

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.

TRANSFORMACIONES DE SULFAMETAZINA EN EL CERDO IN VIVO Y
DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN Y COCINADO DE SUS
TEJIDOS



Por

Amada Yerén Escobedo Lozano

Tesis aprobada por la

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de


MAESTRÍA EN CIENCIAS

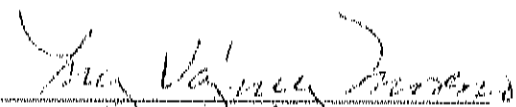
Hermosillo, Sonora.


Noviembre 2003

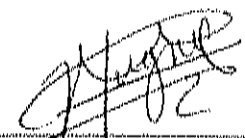
APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de Amada Yerén Escobedo Lozano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.


M. en C. María del Carmen Bermúdez Almada
Director de tesis


Dra. Luz Vázquez Moreno

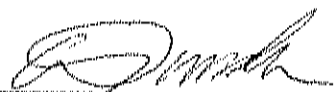

Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar


M. en C. Humberto Gonzalez Ríos

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.; por brindarme la oportunidad de continuar creciendo profesional y personalmente en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; por el apoyo económico brindado para llevar a cabo mis estudios de postgrado y el financiamiento otorgado al proyecto 35180-B, dentro del cual desarrollé el presente trabajo de tesis.

A la M. C. María del Carmen Bermúdez Almada; por su confianza y apoyo al permitirme participar y desarrollar este proyecto, así como las enseñanzas adquiridas en el mismo.

Agradezco de forma especial a la M. C. Angélica Espinosa Plascencia; por su apoyo técnico, paciencia y cariño que me ayudaron a desarrollar con eficiencia y armonía el proyecto.

Al personal del Laboratorio de Residuos Tóxicos, en especial al laboratorio de Análisis Biológicos; por su disponibilidad y apoyo al desarrollar el trabajo.

A mis compañeras de laboratorio: Erika Fierros, Tania Barreras y Leticia Miranda, porque me brindaron una hermosa amistad, apoyo moral, comprensión y respeto.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Luz Vázquez Moreno, Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar y al M. C. Humberto Gonzalez Rjos. Gracias por su tiempo, asesoría, sugerencias y aportaciones que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

A la M.C. Gabriela Ramos Clamont Montfort; por su tiempo y disposición en la toma de fotografías que mejoraron y dieron calidad a la presentación del trabajo.

A la M.C. Refugio Robles Burgueño; por brindarme su tiempo y asesoría en el manejo del cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas.

A mis compañeros de grupo; por compartir conmigo esta etapa de nuestras vidas. Principalmente a Felipe Alemán, Héctor Ayala y Jorge Márquez que me brindaron su cariño y apoyo en cualquier momento que lo necesite.

A los investigadores y técnicos de los diversos departamentos en los que recibí su colaboración para la realización de este proyecto.

A los profesores con los que tuve oportunidad de adquirir sus enseñanzas y conocimientos en el aula de clases.

A toda la comunidad CIAD, en especial al personal de Biblioteca, que siempre estuvieron dispuestos a prestarme ayuda en todo momento.

A mis amigos: Ana Lourdes Mata, Araceli Serna, Consuelo Corrales, Nidia Caceres, Erik Ramírez y Saúl Ruiz quienes han estado conmigo incondicionalmente a lo largo de nuestra estancia en el CIAD.

A mis tíos: Ma. Antonieta Lozano Velázquez y Rubén Reynaga Váldez; así como a mis primos Silvia, Rubén y Linda; quienes me brindaron su hogar y corazones en mi estancia en Sonora.

DEDICATORIAS

A DIOS; por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y cada día de mi existencia. Gracias por todo.

A mi madre Ma. Elizabeth Lozano Velázquez; por darme vida, amor, confianza, comprensión, fortaleza, tranquilidad, amistad y por ser un ejemplo de vida. Te amo.

A mi esposo José María Uribe Costo quien también ha sido mi amigo incondicional y compañero. Por su gran apoyo en mi desarrollo profesional y personal. Así como, el cariño y admiración que nos tenemos.

A mi hermano José Omar Escobedo Lozano, a mi padre Amado Pascual Escobedo Cerpa y Gilberto González; por todo su cariño, consejos, todos los momentos gratos vividos y fortaleza para seguir adelante en el camino de la vida. Los quiero y agradezco a Dios que estén conmigo.

A mi familia, en especial a mis tíos Ma. Antonieta Lozano Velázquez y Rubén Reynaga Vázquez; porque además de abrirme sus corazones son personas admirables y un gran ejemplo de vida a seguir. Los quiero mucho.

A mis amigos: Ana Lourdes Mata, Araceli Serna, Erik Ramírez y Saúl Ruiz quienes han estado a mi lado en las buenas, en las malas y con quienes he compartido muy bellos y gratos momentos.

A mis amigas Elsa Ochoa, Marcia Gauthereau, Mariana Armenta y Rebeca Garay; porque a pesar de la distancia, siempre me hicieron sentir su apoyo y amistad.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
Objetivos Particulares.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	6
Definición y Uso de Sulfametazina.....	6
Mecanismo Bacteriostático de Sulfametazina.....	6
Metabolismo de Sulfametazina.....	8
Absorción.....	8
Biotransformación.....	8
Reacciones de fase I.....	9
Reacciones de fase II.....	9
Conjugación con glucurónidos o glucuronidización.....	10
Acetilación.....	10
Excreción.....	11
Importancia de la Sulfametazina en la Industria Porcina.....	12
Uso Inadecuado de Sulfametazina en la Industria Porcina y la Presencia de sus Residuos en Tejidos Animales.....	12
Riesgos a la Salud por el Uso de Sulfametazina.....	14
Transformaciones de Sulfametazina Bajo Condiciones de Congelación y Cocinado.....	15
Regulación Sanitaria.....	17
Métodos de Detección de Sulfametazina y sus Metabolitos.....	18
Métodos Microbiológicos.....	19
Métodos Químicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Reactivos.....	21
Aseguramiento de la Calidad de los Resultados.....	21

Linealidad.....	21
Sensibilidad.....	22
Exactitud.....	22
Adición de Sulfametazina en el Alimento para Cerdos.....	22
Bioensayo.....	23
Diseño del Experimento.....	23
Metabolismo de Sulfametazina.....	25
Acumulación de Sulfametazina y Metabolitos.....	25
Transformaciones de Sulfametazina Durante Congelación.....	25
Transformaciones de Sulfametazina Durante Cocinado.....	26
Estandarización del método de hervido.....	26
Hervido.....	26
Asado.....	26
Análisis de Sulfametazina y Metabolitos.....	27
Preparación de las Muestras.....	27
Preparación del Estándar de Sulfametazina.....	27
Preparación del Estándar de Acetilsulfametazina.....	28
Activación de Silica Gel Octadecilsilano Derivatizada (C ₁₈).....	28
Preparación de la Fase Móvil.....	28
Extracción en Tejido.....	29
Confirmación de Resultados.....	30
Determinación del Porcentaje de Humedad.....	31
Análisis Estadístico.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Aseguramiento de la Calidad de los Resultados.....	33
Linealidad.....	33
Sensibilidad.....	33
Exactitud.....	35
Análisis de Sulfametazina en Alimento para Cerdos.....	35
Metabolismo de Sulfametazina.....	37
Acumulación de Sulfametazina y Metabolitos.....	40

Confirmación de Resultados por Espectrometría de Masas.....	43
Transformación de Sulfametazina Durante Congelación.....	44
Transformaciones de Sulfametazina Durante Cocinado.....	57
Estandarización del Método de Hervido.....	57
Hervido y Asado.....	59
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructuras de sulfametazina y sus metabolitos.....	7
2.	Esquema del diseño experimental.....	24
3a.	Curva de calibración de sulfametazina.....	34
3b.	Curva de calibración de sulfametazina acetilada.....	34
4.	Cromatograma de una muestra de alimento para cerdo con una... concentración de 110 mg/Kg de sulfametazina.....	36
5.	Concentraciones de sulfametazina (ppm) detectadas en los tejidos de porcino con respecto al tiempo de su administración.....	38
6.	Concentraciones de sulfametazina acetilada (ppm) detectadas en los tejidos de porcino con respecto al tiempo de su administración.....	41
7a.	Concentración de sulfametazina acumulada en los tejidos de cerdo durante 5 días.....	42
7b.	Concentraciones del metabolito N ⁴ -acetilsulfametazina acumulado.. en los tejidos de cerdo durante 5 días.....	42
8.	Espectro de masas de un estándar de sulfametazina.....	45
9.	Espectro de masas de un estándar del metabolito N ⁴ -acetilsulfame- tazina.....	45
10.	Espectro de masas de una muestra de hígado conteniendo sulfame- tazina y tres de sus metabolitos.....	46
11.	Concentraciones de sulfametazina (ppm) en los tres diferentes..... tejidos de porcino sometidos a almacenamiento en congelación.....	50
12.	Concentraciones de sulfametazina acetilada (ppm) en los tres..... tejidos de porcino sometidos a almacenamiento en congelación.....	51
13.	Comportamiento de sulfametazina a través del tiempo de almace- namiento a -20 °C.....	52

14.	Comportamiento de sulfametazina acetilada a través del tiempo de almacenamiento a -20°C	53
15.	Espectros de masas de una muestra de hígado que fue sometida al proceso de congelación conteniendo sulfametazina y uno de sus metabolitos.....	54
16.	Espectros de masas de una muestra de hígado conteniendo dos de los metabolitos de sulfametazina.....	56
17.	Cromatogramas de la reconversión del metabolito acetilado a sulfametazina.....	58
18.	Comportamiento de sulfametazina y su metabolito en los tejidos de músculo, hígado y riñón al someterlos a los diferentes tratamientos térmicos.....	60
19.	Espectros de masas de una muestra de músculo conteniendo sulfametazina.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cambios en concentración (ppm) de sulfametazina y su metabolito acetilado producidos por el cocinado en hígado, músculo y riñón.....	64

RESUMEN

La sulfametazina (SMZ) es un antibiótico sintético muy utilizado en la industria porcina con fines de tratar, prevenir enfermedades y promover el crecimiento animal. Se ha visto que dentro del organismo, el antibiótico forma diversos metabolitos, los cuales pueden permanecer en los tejidos comestibles y éstos presentan el mismo efecto toxicológico que la sulfametazina original. Es por ello, importante desde el punto de vista de salud pública que existan regulaciones para el control de antibióticos. En México, se cuenta con la NOM-004, 1996, en la que se establecen los límites máximos permitidos para sulfametazina en los diferentes tejidos animales, sin embargo, esta normatividad no considera la presencia de los metabolitos. Por lo que, el objetivo del presente trabajo fué determinar las transformaciones de sulfametazina en cerdos *in vivo* y en sus tejidos sometidos a condiciones de congelación y de cocinado. Primeramente, se realizó un bioensayo con 13 cerdos, separados en tres grupos de 3 cerdos (A, B, C), un grupo de dos cerdos (D) y dos cerdos como control. Los animales de los grupos A, B y C fueron alimentados una sola vez con una dieta basal conteniendo 110 mg/Kg de sulfametazina, y fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente postalimentación. Al grupo D se le administró por 5 días la dieta con sulfametazina sacrificándolo al 6to. día, estos tejidos se almacenaron en congelación por seis meses. Muestras de hígado, riñón y músculo se sometieron a procesos de hervido y asado. Las concentraciones de sulfametazina y sus metabolitos en los tejidos se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución y se confirmaron por espectrometría de masas. Las concentraciones de sulfametazina y N⁴-acetilsulfametazina disminuyeron durante las primeras 72 horas presentando un comportamiento lineal. Por espectrometría de masas se identificaron sulfametazina, N⁴-acetilsulfametazina, N⁴-glucuronilsulfametazina y N⁴-desaminosulfametazina. En los cerdos, a los cuales se les administró sulfametazina durante 5 días, se encontró una acumulación de residuos en niveles promedio de 2.7±0.61 ppm en riñón, 2.09±0.50 en hígado y 1.67±0.11 en músculo.

