UNIVERSIDAD DE MACHLALA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE ACUACULTURA

TESIS SOMETIDA A CONSIDERACIÓN DEL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS COMO REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL GRADO DE:

INGENIERO ACUACULTOR

EVALUACIÓN DEL USO DE AGENTES PROTECTORES SOBRE LA LIXIVIACIÓN Y PALATABILIDAD DE DIETAS MEDICADAS (FLORFENICOL) PARA CAMARONES

JORGE OMAR POZO PALACIOS
2002

evaluar la cantidad de animales mudados contando el numero de *rostrums* recuperados en el sifoneo.

3.5. DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL (FLO) VÍA HPLC

El método analítico implantado para la determinación cualitativa y cuantitativa de florfenicol (FLO) mediante HPLC, incluyó una serie de pasos entre los cuales tenemos: muestreo, almacenaje, extracción y análisis.

Las condiciones operativas del sistema para la determinación de FLO vía HPLC, fueron extrapoladas del método original descrito por Schering-Plough (2000). Metodologías de extracción para FLO descritas por Nagata y Saeki (1992) y Hormazabal *et al* (1993), fueron analizadas y comparadas en su cuantificación de FLO.

3.5.1. EXTRACCIÓN DE FLO

3.5.1.1. Equipos

- Biohomogenizador (Janke & Kunkel-Ultra Turrax T25)
- Centrífuga refrigerada (Kokusan H-2000 B)
- Sistema de evaporación al vació (Büchi RE 111, Sibata)
- Balanza analítica Mettler AE-240 (0.00001 g)
- Sonicador Branson 5200
- Congelador – 20°C (NIHON BIO Freezer)

3.5.1.2. Reactivos

- Acetona grado HPLC (Mallinckrodt Baker)

Esta tesis ha sido aceptada en la forma presente por el tribunal de grado nominado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Machala, como requisito parcial para optar al grado de:

INGENIERO ACUACULTOR

Dr. Benigno Granda Arias, Director Presidente

Ing. Colón Velásquez López, Profesor Miembro

Dr. Patricio Reyes Nieto, Profesor Miembro

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado con la ayuda financiera – técnica y científica de CENAIM- ESPOL. Dejo constancia de mi agradecimiento al Dr. Jorge Calderón, Director de la Fundación, por permitirme realizar este importante estudio.

De manera especial mi reconocimiento y agradecimiento al M.Sc. Nelson Montoya, Investigador de la Fundación CENAIM- ESPOL, por su amistad, apoyo y confianza brindada, y quien en forma desinteresada colaboró guiando este trabajo de investigación.

De igual manera al Dr. Benigno Granda A. Director de la tesis, al Ing. Colón Velásquez y al Dr. Patricio Reyes, colaboradores de la misma, por haber cooperado desinteresadamente en la revisión y evaluación de la presente investigación.

Así mismo en la Fundación CENAIM- ESPOL, agradezco la colaboración y amistad de la Sra. Cecilia Campoverde, Sr. Eduardo Zambrano, a todos los chicos de Maestría 2: Pilar Bonilla, Miguel Ullaguari, Iván Álvarez, Martha Maldonado, Constanza Erazo; a mis compañeros tesistas: Vanesa Riofrío, Verónica Arriaga, Cristian Heise, y todos los que colaboraron de manera desinteresada, muchas gracias a todos ustedes.

Agradezco sinceramente a mi familia, por ese apoyo constante que me dieron desde el primer día que ingrese a la Fundación, a mi madre por sus oraciones diarias, a mi padre por estar pendiente de mi bienestar, y a mi hermana por preocuparse sobre mis estudios, a ustedes un beso inmenso y muchas gracias por todo.

Al personal docente y administrativo de la Facultad de Agronomía, Veterinaria y Acuacultura de la Universidad de Machala, y de manera muy especial, mi agradecimiento a la Srta. Pilar.

A todos ustedes gracias, infinitas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres:

Dios es amor y para mi la señal inconfundible de que existe amor es el mejor regalo que pude recibir de el: mi Madre y mi Padre, padres en todo sentido de la palabra, que con esfuerzo, dedicación y sacrificio, supieron siempre enseñarme y brindarme el verdadero valor de la vida, que no es la riqueza, ni lo material, sino el cariño, el amor y la compresión, que es en realidad lo que nos hace felices en este mundo.

Para ti mama Elgia y papá Jorge, esta dedicado completamente este trabajo, y todos los años de estudio para llegar a esta meta, el de ser un profesional, recuerden que nunca los voy a decepcionar, pues me siento muy feliz de haberles cumplido. Gracias por todo, y los quiero mucho.

Jorge P.

Si Dios nos permitiese pasar por nuestras vidas sin encontrar ningún obstáculo, nos dejaría limitados y no lograríamos ser tan fuertes como podríamos haber sido. Algunas veces, el esfuerzo es lo que realmente necesitamos en nuestra vida.

Pedí fuerza y Dios me dio dificultades para hacerme más fuerte.

Pedí sabiduría y Dios me dio problemas para resolver.

Pedí prosperidad y Dios me dio cerebro y músculos para trabajar.

Pedí valor y Dios me dio obstáculos para superar.

Pedí favores y Dios me dio oportunidades.

Yo no recibí nada de lo que pedí pero he recibido todo lo que necesitaba para culminar con esta investigación. Enfrenta todos los obstáculos y demuéstrate a ti mismo que puedes superarlos.

ÍNDICE

INDICE DE CUADROS

INDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Desde 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, esto originó que pequeños y grandes camaricultores actúen de manera independiente para resolver sus necesidades tecnológicas; motivo por el cual la industria camaronera sigue surgiendo a pesar que, desde su desarrollo a adolecido de manejos estandarizados en lo que se referente al control de enfermedades infecciosas (Bell, 1992).

Es así, como las enfermedades se han convertido en uno de los mayores problemas para la acuicultura del camarón en América Latina; especialmente desde la propagación del virus de la Mancha Blanca (WSSV), donde la producción de camarón se ha visto significativamente afectada en muchos países y los productores están enfrentando serias dificultades para continuar produciendo este crustáceo (Panorama acuícola, 2001).

Cuando se presenta un evento infeccioso en el camarón de índole bacteriano, el uso de antibióticos es un sistema común en los diversos sistemas de producción. Su aplicación esta destinada a disminuir y/o controlar la carga microbiana presente en el medio de cultivo; esto permite evitar la morbilidad y mortalidad del los organismos en la producción acuícola (Shering Ploug, 2000).

La oxitetraciclina junto con la enrofloxacina son los antibióticos mayormente empleados por la industria camaronera, pero también el florfenicol (FLO) es otro de los antibióticos de creciente aplicación en la industria acuícola del país. FLO es un fluorinado derivado del tianfenicol y cloranfenicol con actividad bacteriostática contra bacterias gram positivas y gram negativas, aplicado actualmente en la industria camaronera para el control de ricktesias y vibriosis (Shering Ploug, 2000).

Sin embargo, la información bibliográfica referente a la dosis y comportamiento de esta droga es mínima. La mayoría de los antibióticos poseen propiedades físico-químicas que deben analizarse detenidamente a la hora de aplicarse en un tratamiento terapéutico (Lunestad *et al* 1995). Factores tales como: temperatura (Frelier, 1995), quelación, fotosensibilidad (Lunestad y Goksoyr, 1990), y tamaño del pellet (Duis *et al* 1995), entre otros, deben considerarse en cada uno de los pasos del proceso de elaboración de una dieta medicada y aplicación del alimento medicado al entrar en contacto con el agua de mar debido al proceso de lixiviación.

Efectos directos de la inestabilidad de un antibiótico se traduce en términos terapéuticos, en la utilización de dosis sub-letales de limitada eficacia bacteriana y además en pérdidas económicas innecesarias.

Frente a la problemática del uso de dietas medicadas y al efecto adverso que tienen estos en su aporte residual debido al proceso de lixiviación, existe la posibilidad de disminuir este problema mediante el uso de aglutinantes y/o recubridores; estos aditivos han permitido en algunos casos una mayor estabilidad del antibiótico durante el proceso de lixiviación (Partridge y Southgate, 1999).

De esta manera, el objetivo general de este estudio pretende mediante el desarrollo de una técnica cromatográfica utilizando un sistema de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performancia) proveer una herramienta analítica que sirva para cuantificar el componente FLO, identificar los niveles de pérdidas durante los procesos de manufactura y lixiviación, brindando algunas alternativas mediante el uso de recubridores para evitar las pérdidas del antibiótico al entrar en contacto con el medio acuoso.

Dentro de los objetivos específicos presentes en esta investigación tenemos los siguientes:

- Cuantificar las pérdidas de FLO debido a los procesos de manufactura (en cada etapa y acumulado) en el alimento balanceado medicado.

- Determinar el efecto del uso de agentes protectores (aceite de pescado, alginato de Na + Ca^{++}, y gelatina) sobre las pérdidas por lixiviación de FLO.

- Determinar el efecto de la concentración de FLO sobre las pérdidas por lixiviación.

- Evaluar el efecto de los agentes protectores sobre la palatabilidad del pellet medicado.

- Establecer una metodología para el análisis cuantitativo de FLO.

- Definir un procedimiento de extracción del antibiótico a partir de alimento balanceado medicado.

- Determinar los parámetros analíticos más adecuados para un alto grado de separación cromatográfica mediante HPLC.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTIBIÓTICOS

Los fármacos antibacterianos se dividen en dos grandes grupos: las drogas sintéticas o quimioterápicos, y los antibióticos. Los quimioterápicos son obtenidos por la mano del hombre, en el laboratorio, y los antibióticos son elaborados, en su metabolismo propio, por seres vivos: plantas, animales bacterias y hongos (Arista, 1999).

En la actualidad, la separación entre quimioterápicos y antibióticos es *puramente académica, ya que muchos nuevos agentes antimicrobianos* son derivados semi-sintéticos de substancias primitivas y exclusivamente naturales (Neu, 1987).

Un antibiótico puede definirse entonces como una substancia derivada de un organismo vivo, generalmente de un microorganismo, o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, el crecimiento, o incluso, destruye otros microorganismos y células anormales de animales superiores (Calderon, 1997).

La era moderna de la quimioterapia antimicrobial empezó en 1929 con el descubrimiento de Fleming de las poderosas sustancias bactericidas llamadas penicilinas, posteriormente en 1935 Domagk lleva a cabo el descubrimiento de los químicos sintéticos

Luego a principios de 1940, estimulada parcialmente la necesidad de nuevos agentes antimicrobiales a causa de la segunda guerra mundial, la penicilina fue aislada, purificada e inyectada en animales experimentales, *encontrándose* a más de su efectividad *una increíble* baja toxicidad.

El rápido aislamiento de la estreptomicina, cloranfenicol y tetraciclinas siguió a continuación , y ya para 1950, estos y otros antibióticos estaban en uso clínico (Todar, 2000).

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, tifoidea, difteria, entre otras (*Salyers y Whitt, 1994*). *Una de las principales razones que elevo* 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,

c) Desconocimiento de las dosis adecuadas (niveles sub óptimos básicamente),

d) Irrespeto de los tratamientos y automedicación,

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).

2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los antibióticos son moléculas no proteicas de bajo peso molecular producidas como metabolitos secundarios por microorganismos que viven comúnmente en suelos, gran parte de estos microorganismos se encuentran a manera de esporas o como células en estado latente (Todar, 2000).

Más de la mitad de los antibióticos han sido obtenidos a partir de bacterias, actinomicetos y hongos. Entre los hongos, los más notables productores son: *Penicillium* y *Cephalosporium* , y entre las bacterias, los *Actinomicetos* destacando la especie *Streptomyces*. También se han desarrollado los antibióticos semi sintéticos que resultan de alteraciones químicas de algunos antibióticos (Goodman *et al* 1981).

Las propiedades más importantes de un agente antimicrobial de uso clínico, especialmente desde el punto de vista del paciente es su toxicidad selectiva, lo cual significa baja toxicidad para las células del huésped y alta para el parásito o microorganismos patógenos. En otras palabras, para que un agente quimioterapeútico sea satisfactorio debe de tener las siguientes propiedades:

- Destruir o impedir la actividad de un microorganismo sin dañar las células del huésped o solo causarles un mínimo daño.

- Ser capaz de actuar sobre el microorganismo por penetración de la célula y tejidos del huésped, y;

- No alterar los mecanismos naturales de defensa del huésped, como la fagocitosis y la producción de anticuerpos.

Un antibiótico debe ser capaz de llegar a la parte del cuerpo del huésped donde se esta produciendo la infección. Algunos antibióticos no son absorbidos por el sistema digestivo del huésped, otros son capaces de llegar al torrente sanguíneo pero no pueden ingresar al cerebro del organismo, y otros no están desarrollados para ingresar *muy bien a la célula patógena.* Es por esta razón, que es importante tomar en cuenta la distribución del antibiótico que se va aplicar (Tortora, 1998)

De esta forma, los antibióticos pueden tener un efecto bactericida o bacteriostático en un rango de microbios. Aquellos antibióticos que matan la bacteria reciben el nombre de bactericidas, mientras que, aquellos inhiben su crecimiento se denominan bacteriostáticos. El rango de bacterias o de otros microorganismos que son afectados por un determinado antibiótico se expresa como el espectro de acción. Los antibióticos efectivos contra las procariotes que matan o inhiben un amplio rango de bacterias Gram positivas o Gram negativas se dice que son de amplio espectro. Si son efectivas especialmente en contra de bacterias Gram positivas o Gram negativas, se dice que son de espectro reducido. Y finalmente, si son efectivas contra un determinado microorganismo o bacteria, se refiere a un antibiótico de espectro limitado (Todar, 2000).

No obstante, es importante considerar que los antibióticos de amplio espectro tiene sus desventajas. Ellos no solo matan o inhiben los patógenos que producen la enfermedad, sino que actúan también sobre la microflora presente del huésped. Esto genera que ciertos patógenos que están fuera de competencia se desarrollen y causen otras infecciones (Tortora, 1998).

Muchos microorganismos debido al proceso de mutación, han superado la acción inhibitoria del antibiótico mediante producción de enzimas, las cuales son capaces de degradarlo y convertirlo en un compuesto inofensivo. Sin embargo, en tales casos, aplicar el antibiótico como parte de la mezcla de dos antibióticos, puede ayudar a prevenir el surgimiento de resistencia, ya que la probabilidad de simultaneas mutaciones otorgando resistencia a dos fármacos diferentes es mucho más baja que para un solo antibiótico.

En la actualidad, debido al surgimiento de antibióticos resistentes a ciertos microorganismos, compañías farmacéuticas continúan investigando en la búsqueda de nuevos antibióticos con diferencias en su estructura química

A continuación presentamos los principales grupos de antibióticos y su mecanismo de acción que se resumen en el cuadro 1.

2.1.2. FENICOLES

En términos generales, los fenicoles se caracterizan por ser bacteriostáticos, con mecanismos de acción basados en la inhibición de la síntesis proteica de la célula bacteriana. Los miembros que conforman este grupo de antibióticos son: Cloranfenicol, Tianfenicol y Florfenicol.

Estos antibióticos caracterizados por poseer una estructura química semejante, están representados principalmente por el cloranfenicol y tianfenicol. Sin embargo, a pesar de su gran capacidad bacteriostática, en la mayoría de las investigaciones los mencionan como fármacos de reserva debido a su toxicidad sobre la médula ósea en humanos (Schering Plough, 2000).

Debido a estas restricciones, el gobierno ecuatoriano, como respuesta a las regulaciones y monitoreos impuestos a las importaciones de camarón, oficializo mediante acuerdo ministerial a principios del 2002, la prohibición del uso de cloranfenicol y comercialización de productos para su uso en la actividad acuícola, considerando la residualidad de los fenicoles en productos para consumo humano

Cuadro 1. Principales tipos de antibióticos

Familia	Antibiótico	Mecanismo de acción
β-lactanos	Penicilina G Gentamicina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Penicilina semi sintética	Ampicilina Amoxicilina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Aminoglucósidos	Estreptomicina Gentamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas
Macrólidos	Eritromicina	Inhibición de proteínas
Quinolonas	Ácido nalidixico Ácido oxolínico Flumequina Sarafloxacina Norfloxacina Enrofloxacina	Inhibición de la replicación del ADN
Fenicoles	Cloranfecicol Tianfenicol Florfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Tetraciclina Clortetraciclina Oxitetraciclina	Inhibición de la síntesis de proteínas
Sulfanomidas	Ácido aminobenzoíco Sulfonamida	Inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales

(Todar, 2000; Reyes, 2000)

2.1.2.1. Cloranfenicol (CAP)

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. Este antibiótico es muy efectivo pero puede inducir anemia aplastica y producir otros desordenes sanguíneos a niveles muy reducidos (trazas). Estos efectos adversos han determinado la prohibición del CAP para el tratamiento de animales usados en la producción de alimento.

Como se ilustra en la figura 1, el CAP presenta el anillo nitrobenzeno, un enlace amina y una función alcohol. La presencia del anillo nitrobenzeno es relevante debido a que este origina la formación de *aminas aromáticas, las cuales pueden ser carcinogénicas. El grupo* alcohol sirve como un grupo funcional, facilitando la formación de esteres que mejoran la hidrosolubilidad del antibiótico.

El cloranfenicol 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 (Cenaim informa 2002).

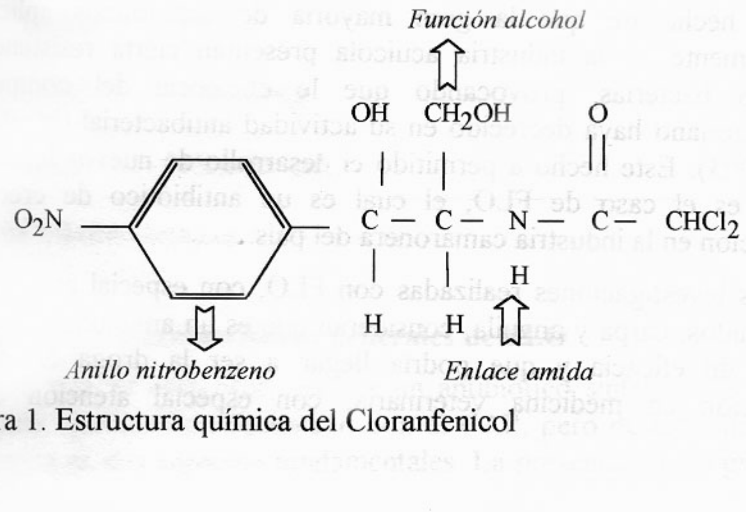

Figura 1. Estructura química del Cloranfenicol

2.1.2.2. Tianfenicol (TAP)

El Tianfenicol, antibiótico derivado del CAP difiere en sus características por su marcada solubilidad en agua. La estructura química del TAP se difiere de la del CAP por la presencia de un grupo sulfa en reemplazo del grupo nitro. Este antibiótico presenta probada actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, siendo especialmente activo en bacterias anaeróbicas.

Sin embargo, a pesar de no ser toxico debido a las modificaciones químicas, existen ciertas precauciones para el empleo de este antibiótico, siendo el posible causante de anemia hemolítica (Cenaim informa, 2202).

De esta forma, las concentraciones necesitadas para lograr un efecto terapéutico del TAP son muy superiores a las requeridas por cloranfenicol, ocasionando una acumulación intracelular e induciendo a una resistencia bacteriana deforma inmediata (Shering Plough, 2000).

2.1.2.3. Florfenicol (FLO)

El empleo de florfenicol (FLO) en esta investigación, se fundamenta en el hecho de que la gran mayoría de antibióticos aplicados comúnmente en la industria acuícola presentan cierta resistencia a algunas bacterias, provocando que le eficiencia del compuesto antibacteriano haya decrecido en su actividad antibacterial (Martinsen *et al*1993). Este hecho a permitido el desarrollo de nuevos fármacos, como es el caso de FLO, el cual es un antibiótico de creciente utilización en la industria camaronera del país.

Ciertas investigaciones realizadas con FLO, con especial atención en salmonidos, carpa y anguila, consideran que es un antibiótico con alto grado de eficacia y que podría llegar a ser la droga de mayor aplicación en medicina veterinaria, con especial atención en la producción de organismos acuáticos para el consumo humano (Hormazabal *et al* 1996).

De la literatura revisada, la normativa internacional de la EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Veterinary y Medicines Evaluation Unit) y FDA (Food and drug administration) clasifica a estos últimos fenicoles: Tianfenicol y florfenicol, como antibióticos aprobados para uso terapéutico. La normativa europea clasifica al tianfenicol, como una droga con aprobación provisional para su uso terapéutico en peces, mientras que, el florfenicol se encuentra dentro de las sustancias con LMR (limite máximo residual) para su uso en medicina veterinaria (cuadro 2). Finalmente, resaltamos el hecho de que las aprobaciones europeas aquí mencionadas, hablan específicamente de su uso terapéutico solo para la producción de peces y no en camarones (Cenaim informa, 2002).

Cuadro 2. Limite máximo residual para FLO establecido por la FDA, para su aplicación en medicina veterinaria

Sustancia:	Florfenicol
Marcador	Suma de florfenicol y su metabolito florfenicol amina
Especie	Peces
LMR*	1000 µg/Kg.
Tejido	Músculo y piel

* limite máximo residual

2.1.2.4. Características generales de FLO

Al igual que su antecesor, este es un antibiótico sintético de amplio espectro, igualmente relacionado con el CAP, pero de este ultimo se diferencia en dos aspectos fundamentales. La presencia de un grupo ρmetil 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). Estas características propias de FLO, lo distingue con ciertas ventajas a sus antecesores, convirtiéndolo en un antibiótico sin riesgo a la inducción de anemia aplastica en humanos.

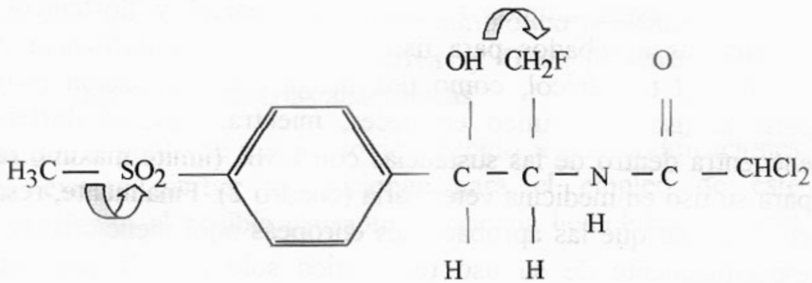

Figura 2. Estructura química del Florfenicol y sus modificaciones

El FLO es altamente soluble en lípidos lo cual se refleja en una distribución extensiva hacia los tejidos de los animales. Este antibiótico es similar en su mecanismo de acción a la del CAP, esto es, la inhibición de la enzima peptidil transferasa. Sin embargo, cepas bacterianas resistentes al CAP y TAP han demostrado, por el contrario, ser altamente sensibles a la inhibición causada por este representante fluorinado (Cenaim informa, 2202).

