



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E  
INDUSTRIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL ANTIBIÓTICO  
NITROFURAZONA EN MÚSCULO BOVINO EN LA PROVINCIA  
DE MANABÍ**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA DE ALIMENTOS**

**MAYRA SILVANA VEINTIMILLA PAREDES**

**DIRECTOR: Dr. LUIS RAMOS**

**Quito, enero 2018**

# **DERECHOS DE AUTOR**

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2018  
Reservados todos los derechos de reproducción

# FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

## PROYECTO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	1720388899
<b>APELLIDO Y NOMBRES:</b>	Veintimilla Mayra Silvana
<b>DIRECCIÓN:</b>	Av. Carlos Mantilla y Alhambra
<b>EMAIL:</b>	maythi_0011@hotmail.com
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	2 033-181
<b>TELÉFONO MOVIL:</b>	0996433854

DATOS DE LA OBRA	
<b>TÍTULO:</b>	Evaluación de la presencia del antibiótico Nitrofurazona en músculo bovino en la provincia de Manabí
<b>AUTOR O AUTORES:</b>	Mayra Silvana Veintimilla Paredes
<b>FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:</b>	15 de diciembre del 2017
<b>DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:</b>	Dr. Luis Ramos
<b>PROGRAMA</b>	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniería en Alimentos
<b>RESUMEN: Mínimo 250 palabras</b>	<p>Para organismos internacionales como el CODEX y la Unión Europea, los residuos de nitrofuranos y sus metabolitos en alimentos destinados para consumo humano, son considerados como un factor de riesgo en salud pública por su potencial efecto nocivo para la salud. El estudio presente, realizó la evaluación en tejido muscular de una muestra representativa del hatu ganadero bovino de Manabí con el objetivo de determinar la presencia de nitrofurazona (NFZ), a través de su metabolito semicarbazida (SEM) con la finalidad de levantar información actual de la situación de uso de este antibiótico.</p>

Se tomó un total de 41 muestras aleatorias y se realizó pruebas de tipo screening utilizando la técnica de ELISA competitivo. Los resultados del estudio revelaron que 40 (98%) de las muestras del tejido muscular bovino resultaron positivas a la presencia de residuos de nitrofurazona (SEM), con intervalos de concentraciones entre 0.10 µg/kg y 0.58 µg/kg. Por lo tanto, el buen desempeño del método refleja un coeficiente de correlación  $R^2 \geq 0,99$  en la curva de calibración, mostrando un límite de detección de 0,05 µg/kg y porcentajes de recuperación que fluctuaron entre 94 y 100%. Adicionalmente, se analizaron algunos duplicados de muestras por el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que mostraron resultados positivos, lo que confirma la presencia de residuos de nitrofurazona en la muestra por un segundo método de análisis.

**PALABRAS CLAVES:**

Nitrofurazona, Semicarbazida, ELISA, Espectrometría de masas, residuos antibióticos

**ABSTRACT:**

For international organizations such as CODEX and the European Union, the residues of nitrofurans and their metabolites in foods destined for human consumption are considered a risk factor in public health, due to their potential harmful effect on health. This study was carried out the evaluation in muscle tissue of a representative sample of the cattle herd of Manabí. The aim of this study was determining the presence of nitrofurazone (NFZ), through its metabolite semicarbazide (SEM) in order to collect

current information from the situation of use of this antibiotic. A total of 41 random samples were taken and screening tests were performed using the competitive ELISA technique. The results of the study revealed that 40 (98%) of the bovine muscle tissue samples were positive for the presence of nitrofurazone residues (SEM), with ranges of concentrations between 0.10 µg / kg and 0.58 µg / kg. Therefore, the good performance of the method reflects a correlation coefficient  $R^2 \geq 0.99$  in the calibration curve, showing a detection limit of 0.05 µg / kg and recovery percentages that fluctuated between 94 and 100%. Additionally, some duplicates of samples were analyzed by the liquid chromatography method coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), which showed positive results, confirming the presence of nitrofurazone residues in the sample by a second method of analysis.

**KEYWORDS**

Nitrofurazone, Semicarbazide, ELISA, Mass Espectrometry, medicaments residues

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.

f: 

VEINTIMILLA PAREDES MAYRA SILVANA

1720388899

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, VEINTIMILLA PAREDES MAYRA SILVANA, CI 1720388899 autor/a del proyecto titulado: **Evaluación de la presencia del antibiótico nitrofurazona en músculo bovino en la provincia de Manabí** previo a la obtención del título de **Ingeniera de Alimentos** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, 12 de diciembre del 2017

f: \_\_\_\_\_



VEINTIMILLA PAREDES MAYRA SILVANA

1720388899

Quito, 24 de octubre de 2017

Quito, 24 de octubre de 2017

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **SEGUNDO ISRAEL VACA JIMÉNEZ** con cédula de identidad N.-0502975618 en calidad de Coordinador General Inocuidad de los alimentos (Subrogante) de AGROCALIDAD autorizo a **MAYRA VEINTIMILLA**, realizar la investigación para la elaboración de su proyecto de titulación "**Evaluación de la presencia del antibiótico nitrofurazona en músculo bovino en la provincia de Manabí**", basada en la información proporcionada por la institución.

f: \_\_\_\_\_



VACA JIMENÉZ SEGUNDO ISRAEL

0502975618

## DECLARACIÓN

Yo **MAYRA SILVANA VEINTIMILLA PAREDES**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



---

MAYRA VEINTIMILLA

C.I. 1720388899



## CARTA DE AVAL DE LA EMPRESA

Yo, **SEGUNDO ISRAEL VACA JIMÉNEZ** con cédula de identidad N.-  
0502975618 en calidad de Coordinador General Inocuidad de los alimentos  
(Subrogante) de AGROCALIDAD certifico que la Srta. **MAYRA VEINTIMILLA**,  
realizó su trabajo de titulación con el tema “**Evaluación de la presencia del  
antibiótico nitrofurazona en músculo bovino en la provincia de Manabí**”,  
por requerimientos, y basada en la información proporcionada por la empresa.  
Los resultados del trabajo se entregaron el día 12 de diciembre del 2017.

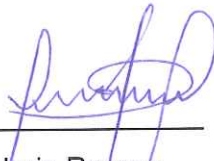
f: \_\_\_\_\_

  
VACA JIMÉNEZ SEGUNDO ISRAEL

0502975618

# CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título "Evaluación de la presencia del antibiótico nitrofurazona en músculo bovino en la provincia de Manabí", que, para aspirar al título de Ingeniería de alimentos fue desarrollado por **MAYRA SILVANA VEINTIMILLA PAREDES**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 19, 27 y 28.



---

Dr. Luis Ramos

**DIRECTOR DEL TRABAJO**

C.I. 1712923760

# DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres y familia, que ha sido un gran apoyo a lo largo de mi vida para mi desarrollo como profesional.

Gracias por todo.

# AGRADECIMIENTO

Este trabajo está especialmente dedicado primeramente a dios y luego a toda mi familia que han sido un pilar importante en toda mi vida, a mis tíos y abuelita por sus consejos, ánimos y bendiciones para lograr una meta de mi vida.

Agradezco a mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo del desarrollo académico.

A AGROCALIDAD por darme la oportunidad de realizar esta investigación, a Paulette Andrade por la asesoría y ayuda brindada en el laboratorio. A World Survey Services S.A. (WSS) ubicada en la ciudad de Guayaquil por la prestación del servicio para los respectivos análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

A mi director de tesis el Dr. Luis Ramos y la Ing. Michelle Guijarro por la paciencia, confianza, apoyo, guía y conocimientos brindados a lo largo del desarrollo de este trabajo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>2. METODOLOGÍA</b>	8
2.1 MUESTREO	8
2.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	9
2.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	9
2.2.1.1 Acondicionamiento del músculo bovino	9
2.2.1.2 Extracción líquido-líquido (LLE) del músculo bovino	10
2.3 PROTOCOLO PARA INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO COMPETITIVO ELISA	10
2.4 MÉTODO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	11
<b>3. RESULTADOS</b>	12
3.1 DESEMPEÑO DEL MÉTODO ELISA PARA DETERMINAR NITROFURANOS	12
3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE INMUNOENSAYO ELISA	13
3.3 DESEMPEÑO DEL MÉTODO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA DETERMINAR NITROFUZONA (SEM)	16
3.4 ANÁLISIS DE MUESTRA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	19
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	21
4.1 CONCLUSIONES	21
4.1 RECOMENDACIONES	22

	<b>PÁGINA</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	23
<b>6. ANEXOS</b>	27

# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Mataderos operativos y número de muestras recolectadas en la provincia de Manabí	8
<b>Tabla 2.</b> Controles del kit ELISA nitrofurazona (SEM)	13
<b>Tabla 3.</b> Monitorización de reacción múltiple MRM para metabolitos de nitrofuranos	17
<b>Tabla 4.</b> Resultados mediante ELISA vs cromatografía de masas	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Protocolo de preparación de la muestra por extracción en fase líquida	10
<b>Figura 2.</b> Curva de calibración SEM método ELISA	12
<b>Figura 3.</b> Resultados presencia de nitrofurazona metabolito (SEM) en músculo bovino mediante ELISA	14
<b>Figura 4.</b> Cumplimiento con la resolución 034-cancelacion cloranfenicol y nitrofurano AGROCALIDAD	15
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración SEM método LC-MS/MS	16
<b>Figura 6.</b> Formación in vivo del enlace tejido SEM (A). Proceso de derivatización para determinar el metabolito SEM (B).	17
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de la muestra 17-137	18
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de la muestra 17-138	18
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de la muestra 17-152	18



# ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>ANEXO 1.</b> Estructura química de los nitrofuranos y sus metabolitos	27
<b>ANEXO 2.</b> Número de muestras primarias	28
<b>ANEXO 3.</b> Registro de muestras para el protocolo kit ELISA	29
<b>ANEXO 4.</b> Resultados mediante la técnica de cromatografía de masas	30

## RESUMEN

Para organismos internacionales como el CODEX y la Unión Europea, los residuos de nitrofuranos y sus metabolitos en alimentos destinados para consumo humano, son considerados como un factor de riesgo en salud pública por su potencial efecto nocivo para la salud. El estudio presente, realizó la evaluación en tejido muscular de una muestra representativa del hato ganadero bovino de Manabí con el objetivo de determinar la presencia de nitrofurazona (NFZ), a través de su metabolito semicarbazida (SEM) con la finalidad de levantar información actual de la situación de uso de este antibiótico. Se tomó un total de 41 muestras aleatorias y se realizó pruebas de tipo screening utilizando la técnica de ELISA competitivo. Los resultados del estudio revelaron que 40 (98%) de las muestras del tejido muscular bovino resultaron positivas a la presencia de residuos de nitrofurazona (SEM), con intervalos de concentraciones entre 0.10 µg/kg y 0.58 µg/kg. Por lo tanto, el buen desempeño del método refleja un coeficiente de correlación  $R^2 \geq 0,99$  en la curva de calibración, mostrando un límite de detección de 0,05 µg/kg y porcentajes de recuperación que fluctuaron entre 94 y 100%. Adicionalmente, se analizaron algunos duplicados de muestras por el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), que mostraron resultados positivos, lo que confirma la presencia de residuos de nitrofurazona en la muestra por un segundo método de análisis.

**Palabras clave:** Nitrofurazona, Semicarbazida, ELISA, Espectrometría de masas, residuos de antibióticos.

## ABSTRACT

For international organizations such as CODEX and the European Union, the residues of nitrofurans and their metabolites in foods destined for human consumption are considered a risk factor in public health, due to their potential harmful effect on health. This study was carried out the evaluation in muscle tissue of a representative sample of the cattle herd of Manabí. The aim of this study was determining the presence of nitrofurazone (NFZ), through its metabolite semicarbazide (SEM) in order to collect current information from the situation of use of this antibiotic. A total of 41 random samples were taken and screening tests were performed using the competitive ELISA technique. The results of the study revealed that 40 (98%) of the bovine muscle tissue samples were positive for the presence of nitrofurazone residues (SEM), with ranges of concentrations between 0.10 µg / kg and 0.58 µg / kg. Therefore, the good performance of the method reflects a correlation coefficient  $R^2 \geq 0.99$  in the calibration curve, showing a detection limit of 0.05 µg / kg and recovery percentages that fluctuated between 94 and 100%. Additionally, some duplicates of samples were analyzed by the liquid chromatography method coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), which showed positive results, confirming the presence of nitrofurazone residues in the sample by a second method of analysis.

**Key words:** Nitrofurazone, Semicarbazide, ELISA, Mass Espectrometry, antibiotic residues

## **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

La actividad pecuaria en Ecuador se ha incrementado en los últimos años y se constituye una de las principales actividades económicas del país. En el año 2014 este sector registró una producción total de 1.86 millones de dólares en productos cárnicos y subproductos, y una tasa de crianza de ganado vacuno de 51.06, 39.44 y 8.79 % para la región Sierra, Costa y Oriente, respectivamente (PROECUADOR, 2016). Sin embargo, solo la provincia de Manabí concentra la mayor población de ganado bovino del país (20,3%), seguido de Pichicha, Esmeraldas, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas con 7.9, 7.6, 7.1 y 5.4 % respectivamente (ESPAE-ESPOL, 2016).

Por otra parte, la región Costa concentra la mayor producción de ganado de carne; mientras que el ganado destinado a la producción de leche se concentra en la Sierra (INEC, 2014), con 76.90 % de producción de leche, seguido de la región Costa (18.84 %) y Oriente (5.26 %) (PROECUADOR, 2016).

Para la optimización de la producción pecuaria en Ecuador, se han diferenciado razas de bovinos como Brahman, Charolais y Aberdeen Angus utilizadas para carne y razas bovinas lecheras como Jersey y Brown Swiss, mientras que Holstein Frissona, Normando, Sahiwal y Nelore son razas de doble propósito (AGROINDUSTRIA, 2013).

La industria ganadera ha sido afectada por los altos costos de producción, principalmente para combatir las enfermedades que adquieren los animales bovinos y vacas lecheras, recurriendo al uso de productos farmacéuticos como antibióticos (Calderón, 2014). El 80 % de ganaderos ecuatorianos no aplican tratamientos médicos veterinarios basados en los signos clínicos, diagnóstico e identificación de la enfermedad que presenta el animal, incurriendo en pérdidas económicas innecesarias, residualidad de medicamentos, riesgo de la vida del animal y proliferación de enfermedades por la generación de microorganismos resistentes a antimicrobianos (AGROCALIDAD, 2016).

Los antibióticos son ampliamente utilizados en animales en forma terapéutica y preventiva, pero el uso incorrecto en tratamientos de vacas lecheras y ganado bovino resulta en la contaminación de leche y carnes debido a la

presencia de residuos de medicamentos (Souza, 2012), además aumenta la posibilidad de la resistencia de bacterias y parásitos frente a estas sustancias (Camona & Vindas, 2009). Adicionalmente, no se cumplen los tiempos de retención de animales por parte de los proveedores de productos cárnicos y lácteos, para disminuir los niveles de medicamentos hasta niveles inocuos, inferiores al límite máximo de residuos permitidos (LMR) (AGROCALIDAD, 2016).

Por esta razón la regulación nacional e internacional de medicamentos de uso veterinario se ha enfocado en controlar el uso de estas sustancias en animales de consumo (Wagner & Fajt, 2010). Una clasificación corresponde a sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas (Grupo A) y medicamentos veterinarios y contaminantes químicos (Grupo B) (INVIMA, 2010; SAG, 2016). En algunos países no se ha autorizado el uso de ciertos medicamentos en animales destinados a la alimentación humana como cloranfenicol, clenbuterol, dietilestilbestrol, dimetridazol, ipronidazol, metronidazol, furazolidona, nitrofurazona y fluoroquinolonas (Wagner & Fajt, 2010). En Ecuador se ha suspendido la fabricación, formulación, importación, comercialización y registro de productos que contengan como ingrediente activo cloranfenicol y nitrofuranos (AGROCALIDAD, 2007). Además, son sustancias sin límite máximo de residuos (LMR) para el CODEX Alimentarius.

En cuanto a los países fronterizos, Perú con su organismo regulador el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) aún no cuenta con una reglamentación específica para los cuatro metabolitos, sin embargo cuenta con la resolución R. D.N°0072-2013 —MINAGRI — SENASA – DIAIA donde menciona la prohibición y comercialización de productos que contengan nitrofuranos como principio activo basado en el reglamento de la UE N N°37/2010, y el Anexo IV del Reglamento N°2377/90 (Solis, 2015). De igual manera Colombia cuenta con la Resolución ICA 1082 de 1995 la cual prohíbe el uso y comercialización de la Furazolidona, la Nitrofurazona y la Furaltidona para uso animal (ICA-INVIMA, 2015).

Por otra parte, los nitrofuranos son compuestos sintéticos de amplio espectro antimicrobiano (Cantú, et al., 2010), caracterizados por el anillo 5-nitrofurano en su estructura molecular, los más comunes son la furazolidona, furaltidona, nitrofurantoína y nitrofurazona (anexo 1), son rápidamente metabolizados en el organismo originando sus respectivos metabolitos (Cantú, et al., 2010; Chu, 2008) que son monitoreados como residuos marcadores, 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 1-aminohidatoína (AHD) y semicarbazida (SEM) respectivamente (Chu, 2008).

El compuesto de nitrofurazona posee propiedades bacteriostáticas y bactericidas, caracterizado por su elevada actividad contra *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Coccidia* spp, coliformes y otros protozoos (Riera, 2010). Ha sido utilizado para enfermedades como la mastitis, la cual inflama la glándula mamaria provocada por bacterias que penetran al interior de la ubre, siendo causada principalmente por mala higiene sanitaria durante el ordeño manual e incorrectas formas de realizarlo (INTA, 2010).

Sin embargo, la nitrofurazona es difícilmente identificable y cuantificable debido a su fuerte unión a otras moléculas como proteínas por un largo período (Cantú, et al., 2010), por ello, resultados de ensayos toxicológicos en seres humanos como *in vitro* sugieren que estas sustancias y sus metabolitos tienen riesgo potencial mutagénico, carcinogénico y teratogénico (Cantú, et al., 2010; Chu, 2008).

Durante los años 2002-2003 se revelaron hallazgos de residuos de nitrofuranos en tejidos vinculados a aves de corral, músculo de cerdo y productos de acuicultura importados por la Unión Europea procedentes de Tailandia, China, Taiwan, India, Vietnam, Ecuador, Brasil, Portugal, Italia, Grecia, Rumania y Bulgaria (Anon, 2008; O’Keeffe, 2004).

Cooper & Kennedy (2007), mencionan en un estudio reciente la estabilidad de los metabolitos durante el almacenamiento y la cocción de la carne tras ocho meses de almacenamiento, no tuvo un efecto significativo sobre la concentración residual de nitrofuranos determinando que entre el 67 % y el 100 % de los residuos permanecen presentes en el tejido después de cocinar, freír y asar.

