ACUMULACIÓN/ELIMINACIÓN DE OXITETRACICLINA EN EL CAMARÓN BLANCO, *LITOPENAEUS VANNAMEI*, Y SU RESIDUALIDAD EN DIETAS ARTIFICIALES

Nelson Montoya[1] y Eduardo Reyes[2]
[1] Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM
[2]Aqualab

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el control de enfermedades mediante el uso de antibióticos es uno de los objetivos de las investigaciones (GESAMP 1997). Antecedentes de falta de control sobre la actividad acuícola y sus residuos químicos en las naciones subdesarrolladas, así como las nuevas tendencias mundiales sobre la seguridad alimenticia, han generado que países importadores de sus productos establezcan nuevos requerimientos.

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

La camaronicultura ecuatoriana, la cual exporta la mayor parte de su producción a Estados Unidos y Europa, se encuentra sometida a este tipo de controles. Por esto es necesario para asegurar el futuro de la industria, el desarrollo de protocolos de medicación basados en conocimentos del comportamiento residual del antibiótico empleado, así como su farmacocinética durante el tratamiento terapéutico y el establecimiento de los tiempos de retiro para asegurar la ausencia de residuos químicos en los camarones.

En Ecuador, la oxitetraciclina es uno de los antibióticos mayormente empleados por la industria camaronera. Este antibiótico ha sido objeto de numerosos estudios destinados a evaluar su residualidad mayormente en peces (Ueno *et al.* 1999). Información relevante sobre la cinética de la OTC en camarones, así como el respectivo comportamiento residual de este antibiótico en dietas artificiales para camarones, son desconocidos.

La presente investigación pretende evaluar las curvas de acumulación y pérdida de la OTC en el camarón *L. vannamei*, empleando el suministro de antibióticos vía alimento balanceado y determinar la estabilidad de la OTC durante los procesos de manufactura y lixiviación en alimento artificial para camarones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayo

El bioensayo fue dirigido a estudiar la acumulación y pérdida de la oxitetraciclina (OTC) en juveniles de *L. vannamei,* alimentados con dietas medicadas de distintas concentraciones (A= 0.81; B= 4.47 y C= 9.52 mg OTC.Kg^{-1}), empleando como control una dieta no medicada. Los tratamientos con OTC fueron preparados en la planta piloto del CENAIM, basados en la formulación CENAIM-40.

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

Dietas

Las pérdidas por procesos de manufactura y lixiviación en OTC se realizaron en dietas balanceadas obtenidas a partir de las dietas preparadas (planta piloto del CENAIM) para el bioensayo de acumulación/eliminación.

El establecimiento de las pérdidas por manufactura se basó en el análisis por triplicado de la concentración de OTC presente en muestras de diferentes etapas (mezclado, molido, expandido, acondicionado, peletizado y producto final) del proceso de elaboración de una dieta medicada.

La evaluación de la pérdida del antibiótico por lixiviación se realizó por triplicado mediante el uso de la metodología aplicada en el CENAIM para determinar la estabilidad de las dietas artificiales.

Procedimientos analíticos

La extracción de OTC presente en dietas y/o a nivel corporal se realizó mediante el método descrito por Montoya y Reyes (1999). Los extractos obtenidos se analizaron mediante el uso de un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento(HPLC).

El sistema analítico HPLC consistió de una bomba LC-10AT Shimadzu (S. Seisakusho, Japón), inyector manual Rheodyne 7725i Shimadzu con un bucle de 20 µl y un detector UV/VIS SPD-6AV Shimadzu (360 nm). La separación se la realizó en dos columnas Shim-pack CLC-ODS (15 cm x 6 mm), conectadas en serie dentro un horno CTO-6A Shimadzu (30˚C). La fase móbil: ácido oxálico 0.2M, metanol y acetonitrilo en relación 3.5:1:1 a un pH final de 2.0, se utilizó a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min. Los datos generados fueron registrados y analizados por un integrador/registrador Shimadzu CR-501.

Análisis Estadístico

Las diferencias entre los efectos de los tratamientos fueron establecidas mediante análisis de varianza (ANOVA). En caso de diferencias entre tratamientos, estas fueron identificadas mediante la prueba de rango multiple de Duncan. Los resultados fueron considerados significativos a un valor de $P \leq 0.05$.

Resultados

Acumulación/eliminación de OTC

La supervivencia de los animales en todos los tanques fue alta (87-92%). La tabla 1 indica las concentraciones máximas y mínimas determinadas en las muestras de camarón durante el bioensayo.

Tabla 1. Concentraciones promedio de OTC en *L. vannamei* alcanzadas durante un tratamiento terapéutico (14 días)

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

C_{max}: Concentración máxima de OTC alcanzada después de iniciar el tratamiento.
C_{min}: Concentración mínima de OTC alcanzada después de suspender el tratamiento.
T_{max}: Número de días transcurridos hasta alcanzar la C_{max} después de iniciar el tratamiento.
T_{min}: Número de días transcurridos hasta alcanzar la C_{min} después de suspender el tratamiento.