Su actividad *in vivo* y *in vitro* lo ha demostrado frente a algunas bacterias como: *Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida y Hemophilus somnus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Salmonella typhi y Shigella dysenteriae.*

Dentro de su aplicación en acuacultura, también ha demostrado su efectividad en el tratamiento de pseudotuberculosis (*Pasturella piscicida*),y cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*); en el tratamiento de *Edwardsiella tarda* en anguila, vibriosis en carpa dorada, y furunculosis en salmón del atlántico (Martinsen *et al* 1993). Adicionalmente se ha comprobado su efectividad en el tratamiento de *Rickettssia* (www.canal-h/antimicrobiana.htm)

2.1.2.5. Características químicas de FLO

Florfenicol, es un fluorinado derivado del Tianfenicol, tiene un peso molecular de 358.22 en forma de polvo seco, y su formula molecular es $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$.

Su punto de fusión esta entre 153 a 154°C, es una molécula neutra no ionizable en un rango de pH de 3 a 9, soluble en solventes polares inorgánicos, y ligeramente soluble en agua bajo ciertas condiciones de pH. Presenta una alta solubilidad en lípidos (Shering Plough, 1999).

Florfenicol, presenta a su ves dos metabolitos de importancia en acuacultura, ellos son: florfenicol amina y florfenicol alcohol (Horsberg *et al* 1994) (figura 3).

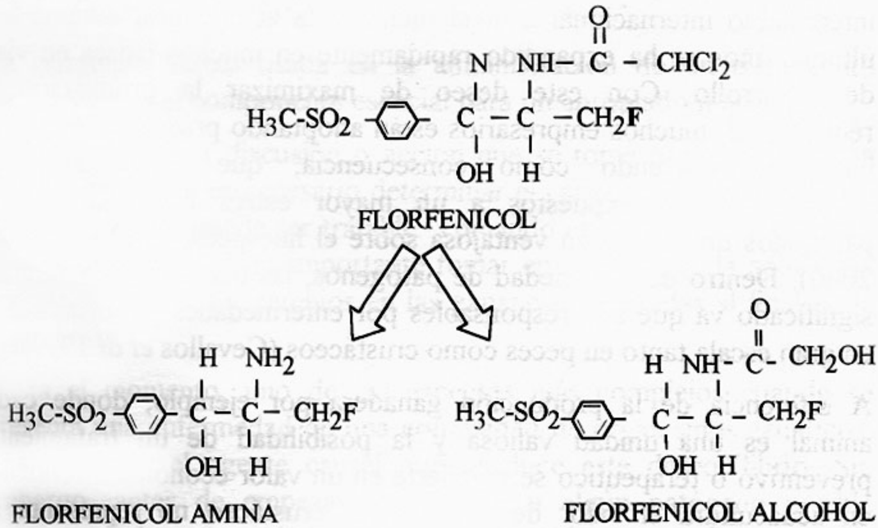

Figura 3. Estructura química de florfenicol y sus metabolitos florfenicol amina y florfenicol alcohol.

2.1.2.6. Mecanismo de acción de FLO

Florfenicol es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de la proteína, recubriendo las sub unidades ribosomales 50S de las bacterias susceptibles, permitiendo la inhibición de la peptidil transferaza; y por consecuencia previniendo la transferencia de aminoácidos para el crecimiento de las cadenas peptidicas y subsiguiente formación de proteína. El medio de acción de FLO en el interior de la bacteria patógena, es considerado el mismo tanto para cloranfenicol como para tianfenicol.

2.2. MEDICACIÓN EN ACUACULTURA

En un intento por incrementar la producción de alimentos y el intercambio internacional a nivel mundial, la acuicultura, durante los últimos años se ha expandido rápidamente en muchos países en vías de desarrollo. Con este deseo de maximizar la producción y rentabilidad, muchos empresarios están adoptando prácticas de cultivo intensivas; trayendo como consecuencia, que los organismos cultivados estén expuestos a un mayor estrés brindando a los patógenos una situación ventajosa sobre el huésped (Chythanya *et al* 2000). Dentro de la variedad de patógenos, las bacterias son de gran significado ya que son responsables por enfermedades y mortalidades en gran escala tanto en peces como crustáceos (Cevallos *et al* 1999).

A diferencia de la producción ganadera por ejemplo, donde cada animal es una unidad valiosa y la posibilidad de un tratamiento preventivo o terapéutico se convierte en un valor económico rentable, en acuacultura el valor de cada pez o crustáceo no representa la *inversión en manejos individuales veterinarios*. De esta *forma*, los tratamientos suelen realizarse sobre toda la población, ya sea tratando el agua cuando los volúmenes y las condiciones del cultivo lo permiten, o mediante dietas medicadas, técnica reconocida como la forma más práctica de suministrar antibióticos y demás drogas a animales (Alderman, 1988).

Sin embargo, a pesar de que los antibióticos han jugado un papel importante en combatir muchas enfermedades de organismos acuáticos, su uso indiscriminado dentro de la acuacultura puede causar muchos desequilibrios medio ambientales y problemas humanos (Hektoen *et al* 1995). Un uso incorrecto y prolongado de dichos antibióticos ha resultado en el desarrollo de bacterias resistentes y problemas de persistencia de residuos de antibióticos en la carne de los peces (Rawles *et al* 1997).

Es por estas razones, que para aplicar un compuesto antibacteriano, este no solamente debe inhibir a la bacteria *in vitro*, sino que también debe ser administrada en las dosis correctas y con métodos prácticos para su efectividad ya sea en el medio ambiente o en el interior del organismo (Chanratchakool *et al* 1995).

2.2.1. OBJETIVOS DEL TRATAMIENTO

La estrategia actual usada en la administración de un tratamiento terapéutico es el componente esencial para un apropiado manejo.

Previo a cualquier discusión o acción que se tome para la aplicación de un antibiótico, es necesario determinar el causal problema, es decir, si la enfermedad puede ser tratable. Tomando en cuenta el costo de un agente antimicrobial, es importante tomar en cuenta que la aplicación de este puede causar cambios en las ganancias obtenidas al final de la producción.

Hasta el momento, uno de los aspectos más complejos cuando se presenta una enfermedad en una comunidad de organismos acuáticos, es determinar el agente causal que produce este desequilibrio. Sin embargo, antes de empezar a combatir a algún patógeno posible causante de la enfermedad, es necesario examinar otros factores tales como: calidad de agua, nutrición, la introducción de antibióticos contaminados, etc. Por el contrario, si se ha determinado que ninguno de los factores mencionados anteriormente son los causantes de la enfermedad, entonces si es necesario enfocar la atención en la identificación del patógeno, seguido por una selección del tratamiento apropiado.

Para combatir diversas bacterias patogenas se han clasificado dos tipos principales de tratamientos: profilácticos y terapéuticos. Las variables q los diferencian se centran en la duración del tratamiento, la dosis del fármaco y el estado de la enfermedad (Bell, 1992).

2.2.1.1. Tratamiento Profiláctico

Este tratamiento consiste en la aplicación rutinaria de uno o varios antibióticos antes que los signos clínicos de alguna enfermedad común dentro del sistema se haga presente; por lo general este tratamiento no exige el diagnostico previo del patógeno.

La utilización de este tratamiento intenta evitar el ataque de patógenos comunes con dosis bajas de antibióticos por periodos relativamente prolongados. Además, minimiza la posibilidad de una reducción en el consumo de alimento (importante en la medicación oral) por la falta de apetito de los animales enfermos.

Sin embargo, el uso rutinario de este tratamiento le resta importancia a la verdadera necesidad y efectividad de los antibióticos, incrementando el riesgo de generar resistencia bacteriana a estos compuestos. Adicionalmente, si los resultados obtenidos no son los esperados, esta inversión realizada se podría transformar en un gasto innecesario (Bell, 1992).

2.2.1.2. Tratamiento Terapéutico

Este método depende del diagnostico preciso del agente causal de la enfermedad, seguido de un apropiado tratamiento. Una ves confirmado los signos clínicos de la enfermedad y un diagnostico positivo del agente, su protocolo consiste en el empleo de uno o varios antibióticos por lapsos cortos y en mayores concentraciones.

De esta forma, se evita la administración innecesaria de antibióticos evitando el desarrollo de cepas resistentes a los fármacos. Por otro lado, las altas concentraciones suministradas permiten una rápida acción del compuesto reduciendo la mortalidad de los organismos.

Por el contrario, debido a la exigencia de un diagnostico específico del patógeno, es posible que la aplicación del tratamiento pueda llegar a ser tardío (Bell, 1992).

2.2.2. METODOS DE ADMINISTRACIÓN

Al momento de aplicar un tratamiento terapéutico es importante identificar donde esta presente el patógeno, esto es, dentro del organismo o en el medio acuoso donde vive. En acuacultura, tanto el establecimiento de los objetivos del tratamiento, así como su forma de administración, son considerados para la aplicación del compuesto antibacterial

Actualmente existen una variedad de métodos los cuales son escogidos principalmente por su practicidad en cada uno de los diferentes sistemas de cultivo y especies más comunes con que se trabaja. A continuación se analizan las características de las principales técnicas de medicación (Herwig, 1979).

2.2.2.1. Baños

Es una práctica común en acuacultura, especialmente aplicada en cultivos de peces, siendo en algunos casos reportado su uso en el cultivo de camarones. Se caracteriza por su simpleza, fácil aplicación y baja inversión, se emplea generalmente para eliminar o reducir bacterias presentes en el agua y para la eliminación de parásitos externos e internos cuando otros métodos no son viables, por ejemplo: cuando el estadio larval del organismo a cultivar es pequeño, siendo dificultoso el suministro de una dieta oral.

Combinacion de drogas y químicos es importante considerar al momento de aplicar, ya que pueden causar efectos tóxicos al organismo enfermo. Cambios de pH en el agua deben ser tomados en cuenta, ya que pueden originar poderosos antibióticos, como también compuestos completamente inactivos.

Roque *et al* 1998, encontró dificultades al realizar baños, debido a que gran parte de la droga se pierde o lixivia con algunos compuestos presentes en el agua de mar; esto conlleva a la aplicación de más antibiótico para asegurar un buen tratamiento.

Dentro de este tipo de terapia, existen dos variantes principales: la inmersión y el reflujo.

La técnica de inmersión consiste en sumergir a los organismos en un lugar determinado del medio donde habitan, ya sea por periodos largos o cortos de tiempo, esto depende de la concentración del compuesto al que haya sido expuesto el organismo. Luego de terminado el tiempo de inmersión, los organismos son conducidos a otro ambiente independiente sin la presencia de ningún químico.

La técnica de reflujo es considerado exclusivamente para un sistema abierto de producción. La droga o medicamento es adicionado en forma concentrada en las entradas de agua, permitiendo que esta se disuelva por todo el estanque. La duración del tratamiento es regulada controlando la cantidad de agua que ingresa mientras la droga esta disuelta en el medio acuoso. Es importante considerar los patrones de flujo de agua, ya que ocasionalmente la droga pueda que no llegue a puntos muertos de la piscina creando focos infecciosos y resistencia al fármaco. Esta técnica debe ser repetida periódicamente.

2.2.2.2. Administración Parenteral

Es el método más efectivo y directo para la administración y evaluación de nuevos antibióticos, su aplicación esta destinada a estudiar la farmacocinética y biodisponibilidad del antibiótico (Lewbart *et al* 1997). Estudios realizados con diferentes antibióticos en peces (Uno, 1996; Uno *et al* 1997, Sohlberg *et al* 1994) y crustáceos (Park *et al* 1995, Chien y Chen 1996), han preferido e método parenteral debido a que, a diferencia de otros métodos permite conocer con relativa certeza la cantidad real de droga que ha sido suministrada y aprovechada por el organismo.

Sin embargo, la inyección de soluciones antibióticas es una alternativa poco común en la mayoría de los cultivos acuícolas. La cantidad y el tamaño de los organismos son factores limitantes , inclusive a pesar de trabajar con un numero pequeño de organismos, el estrés provocado por la captura y punción limita el uso de esta técnica (Herwig, 1979).

2.2.2.3. Administración Oral

La aplicación de dietas medicadas en acuacultura es una de las técnicas más comunes que nos permite suministrar la droga a grandes poblaciones sin requerir mayores modificaciones en las condiciones de cultivo, reconocida como la técnica más practica para suministrar antibiótico a organismos acuáticos (Alderman, 1988).

El empleo de esta técnica nos permite ahorrar tiempo y esfuerzo, debido a que grandes extensiones de producción se encuentran implicadas al momento de medicar, sin embargo existen ciertos inconvenientes que son importantes tomarlos en cuenta.

Al momento de suministrar el alimento medicado en el estanque este no se distribuye uniformemente entre los organismos, originando que, aquellos animales que se encuentran débiles o menos agresivos reciban poco o ninguna medicación, por otro lado, aquellos que están saludables probablemente consuman una sobre dosis del alimento. Causas de este comportamiento, se debe a que uno de los primeros síntomas que se observan en una seria infección es la falta de apetito, provocando que los organismos que encuentran más enfermos no reciban probablemente ninguna medicación. De esta forma, los organismos que requieren con mayor necesidad el alimento medicado son privados del antibiótico, mientras que, aquellos que se alimentan de sobre manera corren el riesgo de ser envenenados pudiéndoles causar la muerte.

Una de las ventajas de esta técnica, es que se puede utilizar antibióticos hidrosolubles, aunque los más recomendables son aquellos compuestos insolubles en agua debido a que estos no se lixivian con la rapidez que lo hacen los compuestos hidrosolubles. Un importante aspecto de esta técnica es la reducción de las interacciones droga-medio de cultivo, al ser aislado el antibiótico de la carga orgánica e inorgánica del agua.

Existen dos formas básicas de aplicar la droga en el alimento balanceado. Recubrir el alimento con el fármaco, o mezclar el antibiótico durante la elaboración del pellet. El primer método es factible cuando se utilizan antibióticos que son susceptibles a las temperaturas generadas en los procesos de pelletización : 75- 95°C (Cuzon *et al* 1994, Slinger *et al* 1979). La elaboración requiere principalmente de un mediador o recubridor que permita una mayor estabilidad y eficacia del antibiótico. Comúnmente se suelen utilizar diferentes aglutinantes tales como: aceite de hígado de bacalao, alginatos, gelatina, almidones, etc. Una ventaja importante de esta técnica es que la preparación del alimento medicado se puede realizar en la misma estación de cultivo, lo que permite realizar una intervención rápida frente a un evento o enfermedad. Sin embargo, las pérdidas que se originan por efectos de lixiviación del antibiótico son de gran importancia.

La segunda opción la cual consiste en la inclusión del compuesto antibacteriano durante la elaboración de la dieta es otra opción disponible. Si bien es cierto que las pérdidas por lixiviación son menores (Rigos *et al* 1999) la degradación térmica del compuesto debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante la elaboración, junto con la posible quelación del antibiótico con los compuestos presentes en la dieta (Reyes, 2000), dan como resultado una dieta medicada con concentraciones sub terapéuticas de poca eficiencia antibacterial. Adicionalmente, el tiempo y costo que representa elaborar una dieta medicada en las fabricas de balanceado, constituye una dificultad para el productor, lo cual no le impide actuar con rapidez frente a una enfermedad.

No obstante, gran parte de las investigaciones sobre el uso de antibióticos en el crecimiento de peces y camarones (Rawles *et al*

1997, Corliss *et al* 1977), así como estudios relacionados con la farmacocinética (Uno *et al* 1992) y residualidad en tejidos de peces (Somsiri *et al* 1997, Du *et al* 1995), mencionan a la administración oral, como la técnica más efectiva para suministrar antibióticos mediante dietas medicadas.

2.3. PROBLEMÁTICA DEL USO DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos al ser incorporados en la elaboración de una dieta medicada, y esta ha su ves, al entrar en contacto con el medio acuoso donde habitan los organismos, el compuesto antibacteriano presenta ciertos problemas especialmente en su concentración, por lo que es importante tomar en cuenta este aspecto si se desea realizar una medicación efectiva. La influencia de ciertos factores medio ambientales tales como: salinidad, temperatura, intensidad lumínica, formación de complejos, quelación, etc, sobre la estabilidad, efectividad y residualidad del fármaco serán tratados en este capitulo.

Adicionalmente, Rigos *et al* (1994) proponen que para realizar una exitosa terapia con antibióticos se deben considerar algunos criterios:

- El antibiótico debe ser distribuido uniformemente en el alimento balanceado administrando cantidades suficientes del compuesto, sin afectar la palatabilidad del alimento medicado.
- La droga debe ser estable en la dieta y su disponibilidad no debe ser afectada por la composición del alimento.
- La lixiviación del antibiótico debe ser insignificante antes de ser consumido por el organismo.
- La digestibilidad del antibiótico debe alcanzar niveles satisfactorios.

De esta forma, tomando en cuenta las recomendaciones mencionadas, se evitara que la pérdida del antibiótico especialmente por efectos de lixiviación contribuyan a la formación de bacterias resistentes a los fármacos.

2.3.1. CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos poseen ciertas características físico-químicas que den tomarse en cuenta la momento de ser aplicadas, ya sea en un tratamiento profiláctico o terapéutico. Dentro de las características más relevantes tenemos: fotosensibilidad y formación de complejos o quelatos.

2.3.1.1. Fotosensibilidad

La fotosensibilidad puede ser definido como el proceso en el cual un compuesto es alterado directamente por la acción de la luz visible (300 – 800 nm) o indirectamente por otro componente el cual absorbió luz. Lunestad *et al* (1995), examinaron la fotosensibilidad de 8 soluciones antibióticas en tubos de cuarzo sumergidos a un metro en agua de mar. Se determinó que la oxitetraciclina, furazolidona, ácido oxolinico y flumequina perdieron toda su actividad antibacteriana después de 21 días de exposición por efectos de la luz.

En otra investigación realizada por Samuelsen (1989), donde evaluó el proceso degradatorio de la oxitetraciclina con diferentes condiciones de luz y temperatura, determino pérdidas del 80% a 15°C y 40% a 4°C. El autor concluye, que a mas de ser la luz un factor relevante en la pérdida del antibiótico, la temperatura también juega un rol importante en la actividad antibacterial.

2.3.1.2. Formación de complejos

El agua de mar tiene una variedad de compuestos químicos entre los cuales tenemos al sodio, potasio, calcio y magnesio como los cationes divalentes de mayor importancia en el agua de mar (Pykowics y

Kester, 1971). Estos elementos químicos han sido mencionados como los posibles causantes de la inactividad de ciertos antibióticos frente a las bacterias patógenas

Se ha mencionado principalmente la capacidad de los iones Ca^{++} y Mg^{++} por su habilidad para formar complejos con los antibióticos demostrando reducida actividad antibacterial (Barnes *et al* 1995; Pursell *et al* 1995).

Goodman *et al* (1981) mencionaron que la pérdida de la actividad antibacteriana por parte de la oxitetraciclina unida con los iones Ca^{++} y Mg^{++}, 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 oxitetraciclina (OTC) en concentraciones de 0.5 a 100 ppm en agua de mar, tal solo el 5% del antibiótico se mantiene libre, debido a que el restante 95% demostró su capacidad de quelación frente a los iones calcio y magnesio presentes en el agua de mar. Tomando en cuenta estos resultados, los autores recomiendas que para la preparación de medios de cultivo destinados a evaluar las concentraciones inhibitorias de los fármacos en bacterias marinas, deben de incluir un 70% de agua salada natural, caso contrario, los resultados se subestimaran entre 4 y 32 veces.

Estudios efectuados con otros compuestos antibacterianos, realizados por Ratcliffe *et al* (1983) y Smith *et al* (1988) determinaron que el pH del agua junto con el ion magnesio, son los causantes de una baja actividad antibacterial de la flumequina (antibiótico) principalmente en rangos de pH altos. Esta indicación sugiere que la complexación entre las cargas negativas de flumequina y el ion magnesio, contribuye en los efectos inhibitorios de antibiótico.

De esta manera, es evidente que los elementos químicos presentes en el agua de mar juegan un rol importante en la efectividad de un antibiótico, por lo que es importante considerar las características del compuesto antes de entrar en contacto con e l medio acuoso.

2.3.2. DIETAS MEDICADAS

Al momento de suministrar un tratamiento terapéutico al organismo en cultivo a través de una dieta medicada, el antibiótico esta se expuesto a diferentes condiciones adversas, esto es desde la elaboración de la dieta medicada hasta el momento que entra en contacto con el agua de mar.

Aspectos tales como la palatabilidad del antibiótico, pérdidas por lixiviación y manufactura del alimento medicado, serán considerados en esta investigación.

2.3.2.1. Palatabilidad

Es conocida la disminución en el consumo de alimento por parte de las especies acuáticas al ser sometidas a cambios en el tipo de dieta. Con mayor razón aun, sucede este efecto al momento de suministrar una dieta medicada, de hecho, la reducción en el consumo de alimento puede ser mucho mas drástico que cuando se lo hace con una dieta sin antibiótico (Bell, 1992).

Algunas drogas no son palatábles, y esto puede confirmarse en especies que se encuentran en buen estado de salud, donde se observa una drástica reducción en el consumo de alimento. Samuelsen *et al* (1992) determinaron que al suministrar las drogas a través del alimento, solo un 20% del alimento medicado es aprovechado por el pez, mientras un 70-80% de la dieta no es consumida, finalizando en el fondo de las piscinas. Este efecto ha sido demostrado por Hustvedt *et al* (1991), quienes determinaron una reducción del 61% en la toma del alimento medicado con OTC por parte de la trucha arco iris.

Estudios con *Penaeus aztecus* demostraron una decreciente captación del alimento en relación a una ascendente concentración de OTC en la dieta (Corliss *et al* 1977). De la misma forma Park *et al* (1994) observaron una relación inversa entre el consumo de alimento y la concentración del antibiótico utilizando sarafloxacina en camarones *Litopenaeus vannamei*.

Frente a esta problemática, y tratando de reducir este fenómeno, Bell (1992), plantea una serie de recomendaciones:

- Detener la alimentación días antes de iniciar el tratamiento y de esa forma incrementar el apetito.
- Reducir la tasa de alimentación diaria.
- Utilizar dietas de diferente composición eligiendo aquellas con mayor grado de atractabilidad.
- Recubrir con sustancias atractactes (aceite de hígado de bacalao, de calamar, etc)con el propósito de enmascarar el efecto del fármaco.

