



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR MEDIO DE LA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)
DEL METABOLITO 3-AMINO-2-OXAZOLIDONA DEL
NITROFURANO FURAZOLIDONA EN MÚSCULO Y VISCERAS
DE POLLO DE ENGORDA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
AGUSTIN NIETO CARMONA

ASESORES: MVZ. M. en C. LUIS OCAMPO CAMBEROS
MVZ. PhD. LILIA GUTIERREZ OLVERA

m. 339773

MEXICO, D. F.

2005





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Agustín Nieto
Lacmoha

FECHA: 7- Enero - 03

FIRMA: [Firma]

03 FEB 03

DEDICADA A:

Mis padres,

Blanca Estela Carmona de Nieto

Elias Nieto Ortega

Por brindarme su apoyo en mis decisiones, por saber conducirme por el camino del bien, por saber ser estrictos cuando era necesario y saber ser flexibles cuando se ameritaba, por todo su amor

Incondicional y sobre todo...

POR SER MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS A:

A Dios por permitirme vivir y cumplir esta meta

A mi familia, mis hermanos, mis asesores, al depto de Fisiología y Farmacología y a mis amigos Teresa, Antonio, Cintya, Adrian, Ubaldo, Leonardo, Nancy, Malu, Natalia, Mariel, Norma, Dra Lilla, Dr. Villa, Dr. Ocampo, Dr. Sumano, Dr Paez, Dr Rosiles, Gabriel, Susana Z, Sayuri, Susana G, Aracell, al señor Eleazar Arias y a su familia, Donaji, Juan, Diana Adriana, a la familia Estrada Sanchez, a la familia Martínez Vazquez, a mi escuela de Karate Selkka No Itten en especial a mi Sensei Ricardo Hernández a todos mis compañeros del Pentatlón Deportivo Militarizado Universitario en especial al Batallón Azcapotzalco y por ultimo y no menos importante a la Lic. CC, Rocio Hernandez, por todo su apoyo y cariño, por enseñarme otra vez la belleza de la vida, por ser mi bastion en los momentos difíciles de este trabajo.

Y a toda aquella persona que tal vez no nombre, pero que forma parte de este logro.

A TODOS USTEDES ... GRACIAS.

CONTENIDO

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Índice | 1 |
| Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| Introducción | 4 |
| Hipótesis | 10 |
| Metodología | 10 |
| Resultados | 12 |
| Análisis estadístico | 20 |
| Conclusiones | 22 |
| Discusión | 22 |
| Bibliografía | 27 |

Identificación y cuantificación por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del metabolito 3-amino-2-oxazolidona del nitrofurano furazolidona en músculo y vísceras de pollo de engorda. Por PMVZ Agustín Nieto Carmona. Asesores MVZ M en C Luis Ocampo Camberos, MVZ PhD Lilia Gutiérrez Olivera

Los antibióticos, son un grupo de fármacos muy utilizados en nuestro país, de manera indiscriminada; desgraciadamente no todos los médicos veterinarios conocen sus metabolismos, mucho menos los metabolitos que generan y los posibles daños o beneficios que estos puedan ocasionar, tal es el caso de la familia de los nitrofuranos, específicamente de la furazolidona, este fármaco está prohibido por la FDA en la producción de alimento de origen animal para consumo humano, pues se menciona que uno de los metabolitos, el 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) tiene capacidad carcinogénica; el presente trabajo se realizó para determinar y cuantificar el AOZ en carne y vísceras (hígado) de pollo, se utilizaron tres grupos de 30 pollos, cada grupo fue dosificado con una dosis profiláctica de furazolidona, otro con dosis terapéutica y una más que fungió como grupo testigo, se dosificaron por medio del alimento dosis profiláctica (0.011%) 110 g/ton de alimento, durante los primeros 14 días de edad. Seguidos por una dosis continua de 55 g/ton (0.0005%) durante 28 días de su ciclo productivo, dejando los últimos 7 días de retiro, el grupo terapéutico (0.022%) 220 g/ton de alimento, durante los primeros 10 días de edad. Seguidos por una dosis continua de 110 g/ton (0.011%) durante 32 días de su ciclo productivo, dejando los últimos 7 días para la eliminación de los residuos del fármaco. Al grupo testigo solo se le suministró alimento sin furazolidona durante todo el ciclo productivo del ave, las muestras se analizaron por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Los resultados fueron analizados por medio de estadística utilizando el método de Contrastes pareados con U de Mann Whitney entre tejidos; prueba de U de Mann Whitney entre grupos. Los resultados muestran un mayor depósito del metabolito AOZ en carne y vísceras de pollo a dosis terapéutica y que el tiempo de retiro debe ser mayor a los 7 días que se manejó en este estudio.

Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidone (AOZ), in broiler tissues using HPLC in broilers produced in Mexico. PMVZ Agustín Nieto Carmona. Asesores MVZ M en C Luis Ocampo Camberos, MVZ PhD Lilia Gutiérrez Olvera

Nitrofurans are synthetic broad-spectrum antimicrobial agents used in some countries in human and veterinary medicine. There are 4 main nitrofurano chemicals referred to in the scientific literature, namely, furazolidona, furaltadone, nitrofurantoine and nitrofurazone. Nitrofurans are antimicrobial substances which are banned from use in animal food production in the European Union (Commission Regulation 1442/95 for furazolidona, Regulation 2601/93 for other nitrofurans, USDA prohibited the topical use of nitrofurans in 2002 and Australia prohibited the use of nitrofurans in late 1992, mainly due the public health and safety concerns in relation to the carcinogenic potential of either the parent compounds or their metabolites.

Studies have shown that parent molecules are rapidly metabolized by animals and that their in vivo stability is not longer than a few hours. The compounds searched are protein-bound residues.

Unlike parent molecules, these protein-bound metabolites are stable and persistent in the body.

The aim of this study was to determine the furazolidona metabolite AOZ in broiler tissues using HPLC under 2 dosage regimens of furazolidona: prophylactic and therapeutic.

The metabolite under investigation is not commercially available. Several milligrams of AOZ were provided by Quimec (Química Ecosistemas, México). The stock solutions were prepared in methanol and stored at 4°C for a maximum of 2 months. All chemical and solvents used were of analytical-reagen grade and HPLC grade, respectively. A stock standards solutions (100 µg/ml) were prepared by serial dilution of stock. Protease, type XXIV, bacterial (8 units per mg solid), 2-nitrobenzaldehyde (98% purity) were obtained from Sigma (México). The solid phase extraction cartridges, Oasis Max (3cc, 60 mg) and oasis HLB (3cc, 60 mg), were obtained from Waters (México). 90 birds were used divided into 3 groups. Group A treated with a prophylactic dose of furazolidona; group B, treated with a therapeutic dose of furazolidona and, group C, as a control. Results shows a higher positive samples in group B than in group A, also with a higher AOZ concentration. It is concluded that the withdrawal time must be longer than 7 days.

Identificación y cuantificación por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del metabolito 3-amino-2-oxazolidona del nitrofurano furazolidona en músculo y vísceras de pollo de engorda.

I. Introducción

En nuestro país existen elevadas tasas de mortalidad y morbilidad humana cuya etiología pudiera atribuirse, entre otras causas, al consumo de alimentos contaminados. Este problema se debe de considerar seriamente, por su magnitud, frecuencia y gravedad a la salud y economía de toda la población, por lo que su estudio y estrategias de solución requieren prioridad dentro de las actividades sanitarias ¹.

Entre los factores etiológicos que determinan la prevalencia e incidencia de las enfermedades atribuidas a la contaminación de los alimentos se deben de mencionar en primer lugar los higiénico-sanitarios (organismos infecciosos; toxinas de origen microbiano; sustancias tóxicas naturales o químicas), complementados por los económicos, sociales y culturales. Esta multifactorialidad hace que su estudio, prevención y control resulten especialmente complejos.

La contaminación por agentes químicos en los últimos años ha cobrado gran importancia, debido a un alto desarrollo en las prácticas agrícolas o zootécnicas tendientes a mejorar los niveles de calidad y cantidad de los alimentos. Para alcanzar este desarrollo, cada vez existen más compuestos o sustancias químicas producidas por el humano o en forma natural que ponen en riesgo la salud humana o su bienestar².

El uso de fármacos en el ámbito veterinario, del tipo de los antibióticos, es muy amplio, aunque la tendencia actual es que cada día se usen menos, pero en países en vías de desarrollo como el nuestro, aún se usan en gran cantidad. Estos fármacos, se utilizan desde con fines terapéuticos y preventivos hasta promotores del crecimiento.

Los antibióticos, constituyen una gran familia de fármacos, que a su vez se subdividen en subfamilias, dependiendo de su antigüedad y su efectividad, teniendo así: Sulfonamidas, β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos, nitrofuranos, quinolonas, antimicóticos,

etc. En el caso del presente trabajo se analizó un elemento de esa gran familia de fármacos, la furazolidona de la familia de los nitrofuranos³.

Los nitrofuranos son compuestos sintéticos derivados del 5-nitrofurano con buena actividad antimicrobiana. La presencia del grupo 5-nitro es necesaria para dicha actividad. De los 3500 nitrofuranos sintetizados hasta la fecha, solo unos pocos tienen actividad en la quimioterapia animal.¹⁴

Los derivados del furano –anillo heterocíclico con oxígeno– poseen acción bactericida, y se ha demostrado que la adición de un grupo nitro en la posición 5 del anillo furano le confiere potentes acciones antibacterianas, que son reforzadas por la adición de distintas cadenas laterales en la posición 2. Así, nació la nitrofurazona o nitrofural (Furacín).¹⁵

Con la modificación de la cadena lateral en la posición 2 y con la introducción del núcleo de la hidantoína, se produjo la nitrofurantoina (furadantina) que se absorbe en el tracto digestivo, se excreta y se concentra en orina rápidamente, comportándose como un antiséptico urinario. Otra modificación en dicha cadena lateral con el reemplazo del núcleo de la hidantoína por el de oxazolidona da lugar a la furazolidona, un excelente antiséptico intestinal, incluyendo parásitos como la giardiasis y Trichomonas¹⁴ (Véase figura 1 y 2).