Los avances científicos y técnicos en los últimos años se han especializado en la diferenciación y detección de residuos en medicamentos veterinarios y contaminantes químicos en productos pecuarios (INVIMA, 2010). Por ello existen técnicas microbiológicas, técnicas inmunoquímicas y técnicas físico-químicas que se realizan generalmente en orina y plasma, así como en muestras de tejidos después del sacrificio del animal en hígado, riñón, humor vítreo, músculo y grasa para la determinación de residuos de antibióticos usados principalmente para el ganado, aves de corral, cerdos, acuicultura (peces y camarones) y colonias de abejas (Souza, 2012).

Las técnicas para detección de residuos más utilizadas son cromatografía acoplada a espectrometría de masas reconocida por su alta efectividad, sensibilidad, precisión y selectividad (Riera, 2010). Además, se ha utilizado ampliamente la técnica ELISA, basadas en la afinidad de inmunosorbentes ligados a una enzima, con el objetivo de realizar barridos rápidos o screening de muestras para detectar la presencia de diversos compuestos (Toldrá & Reig, 2006). Este test se caracteriza por su fácil uso, sensibilidad, rapidez y flexibilidad para analizar un gran número de muestras de forma simultánea en un tiempo relativamente corto (Dimitrieska, et al., 2013).

Existe una amplia variedad de ensayos ELISA, dependiendo de la matriz a analizar, debido a su especificidad como métodos inmunológicos para cada tipo de analito basado en una reacción antígeno-anticuerpo (Reig & Toldrá, 2008), siendo el más utilizado el kit basado en una enzima ligada a un inmunosorbente. El sistema de detección se da mediante la lectura espectrofotométrica, los resultados de la lectura colorimétrica se verán reflejados numéricamente mediante valores de absorbancia óptica (Riera, 2010). La técnica Elisa competitivo es la más utilizada para la cuantificación de sustancias pequeñas, donde el conjugado y el anticuerpo de la muestra compiten para unirse al antígeno (Jordan, 2005) por ende, habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.

Esta técnica ha sido utilizada en diferentes matrices como huevos, miel e hígado para detección de Semicarbazida (SEM), en 20 muestras en blanco siendo inferiores a  $0.3 \mu\text{g} / \text{kg}$  y significativamente menor que la MRPL (límite mínimo de rendimiento requerido)  $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ , demostrando que el método es adecuado en el análisis de detección de residuos (Dimitrieska, et al., 2013).

En Ecuador no se conoce en detalle la presencia de este tipo de residuos en alimentos primarios y tampoco se registran estudios específicos acerca del uso de antibióticos como nitrofurazona (NFZ) en tejido bovino por ejemplo, para con ello mejorar las prácticas ganaderas y así asegurar la calidad de los productos por parte de las instituciones de control y productores. Por esta razón, el presente trabajo de investigación se enfoca en determinar la ausencia o presencia del antibiótico nitrofurazona en productos pecuarios en la provincia de Manabí mediante el uso de la técnica ELISA y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Como objetivos específicos se contempló elaborar un plan de muestreo de bovinos para la provincia de Manabí y comparar los resultados obtenidos



respecto a la Resolución 034 vigente de AGROCALIDAD. Por otra parte, evaluar el desempeño del método inmunoenzimático para la determinación de nitrofurazona y comparar una muestra de los resultados del método ELISA con análisis de espectrometría de masas en tándem, para finalmente proponer actividades de mejora, de ser el caso, mediante los resultados obtenido

## **2. METODOLOGÍA**

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MUESTREO

Se determinó un plan de muestreo en base a un muestreo aleatorio simple de los animales que ingresaban a los mataderos de acuerdo a la norma del CODEX CAC/GL 33, 1999 (Anexo 2) y procedimiento interno de muestreo de AGROCALIDAD “Instructivo INT/PPP/01”. Para la definición del número de muestras se utilizó como referencia una probabilidad de 99% de detección y un 10% de incidencia en presencia de residuos no conformes en la unidad de muestreo (UM). Se consideró además el movimiento de bovinos llegados a cada matadero de Manabí (Tabla 1).

De esta manera se obtuvieron 41 muestras necesarias para cumplir con la representatividad propuesta.

**Tabla 1.** Mataderos operativos y número de muestras recolectadas en la provincia de Manabí

NOMBRE DEL MATADERO	COORDENADAS UTM			Ingreso Animales (x Mes)	MUESTRAS
	X	Y	Z		
Matadero Cogamantasa	529501	9892986	25	1272	12
Matadero municipal Portoviejo	562172	9883255	72	1011	10
Matadero parroquial San isidro	590662	9957318	189	25	0
Matadero municipal Chone	599983	9923507	22	178	1
Matadero municipal Leonidas plaza	563877	9931544	0	94	2
Matadero parroquial Charapotó	557885	9907106	32	89	3
Matadero municipal El Carmen	670925	9970207	0	295	2
Matadero municipal Paján	563909	9828072	117	378	4
Matadero municipal Pedernales	602710	63438	0	68	2
Matadero municipal Rocafuerte	561430	9897516	63	179	3
Matadero parroquial Honorato Vásquez	586484	9877419	77	210	1
Matadero municipal Tosagua	584232	9912406	0	324	1
TOTAL				4123	41

UTM: Universal transversal de Mercator

## **2.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

En la provincia de Manabí a la fecha de definición del plan de muestreo, se encontraban 12 mataderos autorizados para esta actividad. Las muestras de músculo para el análisis de nitrofurazona fueron obtenidas de 11 mataderos en la provincia de Manabí ya que representa el mayor flujo de bovino a nivel país. De estos se tomaron de manera ponderada un total de 41 muestras de 500 g, cada una de músculo bovino y utilizando el procedimiento establecido por el Codex Alimentarius y AGROCALIDAD. Las muestras se almacenaron en fundas ziploc, se codificó de acuerdo al anexo 3 y se mantuvieron en congelación hasta su recepción a los laboratorios de AGROCALIDAD ubicado en Tumbaco-Quito para realizar los ensayos inmunoenzimático tipo ELISA y posteriormente los de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

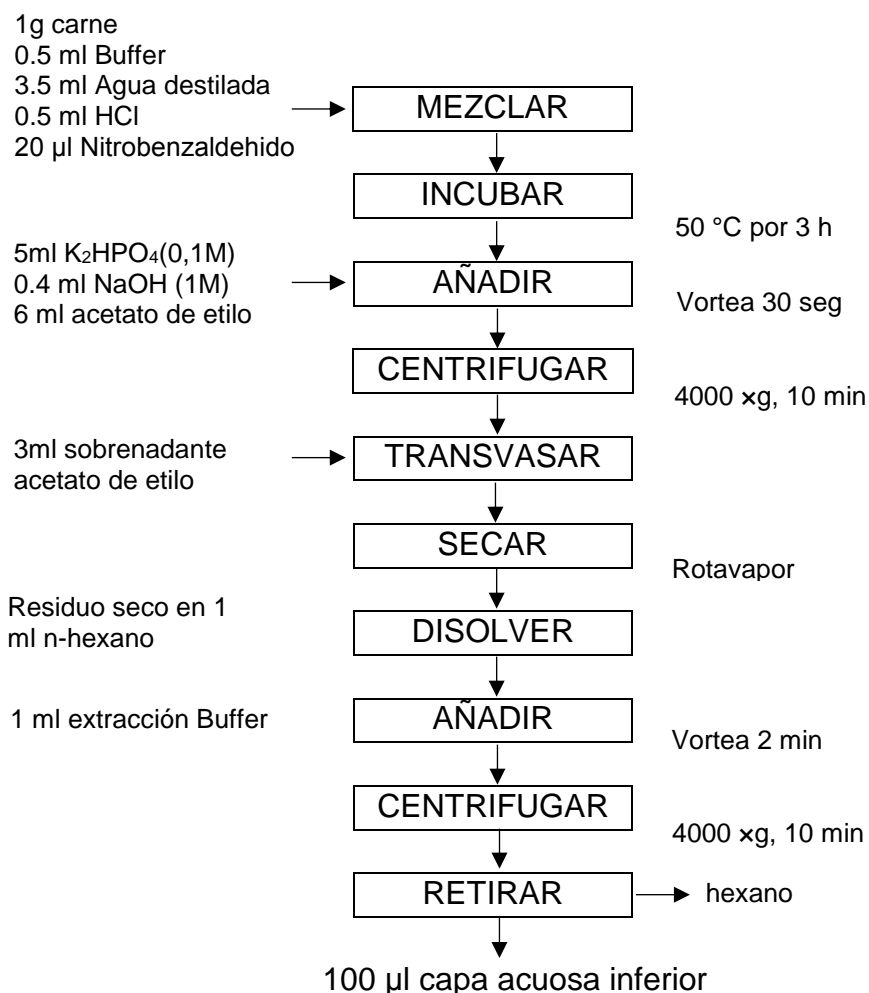
### **2.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

#### **2.2.1.1 Acondicionamiento del músculo bovino**

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente (20-25 °C), se retiró venas y grasa del músculo, se trituró y homogenizó en un molino procesador de tejidos (*Omni Tissue Master*) hasta conseguir una consistencia homogénea.

### 2.2.1.2 Extracción líquido-líquido (LLE) de músculo bovino

En la figura 1 se observa el protocolo para la extracción a fase líquida de la muestra de carne.



**Figura 1.** Protocolo de preparación de la muestra por extracción en fase líquida.

### 2.3 Protocolo para inmunoensayo enzimático competitivo ELISA

La determinación cuantitativa de Nitrofurazona SEM se realizó mediante inmunoensayo competitivo en microplaca del kit comercial de ELISA (Max Signal® Nitrofurazone (SEM)). Con una micropipeta se añadieron 100 µl SEM Estándar en el kit ELISA, 100 µl de la muestra por duplicado en cada pocillo como se muestra en el Anexo 4, 50 µl SEM-HRP conjugado el cual se mezcló agitando suavemente (1 min) e incubó (30 min/temp. ambiente). Con 250 µl de solución de lavado (1X) se lavó en 3 tiempos, se agregaron 100 µl de

sustrato TMB y suavemente se mezcló (1 min) para incubar (20 min/temp. ambiente); después del tiempo transcurrido se adicionaron 100 µl de solución Stop Tampón para detener la reacción enzimática. Finalmente, se insertó el kit en el lector de placa (5 min) para obtener la lectura de la densidad óptica a 400 nm.