2.3.2.2. Lixiviación

Lixiviación, proceso mediante el cual los componentes hidrosolubles de una dieta artificial se disuelven en un medio acuoso, es sin duda el mecanismo que influye en la mayor o menor presencia de residuos de antibióticos en sedimentos de piscinas camaroneras (Nygaard *et al* 1992). De esta forma, la medición de la tasa de lixiviación de las dietas es un indicativo de su calidad (Lim y 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 son los factores mencionados como causantes de las pérdidas de antibióticos durante el proceso de lixiviación en dietas medicadas. Entre ellos tenemos: temperatura, pH, la relación volumen-área del pellet (Duis *et al* 1995) y características químicas del antibiótico (Lunestad *et al* 1995; Lunestad y Goksoyr, 1990).

En forma específica, Sermwatanakul y Ounkon (1997), mencionan que el incremento de la lixiviación del antibiótico esta relacionado con el aumento del área superficial del pellet y de la salinidad.

De las publicaciones reportadas sobre el tema, la mayoría describen trabajos en donde la droga es aplicada en forma de recubrimiento, y protegida de la lixiviación mediante el uso de un aglutinante. Pearson y Charatchakool (1999), determinaron pérdidas de OTC en dietas medicadas para peces mayores 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 de sodio 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 *et al* (1999) comprobaron como el alimento balanceado 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 elaboración de la dieta (pérdida del 6%), después de haber permanecido por 3 minutos en agua salada a 24 °C. Los autores concluyen que la inclusión del antibiótico en la mezcla de los ingredientes de la dieta, origina una reducción importante en las pérdidas por lixiviación. Adicionalmente, en esta misma investigación, al realizar pruebas con temperaturas de 16°C, se observo como la lixiviación de OTC se redujo a un 42%.

2.3.2.3. Manufacturación de dietas

Un aspecto poco estudiado, pero de similar importancia al de lixiviación, son las pérdidas del antibiótico durante los procesos de manufactura en dietas medicadas. Los compuestos antibacteriales pierden su efectividad debido a la reducción del compuesto activo, ya que se presentan ciertas condiciones adversas en las cada uno de etapas de elaboración.

Dependiendo de las etapas del proceso de elaboración, el alimento pueden tener una hidroestabilidad variable o alta. Alimentos con alta hidroestabilidad, brindaran mayor protección al antibiótico cuando se incorpore en la dieta, reduciendo la lixiviación del compuesto. Por otro lado, aquellas drogas que son insolubles en agua no estarán expuestas completamente al proceso de lixiviación, mientras que, para aquellos compuestos que son solubles en agua sucede lo contrario.

Durante el proceso de manufactura, la temperatura juega un papel fundamental en cada una de las etapas de elaboración, especialmente en etapa de peletizado y secado de la dieta. Es por esta razón, que es importante considerar las características de la droga, ya que estas nos dirán si es o no sensible al calor. De esta forma, niveles de antibiótico adicionados en la dieta puede reducirse significativamente, originando dietas con concentraciones sub terapéuticas.

Por otro lado, si se conoce que la droga es altamente sensible al calor, las pérdidas pueden ser compensadas incrementando una cantidad adicional de la droga al inicio del proceso de elaboración. Otra forma de reemplazar las pérdidas es adicionando más droga después de la etapa de peletizado, es decir, en la etapa de cocción de la dieta.

Frelier (1995) explica que la degradación de los fármacos, en este caso para OTC, se debe a efectos de humedad, temperatura, presión , y tiempo de exposición al cual es sometida la droga durante la elaboración. Además, menciona como valores normales de pérdida del antibiótico entre el 10 y 40% durante la manufactura de dietas medicadas a nivel comercial.

Montoya y Toro (2000), al evaluar las pérdidas de enrofloxacina durante el proceso de elaboración de una dieta medicada comercial, determinaron que las mayores pérdidas del antibiótico se originaron durante los procesos de molido (68.7%) y expandido (57.8%), con valor promedio acumulado de pérdida del 81% al final de la elaboración de la dieta.

En otros estudios, Montoya y Reyes (2000) determinaron que las mayores pérdidas de OTC durante la elaboración de una dieta medicada en una planta piloto, se originaron en las etapas de mezclado (6.4%) y secado (13.1%), teniendo una pérdida acumulada del 18.7% al final de la elaboración.

Es importante analizar las etapas de elaboración del alimento, ya que nos brinda un amplio conocimiento a la que es sometida la droga desde el momento que es incluida en la dieta.

Así pues, sabiendo las etapas de manufactura por donde es sometido el alimento medicado, se conocerán las características físicas del pellet, tales como: estabilidad del alimento o índice de permeabilidad, granulometría, tamaño del pellet, etc. Todas estas características permitirán una mayor o menor lixiviación del antibiótico al momento de entrar en contacto con el medio acuoso.

2.4. RECUBRIDORES O AGLUTINANTES

Los aglutinantes son sustancias empleadas para incrementar la eficiencia de pellet durante los procesos de elaboración, reducir el desperdicio de partículas pequeñas y producir dietas estables capaces de mantener la forma y textura del alimento balanceado (Tacon, 1989). Aglutinantes tales como alginatos, geles, aceites, sustancias hemicelulosas, etc, son empleados con regularidad para incrementar la dureza del pellet y mantener unidas los distintos ingredientes que componen el alimento.

Sin embargo, frente a la problemática existente debido al uso de antibióticos en el cultivo de organismos acuáticos, existe la alternativa del uso de aglutinantes como recubridores del alimento medicado, los cuales en algunos casos han permitido una mayor estabilidad de antibiótico debido a la capacidad de envolver el alimento evitando las pérdidas que se originan por la lixiviación. Pocos son los reportes que mencionan su aplicación en dietas medicadas, no obstante, Duis *et al* (1995), estudiaron la lixiviación de los antibióticos OTC, ácido oxolinico, amoxicilina y sulfonamida, usando aceite de hígado de bacalao y alginato de sodio mas calcio como recubridores. Las pérdidas de los antibióticos recubiertas con aceite de pescado fueron altas, con perdidas entre 42 y 67% después de permanecer 15 minutos de inmersión. Por el contrario, cuando se utilizo alginato de sodio más calcio las pérdidas disminuyeron entre 6.3 y 24% en el mismo tiempo de inmersión.

Por otro lado, Langdon y Buchal (1998), explican que los recubridores típicamente usados como la zeina, alginatos y otras matrices coloidales, actúan con éxito en sustancias con alto peso molecular e insolubles en agua, mientras que, al usar estos recubridores para eliminar la lixiviación de compuestos de bajo peso molecular y solubles en agua, como los antibióticos, vitaminas y aminoácidos, su capacidad de retención es mínima aumentando las pérdidas por lixiviación.

Otro aspecto importante a tomar en consideración, es la concentración o cantidad de recubridor que se utilice. Reinitz (1983) considera concentraciones entre 1 y 2% del recubridor como exitosas para su aplicación evitando la lixiviación. Sin embargo, estudios realizados por Partridge y Southgate (1999), explican que concentraciones entre el 2 y 3% son las recomendadas para la retención de nutrientes esenciales, reduciendo las perdidas por lixiviación.

En la presente investigación se ha tomado en consideración el aceite de pescado, la gelatina natural y el alginato de sodio como recubridores para su evaluación en las perdidas de FLO durante el proceso de lixiviación. A continuación se describen algunas características relevantes que nos explican sus cualidades como aglutinantes.

2.4.1. GELATINA

La gelatina es una sustancia de origen animal formada por proteínas y usada en la alimentación. Se extrae de pieles, huesos y otros tejidos animales mediante tratamientos con álcalis o ácidos. Es muy fácil de digerir y aunque sea 100% proteína su valor nutritivo es incompleto al ser deficiente en ciertos aminoácidos esenciales.

La obtención de la gelatina se logra mediante la separación de las cadenas que conforman la triple hélice de la molécula de colágena. Esta separación ocurre por el rompimiento de los puentes de hidrógeno que unen a las tres cadenas de la colágena. La gelatina contiene a estas moléculas como cadenas lineales individuales. Cada cadena de la molécula de gelatina, se compone por la secuencia de amino e iminoácidos por enlaces peptídicos.

La composición de la gelatina natural sin aditivos ni conservantes, es la siguiente:

- 84 – 90% de proteína
- 1 – 2% de sales minerales
- 8 – 15% de agua

Uno de los factores más importantes a la hora de establecer la calidad de la gelatina es el grado de firmeza y fuerza del gel una ves cuajado. La gelatina seca al ponerla en contacto con un liquido lo absorbe y se hincha. Al calentar el líquido se forma un fluido coloidal, y está a medida que se enfría la viscosidad del fluido aumenta solidificándose.

Ciertas características como su alto valor biológico y nulo sabor que caracteriza este tipo de proteína, le permite su uso en numerosas aplicaciones, con especial atención en la industria alimentaría. Entre las principales funciones que desempeña la gelatina tenemos las siguientes:

Gelificar, espesar, emulsionar, retener humedad, mejorar la consistencia de alimentos, conseguir adherencia, recubrir, etc.

2.4.2. ALGINATO DE SODIO

Los alginatos son extractos de algas pardas de la clase *Phaeophycaeae*. Las principales especies usadas industrialmente son de las familias Fucáceas, Laminariáceas , Alariáceas y Lessoniáceas. Se encuentran a lo largo de las costas rocosas del Atlántico Norte, principalmente en los Estados Unidos, Gran Bretaña, Francia y Noruega.

Se trata de macromoléculas lineales constituidas por dos tipos de *monómeros unidos en (1-4): el ácido b-D manurónico* y *el ácido* a-L gulurónico. Estas macromoléculas tienen un peso molecular comprendido entre 20.000 y 200.000. La relación ponderal manurónico / gulurónico, así como el reparto de motivos a lo largo de la cadena, varían de un extracto a otro, y determinan las propiedades del polímero, especialmente su gelificación. Esto depende principalmente de la especie de alga, y en menor grado de la madurez del alga y del área de cosecha.

Los procedimientos de preparación están basados en las propiedades de solubilidad de los alginatos, según su estado iónico y su poder complejante con el calcio. Un tratamiento preliminar de las algas con un ácido, permite eliminar los iones calcio unidos al alginato. La solubilización de las macromoléculas se obtiene a continuación al neutralizar con una base (generalmente NaOH) formando una sal alcalina. El alginato se precipita por reacidificación, bajo la forma de ácido algínico o por la adición de cloruro cálcico, bajo forma de alginato cálcico. En algunos casos el calcio se elimina por un nuevo tratamiento ácido.

Los alginatos se han empleado como aglutinante junto con el carrageno en alimentos microparticulados para la nutrición en larvicultura marina, en alimentos experimentales y semi comerciales para engorde de camarones marinos y de agua dulce, y diferentes especies de peces (Cruz-Suarez *et al*., 2000).

La atractabilidad, palatabilidad, textura y estabilidad en el agua de los alimentos para camarón, son factores críticos para obtener tasas máximas de ingestión que permitan cubrir los nutrientes requeridos y lograr el máximo crecimiento, especialmente cuando los alimentos son suministrados con poca frecuencia (Cruz-Suarez *et al*., 2000).

El alginato de sodio es reconocido como un fuerte recubridor, debido a su habilidad para formar soluciones viscosas y geles en la presencia de cationes polivalentes. Mejora la estabilidad de los pellets en el agua, de tal forma que reduce las pérdidas de nutrientes y evita la contaminación del medio líquido (Spyridakis *et al*., 1988).

2.4.3. ACEITE DE PESCADO

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y los aceites son los representantes más importantes. Están formados por carbono, oxígeno e hidrógeno, y en ciertos casos pueden contener fósforo y nitrógeno. Tienen la particularidad de que son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua, de hecho, esa es la definición de lípidos: compuestos solubles en eter, cloroformo y otros disolventes no polares, pero insolubles en agua.

Además de su valor nutritivo, los lípidos contribuyen en muchos aspectos en la textura de los alimentos, sirve como vehículo de las vitaminas liposolubles e influyen en el sabor de varios productos alimenticios.

Las grasas y los aceites se clasifican como lípidos simples, y son la clase de lípidos más abundante en la naturaleza, seguidos de otros de menos importancia como las ceras, los fosfolípidos, los glucolípidos, las lipoproteínas y los ácidos grasos libres

El aceite de pescado es un triacilglicerol que se caracteriza por ser rico en ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos insaturados tienen una mayor reactividad química que los saturados debido a la presencia de dobles ligaduras. Estos ácidos predominan de los saturados, especialmente en los aceites vegetales y en las grasas de animales marinos que viven a bajas temperaturas. Su punto de fusión disminuye a medida que aumenta el grado de instauración y su sensibilidad a las reacciones de oxidación, es mayor cuanto más insaturado sea el ácido.

Generalmente los aceites que son líquidos a temperatura ambiente tienden a tener un mayor contenido de ácidos grasos insaturados que las grasas sólidas, sin embargo no es correcto decir que todos los aceites líquidos son ricos e insaturados ya que existen varias excepciones muy importantes a esta regla.

Las grasas y aceites de uso comercial en alimentos provienen de fuentes de animales y vegetales. Las primeras se obtienen de los tejidos adiposos de los animales que han sido sacrificados y procesados; estos tejidos se someten a un proceso térmico para romper las células animales y liberar la grasa. A los lípidos obtenidos directamente del animal se los denomina grasas y aceites crudos, y contienen una cierta concentración de compuestos no lípidos. Dichas sustancias que comúnmente se encuentran como contaminantes son aquellos que contribuyen al olor, inestabilidad , espumado y otros defectos de los lípidos (Dergal, 1997).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se hicieron estudios de florfenicol (FLO) en dietas artificiales con diferentes concentraciones de antibiótico y la aplicación de recubridores durante el proceso de lixiviación, además de un bioensayo. Se implantó un método para la detección consistente de florfenicol mediante HPLC (Cromatografia Liquida de Alta Performancia).

3.1. LUGAR DE REALIZACIÓN

La presente investigación se llevo a cabo en el "CENTRO NACIONAL DE ACUACULTURA E INVESTIGACIONES MARINAS" CENAIM, perteneciente a la Universidad Politécnica del Litoral (ESPOL), ubicado en el cantón Santa Elena, provincia del Guayas

3.2. COMPUESTOS QUÍMICOS

Los compuestos utilizados como agentes protectores en las dietas medicadas son los siguientes:

Gelatina sin sabor (Royal), alginato de sodio (Wake Pure Chemical Industries Ltd.), cloruro de calcio di-hidratado (WakoPure Chemical Industries, Ltd.) y aceite de pescado.

El antibiótico utilizado para la elaboración de todas las dietas medicadas es un estándar de florfenicol de alta pureza (98.5%) donado por Polidist®

3.3. DIETAS MEDICADAS

3.3.1. ELABORACIÓN

Al momento de la elaboración de las dietas medicadas en la planta piloto del CENAIM, existieron dos parámetros que se desconocían. El primero fue el porcentaje de pérdida del antibiótico (FLO) que se originaba como efecto de los procesos de manufactura, y el segundo, determinar si era necesario utilizar algún tipo de excipiente que permita una buena homogenización del antibiótico en la dieta. Dado que al momento de la elaboración de las dietas no se habían definido aún las condiciones analíticas para la determinación cromatográfica de FLO en dietas, se decidió asumir una pérdida teórica del 10%. El antibiótico fue agregado en la pre-mezcla sin la adición de ningún excipiente realizando la mezcla de este con los ingredientes de la dieta en forma lenta y progresiva tratando en lo posible de obtener una buena homogenización.

La formula base que se utilizó para las pruebas de lixiviación y el desarrollo del bioensayo correspondió a la formulación de la dieta CENAIM C40 (Cuadro 3).

Inicialmente se mezclaron todas las harinas vegetales y animales de la formulación para elaborar un total de 10 Kg de alimento. Terminada la mezcla de los mismos se procedió a pesar tres porciones de 2 Kg cada uno y una última porción de 4 Kg. Estos valores se obtuvieron estimando la cantidad de dieta requerida para cada tratamiento incluyendo a la dieta control. Finalmente se agregó la cantidad de FLO (cuadro 4) a la mezcla de los ingredientes para cada uno de los tratamientos.

A continuación se procedió a la preparación de los pellets, homogenizando en un comienzo cada una de las dietas en una mezcladora por alrededor de 10 minutos, periodo en el cual se adicionaron los elementos líquidos tales como: aceite de pescado, lecitina y agua. La masa obtenida fue pasada por dos ocasiones a través de una compactadora, este equipo oprimió la masa dándole la forma de fideos, mientras atravesaba por una matriz de 2.5 mm de diámetro. Durante el proceso de compactación, los fideos alcanzaron temperaturas de 79 ± 4.5°C. Luego se secaron las dietas por 1 hora 45 minutos a temperaturas superiores a los 100°C en un secador de granos y finalmente se trocearon manualmente en pedazos de entre 1 y 1.5 cm. De la misma forma la dieta control fue elaborada siguiendo el procedimiento descrito. Es importante mencionar que la temperatura mayor a 100°C alcanzada en el secador de granos, se debió a fallas producidas por el equipo, el cual se encontraba en mal estado durante la elaboración de las dietas.

Cuadro 3. Composición de la fórmula base para las dietas experimentales (CENAIM C40)

Materiales	g/100 g de dieta
Harina de pescado	28.72
Pasta de soya	20.16
Polvillo de arroz	5.00
Gluten de trigo	5.00
Aceite de pescado	4.95
Lecitina líquida	1.00
Mezcla vitamínica *	1.00
Mezcla de minerales *	2.00
Aglutinantes	1.00
Antioxidante	0.002
Antihongo	0.07
Maicena	31.99

Tomado de: Departamento de nutrición CENAIM

*Marca ROCHE

Cuadro 4. Cantidad de dieta elaborada para cada concentración con el correspondiente peso del antibiótico adicionado

Dietas	Conc. nominal (ppm FLO)	Cantidad de alimento (Kg)	Cantidad de FLO (mg)
L 1	50	2.0	110
L 2	100	4.0	440
L 3	200	2.0	440
P-150	150	2.5	500
Lc (Control)	-	2.0	-

Establecidas las condiciones analíticas para la determinación de FLO mediante HPLC en dietas medicadas, el análisis de las mismas, demostraron que las pérdidas del antibiótico por efecto del proceso de manufactura eran superiores a las esperadas. Por este motivo se determinó realizar una dieta adicional (P-150) a las tres ya mencionadas, misma que sería utilizada en el bioensayo de palatabilidad, para el efecto se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. El análisis en contenido de FLO de la dieta P-150 arrojo como resultado una concentración final de 150 mg de FLO/ Kg dieta

3.3.2. PÉRDIDAS POR PROCESO DE MANUFACTURA

Para estimar las pérdidas de FLO en cada una de las etapas del proceso de manufactura, así como la pérdida acumulada durante la elaboración de las dietas, se tomaron muestras de aproximadamente 25 g por triplicado en cada una de las etapas del proceso de elaboración (figura 4). Cada una de las muestras fueron analizadas en su contenido de FLO mediante HPLC.

Las muestras fueron guardadas en fundas, saturadas con nitrógeno y mantenidas a –20°C hasta ser analizadas.

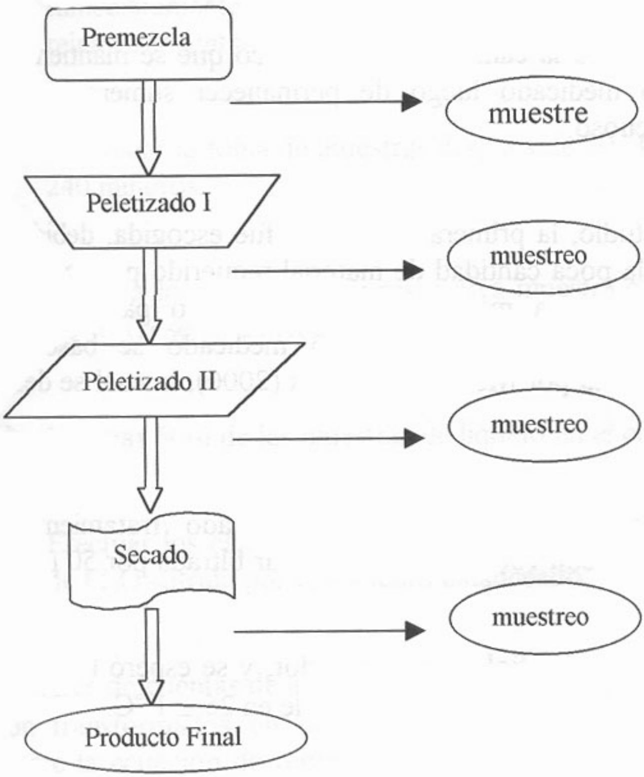

Figura 4. Diagrama de toma de muestras en cada una de las etapas de elaboración del alimento medicado

3.3.3. PÉRDIDAS POR LIXIVIACIÓN EN DIETAS MEDICADAS

La lixiviación, proceso mediante el cual el componente hidrosoluble de una dieta medicada se disuelve en un medio acuoso, puede ser cuantificado mediante dos métodos:

a) Determinando la concentración de la droga presente en el agua debido a la disolución del fármaco, y/o
b) Cuantificando la cantidad de antibiótico que se mantiene en el alimento medicado luego de permanecer sumergido en un medio acuoso.

Para nuestro estudio, la primera alternativa fue escogida, debido a su practicidad y a la poca cantidad de material requerido para cuantificar el antibiótico. De esta manera, el procedimiento para evaluar la pérdida del antibiótico en el alimento medicado se basó en la metodología descrita por Montoya y Reyes (2000), la cual se describe a continuación:

- Fiolas de 125 ml de capacidad (triplicado /tratamiento) son adicionadas con 100 ml de agua de mar filtrada por 50 µm.

- Se colocaron las fiolas en el agitador, y se esperó hasta que la temperatura del baño María se regule en 25 ± 1°C.

- Aproximadamente se utilizó 1.0 g de dieta por fiola

- Homogenizar manualmente el tamaño de los pellets (1 – 1.5 cm) y agregarlos a cada una de las fiolas

- Encender el agitador y ajustarlo a 70 RPM.

- 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 y recogerla en un vial ámbar.

- Inmediatamente después de concluir con el primer muestreo, reiniciar la agitación.

- Continuar la toma de muestras después de 30, 45, 60, 90, 120 y 240 minutos.

