

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

Eduardo Reyes¹, Nelson Montoya²

¹Acuicultor, Escuela Superior Politécnica del Litoral 2001

²Director de Tesis, Ingeniero Químico, Universidad de Guayaquil, 1989, Postgrado Bélgica, Universidad de Gante 1998. Jefe del Departamento de Cromatografía y Espectrofotometría CENAIM-ESPOL.

RESUMEN

La inclusión de oxitetraciclina (OTC) en concentraciones de 1, 5 y 10 ppt (mg.g^{-1}), 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 ($\mu\text{g.g}^{-1}$), 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.

INTRODUCCION

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 mas 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 via el alimento balanceado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los análisis se empleó un sistema modular de HPLC (Shimadzu, S. Seisakusho, Japón) con detección espectrofotométrica mediante un detector UV/VIS. El mecanismo de separación de fase reversa utilizado, consistió de dos columnas Shim-pack CLC-ODS (15 cm x 6 mm d.i.) ubicadas en serie dentro de un horno.

Las dietas medicadas fueron preparadas en la planta piloto del CENAIM, basados en la formulación CENAIM-40 (Manual de técnicas de nutrición acuícola, 1997). La tabla I muestra las concentraciones nominales de las tres dietas medicadas, junto con la respectiva cantidad de antibiótico mezclado con los ingredientes previa a su elaboración y la concentración final alcanzada en el alimento. El procedimiento de evaluación de la pérdida del antibiótico por lixiviación, se basó en la metodología aplicada en el CENAIM para determinar la estabilidad de las dietas artificiales.

Tabla I. 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%

La prueba dirigida a estudiar la acumulación y pérdida de la OTC en juveniles de *P. vannamei* (peso promedio: 5.6 g $\pm$ 0.9) se efectuó en 12 tanques de fibra de vidrio, cada uno con 37 animales.m⁻², ubicados en el área de bioensayos del CENAIM. El efecto de cada dieta (A, B, C y el control) se evaluó por triplicado, suministrando el 5% de la biomasa presente en cada tanque en dos raciones diarias. Se recambió el 200% del agua y se sifonearon los tanques diariamente. Cuantificando la cantidad de alimento recuperado se determinó el consumo de alimento en cada tanque. Los muestreos consistieron en la captura de dos animales por tanque, antes de brindar la primera dosis de alimento en la mañana. Todas las muestras se congelaron a - 80 °C hasta ser analizadas.

RESULTADOS

Análisis cromatográfico

La implementación de la técnica de extracción de OTC y la metodología analítica mediante HPLC, se basó en el trabajo de Ueno *et al.* (1989), siendo la principal variación del método, la utilización de la

solución tampón McIlvaine (AOAC, 1990) para la extracción del antibiótico. El porcentaje de recuperación del proceso extractivo, fue del 68.1% y 94.8% para la muestras de camarón y alimento balanceado, respectivamente, mientras que las variables operacionales del sistema cromatografico desarrollado, se muestran en la tabla II. Concentraciones de hasta 0.05 ppm de OTC pudieron ser detectadas por el equipo, el cual mostró una respuesta lineal ($R^2=0.998$) hasta niveles de 6.4 ppm.

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

Temperatura de columna	30 °C
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 OTC	11 ± 0.05 min

En lo referente a la tasa de lixiviación del antibiótico en agua dulce y agua de mar, se observó como la salinidad incrementó significativamente las pérdidas de la OTC en las dietas medicadas (Figura 1). Un rápido desprendimiento de la droga se notó en las primeras dos horas de experimentación, obteniéndose en este lapso el 73% de la pérdida total ocurrida durante 6 horas de lixiviación.