En la microplaca se colocaron 6 estándares para la curva de calibración por duplicado (control negativo; 0.025 ng/ml; 0.1 ng/ml; 0.4 ng/ml; 1.6 ng/ml y 6.4 ng/ml).

## **2.4 MÉTODO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

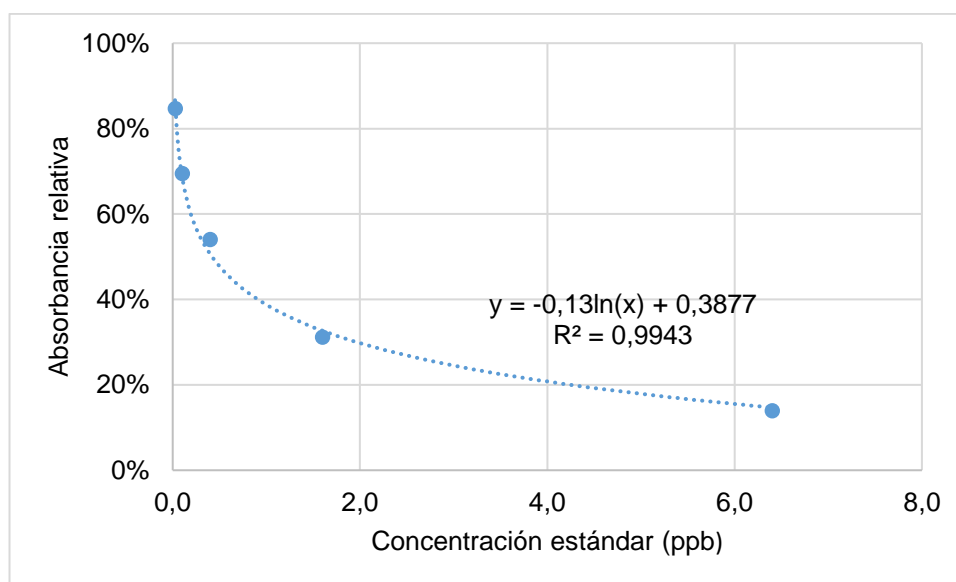
Se realizó en colaboración con el laboratorio World Survey Services (WSS) ubicado en la ciudad de Guayaquil. Se analizaron tres muestras de las analizadas previamente mediante la técnica ELISA siendo, los códigos 17-137, 17-175 (positivos) y 17-139 (negativo). Las muestras se enviaron al laboratorio, que cuenta con certificación ISO 17025 en varios parámetros. Para la cuantificación de Nitrofurazona (SEM) se utilizó el método interno POE-LI-003, denominado “Determinación de Nitrofuranos mediante UPLC-MS-MS”, el mismo que tiene como método de referencia el de “Darni Institute SOP BIO 220 V.1. Belfast, UK: Determinación de residuos de medicamentos veterinarios usando un sistema Waters Quattro Premier Tandem Espectrometría de masas”. Mediante el análisis se obtendrá % recuperación y coeficiente de variación. Se realizó un proceso de optimización de parámetros de control a nivel del espectrómetro de masas para la obtención de iones moleculares y productos iónicos de cada nitrofurano.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 DESEMPEÑO DEL MÉTODO ELISA PARA DETERMINAR NITROFURAZONA

Las curvas de determinación para los metabolitos AOZ, AMOZ, AHD y SEM mediante el método de ensayo ELISA son logarítmicas (Dimitrieska, et al., 2013). Al realizar la curva de calibración representativa para SEM, se determinó una buena correlación entre la concentración de los analitos y la respuesta del método, lo que se tradujo en una recta con un coeficiente de correlación de 0,994 (Figura 2). Las absorbancias relativas se expresan como la relación B/B0 en %, donde B es la absorbancia en una concentración dada del analito y B0 absorbancia en ausencia del analito en la mezcla de reacción (Vass, et al., 2008; Dimitrieska, et al., 2013).



**Figura 2.** Curva de calibración SEM método ELISA

Como se observa en la Tabla 2, los controles de calidad duplicados QC 1.6 ppb representa un margen de error del 4 % y para QC 6.4 ppb hay un margen de error del 0 % lo que indica que la exactitud del método es apropiada, estos valores de control representaron densidad óptica (OD) y estimación del límite de detección de la pendiente de B / B0 en ELISA competitivo donde es estándar de absorbancia o muestra /estándar de absorbancia cero.

Los porcentajes de recuperación fluctúan entre el 96 y 100 % (Tabla 2). Según Vass, et al. (2008) esta diferencia puede ser causada por pequeñas desviaciones en la medida de volúmenes y procesamiento de las muestras.



Para la técnica de cribado la normativa europea, Decisión 2002/657/CE, establece un porcentaje de falsos conformes < 5% (error  $\beta$ ), los resultados obtenidos están dentro del límite para su correcto funcionamiento.

**Tabla 2.** Controles del kit ELISA Nitrofurazona (SEM)

NOMBRE MUESTRA	OD	B/B0	PROMEDIO	VALOR EXPERIMENTAL	%RECUPERACION
QC 1.6 ppb	1.194	0.496	1.54	1.60	96 %
QC 6.4 ppb	0.353	0.146	6.41	6.4	100 %

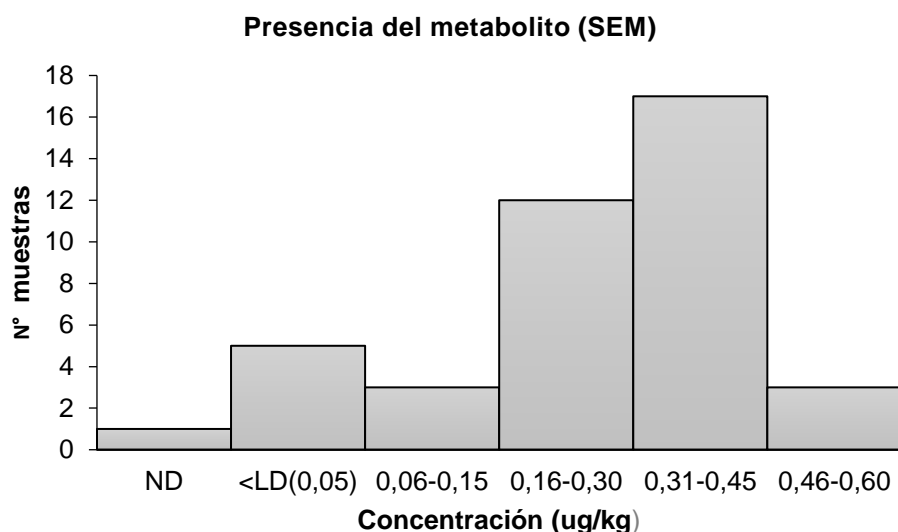
Tomando en cuenta, información de Cooper & Kennedy (2007) el desempeño del método ELISA utilizado en este trabajo satisface el rendimiento y los criterios de validación establecidos por la decisión 2002/657/EC, siendo adecuado para el análisis cualitativo o semicuantitativo en la determinación de residuos totales de nitrofurazona a través de su metabolito SEM, en diferentes matrices como carne, huevos, miel, hígado, leche y marisco y lo que fue constatado en este estudio.

### 3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE INMUNOENSAYO ELISA

El límite máximo de residuos (LMR) se define como la “*concentración máxima de un plaguicida o medicamento veterinario que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda permitir o reconocer como aceptable legalmente en la parte interna o en la superficie de un producto alimenticio o pienso*” (CODEX, 2011). Según la FDA, el comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) no permite el uso de ningún nitrofurano en animales productores de alimentos, estableciendo límite de tolerancia cero ppb (FAO, 2002). En el país AGROCALIDAD establece tolerancia cero en cuanto a la administración de nitrofuranos a animales de consumo humano por ende no cuenta con límite máximo de residuos (LMR) para este metabolito.

Mediante el uso del test ELISA competitivo se determinó la presencia del metabolito Semicarbazida (SEM), en concentraciones que van entre rangos de 0.31-0.45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para el 41 % de las muestras, seguidas del 29 % para rangos de 0.16-0.30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en músculo bovino y 12.19 % para niveles menores a 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 3). El método ELISA tiene la capacidad de detectar

niveles sobre 0.05 µg/kg. Los límites de detección (LD) son propios del método y dependen también de la extracción y purificación previa que se le haga a la muestra (Riera, 2010).