- Guardar los viales con su respectiva muestra en refrigeración a - 5 °C (si se va a inyectar en pocas horas)

- Inyectar 50μl de las muestras de líquido en el cromatógrafo

- Efectuar los cálculos para cuantificar la pérdida por lixiviación de FLO sufrida por el alimento balanceado

Los valores de cuentas de área obtenidos por el integrador del sistema, fueron transformados en un valor de concentración (μg FLO/ml) mediante la ecuación de regresión lineal obtenida a partir de la curva de calibración para el antibiótico (ver ítem 4.5.2).

Obtenido el valor de la concentración se procedió con los siguientes cálculos de acuerdo a las formulas establecidas:

$$\boxed{\text{Conc.}_{\text{FLO (agua)}} = \text{FLO}_{\text{(agua)}} * V}$$

Así:

Conc. $_{FLO\ (agua)}$ = Cantidad de FLO desprendida de la muestra de alimento (μg)

$FLO_{(agua)}$ = Concentración de FLO en la muestra de agua (μg/ml)

V = Volumen de la fiola antes de tomar la muestra (ml)

$$P_L = [\text{Conc.}_{FLO\ (agua)} / C._{pellet} * A] * 100$$

Así:

PL = Porcentaje de FLO desprendido en el agua por lixiviación

$C._{pellet}$ = Concentración real de FLO en la dieta (mg FLO/g)

A = Peso de muestra de alimento (mg)

Es de común conocimiento que al aplicar un tratamiento terapéutico usando dietas medicadas con antibióticos hidrosolubles, éstos, al entrar en contacto con el agua, tienden a disolverse en el medio acuoso mediante el proceso de lixiviación.

Frente a esta problemática existe la alternativa del uso de aglutinantes o recubridores. Estos han permitido, en algunos casos, una mayor estabilidad del antibiótico durante el proceso de lixiviación.

En el presente trabajo se evaluó el comportamiento que pueden ejercer los recubridores para aminorar las pérdidas de FLO al entrar en contacto con el agua de mar; adicionalmente, se analizó el efecto que pueden originar estos sobre la palatabilidad del alimento medicado en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*.

FOTO : EQUIPO DE BAÑO MARIA (Aplicado en pruebas de lixiviación)

A continuación se describen los trabajos a evaluar:

3.3.3.1. Lixiviación: Efecto de concentración (FLO)

Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración del antibiótico sobre las pérdidas por lixiviación, se analizaron las dietas L1, L2, L3 y LC (ver cuadro 4) recubiertas solo con aceite de pescado. La inclusión del recubridor en las dietas fue al 5% (p/p). Su aplicación se realizo mediante un surtidor spray el cual permitió distribuir el aceite de pescado por toda la dieta, luego mediante agitación, semejante al movimiento de un tambor se logró obtener un completo homogenizado del recubridor en la dieta. Finalmente fue secada a 60°C por 45 minutos.

3.3.3.2. Efecto de agentes protectores sobre la lixiviación y palatabilidad en dietas medicadas

Las dieta medicada tomada a consideración para esta investigación fue únicamente la dieta L2 (100 ppm). Los agentes protectores aplicados fueron: aceite de pescado, alginato de sodio más cloruro de calcio di-hidratado y gelatina sin sabor, respectivamente. De esta manera, se originaron los tratamientos descritos en el cuadro 5:

Cuadro 5. Agentes protectores aplicados en dieta L2 (100ppm)

Composición	Recubrimiento
Alimento + FLO 100 ppm	Gelatina
Alimento + FLO 100 ppm	Alginato sodio + Ca^{++}
Alimento + FLO 100 ppm	Aceite de pescado
Alimento + FLO 100 ppm	(sin recubrimiento)

La cantidades utilizadas en el proceso de aplicación para cada recubridor en la dieta medicada se describe a continuación:

- Aceite de pescado: se adicionó aceite de pescado en la dieta al 5% p/p (15g/300g dieta)

- Alginato de sodio: se preparó una solución al 2% de alginato de sodio (p/v) con agua grado HPLC y se adicionó 47.8 g de la solución por cada 300 g de dieta. Además se agregó cloruro de calcio di-hidratado ($Cl2Ca\ 2H2O$) a razón de 8 g por cada 100 g de dieta.

- Gelatina: se preparó una solución al 5% de gelatina (p/v) con agua grado HPLC y se adicionó 47.81g de la solución por cada 300 g de dieta

Al momento de agregar los recubridores en la dieta, este fue adicionado mediante un surtidor a manera de spray en envases de plástico junto con la dieta, tratando que sea distribuido aleatoreamente y agitando manualmente asemejando al movimiento de un tambor, hasta observar una distribución homogénea del recubrimiento. Luego fueron dejadas en reposo aproximadamente 10 minutos y a continuación fueron secados a 60°C por 45 minutos.

3.4. BIOENSAYO

El bioensayo fue dirigido a estudiar el efecto de tres recubridores: aceite de pescado, alginato de sodio más calcio y gelatina, sobre la palatabilidad de dietas medicadas con FLO aplicadas a un tratamiento terapéutico en juveniles de *Litopenaeus vannamei*, incluyendo además un tratamiento de la misma dieta medicada sin recubrimiento

FOTO : SIFONEO DEL ALIMENTO NO CONSUMIDO DE LOS ESTANQUES (control). La denominación para cada tratamiento se especifica en la cuadro 6.

El experimento tubo un periodo de duración de 14 días, tiempo en el cual se aplicaron los cuatros tratamientos descritos; alimentando diariamente hasta completar las dos semanas de experimentación

La concentración utilizada en la dieta medicada fue de 150 ppm de FLO/kg alimento, correspondiendo a dosis terapéuticas recomendadas para su uso en camarones Litopenaeus vannamei.

Cuadro 6. Tratamientos aplicados durante el bioensayo de 14 días en juveniles *Litopenaeus vannamei*.

Tratamiento (Dieta P-150)	Denominación
Gelatina	A
Aceite de pescado	B
Control	C
Alginato de sodio + calcio	D

3.4.1. SISTEMA

El sistema constó de 24 acuarios rectangulares de plástico, divididos en 6 grupos de 4 acuarios cada grupo, con un volumen operativo de 50l, y un área de 0.18 m^2.

El efecto de cada recubrimiento se evaluo por sextuplicado, de esta forma los acuarios se ubicaron en seis bloques de cuatro acuarios cada uno, recibiendo aleatoriamente cada bloque uno de los cuatro tratamientos (figura 5).

Dentro de las condiciones experimentales cada acuario constó de: una línea de entrada de agua salada para obtener un recambio del 100% diario y mantener la calidad de agua en condiciones normales, un drenaje vertical superficial mantuvo constante el nivel de agua y una línea de aire con una piedra difusora al final. Adicionalmente se colocó una malla que recubría cada uno de los acuarios impidiendo el escape de los animales y el salto de estos entre acuarios.

El agua de mar (filtrada) utilizada para la alimentación del sistema de acuarios, se ubicó en un reservorio (2 m^2) manteniendo el agua a temperatura ambiente. Este brindaba abastecimiento constante a cada acuario, evitando las fluctuaciones de temperatura por efecto del recambio.

El sistema constó de 24 acuarios rectangulares de plástico, divididos en 6 grupos de 4 acuarios cada grupo, con un volumen operativo de 50l, y un área de 0.18 m^2.

El efecto de cada recubrimiento se evaluó por sextuplicado, de esta forma los acuarios se ubicaron en seis bloques de cuatro acuarios cada uno, recibiendo aleatoriamente cada bloque uno de los cuatro tratamientos (figura 5).

Dentro de las condiciones experimentales cada acuario constó de: una línea de entrada de agua salada para obtener un recambio del 100% diario y mantener la calidad de agua en condiciones normales, un drenaje vertical superficial mantuvo constante el nivel de agua y una línea de aire con una piedra difusora al final. Adicionalmente se colocó una malla que recubría cada uno de los acuarios impidiendo el escape de los animales y el salto de estos entre acuarios.

El agua de mar (filtrada) utilizada para la alimentación del sistema de acuarios, se ubicó en un reservorio (2 m^2) manteniendo el agua a temperatura ambiente. Este brindaba abastecimiento constante a cada acuario, evitando las fluctuaciones de temperatura por efecto del recambio.

El fotoperiodo aplicado durante el desarrollo del bioensayo correspondió a: 12 hrs. luz, 12 hrs. oscuridad.

3.4.2. ANIMALES

Juveniles de *Litopenaeus vannamei* fueron cedidos por CENAIM gracias a la colaboración de la srta. Martha Maldonado, estudiante de maestría de CENAIM-ESPOL quien realizó el levantamiento de los organismos desde el estadio de post larva en tanques exteriores de 500 toneladas. Hasta el momento de la captura, los organismos no habían recibido ningún tratamiento terapéutico como parte del manejo de engorde. Durante la siembra, un total de 9 animales / acuario fueron pesados individualmente y seleccionados en base a su peso. Camarones entre 0.8-1.5 g fueron seleccionados, obteniéndose un peso promedio inicial de 1.1 ± 0.05 g.

Durante tres días de aclimatación a las condiciones del set experimental, los animales fueron alimentados *ad libitum* con la dieta experimental CENAIM C40 libre de antibiótico

3.4.3. ALIMENTACION

Para el periodo de aclimatación los organismos fueron alimentados únicamente con la dieta D (sin antibiótico), y durante el desarrollo del bioensayo se utilizaron las dietas A, B, C y D

Durante el tratamiento terapéutico, el calculo de la dosis diaria de alimentación se basó en la biomasa presente por acuario, considerándose para los cálculos de alimentación un 10% de la misma. La ración diaria fue dividida en dos porciones iguales, suministrándose a las 8h30 y 16h30.

Diariamente se hicieron correcciones de la cantidad de alimento a suministrar por acuario considerándose para este cálculo el número de animales presentes por acuario y asumiéndose un crecimiento de un gramo por semana para los organismos presentes en los diferentes tratamientos.

Previo al inicio del bioensayo, se pesaron y enfundaron porciones suficientes de alimento para cada tratamiento. El alimento fue pesado diariamente para cada tratamiento y la porción restante fue conservado en refrigeración a –5°C para mantener la calidad del mismo.

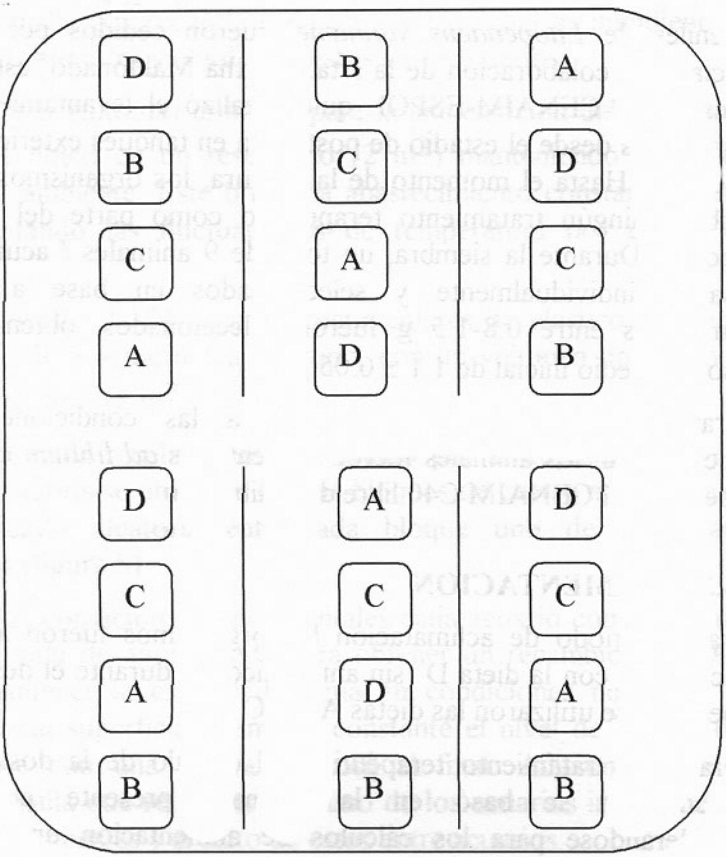

Figura 5. Diagrama del diseño experimental del bioensayo

3.4.4. PROTOCOLOS

Durante el ensayo, se determinaron parámetros abióticos tales como: temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto; junto a estos se evaluaron supervivencia, frecuencia de muda y consumo de alimento, que servirán para la interpretación de los resultados obtenidos a partir del bioensayo.

Los procedimientos utilizados para el registro de los mismos se detallan a continuación:

3.4.4.1. Parámetros abióticos

Durante los 14 días del bioensayo se monitorearon diariamente los parámetros físico-químicos como son: temperatura, salinidad, pH y oxígeno, realizando las lecturas en horarios de 8h00 y 16h00.

La medición de temperatura se realizó mediante un termómetro de mercurio, el oxigeno disuelto fue medido con un oxigenómetro de campo (YSI 85/12 FT), y la salinidad se verificó con un refractómetro de mano (ATAGO S/MILL-Japones). La medición de pH se la realizó con un medidor de pH de laboratorio. Para este efecto muestras de agua fueron transportadas y registradas en su valor de pH en el laboratorio utilizando el equipo TOA HM-5S.

3.4.4.2. Supervivencia

Con la finalidad de verificar la presencia de animales muertos y así determinar la supervivencia en los acuarios, diariamente se monitoreo visual e individualmente cada acuario.

El número de animales vivos presentes por cada acuario fue la referencia para los cálculos de la ración diaria de alimento

3.4.4.3. Consumo de alimento

Para determinar la cantidad de alimento consumido por camarón, diariamente se realizó el sifoneo de los tanques recuperándose la dieta balanceada sobrante de la tarde anterior y de la primera dosis

FOTO : CANASTILLAS UTILIZADAS PARA DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTO evaluar la cantidad de animales mudados contando el numero de *rostrums* recuperados en el sifoneo.

3.5. DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL (FLO) VÍA HPLC

El método analítico implantado para la determinación cualitativa y cuantitativa de florfenicol (FLO) mediante HPLC, incluyó una serie de pasos entre los cuales tenemos: muestreo, almacenaje, extracción y análisis.

Las condiciones operativas del sistema para la determinación de FLO vía HPLC, fueron extrapoladas del método original descrito por Schering-Plough (2000). Metodologías de extracción para FLO descritas por Nagata y Saeki (1992) y Hormazabal *et al* (1993), fueron analizadas y comparadas en su cuantificación de FLO.

3.5.1. EXTRACCIÓN DE FLO

3.5.1.1. Equipos

- Biohomogenizador (Janke & Kunkel-Ultra Turrax T25)
- Centrífuga refrigerada (Kokusan H-2000 B)
- Sistema de evaporación al vació (Büchi RE 111, Sibata)
- Balanza analítica Mettler AE-240 (0.00001 g)
- Sonicador Branson 5200
- Congelador – 20°C (NIHON BIO Freezer)

3.5.1.2. Reactivos

- Acetona grado HPLC (Mallinckrodt Baker)

- n- hexano grado HPLC (Kanto chemical Co., Inc., Japon)
- Agua grado HPLC (Milli Q)
- Estándar de florfenicol (Polidist®)

3.5.1.3. Materiales

- Tubos de centrífuga con tapa rosca (40 y 25 ml)
- Peras de vidrio (50 ml)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas y volumétricas
- Viales ámbar con tapa rosca y sello de teflón (2.5 ml)
- Filtros (0.45µm)
- Jeringas descartables de 1ml

3.5.1.4. Solvente de extracción

Debido a que no se contaba con un método establecido para la extracción de FLO a partir de dietas medicadas para camarones, se procedió a investigar los procedimientos publicados. Luego de contar con unos pocos métodos, se observo que la principal variante entre metodologías se centraba en el solvente de extracción.

De esta forma, previo a la definición del solvente de extracción más apropiado para la obtención de FLO a partir de alimento balanceado medicado, se probaron dos tipos de solventes de extracción que se detallan a continuación:

- Etil Acetato (Nagata y Saeki, 1992), y
- Acetona grado HPLC (Hormazabal *et al* 1993)

La elección del solvente más apropiado para la extracción de FLO, se baso principalmente en los siguientes aspectos:

- Facilidad de trabajo con el extracto de la muestra.
- Obtención de un extracto limpio, que demuestre una ves inyectada la muestra en el cromatógrafo, un pico limpio y libre de impurezas que pudieran interferir en su cuantificación.

3.5.1.5. Procedimiento

La metodología escogida para la extracción de FLO a partir de alimento medicado para camarones, fue un modificado del método descrito por Hormazabal *et al* (1993) para la extracción de FLO en tejidos de peces mediante HPLC. Como se mencionó anteriormente, la única variable entre los métodos descritos fue el solvente de extracción.

Un aproximado de 500 g de dieta terminada y/o pre-mezclas de las dietas descritas en el capitulo anterior (cuadro 4) fueron colectadas para su respectivo análisis en contenido de FLO.

Luego de la toma de muestras aquellas que no pudieron ser analizadas inmediatamente fueron conservadas a –5°C. Antes del inicio del análisis se estabilizó la temperatura de las muestras (temperatura ambiente) y luego se procedió a seguir con la metodología descrita a continuación:

- Pulverizar el alimento balanceado con la ayuda de un mortero y tamizarlo a través de una malla de 500 µm.

- Pesar aproximadamente 100 mg de muestra en una balanza analítica Mettler AE-240 (0.00001 g) y colocarla en un tubo de centrífuga de 40 ml.

- Agregar 10 ml de solvente de extracción (acetona, grado HPLC) al tubo de centrífuga con la muestra.
- Proceder a la extracción mediante el uso de un biohomogenizador durante 1 minuto a 13500 rpm manteniendo la temperatura baja con hielo.
- El homogenizado resultante dejar en reposo por 10 minutos y luego proceder a centrifugar durante 10 minutos a 5000 rpm manteniendo la temperatura a 4°C mediante la centrífuga refrigerada.
- Recoger el sobrenadante en un frasco pera (50 ml) previamente rotulado.
- Agregar 7 ml de solvente de extracción (acetona grado HPLC) al remanente de la muestra original y biohomogenizar durante 1 minuto a 13500 rpm , a 4°C para extraer cualquier residuo de FLO presente aun en la muestra.
- Recoger el sobrenadante y unirlo al obtenido en la primera extracción.
- Rotaevaporar la totalidad de la solución contenida en la pera a temperatura inferior a 40°C.
- Rediluir el remanente de la pera mediante dos lavados con fase móvil de 5 ml c/u. Mediante sonicación ayudar a la disolución del fármaco presente en la pera después de cada lavado y

verter el extracto obtenido en un nuevo tubo de centrífuga (25 ml).

- En los extractos colectados aplicar dos lavados de 3 ml c/u de n-hexano y mezclar vigorosamente durante 10 segundos.

- Centrifugar el contenido durante 2 minutos a 4°C y 5000 rpm.

- Desechar la capa orgánica junto con cualquier otro residuo presente en el extracto.

- Tomar 2 ml del extracto con una jeringa descartable de 1 ml y pasarlo por un filtro descartable de 0.45 µm.

- Recoger el filtrado en un vial ámbar con tapa rosca de teflón y conservarlos a –5°C hasta su análisis mediante HPLC.

- Inyectar 50 µl del extracto.

3.5.1.6. Recuperación del método de extracción

El porcentaje de recuperación, es un valor que define la capacidad extractiva que tiene el método.

El porcentaje de recuperación del método de extracción se determinó *mediante la técnica conocida como* "spike". Mediante este *método*, una concentración conocida de antibiótico es añadida a una matriz (muestra), los resultados del análisis de extracción de la misma son comparados con la concentración original conocida, determinándose de esta forma el porcentaje de recuperación.

Para este estudio se tomaron seis replicas en la etapa de pre-mezcla de una dieta elaborada en planta piloto de CENAIM cuya concentración teórica fue de 110 ppm de FLO.

El porcentaje de recuperación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\boxed{PR = FLO_f / (FLO_i / V_e) * 100}$$

Así:

PR = Porcentaje de recuperación

FLO_i = Cantidad de FLO adicionada a la muestra antes de la extracción(µg).

FLO_f = Concentración de FLO en el extracto (µg/ml)

V_e = Volumen del extracto (ml)

3.5.1.7. Presencia de picos endógenos

Este procedimiento consiste en verificar la presencia de alguna señal medible generada por la matriz de la muestra libre de antibiótico, dentro del mismo rango del tiempo de retención de FLO que podría interferir en su cualificación y cuantificación cromatográfica.

Para su determinación se realizaron análisis extractivos (n = 3) en dietas suplementadas con antibiótico (FLO) y sin antibiótico para determinar la presencia de picos endógenos en la matriz.

3.5.2. ANÁLISIS DE FLO VÍA HPLC

Previo a la determinación de las condiciones analíticas del equipo, se verificó primero la capacidad del sistema para la detección y

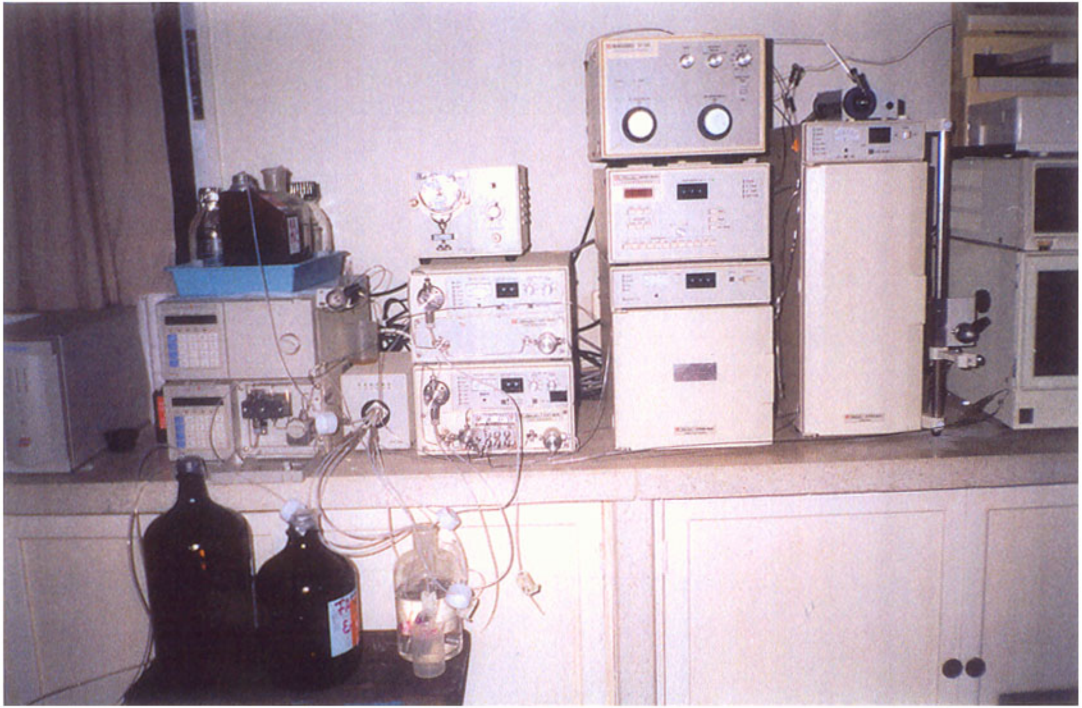

FOTO : SISTEMA MODULAR DE HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performancia) separación de FLO, empleando la fase móvil descrita por Schering Plough (2000).