En todos los tratamientos se pudo observar una rápida acumulación del antibiótico después de iniciar el bioensayo. Transcurridos los primeros 6 días de medicación, ya se habían alcanzado las máximas concentraciones de OTC en los tres tratamientos. La concentración promedio, mantenida en los camarones desde el día 2 hasta el día 15 en el tratamiento A, fue de 2.6 ppm de OTC. En el mismo período la concentración promedio, alcanzada por el tratamiento B, fue de 9.1 ppm de OTC, mientras C alcanzó niveles de 14.1 ppm de OTC. De esta forma, no se observa un aumento de los niveles de OTC en el músculo del camarón en la misma magnitud en que se incrementan las concentraciones del antibiótico en la dieta.

Pocos días después de suspender el suministro de alimento medicado (6 días), en todos los tratamientos se determinaron concentraciones musculares del antibiótico por debajo de 2 ppm, nivel tolerado por la FDA para muestras de camarón cultivado.

Como resultado de los diferentes tratamientos, se observó una relación inversa entre el consumo de alimento y el nivel de OTC en las dietas. Los tanques de la dieta control consumieron más alimento, seguidos por los del tratamiento A. Entre los tratamientos B y C la diferencia fue menos visible, ya que tan solo en los primeros días fue claro un mayor consumo de alimento por parte de los animales sometidos a la dieta B.

Pérdidas por manufactura y lixiviación

Las pérdidas acumuladas de OTC que se originaron como efecto del proceso de elaboración en cada una de las dietas se muestran en la tabla 2.

Luego del proceso de compactación, el cual incrementó la temperatura de la mezcla a no más de 40ºC, la pérdida acumulada del antibiótico fue negativa (promedio: -1.16%). Interpretándose como ausencia de degradación de OTC en este paso del proceso, pues la pérdida que se cuantificó fue inferior a la determinada en la mezcla de las dietas. El valor negativo se origina probablemente por la variabilidad intrínseca del método de extracción. En el proceso de secado, en cambio, la pérdida promedio fue significativamente superior a la de los pasos anteriores ($P<0.05$), aunque no fue homogénea para cada una de las dietas. Estos resultados denotan cómo la mayor parte de las pérdidas de OTC se produjeron en el secado de las dietas.

Tabla 2. Pérdidas de OTC durante el proceso de elaboración de las dietas medicadas

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

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

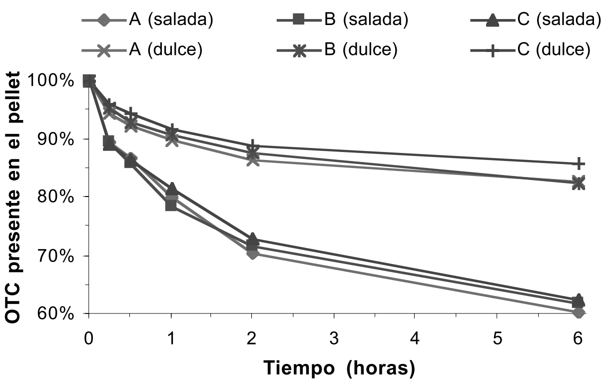

Figura 1. Porcentajes de OTC lixiviado en tres dietas (A,B y C) medicadas empleando dos tipos de medios: agua de mar y agua dulce.

Discusión

El empleo de la OTC para esta investigación se fundamenta en el hecho de que las tetraciclinas aún representan familias de antibióticos, mayormente empleadas en la industria pecuaria a nivel mundial (Kühne *et al.* 2000); a más de que la OTC podría ser uno de los primeros antibióticos autorizados por la FDA para el tratamiento de las enfermedades del camarón cultivado en cautiverio (Williams y Lightner 1988; Greenlees 1997).

Efectos de la OTC en los animales

La inclusión de OTC en las dietas redujo ligeramente el consumo de alimento de los animales, a pesar de que las diferencias no fueron significativas ($P<0.05$). En cambio, este efecto fue claramente reportado por Mohney *et al.* (1997), quienes utilizaron una dieta con 1.45 ppt de OTC para alimentar *P. stylirostris* (11 g, peso promedio) durante 14 días.