Para el metabolito de sulfametazina acetilada las concentraciones promedio fueron, 3.72 ± 0.12 ppm en riñón, 0.87 ± 0.03 ppm en hígado y 0.53 ± 0.064 ppm en músculo. Los niveles de sulfametazina y el metabolito acetilado disminuyeron durante la congelación. Sin embargo, las concentraciones finales de sulfametazina estuvieron por arriba del límite permitido (0.1 ppm) y las del metabolito acetilado fueron de 0.05 a 0.18 ppm en hígado, músculo y riñón. Por espectrometría de masas se confirmó nuevamente la presencia de sulfametazina, N⁴-acetilsulfametazina, N⁴-desaminosulfametazina y N⁴-glucuronilsulfametazina en tejidos de hígado, músculo y riñón sometidos a congelación. En el cocinado se observó una hidrólisis del metabolito acetilado formando nuevamente la sulfametazina. En el asado la reconversión osciló entre 40 a 60% y para hervido del 20 al 40%. Mediante espectrometría de masas se observó una disminución en la intensidad de los metabolitos N⁴-acetilsulfametazina y N⁴-glucuronilsulfametazina. Las transformaciones que ocurren a la sulfametazina en el cerdo *in vivo* y durante los procesos de congelación y cocinado indican la importancia que tiene la cuantificación de los metabolitos, ya que éstos pueden estar implicados en los efectos adversos del antibiótico.

HIPÓTESIS

La sulfametazina presente en tejidos de cerdo se transforma durante el almacenamiento en congelación y por efecto del cocinado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las transformaciones de sulfametazina en cerdos *in vivo* y en sus tejidos sometidos a condiciones de congelación y de cocinado.

Objetivos Particulares

Estudiar las transformaciones de sulfametazina en cerdos, a las 24, 48 y 72 horas de la administración de una dieta conteniendo el antibiótico en una concentración de 110 mg/kg.

Estudiar la acumulación de sulfametazina y sus metabolitos en los tejidos de cerdos alimentados durante 5 días con una dieta conteniendo el antibiótico en una concentración de 110 mg/kg.

Determinar las transformaciones de sulfametazina en músculo, riñón e hígado de porcino almacenados a -20°C durante 6 meses.

Estudiar las transformaciones de la sulfametazina presente en muestras de músculo, riñón e hígado de porcino sometidos a tratamientos de hervido y asado.

INTRODUCCIÓN

En 1931, a partir de núcleos de sulfanilamida se sintetizó el químico prontosil; el cual, resultó efectivo contra infecciones causadas por *Streptococcus*, en humanos. En 1935, se utilizó en animales y durante los años 40's se sintetizaron diversas sulfonamidas como sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfatiazol, sulfaguanidina, sulfametazina y otras, las cuales son muy utilizadas en la actualidad. Por su eficiencia, costo y características farmacocinéticas, se cree que influyen en la promoción del crecimiento, ya que juegan un papel importante en la profilaxis y terapéutica veterinaria (Bevill, 1984; Fuentes, 1999).

El uso indiscriminado de sulfonamidas, principalmente sulfametazina en la industria porcina y la falta de conocimiento sobre el uso adecuado de la medicación, induce la presencia de residuos tóxicos en tejidos animales. Este problema, se presenta en varios países del mundo. En Estados Unidos, del 6-10% de los cerdos sacrificados para abasto, han presentado concentraciones tisulares de sulfas por arriba de los Límites Máximos de Residuos (LMR) permitidos (0.1 ppm). La mayoría de los residuos violatorios encontrados en los tejidos fueron debido a sulfametazina. En la actualidad, en dicho país ha bajado el índice de violaciones por sulfonamidas a menos del 6% (Augsburg, 1989; Biehl, 1994).

En México, en la región noroeste del país, se detectó una incidencia del 6.1% de sulfonamidas en tejidos animales comestibles, correspondientes a carne de porcinos (Bermúdez y cols. 2001). Por lo que, se considera que podría existir un riesgo a la salud pública debido a los efectos que se pueden presentar por el uso de sulfametazina. Dentro de los efectos a la salud se encuentran, las reacciones alérgicas en personas sensibles, además del desarrollo de cepas resistentes a microorganismos en los animales, que pueden transmitirse al hombre por medio de la cadena alimenticia (Gums, 2002; Tilles, 2001).

Es común que los tejidos cárnicos se sometan a tratamientos térmicos (congelación o cocción) antes de su consumo, por lo que es importante conocer

los efectos de estos tratamientos sobre los residuos de sulfametazina contenidos en los tejidos comestibles. Existen pocos estudios *in vitro* en donde se dan a conocer las transformaciones de la sulfametazina en tejidos como riñón, hígado y músculo. En ellos se observó que durante congelación, la sulfametazina se transformó a su metabolito N⁴-glucosilsulfametazina. Otro metabolito de importancia por el poder toxicológico y residual que presenta es el N⁴-acetilsulfametazina, ya que se cree que al cocinar los tejidos que contienen dichos metabolitos, éstos sufren una reacción de hidrólisis formando de nuevo la sulfametazina original (O'Brien y cols. 1981; Paulson y cols. 1981; Giera y cols. 1982^b; Fisher y cols. 1992).

En la detección de sulfonamidas se utilizan métodos microbiológicos y en caso de ser positivo el resultado se recurre a la detección individual por medio de cromatografía líquida de alta resolución. Estas pruebas microbiológicas son insuficientes en la detección de sulfametazina y sus metabolitos, por lo que, se requiere hacer su identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución y su confirmación por espectrometría de masas.

Los estudios *in vivo* reportados, donde se expone como se da la transformación y acumulación del antibiótico y sus metabolitos en los tejidos comestibles han sido insuficientes. Por lo que, es importante realizar mayor investigación sobre este tema, ya que con ello, se puede reflejar con mayor precisión el riesgo que estos compuestos pueden representar para el consumidor (O'Brien y cols. 1981; Fisher y cols. 1992).

Debido a la poca información disponible en nuestro país sobre el tema, es importante realizar investigaciones acerca de las transformaciones que sufre la sulfametazina en los tejidos como riñón, hígado y músculo de cerdo, sometidos a diversos tratamientos térmicos, así como su confirmación por espectrometría de masas.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Definición y Uso de Sulfametazina

La sulfametazina se define químicamente como, 4-amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil)bencen-sulfonamida y su masa molecular es de 278.32 m/e (Fig. 1). Es un polvo blanco o crema, insoluble en agua, soluble en solventes polares y en soluciones alcalinas, donde actúa como ácido débil con la subsiguiente formación de sales de sodio y potasio. En ácidos diluidos actúa como base débil debido a la aceptación de protones en la posición N⁴ (Bevill, 1984; Kiser, 1984).

En humanos, se administra principalmente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario y en animales se emplea en infecciones respiratorias, mastitis, diarreas, enteritis y otras. El uso de niveles subterapéuticos (110 mg/kg) de la sulfametazina en los alimentos para animales tiene el propósito de prevenir infecciones, promover el crecimiento y favorecer la disponibilidad de los nutrimentos (Bevill, 1984; Kiser, 1984; Águila, 2000^b; Breeders, 2000).

Mecanismo Bacteriostático de Sulfametazina

El ácido fólico, es un precursor importante en la síntesis de metionina, timinas, purinas y DNA en humanos y bacterias. Los humanos absorben el ácido fólico de la dieta, mientras que las células bacterianas lo sintetizan por medio de la enzima dihidropteroato sintetasa. Esta enzima, cataliza la condensación del ácido p-aminobenzoico y 2-amino 4-hidroxi-hidropteridina para formar dihidropteroato, un intermediario en la síntesis de ácido fólico. La sulfametazina tiene una estructura química similar al ácido p-aminobenzoico por lo que, actúa inhibiendo a nivel de la enzima. Como consecuencia la bacteria no puede adquirir el ácido fólico que necesita como coenzima para formar las purinas necesarias para la biosíntesis de DNA (Bevill, 1984; Kucers y cols. 1984; Silverman, 1992).

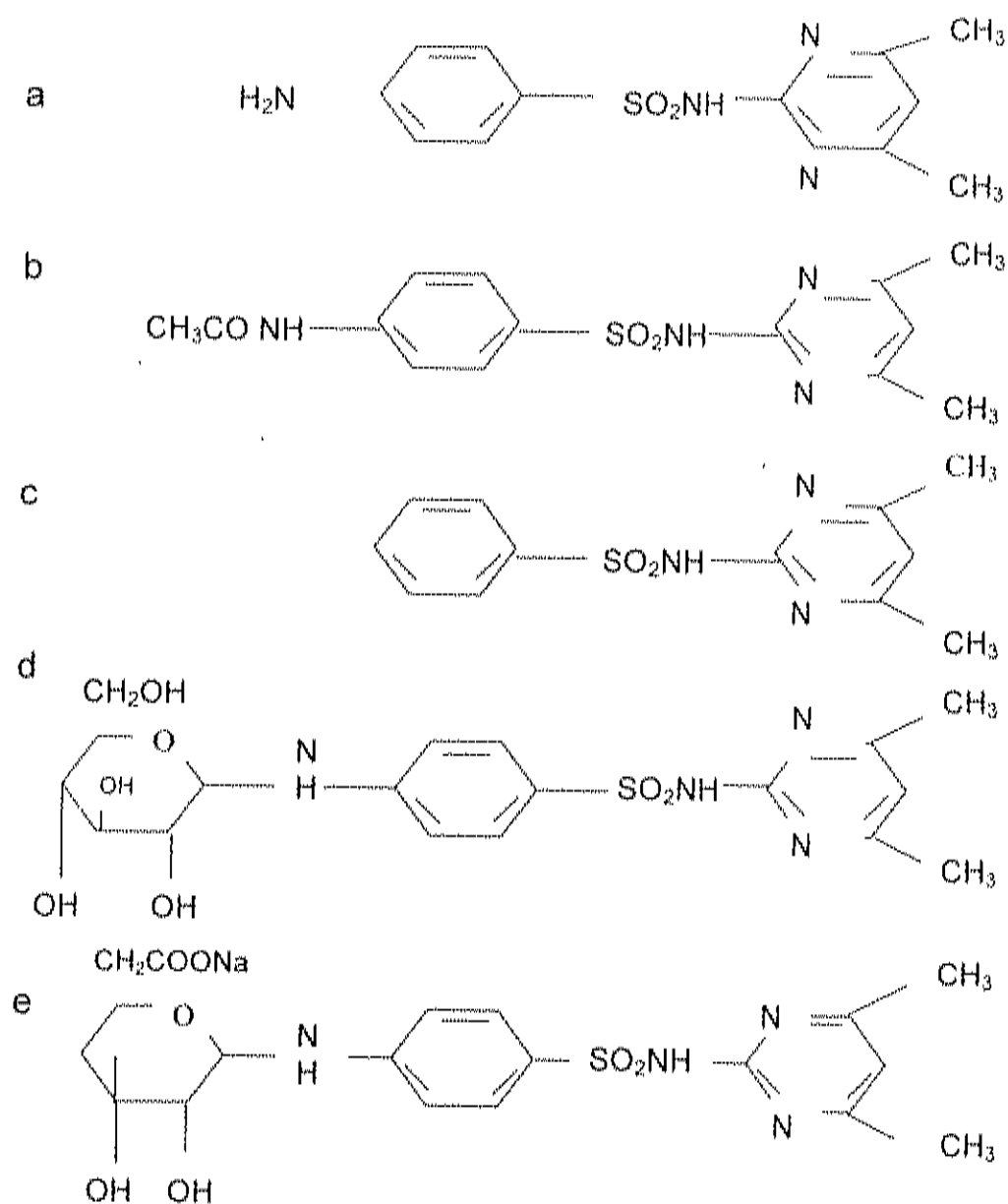


Figura 1. Estructuras de sulfametazina y sus metabolitos

- a) Sulfametazina, Masa molecular = 278.32
- b) N⁴- acetilsulfametazina, Masa molecular = 320.34
- c) Desaminosulfametazina, Masa molecular = 261.0
- d) N⁴-glucosilsulfametazina, Masa molecular = 440.0
- e) N⁴-glucuronilsulfametazina, Masa molecular = 476.0

Metabolismo de Sulfametazina

Absorción.