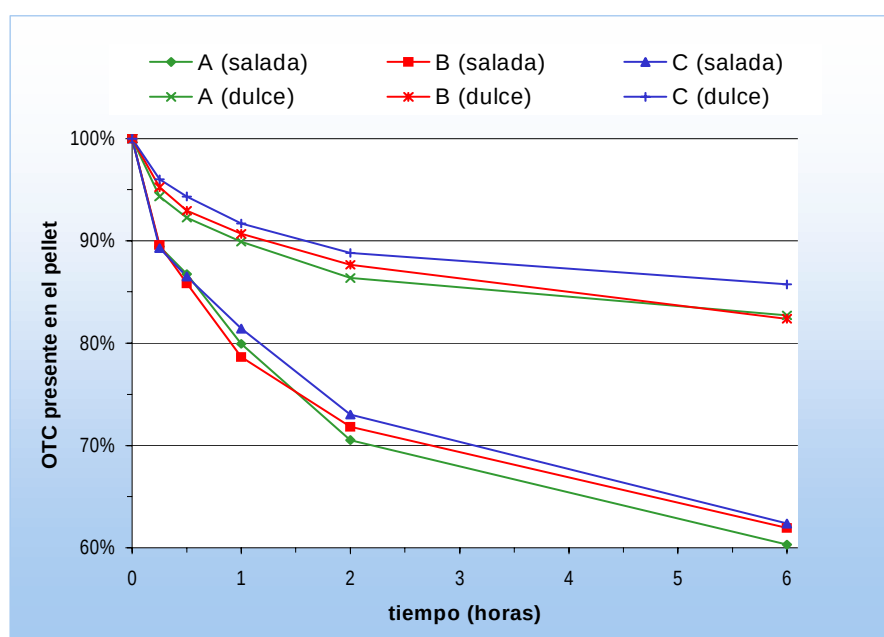


Figura 1. Porcentajes de OTC lixiviado en las dietas medicadas empleando dos tipos de medios: agua de mar y agua dulce.

Bioensayo

La supervivencia de los animales en todos los tanques fue alta, 92%. Las curvas de acumulación y pérdida de la OTC del músculo del *P. vannamei* se muestran en la figura 2. La tabla III indica las concentraciones máximas y mínimas determinadas en las muestras de camarón durante el bioensayo.

Tabla III. 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.

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 una 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.

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.

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 3 muestra la tendencia del consumo de alimento por animal para cada uno de los tratamientos. Igualmente, se observa que los tanques control fueron los que siempre consumieron mas 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.

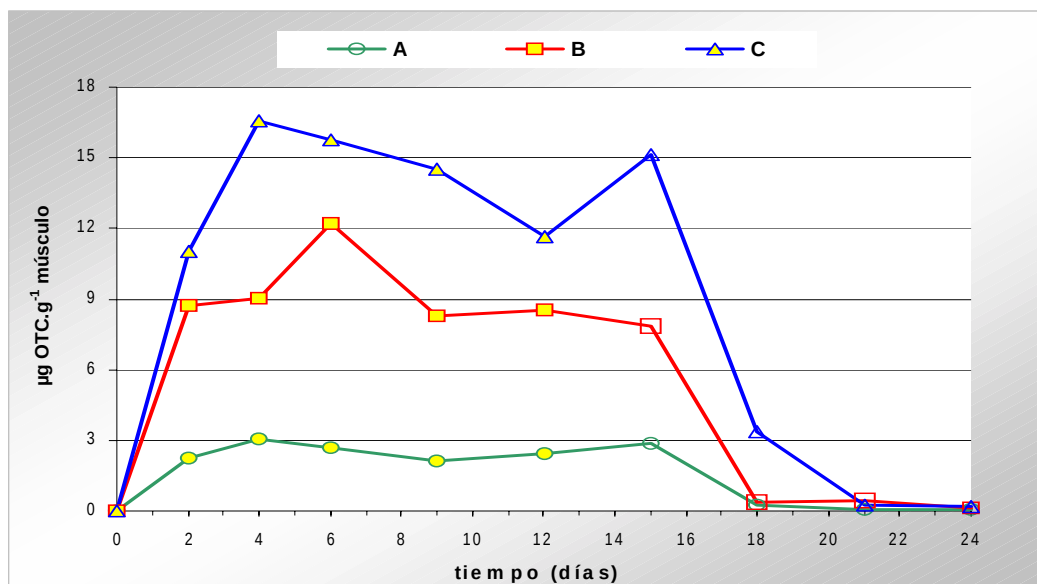


Figura 2. Curvas de acumulación y pérdida de la OTC con los tres tratamientos.