El desarrollo de este trabajo, consistió en pruebas de ensayos inyectando diferentes concentraciones del analito, teniendo como segundo objetivo la obtención de un cromatograma donde el pico generado por FLO se graficara de forma adecuada y sin la interferencia de picos endógenos de la muestra del antibiótico.

Una ves determinada la presencia del analito, se procedió a definir las condiciones operativas del sistema tomando en consideración las establecidas por Shering Plough (2000).

3.5.2.1. Equipos

Sistema de cromatografía líquida HPLC con inyector manual esta constituido de:

- Bomba LC-10AT Shimadzu
- Inyector manual Rheodyne 7725i, con un bucle de 50 ml
- Detector UV/VIS SPD-6AV Shimadzu
- Columnas Shim-pack CLC-ODS de 15 cm de longitud y diámetro interno de 0.6 cm, ubicadas en serie
- Horno CTO-6A Shimadzu (ubicación de columnas)
- Integrador/ registrador Shimadzu C-R4A

3.5.2.2. Reactivos

- Ácido acético glacial 100% (E. Merck, Darmstaldt, Alemania)
- Acetonitrilo grado HPLC (E. Merck, Darmstaldt, Alemania)
- Agua grado HPLC

3.5.2.3. Materiales

- Sistema de filtración al vacío (Kitasato)
- Membranas filtrantes de 0.45µm
- Microjeringa (250µl)
- Material de vidrio (pipetas graduadas, balón volumétrico y probeta)

3.5.3. CONDICIONES OPERACIONALES DE HPLC

3.5.3.1. Flujo

Para el análisis de FLO un sistema de flujo isocrático, es decir, donde el flujo de la fase móvil es constante durante todo el análisis, fue aplicado. Este se fijo en 1 ml/min.

3.5.3.2. Presión

La presión originada por el flujo de la fase móvil en el sistema originó valores entre 93 y 95 Kgf/cm^2. Estos valores se mostraron estables en el sistema una ves establecidas las condiciones analíticas.

3.5.3.3. Temperatura

La temperatura del horno, donde permanecieron las columnas fue de 32°C. Este valor fue bastante constante durante todo el análisis de FLO, mientras la temperatura ambiental se mantuvo a 28 ± 1°C.

3.5.3.4. Longitud de onda

Para lograr la detección de FLO mediante el espectofotómetro UV-VIS (luz ultravioleta y rango de luz visible), este fue fijado a una longitud de honda de 224 nm.

FOTO : SISTEMA INTEGRADOR – REGISTRADOR DEL HPLC

3.5.4. PREPARACIÓN DE FASE MOVIL

La fase móvil utilizada fue la descrita por Schering Plough (2000). Su preparación se describe a continuación:

Preparación: La fase móvil esta compuesta de tres componentes: acetonitrilo (grado HPLC), agua grado HPLC y solución ácido glacial al 10% v/v (disolución de 10 ml de ácido acético glacial en 90 ml de agua grado HPLC).

- Mezclar los tres componentes en una probeta de vidrio en una relación 100:197:3 de acuerdo al orden mencionado anteriormente. Es importante agregar lentamente cada uno de los compuestos evitando la formación de un precipitado.

- Filtración: Preparada la fase móvil, esta debe ser pasada por un filtro de 0.45 µm

- Desgacificación: Un aspecto importante es la correcta desgacificación y sonicación de la solución. El sonicador emite ondas de baja frecuencia que desprende los gases disueltos en la solución junto con una bomba de vació. Es necesario tomar en cuenta que después de que la fase móvil ha sido filtrada esta no debe ser expuesta al vació ya que puede provocar cambios en la concentración de cada uno de sus componentes.

3.5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.5.5.1. Preparación de soluciones stock y estándares

Para la preparación de las soluciones stock como para porcentaje de recuperación se utilizo un estándar de FLO de alta pureza (99.8%) el cual fue donado por la compañía Polidist®.

Para la preparación de la solución stock se pesaron 3.2 mg de FLO en una balanza analítica Mettler AE-240 (0.00001 g) y se disolvieron en un matraz color ámbar con 10 ml de fase móvil (0.32 mg FLO/ml). Luego se realizó una segunda dilución tomando 1 ml de la solución anteriormente preparada y llevándolo a 10 ml con fase móvil (32µg FLO/ml).

A partir de la solución stock se prepararon las diluciones necesarias para obtener las soluciones estándares que sirvieron para la elaboración de la curva de calibración. Se determino utilizar no menos de 6 puntos para evaluar la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta generada por el detector (n=3).

Para una mejor detalle de lo realizado se detalla a continuación (cuatro 7):

Cuadro 7. Preparación de soluciones estándar a partir del stock de concentración 32 ppm para la curva de calibración

Concentración de sol .estándar (ppm)	*Volumen de solución stock*	*Vol. fase móvil adicionado*	*Volumen final (ml)*
3.2	100 µl	900 µl	1
1.6	100 µl	1900 µl	2
0.8	50 µl	1950 µl	2
0.4	1 ml st 0.8	1 ml	2
0.2	1 ml st. 0.4	1 ml	2
0.1	1 ml st. 0.2	1 ml	2
0.05	1 ml st 0.1	1 ml	2

3.5.5.2. Límite de detección

Para que la técnica establecida tenga validez en la detección de concentraciones bajas de FLO en una dieta medicada, esta debe ser capaz de detectar los niveles más bajos de antibiótico presente en las dietas medicadas aplicadas en campo.

De acuerdo al concepto cromatográfico de limite detección, corresponde a la menor concentración del analito que puede detectarse en las condiciones establecidas. Su determinación se efectúa por comparación de un estándar con la respuesta de un blanco, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 3.

3.5.5.3. Límite de cuantificación

El limite de cuantificación corresponde a la menor concentración del analito que puede detectarse con precisión y exactitud en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (ppm, ppt, %). Esto se determina inyectando concentraciones del analito, inferiores a la concentración mínima que pudo detectarse con precisión y exactitud en el sistema. Si la señal generada por el detector del pico de cada concentración es igual para todas las concentraciones menores, entonces estamos bajo nuestro limite de cuantificación.

3.5.6. CALCULO DE FLO PRESENTE EN LAS MUESTRAS

Para determinar la concentración de FLO presente en la dieta, se requiere primero el empleo de la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración (descrita en resultados) que transforma el dato de cuentas de área en un valor de concentración (μg/ml) antibiótica en el extracto. Luego de obtener este valor se aplica la siguiente formula para obtener el resultado de concentración de FLO presente en la muestra original:

$$\boxed{FLO_{muestra} = (FLOf / M * Ve) / PR}$$

Así:

$FLO_{muestra}$ = Concentración de FLO en la muestra original (ppm o µg/ml)

FLO_f = Concentración de FLO en el extracto (ppm o µg/ml)

M = Peso de la muestra utilizada en el proceso de extracción (g)

V_e = Volumen del extracto (ml)

PR = Porcentaje de recuperación

3.6. ANÁLISIS ESTADISTICO

Los datos generados por las pruebas de pérdidas por procesos de manufactura, pérdidas por lixiviación, efecto de recubridores sobre el consumo de alimento, fueron analizados mediante análisis de varianzas (ANOVA, Software Mstatc). El límite de confianza empleado fue de $P \leq 0.05$. La identificación de diferencias entre tratamientos se lo realizó utilizando Duncan's Test

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE CONCENTRACIÓN (50, 100 Y 200 PPM DE FLO) SOBRE LAS PÉRDIDAS POR LIXIVIACIÓN DE FLO EN DIETAS RECUBIERTAS SOLO CON ACEITE DE PESCADO AL 5% (P/P)

En el cuadro 8 se indican los valores en porcentajes lixiviados de FLO presente en dietas expuestas a diferentes tiempos. Los análisis estadísticos para los tiempos 15 y 30 de exposición en el agua de mar, con concentraciones de 50, 100 y 200 ppm de FLO no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$). En cambio, para el resto de tiempos de exposición, únicamente la concentración de 50ppm resultó ser significativamente diferente respecto a las concentraciones de 100 y 200 ppm.

Puede observarse (cuadro 8) que las pérdidas de FLO fueron mayormente evidentes durante los primeros 30 minutos en las tres concentraciones usadas, reduciéndose a casi la mitad para todas las concentraciones las pérdidas hasta el final del ensayo. Considerando que las pérdidas fueron similares en las tres concentraciones, la concentración de 50 ppm puede ser la mayormente indicada para usarse usando en este caso aceite de pescado como recubridor.

Este *recubridor natural*, ha sido *experimentalmente usado con* oxitetraciclina (OTC), determinándose una pérdida en los primeros 15 minutos de 50.7 % usando una concentración de 7.5 mg de OTC por gramo de pellet (Duis *et al* 1995). En comparación con este ensayo que se usó 0.05, 0.1 y 0.2 mg de FLO por gramo de pellet, las concentraciones fueron adecuadas para que el aceite de pescado pueda retener con mayor efectividad si se usan bajas concentraciones.

Cuadro 8. Valores calculados en porcentajes de pérdida por lixiviación de FLO usando tres concentraciones y siete tiempos de exposición.

	Tiempo de exposición en minutos						
Concentración de FLO (ppm)	15	30	45	60	90	120	240
50	12.1a	23.4 a	30.0 b	35.7 b	42.0 b	50.9 b	61.4 b
100	8.3 a	25.9 a	33.6 a	40.4 a	49.3 a	57.9 a	68.9 a
200	8.8 a	25.1 a	33.8 a	40.2 a	51.6 a	59.3 a	71.0 a

Letras distintas en la columna correspondiente a cada tiempo de exposición, indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \leq 0.05$ y n =3 replicas)

Estudios similares en dietas medicadas para camarones con concentraciones de 3 y 5 g de OTC/ Kg de dieta, determinaron pérdidas del 29.6 % durante los primeros 30 minutos de exposición recubriendo los pellets solo con aceite de pescado al 3% v/p; mientras que, al disminuir la concentración del recubridor al 1% v/p, las pérdidas aumentaron al 53.9% en el mismo tiempo de exposición (Pearson y Charatchakool, 1999).

En comparación con esta investigación, donde las concentraciones de FLO fueron pequeñas, conlleva a pensar que los porcentajes de lixiviación de FLO fueron independientes de la concentración antibiótica en las dietas, siendo importante considerar que la concentración del recubridor, en este caso aceite de pescado al 5% v/p, tuvo mayor capacidad efectiva de retención, disminuyendo la lixiviación del antibiótico.

Las pérdidas por lixiviación de FLO, se originaron por el desprendimiento uniforme del medicamento de la masa del pellet, y no tan solo desde la superficie que esta en contacto directo con el medio liquido. Landon y Buchal (1998) explicaron que el aceite de pescado en su composición presenta impurezas de fosfolípidos, que al entrar en contacto con un medio acuoso, incrementa la movilidad de los lípidos originando la formación de canales fosfolípidos, vía por la cual se dice que se origina el desprendimiento del antibiótico del pellet.

Otros factores descritos como responsables del incremento de la tasa de lixiviación son el aumento de temperatura (Duis *et al* 1995, Rigos *et al* 1999) y mayor área superficial de los pellets (Fribourg *et al* 1969 citado por Duis *et al* 1995). En la presente investigación todas las pruebas se realizaron con un solo tipo de alimento y se mantuvieron a una temperatura constante de ± 24°C.

En el cuadro 9. se presentan cálculos de las concentraciones en ppm efectivas de FLO obtenidas de la sustracción del antibiótico presente en el alimento y el antibiótico presente en la muestra de agua, en la cual se sumergieron los pellets después del proceso de lixiviación. Este calculo permitió conocer la cantidad de antibiótico en ppm disponible y la pérdida o lixiviación respectiva en cada concentración y tiempo de exposición. Durante la preparación de las dietas se adicionó un 10 % más de la concentración indicada, para asumir las pérdidas en el proceso de elaboración.

Cuadro 9. Concentraciones reales de FLO presentes y lixiviados durante el proceso de lixiviación usando como recubridor aceite de pescado

Tiempos de	Concentraciones de FLO					
exposición	50 ppm		100 ppm		200 ppm	
en minutos	Presente	lixiviado	presente	lixiviado	presente	lixiviado
15	48.32	6.68	100.88	9.12	200.61	19.39
30	42.13	12.87	81.52	28.48	164.76	55.24
45	38.49	16.51	73.08	36.92	145.60	74.40
60	35.39	19.61	65.57	44.43	131.46	88.54
90	31.92	23.08	55.80	54.20	106.51	113.49
120	26.99	28.01	46.34	63.66	89.55	130.45
240	21.23	33.77	34.20	75.80	63.71	156.29

4.2 EVALUACIÓN DE TRES AGENTES PROTECTORES SOBRE LAS PÉRDIDAS POR LIXIVIACIÓN DE FLO (100 PPM) USANDO: ACEITE DE PESCADO, GELATINA Y ALGINATO DE SODIO + Ca^{++}

En el cuadro 10 se presentan los resultados de la evaluación y análisis estadístico del uso de agentes protectores en diferentes tiempos secuenciales de exposición.

Cuadro 10. Valores en porcentajes de lixiviación de FLO (100ppm) usando tres recubridores y un control en siete tiempos de exposición.

	Tiempo de exposición en minutos						
Recubridores	15	30	45	60	90	120	240
Control	17.7a	35.5 a	51.3 a	53.4 a	55.8 a	59.6 a	77.7 a
Gelatina	14.0b	30.3 b	42.6 b	51.9 a	54.6 a	57.4 a	73.4 b
Aceite	7.7 c	18.4 c	25.6 c	31.9 c	39.1 c	49.9 b	60.4 c
Alginato + Ca	4.7 d	19.5 c	27.3 c	35.1 b	43.1 b	50.3 b	60.3 c

Letras distintas en la columna correspondiente a cada tiempo de exposición, indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \leq 0.05$ y n =3 replicas)

Después de permanecer sumergidas las dietas por un lapso de cuatro horas en agua de mar, los resultados indicaron que la dieta recubierta con gelatina y el control presentaron los mayores porcentajes de lixiviación. Sin embargo, el aceite de pescado y el alginato de sodio mas Ca^{++}, fueron los recubridores que mayor cantidad de antibiótico retuvieron en el pellet.

Considerando los primeros 15 minutos de exposición para el análisis, tiempo en el cual las especies acuáticas, van en busca del alimento, investigaciones similares utilizando estos dos últimos recubridores(Duis *et al* 1995) con oxitetraciclina, amoxicilina y sulfonamidas reportan por el contrario, pérdidas elevadas del 50.7, 41,6 y 67%, utilizando aceite de pescado a razón de 3.4g /100g de dieta y concentraciones de 7.5, 8 y 3 mg de OTC, amoxicilina y sulfanamida por gramo de pellet. Para el caso del alginato de sodio + Ca^{++} las pérdidas fueron ligeramente disminuidas con valores del 24.1% para la OTC, 17.6% para amoxicilina y 6.3% para sulfonamidas, en el mismo tiempo de exposición y con las mismas concentraciones de antibiótico. En comparación con esta investigación donde las perdidas de FLO fueron pequeñas (cuadro 10), esto nos conlleva ha pensar que existen dos factores que influyen directamente en la lixiviación de los antibióticos: la concentración del compuesto y la del recubridor. En el trabajo realizado por Duis *et al* (1995), las perdidas fueron mucho más elevadas debido a que probablemente el recubridor para el caso del aceite de pescado no tubo la capacidad requerida para poder atrapar todo el antibiótico presente en el pellet ya que las cantidades de recubridor fueron bajas comparadas con la cantidad de antibiótico. Sin embargo, el alginato de sodio mas calcio, permitió que las perdidas disminuyeran debido a la capacidad del calcio para formar enlaces intermoleculares que endurece y gelifica al alginato.

En este caso, tanto las cantidades de FLO (0.1mg FLO/g de pellet) como del recubridor (5g aceite/100 g de dieta y 16 g de alginato + Ca^{++}/100 g de dieta) fueron adecuadas para que los agentes protectores atrapen una mayor cantidad del antibiótico, no obstante, la gelatina no presento este comportamiento. Es posible que, debido a la capacidad de absorción de agua que presenta la gelatina, haya provocado mayores espacios o poros en el pellet que permitió un rápido escape de las moléculas de FLO.

A pesar de que la gelatina no funciono como un buen recubridor, Partridge y Southgate (1999), proponen que concentraciones de un 2 o 3% de gelatina podría funcionar como un exitoso aglutinante, especialmente en dietas donde el tamaño del pellet es pequeño.

Las pérdidas de FLO fueron secuencialmente progresivas con respecto al tiempo para todos los tratamientos. Estas observaciones pueden recrearse en la figura 6. Respecto al uso del aceite de pescado como recubridor con 100 ppm de FLO evaluado en el experimento 1 y 2, pudo determinarse que existe una mayor lixiviación en el primer experimento (68.9 % y 60,4 %). Estas diferencias de 8.5 % podrían atribuirse a errores durante el análisis cromatográfico.

En el cuadro 11 se indican con mayor explicación el FLO retenido y lixiviado en ppm usando diferentes tipos de recubridores. La tabla muestra evidentemente que el aceite de pescado y el alginato de sodio + Ca^{++} fueron los recubridores de consideración. Sin embargo desde un punto de vista económico y de preparación, el aceite de pescado es el protector de fácil disponibilidad y eficacia de acuerdo a la concentración para ser usado.

Cuadro 11. Valores en ppm de FLO presente y lixiviado usando tres recubridores en diferentes tiempos secuenciales

	RECUBRIDORES							
Tiempo de	Control		Aceite		Gelatina		Alginato + Ca	
exposición minutos	FLO presente	FLO lixiviado	FLO presente	FLO lixiviado	FLO presente	FLO lixiviado	FLO presente	FLO lixiviado
15	90.5	19.5	101.58	8.42	94.64	15.36	104.87	5.13
30	76.92	33.08	89.77	20.23	76.71	33.29	88.57	21.43
45	53.61	56.39	81.79	28.21	63.17	46.83	79.95	30.05
60	51.27	58.73	74.89	35.11	52.95	57.05	71.41	38.59
90	48.64	61.36	67.01	42.99	49.97	60.03	62.61	47.39
120	44.49	65.51	55.10	54.90	46.90	63.10	54.63	55.37
240	24.89	85.11	43.60	66.40	29.29	80.71	43.66	66.34

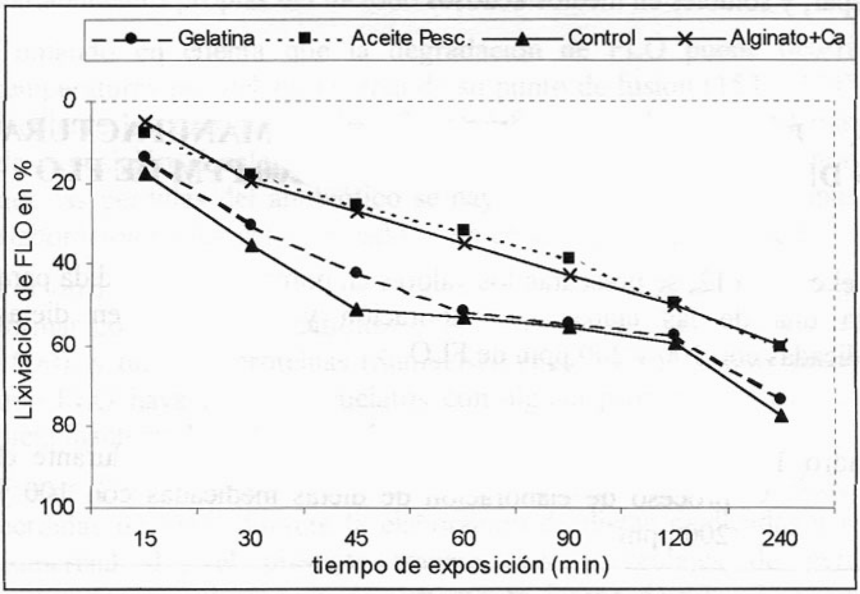

Figura 6. Pérdidas en % de lixiviación de tres recubridores durante cuatro horas de exposición en agua de mar

Adicionalmente, a pesar de que estos resultados nos dan la pauta para determinar cual puede ser el mejor recubridor, es importante considerar la especie que se esta cultivando. Especies como el camarón, el cual se alimenta de manera lenta y continua, a mas de que daña fisicamente el pellet, es importante buscar otras alternativas que permitan darle una mejor textura y compactación al pellet, de esta manera, se reduce en cierto modo la lixiviación.

Langdon y Buchal (1998) proponen el uso de micro cápsulas de paredes lipídicas, para su aplicación en dietas medicadas, ya que estos autores consideran que los recubridores utilizados normalmente como la zeina, alginato, y otras matrices coloidades, no eliminan la lixiviación de compuestos como los antibióticos, aminoácidos y vitaminas, ya que son materiales de bajo peso molecular, dificiles de atrapar, y solubles en medios acuosos.

4.3. PÉRDIDAS POR PROCESOS DE MANUFACTURA EN DIETAS MEDICADAS CON 100 Y 200 PPM DE FLO

En el cuadro 12, se presentan los valores en porcentaje de pérdida para cada una de las etapas de elaboración y acumulado en dietas medicadas con 100 y 200 ppm de FLO.

Cuadro 12. Valores porcentuales de la pérdida de FLO durante el proceso de elaboración de dietas medicadas con 100 y 200 ppm.

	Etapas de manufactura				
Dietas	Premezcla	Peletizado1	Peletizado2	Secado	Acumulado
100 ppm	4.8	27.2	5.0	30.0	67
200 ppm	-0.5	29.7	-3.2	45.5	71.5

Los resultados denotan que las mayores pérdidas se originaron en las etapas de peletizado 1 y secado, debido a que, en ambos pasos de elaboración existieron cambios bruscos y elevados de temperatura. La etapa de peletizado alcanzo temperaturas de 70°C, mientras que en secado la temperatura sobrepaso los 100°C, debido a fallas en el horno de secado.

