. Este

#### TIANFENICOL (TAP)

| Sustancia   | Marcador    | Especie | LMR      | Tejido         | Provisiones |
|-------------|-------------|---------|----------|----------------|-------------|
| Tianfenicol | Tianfenicol | Peres   | 50 µg/kg | Músculo y piel | Ninguna     |

enlace amida y una función alcohol. La presencia del anillo nitrobenzeno es relevante, debido a que este origina formación de aminas aromáticas, las cuales pueden ser carcinogénicas. El grupo alcohol sirve como un grupo funcional que facilita la formación de ésteres, mejorando la hidrosolubilidad del antibiótico.

antibiótico presenta probada efectividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, siendo especialmente activo en bacterias anaeróbicas.

En una de las últimas revisiones (EMEA/CVMP/765/99-Rev.11) de la agencia europea para la evaluación de productos medicinales -unidad de evaluación de medicinas veterinarias- (EMEA por sus siglas en inglés) se incluyó al TAP dentro del Anexo I de la regulación del consejo (EEC) No. 2377/90. Es decir, dentro de las sustancias farmacológicamente activas para las que hay un L.M.R. establecido.

La FDA no incluye este antibiótico dentro de las drogas aprobadas para el uso en medicina veterinaria (FDA Approved Animal Drugs Products).

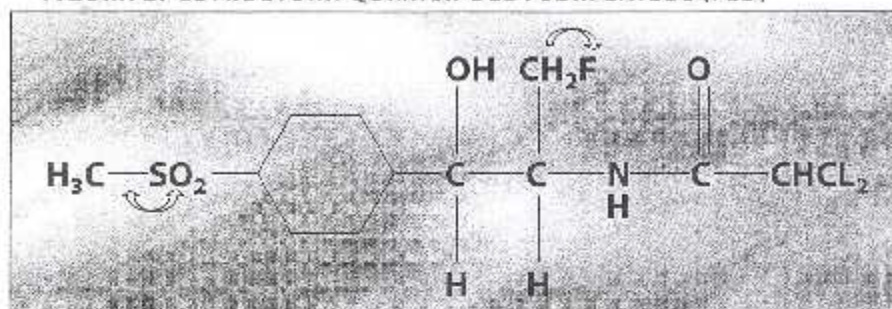
**Las restricciones y los controles al uso de antibióticos en acuicultura derivan de la aplicación no controlada y poco técnica de estas drogas.**

### Florfenicol (FLO)

Al igual que su antecesor, éste es un antibiótico sintético de amplio espectro, igualmente relacionado con el CAP, pero de este último se diferencia en dos aspectos fundamentales. La presencia de un grupo p-metil sulfonilo en reemplazo del grupo nitro, y la de un radical fluor en reemplazo del grupo oxidrilo en la función alcohol terminal primaria del CAP (figura 2). El FLO es altamente soluble en lípidos, lo cual se refleja en una distribución extensiva hacia los tejidos animales.

Este antibiótico es similar en su mecanismo de acción a la del CAP; esto es, la inhibición de la enzima peptidil trans-

FIGURA 2: ESTRUCTURA QUIMICA DEL FLORFENICOL (FLO)



### FLORFENICOL (FLO)

| Sustancia   | Marcador                                              | Especie | LMR        | Tejido         | Provisiones |
|-------------|-------------------------------------------------------|---------|------------|----------------|-------------|
| Florfenicol | Suma de Florfenicol y su metabolito Florfenicol amilo | Peces   | 1000 µg/kg | Músculo y piel | Ninguna     |

# AHORA EN ECUADOR



# BERNAQUA

biotechnology environment research nutrition

**con las mejores dietas para camarones y peces!**

**Bern Aqua BVBA** es una compañía belga que ha tomado la producción de la Compañía Tesgofarm Aqua BV de Holanda, la cual viene trabajando en el Ecuador desde 1998.