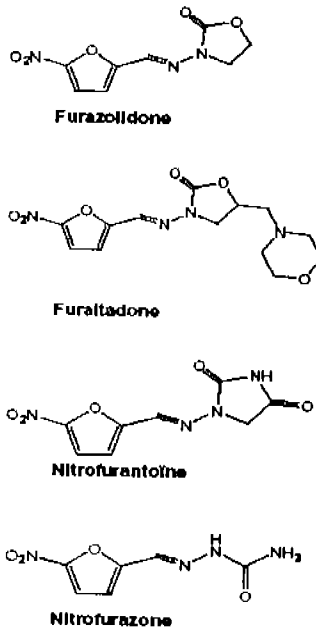


Figura 1.- Conformación estructural de los nitrofuranos

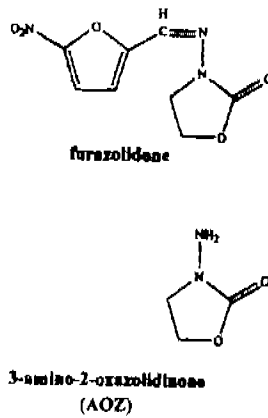


Figura 2.- Estructura de la furazolidona y del metabolito AOZ

Los nitrofuranos actúan bloqueando la descarboxilación oxidativa del piruvato para dar origen a la acetilcoenzima A, privando a los organismos sensibles de rutas vitales de producción de energía. Su espectro de acción abarca bacterias Gram positivas y Gram negativas además de algunos protozoos, pero son más efectivos contra bacterias Gram negativas. Los nitrofuranos se pueden administrar por vía oral y tópica, la absorción oral se mejora cuando se administran junto con el alimento; se distribuyen ampliamente a través de todos los tejidos orgánicos, pero a concentraciones bajas. Aproximadamente el 50% de la dosis total de los nitrofuranos se excreta en forma activa. La difusión de los nitrofuranos a través de las membranas celulares requiere un ambiente ácido. Los nitrofuranos se utilizan principalmente en preparaciones tópicas para ojos, oídos, membranas mucosas y piel; además tienen un uso limitado en el tratamiento de infecciones bacterianas de los tractos gastrointestinal y urinario. La mayor desventaja de los nitrofuranos en el tratamiento de infecciones sistémicas es que las concentraciones necesarias para alcanzar la CMI pueden ser tóxicas.¹⁵

Los nitrofuranos se biotransforman en menos de 8 horas dando como resultado 2 metabolitos principales a partir de la reducción del grupo nitro por enzimas como la nitrofurazona reductasa:

- 2,3-dihidro-3-clanometil-2-hidroxi-5-nitro-1 alfa, 2-di(2-oxo-oxazolidin-3-il) iminometil-furo [2, 3-β] furan, también llamado: 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) y
- N-(5-amino-2-furfuriliden)-3-amino-2-oxazolidona (FOZ)¹⁶

La furazolidona no se biotransforma en los tejidos como pudieran ser la pared intestinal o el hígado. Se metaboliza mediante la reducción del grupo nitro a hidroxilamina, una pequeña proporción se elimina por la orina.

La Furazolidona se aprecia como un polvo cristalino de color amarillo intenso, inodoro, poco soluble en agua, pero soluble en dimetil sulfóxido (DMSO). Se mezcla bien con el alimento. Se absorbe escasamente en el tracto digestivo, por lo cual es ideal para el tratamiento de infecciones gastrointestinales.

Farmacocinética

La Furazolidona, se excreta de manera activa en las heces, bilis y orina; empero la furazolidona que es absorbida alcanza niveles plasmáticos dentro de los primeros 30 minutos postadministración, uniéndose en un 30% a proteínas plasmáticas.

La furazolidona absorbida se metaboliza por la nitro-reductasa, dando como resultado los metabolitos ya descritos.³ (Vease figura 3).