Valores negativos obtenidos en los porcentajes de perdida de FLO durante el proceso, significan que no existió degradación del fármaco o que posiblemente ese valor negativo se originó por ciertas variabilidades propias del método de extracción.

Tomando en cuenta que la degradación de FLO puede ocurrir a temperaturas por debajo o cerca de su punto de fusión (153 – 154°C), mediante la contribución de diferentes factores tales como el tiempo de exposición al calor, humedad, y presión (Frelier, 1995) es normal que las pérdidas del antibiótico se hayan generado en estas etapas de *elaboración (peletizado y secado) y no en la etapa de pre-mezcla.*

Por otro lado, debido a la conocida capacidad de los antibióticos para formar complejos con cationes di y trivalentes (Lunestad y Goksoyr, 1990), y unirse a proteínas (Samuelsen *et al* 1994), es muy probable que FLO haya formado quelatos con alguna proteína presente en la dieta inactivando o degradando al compuesto.

Frelier (1995) señala como normales valores entre 10 y 40% de pérdidas de OTC durante la elaboración de dietas medicadas a nivel comercial. En el presente trabajo, los porcentajes de pérdida originados por el proceso de elaboración fueron de 67 y 71.5% para las dietas con 100 y 200 ppm, respectivamente, encontrándose en discordancia con esta investigación. Cabe recalcar que los valores obtenidos han sido bajo condiciones no comerciales, por lo que se debe tomar en cuenta que las temperaturas típicas alcanzadas en los procesos industriales de peletización van entre 75 y 95°C.(Cuzon *et al 1994*) y no superiores a los 100°C como los obtenidos en esta investigación. Además, es importante considerar las características intrínsecas de cada antibiótico, debido a que su capacidad de quelarse o inactivarse por efectos de temperatura, humedad y presión varían entre ellos.

En la figura 7, se muestran las pérdidas acumuladas de cada una de las etapas de elaboración y producto final, demostrando como las mayores pérdidas de FLO se produjeron en el peletizado y secado de las dietas

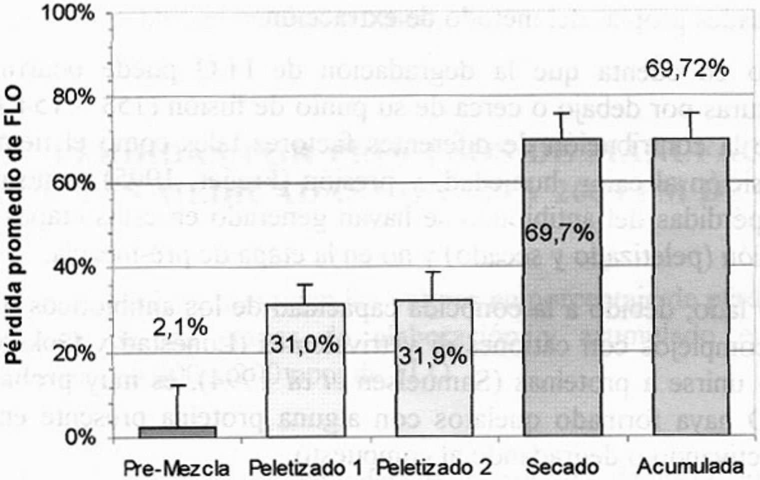

Figura 7. Porcentaje acumulado por etapa de FLO perdido en el proceso de elaboración de las dietas

De esta forma los resultados obtenidos de esta investigación , podrán ser utilizados como indicadores al momento de ser aplicados para estimar las posibles pérdidas en la elaboración de una dieta medicada con FLO a nivel comercial.

4.4. EVALUACIÓN DEL USO DE RECUBRIDORES SOBRE LA PALATABILIDAD DE DIETAS MEDICADAS CON FLO

Durante 14 días de experimentación se evaluaron parámetros abióticos (temperatura, salinidad, oxigeno disuelto y pH), supervivencia, crecimiento, consumo de alimento y frecuencia de mudas, para cada uno de los tratamientos. A continuación se detallan los resultados de los parámetros mencionados:

4.4.1. PARÁMETROS ABIÓTICOS

Los parámetros de temperatura, salinidad, oxigeno disuelto y pH fueron medidos diariamente en doble horario (8h00- 16h00). Condiciones de calidad de agua fueron mantenidas bajo control tomando en cuenta un recambio del 100% diario. Los valores promedio de los parámetros abióticos se resumen en cuadro 13.

Cuadro 13. Valores promedio (± desviación estandar) de la calidad del agua en los acuarios durante el tratamiento terapéutico.

Parámetros físico-químicos del agua				
Tratamientos	Temperatura (°C)	Oxígeno (mg/l)	PH	Salinidad (S‰)
A (Gelatina)	28.0±0.3	5.8±0.6	8.1±0.07	33.1±0.5
B(Aceite deP)	28.0±0.3	5.8±0.2	8.1±0.05	33.1±0.3
C (Control)	28.1±0.2	5.9±0.4	8.1±0.06	33.1±0.4
D(Alginato+Ca	28.0±0.5	5.9±0.5	8.1±0.06	33.2±0.8

4.4.2. SUPERVIVENCIA

Los porcentajes de supervivencia obtenidos en cada uno de los tratamientos fueron altos. Porcentajes del 100% se observaron casi en todos los tratamientos, a excepción del tratamiento A cuyo porcentaje fue del 98.1%.

4.4.3. CRECIMIENTO

Los resultados de biomasa final e incremento de biomasa se muestran en el cuadro 14. Después de 14 días de alimentación, no existieron diferencias significativas (P≥0.05) entre las biomasas ganadas de los camarones alimentados con los diferentes tratamientos.

Cuadro 14 Valores promedio de biomasa final e incremento de biomasa (± desviación estándar) obtenidos después de 14 días de alimentación a juveniles *Litopenaeus vannamei*

	Tratamientos			
Determinaciones	A	B	C	D
Peso inicial (g)	1.08±0.19	1.10±0.19	1.05±0.19	1.1±0.2
Peso final (g)	1.86±0.31	1.72±0.31	1.75±0.29	1.81±0.32
Biomasa final (g)	16.47±1.5	15.47±0.83	15.73±0.63	17.03±1.44
Biomasa (g)	40.26 a	33.48 a	37.80 a	39.42 a
biomasa (%)	72	56	67	65

Letras distintas en la fila correspondiente a incremento de biomasa, indican diferencias significativas según el test de Duncan (P≤0.05 y n =6 replicas)

Los resultados obtenidos demuestran que, a pesar de no existir diferencias significativas entre los tratamientos, las dietas recubiertas con gelatina (A) y alginato de sodio + Ca^{++} (B), presentaron los mayores incrementos de biomasa. Sin embargo, la dieta control, la cual carecía de recubrimiento, no se vio directamente influenciada por la palatabilidad del antibiótico (FLO). Investigaciones realizadas con otros compuestos antibacterianos como es el caso de la OTC, (Corliss *et al* 1977) determinaron que el antibiótico no tubo ningún efecto significativo en el crecimiento de *Penaeus aztecus*.. En comparación con este trabajo, se puede observar que tanto el antibiótico como el recubridor tampoco afectaron en el crecimiento de los peneidos, sin embargo, las dietas recubiertas con gelatina y alginato de sodio más Ca^{++} contribuyeron en cierta forma para mejorar el consumo del pellet medicado. Park *et al* (1994) consideran por el contrario, que la concentración del antibiótico si afecta directamente en el consumo de alimento y por consiguiente en el crecimiento. Concluye, que la concentración del compuesto es directamente proporcional con el crecimiento de los organismos, mientras mayor sea la cantidad de antibiótico, limitado es el crecimiento de los organismos. En esta investigación, el crecimiento no se vio afectado por este motivo, ya que la concentración aplicada de FLO son dosis normales que se recomienda en un tratamiento terapéutico. No obstante, es interesante observar, que los pesos finales en todos los tratamientos no son los valores que normalmente se obtienen con una dieta sin antibiótico, ya que los crecimientos en todos los tratamientos fueron inferiores a un gramo por semana. Esto puede atribuirse al comportamiento que toman los organismos de reducir su consumo de alimento cuando se varia la dieta, principalmente cuando es un alimento medicado (Bell, 1992).

4.4.4. CONSUMO DE ALIMENTO

Los resultados de consumo de alimento fueron analizados tomando en cuenta el porcentaje de alimento consumido por tratamiento. El análisis estadístico de estos datos determinaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos durante la primera y segunda semana del bioensayo (cuadro 15)

Cuadro 15. Valores porcentuales de consumo de alimento en dieta medicada con FLO (150ppm) usando tres recubridores

	Duración del bioensayo	
Tratamientos	Primera semana	Segunda semana
A (Gelatina)	74.57 a	65.14 a
B (Aceite de P)	65.43 c	57.71 b
C (Control)	70.14 b	61.00 ab
D (Alginato+ Ca	74.00 a	61.29 ab

Letras distintas en la columna correspondiente a cada semana, indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \leq 0.05$ y n =6 replicas)

Los resultados indican que el mayor consumo de alimento durante las dos semanas de experimentación se produjo en la primera semana (71%) comparado con la segunda (61.3%). Tanto la gelatina como el alginato de sodio + Ca^{++} demostraron ser los tratamientos con mayor consumo de alimento en las dos semanas de experimentación, tomando en cuenta que la dieta control tiene porcentajes casi similares a los tratamientos mencionados. La dieta recubierta con aceite de pescado presento los valores más bajos de consumo de alimento comparado con el control y las dietas recubiertas con gelatina y alginato de sodio más calcio.

El bajo consumo de alimento por parte de la dieta recubierta con aceite de pescado, probablemente se debe a la capacidad que tiene este para oxidarse al medio ambiente. De esta manera, el producto se convierte en un aceite rancio de mal olor y sabor inpalatable para el camarón. Adicionalmente, durante el experimento, la dieta recubierta con aceite de pescado estuvo expuesta a cambios de temperatura, lo que seguramente contribuyo al deterioro del recubridor.

Trabajos realizados con alginato de sodio y gelatina como recubridores en dietas para peces (Partridge y Southgate, 1999), determinaron que el alginato de sodio presenta mayores porcentajes de ingestión frente a la gelatina. Sin embargo los autores aconsejan que la *concentración o niveles del recubridor puede afectar directamente en* el consumo del alimento. En comparación con este trabajo, los porcentajes de consumo de alimento fueron casi iguales para ambos recubridores, siendo por el contrario, la gelatina el que mayor consumo de alimento presento durante las dos semanas de experimentación. Probablemente, los niveles de concentración de los recubridores especialmente para el alginato de sodio, no fue el adecuado para una mayor ingestión por parte del camarón.

Los mismos autores mencionan que otro factor que influye en una mayor o menor ingestión del alimento es el color y principalmente la apariencia o textura del pellet. Seguramente, debido a la capacidad de la gelatina de absorber agua, convirtió al pellet en un alimento de suave textura, lo que le puedo dar una ventaja frente al alginato de sodio, el cual al estar mezclado con moléculas de Ca^{++} formaron fuertes enlaces, provocando un alimento duro y ligeramente difícil de ser desintegrado por el camarón.

En la figura 8 se presentan los promedios de gramos consumidos por organismo de los cuatro tratamientos durante los 14 días del bioensayo.

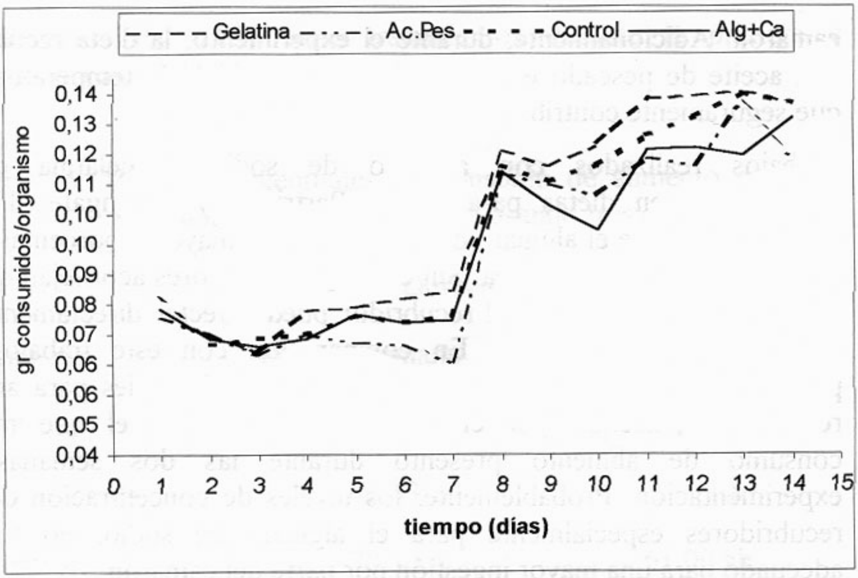

Figura 8. Promedio de gramos consumidos/organismo durante un tratamiento terapéutico (FLO) con recubridores.

De acuerdo a lo observado en el análisis del consumo de alimento, vemos que la dieta control (sin recubrimiento), no afecto directamente en el consumo del alimento. Si bien, se ha sugerido que la disminución de la palatabilidad en alimentos medicados, es el 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 existió un factor que pudo haber reducido este efecto en el presente bioensayo. Gira alrededor del método de elaboración de las dietas medicadas, se ha comprobado recientemente que peces (*Dicentrarchus labrax* L.) consumen 74% más alimento medicado cuando el antibiótico se adiciona en la mezcla del alimento artificial, a diferencia que si se lo aplicara en forma de recubrimiento junto con aceite de pescado (Rigos *et al* 1999). En el presente trabajo, debido a la facilidad de la planta piloto en CENAIM se logró realizar la dieta medicada incluyendo el antibiótico en la elaboración del mismo.

Para entender mejor el comportamiento de los camarones en relación al consumo de alimento, la figura 9 muestra de manera global la tendencia (polinomial de 4to orden) de los gramos consumidos de alimento, por animal para cada tratamiento.

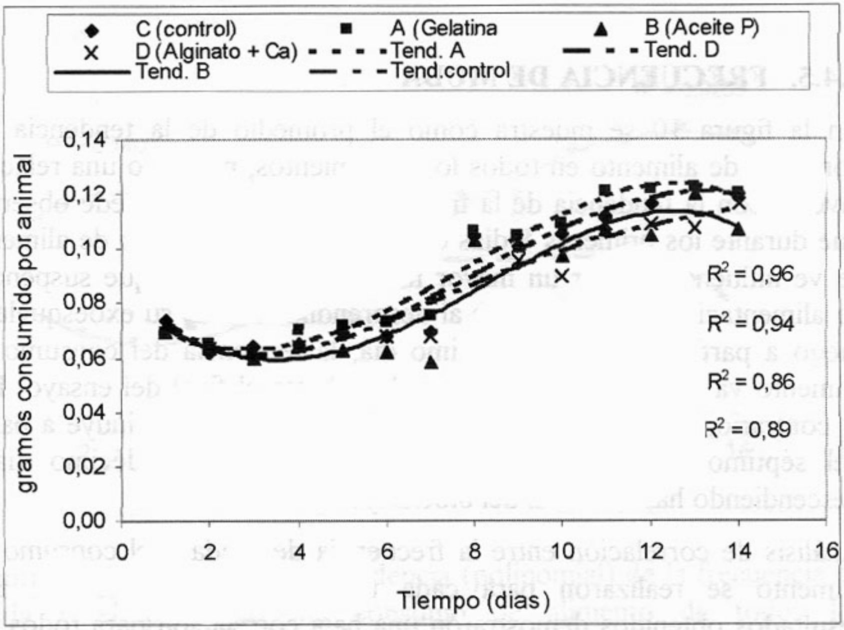

Figura 9. Tendencia del consumo de alimento para cada tratamiento durante el bioensayo

Durante los primeros tres días del bioensayo, la tasa de consumo fue prácticamente la misma para todos los tratamientos. Al cuarto día las curvas empiezan a separarse. A partir de este día, las curvas de las dietas recubiertas con gelatina y aceite de pescado se separan, mientras que las curvas de la dieta control (con antibiótico sin recubrimiento) y la dieta recubierta con alginato de sodio más Ca^{++} se mantienen unidas hasta el sexto día.

Finalmente, la curva de la dieta recubierta con gelatina alcanza el pico más alto de consumo de alimento de las demás dietas en el día duodécimo. Sin embargo, la tasa de consumo de alimento de la dieta mencionada, sólo es alcanzada por la dieta control al final del bioensayo.

4.4.5. FRECUENCIA DE MUDA

En la figura 10 se muestra como el promedio de la tendencia del consumo de alimento en todos los tratamientos, mantuvo una relación inversa con la tendencia de la frecuencia de muda. Se puede observar que durante los primeros 5 días del bioensayo el consumo de alimento se ve influenciado por un mayor numero de animales que suspenden su alimentación para dedicarse al desprendimiento de su exoesqueleto, luego a partir del sexto y séptimo día, la tendencia del consumo de alimento va en aumento, manteniéndose hasta el final del ensayo. Por el contrario, la tendencia de la frecuencia de muda disminuye a partir del séptimo día, manteniéndose estable hasta el duodécimo día y descendiendo hasta el final del bioensayo.

Análisis de correlación entre la frecuencia de muda y el consumo de alimento se realizaron para cada uno de los tratamientos. Los resultados obtenidos demostraron una baja correlación para todos los tratamientos con valores del 5, 16, 23 y 27% para el control, la dieta recubierta con gelatina, aceite de pescado y alginato de sodio + Ca^{++}, respectivamente

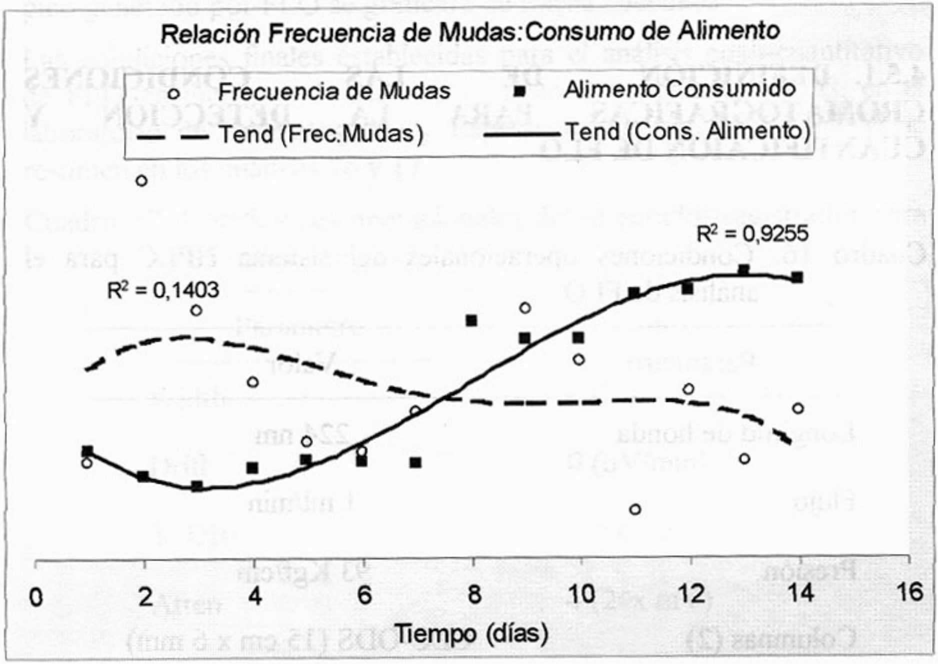

Figura 10. Relación entre la tendencia (polinomial) de la frecuencia de muda y el promedio del consumo de alimento de todos los tratamientos.

4.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

4.5.1. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICAIÓN DE FLO

Cuadro 16. Condiciones operacionales del sistema HPLC para el análisis de FLO.

Parámetro	Valor
Longitud de honda	224 nm
Flujo	1 ml/min
Presión	93 Kgf/cm
Columnas (2)	CLC-ODS (15 cm x 6 mm)
Volumen de inyección	50µl
Tiempo de retención	9.86 ± 0.09 min (n=14)
Temperatura horno	32°C

Las condiciones operativas del sistema para la cuali-cuantificación de FLO en dietas medicadas para camarones fueron extrapoladas del método originalmente descrito por Schering-Plough (2000).

Previo a la determinación de las condiciones analíticas del equipo, se verificó la capacidad del sistema para la detección y separación de FLO, empleando la fase móvil descrita por Schering-Plough (2000). El desarrollo de este trabajo consistió en pruebas de ensayos *inyectando diferentes concentraciones del analito; teniendo a su vez* como un segundo objetivo la obtención de un cromatograma donde el pico generado por FLO se graficara de forma adecuada.

Las condiciones finales establecidas para el análisis cuali-cuantitativo de FLO en dietas medicadas para camarones mediante HPLC, en el laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría del CENAIM se resumen en los cuadros 16 y 17.

Cuadro 17. Condiciones operacionales del integrador/registrador para el análisis de FLO

Parámetro	Valor
Width	5 (sec)
Drift	0 (uV/min)
T. DBL	0 (min)
Atten	4 (2^x mV)
Method (0 ~8)	1
Window	5 %
IS. WT	1
Slope	351.36 (uV/min)
Min. area (count)	1000
Stop. Tm	25 min
Speed	3 (mm/min)
W/B(0=window	0

4.5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE FLO

Establecidas las condiciones operacionales para el análisis de FLO mediante HPLC, se elaboró la curva de calibración (figura 11) inyectando las soluciones estándares (n=6) cuyas concentraciones se establecieron en valores de 0.05 ppm a 3.2 ppm.