Su propietario, el Dr. Bernard Devresse y su Gerente en Ecuador, el Sr. Julio Macías, garantizan el servicio técnico y comercial que **Bern Aqua BVBA** ofrece a la industria ecuatoriana con la mejor calidad de productos y a los mejores precios!

Oficinas Ecuador: Av J.Tanca Marengo Km 2.5,  
Centro Comercial Sepropisa Local 9 • tel/fax 04-238.63.13

## ► desde el CENAIM: residualidad y detección de antibióticos

ferasa. Sin embargo, cepas bacterianas resistentes al CAP y al TAP han demostrado, por el contrario, ser altamente sensibles a la inhibición causada por este representante fluorado.

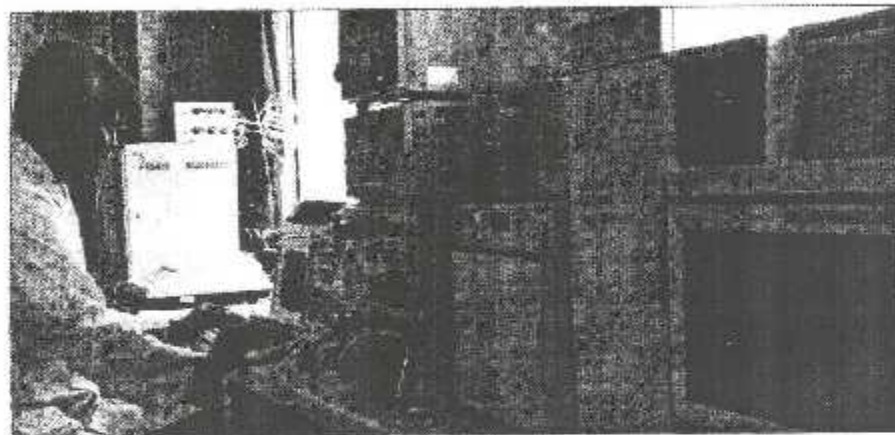
La EMEA también clasifica al Florfenicol (EMFA/MRL/760/00-Final) dentro del Anexo I de la regulación del consejo.

La FDA incluye al FLO como droga aprobada para su uso en medicina veterinaria. Siendo esta aprobación específica para el control de enfermedades respiratorias en ganado vacuno.

En resumen, en las regulaciones revisadas, ambas normativas (FDA y EMEA) clasifican al cloranfenicol como anti-

biótico de uso ilegal en acuicultura. La regulación europea clasifica a sus derivados (tanfenicol y florfenicol) como antibióticos aprobados para uso te-

rapéutico -esto es, aplicación del antibiótico una vez confirmada la presencia de los signos clínicos de la enfermedad a concentración y tiempo definidos-



## Sea Technology, Inc.

**Soluciones en  
acuicultura**

El proveedor más completo de América



José Hernando de la Hoz

Gerente de Ventas

Tel: (507) 269-3485

Fax: (507) 264-7294

E-mail: seatech2@pananet.com

P.O. Box 55-0939 Paifilla, Panamá  
República de Panamá



### Dietas Secas

Somos distribuidores autorizados de la compañía Salt Creek para Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Honduras de los siguientes productos:

- Spirulina Microfeast
- Brine Shrimp Flake
- Cisto de Artemia 80-90% a 95% de eclosión
- Jade Spirulina
- Progression 1, 2, 3, 4
- Pond Huffer



### IQ 2000

Es un reactivo altamente sensible para detectar la presencia de Mancha Blanca, TSV, YHV e IHHNV.



### Poliquetos Marinos

Cerubeados libres de Mancha Blanca empacados en bolsas de 5 libras. Suministro constante.



### Biomasa de Artemia

Procedente de Mosoró, Brasil, la más alta relación de peso seco vs. peso húmedo. Controlamos extracción, lavado, congelamiento y empaque, para garantizar la calidad. Excelente alimento para reproductores y postlarvas de camarón.