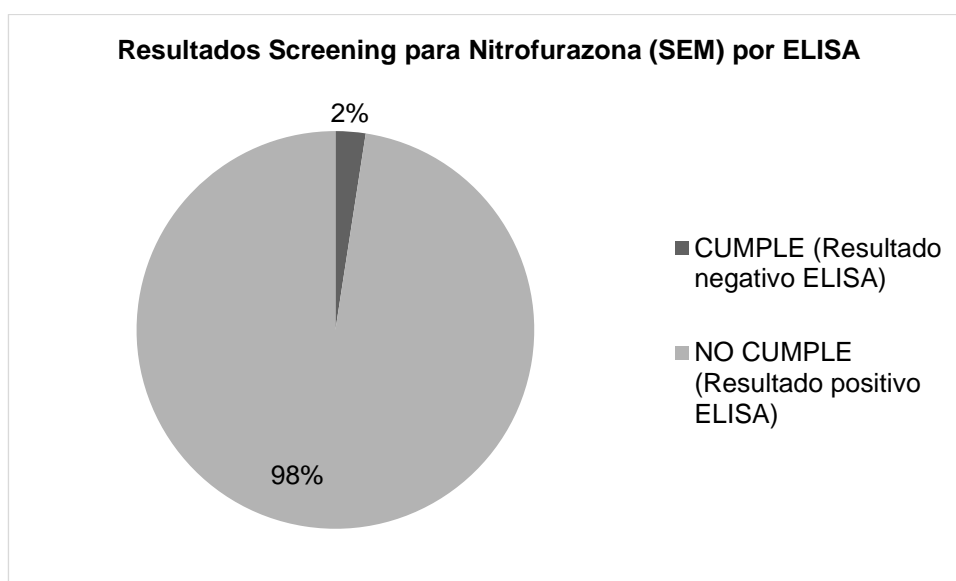


**Figura 3.** Resultados presencia de Nitrofurazona metabolito (SEM) en músculo bovino mediante ELISA. ND=No detectable

La legislación europea no cuenta con un límite máximo de residuo (LMR) para la nitrofurazona, sin embargo, ha establecido el límite mínimo de funcionamiento exigido para el desempeño del diagnóstico (MRPL), siendo 1 µg/kg (Commission decisión 2003/181/EC). Según la Decisión 2002/657/EC el MRPL es el “*contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado para aquellas muestras que no se ha establecido un límite permitido*”, en consecuencia, los kits ELISA son muy sensibles para la mayoría de las sustancias analizadas por este método y se pueden obtener resultados semicuantitativos (Riera, 2010) y que cumplan con el MRPL establecido. El límite de detección de 0.05 µg/kg indicaría que se cumple con el criterio de la normativa europea relacionado con el funcionamiento del método.

Los nitrofuranos luego de su administración en los animales desaparecen rápidamente originando metabolitos que se depositan en tejidos unidos a las proteínas donde permanecen durante varias semanas o meses (Orlando & Olivos, 2007; Cooper & Kennedy, 2007; Cántu et. Al, 2007), como consecuencia directa de la ingesta de nitrofurazona sus efectos son pancitopenía, depresión medular reversible y aplasia medular irreversible, así como cáncer (AGROCALIDAD, 2006). Según la resolución (034), del ente de control de Ecuador, de cancelación de Cloranfenicol y Nitrofuranos vigente en Ecuador, en la figura 4, se evidencia solo el 2 % del total de las muestras da

resultados negativos al screening realizado y un 98 % de muestras positivas lo que se contrapone con la normativa vigente en el país, sin embargo, es necesario aplicar un método de confirmación.



**Figura 4.** Cumplimiento de la Resolución 034\_Cancelación Cloranfenicol y Nitrofurano AGROCALIDAD.

Los métodos inmunológicos son específicos para cada tipo de analito, basados en la reacción antígeno-anticuerpo, esta interacción es muy específica y muy útil en la detección de medicamentos veterinarios (Riera, 2010) sin embargo, hay que tener en cuenta que es una técnica de barrido rápido el cual puede dar falsos positivos debido a interferencias de reacciones cruzadas cuya estructura química es similar (Vass, et al., 2008). Todas las muestras remitidas al laboratorio de AGROCALIDAD se analizaron con la técnica ELISA siendo de fácil uso, sensible, rápida y con flexibilidad de analizar un gran número de muestras en un tiempo corto (Dimitrieska, et al., 2003; Reig y Toldrá, 2008). Concordando con el correcto funcionamiento de la técnica con estudios de Cooper (2007) y Vass, et al. (2008) el cual confirma concentraciones de SEM mediante ELISA entre rangos de (0.5 a 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en músculo de pollo y (0.32 a 1.0)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en cinco huevos homogenizados respectivamente.

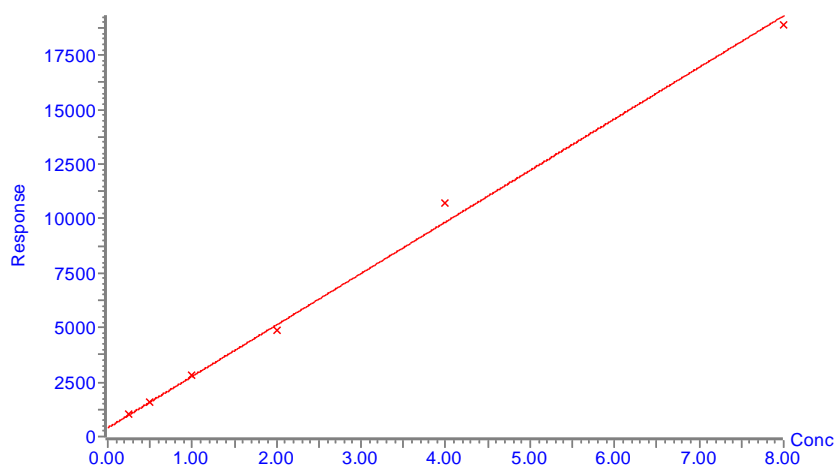
Para asegurar y confirmar los analitos, todas las muestras con resultado no conforme deben ser confirmadas (Riera, 2010). A menudo se utiliza el método de inmunoensayo como una técnica de evaluación, seguido de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) como método de confirmación (Wen, Ya, & Xiang, 2014).

Los resultados del screening sugieren el uso de este antibiótico en animales bovinos y posiblemente se deba a prácticas culturales arraigadas, sin embargo, en el siguiente punto se realizan análisis mediante un método confirmatorio para evaluar los resultados obtenidos por ELISA.

### 3.3 DESEMPEÑO DEL MÉTODO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA DETERMINAR NITROFURAZONA (SEM)

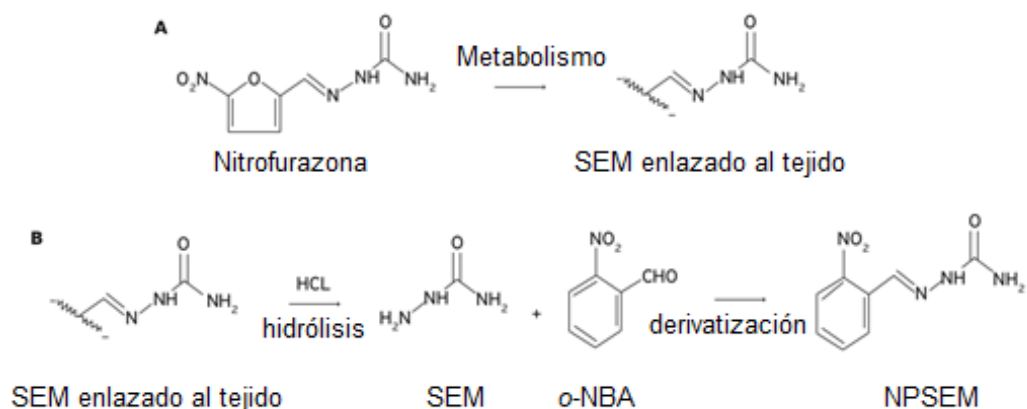
La evaluación de Nitrofurazona por UPLC/MS/MS se aplicó en 3 muestras, los valores se obtuvieron mediante la generación de una curva de calibración, la que está dada por las áreas del pico cromatográfico versus la concentración (en ppb) para cada analito. La determinación de las concentraciones de las muestras se realizó mediante la interpolación en la ecuación  $Y=2363.54x+392.564$ , obtenida mediante regresión lineal de las variables y en donde Y es el área del pico y X la concentración del estándar en ppb (Chu & López, 2005). Se obtuvo una buena relación entre las variables con un coeficiente de correlación 0,998 (Figura 5).

Compound name: NP SEM  
Correlation coefficient:  $r = 0.997913$ ,  $r^2 = 0.995831$   
Calibration curve:  $2363.54 * x + 392.564$   
Response type: External Std, Area  
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



**Figura 5.** Curva de calibración SEM método LC-MS/MS

La determinación de la Nitrofurazona se realiza mediante la detección de su metabolito SEM. El proceso de metabolito y derivatización que se realiza para la determinación se esquematiza en la Figura. 6 (Lázaro et al, 2015).



**Figura 6.** Formación in vivo del enlace tejido-SEM (A). Proceso de derivatización para determinar el metabolito SEM (B). Tomado de Lázaro et al, 2015 con modificaciones.

En la Tabla 3 se puede observar que la determinación del metabolito de la nitrofurazona SEM se realiza por la detección de los iones padre  $m/z = 209.1$  y los iones hijos que se desprenden de este  $m/z = 166.2$  y  $m/z = 192.1$ .

**Tabla 3.** Monitorización de reacción múltiple MRM para metabolitos de nitrofuranos

METABOLITO	Ion de cuantificación (m / z)	Ion calificador (m / z)
AMOZ	335.3/291.2	335.3/262.2
AOZ	236.1/134.1	236.1/104.0
AHD	249.1/134.1	249.1/178.1
SEM	209.1/166.2	209.1/192.1

\*(Chen & Fang, 2011)

m/z: Relación de masa sobre carga de ion

Los cromatogramas MRM (monitorización de reacción múltiple) en modo de ionización positivo mostrados en las Figuras 7, 8 y 9 corresponden a 3 muestras de tejido bovino analizadas por la técnica UPLC/MS/MS.