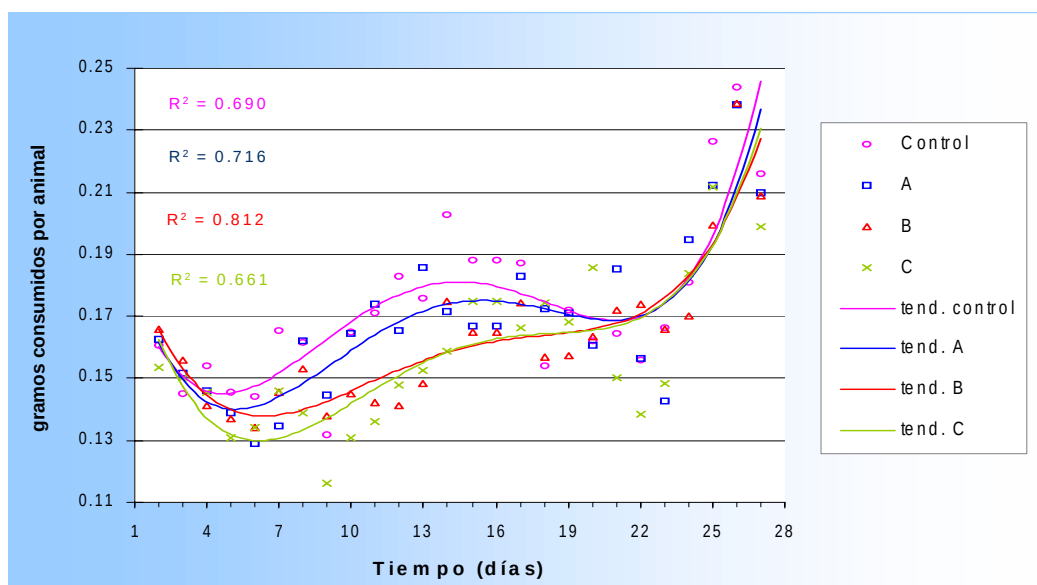


Figura 3. Tendencia del consumo de alimento en los tratamientos y el control durante el bioensayo.

DISCUSIÓN TÉCNICA

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.

Lixiviación

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 y mayor área superficial de los pellets (Duis *et al*, 1995), no afectaron los resultados del presente trabajo, ya que en ambas pruebas se empleo 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.

Efectos de la OTC en los animales

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 Mohney *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 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.

En la figura 5 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.

Cuando se incluye en la figura 4 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 5, indicando una reducción en la capacidad de acumular el antibiótico a medida que se incrementa la dosis de OTC para el *P. vannamei*.