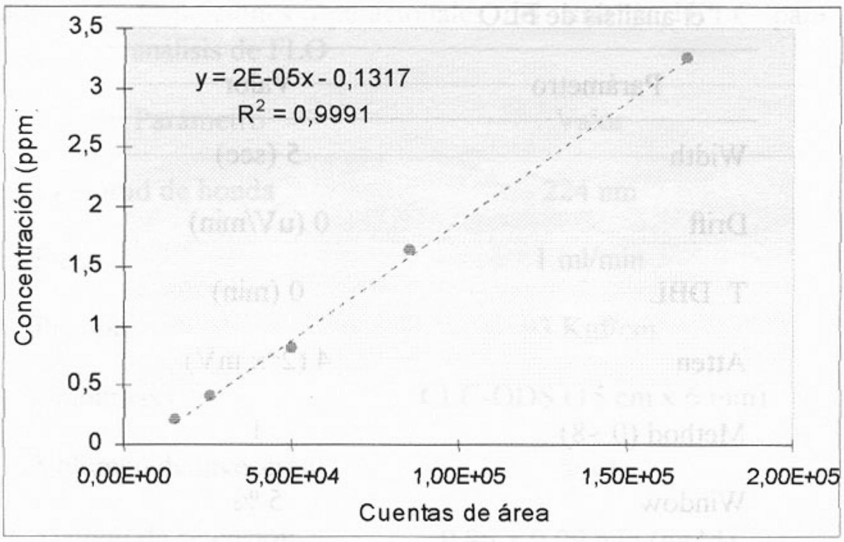

Figura 11. Curva de calibración para FLO de acuerdo a las condiciones analíticas establecidas

Algunas referencias sobre el empleo de técnicas de HPLC para el análisis de FLO en sedimentos marinos han reportado linealidad en las curvas de calibración tanto para florfenicol, como para florfenicol amina, entre las concentraciones de 1 y 75 μg/g. Coeficientes de correlación obtenidos para florfenicol y florfenicol amina fueron de r=0.9997 de r = 0.9970, respectivamente (Hormazabal *et al* 1996).

En el presente estudio, el valor de correlación obtenido $r^2 = 0.9991$ a partir de la ecuación de la regresión lineal, mostró un rango de *respuesta proporcional entre las concentraciones* de 0.05 y 3.2 ppm de FLO y la respuesta del detector, demostrándose de esta forma la linealidad de respuesta del mismo dentro de los rangos de concentración analizados.

Considerando la más baja concentración utilizada durante las pruebas, el límite de cuantificación se estableció en una concentración de 0.05 ppm de FLO en el extracto. De acuerdo a la capacidad del bucle (50µl) que define el volumen de la muestra inyectada en el cromatógrafo, el límite de detección del método establecido es de 2.5 ng de FLO.

Métodos cromatográficos para la determinación de FLO en tejidos de peces han obtenido limites de detección de 20 ng/g en músculo y 50 ng/g en hígado (Hormazabal *et al* 1993). A pesar de ser valores elevados con respecto a nuestra investigación, en términos generales, los métodos para el análisis de FLO vía HPLC logran limites que van desde 0.5 a 50 ng de FLO (Hormazabal *et al* 1993, 1996) y este trabajo no fue la excepción

4.5.3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE FLO

Las pruebas de sondeo para el establecimiento del método más apropiado para la extracción de FLO en dietas medicadas para camarones, evaluó las técnicas que se describen a continuación:

Inicialmente el procedimiento empleado fue el desarrollado por Nagata y Saeki (1992), utilizando como solvente de extracción al etil acetato. En la práctica esta solución de extracción presentó problemas debido que al inyectar el extracto en el cromatograma, los resultados presentaron cuentas de área superiores a las concentraciones reales de FLO en la muestra. Pruebas de inyección directa del etil acetato, demostraron la elusión del pico en el mismo rango del tiempo de retención para FLO.

Luego de este primer intento se probó un nuevo método de extracción, el método de elección fue el descrito por Hormazabal *et al* (1993), mismo que utiliza como solvente de extracción la acetona.

Obtenidos los extractos luego de aplicar esta metodología, se determinó que los resultados conseguidos no presentaban el inconveniente descrito por el primer método, con ello se concluyó que el solvente de extracción no interfirió en la cuantificación de FLO. Adicionalmente este método generó un extracto limpio y con menores dificultades en el manejo. Esta última metodología debido a su practicidad y afinidad fue la escogida para la determinación de FLO en dietas medicadas para camarones.

Los porcentajes de recuperación obtenidos del método implantado, estuvieron por encima del 98% (n=6). Valores similares en trabajos realizados con el mismo antibiótico han sido reportados, determinándose porcentajes de recuperación en tejidos de peces y sedimentos marinos (Hormazabal *et al* 1993, 1996) del 99 y 86% respectivamente.

De esta forma, se estima que el metodo determinado no requiere de mayores modificaciones para su aplicación en el monitoreo de dietas medicadas para camarones con FLO.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

5.1.1. MÉTODO ANALÍTICO

- Los porcentajes de recuperación del método desarrollado en el alimento medicado presentan valores altos (98.5%), indicando que el método no requiere mayores modificaciones para su aplicación en el monitoreo de dietas para camarones medicadas con FLO.
- La linealidad observada se ubicó dentro de los rangos de concentración que van desde 0.05 a 3.2 ppm. El análisis de regresión lineal dentro de estos valores demostró una alta correlación $r^2 = 0.9991$.
- Los valores establecidos en limite de detección (2.5ng FLO) y cuantificación (0.05 ppm) corresponden a valores adecuados para la investigación de FLO en dietas medicadas para acuacultura.
- El método implantado es de fácil aplicación y permite realizar un promedio de 15 a 20 muestras diarias. Además, pequeñas cantidades de químicos son requeridas para el análisis.

5.1.2. DIETAS MEDICADAS

- Las pérdidas de FLO durante el proceso de manufactura de las dietas con 100 y 200 ppm, demostraron ser independientes de la concentración del antibiótico presente en la dieta.

- La pérdida promedio acumulada al final del proceso de elaboración fue alta (69.7%). Las mayores pérdidas ocasionadas durante el proceso de elaboración en ambas dietas, se registraron en la etapa de peletizado (70°C) y secado (>100°C), siendo probablemente la temperatura y los componentes presentes en los ingredientes de la dieta, los principales factores que quelaron y/o inactivaron el antibiótico presente en el alimento.

- El efecto de la concentración de FLO en las dietas medicadas con 50 (L1) ,100 (L2) y 200 ppm (L3), probablemente no influyeron sobre las pérdidas por lixiviación, no obstante las mayores pérdidas del antibiótico en las dietas mencionadas se registraron en las primeras 2 horas de exposición en el agua de mar

- El uso de aceite de pescado y alginato de sodio más calcio como agentes protectores en dietas medicadas con FLO para camarones, evitan un rápido desprendimiento del antibiótico por efecto de la lixiviación especialmente en los primeros 15 minutos de exposición. Por el contrario, el uso de gelatina como recubridor permite una rápida liberación del antibiótico presente en el pellet. Sin embargo, es importante mencionar que las pérdidas finales (4 hrs) son altas con un 60% de pérdida para las dietas recubiertas con aceite de pescado y alginato de sodio más calcio; y un promedio del 73% para la dieta recubierta con gelatina.

- El efecto de la concentración del recubrimiento en las pérdidas por lixiviación juega un papel importante en el desprendimiento del antibiótico. Dietas con elevadas concentraciones de antibiótico necesitan ser recubiertas con altas concentraciones del agente protector.

- La influencia de los recubridores sobre la palatabilidad de la dieta medicada se vio afectada por un mayor consumo de alimento con la dieta A y D (recubierta con gelatina y alginato de sodio más Ca^{++}), por otro lado, la dieta C aquella con antibiótico pero sin recubrimiento presento similar consumo que las dietas mencionadas. Esto indica que el antibiótico en sí no afecto directamente sobre la palatabilidad del pellet. En la dieta B (recubierta con aceite de pescado) el efecto del recubridor sobre la palatabilidad de la dieta provocó una disminución en el consumo del alimento.

5.1. RECOMENDACIONES

- Se aconseja a las fábricas de alimento balanceado, verificar minuciosamente las pérdidas del antibiótico originadas por sus condiciones particulares de manufactura, evitando la producción de dietas medicadas con dosis sub-letales de antibiótico.

- Deberían investigarse otros agentes aglutinantes alternativos capaces de mejorar la eficiencia de los tratamientos orales y permitiendo reducir al mínimo las pérdidas del antibiótico por efecto de lixiviación, sin olvidarse que estos no influyan en la palatabilidad del pellet.

- La creciente aplicación de FLO en la industria camaronera del Ecuador, debería ser revisado, mas aún ahora que se dispone de un método analítico para su determinación. Un tema interesante gira alrededor de su bioacumulación en los peneidos y su persistencia en los sedimentos de las piscinas camaroneras.

- Adicionalmente, debería investigarse, algunas alternativas que reemplacen el uso de antibióticos por otros que no causes efectos negativos sobre la microbiología del medio marino, un tema para ponerlo en consideración es el uso de probióticos.

6. RESUMEN

En la presente investigación se hicieron estudios de florfenicol (FLO) en dietas artificiales con diferentes concentraciones de antibiótico y el uso de recubridores como protectores de la lixiviación, evaluando también la palatabilidad del pellet medicado. Se implantó un método para la detección consistente de FLO mediante HPLC (Cromatografia Liquida de Alta Performancia). Se elaboraron dietas con diferentes concentraciones del antibiótico (50 ppm, 100 ppm y 200 ppm) determinándose las pérdidas del mismo en las diferentes etapas del proceso de manufactura (premezcla, peletizado 1, peletizado 2, y secado) del alimento medicado. Además, se realizó un estudio de pérdidas por lixiviación de FLO en el agua de mar por efecto de concentración y del recubridor (control, aceite de pescado, alginato de sodio más calcio y gelatina). Finalmente, se realizó el bioensayo con camarones juveniles de aproximadamente 1g (*Litopenaeus vannamei*) por 14 días, en el cual se observaron los efectos de los recubridores sobre el consumo de alimento Los resultados demostraron que la concentración del antibiótico no afecto directamente en las pérdidas de FLO por lixiviación, sin embargo se pudo determinar que la concentración del recubridor juega un papel importante en este proceso. De los tres recubridores utilizados, el aceite de pescado y el alginato de sodio + Ca^{++}, fueron los que menos perdidas de FLO tuvieron en los primeros 15 minutos de exposición (7.7% aceite de pescado y 4.7% alginato de sodio + Ca^{++}). Mientras que la gelatina presento valores elevados de pérdida de FLO (14%). La palatabilidad del pellet medicado se vio altamente afectado por un elevado consumo de alimento por parte de la dieta recubierta con gelatina y alginato de sodio + Ca^{++} (70 y 68% respectivamente) seguido del control y finalmente el aceite de pescado (65% y 62%, respectivamente).

7. SUMMARY

In the present investigation studies were done of florfenicol (FLO) in artificial diets with different concentrations of antibiotic and the use of binders as protectors of the leaching, evaluating also the palatability of the pellet medicated. Himself into a method for the detection consistent of FLO by means of HPLC (Liquid Chromatography of High Performance). They elaborated diets with different concentrations of the antibiotic (50 ppm, 100 ppm and 200 ppm) being determined the losses of the same one in the different phases of the process of manufacture (pre- mix, crowd 1, crowd 2, and dried) of the food medicated. Besides, a study of losses was carried out by leaching of FLO in the water of sea by effect of concentration and of the recubridor (control, oil of fish, alginato of sodium more calcium and gelatin). Finally, it was carried out the bioensayo with shrimps youthful of approximately 1g (*Litopenaeus vannamei*) for 14 days, in which the effects were observed of the binders upon the consumption of food The results showed that the concentration of the antibiotic not affection directly in the losses of FLO by leaching, however could be determined that the concentration of the binder plays an important paper in this process. Of the three binders utilized, the oil of fish and the alginato of sodium + Ca^{++}, went the ones that less lost of FLO had in the first 15 minutes of exposition (7.7% oil of fish and 4.7% alginato of sodium + Ca^{++}). While the gelatin I present high values of loss of FLO (14%). The palatability of the pellet medicated was seen highly affected by a high consumption of food on the part of the diet covered with gelatin and alginato of sodium + Ca^{++} (70 and 68% respectively) followed by the control and finally the oil of fish (65% and 62%, respectively).

8. BIBLIOGRAFÍA

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

ARISTA, A. 1999. Uso y abuso de antibióticos. Hospital general de México S.S. Unidad de Pediatría.

BARNES, A., HASTING, T., AMYES, S. 1995. Aquaculture antibacterial are antagonized by seawater cations. Journal Fish Diseases 18: 463 – 465.

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.

CALDERON, J. 1997. Consideraciones generales sobre el uso de antimicrobianos en: Aplicación clínica de antibióticos y quimioterapéuticos. Edit Méndez Cervantes 7ª edición: 53-85.

CEVALLOS, F., SOLIS, A., SERRANO, J. 1999. Evaluación de la aplicación de dieta medicada con Sarafin durante un ciclo de producción de camarón en Ecuador. Revista Panorama acuícola Vol. 4: 18-21.

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

CRUZ-SUAREZ, E., RICQUE, D., SALAZAR, M., BARBOSA, C. 2000. Uso de harina de Kelp (*Macrosystis pyrifera*) en alimentos para camarón. Avances en nutrición acuícola, V simposium internacional de nutrición acuícola. pp:227-266.

CUZON, G., GUILLAUME, J., & CAHU, C. 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacea. Aquaculture 124: 253–267.

CHANRATCHAKOOL, P., PEARSON, M., LIMSUWAN, C., ROBERTS, R. 1995. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. Journal of fish diseases 18: 79-82.

CHIEN, Y., CHEN, I. 1996. The distribution of oxytetracycline residue in *Penaeus monodon* culture system. Department of aquaculture, National Taiwan ocean university.

CHYTHANYA, R., NAYAK, D., VENUGOPAL, M. 2000. Resistencia de los antibióticos en la Acuacultura. Acuacultura del Ecuador. Edición # 35 pag 7-9.

DERGAL, S. 1997. Química de los alimentos. Universidad nacional autónoma de México. Facultad de química.

DISCOVER, J. 1999. Medicinas oceánicas. Discover en Español, Reportaje de Portada. *Ideas Publishing Group, Miami, FL*, 3(4) 26 – 31.

DU, W., MARSHALL, M., WHEELER, W., MATHEWS, M., GATLIN, D., RAWLES, S., XU, D., RODGERS, W., WEI, C. 1995. Oxytetracycline, Sulfadimethoxine, and Ormetropin residues in channel catfish by HPLC. Journal of food science, Vol 60 N° 6.

DUIS, K., INGLIS, V., BEVERIDGE, M., HAMMER, I. 1995. Leaching of four different antibacterial from oil-and alginate-coated fish feed pellets. Aquaculture research 26: 549-556.

FRELIER, P. 1995. Early diagnosis and prevention of rickettsiosis in shrimp farming. College of veterinary medicine, Texas A&M University, USA.

FRIBOURGH, H., MEYER, F., ROBINSON, J. 1969. Oxytetracycline leaching from medicated fish feed. Bureau of Sport Fisheries paper 40: 3-7.

GÓMEZ, G. 1998. Uso medico y veterinario de agentes antimicrobianos: implicaciones para la salud pública, una *visión clínica de la resistencia antimicrobiana*. Noticias Epidemiológicas, Vol. 2. N° 12.

GOODMAN, A., GOODMAN, L.,. GILMAN, A. 1981. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1158 - 1175.

HEKTOEN, H., BERGE, J., HORMAZABAL, V., YNDESTAD, M. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. Aquaculture 133: 175-184.

HERWING, N. 1979. Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. A manual of fish pharmacology and material medical. Charles C. Thomas, Springfield, III.

HORMAZABAL, V., STEFFENAK, I., YNDESTAD, M. 1993. Simultaneous extraction of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography 615: 161-165.

HORMAZABAL, V., STEFFENAK, I., YNDESTAD, M. 1996. Simultaneous extraction of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediments by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 724 pp 364-366.

HORSBERG, T., MARTINSEN, B., VARMA, K. 1994. The disposition of C^{14} florfenicol in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 122: 97-106.

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

LANGDON, C., BUCHAL, M. 1998a. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray beads for the delivery of water-soluble, low molecular-weight materials to aquatic animals. Aquaculture Nutrition 4: 275-284

--------------------------------------. 1998b. Evaluation of lipid spray beads for the delivery of water-soluble materials to a marine suspension-feeder, the Manila clam *Tapes philippinarum* (Deshayes 1853). Aquaculture Nutrition 4: 263-275.

LEWBART, G., VALDEN, S., DUN, J., MANAUGH, C., WHITT, D., DOI, A., SMITH, T., FLAMMER, K. 1997. Pharmacokinetic of enrofloxacina in the red pacu (*Colossoma brachypomun*) after intramuscular, oral and bath administration. Aquaculture 127: 124-128

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

LUNESTAD, B., GOKSOYR, J. 1990. Reduction in the antibacterial effect of oxitetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. Diseases of aquatic organisms 9: 67-72.

------------------., SAMUELSEN, O., FJELDE, S., ERVIK, A. 1995. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. Aquaculture 134: 217-225.

MARTINSEN, B., HORSBERG, T., VARMA, K., SAMS., R. 1993. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C. Aquaculture 112: 1-11.

MOLINA, C., PAREDES, Y., MONTOYA, N., LEÓN, A., HING, K., TOWSEND, S., PEDRAZZOLI, A. 1997. Manual de técnicas para nutrición acuícola.45 – 47p

MONTOYA., N. 2002. Boletín informativo: Limites residuales y detección de fenicoles. Cenaim Informa. N° 54.

-------------------., Y REYES, E. 2000. Acumulación /eliminación de oxitetraciclina en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, y su residualidad en dietas artificiales. Tesis de pre-grado.

Universidad Politécnica del Litoral, Facultad de Ciencias Marinas, Ecuador. 65 p

--------------------., Y TORO, L. 2000. Pérdidas por procesos de manufactura y lixiviación de enrofloxacina en dietas medicadas para camarones *Penaeus vannamei*. Boletín Informativo El Mundo Acuícola. Vol 6 N° 2: 52 – 53.

NAGATA, T., Y SAEKI, M. 1992. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and culture fish by liquid chromatography, J. Liquid Chromatography., 15, 2045-2056

NEU, H. 1987. Conceptos generales sobre quimioterapia de enfermedades infecciosas. Med. Clin North Am. Actualización sobre antibióticos 6: 1115-1129.

NYGAARD, K., LUNESTAD, B., HEKTOEN, H., BERGE, J.,. HORMAZABAL, V. 1992. Resistence to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. Aquaculture, 104, 31 - 36.

PANORAMA ACUÍCOLA, 2001. Asistencia para el manejo sanitario del cultivo de camarón en America Latina; pp 34

PARK, E., LIGHTNER, D., STAMN, J., BELL, T. 1994. Preliminary studies on the palatability, animal safety, and the tissue of Sarafloxacin-HCL in the peneid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 126: 231 – 241.

-------------., LIGHTNER, D., MILNER, N., MAYERSOHN, M., PARK, D., GIFFORD, J., BELL, T. 1995. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetropin in the penaid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 130: 113–128.

PARTRIDGE., G. Y SOUTHGATE., P. 1999. The effects of binder composition on ingestion and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calcarifer* Bloch larvae. Aquaculture Research 30. pag 879-886.

PEARSON, M., AND CHARATCHAKOOL, P. 1999. Leaching of oxytetracycline from surface coated shrimp feed. En: The AAHRI Newletter (abstracts), www. agri-aqua.ait.ac.th/aahri /seaadcp/ AAHI/Newsletter

PEETERS, M., RODRÍGUEZ, J. 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. El mundo acuícola Vol. 5 N° 1 pp 13-19

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E. 1997. Microbiología de los microorganismos. Cuarta Edición. Ed. McGraw-Hill Cap: 20-24.

PURSELL, L., SAMUELSEN, O., SMITH, P. 1995. Reduction in the in vitro activity of flumequine against Aeromonas salmonicela in the presence of the concentrations of Mg^{++} and Ca^{++} ions found in seawater. Aquaculture 135: 245 – 255.

PYKOWICS, R., KESTER, D. 1971. The physical chemistry of seawater. Rev. Oceanogr.Mar.Biol.: 11 – 60

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

RATCLIFFE, N., SMITH, J. 1983. Effects of magnesium on the activity of quinolone antibacterial agent. J. Pharm Pharmacol 35 – 59.

RAWLES, S., KOCABAS, A., DELBERT, M. 1997. Dietary supplementation of Terramicyn and Romet 30 does not enhance growth of channel catfish but does influence tissue residues. World aquaculture society 122: 393-401.

REINITZ, G. 1983. Evaluación de sodium bentonite in practical diets for rainbow trout. Prog. Fish Culture 45:100 – 102.

RIGOS, G., ALEXIS, M., NENGAS, I. 1999. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid include in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax L.* Aquaculture Research 25: 841-847.

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

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.*

----------------------., TORSVIK, V., ERVIK, A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistence toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medcation.. Science of Total Envinroment, 114, 25 – 36.

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

SCHERING PLOUGH. 1999. Nuflor Premix, Florfenicol. Departamento Técnico-México

-----------------------------. 2000. Florfenicol, un Nuevo antibiótico en la acuacultura. Departamento Técnico- México

-----------------------------. 2000. Análisis de florfenicol vía HPLC. Condiciones analíticas. In: Polidist. S. A.

SLINGER, S., RAZZAQUE, A., CHO, C. 1979. Effects of feed processing and leaching on the losses of certain vitamins in fish diets. World Symposium Finfish Nutrition and Fi Hamburg 20-23 june. Vol II, Berlin.

SMITH, J., LEWIS, C. 1988. Chemistry and mechanisms of action the quinolone antibacterial. Academic –Press, London. Pp: 23 – 82.

SOHLBERG, S., AULIE, A., SOIL, N. 1994. Temperature-dependent absorption and elimination of flumequine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. Aquaculture 119: 1-10.

SOMSIRI, T., WANNAPRAPA, M., SOONTORNVIT, S. 1997. Accumulation of oxtetracycline in hybrid catfish (*Clarias gariepinus X C. macrocephalus*). Diseases in Asian Aquaculture II.

SPYRIDAKIS, P., METAILLER, R., GABAUDAN, J. 1988. Effects of sodium alginate on protein and lipid digestibility. Aquaculture 121: 71-73

TACON, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación (Organización de las Naciones Unidas para la agriciltura y alimentación. 288 – 290 p.

THRELFALL, E. 1992. Antibiotic and the selection of food borne pathogens. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 72, 96-102

TODAR, K. 2000. Antibiotics, University of Wisconsin-Madinson. www.bact.wisc.edu/antibiotics.html

TORTORA, P. 1998. Antibiotics: Mechanisms of action and mechanisms of bacterial resistance. Vol 8: 97-102.

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

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

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

VALLE, J. 1999. Comparación *in vitro* de los efectos de la Litofloina, Norfloxacina y Crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón - estudio preliminar *insitu* de la Litofloxina. Publireporte Farmavet 17-22 pp.