### Krill

Somos representantes exclusivos de la empresa japonesa NSK, líder mundial en la pesca y proceso de Krill. Es comprado y almacenado a -30° C en nuestras bodegas de Panamá.



### Calamar

Empacados con la más alta calidad y frescura.

## ► desde el CENAIM: residualidad y detección de antibióticos

Por el contrario, la FDA no clasifica al tianfenicol pero sí lo hace para el caso del florfenicol, indicando la aplicación terapéutica específica para ganado vacuno. En este punto, resaltamos el hecho de que las aprobaciones europeas aquí mencionadas rezan específicamente -en su uso terapéutico- para la producción de peces y no de camarones.

### Residuos de Nitrofuranos

Al igual que el cloranfenicol, los nitrofuranos (furazolidona, furaltadona, nitrofurazona, nitrofurantoina) y sus respectivos metabolitos (AOZ, AMOZ, AHD, SEM), categorizados como probables "carcinogénicos y/o mutagénicos", son regulados (FDA, EMEA) mediante norma prohibitiva y precautelaria de "Cero Tolerancia", esto es: el uso de estos antibióticos en el tratamiento de animales destinados a la producción de alimentos para humanos es ilegal.

A diferencia de los fenicoles y de otros antibióticos, el análisis de residuos de nitrofuranos se basa en la detección de los metabolitos de las drogas parientes. Los metabolitos originados a partir de las drogas parientes de NF son conocidos por unirse en forma covalente a proteínas celulares en los tejidos. El complejo metabolito-proteína formado es "estable y de difícil eliminación". Aunque si bien la eliminación de este complejo depende de la tasa de recambio de proteínas del organismo tratado, no obstante, este tipo de proceso es muy lento en la mayoría de los animales, y en forma puntual para camarones, el proceso en muchas ocasiones es detenido para favorecer el rápido creci-

miento del animal. En conclusión, la aplicación de NF en estadios tempranos, y la posibilidad de que sus residuos estén presentes a niveles detectables en animales de peso superior son representativas.

A más de la alta residualidad en los tejidos, también se ha comprobado que los complejos metabolito-proteínas (AOZ-proteína, SEM-proteína, etc.) no sufren mayor degradación o inactivación mediante las técnicas normales de preparación de alimentos, esto es: cocción, hervido, calentamiento, horneado, etc.

**Los residuos de CAP en productos acuícolas son regulados mediante norma prohibitiva y precautelatoria de "Cero tolerancia".**

Debido a las características anotadas, la evaluación de los residuos de Nitrofuranos en camarones, dado el alto riesgo de sus metabolitos, especifica "principalmente" la detección de los niveles residuales de AOZ, AMOZ, AHD o SEM, en conjunto con las respectivas drogas parientes.

### Métodos para la detección de antibióticos

Debido a la improbabilidad de establecer los L.M.R. de antibióticos como el cloranfenicol y los nitrofuranos, un

criterio importante que emerge desde el punto de vista analítico para la evaluación de sus residuos, es el límite de performance mínimo (MRPL por sus siglas en inglés) del método aplicado para el análisis residual.

En general, la detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal es realizada mediante dos tipos de métodos: "screening" y confirmatorios. Los métodos de "screening" (microbiológicos: multiplate test; inmunoensayos: ELISA; cromatografía líquida: HPLC; sistema de ensayo receptor: CHARM II) son ensayos presuntivos que tienen como objetivo identificar la presencia de una y/o varias drogas en una muestra sospecha. Las ventajas de estos métodos son una mínima extracción y procedimientos de limpieza, siendo además relativamente económicos y de fácil aplicación. Sus desventajas son: presentar un rango amplio, y no específico de espectro de sensibilidad y especificidad.