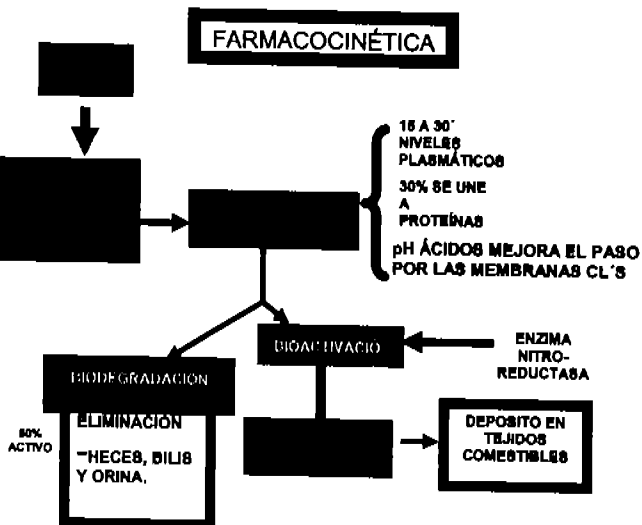


Figura 3. Farmacocinética de la furazolidona

Toxicidad

La administración de la furazolidona, a la dosis recomendada, es muy eficaz y segura; la sobredosificación provoca signos nerviosos en todas las especies, que van desde incoordinación hasta parálisis, también puede provocar decremento en la producción y problemas de la fertilidad en algunas especies aviarias. Puede haber signos nerviosos en pollos y becerras, en patos y pavos se ha informado que induce necrosis cardíaca³, esto se describe con mayor detalle en el cuadro 1.

Cuadro 1.- principales efectos tóxicos de la furazolidona a diferentes dosis y en diferentes especies.

| DOSIS | TIEMPO | EFEECTO | ORGANISMOS |
|-----------|------------|--|--------------------------------------|
| > 650 ppm | <4 SEMANAS | Daño cardíaco | Patos |
| > 200 ppm | + 15 DÍAS | ↓ Espermatogénesis ↓ motilidad espermática | Gallos |
| < 200 ppm | CONTINUA | Sin efecto en la producción de huevo, ganancia de peso fertilidad y viabilidad embrionaria | Gallinas Reproductoras Ligeras |
| < 220 ppm | < 14 DÍAS | Segura y efectiva | Aves |
| 33.3 ppm | CONTINUA | Modificación de la población de espermatoцитos primarios. | Gallos |
| 66.6 ppm | CONTINUA | Modificación sustanciales en testículo de gallo | |
| > 300 ppm | > 10 DÍAS | Sobredosis o ingestión accidental Algunos hepatotoxicidad; Raro agranulocitosis; Anemia en pacientes c/d 6-fosfato deshidrogenasa. | HUMANOS |

En este sentido, el metabolito 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) del nitrofurano furazolidona es un derivado del proceso metabólico en el consumidor primario, es decir, en uno de los eslabones intermedios de la cadena alimenticia, se considera que este metabolito es tóxico para el consumidor secundario o final (humano), además de que se sospecha de que tiene efecto genotóxico⁷.

Hipótesis

- La ingestión de dosis profilácticas y terapéuticas³ de la furazolidona con sus respectivos tiempos de retiro no permiten el depósito del metabolito 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) en carne y vísceras (hígado) comestibles de pollo, lo cual no representa un riesgo a la salud pública.

Objetivos

- Identificar y cuantificar por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el metabolito 3-amino-2-oxazolidona del nitrofurano furazolidona en músculo y vísceras de pollo de engorda sano que haya recibido dosis profilácticas y terapéuticas de la furazolidona, con el tiempo de retiro establecido (> 5 días antes del sacrificio)³.
- Evaluar la seguridad del fármaco furazolidona bajo condiciones ambientales y técnicas normales de producción de pollos destinados al abasto público.

Metodología

Primer etapa

Se trata de un ensayo clínico controlado fase IV⁴ (Un ensayo clínico controlado fase IV es aquel que tiene por objeto evaluar un fármaco en población abierta previamente autorizado, ver referencia) en donde se evaluó la seguridad del fármaco furazolidona bajo condiciones ambientales y técnicas normales de producción de pollos destinados al abasto público, esta fase, se realizó en las instalaciones de la granja avícola "La Veracruz" perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Cabe aclarar que esta etapa corresponde a la primera fase de un modelo experimental de un macroproyecto aceptado y financiado por CONACYT con el número 400310-5-38587-B que lleva por título: "Caracterización y cuantificación del metabolito 3-amino-2-oxazolidona como probable contaminante genotóxico en carne y vísceras de pollo para consumo humano",

Los animales y por consiguiente las muestras se ordenaron de la siguiente manera: Se formaron 3 grupos de 30 aves (seleccionadas aleatoriamente) con las siguientes dosis; la asignación de las dosis y grupos experimentales fué doblemente ciego:

Grupo A: Alimento tratado con furazolidona, dosis profiláctica (0.011%) 110 g/ton de alimento, durante los primeros 14 días de edad. Seguidos por una dosis continua de 55 g/ton (0.0005%) durante 28 días de su ciclo productivo, dejando los últimos 7 días para la eliminación respectiva de los residuos del fármaco.

Grupo B: Alimento adicionado con furazolidona, dosis terapéutica (0.022%) 220 g/ton de alimento, durante los primeros 10 días de edad. Seguidos por una dosis continua de 110 g/ton (0.011%) durante 32 días de su ciclo productivo, dejando los últimos 7 días para la eliminación de los residuos del fármaco.

Grupo C: Suministro de alimento sin furazolidona durante todo el ciclo productivo del ave (grupo testigo)

La preparación del alimento con las diferentes dosis del fármaco se efectuó en una sola ocasión antes de iniciar el ensayo clínico. Así mismo, se monitoreó diariamente a las aves para controlar el tipo de alimento y agua suministrado, además de las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad) de la caseta en donde se alojaron las aves, todos los animales se agruparon como se muestra en la figura 4.