El término absorción denota la rapidez con que el antibiótico sale de su sitio de administración y el grado en que lo hace. Es un proceso complejo en el cual, intervienen varios factores para que se lleve a cabo la absorción de un medicamento. Uno de ellos son las características fisicoquímicas del fármaco, ya que, éstas determinarán el sitio de absorción. También, el área de superficie absorbente con que entre en contacto es importante. Otro factor que influye es la circulación en el sitio de absorción, entre mayor sea el flujo sanguíneo se acelera la absorción (Shibamoto y Bjeldanes, 1993; Benet y cols. 1996).

En el caso del antibiótico sulfametazina, éste se mezcla en el alimento, para proporcionarse al animal en una concentración de 110 ppm. Su administración es por vía oral, ya que, es la más inocua, cómoda y económica. Por ser un fármaco con características liposolubles, no ionizado y tener un pka de 7.14, se absorbe de un 70 a 100%, mediante transporte pasivo, a través del intestino delgado, el cual tiene una gran área de superficie (Vree y Hekster, 1987; Shibamoto y Bjeldanes, 1993; Benet y cols. 1996). Posteriormente, pasa al sistema circulatorio donde se liga a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina y se distribuye en forma homogénea por todos los tejidos del cuerpo (Mandell y Petri, 1993). Después de su absorción pasa a hígado, en donde se llevan a cabo diversas transformaciones metabólicas (Mitchell y cols. 1985; Fuentes, 1999).

Biotransformación.

La biotransformación de sulfametazina se presenta con el fin de modificar la molécula original y que ésta pueda ser excretada lo más rápido posible del organismo. Las reacciones de biotransformación se efectúan con mayor intensidad

en el hígado por ser un órgano muy irrigado y por contener una alta cantidad de isoenzimas de alta especialización (Silverman, 1992; Klassen y Rozman, 1996).

Los sistemas enzimáticos de los hepatocitos se encuentran primordialmente unidos al retículo endoplásmico, que es una red de canales que movilizan nutrientes dentro de las células. Las isoenzimas, también están presentes en riñón, pulmón, intestino, corteza adrenal, piel, cerebro y otros tejidos epiteliales, pero en menor proporción (Silverman, 1992; Klassen y Rozman, 1996).

En ocasiones, se forman distintos metabolitos que pueden ser inactivos, igual de activos, o más activos que el compuesto que les dió origen. Durante la biotransformación de antibióticos, primeramente el fármaco es sometido a reacciones de fase I y posteriormente se complementa con reacciones de la fase II ó de conjugación (Benet y cols. 1996).

Reacciones de fase I. Es la ruta metabólica predominante y consiste en la adición de grupos amino, hidroxilo y otros, para perder su actividad farmacológica. Esto ocurre principalmente por la acción de dos sistemas enzimáticos, el citocromo P-450 y la flavin-mono-oxigenasa de acción mixta. Este sistema cataliza las oxidaciones, en su mayoría hidroxilaciones de un gran número de fármacos. Para sulfametazina su biotransformación es por oxidación, hidroxilación y desaminación (Silverman, 1992; Benet y cols. 1996).

Reacciones de fase II. Este tipo de reacciones son biosintéticas y requieren normalmente de elevadas cantidades de energía aportadas directa o indirectamente para obtener intermediarios altamente energizados (aminoácidos, sulfato, ácido glucurónico, etc.). Estos intermediarios desactivan el antibiótico y producen metabolitos solubles en agua que son rápidamente excretados en la orina y bilis. Algunas de las reacciones que se dan en la transformación de sulfametazina son la glucuronidización y acetilación (Silverman, 1992; Benet y cols. 1996).

Conjugación con glucurónidos o glucuronidización. Esta reacción consiste en la unión de un nucleótido de alta energía con grupos de una molécula aceptora. Las reacciones requieren de una coenzima proveniente de la α -D-glucosa-1-fosfato, previamente energizada o activada por las enzimas fosforilasas generando el ácido uridín 5', difosfo α -D glucurónico (UDP-GA), seguido de una oxidación en presencia de la enzima uridín-difosfoglucosa deshidrogenasa. Finalmente, en presencia de la uridín-difosfo-glucuronosil-transferasa (UDP-GT) se produce un ácido UDP-glucurónico.

La estructura final de la reacción anterior contiene ácido D-glucurónico en la configuración- α , pero al unirse a otra estructura se comportan como β -glicósidos, por lo que se cree que la reacción involucra una inversión estereoquímica en el carbón anomérico. Se conocen diversos tipos de conjugación con el glucurónido según el tipo de átomo que se le una (Silverman, 1992). Para el caso de sulfametazina se une el grupo glucuronil formando la N⁴-glucuronilsulfametazina (Klassen y Rozman, 1996).

Acetilación. Es la principal ruta metabólica para sulfonamidas y consiste en la transferencia de un radical acetilo a un grupo amino (Silverman, 1992; Mengelers y cols. 1997). Es un mecanismo por el cual se enmascaran posibles receptores, con frecuencia formando metabolitos menos solubles que la molécula original y sin actividad farmacológica. Las enzimas catalizadoras son N-acetil-transferasas, que están presentes en varios tejidos y en diferentes especies.

La reacción de acetilación consiste en dos pasos principales. Primero, la acetilcoenzima A acetila un sitio activo (residuo de cisteína) de la enzima N-acetiltransferasa hepática soluble, después el grupo acetilo se transfiere al grupo amino que es el sustrato (Silverman, 1992; Benet y cols. 1996).

Se ha reportado que los humanos, conejos y ratones expresan dos N-acetil-transferasas conocidas como NAT1 y NAT2, las cuales catalizan la reacción de acetilación para algunas drogas como sulfametoxazol, sulfanilamida, dapsona y sulfametazina.

Se piensa que estas enzimas, dentro de su estructura contienen mutaciones en el ácido para-aminosalicílico distribuido bimodalmente confiriéndoles formas de NAT1 y NAT2 con actividad lenta y alta (Klassen y Rozman, 1996).

Es por ello, que en el caso de sulfametazina se puede observar en los pacientes una acetilación polimórfica, lo cual provoca una variación en la respuesta terapéutica y toxicológica. Por lo que, si la acetilación es lenta, se desarrollan reacciones adversas por efecto de la concentración del metabolito. Si la acetilación es rápida, la respuesta terapéutica es inadecuada a la dosis establecida del xenobiótico (Silverman, 1992).

Excreción.

La mayoría de las sulfonamidas, son excretadas primeramente en la orina, siguiendo una cinética de eliminación de primer orden y se ha observado que son rápidamente eliminadas durante las primeras 72 horas (Whipple y cols. 1980). Aproximadamente, del 73-85% de una dosis aplicada vía administración oral, puede recuperarse en la orina (Kucers y cols. 1984).

La filtración glomerular y la secreción tubular son importantes mecanismos de excreción renal de sulfonamidas. Sin embargo, una porción medible de la droga puede ser reabsorbida por filtración a través de los túbulos renales. Las heces, la leche y el sudor son rutas de excreción menores (Bevill, 1984; Mengelers y cols. 1995).

Cuando la sulfametazina está en forma no ionizada o disminuye el pH de la orina, es reabsorbida mucho más rápidamente que el antibiótico en forma ionizada. Debido a esto, la clarificación renal disminuye, y la probabilidad de cristalización en los túbulos renales se incrementa, pudiendo ser afectada la función del riñón y retrasarse la excreción (Bevill, 1984; Mandell y Petri, 1993).

Importancia de la Sulfametazina en la Industria Porcina

En la industria porcina, la sulfametazina, juega un papel muy importante en la reducción de mortandad e incidencia de enfermedades infecciosas. Es un compuesto bacteriostático que a bajas concentraciones y por distintos mecanismos, inhibe un gran espectro de bacterias gram-positivas, gram-negativas, microorganismos como clamidias y ciertos protozoarios. Como antibiótico tiene un bajo costo y es de fácil administración mezclándose con alimento o agua.

En el agua, se combina con agentes saborizantes para enmascarar su fuerte sabor amargo e incrementar el consumo de agua medicada. También se emplea con la finalidad de promover el crecimiento en los animales, aunque el mecanismo de acción para este fin se desconoce aún (Bevill, 1984; Kucers y cols. 1984; Águila, 2000^a; Águila, 2000^b; Katz y Sue, 2000).

Aunque la sulfametazina es muy utilizada (Mitema y cols. 2001), el principal inconveniente de ello radica en su alto poder residual, ya que es un antibiótico que se absorbe rápidamente, pero se elimina lentamente. Además, puede permanecer en los distintos tejidos comestibles cuando no se respeta el tiempo de retiro del antibiótico, que está establecido como 15 días (Littlefield y Gaylor, 1989).

Uso Inadecuado de Sulfametazina en la Industria Porcina y la Presencia de sus Residuos en Tejidos Animales

En los últimos 10 años, las sulfonamidas han sido la causa más común de niveles violatorios de residuos reportados por el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria de los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). La prevalencia de contaminación ha sido mayor en porcinos (Biehl y cols. 1981). Identificando que un 95% de los tejidos contienen concentraciones tisulares de sulfametazina por arriba de los límites máximos de residuos (LMR) permitidos (0.1

ppm) (Renson y cols. 1993). Actualmente, en Estados Unidos ha bajado el índice de violaciones por sulfonamidas a menos del 6% (Augsburg, 1989; Biehl, 1994).

En México, a pesar de que se han publicado varias Normas Oficiales acerca de la comercialización, regulación, clasificación y lineamientos para la prescripción de medicamentos veterinarios, no se mencionan dosis estándar para su aplicación con fines profilácticos (NOM-012, 1993; NOM-040, 1995; NOM-059, 1997; NOM-064, 2000). Además, en la NOM-064, (2002), se menciona que en el país no se cuenta con criterios para la prescripción de cada antibiótico en base al nivel de toxicidad de sus ingredientes activos. Esto representa un riesgo importante a la salud animal y humana por el uso indebido, los desvíos y el abuso de los mismos.

La magnitud del problema de los residuos de sulfonamidas en alimentos se desconoce por la falta de estudios sobre el tema. Existen dos investigaciones realizadas al respecto, una de ellas, se llevó a cabo en México, Distrito Federal, donde el 40% de las muestras de carne de bovino, analizadas mediante un método espectrofotométrico, contenían residuos de sulfametazina. Las concentraciones encontradas fluctuaron desde 10 hasta 18.5 ppm, estos niveles estuvieron muy por encima de los límites máximos permitidos (Sánchez y cols. 1988). La otra investigación, se realizó en el noroeste del país, durante el periodo de 1993-2001, en donde se analizaron 2511 muestras de músculo de porcinos, mediante el método biológico Charm II y cromatografía líquida de alta resolución. Se obtuvo un porcentaje de 6.1% de muestras con residuos de sulfonamidas y de ellas el 4%, presentaron niveles superiores a 0.1 ppm, que es el nivel máximo permitido, establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-004, 1996; Bermúdez y cols. 2001). En base a lo anterior, se considera que la presencia de sulfonamidas en músculo de cerdo es un problema en varias regiones del país.

Estas violaciones por residuos de sulfonamidas son atribuidas principalmente al incumplimiento en el tiempo de retiro del medicamento (15 días), así como a la administración del fármaco por arriba de la dosis preescrita, o a la administración simultánea del medicamento por diferentes rutas y vehículos. Otras fuentes de contaminación con sulfametazina son, las malas prácticas de higiene, como es el mal lavado de equipos y corrales de alojamiento.