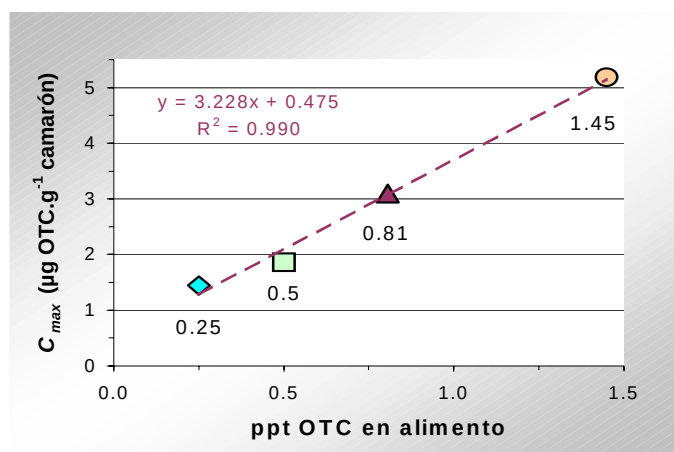


Figura 4. Correlación de las C_{max} de OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos. Rombo celeste: Higuera-Ciapara *et al.*, 1991; *P. monodon* 12.2 g, 27 – 29 °C. Cuadrado verde: Bermúdez-Almada *et al.*, 1999; *P. vannamei*, 17 g, 18 – 24 °C. Triángulo lila: Presente trabajo, *P. vannamei*, 5.6 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.

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.

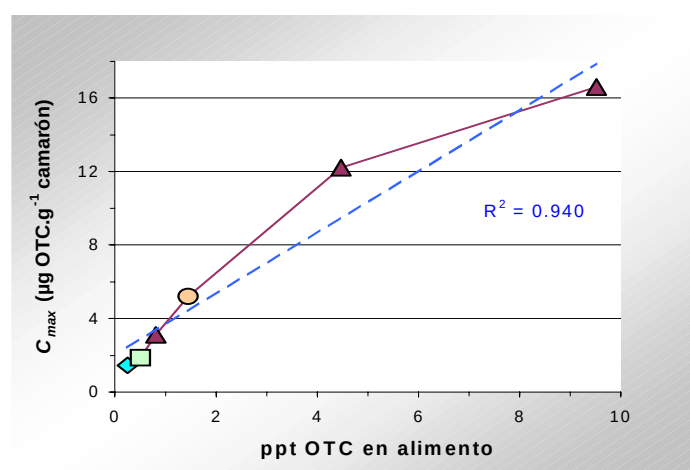


Figura 5. Datos de C_{max} OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos, junto con las C_{max} originadas por las tres dietas medicadas en el presente estudio. La simbología es correspondiente a la descrita en la figura 4.

CONCLUSIONES

El porcentaje de recuperación del procedimiento de extracción para el músculo de camarón y el límite de detección del sistema HPLC empleado, se encuentran dentro de los rangos reportados.

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.

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.

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).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th edition: Agricultural chemicals, contaminants, drugs. K. Helrich (ed), Association of Official Analytical Chemists, INC., Arlington, Virginia, USA, 126p
2. BAPTISTA, M., 1998. Uso indiscriminado de antibióticos y sus problemas. El Mundo Acuícola, 4(2), 9p.

3. 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.
4. 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 recptor assay. Journal of Food Science, 64(4), 638 – 640.
5. CENAIM, 1998. Informe interno. Departamento de Monitoreo.
6. CUZON, G., J. GUILLAUME & C. CAHU, 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacea. Aquaculture, 124, 253 – 267.
7. 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.
8. FDA, 1998. Method for the determination of oxytetracycline residues in uncooked shrimp using High Performance Liquid Chromatography, November 6, 1998, 1 – 13.
9. FEEDING TIMES, 2000. Cambio de hábitos en el nuevo milenio. Feeding times, 5(1), 14 – 15.
10. FRELIER, P., 1995. Early diagnosis and prevention of rickettsiosis in shrimp farming. College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, USA.
11. 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.
12. GREENLEES, K., 1997. Laboratory studies for the approval of aquaculture drugs. The Progressive Fish Culturist, 59, 141 – 148.
13. 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.) Chemoterapy in Aquaculture: From theory to reality. Symposium, Paris, marzo 12 – 15, 59 – 66.
14. KÜHNE, M., S. WEGMANN, A. KOBE & R. FRIES, 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. Food Control, 11, 175 – 180.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. RUPP, H., R. MUNNS & A. LONG, 1994. Simultaneous determination of nitrofurazone, nitrofurantoin, and furazolidone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77(2), 344 – 350.
20. 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
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. WILLIAMS, R. & D. LIGHTNER, 1988. Regulatory status of therapeutants for penaeid shrimp culture in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19(4), 188 – 196.