WWW.GELATINE.ORG/DE/RELAUNCH_ES/V7/INDEX.HTML Un alimento puro y natural: gelatina.

WWW.IMI.COM.MX/REVISTA/CONSERVACION/4.HTML. La gelatina fotográfica. Estructura y composición química de la gelatina y la colágena

WWW.MUNDOHELADO.COM/MATERIASPRIMAS/ESTABILIZANTES-ALGINATOS.HTM Aplicación y características del alginato de sodio.

9. ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de lixiviación en dieta medicada con FLO recubierta con tres agentes protectores (Aceite de pescado, gelatina, alginato de sodio + Ca^{++}) y un control (sin recubrimiento)

Recubrimiento: Gelatina

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	13.67	30.83	43.24	51.76	54.53	58.30	74.58
2	13.61	29.95	42.77	51.71	52.86	56.60	74.12
3	14.61	30.01	41.72	52.11	56.31	57.20	71.42

Recubrimiento: Aceite de pescado

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	6.17	21.13	25.51	30.79	37.87	55.93	58.15
2	7.63	17.06	25.26	32.58	40.49	45.95	61.84
3	9.17	16.98	26.16	32.39	38.87	47.84	61.10

Recubrimiento: Control (sin recubrimiento)

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	15.96	36.87	55.52	51.64	55.36	59.95	76.60
2	17.42	36.29	50.47	55.04	56.54	60.80	76.82
3	19.80	33.43	47.82	53.49	55.46	57.90	75.69

Recubrimiento: Alginato de sodio + Ca^{++}

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	3.65	18.66	28.92	35.72	43.36	49.89	60.88
2	5.83	22.08	24.84	35.56	42.55	50.70	59.51
3	4.51	17.69	28.20	33.97	43.33	50.43	60.53

Anexo 2. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Duncan en las dietas medicadas con recubridores (gelatina, aceite de pescado, alginato de sodio + Ca^{++}), para cada tiempo de exposición.

Codificacion	Tratamiento
1	Control
2	Aceite de Pesc.
3	Gelatina
4	Alginato + Ca

Lixiviación: minuto 15

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	316.082	105.361	55.985	0.0000
Within	8	15.055	1.882		
Total	11	331.137			

Coefficient of Variation = 12.47%

2	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	53.180	17.727	1.94	0.79
2	3.00	22.970	7.657	1.50	0.79
3	3.00	41.890	13.963	0.56	0.79
4	3.00	13.990	4.663	1.10	0.79
Total	12.00	132.030	11.002	5.49	1.58
Within			1.37		

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 2.583
s_ = 0.7920 at alpha = 0.050
x

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	17.73	A	Mean 1 =	17.73	A
Mean 2 =	7.657	C	Mean 3 =	13.96	B
Mean 3 =	13.96	B	Mean 2 =	7.657	C
Mean 4 =	4.663	D	Mean 4 =	4.663	D

Lixiviación: minuto 30

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	628.302	209.434	57.443	0.0000
Within	8	29.168	3.646		
Total	11	657.470			

Coefficient of Variation = 7.37%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	106.590	35.530	1.84	1.10
2	3.00	55.170	18.390	2.37	1.10
3	3.00	90.790	30.263	0.49	1.10
4	3.00	58.430	19.477	2.31	1.10
Total	12.00	310.980	25.915	7.73	2.23
Within			1.91		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 3.595
s_ = 1.102 at alpha = 0.050
x

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 =	35.53	A	Mean 1 =	35.53	A
Mean 2 =	18.39	C	Mean 3 =	30.26	B
Mean 3 =	30.26	B	Mean 4 =	19.48	C
Mean 4 =	19.48	C	Mean 2 =	18.39	C

Lixiviación: minuto 45

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	1371.163	457.054	87.616	0.0000
Within	8	41.733	5.217		
Total	11	1412.896			

Coefficient of Variation = 6.22%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	153.810	51.270	3.91	1.32
2	3.00	76.930	25.643	0.46	1.32
3	3.00	127.730	42.577	0.78	1.32
4	3.00	81.960	27.320	2.18	1.32
Total	12.00	440.430	36.703	11.33	3.27
Within			2.28		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 4.301
$s_{\bar{x}}$ = 1.319 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	51.27	A	Mean	1 =	51.27	A
Mean	2 =	25.64	C	Mean	3 =	42.58	B
Mean	3 =	42.58	B	Mean	4 =	27.32	C
Mean	4 =	27.32	C	Mean	2 =	25.64	C

Lixiviación: minuto 60

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	1115.627	371.876	306.845	0.0000
Within	8	9.695	1.212		
Total	11	1125.322			

Coefficient of Variation = 2.56%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	160.170	53.390	1.70	0.64
2	3.00	95.760	31.920	0.98	0.64
3	3.00	155.580	51.860	0.22	0.64
4	3.00	105.250	35.083	0.97	0.64
Total	12.00	516.760	43.063	10.11	2.92
Within			1.10		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 2.073
$s_{\bar{x}} = 0.6356$ at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	53.39	A	Mean	1 =	53.39	A
Mean	2 =	31.92	C	Mean	3 =	51.86	A
Mean	3 =	51.86	A	Mean	4 =	35.08	B
Mean	4 =	35.08	B	Mean	2 =	31.92	C

Lixiviación: minuto 90

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	622.562	207.521	154.756	0.0000
Within	8	10.728	1.341		
Total	11	633.289			

Coefficient of Variation = 2.41%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	167.360	55.787	0.65	0.67
2	3.00	117.230	39.077	1.32	0.67
3	3.00	163.700	54.567	1.73	0.67
4	3.00	129.240	43.080	0.46	0.67
Total	12.00	577.530	48.128	7.59	2.19
Within			1.16		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 2.180
$s_{\bar{x}}$ = 0.6686 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	55.79	A	Mean	1 =	55.79	A
Mean	2 =	39.08	C	Mean	3 =	54.57	A
Mean	3 =	54.57	A	Mean	4 =	43.08	B
Mean	4 =	43.08	B	Mean	2 =	39.08	C

Lixiviación: minuto 120

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	215.849	71.950	9.213	0.0057
Within	8	62.479	7.810		
Total	11	278.327			

Coefficient of Variation = 5.15%

2	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	178.650	59.550	1.49	1.61
2	3.00	149.720	49.907	5.30	1.61
3	3.00	172.100	57.367	0.86	1.61
4	3.00	151.020	50.340	0.41	1.61
Total	12.00	651.490	54.291	5.03	1.45
Within			2.79		

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 5.262

$s_{\bar{x}}$ = 1.613 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	59.55	A	Mean	1 =	59.55	A
Mean	2 =	49.91	B	Mean	3 =	57.37	A
Mean	3 =	57.37	A	Mean	4 =	50.34	B
Mean	4 =	50.34	B	Mean	2 =	49.91	B

Lixiviación: minuto 240

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	702.269	234.090	83.002	0.0000
Within	8	22.562	2.820		
Total	11	724.831			

Coefficient of Variation = 2.47%

2	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	232.110	77.370	2.01	0.97
2	3.00	181.090	60.363	1.95	0.97
3	3.00	220.120	73.373	1.71	0.97
4	3.00	180.920	60.307	0.71	0.97
Total	12.00	814.240	67.853	8.12	2.34
Within			1.68		

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 3.162

$s_{\bar{x}}$ = 0.9695 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	77.37	A	Mean	1 =	77.37	A
Mean	2 =	60.36	C	Mean	3 =	73.37	B
Mean	3 =	73.37	B	Mean	2 =	60.36	C
Mean	4 =	60.31	C	Mean	4 =	60.31	C

Anexo 3. Porcentajes de lixiviación en dietas medicadas con FLO aplicando diferentes concentraciones de antibiótico (50, 100 y 200 ppm)

Concentración: 50ppm

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	9.76	23.98	32.18	35.82	42.72	51.08	63.49
2	8.92	21.63	27.28	34.45	40.69	48.86	59.94
3	17.78	24.57	30.60	36.68	42.46	52.83	60.77

Concentración: 100ppm

	Tiempo de exposición						
Replicas	15	30	45	60	90	120	240
1	5.29	24.94	33.12	38.95	45.40	57.89	68.57
2	10.31	27.20	35.23	42.54	51.21	57.74	69.16
3	9.28	25.52	32.34	39.69	51.21	57.99	68.99

Concentración: 200ppm

	Tiempo de exposición						
Replicas	*15*	*30*	*45*	*60*	*90*	*120*	*240*
1	9.22	24.23	34.23	39.30	50.52	58.81	71.30
2	7.70	26.01	32.97	38.70	50.50	58.70	69.70
3	9.53	25.09	34.25	42.74	53.74	60.37	72.12

Anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Duncan en las dietas medicadas con tres concentraciones de FLO (50, 100 y 200 ppm) para cada tiempo de exposición.

Codificacion	Tratamiento
1	50 ppm
2	100 ppm
3	200 ppm

Lixiviación: minuto 15

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	26.307	13.153	1.237	0.3551
Within	6	63.821	10.637		
Total	8	90.128			

Coefficient of Variation = 33.44%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	36.460	12.153	4.89	1.88
2	3.00	24.880	8.293	2.65	1.88
3	3.00	26.450	8.817	0.98	1.88
Total	9.00	87.790	9.754	3.36	1.12
Within			3.26		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 6.516
$s_{\bar{x}}$ = 1.883 at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	12.15 A	Mean	1 =	12.15 A
Mean	2 =	8.293 A	Mean	3 =	8.817 A
Mean	3 =	8.817 A	Mean	2 =	8.293 A

Lixiviación: minuto 30

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	9.767	4.883	3.192	0.1137
Within	6	9.178	1.530		
Total	8	18.945			

Coefficient of Variation = 4.99%

2	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	70.180	23.393	1.56	0.71
2	3.00	77.660	25.887	1.17	0.71
3	3.00	75.330	25.110	0.89	0.71
Total	9.00	223.170	24.797	1.54	0.51
Within			1.24		

Duncan's Multiple Range Test

LSD value = 2.471

$s_{\bar{x}}$ = 0.7141 at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean	1 =	23.39 A	Mean	2 =	25.89 A
Mean	2 =	25.89 A	Mean	3 =	25.11 A
Mean	3 =	25.11 A	Mean	1 =	23.39 A

Lixiviación: minuto 45

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	27.034	13.517	4.492	0.0642
Within	6	18.056	3.009		
Total	8	45.090			

Coefficient of Variation = 5.34%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	90.060	30.020	2.50	1.00
2	3.00	100.690	33.563	1.50	1.00
3	3.00	101.450	33.817	0.73	1.00
Total	9.00	292.200	32.467	2.37	0.79
Within			1.73		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 3.466
$s_{\bar{x}}$ = 1.001 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	30.02	B	Mean	3 =	33.82	A
Mean	2 =	33.56	A	Mean	2 =	33.56	A
Mean	3 =	33.82	A	Mean	1 =	30.02	B

Lixiviación: minuto 60

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	43.650	21.825	6.813	0.0286
Within	6	19.221	3.203		
Total	8	62.871			

Coefficient of Variation = 4.62%

2	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	106.950	35.650	1.12	1.03
2	3.00	121.180	40.393	1.90	1.03
3	3.00	120.740	40.247	2.18	1.03
Total	9.00	348.870	38.763	2.80	0.93
Within			1.79		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 3.576
$s_{\bar{x}}$ = 1.033 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	35.65	B	Mean	2 =	40.39	A
Mean	2 =	40.39	A	Mean	3 =	40.25	A
Mean	3 =	40.25	A	Mean	1 =	35.65	B

Lixiviación: minuto 90

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	151.622	75.811	14.259	0.0053
Within	6	31.900	5.317		
Total	8	183.522			

Coefficient of Variation = 4.84%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	125.870	41.957	1.10	1.33
2	3.00	147.820	49.273	3.35	1.33
3	3.00	154.760	51.587	1.86	1.33
Total	9.00	428.450	47.606	4.79	1.60
Within			2.31		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 4.607
$s_{\bar{x}}$ = 1.331 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	41.96	B	Mean	3 =	51.59	A
Mean	2 =	49.27	A	Mean	2 =	49.27	A
Mean	3 =	51.59	A	Mean	1 =	41.96	B

Lixiviación: minuto 120

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	120.478	60.239	37.432	0.0004
Within	6	9.656	1.609		
Total	8	130.134			

Coefficient of Variation = 2.26%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	152.760	50.920	1.98	0.73
2	3.00	173.620	57.873	0.13	0.73
3	3.00	177.880	59.293	0.93	0.73
Total	9.00	504.260	56.029	4.03	1.34
Within			1.27		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 2.534
$s_{\bar{x}}$ = 0.7323 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	50.92	B	Mean	3 =	59.29	A
Mean	2 =	57.87	A	Mean	2 =	57.87	A
Mean	3 =	59.29	A	Mean	1 =	50.92	B

Lixiviación: minuto 240

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	153.831	76.915	45.644	0.0002
Within	6	10.111	1.685		
Total	8	163.941			

Coefficient of Variation = 1.93%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	3.00	184.200	61.400	1.86	0.75
2	3.00	206.720	68.907	0.30	0.75
3	3.00	213.120	71.040	1.23	0.75
Total	9.00	604.040	67.116	4.53	1.51
Within			1.30		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 2.593
$s_{\bar{x}}$ = 0.7494 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	61.40	B	Mean	3 =	71.04	A
Mean	2 =	68.91	A	Mean	2 =	68.91	A
Mean	3 =	71.04	A	Mean	1 =	61.40	B

Anexo 5. Porcentaje de recuperación en dieta medicada con 100 ppm de FLO

Concentración Teórica (100% de recuperación)

Replicas	g muestra	ppm dieta	ug FLO muestra	Dilución ml	ug/ml
1	0,2546	110	28,01	10	2,80
2	0,2532	110	27,85	10	2,79
3	0,2535	110	27,89	10	2,79
4	0,2565	110	28,22	10	2,82
5	0,2546	110	28,01	10	2,80
6	0,2550	110	28,05	10	2,81

Concentración real de la muestra de alimento medicado (100 ppm)

Replicas	cuentas área	Coceen. Real	Concen. Teórica	% recuperación
1	146747	2,93	2,80	104,8%
2	127463	2,55	2,79	91,5%
3	138257	2,77	2,79	99,2%
4	144551	2,89	2,82	102,5%
5	115943	2,32	2,80	82,8%
6	154443	3,09	2,81	110,1%
			Promedio	98,5%
			SD	10%
			C.V	10,0%

Anexo 6. Pérdidas por procesos de manufactura en dietas medicadas con 100 y 200 ppm de FLO

	Concentración Teórica				
Dieta	mg FLO/Kg Dieta	peso muestra	ug FLO muestra	Dilusion ml	ug/ml FLO
100 ppm (1)	110	0,2557	28,13	10	2,81
100 ppm (2)	110	0,2527	27,80	10	2,78
100 ppm (3)	110	0,2523	27,75	10	2,78
200 ppm (1)	220	0,2564	56,41	20	2,82
200 ppm (2)	220	0,2537	55,81	20	2,79
200 ppm (3)	220	0,2526	55,57	20	2,78

Dieta	cuenta de area	Conc. real	Con. Real + Porce Rec	Conc. Teórica	% FLO recuperado	Pérdida **Pre-mezcla**
100 ppm 1	146747	2,93	2,98	2,81	106,0%	-5,96%
100 ppm 2	107463	2,15	2,18	2,78	78,5%	21,49%
100 ppm 3	138257	2,77	2,81	2,78	101,2%	-1,17%
Prom					95,2%	4,78%
SD					0,147	15%
200 ppm 1	146623	2,93	2,98	2,82	105,6%	-5,58%
200 ppm 2	133463	2,67	2,71	2,79	97,1%	2,87%
200 ppm 3	135257	2,71	2,75	2,78	98,9%	1,14%
Prom					100,5%	-0,52%
SD					0,045	4%
Prom Total					97,87%	2,1%
SD						0,101

100 % de recuperación Concentración Teórica					
Dieta	mg FLO/Kg Dieta	peso muestra	ug FLO muestra	Dilusion ml	ug/ml FLO
100 ppm (1)	110	0,1091	12,00	10	1,2
100 ppm (2)	110	0,1020	11,22	10	1,1
100 ppm (3)	110	0,1032	11,35	10	1,1
200 ppm (1)	220	0,1006	22,13	10	2,2
200 ppm (2)	220	0,1010	22,22	10	2,2
200 ppm (3)	220	0,1041	22,91	10	2,3

Dieta	cuenta area	Conc. real	Con. Real + Porce Rec	Conc. Nominal	% FLO recuperado	Pérdida **Peletizado 1**
100 ppm 1	37586	0,74	0,76	1,20	63,0%	36,99%
100 ppm 2	39254	0,78	0,79	1,12	70,4%	29,57%
100 ppm 3	39901	0,79	0,80	1,14	70,7%	29,26%
Prom					68,1%	31,94%
SD						0,044
200 ppm 1	79310	1,49	1,51	2,21	68,3%	31,66%
200 ppm 2	75849	1,42	1,44	2,22	64,9%	35,10%
200 ppm 3	90908	1,72	1,75	2,29	76,3%	23,70%
Prom					69,8%	30,16%
SD						0,058
Prom Total					69,0%	31,0%
SD						0,047

100 % de recuperación Concentración teórica					
Dieta	mg FLO/Kg Dieta	peso Muestra g	ug FLO muestra	Dilución ml	ug/ml FLO
100 ppm (1)	110	0,1080	11,88	10	1,2
100 ppm (2)	110	0,1061	11,67	10	1,2
100 ppm (3)	110	0,1028	11,30	10	1,1
200 ppm (1)	220	*0,1028*	22,62	*10*	2,3
200 ppm (2)	220	0,1021	22,46	10	2,2
200 ppm (3)	220	0,1072	23,58	10	2,4

Dieta	cuenta de area	Conc. real	Con. Real + Porce Rec	Conc. Teórica	% FLO recuperado	Pérdida **Peletizado 2**
100 ppm 1	38151	0,76	0,77	1,19	64,6%	35,37%
100 ppm 2	33481	0,66	0,67	1,17	57,7%	42,34%
100 ppm 3	37473	0,74	0,75	1,13	66,7%	33,30%
Prom					63,0%	37,00%
SD					0,047	0,047
200 ppm 1	87141	1,74	1,76	2,26	77,9%	22,09%
200 ppm 2	79880	1,59	1,62	2,25	71,9%	28,09%
200 ppm 3	81163	1,62	1,64	2,36	69,6%	30,40%
Prom					73,1%	26,86%
SD					0,043	0,043
Prom Total					68,1%	31,9%

100 % de recuperación Concentración teórica					
Dieta	mg FLO/Kg Dieta	peso muestra	ug FLO muestra	Dilusion ml	ug/ml FLO
100 ppm (1)	110	0,10240	11,26	10	1,13
100 ppm (2)	110	0,10103	11,11	10	1,11
100 ppm (3)	110	0,10033	11,04	10	1,10
200 ppm (1)	220	0,10340	22,75	10	2,27
200 ppm (2)	220	0,10352	22,77	10	2,28
200 ppm (3)	220	0,10465	23,02	10	2,30

Dieta	cuenta de area	Conc. real	Con. Real + Porce Rec	Conc. Teórica	% FLO recuperado	**Pérdida Secado**
100 ppm 1	16246	0,32	0,32	1,13	28,7%	71,34%
100 ppm 2	15729	0,31	0,31	1,11	28,1%	71,90%
100 ppm 3	23370	0,46	0,47	1,10	42,4%	57,64%
Prom					33,0%	66,96%
SD						8,1%
200 ppm 1	33372	0,66	0,67	2,27	29,5%	70,52%
200 ppm 2	32078	0,63	0,64	2,28	28,3%	71,71%
200 ppm 3	28459	0,56	0,57	2,30	24,8%	75,20%
Prom					27,5%	72,48%
SD						2,4%
Prom Total					30,28%	69,7%
SD					0,061	0,061

Anexo 7. Valores porcentuales de consumo de alimento en dietas medicadas con FLO recubiertas con gelatina, aceite de pescado y alginato de sodio + Ca^{++}

Consumo de alimento durante la primera semana

	DíAS							
Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	Promedio
Control (1)	77	65	66	68	72	71	72	70,14
Aceite (2)	72	67	62	67	65	65	60	65,43
Gelatina (3)	74	70	65	76	77	79	81	74,57
Alg+Ca (4)	79	71	69	71	77	75	76	74,00

Consumo de alimento durante la segunda semana

	DIAS							
	8	9	10	11	12	13	14	Promedio
Control (1)	57	55	57	61	64	67	66	61,00
Aceite (2)	56	55	53	59	57	66	58	57,71
Gelatina (3)	61	59	62	68	69	69	68	65,14
Alg+Ca (4)	61	56	53	64	64	63	68	61,29

Anexo 8. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Duncan en el consumo de alimento de dietas medicadas usando tres recubridores (gelatina, aceite de pescado, alginato de sodio + Ca^{++}) y una dieta control.

Primera semana

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	321.125	107.042	17.865	0.0000
Within	20	119.833	5.992		
Total	23	440.958			

Coefficient of Variation = 3.45%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	6.00	420.000	70.000	2.00	1.00
2	6.00	393.000	65.500	2.17	1.00
3	6.00	447.000	74.500	3.51	1.00
4	6.00	445.000	74.167	1.72	1.00
Total	24.00	1705.000	71.042	4.38	0.89
Within			2.45		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 2.948
$s_{\bar{x}}$ = 0.9992 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	70.00	B	Mean	3 =	74.50	A

Mean	2 =	65.50	C	Mean	4 =	74.17	A
Mean	3 =	74.50	A	Mean	1 =	70.00	B
Mean	4 =	74.17	A	Mean	2 =	65.50	C

Segunda semana

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	169.458	56.486	4.387	0.0158
Within	20	257.500	12.875		
Total	23	426.958			

Coetticient of Variation = 5.85%

	Number	Sum	Average	SD	SE
1	6.00	368.000	61.333	3.50	1.46
2	6.00	346.000	57.667	3.27	1.46
3	6.00	391.000	65.167	4.31	1.46
4	6.00	366.000	61.000	3.16	1.46
Total	24.00	1471.000	61.292	4.31	0.88
Within			3.59		

Duncan's Multiple Range Test
LSD value = 4.321
$s_{\bar{x}}$ = 1.465 at alpha = 0.050

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	61.33	AB	Mean	3 =	65.17	A
Mean	2 =	57.67	B	Mean	1 =	61.33	AB
Mean	3 =	65.17	A	Mean	4 =	61.00	AB
Mean	4 =	61.00	AB	Mean	2 =	57.67	B