También la excreción de sulfametazina en las heces y orina pueden causar una contaminación en los animales cuando éstos se encuentran en el mismo corral. Por ello, es importante que los antibióticos se utilicen correctamente en conjunto con unas buenas prácticas de manejo animal (Whipple y cols. 1980; Augsburg, 1989; Katz y Sue, 2000; Glenn y cols. 2000).

Riesgos a la Salud por el Uso de Sulfametazina

Un problema serio, asociado con los residuos de antibióticos es el desarrollo de microorganismos resistentes a los mismos, especialmente si interfiere con el control de un microorganismo patógeno. La sulfametazina utilizada inadecuadamente o en dosis subterapéuticas en humanos y animales puede desarrollar resistencia bacteriana, tanto de las cepas del propio animal, como en las cepas de la flora humana.

Esta resistencia bacteriana se puede presentar de manera natural o por la falta de un mecanismo celular de una bacteria para que el antibiótico lleve a cabo su acción. También, es posible que se presente por intercambio genético, que involucra material extracromosomal o plásmidos que llevan los genes de resistencia y es el mecanismo más común llamado conjugación (Don Franco y cols. 1990; Mitchell y Yee, 1995; Fuentes, 1999; Mitema y cols. 2001; Gums, 2002).

La conjugación, es un proceso de transferencia genética que requiere del contacto de célula a célula. Se transmite a través de plásmidos, los cuales contienen el gen llamado factor R. Éste desempeña una función importante en la adquisición y diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos en las bacterias gram-negativas, principalmente las enterobacterias (Mckellar, 1998).

Otro mecanismo mediante el cual las bacterias adquieren resistencia, es por mutación cromosomal que incluye cambios en la célula, tales como alteraciones en la permeabilidad celular, incremento en la producción de enzimas inactivas y otros. Una vez que se han adquirido los genes de resistencia, éstos

son bastante estables, lo cual les permite, que a través de las generaciones permanezcan inalterados, aún cuando se encuentren sin la presencia de antibióticos (Fuentes, 1999; Tollefson y Ann, 2000).

Otro tipo de reacciones adversas que se pueden presentar por el uso de sulfametazina, son las reacciones de hipersensibilidad, como son los desórdenes en el sistema hematopoyético, tiroides, hígado, tracto gastrointestinal y sistema inmunológico. Las reacciones más comunes son fiebre, lesiones en la piel y se menciona que aproximadamente el 3% de la población ha presentado reacciones de hipersensibilidad (Tilles, 2001). El uso de sulfametazina, provoca cristaluria cuando ésta se acumula en túbulos renales, por reabsorción de agua o cuando la aciduria altera el estado de ionización, disminuyendo la solubilidad de la sulfonamida (Bevill, 1984; Kucers y cols. 1984; Katz y Sue, 2000).

También, se ha estudiado su toxicidad en roedores, detectando la presencia de adenocarcinomas en la glándula tiroides, cuando se utilizan dosis desde 300 hasta 4800 mg/kg, por períodos largos (24 meses). Se cree que la aparición de tumores se debe a la inhibición de la enzima peroxidasa, provocando la insuficiencia de tiroxina sérica y elevando la producción de la hormona estimulante de la tiroides (Littlefield y Gaylor, 1989; Poirier y cols. 1999).

Transformaciones de Sulfametazina Bajo Condiciones de Congelación y Cocinado

Los tejidos comestibles por lo general son congelados a una temperatura de -20°C antes de su comercialización y posteriormente se someten a diversos tratamientos de cocción o son utilizados en la industria alimenticia para la elaboración de subproductos (Rust, 1975; Heaton y cols. 1996; Pearson y Gillett, 1999). Esto, ha conducido a la realización de estudios para conocer la estabilidad y transformaciones que sufre la sulfametazina bajo condiciones de congelación comercial (-20°C) y cocinado.

En las investigaciones realizadas bajo condiciones *in vitro* en otros países, se ha encontrado que las concentraciones de sulfametazina disminuyen en

músculo e hígado bajo el tratamiento de congelación (Parks, 1984; Thomas y cols. 1997; Alfredsson y Ohlsson, 1998).

Esta disminución se cree que es debido a la transformación de sulfametazina a su metabolito N⁴-glucosilsulfametazina, el cual posee las mismas características de toxicidad que la sulfametazina. La identificación del metabolito se ha realizado mediante espectrometría de masas de ionización química, cromatografía líquida de alta resolución, resonancia magnética nuclear y otros (Paulson y cols. 1981; Giera y cols. 1982^b).

El mecanismo por el cual se dá la transformación se desconoce, pero se piensa que es un proceso no enzimático, donde la congelación favorece la unión de sulfametazina con una molécula de glucosa. Sin embargo, la proporción del metabolito no es alterada por glucosa, UDP-glucosa, glucosa-1-fosfato ni por glucosa-6-fosfato contenidas en el hígado (O'Brien y cols. 1981; Cox y Krzeminski, 1982; Giera y cols. 1982^a).

Se ha reportado que durante el cocinado el metabolito N⁴-glucosilsulfametazina sufre una reacción de hidrólisis formando de nuevo la sulfametazina. Para observar dicha reacción se han realizado algunos estudios *in vitro* en donde se sometió el metabolito a temperaturas de 100° C en solución ácida (Paulson y cols. 1981; Fisher y cols. 1992).

Otro metabolito de gran importancia es el N⁴-acetilsulfametazina, ya que posee el mismo potencial tóxico y residual que la sulfametazina. Por lo que se han realizado algunos estudios para conocer el metabolismo de éste metabolito en cerdos, administrando a los animales una dosis de 110 mg/kg de sulfametazina marcada, se encontró que en hígado hubo un total de 96% de residuos marcados de los cuales el 3% correspondió al metabolito N⁴-acetilsulfametazina. En riñón y músculo se obtuvo un total de 91% de residuos marcados correspondiendo el 33% al metabolito acetilado en riñón y 7.8% en músculo (Giera y cols.^b 1982; Mitchell y cols. 1985).

Las diferencias en la concentración de residuos de antibióticos entre un tejido y otro se deben a la funcionalidad de cada uno de ellos, ya que el hígado biotransforma, el músculo acumula y el riñón elimina (Giera y cols. 1982^a; Mitchell

y cols. 1985). La ruta metabólica más común para la mayoría de las sulfonamidas es la acetilación, de ella se deriva el metabolito N¹-acetilsulfametazina.

Éste, es poco soluble lo que favorece se encuentre en mayor concentración en el riñón (Mengelers y cols. 1997). En cuanto a los tratamientos térmicos, no se han reportado estudios acerca del comportamiento que tiene la sulfametazina en riñón durante la congelación, pero para el tratamiento de cocción Fisher y cols. (1992) encontraron que el metabolito sufre una reacción de hidrólisis formando de nuevo la sulfametazina original.

Regulación Sanitaria

La presencia de residuos de sulfonamidas, especialmente sulfametazina en tejidos animales constituye un problema para los productores, compañías e instituciones encargadas de las regulaciones sanitarias. Varios países cuentan con sistemas de inspección, implementando las medidas correctivas necesarias para disminuir la presencia de dichos residuos en los tejidos animales.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA), a través del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS), han desarrollado tres programas de vigilancia para detectar y minimizar las violaciones de residuos químicos en carne y aves de corral.

Estos programas, consisten en un monitoreo diseñado para obtener información anual sobre la presencia de residuos en una población animal específica y detectar el problema causante de la violación. También, tiene como finalidad estudiar la incidencia de residuos químicos para los cuales no se han establecido límites permitidos y realizar análisis en animales cuando se sospecha de algún problema en base a los signos clínicos e historial de la manada (Gibbons y cols. 1996).

En el caso de sulfametazina, el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios en conjunto con la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), establecieron un límite máximo de residuos de sulfametazina (LMR) de 0.1 ppm en

carne. Éste se implementó en base a los estudios que reportan cambios morfológicos en la tiroides observados en ratas y cerdos medicados con dicho fármaco. También, se ha establecido un periodo de retiro del antibiótico de 15 días antes del sacrificio, el cual, puede ser más largo dependiendo de las condiciones de manejo (Van Eeckhout y cols. 1998; Fuentes, 1999).

En México, en 1994, la actual Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), decretó a través del Diario Oficial de la Federación, la Norma Oficial Mexicana (NOM-004-Z00, 1994). En ella se establecen las especificaciones para el control de residuos tóxicos en carne y vísceras de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país. Esta norma se modificó en 1996; sin embargo, en lo referente a sulfonamidas no hubo cambio (NOM-004, 1996).

Se han decretado otras normas por parte de la SAGARPA, relacionadas con antibióticos, como son la NOM-012-ZOO-1993, en la cual se mencionan las especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumidos por éstos. La NOM-040-ZOO-1995, que establece las especificaciones para la comercialización de sales puras antimicrobianas para uso en animales o consumidos por éstos.

Otra norma relacionada, es la NOM-059-ZOO-1997, donde se describen las especificaciones de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumidos por éstos. Manejo técnico del material publicitario. Por último, la NOM-064-ZOO-2000 en la que se mencionan los lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.

Métodos de Detección de Sulfametazina y sus Metabolitos

Las concentraciones de sulfametazina y sus metabolitos presentes en los tejidos pueden ser muy pequeñas, por lo que, se ha promovido el desarrollo de métodos sensibles para su identificación y cuantificación. En la actualidad, existen

métodos de cuantificación muy sensibles, pero no son muy utilizados por el alto costo del equipo, o porque se requiere de procedimientos largos de extracción y personal altamente capacitado (Moats, 1997). Entre los métodos de análisis de sulfonamidas se pueden incluir los métodos microbiológicos y los químicos.

Métodos Microbiológicos

Se basan en la difusión del antibiótico sobre una capa de agar inhibiendo el crecimiento de un organismo sembrado. Para la detección de sulfametazina se han utilizado cepas de *Bacillus subtilis*. Entre los métodos utilizados está el Delvotest SP. La ventaja de estos métodos es que no requieren de equipo caro. Aunque es rápido, su desventaja es que no pueden detectar a un antibiótico específico o las cantidades del mismo y de sus metabolitos (Bugyei y cols. 1995; Moats, 1997).

El método microbiológico más sensible actualmente en el mercado, es el ensayo "Charm II Test". Éste permite la determinación cualitativa y cuantitativa de ocho diferentes familias de antibióticos; para el caso de sulfonamidas tiene un límite mínimo de cuantificación de 10 ppb (ng/g) y es un método rápido. La principal desventaja del método Charm II es que únicamente permite cuantificar familias de antibióticos, como por ejemplo, sulfonamidas totales (Hogg y cols. 1989).

Métodos Químicos

Durante los últimos 15 años, se han desarrollado tecnologías sofisticadas para la separación, cuantificación e identificación de sulfametazina y sus metabolitos en tejidos de porcino. Entre estos métodos, se pueden mencionar la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR-EM), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-

EM), resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR) (García y Castillo, 1988; Porter, 1994).

La cromatografía se basa en la separación de los compuestos de una muestra de acuerdo a sus propiedades químicas y físicas a través de una fase móvil que la transporta y una fase estacionaria que la retiene y separa. La espectrometría de masas (EM) y RMN, proporcionan datos de la estructura química del analito de interés y se emplean para confirmar la identificación de un residuo en una muestra (García y Castillo, 1988; Porter, 1994).

De estos métodos el más utilizado en la confirmación de sulfametazina y sus metabolitos es la espectrometría de masas, el cual determina el peso molecular de los compuestos químicos mediante la separación de iones moleculares, en relación de su masa con la carga (m/e). El fundamento de la espectrometría de masas se basa en la producción de iones por bombardeo de moléculas orgánicas con electrones de alta energía, dirigiendo estos iones en una dirección definida para que ellos puedan ser separados de acuerdo con su velocidad de masa (Barreras, 2003).