Si las pruebas de "screening" arrojan resultados positivos para cualquier antibiótico sujeto a verificación, las políticas de residuos de antibióticos que actualmente rigen en las fronteras, especifican la aplicación "obligatoria" de métodos confirmatorios. Los métodos para la confirmación de residuos de antibióticos son: HPLC, LC-MS y LC/MS/MS (Cromatografía Líquida/ Espectrofotometría de Masas/ Espectrofotometría de Masas). A diferencia de los métodos de "screening", las características principales de estos métodos son la elevada capacidad de cuantificación, especificidad y sensibilidad.

### Confirmatorios

El método de mayor simpleza con que se cuenta al momento para la determinación de los metabolitos de NF es el sistema HPLC. Sin embargo este método puede sufrir considerables interferencias provenientes de la matriz (tejidos) a analizar. El método tampoco reúne las características exigidas por la UE a los procedimientos analíticos confirmatorios aplicados en el análisis de sustancias prohibidas. Si bien al momento no existe un método referencial para la confirmación de los metabolitos de NF y sus respectivas drogas parientes, basados en las características de elevada sensibilidad y especificidad, el sistema LC/MS/MS es ampliamente recomendado y aplicado para la estimación de estas drogas. Este método permite la estimación de niveles cercanos a 0.08 ppb.

### Problemática del límite de detección

Uno de los pronunciamientos de la Alianza Global de la Acuicultura (GAA por sus siglas en inglés) en una de sus últimas reuniones (Bruselas, abril 24 de 2002) establece que para discernir la aplicación de las normativas aplicadas a residuos de fármacos en alimentos, se deben inicialmente esclarecer las diferencias entre niveles de detección y toxicidad del fármaco en humanos. Esto es, las normativas deben basarse en estudios reales de niveles de toxicidad y no ser un reflejo del avance tecnológico logrado. Indicando además que, los niveles de residualidad para CAP establecidos por la UE, no está basado

en información toxicológica reciente, sino más bien que la normativa es un reflejo del avance logrado en la tecnología de detección y la aplicación del principio de precaución.

En este contexto, la estimación de valores reales de toxicidad, sin duda alguna será una herramienta de gran ayuda al momento de escoger el método analítico más idóneo para la determinación de residuos de antibióticos prohibidos en camarones.

De la revisión aquí detallada, numerosos son los métodos descritos para la detección y confirmación de residuos de antibióticos en alimentos y materiales biológicos.

La diferenciación y aplicación de los métodos descritos están basados en la capacidad de detección y practicidad del método para medir niveles trazas en el tejido objetivo; así los límites de detección estimados para las pruebas de "screening" se encuentran en rangos promedios de 0.5-5ppb y de 0.3-5 ppb para los métodos confirmatorios. En términos de aplicación, varios son los factores que pueden incidir en la performance y resultados arrojados por pruebas analíticas como las detalladas. Por ejemplo, la aplicación de métodos en matrices (tejido animal, fluido corporal, producto comestible, etc.) diferentes a las inicialmente especificadas por la prueba, puede definitivamente traer como consecuencias variación en sus resultados y límites de detección originalmente descritos.

Un ejemplo real de este efecto, lo

constituyen las inconsistencias en las pruebas de ELISA para el "screening" de CAP en camarones. De manera específica, debemos estar concientes que los "test kits" usados para la detección de CAP en camarones han sido desarrollados para mediciones en tejidos de animales terrestres, productos comestibles y fluidos corporales (orina y leche). No debe causar sorpresa las inconsistencias de la prueba si previo a su utilización en la nueva matriz no existen reportes de la respectiva validación del procedimiento. Reportes como el mencionado concuerdan con resultados observados en estudios comparativos de metodologías para la determinación de residuos de antibióticos mediante ELISA y otros métodos.

En sentido generalizado, debemos recalcar que las normativas enunciadas estipulan y exigen el uso de métodos cromatográficos (LC/MS/MS, LC-MS, HPLC, GC) para la confirmación de residuos de drogas en la mayoría de productos para consumo humano. ◀

Hoy en día el sistema LC/MS/MS es el método aplicado por las entidades de control para la confirmación de CAP y otros antibióticos incluidos en la categoría de "Cero Tolerancia".