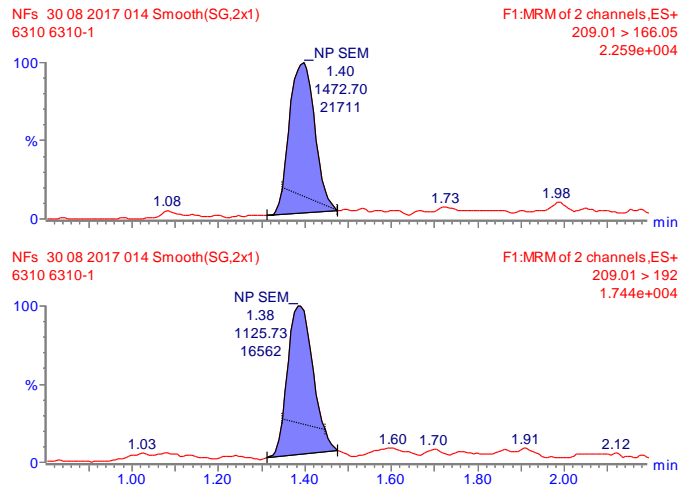


Figura 7. Cromatograma de la muestra 17-137

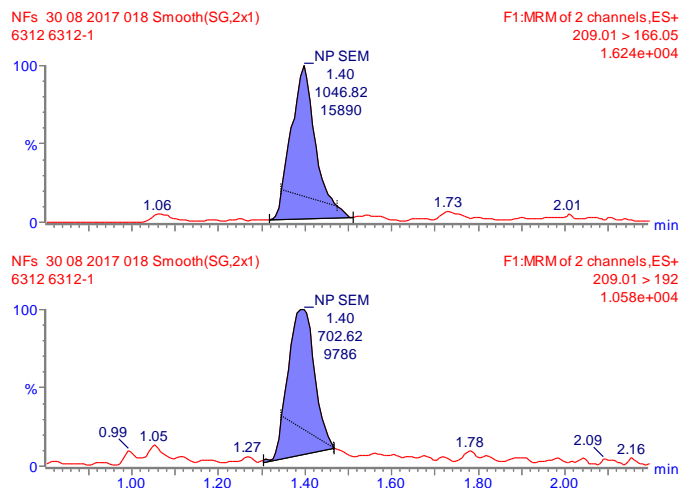


Figura 8. Cromatograma de la muestra 17-139

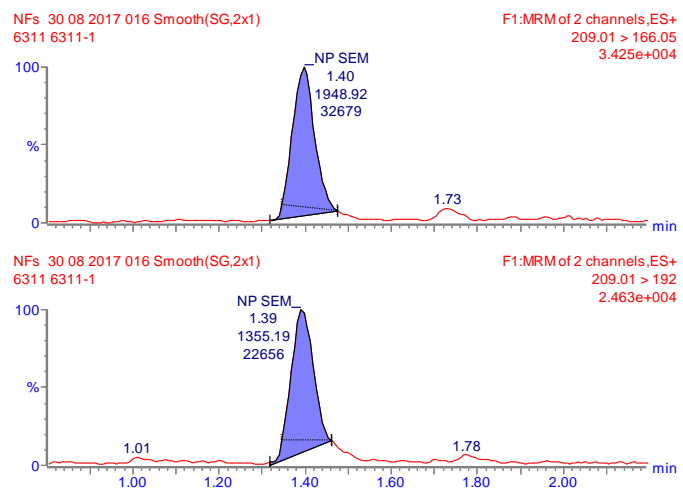


Figura 9. Cromatograma de la muestra 17-175

Los límites de detección y cuantificación del método fueron 0.125 ppb y 0.250 ppb, respectivamente. Así mismo, los porcentajes de recuperación se encontraron entre 80 – 115 % y el coeficiente de variación del método fue de 10%. Adicionalmente, el haber detectado iones padres e hijos de la SEM derivatizada, da plena certeza de la presencia de residuos de Nitrofurazona en el músculo bovino.

### 3.4 ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La selección de las muestras se realizó escogiendo aquellas con resultados positivos de menor, mayor valor y una muestra negativa a la presencia de nitrofurazona (SEM) mediante la metodología ELISA (0.10 µg/kg; 0.58 µg/kg y ND, respectivamente). El límite de detección informado para el método ELISA es 0.05 µg/kg, mientras que para espectrometría de masa (LC-MS/MS) se ha determinado un valor de 0.125 µg/kg.

Los análisis realizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas mostraron diferencias de concentraciones (µg/kg) con tendencia a ser mayores con respecto a los resultados de las muestras determinadas por ELISA, según se muestran en la (Tabla 4), esto se debe a que el método ELISA es una técnica de cribado semicuantitativo que puede generar falsos positivos o negativos.

**Tabla 4.** Resultados mediante ELISA vs Cromatografía- E. Masas

Muestra	Presencia SEM (µg/kg)	
	ELISA	LC MS/MS
17-137	0.10	0.46
17-139	ND	0.28
17-175	0.58	0.66

Resultados similares se encontraron con estudios de Cooper & Kennedy (2007), donde las 12 muestras en músculo de pollo resultaron positivas usando el método ELISA y aplicando el método de confirmación LC-MS / MS.

Así mismo, según Orlando & Olivos (2007) la técnica de LC/MS/MS es la técnica confirmatoria estándar de elección para la cuantificación y detección de residuos pesticidas y medicamentos veterinarios en alimentos la cual es sensible y confiable (Solis, 2015). Sin embargo, al emplear espectrometría de

masas se comprobó la presencia de una muestra con un resultado falso negativo al aplicar el método de criba o barrido rápido ELISA, este resultado puede deberse a que quizá las pequeñas cantidades de SEM en el tejido no logran fijarse adecuadamente con los anticuerpos, o quizá se produjo alguna reacción no específica en esta muestra. De todas maneras, el método UPLC/MS/MS resulta confiable por su naturaleza de identificar las masas moleculares de iones derivados de la SEM y por ende de la nitrofurazona.



## **4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## **4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **4.1 CONCLUSIONES**

Se utilizó el plan de muestreo CODEX CAC/GL 33, 1999 y estableció estadísticamente la monitorización de 41 muestras de músculo bovino. Estas se muestrearon en los camales autorizados con mayor flujo de animales y ubicados en la provincia de Manabí. Los análisis sobre estas muestras de nitrofurazona mediante la técnica de ELISA competitivo, determinaron que el 98% de las muestras resultaron positivas a la presencia de residuos del metabolito semicarbazida (SEM).

Los resultados obtenidos mediante la técnica ELISA muestran el incumplimiento a la resolución 034-Cancelación cloranfenicol y nitrofuranos de AGROCALIDAD, el cual indica tolerancia cero para nitrofuranos. Sin embargo, es necesario analizar las muestras con una técnica de confirmación.

El método de cribado ELISA y el método confirmatorio de cromatografía líquida y detección de masas en tándem LC/MS/MS son válidos por la normativa de la UE 2002/657/CE, ya que detectan a niveles de 0.05 µg/kg y 0.125 µg/kg respectivamente. Adicionalmente, se determinó un desempeño satisfactorio de los dos métodos acorde a los coeficientes de correlación de sus respectivas curvas de calibración.

El método de cribado o screening ELISA resultó ser un método simple, y versátil para la determinación de residuos de contaminantes. Confirmando que puede usarse en análisis para detección de antibióticos y otros contaminantes y especialmente para un gran número de muestras simultáneamente.

El análisis de confirmación mediante cromatografía y espectrometría de masas, ratificó la presencia de SEM en las tres muestras analizadas y por ende de nitrofurazona, inclusive se determinó la presencia de un falso negativo, lo que sería un serio inconveniente del método ELISA, por lo que, se propone que la variación pudo deberse a un error aleatorio, por ejemplo el proceso de extracción del analito de la muestra.

## 4.2 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos sugieren fortalecer la implementación de buenas prácticas pecuarias (BPP), para reducir la necesidad de administrar antibióticos y mejorar el control de enfermedades en las unidades de producción pecuaria. Generando y un compromiso por parte de veterinarios y ganaderos sobre el uso correcto de antibióticos permitidos en animales dedicados a la alimentación humana

Los órganos de control del país deben vigilar la venta y distribución de antibióticos prohibidos y brindar programas de educación para los productores y veterinarios. Asimismo, dar un seguimiento constante a los camales donde se ha determinado presencia del antibiótico nitrofurazona para su regulación.

Realizar análisis confirmatorios para todas las muestras positivas a nitrofurazona por la técnica de ELISA, mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas, en tejido animal en la provincia de Manabí.

Validar el ensayo ELISA para Nitrofurazona en el laboratorio de AGROCALIDAD, para verificar condiciones experimentales adecuadas, con la finalidad de minimizar la probabilidad de obtener falsos negativos o positivos.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- 2002/657/CE. (12 de Agosto de 2002). *Decisión de la Comisión*. Obtenido de <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32002D0657>
- AGROCALIDAD. (19 de Diciembre de 2006). *Resolucion 034-Prohibición de cloranfenicol y nitrofuranos*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/Registro-Insumos-Agropecuarios/Registro-Insumos-Pecuarios/normativa/Cancelacion-Clorafenicol-y-Nitrofuranos.pdf>
- AGROCALIDAD. (21 de Diciembre de 2016). *Los Productos de uso Agropecuario y su influencia en la inocuidad de los Alimentos*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/1erseminocuidadalim/Miercoles14/Productos%20de%20uso%20agropecuario%20Jose%CC%81%20Luis%20Guil.pdf>
- AGROCALIDAD. (13 de mayo de 2016). *PROGRAMA NACIONAL SANITARIO DE VIGILANCIA Y PREVENCIÓN DE LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/daj-2016144-0201.0036.pdf>
- AGROINDUSTRIA. (2013). *Estudio de cadenas pecuarias de Ecuador*. Obtenido de [http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/bovinos/mercados/carnes/\\_archivos//000002=Estudio%20del%20mercado%20c%C3%A1rnico%20de%20Ecuador/000008-Estudio%20del%20mercado%20c%C3%A1rnico%20de%20Ecuador.pdf](http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/bovinos/mercados/carnes/_archivos//000002=Estudio%20del%20mercado%20c%C3%A1rnico%20de%20Ecuador/000008-Estudio%20del%20mercado%20c%C3%A1rnico%20de%20Ecuador.pdf)
- Anon. (2008). *FoodBRAND and the nitrofurans crisis in global food production*. Obtenido de Agri-Food and Biosciences Institute: <http://www.afbini.gov.uk/index/services/diagnostic/services-diagnostic-analyticalservices/foodbrand-introduction/foodbrand-the-nitrofurans-crisis.htm>
- Camona Solano, G., & Vindas, S. (16 de Enero de 2009). *Uso racional de medicamentos veterinarios en ganado bovino*. Obtenido de Dos Pinos: [https://images.engormix.com/s\\_articles/carmonasolano\\_medicamentos.pdf](https://images.engormix.com/s_articles/carmonasolano_medicamentos.pdf)
- Cantú, M., Avalos Ramírez, R., Roig Sagués, A. X., Pérez Fernández, B., Morales Loredo, A., & Silva Paéz, M. L. (2010). *Estandarización de la técnica HPLC/MS para la detección de cuatro metabolitos de nitrofuranos furaltadona (AMAZ), Furazolidona (AOZ), Nitrofurazona*

(SEM), Nitrofurantoina (AHO), en carne de bovino en Nuevo León México. Guanajuato: Universidad de Guanajuato.