Los iones separados son detectados y su intensidad medida. El resultado de la ionización, separación del ión y detección es un espectro de masas que puede proporcionar la masa molecular o incluso formación estructural de la molécula analizada (Barreras, 2003). En lo concerniente a estudios metabólicos de drogas la espectrometría de masas se emplea para elucidar rutas de biotransformación de un fármaco, determinar parámetros farmacocinéticos para un fármaco, metabolitos y en la identificación de metabolitos reactivos (Keski-Hynnily, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: Hexano (EM Science), ácido fosfórico, acetonitrilo, metanol y agua fueron grado cromatográfico de la marca J. T. Baker (J. T. Baker, México, D.F.). Ácido clorhídrico y etanol fueron de grado reactivo (J. T. Baker, México, D.F.). El diclorometano grado reactivo marca Mallinckrodt (México, D. F.), sílica octadecil-silano derivatizada (C₁₈), ácido acético glacial y el estándar de sulfametazina marca Sigma (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) y el anhídrido acético grado reactivo (Aldrich Inc., Milwaukee, USA).

Aseguramiento de la Calidad de los Resultados

Para asegurar la calidad de los resultados obtenidos se emplearon tres parámetros de validación del método. Éstos fueron, linealidad, sensibilidad y exactitud, los cuales se midieron de la siguiente manera:

Linealidad

Se conoce como linealidad a la habilidad que tiene el sistema analítico para asegurar que los resultados son proporcionales a la concentración de la sustancia estándar o de referencia dentro de un intervalo determinado (Garfield, 1993). Para su medición se prepararon soluciones estándar de sulfametazina en concentraciones de 0.00, 1.25, 2.50, 5.00, 7.50 y 10.00 ppm. Las concentraciones de las soluciones de sulfametazina acetilada fueron de 0.00, 0.75, 1.50, 2.25, 5.00 y 7.50 ppm. Cada una de ellas se inyectó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se registraron las áreas obtenidas y se obtuvo la curva de calibración para cada uno de los compuestos.

Sensibilidad

La sensibilidad se establece mediante el límite mínimo de detección (LMD) y límite mínimo de cuantificación (LMC). El LMD se define como la concentración mínima de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no cuantificada bajo las condiciones de operación. El LMC, es la concentración más baja de una sustancia en una muestra que puede ser determinada bajo las condiciones de operación experimental establecidas y las normas de validación para precisión y exactitud (Garfield, 1993).

A partir del estándar de sulfametazina con concentración de 1.25 ppm para sulfametazina y de 0.75 ppm para la sulfametazina acetilada se realizaron diluciones en proporciones de 1:1, inyectándose en el CLAR hasta que la respuesta en el equipo fuera nula. De esta manera se establecieron los límites definidos anteriormente.

Exactitud

Se define como la concordancia entre el valor promedio obtenido experimentalmente y el valor de referencia, se le conoce comúnmente como el porcentaje de recuperación (Garfield, 1993). Este parámetro se llevó a cabo tomando muestras libres de sulfametazina, las cuales se contaminaron con una concentración conocida del antibiótico.

Esto se realizó utilizando 5 μ l de un estándar de sulfametazina a una concentración de 320 μ g/ml y 5 μ l del estándar de sulfametazina-acetilada a una concentración de 250 μ g/ml. Se empleó además un blanco reactivo, al cual se le adicionaron 5 μ l de metanol grado cromatográfico en lugar del estándar de sulfametazina y se procedió a analizar de la misma forma que en las muestras.

Adición de Sulfametazina en el Alimento para Cerdos

Para la realización del bioensayo se utilizó una dieta comercial sin medicar para cerdos en etapa de desarrollo, adquirida en una casa comercial. A éste

alimento se le adicionó SMZ a una concentración de 110 mg/Kg (ppm) de alimento. Para la homogeneización de la sulfametazina en la dieta, se empleó una mezcladora de doble aspa con capacidad de 50 Kg, potencia de ½ HP y velocidad de 1725 rpm, Marca Leland, Modelo 1000, No. de serie DQ15779 (Master Electric CO., Dayton. USA). En ella se mezclaron 40 kg del alimento para cerdos y 4.4 g de sulfametazina (Sigma, Chemical, Co., St. Louis, MO), durante 5 min, para obtener el alimento adicionado con SMZ en una concentración de 110 mg/kg. Con la finalidad de garantizar que la concentración de SMZ en el alimento fuera la adecuada, se llevó a cabo el análisis de sulfametazina por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), mediante el método propuesto por Long y cols. (1990).

Bioensayo

Se realizó un bioensayo en la Unidad Metabólica Animal de la Coordinación de Nutrición del CIAD, empleando 13 cerdos de la raza híbrida *Large White*, de ambos sexos, con un peso vivo promedio de 35 ± 5 Kg y una edad de cuatro meses que corresponde a la etapa de desarrollo.

Diseño del Experimento

Los cerdos se alojaron al azar en corraletas; manteniendo 2 cerdos como control y el resto se subdividió en cuatro grupos (A, B, C y D) de 3 cerdos para los tres primeros grupos y 2 cerdos para el grupo D, donde cada uno de ellos funcionó como repetición. A los cerdos inicialmente se les proporcionó un período de adaptación de 7 días, durante el cual se les administró la dieta control (sin sulfametazina). El esquema de la Figura 2 muestra el diseño experimental que se estableció para llevar a cabo el estudio, el cual comprendió las fases de metabolismo, acumulación y transformaciones de sulfametazina y sus metabolitos.

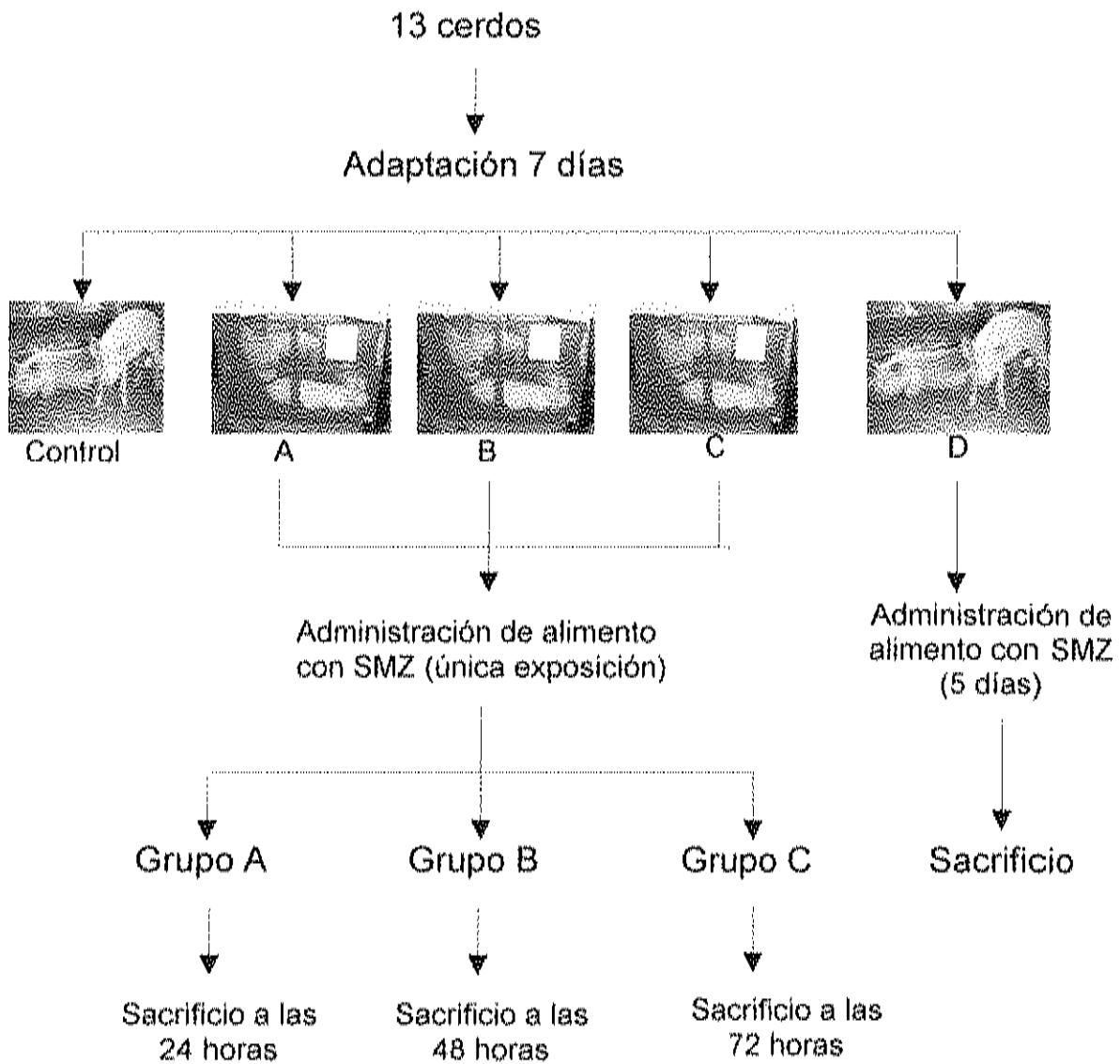


Figura 2. Esquema del diseño experimental.

Metabolismo de Sulfametazina

A los cerdos de los grupos A, B y C se les administró una ración única de 2 Kg/día de alimento conteniendo sulfametazina y a los cerdos control se les proporcionó alimento libre de antibióticos. A ambos grupos se les suministró agua *ad libitum*. El primer cerdo control se sacrificó junto con los cerdos del grupo A, después de 24 horas de la administración del alimento con sulfametazina. El grupo B, se sacrificó a las 48 horas postalimentación y el tercer grupo fue sacrificado a las 72 horas postalimentación.

Acumulación de Sulfametazina y Metabolitos

A los cerdos del grupo D se les administró la misma cantidad de alimento con sulfametazina por un periodo de 5 días y tanto a los cerdos control como a los cerdos medicados se les suministró agua *ad libitum*. Estos cerdos se sacrificaron después de haber recibido el alimento con SMZ durante los 5 días. Además, se sacrificó el otro cerdo control. Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se colectaron los tejidos de hígado (completo), lomo (aproximadamente 500 g.), riñón (completo) y las piernas. Se tomó una porción de cada uno de los tejidos y se homogeneizó individualmente para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y su confirmación por espectrometría de masas (EM). Las piernas se empacaron, un riñón completo y el resto de hígado y músculo, se identificaron y se almacenaron a -20°C para su posterior utilización.

Transformaciones de Sulfametazina Durante Congelación

Inmediatamente después de haber colectado los tejidos, éstos se seccionaron e identificaron para ser congelados a -20°C por un periodo de 6 meses. Para ello, se utilizó un congelador Marca Torrey, Modelo CH15, Serie 07711007LG (Comercializadora Internacional Torrey, S.A de C. V., Canada). A

partir del 3er. mes de almacenamiento se realizaron muestreos mensuales para determinar las concentraciones de sulfametazina y sus metabolitos por CLAR y su confirmación por espectrometría de masas.

Transformaciones de Sulfametazina Durante Cocinado

Estandarización del método de hervido.- Se realizaron pruebas preliminares para establecer las condiciones óptimas de hidrólisis del metabolito N⁴-acetilsulfametazina para obtener de nuevo la sulfametazina. Estas pruebas consistieron en variar tiempo de calentamiento y cantidades de agua y ácido.

Hervido.- Para realizar las pruebas de hervido se tomaron 10 g de los tejidos de hígado, lomo y riñón, tanto de las muestras control (libre de antibiótico), como de los tejidos con el antibiótico. Las muestras se pasaron a tubos de vidrio de 25 X 150 mm, se les adicionó 10 ml de agua grado cromatográfico y HCL 0.1 N hasta obtener un pH de 1. Se colocaron en una placa de calentamiento Marca VWR Scientific No. 13259-005 (EUA). Se calentaron a 100 °C durante 5 horas, transcurrido este tiempo se retiraron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron y se tomaron 0.5 g de cada tejido para realizar las extracciones y cuantificación de sulfametazina y sus metabolitos.