Figura 4.- Distribución de las aves en los diferentes grupos. Dosis profiláctica: 110g/ton por 14 días, Dosis terapéutica: 220 g/ton por 10 días En ambos grupos el tiempo de retiro fue de 7 días antes de sacrificio.

Una vez concluido el ciclo productivo de las aves de los tres grupos se procedió a sacrificarlos por métodos físicos para obtener las muestras de masa muscular y vísceras (hígado y riñón) identificándose con claves para ser trasladadas en hielo seco ese mismo día al laboratorio de toxicología de la FMVZ-UNAM, para ser procesadas por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución, recomendada por Angellini^{6,8}. con el objeto de identificar y cuantificar el metabolito 3-amino-2-oxalidona. Cabe hacer mención que esta técnica esta avalada por el AOAC y está indicada como técnica Oficial a nivel internacional, además de no contarse con más información debido a la falta de investigaciones y experimentos similares.

En este proyecto se aplicaron todas las medidas de manejo para evitar el maltrato de los animales en experimentación, asegurando un trato humanitario, así como evitar el estrés innecesario, garantizando la disposición sanitaria final, asegurando no impactar negativamente a la salud pública.

Resultados:

Después de haber sido analizadas el total de las muestras (90) por cada grupo, tanto de músculo como de hígado de pollos previamente tratados con el nitrofurano furazolidona se detectaron 55

casos positivos al metabolito AOZ, tal como se muestra en el cuadro 2 y 3 en donde se puede apreciar una diferencia en cuanto al número mayor de casos positivos en el grupo terapéutico con relación al grupo control.

En el grupo terapéutico, las muestras de hígado y músculo, no presentan diferencia estadísticamente significativa entre sí con relación a la concentración de AOZ, demostrando así que, el AOZ se deposita en cantidades muy semejantes tanto en hígado como en músculo.

En la figura 7 se muestran los percentiles 25, 50 y 75 donde en el percentil 25 las muestras tienden a una concentración \leq 3.36, 2.15 y 12.81 ng/g para cada grupo respectivamente (profiláctico, control y terapéutico) en 50 de las muestras \leq 14.76, 11.69, 58.49 y 75 y en 75% \leq 65.23, 15.29 y 394.81 ng/g respectivamente, así mismo se observa la distribución y concentración del metabolito AOZ dentro de los diferentes grupos, observándose nuevamente que a dosis terapéuticas hay una elevada concentración del metabolito tanto en carne como en vísceras (hígado) en pollos.

Estas concentraciones están dentro del rango estándar obtenido al finalizar el análisis del 100% de las muestras siendo este desde 13.62-15.94ng /g.

Músculo

Cuadro 2.

Porcentaje relativo de respuesta al 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) en músculo de pollo.

| Grupo | Muestra positivas | Muestra negativas | n |
|--------------|-------------------|-------------------|----|
| Profiláctico | 43.3% | 56.7% | 15 |
| Control | 6.6% | 93.4% | 15 |
| Terapéutico | 36.6% | 63.4% | 15 |
| Total | 28.8% | 71.2% | 45 |

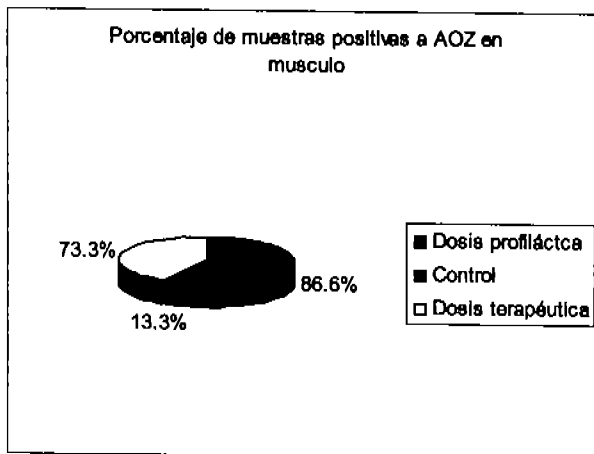


Figura 5.- Porcentaje de músculos de pollo positivos a AOZ con dosis terapéutica y profiláctica de Furazolidona.