- Cheng, G., & Fang, Y. (2011). The LC-MS/MS methods for the determination of specific antibiotics residues in food matrices. *In: Zweigenbaum J. (eds) Mass Spectrometry in Food Safety. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 09-355.
- Chu, P. S. (2008). Residue depletion of nitrofurans and their tissue-bound metabolites in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after oral dosing. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 8030-8034. Obtenido de <http://scihub.io/10.1021/jf801398p>
- Chu, P.-S., & López, M. (2005). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Protein-Bound Residues in Shrimp Dosed with Nitrofurans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 8934–8939.
- CODEX. (Julio de 2011). Obtenido de ANTEPROYECTO PARA PRIORIZAR LA LISTA DE PELIGROS PRESENTES EN LOS PIENSOS: [ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/TFAF/tfaf6/af06\\_05s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/TFAF/tfaf6/af06_05s.pdf)
- Cooper, K. M., & Kennedy, D. G. (2007). Stability studies of the metabolites of nitrofurans antibiotics during storage and cooking. *Food Additives and Contaminant*, 935-942.
- Decision commission. (2003). *amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin*. Obtenido de [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food\\_Legislation\\_Links/Veterinary\\_Medicines,\\_Animal\\_Remedies,\\_Control\\_of\\_Illegal\\_Substances\\_and\\_Poisoning/Commission\\_Decision\\_2003\\_181\\_EC.pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food_Legislation_Links/Veterinary_Medicines,_Animal_Remedies,_Control_of_Illegal_Substances_and_Poisoning/Commission_Decision_2003_181_EC.pdf)
- Dimitrieska, E., Arsova, G., Hajrulaj, Z., Stojanovska, B., Uzunov, R., Todorovic, A., & Stojkovic, G. (2013). IN-HOUSE VALIDATION AND QUALITY CONTROL OF COMMERCIAL ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS FOR SCREENING OF NITROFURAN METABOLITES IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN. *Mac Vet Rev*, 13-21.
- ESPAE-ESPOL. (Febrero de 2016). *ESTUDIOS INDUSTRIALES ORIENTACION ESTRATÉGICA PARA LA TOMA DE DECISIONES. INDUSTRIA DE GANADERÍA DE CARNE*. Obtenido de <http://www.fides.ec/wp-content/uploads/2016/05/ESPAE-Estudios-Industriales-Ganader%C3%ADa-de-Carne.pdf>
- FAO. (2002). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s06a.htm>

- ICA, I. (3 de Julio de 2015). *PLAN NACIONAL SUBSECTORIAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y CONTAMINANTES QUÍMICOS EN BOVINOS DE CARNE Y SUS PRODUCTOS*. Obtenido de <http://www.ica.gov.co/getattachment/Areas/Pecuaria/Servicios/Inocuidad-en-las-Cadenas-Agroalimentarias/Plan-Nacional-de-Residuos/PNR-carne-ICA-INVIMA-03-07-15.pdf.aspx>
- INEC. (2014). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC*. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- INTA. (2010). *Manejo sanitario eficiente del ganado bovino*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/019/as497s/as497s.pdf>
- INVIMA. (1 de Diciembre de 2010). *Plan Nacional Sub-sectorial de vigilancia y control de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes químicos en bovinos de leche*. Obtenido de [https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion\\_y\\_vigilancia/direccion-alimentos/planes/PLAN-LECHE-2015.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion_y_vigilancia/direccion-alimentos/planes/PLAN-LECHE-2015.pdf)
- Jordan, W. (2005). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Medical Biomethods Handbook*, 419-427.
- Lárazo, C., Espinoza B., J., Trajano S., J., Flosi P., V., & Conte, C. (2015). Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Food safety*, 1-9.
- Leitner, A., Zollner, P., & Wolfgang, L. (2001). Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 49-58.
- Meza Calderón, F. (2014). *Universidad de Guayaquil*. Obtenido de Tesis: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/8028/1/BCIEQ-%20T-%200029%20Meza%20Calder%C3%B3n%20Franklin%20Jes%C3%BAs.pdf>
- O’Keeffe M., C. A. (2004). Nitrofurantoin antibiotic residues in pork: The FoodBRAND retail survey. *Analytica Chimica Acta*, 125-131.
- Orlando, L., & Olivos, H. (2007). Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa Cuadrupolar en Tándem (LC/MS/MS) y su aplicación en el análisis de residuos de antibióticos Nitrofuranos en músculo de pollo. *Revista de Química*.

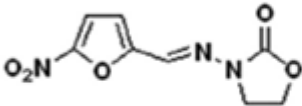
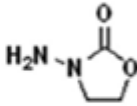
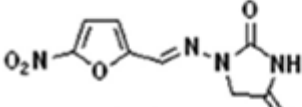
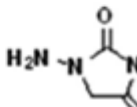
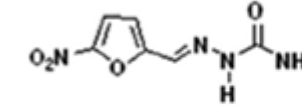
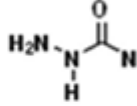
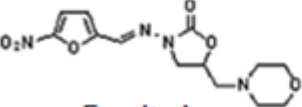
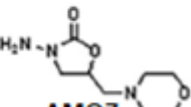
- PROEQUADOR. (Julio de 2016). *Perfil sectorial de lácteos y cárnicos*. Obtenido de [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/proec\\_psi2016\\_lacteos.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/proec_psi2016_lacteos.pdf)
- Reig, M., & Toldrá, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, 60-67. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174007002719>
- Riera, M. M. (2010). *Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos medicamentosos en animales de granja*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Solis, Y. M. (2015). CROM\_ ATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TÁNDEM, PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE NITROFURANOS EN MÚSCULO DE CERDO EN LA CIUDAD DE TACNA. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 50-53.
- Souza, M. I. (2012). *RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN CARNE BOVINA*. Obtenido de UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS: [http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Maria\\_Izabel.pdf?1355500347](http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Maria_Izabel.pdf?1355500347)
- Toldrá, F., & Reig, M. (31 de Marzo de 2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 482-489. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224406000537>
- Vass, M., Diblikova, I., Kok, E., Stastny, K., Frgalova, K., & K., H. (2008). In-house validation of an ELISA method for screening of semicarbazida in eggs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 930-936.
- Wagner, S. A., & Fajt, V. R. (25 de Marzo de 2010). *Farmacología y Bovinos*. Obtenido de Agrovét Market Animal Health: <http://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/farmacologia-y-bovinos>
- Wen, R. T., Ya, X. S., & Xiang, H. W. (2014). Semicarbazide – from state-of-the-art analytical methods and exposure to toxicity: a review. *Food Additives & Contaminants*, 1850-1860.



## **6. ANEXOS**

## ANEXOS

### ANEXO 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS NITROFURANOS Y SUS METABOLITOS

NITROFURANO	METABOLITO
 Furazolidona	 AOZ
 Nitrofurantoina	 AHD
 Nitrofurazona	 SEM
 Furaltadona	 AMOZ

## ANEXO 2: NÚMERO DE MUESTRAS PRIMARIAS

**Cuadro 2.** Número de muestras primarias seleccionadas al azar necesario para una probabilidad determinada de detectar una muestra no conforme por lo menos en un lote de carne de reses y aves, para una incidencia dada de residuos no conformes en el lote

Incidencia de los residuos no conformes en el lote %	Número mínimo de muestras ( $n_0$ ) necesarias para detectar residuos no conformes con una probabilidad del:		
	90%	95%	99%
90	1	-	2
80	-	2	3
70	2	3	4
60	3	4	5
50	4	5	7
40	5	6	9
35	6	7	11
30	7	9	13
25	9	11	17
20	11	14	21
15	15	19	29
10	22	29	44
5	45	59	90
1	231	299	459
0,5	460	598	919
0,1	2302	2995	4603

*Notas.* a) El cuadro se basa en el supuesto de un muestreo aleatorio.

b) Cuando el número de muestras primarias indicado en el Cuadro 2 es un 10% aproximadamente superior a las unidades en el lote total, el número de muestras primarias podrá ser menor y deberá calcularse del modo siguiente:

Fuente: Codex Alimentarius CAC/GL 33, 1999

### ANEXO 3: CODIFICACIÓN MUESTRAS DE CARNE

IDENTIFICACIÓN MATADERO	CODIFICACIÓN
M-01	17-137
M-02	17-138
M-03	17-139
M-04	17-140
M-05	17-141
M-06	17-142
M-07	17-143
M-08	17-144
M-09	17-145
M-10	17-146
M-11	17-147
M-12	17-148
P-01	17-149
P-02	17-150
P-03	17-151
P-04	17-152
P-05	17-153
P-06	17-154
P-07	17-155
P-08	17-156
P-09	17-157
P-10	17-158
EC-01	17-159
EC-02	17-160
EC-03	17-161
R-01	17-162
R-02	17-163
PD-01	17-164
PJ-1	17-165
PJ-02	17-166
PJ-03	17-167
PJ-04	17-168
H-01	17-169
H-02	17-170
Cha-01	17-171
T-01	17-172
T-02	17-173
T-03	17-174
Ch-01	17-175
Ch-02	17-176
B-01	17-177

## ANEXO 4: REGISTRO DE MUESTRAS PARA EL PROTOCOLO KIT ELISA


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	St4 1,6	17- 137	17- 141	17- 145	17- 149	17- 153	17- 157	17- 161	17- 165	17- 169	17- 173
<b>B</b>	B	St4 1,6	17- 137	17- 141	17- 145	17- 149	17- 153	17- 157	17- 161	17- 165	17- 169	17- 173
<b>C</b>	St1 0,025	Sts 6,4	17- 138	17- 142	17- 146	17- 150	17- 154	17- 158	17- 162	17- 166	17- 170	17- 174
<b>D</b>	St1 0,025	Sts 6,4	17- 138	17- 142	17- 146	17- 150	17- 154	17- 158	17- 162	17- 166	17- 170	17- 174
<b>E</b>	St2 0,1	QC 1,6 ppb	17- 139	17- 143	17- 147	17- 151	17- 155	17- 159	17- 163	17- 167	17- 171	17- 175
<b>F</b>	St2 0,1	QC 1,6 ppb	17- 139	17- 143	17- 147	17- 151	17- 155	17- 159	17- 163	17- 167	17- 171	17- 175
<b>G</b>	St3 0,4	F1 144'	17- 140	17- 144	17- 148	17- 152	17- 156	17- 160	17- 164	17- 168	17- 172	17- 177
<b>H</b>	St3 0,4	F1 144'	17- 140	17- 144	17- 148	17- 152	17- 156	17- 160	17- 164	17- 168	17- 172	17- 177

Fuente: AGROCALIDAD, 2017

# ANEXO 5: RESULTADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE MASAS

## LABORATORIO WSS

Inspección & Certificación de Calidad  
Página 1 de 1  
R-LB-15 Rev.08 / 10.11.2016



---

### INFORME DE ENSAYO N° 3217-17

**Número de OT** : 27554  
**Ciente** : Mayra Silvana Veintimilla Paredes  
**Dirección** : Avenida Carlos Mantilla y Alhambra Casa # N 14-125  
**Laboratorio** : Instrumental  
**Tipo de Muestra** : Carne de res  
**Origen de Muestra** : Muestra proporcionada por el cliente  
**Tipo de envase** : Fuida plástica      **Fecha de recepción** : 22 de Agosto del 2017  
**Cantidad de Muestra** : 600 g      **Fecha Inicio de Ensayo** : 22 de Agosto del 2017  
**Hora Recepción** : 11:46      **Fecha Término de Ensayo** : 31 de Agosto del 2017

---

### RESULTADOS DE ANÁLISIS


Muestra - Descripción	Ensayo	Resultado ug/Kg	Incert.	LOD ug/Kg	LOQ ug/Kg	LMR ug/Kg	Métodos
CARNE DE RES MANTA/ M01 17-237	NITROFURAZONA (SEM)	0,46	± 0,1	0,125	0,25	1	POS-U-003: Determinación de Nitrofuranos mediante UPLCMSMS. Método de referencia: Darni Institute SOP 80 220 V.1 - Belfast, UK. Determinación de residuos totales de Nitrofuranos en tejidos usando sistema LCMSMS; Determinación de residuos de medicamentos veterinarios usando un sistema Waters Quattro Premier Tandem Espectrometría de masas. G. Kearney y A. Newton. - Waters Corporation Manchester UK.
	NITROFURANTOINA (ARO)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURALTADONA (AMOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURAZEDONA (AOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	


**Comentarios:**  
 0310= CARNE DE RES MANTA/M01 17-237

**Observaciones:**  
 Los resultados corresponden tan sólo a las muestras sometidas a ensayo.  
 La reproducción parcial de este informe no está permitida sin la autorización por escrito de este laboratorio.

Límite de detección = LOD      Límite de cuantificación= LOQ      Límite máximo residual = LMR  
 ND = No Detectado

Guayaquil, 31 de Agosto del 2017

  
 J.P. Verónica Ancayay L.  
 Jefe de laboratorio Instrumental  
 WSS ECUADOR S.A.



ORIGNAS ADMINISTRATIVAS Y COMERCIAL: Av. Francisco de Orellana Edificio World Trade Center Torre B Piso 1, Of. 123 Phone: 593-4-2630234 - 2630233  
 LABORATORIO: Av. de las Américas 1608 y Av. Plaza Dañin - e-mail: wss@wss.ec  
 www.wss.ec - Guayaquil - Ecuador

# LABORATORIO WSS

Inspección & Certificación de Calidad

Página 1 de 1

RJR-15-Rv.08 / 30.11.2016



## INFORME DE ENSAYO N° 3218-17

Número de OT : 27554  
Cliente : Mayra Silvana Veintimilla Paredes  
Dirección : Avenida Carlos Mantilla y Alhambra Casa # N 14-125

Laboratorio : Instrumental  
Tipo de Muestra : Carne de res  
Origen de Muestra : Muestra proporcionada por el cliente

Tipo de envase : Funda plástica      Fecha de recepción : 22 de Agosto del 2017  
Cantidad de Muestra : 600 g      Fecha Inicio de Ensayo : 22 de Agosto del 2017  
Hora Recepción : 11:40      Fecha Término de Ensayo : 31 de Agosto del 2017

### RESULTADOS DE ANÁLISIS

Muestra - Descripción	Ensayo	Resultado ug/Kg	Incert.	LOD ug/Kg	LOQ ug/Kg	LMR ug/Kg	Métodos
CARNE DE RES CH-01 17-175	NITROFURAZONA (SEM)	0,66	±0,14	0,125	0,25	1	POE-LI-003: Determinación de Nitrofuranos mediante UPLCMSMS. Método de referencia: Danni Institute SQP B0 220 V.1.- Belfast, UK. Determinación de residuos totales de Nitrofuranos en tejidos usando sistema LCMSMS; Determinación de residuos de medicamentos veterinarios usando un sistema Waters Quattro Premier Tandem Espectrometría de masa, G, Koenig y A, Newton - Waters Corporation Manchester UK)
	NITROFURANTOINA (AHO)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURALTADONA (AHOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURAZOLIDONA (AHOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	

#### Comentarios:

6311= CARNE DE RES  
CH-01 17-175

#### Observaciones:

Los resultados corresponden tan sólo a las muestras sometidas a ensayo.  
La reproducción parcial de este informe no está permitida sin la autorización por escrito de este laboratorio.

Límite de detección = LOD      Límite de cuantificación = LOQ      Límite máximo residual = LMR  
ND = No Detectado

Guayaquil, 31 de Agosto del 2017

G.F. Verónica Ancoyay L.  
Jefe de laboratorio Instrumental  
WSS ECUADOR S.A.



# LABORATORIO WSS

Inspección & Certificación de Calidad

Página 1 de 1

R-LB-15 Rev.03 / 10.11.2016



## INFORME DE ENSAYO Nº 3219-17

Número de OT : 27554  
Cliente : Mayra Sivera Veintimilla Farcas  
Dirección : Avenida Carlos Mantilla y Alhambra Casa # N 14-125  
Laboratorio : Instrumental  
Tipo de Muestra : Carne de res  
Origen de Muestra : Muestra proporcionada por el cliente  
Tipo de envase : Pinda plástica  
Fecha de recepción : 22 de Agosto del 2017  
Cantidad de Muestra : 600 g  
Fecha Inicio de Ensayo : 22 de Agosto del 2017  
Hora Recepción : 11:46  
Fecha Término de Ensayo : 31 de Agosto del 2017

### RESULTADOS DE ANÁLISIS

Muestra - Descripción	Ensayo	Resultado ug/Kg	Incert.	LOD ug/Kg	LOQ ug/Kg	LMR ug/Kg	Métodos
CARNE DE RES MANTA/ W01 17-237	NITROFURAZONA (SEM)	0,28	± 0,08	0,125	0,25	1	PDE-LI-004; Determinación de Nitrofuranos mediante UPLCMSMS. Método de referencia: Dairy Institute SOP 860 220 V.1 - Belfast, UK. Determinación de residuos totales de Nitrofuranos en tejidos usando sistema LCMSMS; Determinación de residuos de medicamentos veterinarios usando un sistema Waters Quattro Premier Tandem Espectrometría de masas. G. Eames y A. Newton - Waters Corporation Manchester UK
	NITROURANTOINA (AHO)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURALTADONA (AHOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	
	FURAZOLIDONA (AOZ)	ND	-	0,125	0,25	1	

#### Comentarios:

6312= CARNE DE RES  
W01 17-237

#### Observaciones:

Los resultados corresponden tan sólo a las muestras sometidas a ensayo.  
La reproducción parcial de este informe no está permitida sin la autorización por escrito de este laboratorio.

Límite de detección = LOD      Límite de cuantificación = LOQ      Límite máximo residual = LMR  
ND = No Detectado

Guayaquil, 31 de Agosto del 2017

Q.F. Verónica Ancoyay L.  
Jefe de laboratorio Instrumental  
WSS ECUADOR S.A.