Asado.- El desarrollo de esta prueba consistió en tomar trozos de 200 ± 5 g de pierna, en el caso de hígado se tomaron porciones de 70 ± 5 g y de riñón 8 ± 5 g. Tanto la muestra control, como las muestras conteniendo sulfametazina se sometieron al proceso de asado en un sartén eléctrico marca West Bend, Modelo No. 72000 (Washington, EUA), previamente calentado a una temperatura de 176°C.

Se midió la temperatura de cocción con un termómetro termopar Marca Taylor (Precision Products, L.P. 6097-1), con una escala de 0-150°C. La carne se consideró cocida cuando alcanzó una temperatura interna de 68°C. Se enfrió

hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente, se homogeneizó la muestra y se pesaron 0.5 g de cada tejido para realizar la determinación de sulfametazina y sus metabolitos.

Análisis de Sulfametazina y Metabolitos

Preparación de las Muestras

En las muestras de hígado, riñón y músculo, se eliminó el tejido conectivo y adiposo, ya que éstos interfieren en el análisis. Posteriormente se homogeneizaron, utilizando un procesador de alimentos Marca Osterizer (Oster, Milwaukee, Wisconsin, USA), se envasaron en recipientes de plástico con tapa hermética, se etiquetaron y congelaron a -20°C .

Preparación del Estándar de Sulfametazina

Se preparó una solución estándar de 5000 ppm de SMZ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Para ello, se pesaron 0.05 g de un estándar comercial en polvo de sulfametazina y se aforó a 10 ml con metanol grado cromatográfico. A partir de esta solución se preparó una dilución, tomando 640 μl y se aforaron a 10 ml con metanol, para obtener una concentración de 320 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente para inyectar en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución, se preparó otra solución a partir de la dilución anterior. Se tomaron 100 μl de esta solución y se aforaron a 10 ml con la fase móvil de ácido fosfórico 0.017M:acetonitrilo (95:5, v/v), obteniendo una concentración final de 3.2 ppm.

Preparación del Estándar de Acetilsulfametazina

El metabolito N⁴-acetilsulfametazina (SMZ-ac) se preparó a partir del estándar puro de sulfametazina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). El procedimiento que se siguió para sintetizar el compuesto fue el reportado por Parks (1994), que consistió en mezclar 0.05 g de sulfametazina con 2.5 ml de ácido acético, se calentó por 60 min en un baño maría (Precision, Modelo 180, Serie 247411, Winchester, VA.) y se le adicionó 6 ml de agua grado cromatográfico, se dejó reposar toda la noche, se rotaevaporó a sequedad a 60°C y se le adicionó 10.5 ml de una solución de metanol:agua (7:4.5, v/v), se rotaevaporó nuevamente y se resuspendió en 5 ml de metanol grado cromatográfico. Posteriormente se calentó por 5 min a 40°C para disolverlo completamente.

Activación de Silica Gel Octadecilsilano Derivatizada (C₁₈)

Para llevar a cabo la activación del adsorbente C₁₈, se utilizaron 22 g de éste (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO), los cuales se colocaron en una columna de vidrio de 13.2 cm de largo X 2.7 cm de diámetro, con un filtro de fibra de vidrio (Whatman 90 mm diam., Lab. England) en el fondo y otro en la parte superior. Se pasaron por la columna 50 ml de hexano, seguido de 50 ml de diclorometano y 50 ml de metanol grado reactivo (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO). Los remanentes de los solventes fueron extraídos hasta que la silica gel estuvo totalmente seca, enseguida se colocó en un recipiente con tapa hermética y se almacenó en un desecador, tomando 2 g para cada muestra a analizar.

Preparación de la Fase Móvil

La preparación de la fase móvil para la determinación de SMZ por CLAR, se llevó a cabo diluyendo 1.66 ml de ácido fosfórico en un litro de agua grado cromatográfico para obtener una solución 0.017 M, ésta se filtró mediante vacío

empleando un equipo de filtración (Fisher Modelo 7737-747 Fisher Scientific, Pittsburg, PA), con una membrana de nylon con tamaño de poro de 0.2 μm (Cole Parmer Inc., Vernon Hills, IL.). Se sonicó durante 20 min empleando un sonicador Cole-Parmer (Modelo 8892, Niles, IL.).

Extracción en Tejido

El procedimiento general de extracción de sulfametazina y sus metabolitos en tejido se realizó mediante la técnica propuesta por Long y cols. (1990) y Bermúdez y cols. (2001). En esta técnica, se emplea el principio de la dispersión de matriz en fase sólida, que consiste en romper las membranas celulares por medio de fuerzas hidrofóbicas y mecánicas para dejar al descubierto los componentes hidrofílicos, tales como los residuos de sulfametazina.

Para la extracción se utilizaron 2 g de C_{18} activado (silicagel octadecil silano derivatizado), 0.5 g de tejido y 5 μl de metanol grado cromatográfico, los cuales se homogeneizaron en un mortero, logrando una asociación con los lípidos de la membrana celular.

El homogeneizado se colocó en una jeringa de plástico desechable de 10 ml (Plastipack, Becton Dickinson, México), con un filtro de fibra de vidrio (Whatman Lab. England) en el fondo y otro en la parte superior y se comprimió hasta un volumen final de 4 ml. Se lavó con 10 ml de hexano grado reactivo (J. T. Baker, Xalostoc, México), en donde se eluyeron los compuestos no polares lipídicos y cromóforos neutrales que pueden interferir con la detección ultravioleta de las sulfonamidas.

Posteriormente se eluyeron las sulfonamidas con 15 ml de diclorometano grado reactivo, colectando el eluato en un tubo cónico de 15 ml. Los tubos con la elusión se colocaron en un baño maría con temperatura controlada de 40°C (Precision, Modelo 180, Serie 247411, Winchester, Virginia) y flujo de aire constante.

Se reconstituyó con 1 ml de ácido fosfórico 0.017 M:acetonitrilo (95:5, v/v) y se sonicó por 40 min en un sonicador (Cole-Parmer Modelo 8892, Niles, IL), el

extracto se pasó a través de un filtro acrodisc con tamaño de poro de 2 μm (Acrodisc LC13 PVDF, Fisher Scientific, Pittsburg, PA), a viales color ámbar .

Se inyectaron 200 μl del extracto en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución VARIAN Modelo 9010, equipado con un detector ultravioleta-visible, VARIAN Modelo 9050, a una longitud de onda de 270 nm y un volumen de inyección de 200 μl . Ambos equipos están conectados a una computadora Acer Power 333s con una impresora Epson LX-810L y un paquete computacional Word Station LC 4.0 Varian (Varian Instruments Inc., Palo Alto, CA.).

El equipo cuenta con un sistema de bomba de tres vías y se utilizó una columna econosférica de C_{18} para fase reversa de 3 μm de tamaño de partícula, con una longitud de 15 cm de largo y 4.6 mm de diámetro interno (VARIAN Associates, Inc., Sonnyvale, CA.), con un flujo de 1.0 ml/min, mediante un sistema de gradiente de fase móvil inicial de 95% de ácido fosfórico 0.017 M y 5% de acetonitrilo, con un tiempo de corrida de 35 min. Para determinar la concentración de sulfametazina y sus metabolitos en los tejidos se consideró el área bajo la curva obtenida en los cromatogramas, utilizando de referencia los estándares de concentración conocida correspondientes.

Confirmación de Resultados

Con el fin de confirmar la presencia de sulfametazina y sus metabolitos N^4 -desaminosulfametazina, N^4 -glucosilsulfametazina, N^4 -glucuronilsulfametazina y N^4 -acetilsulfametazina, se procedió a utilizar cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Todas las muestras se sometieron a las mismas condiciones analíticas y de extracción. El espectrómetro de masas utilizado fue un equipo Agilent, Serie 1100, con trampa de iones (Serie 20805029, Alemania). Las condiciones de operación fueron una fuente de ionización positiva con electrospray. El gas acarreador fue nitrógeno a una presión de 15.00 psi con una temperatura de secado de 350°C y un flujo de 8.00 l/min.

La presión del nebulizador fue de 40 psi. El voltaje del capilar fue de 105.0 V. Se llevó a cabo un barrido completo de 50 a 700 m/z. El equipo cuenta con una bomba cuaternaria Agilent 1100 Modelo G1310A, Serie No. US82403514 usando un volumen de inyección de 100 μ l. Una computadora Pentium 4 Modelo Vectra VL420DT, complementada con el programa computacional Windows XP Chemstation Versión 4.1 y una impresora HP Laser Jet 4100.

Determinación del Porcentaje de Humedad

Con el propósito de obtener los resultados de los análisis de sulfametazina y sus metabolitos en las muestras antes y después de la aplicación de los tratamientos en una misma base, se llevó a cabo el análisis de humedad (AOAC, 1990). Se empleó una estufa (GS Blue M Electric, Modelo OV-490 A-3), calibrada a una temperatura de 100°C. Se pesaron 2 g de tejido por triplicado en charolas de aluminio de 43 mm de diámetro (Daigger & Company, Inc, Lincolnshire, IL) y se dejaron las muestras en la estufa por 24 horas. Posteriormente, se enfriaron en un desecador durante 30 min y se pesaron en una balanza analítica (Sartorius Modelo R 300 S). El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia de peso.

Análisis Estadístico

Para analizar los resultados obtenidos del metabolismo de sulfametazina en cerdos se aplicó un análisis unifactorial completamente al azar, teniendo como unidad experimental a los tejidos de músculo, riñón e hígado de porcino, empleando como efecto del factor el tiempo de exposición y como variable de respuesta las concentraciones de sulfametazina y su metabolito. En el tratamiento de congelación se aplicó un análisis de bloques al azar, siendo el bloque los tejidos y el tratamiento fue el tiempo de congelación, lo que permitió observar la concentración de sulfametazina y su metabolito en cada uno de los tejidos durante

toda la etapa de congelación y el comportamiento de éstos compuestos a través del tiempo de congelación. Cuando existió diferencia, se realizó comparaciones de medias por la prueba de Rango Múltiple de Duncan. Para el análisis de los datos obtenidos de los tratamientos de asado y hervido se realizó una prueba de T-pareada para estimar diferencias en las concentraciones de sulfametazina y N⁴-acetilsulfametazina antes y después del método de cocinado. Para todos los análisis, se utilizó un nivel de significancia con una $P < 0.05$. Los resultados se analizaron empleando el programa estadístico NCSS 97 statistical 6.01 (Kaysville, Utah, USA. Quick start & Self Help Manual) System for Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aseguramiento de la Calidad de los Resultados

Para asegurar la calidad de los resultados obtenidos se midieron tres parámetros de validación del método que fueron linealidad, sensibilidad y exactitud.

Linealidad

En las Figuras 3a y 3b se muestran las curvas de calibración obtenidas al inyectar las soluciones estándar de sulfametazina con concentraciones de 0.00, 1.25, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 ppm y de sulfametazina acetilada a concentraciones de 0.00, 0.75, 1.50, 2.25, 5.00 y 7.50 ppm. En ellas se obtuvo un coeficiente de correlación de $r=0.999$ tanto para sulfametazina como su metabolito, presentando un comportamiento lineal, también se observó la habilidad del sistema analítico para asegurar que las áreas obtenidas fueron proporcionales a las concentraciones de cada uno de los estándares.

Sensibilidad

La sensibilidad fue medida mediante el límite mínimo de cuantificación (LMC) y límite mínimo de detección (LMD). Se observó que para el estándar de sulfametazina se tuvo un LMC de 0.015 ppm y un LMD de 0.0098 ppm, los cuales se encuentran muy por debajo del límite máximo permitido que es de 0.1 ppm según la Norma Oficial Mexicana (NOM-004). Para sulfametazina acetilada se obtuvo un LMC de 0.0043 y un LMD de 0.0029 ppm.