Hígado

Cuadro 3.-

Porcentaje de muestras positivas y negativas a AOZ detectadas por medio de HPLC en vísceras (hígado) de pollo, el porcentaje esta expresado en relación con el numero de muestras por cada grupo y tipo de muestra

| Grupo | Muestras positivas | Muestra negativas | n |
|--------------|--------------------|-------------------|----|
| Profiláctico | 86.6% | 13.4% | 15 |
| Control | 20% | 80% | 15 |
| Terapéutico | 86.6% | 13.4% | 15 |
| Total | 64.4% | 35.6% | 45 |

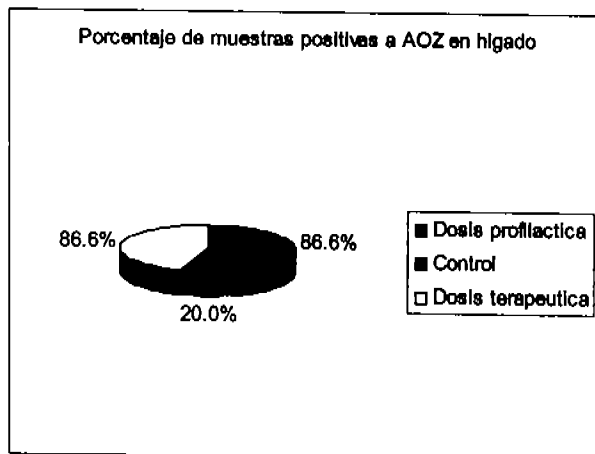


Figura 6. Representación gráfica del número de casos positivos en hígado con relación al número total de aves del grupo.

Cuadro 4.

Frecuencia de concentración de AOZ en hígado y músculo de pollo tratados con dosis profiláctica y terapéutica de Furazolidona.

| Grupo | Percentiles | | |
|--------------|-------------|-------|--------|
| | 25% | 50% | 75% |
| Profiláctico | 3.36 | 14.76 | 65.23 |
| Control | 2.15 | 11.69 | 15.29 |
| Terapéutico | 12.81 | 58.49 | 394.81 |

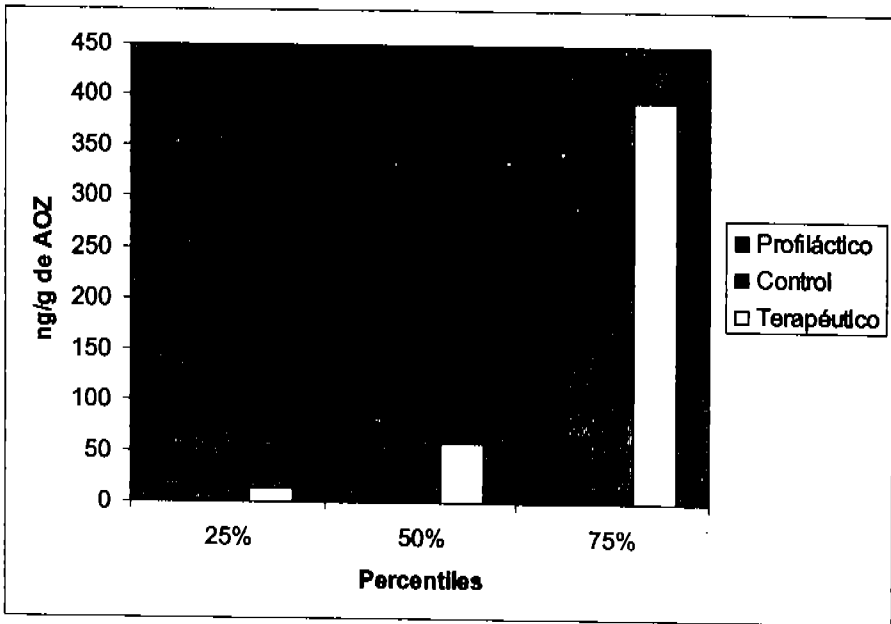


Figura 7. distribución de la concentración de AOZ en hígado y músculo de pollo tratados con Furazolidona

La mediana de la cantidad en ng/g de AOZ encontrado en los diferentes grupos es de 307.17 $\mu\text{g/g}$ para el grupo terapéutico, 49.72 profiláctico y 28.94 para control. Donde se observa que la mayor cantidad de AOZ se encuentra en el grupo terapéutico el cual fue tratado con la dosis de (0.022%) 220 g/ton de alimento, durante los primeros 10 días de edad, seguidos por una dosis continua de 110 g/ton (0.011%) durante 32 días de su ciclo productivo, dejando los últimos 7 días para la eliminación de los residuos del fármaco.

Análisis estadístico

Contrastes pareados con U de Mann Whitney entre tejidos

A1 & A2

$T = 255.0$ $n_{\text{sub S}} = 16$ $n_{\text{sub B}} = 17$

$Z_{\text{sub T}} = 0.594$ $P = 0.555$

Por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre tejidos. $\alpha = 0.05$

B1 & B2

$T = 216.5$ $n_{\text{sub S}} = 15$ $n_{\text{sub B}} = 15$

$Z_{\text{sub T}} = 0.890$ $P = 0.373$

Por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre tejidos. $\alpha = 0.05$

C1 & C2

$T = 231.0$ $n_{\text{sub S}} = 15$ $n_{\text{sub B}} = 15$

$Z_{\text{sub T}} = 0.041$ $P = 0.967$

Por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre tejidos. $\alpha = 0.05$

Considerando que no hay diferencia entre tejidos se contrastarán por medio de un análisis de Kruskal Wallis los tres grupos.

Contraste entre grupos

Donde A = Profiláctico.