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

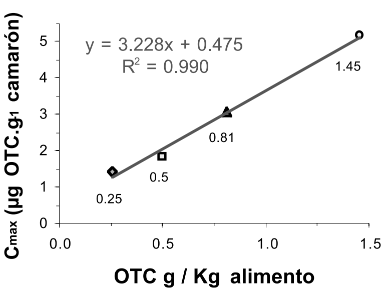

Figura 2. Correlación de las C_{max} de OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos. Rombo: Higuera-Ciapara *et al.* 1991; *P. monodon* 12.2 g, 27 – 29°C. Cuadrado: Bermúdez-Almada *et al.* 1999; *L. vannamei*, 17 g, 18 – 24°C. Triángulo: Presente trabajo, *L. vannamei*, 5.6 g, 22 – 24 °C. Círculo: Mohney *et al.* 1997; *P. stylirostris*, 11 g, 23 – 25 °C. El nivel de OTC (g/Kg) de cada una de las dietas se muestra en el gráfico.

En la figura 2 se muestra una comparación de las C_{max} de OTC en el músculo de diferentes especies de peneidos, alimentados con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Se puede observar que el dato generado con la dieta A en el presente trabajo, puede utilizarse junto con las C_{max} de otras publicaciones para calcular una ecuación de regresión que muestra una importante respuesta lineal.

Cuando se incluye en la figura 2 el dato de C_{max} correspondiente a la dieta B, la respuesta de la ecuación mantiene su linealidad (R^2=0.99). No obstante, cuando se adiciona la C_{max} originada por la dieta C, la ecuación pierde su respuesta lineal, como se observa en la figura 3, indicando una reducción en la capacidad de acumular el antibiótico a medida que se incrementa la dosis de OTC para el *L. vannamei*.

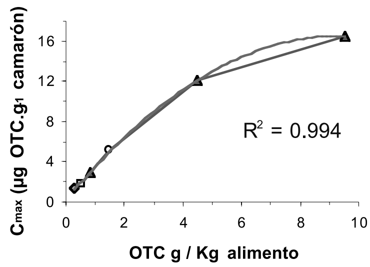

Figura 3. Datos de C_{max} OTC obtenidas en diferentes ensayos con peneidos, junto con las C_{max} originadas por las tres dietas medicadas en el presente estudio. La simbología es correspondiente a la descrita en la figura 2.

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

Pérdidas por manufactura y lixiviación

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

La pérdida observada durante el proceso de mezclado podría explicarse como un efecto de la posible interacción entre el antibiótico y los componentes de las dietas, debido a la capacidad de la OTC de formar complejos con cationes di- y trivalentes (Lunestad y Goksoyr 1990), y de unirse a proteínas.

Las muestras tomadas luego del proceso de secado mostraron mantener el 81.3% (SD = 6.8) del antibiótico agregado inicialmente, cuantificándose una pérdida acumulada del 18.7%. Estableciéndose que las condiciones de operación del secador (4 horas a 60°C) de la planta piloto del CENAIM, representaron la fuente de mayor pérdida de OTC durante el proceso de preparación de la dieta, 12.8% (SD = 6.7). No obstante, cabe recalcar que estos valores han sido obtenidos bajo condiciones no comerciales, por lo que podrán ser utilizados como indicadores al momento de ser aplicados a nivel comercial.

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

Consideramos que los datos presentados son de gran importancia teórica y práctica, particularmente por sus implicaciones sobre el uso de OTC en dietas balanceadas para camarones. No está demás recordar que en la práctica de la acuicultura, el uso adecuado y responsable de los antibióticos debe estar encaminado a evitar la posible acumulación de drogas en el sedimento y sus efectos adversos sobre la flora bacteriana.

Conclusiones

La lixiviación de OTC en dietas medicadas para camarones estuvo altamente influenciada por la salinidad. La afinidad de la OTC por los iones de Ca y Mg debió jugar un papel importante en este proceso.

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

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

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

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

Niveles de OTC inferiores a los tolerados por la FDA en el tejido crudo de camarones, fueron cuantificados después de 7 días de suspender el tratamiento con las dietas A, B y C.

Dentro del período de eliminación, niveles de OTC inferiores a los establecidos como máximos por las regulaciones de la CEE, sólamente fueron alcanzados por la dieta A.

Bibliografia

Bermúdez-Almada, M.C., M.g. Pérez-Tello, A.I. Valenzuela-Quintanar & L. Vázquez-Moreno. 1999. Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. Journal of Food Science, 64(4), 638 – 640.

Duis, K., V. Inglis, M. Beveridge & C. Hammer. 1995. Leaching of four different antibacterial from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. Aquaculture Research, 26, 549 – 556.

Frelier, P. 1995. Early diagnosis and prevention of rickettsiosis in shrimp farming. College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, USA.

GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). 1997. Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. En: Gesamp Reports and Studies, No. 65, Roma, 5 - 31.

Greenlees, K. 1997. Laboratory studies for the approval of aquaculture drugs. The Progressive Fish Culturist, 59, 141 – 148.

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

Kühne, M., S. Wegmann, A. Kobe & R. Fries. 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. Food Control, 11, 175 – 180.

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

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

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

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

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