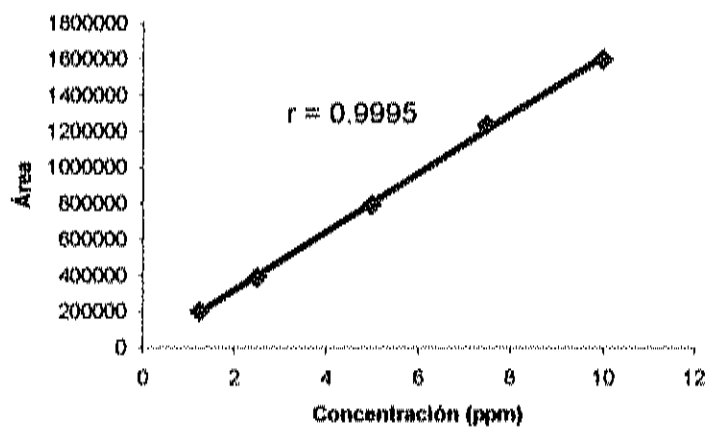


Figura 3a. Curva de calibración de sulfametazina

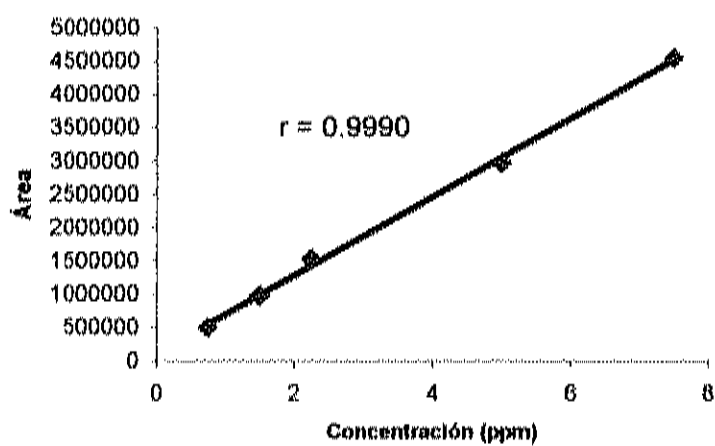


Figura 3b. Curva de calibración de sulfametazina acetilada

Exactitud

Este parámetro obtenido para sulfametazina y el metabolito acetilado en tejidos de cerdo, permitió asegurar la calidad de los resultados. En el análisis de todas las muestras correspondientes a las diferentes etapas del experimento que fueron metabolismo, acumulación, congelación y cocinado, se obtuvo el porcentaje de recuperación promedio de sulfametazina y sulfametazina acetilada en muestras adicionadas con una concentración conocida del antibiótico.

El porcentaje de recuperación promedio obtenido para sulfametazina fue de $88.52 \pm 8.34\%$ y para sulfametazina acetilada de $98.75 \pm 9.17\%$, estos valores quedaron dentro de los rangos aceptables, que son de 80 a 110% (Hokanson y Singer, 2001).

Los coeficientes de variación fueron de 9.42% para sulfametazina y de 9.20% para sulfametazina acetilada, que se sitúan dentro del rango establecido como aceptable que es $\leq 12\%$. Ambos valores se analizaron de acuerdo a las normas de validación para los métodos cromatográficos (FSIS-USDA, 1987), e indican que el proceso de extracción y de determinación fueron adecuados y por lo tanto, los resultados obtenidos son confiables.

Análisis de Sulfametazina en Alimento para Cerdos

El alimento comercial se analizó antes de ser suministrado a los animales, con la finalidad de verificar que estuviera libre de antibióticos. Posteriormente, para confirmar que el alimento administrado a los cerdos tuviera una concentración de 110 mg/Kg, se realizó de nuevo el análisis posterior a la adición de la sulfametazina.

Para este propósito se usó la técnica de extracción por dispersión de matriz en fase sólida y detección por CLAR-UV. Los resultados obtenidos corroboraron lo anterior, en la Figura 4 se muestra un cromatograma de dicho análisis, donde se

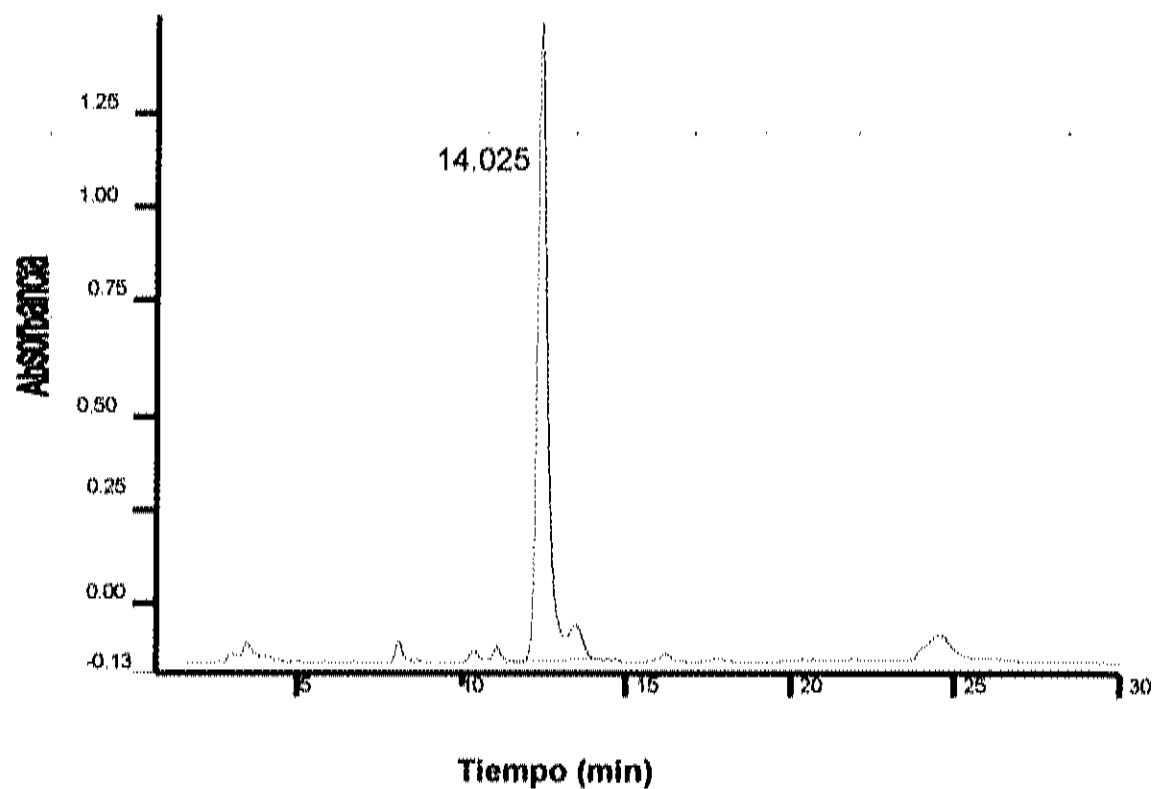


Figura 4. Cromatograma de una muestra de alimento para cerdo con una concentración de 110 mg/Kg de sulfametazina.

Condiciones de determinación: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 9010, Detector ultravioleta Varian 9050, λ 270 nm, Columna econosférica C_{10} fase reversa de 15 cm x 4.6 mm. DI, Volumen de inyección: 200 μ l.

puede observar que no se detectó ningún otro compuesto además de la sulfametazina adicionada, que se detectó a un tiempo de retención de 14.025 min.

Metabolismo de Sulfametazina

En los estudios *in vivo* realizados sobre la transformación y la acumulación de sulfametazina y sus metabolitos en los tejidos comestibles han sido insuficientes. Esto es, porque solamente se ha estudiado en hígado y músculo de cerdo, además no se ha realizado un seguimiento en las transformaciones de sulfametazina y sus metabolitos durante congelación. Es por ello, que en el presente estudio *in vivo* se estudió las diversas transformaciones que sufre la sulfametazina desde el sacrificio del animal hasta los procesos de congelación y cocinado en los tejidos de hígado, músculo y riñón de cerdo.

Inmediatamente después del sacrificio de los cerdos, se llevaron a cabo los análisis de sulfametazina en el músculo (lomo), riñón e hígado de cerdo, esto con el propósito de observar la transformación del antibiótico en los tejidos de los cerdos sacrificados a las 24, 48 y 72 horas. Se realizó la detección de sulfametazina y su metabolito acetilado por CLAR-UV, mediante el método de estándar externo.

En los resultados mostrados en la Figura 5, se observa que las concentraciones de sulfametazina disminuyeron en los tejidos. En el riñón se registró una concentración promedio de 1.15 ± 0.36 a las 24 horas finalizando con una concentración promedio de 0.14 ± 0.00 ppm a las 72 horas. En hígado fue una concentración promedio de 1.12 ± 0.24 a las 24 horas y finalizó con una concentración de 0.11 ± 0.02 ppm a las 72 horas y en músculo fue de 0.87 ± 0.24 a las 24 horas finalizando con una concentración de 0.078 ± 0.028 ppm a las 72 horas. En los tres tejidos se observaron diferencia ($P < 0.05$) con respecto al tiempo (24, 48 y 72 horas).

El comportamiento de transformación que presentó la sulfametazina de acuerdo a los resultados de correlación obtenidos fue lineal. Esto, concuerda con lo reportado por otros estudios (Whipple y cols. 1981; Mengelers y cols. 1995).

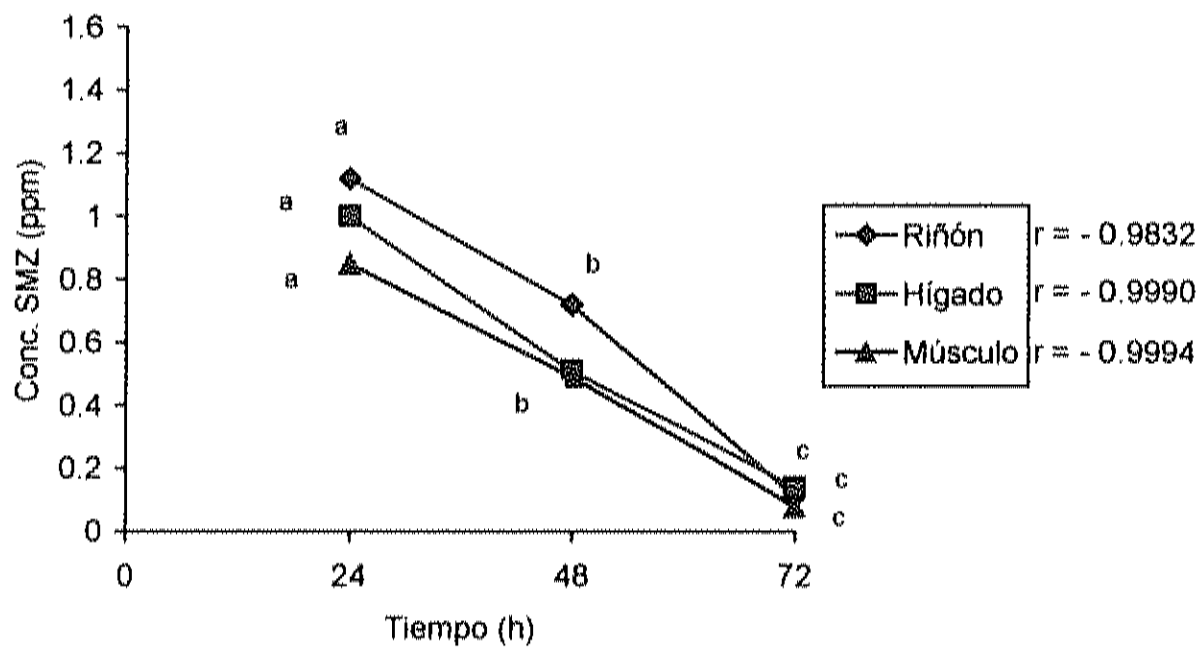


Figura 5. Concentraciones de sulfametazina (ppm) detectadas en los tejidos de porcino con respecto al tiempo de su administración.