B = Control.

C = Terapéutico.

$H = 49.054$ con 2 grados de libertad; $P = 0.0001$ por lo tanto hay diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos.

Para saber cuales grupos determinan las diferencias se hicieron contrastes pareados por la prueba de U de Mann Whitney entre grupos.

A & C

$T = 1112.0$; $n_{\text{sub S}} = 30$ $n_{\text{sub B}} = 30$

$Z_{\text{sub T}} = 2.080$ $P = 0.036$

Por lo tanto hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo profiláctico y el terapéutico. $\alpha = 0.05$ a favor del terapéutico.

$\bar{X} = 0.003008 > 0.000487$

A & B

$T = 528.0$; $n_{\text{sub S}} = 30$ $n_{\text{sub B}} = 30$

$Z_{\text{sub T}} = 5.386$ $P = 0.00004$

Por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo profiláctico y control

$\alpha = 0.5$

C & B

$T = 546.0$; $n_{\text{sub S}} = 30$ $n_{\text{sub B}} = 30$

$Z_{\text{sub T}} = 5.305$; $P = 0.00003$

Por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre terapéutico y control $\alpha = 0.5$

Conclusiones

- Los residuos en músculo e hígado no difieren estadísticamente en cantidad dentro del mismo grupo.
- Existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones del AOZ en los tres grupos considerados cuando se contrastaron juntos; al hacer contrastes pareados se observó que hay diferencia entre los grupos profiláctico y control así como terapéutico y control; al análisis estadístico entre profiláctico y terapéutico muestra diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo terapéutico.

Discusión

Con base en los resultados obtenidos (cuadros 2 y 3) se podría mencionar lo siguiente: Como se esperaba en el grupo terapéutico se detectó un número mayor de casos positivos al metabolito AOZ con relación al resto de los grupos, siendo que las cantidades cuantificadas tanto en hígado como en músculo, de dicho grupo, son semejantes. Lo anterior coincide con lo que informa A. Conneely y colaboradores¹⁰; quienes determinaron el metabolito AOZ, en 3 cerdos de 15 kg aproximadamente, solo que fueron tratados con 300 mg de furazolidona por día, equivalente a 20 mg kg⁻¹, por 5 días. Estos cerdos se sacrificaron en diferentes periodos, siendo estos: 0 días cerdo B, 3 días cerdo C y 10 días cerdo D; obteniendo los siguientes resultados.

(Véase cuadro 5)

Cuadro 5.-

Resultados obtenidos por Conneely y colaboradores estos investigadores hicieron las valoraciones utilizando el método de Cromatografía Líquida de Masas (CL/MS).

| Muestra | AOZ (ng g ⁻¹ hígado) | |
|---------|---------------------------------|----------|
| | LC -UV | LC-MS/Ms |
| Cerdo D | 217 | 203 |
| Cerdo C | 750 | 684 |
| Cerdo B | 990 | 1084 |

Lo que se deduce que el tiempo de retiro para la eliminación de este fármaco, según Conneely¹⁰ es mayor –al menos en cerdos- a 10 días pues en tiempos más cortos todavía hay una alta concentración del AOZ en la carne.

Con relación al cuadro 4 se puede apreciar, con cantidades expresadas en ng/g de la muestra la cantidad del metabolito AOZ aislado en los diferentes grupos, donde se observa que el grupo terapéutico sigue siendo el de mayor concentración, por lo que se puede afirmar que hay un importante depósito del metabolito AOZ en carnes y vísceras de pollo al utilizar dosis terapéuticas, este metabolito a su vez puede ser ingerido por el ser humano, siendo esta la principal razón de este estudio, al igual que lo que mencionan las Investigaciones de Rosa Daisci y J. MCCraken^{11,12}, quienes aislaron residuos de nitrofuranos en huevo, hígado y músculo de pollos, tratando a los animales, previamente, con 5.0 µg, 20 µg y 50 µg de nitrofurazona, furazolidona y furaltadona, respectivamente, por kg de tejido, obteniendo los siguientes resultados: (Véase cuadro 6.)

Cuadro 6.-

Resultados de Rosa Daisci y col. Que muestra los resultados obtenidos por medio de cromatográfica ultravioleta con arreglo de fotodiodos y confirmándolo con detección de espectrometría de masas ionatomiadas.

| Muestra | Dosis (µg kg ⁻¹) | Media ± D.E. (µg/kg-1) | Recuperación (%) |
|---------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Huevo | 5 | 4.4±0.2 | 87.3 |
| | 20 | 17.8±0.6 | 88.9 |
| Hígado | 5 | 4.2±0.2 | 84.5 |
| | 20 | 17.5±0.9 | 87.5 |
| Músculo | 5 | 4.2±0.2 | 84.0 |
| | 20 | 17.4±1.0 | 86.9 |

Los resultados obtenidos en este trabajo actual son coincidentes con los resultados de Rosa Draisci.

Empero, Robert J McCracken y colaboradores¹², Utilizando el método de cromatografía líquida con detección Ultra Violeta y detección de espectrometría de masas en termospray, analizando muestras de músculo de cerdo, tratadas previamente con furazolidona a concentraciones conocidas; 200 mg/kg; 20 mg/kg y 50 mg/kg, y analizándolas en tres ocasiones por separado obtuvieron los siguientes resultados: (Véase cuadro 7.)

Cuadro 7.

Resultados de McCracken, donde se pueden observar las cantidades del metabolito AOZ detectadas en los diferentes tiempos (días) utilizando cromatografía líquida con detección Ultra Violeta y detección de espectrometría de masas en termospray

| Muestra | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Total |
|------------------|-------|-------|-------|-------|
| 200 mg/kg | | | | |
| Media (mg/kg) | 197.8 | 197.2 | 193.2 | 196.0 |
| Recuperación (%) | 99 | 99 | 97 | 98 |
| 20 mg/kg (mg/kg) | 19.4 | 19.2 | 20.4 | 19.6 |
| Recuperación (%) | 97 | 96 | 102 | 98 |
| 5 mg /kg (mg/kg) | 4.8 | 4.6 | 4.7 | 4.7 |
| Recuperación (%) | 95 | 91 | 93 | 93 |

En cuanto a la figura 7 se observa la sensibilidad del método utilizado en esta investigación, la cual, es coincidente con lo que informó Alexander Leitner¹³

El método utilizado en este trabajo tuvo una capacidad o sensibilidad de detección de hasta 0.02466149 µg/20µl. estableciéndose un estándar de 13.62-15.94 ng/g; esto en relación con el método utilizado por Alexander Leitner¹³. Quien utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de tandem de masas.

Alexander determinó los metabolitos de nitrofuranos en tejido muscular por medio de HPLC de masas, estableciendo que su método tenía una sensibilidad de hasta 0.5 ng g^{-1} para el caso del AOZ.

Literatura citada.

- 1.- Fernández, C. D.; Hernández, H.H. y Suárez, C. R.: Capítulo XIII Contaminación de Alimentos Págs. 211-232, en "El medio ambiente en México: Temas, problemas y alternativas". Compilador: Manuel López Portillo y Ramos. Fondo de Cultura Económica. 1era. Edición 1982. México.
- 2.- Vázquez, M.R.: Perspectivas de la Industria farmacéutica transnacional y los antimicrobianos. Memorias del Curso de actualización "Problemática del uso de Antimicrobianos en medicina Veterinaria. Págs. 23 – 24. Del 3 al 6 de abril de 1995. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. FMVZ/UNAM. México.
- 3.- Sumano, Ocampo. Farmacología Veterinaria. 2ª ed. Capítulo 15, pag 172 Editorial McGraw Hill-Interamericana, México 1997.
- 4.- Marrugat, J.: Capítulo 14 Los Estudios Experimentales (tipos de ensayos) Pág. 241 en "Salud Pública". Editorial McGraw-Hill-Interamericana de España. S.A.U. Impreso en México, 1998.
- 5.- Angellini, N.M; Rampini, O.D. and Mugica, H.: Liquid Chromatographic determination of nitrofurans residues in bovine muscle tissues. J AOAC Inter. 80(3) 481-485, 1997.
- 6.- A. Connelly, A. Nugent and M.O'Keefe. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues. The Analyst. The National Food Centre, Dunsinea, Castleknock, Dublin, Ireland. 1998
- 7.- Nikolaos A. Dimitrios J. Drug Residues in foods. Pag. 71-73. Ed. Board E.U. 2001.
- 8.- Scheaffer, Mendenhall. Elementos de Muestreo, Ed. Iberoamericana, México D.F. 1996. pag. 60-65.
- 9.- Gouri K bhattacharyya, Richard A. Jonson. Statistical Concepts and Methods. E.U. 1997.
- 10.- A. Conneely, A. Nugent and M.O'Keefe. Isolation of bound residues of nitrofurano drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta 483 (2003) 91-98.
- 11.- Rosa Draisci, Luigi Giannetti, Luca Lucentini, Luca Palleschi, Gianfranco Brambilla Determination of nitrofurano residues in avian eggs by liquid chromatography-UV

- photodiode array detection and confirmación by liquid chromatography-inspray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 777 (1997) 201-211.
- 12.- Robert J. MacCraken, D. Glenn Kennedy. Determination of furazolidona in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 771 (1997) 349-354.
- 13.- Alexander Leitner, Peter Zöllner, Wolfgang Lindner. Determinación of the metabolites of nitrofurano antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 939 (2001) 49-58.
- 14.- Litter, Manuel. *Farmacología* Ed. El ateneo Buenos Aires 1959.
- 15.- H. Richard Adams. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edition Iowa state University Press/Ames. E.U.A. 2001.
- 16.- Auro A., Sumano, L.H. Ocampo, C.L. & Barragan, A. (2004) Evaluation of the carcinogenic effects of furazolidone and its metabolites in two fish species. *Journal of Pharmacogenomics* 4, 25-29.