En el estudio de Whipple y cols. (1981), se medicó al animal durante 98 días, posteriormente se aplicó el período de retiro observando que la sulfametazina fue eliminada de plasma y tejidos siguiendo una cinética de primer orden.

Por lo tanto, esto parece indicar que, el tiempo de tratamiento del animal no altera su esquema básico de eliminación, ya que en el presente estudio solamente se expuso una vez a la sulfametazina, mostrando el mismo comportamiento lineal de eliminación de los tejidos de hígado, músculo y riñón.

La transformación de sulfametazina también coincide con lo reportado por Epstein y cols. (1988), en donde se tuvieron dos cerdos como unidades experimentales y se les alimentó con 110 mg/Kg de sulfametazina.

Un cerdo se sacrificó a las 48 horas y el otro a las 72 horas, encontrando una concentración de 0.5 ppm de sulfametazina en el tejido de músculo, la cual coincide con la reportada en este estudio. Sin embargo, en lo correspondiente a sulfametazina a las 72 horas, la concentración en nuestro estudio fue de 0.078 ± 0.02 ppm, siendo menor con respecto a lo reportado por Epstein y cols. (1988).

Cabe mencionar que algunas de las concentraciones finales de sulfametazina se mantuvieron por arriba de los límites máximos permitidos (0.1 ppm). Esto se presentó en los tejidos de riñón con una concentración promedio de sulfametazina de 0.14 ± 0.00 ppm, en hígado fue de 0.11 ± 0.02 ppm. En el caso de músculo la concentración promedio final estuvo por debajo del límite máximo permitido y fue de 0.078 ± 0.028 ppm.

El metabolito acetilado se detectó a partir de las 24 horas de haber sacrificado al animal, sin embargo éste metabolito se puede formar en menor tiempo dentro del organismo, ya que el tiempo que tarda en detectarse en orina es de 5 horas (Vree, 1987). En cuanto a su formación, Mengelers y cols. (1995) reportaron la detección de los metabolitos acetilados en plasma a las 2 horas de ser medicado el animal con sulfametazina por vía intravenosa. En otro estudio realizado por Paulson y cols. (1981) indentificaron el metabolito N⁴-

acetilsulfametazina en hígado y riñón de cerdo a las 6 horas de haberlo sacrificado.

Las concentraciones promedio iniciales para el metabolito acetilado en el presente estudio fueron de 0.75 ± 0.24 ppm en riñón, para hígado fue de 0.26 ± 0.16 ppm y 0.20 ± 0.05 ppm para músculo (Figura 6). Estas concentraciones también presentaron un comportamiento lineal con respecto al tiempo, finalizando con concentraciones de 0.12 ± 0.07 ppm en riñón, 0.10 ± 0.05 ppm en hígado y para músculo 0.03 ± 0.00 ppm.

Sin embargo, únicamente se presentaron diferencias ($P < 0.05$) en el tejido de músculo. Esta diferencia entre un tejido y otro puede ser debido a la variabilidad fisiológica que existe entre cada animal, ya que la capacidad de metabolizar cada antibiótico y el comportamiento que se presente en los tejidos es distinto en cada organismo.

Acumulación de Sulfametazina y Metabolitos

Las Figuras 7a y 7b correspondientes a resultados de los cerdos del grupo D, a los cuales se les administró sulfametazina durante cinco días, muestran que tanto la sulfametazina como el metabolito acetilado se acumularon en los tejidos de músculo, hígado y riñón. Las concentraciones promedio obtenidas en el caso de sulfametazina fueron de 2.70 ± 0.61 ppm en riñón, 2.09 ± 0.50 ppm en hígado y 1.67 ± 0.11 ppm en músculo. Para el metabolito de sulfametazina acetilada las concentraciones fueron de 3.72 ± 0.12 ppm en riñón, 0.87 ± 0.03 ppm en hígado y 0.53 ± 0.064 ppm en músculo. Por lo que, las concentraciones más altas fueron detectadas en riñón en comparación con los otros dos tejidos.

Esto coincide con un estudio realizado por Mitchell y cols. (1985), en donde a nueve cerdos a los que se les administró 169 mg de sulfametazina marcada con C^{14} y se les sacrificó al 3, 5 y 7 día.

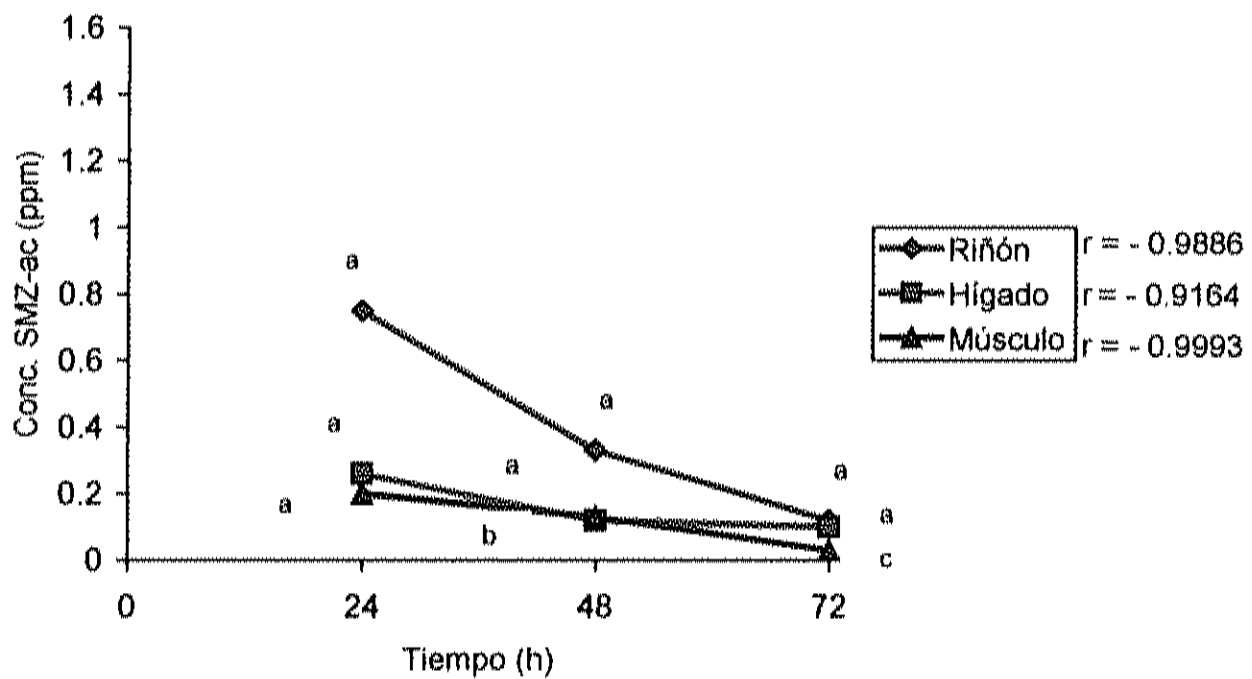


Figura 6. Concentraciones de sulfametazina acetilada (ppm) detectadas en los tejidos de porcino con respecto al tiempo de su administración.

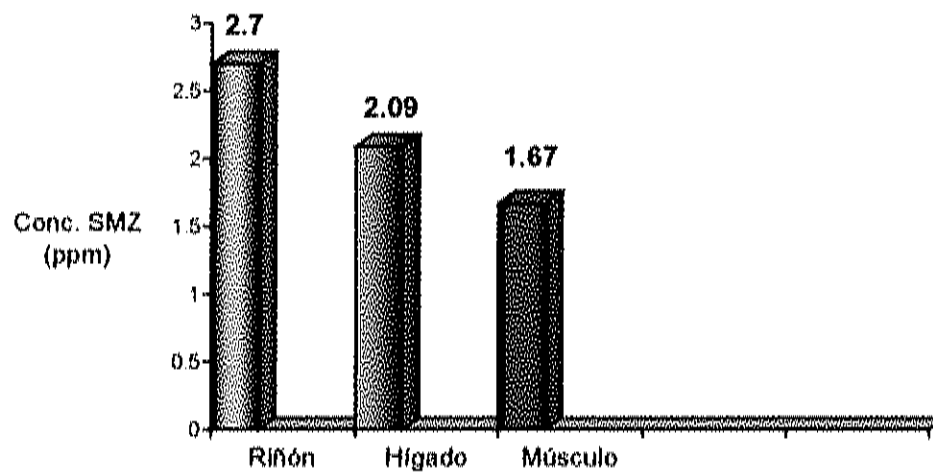


Figura 7a. Concentración de sulfametazina acumulada en los tejidos de cerdo durante 5 días.

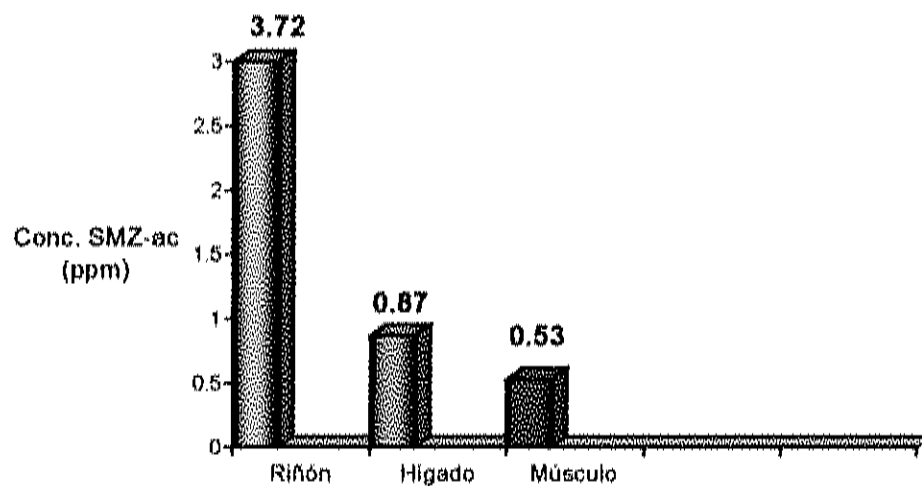


Figura 7b. Concentraciones del metabolito N⁴-acetilsulfametazina acumulado en los tejidos de cerdo durante 5 días.

Se observó que las concentraciones de sulfametazina al 5^{to} día fueron de 9.66 ± 0.65 ppm para riñón, 7.37 ± 0.79 ppm para hígado y de 3.25 ± 0.28 ppm para músculo. Para el metabolito acetilado las concentraciones fueron de 2.61 ± 0.18 ppm en riñón, 1.12 ± 0.16 ppm en hígado y 0.216 ± 0.02 ppm en músculo.

Por lo que, se observó que en el tejido de riñón se acumuló mayor cantidad de sulfametazina y su metabolito. Las concentraciones de sulfametazina reportadas por Mitchell y cols. (1985) fueron más altas que las encontradas en éste estudio.

En cuanto al metabolito acetilado, en el reporte anterior se detectaron concentraciones menores en riñón e hígado con respecto a nuestro estudio, sin embargo, en músculo fue mayor.

Por lo que, se puede decir que ésta acumulación en riñón puede deberse a diversos factores, uno de ellos puede ser debido a la reabsorción de agua que ocurre a nivel de túbulos renales, lo que ocasiona una concentración de éstos compuestos en dicho tejido. También, puede ser debido a la funcionalidad de cada tejido y a la variabilidad fisiológica del animal. Otro de los factores puede ser la vida media que presenta la sulfametazina en cada uno de los tejidos. Puesto que en el estudio realizado por Whipple y cols. (1981), donde se determinó el tiempo de vida media del antibiótico en los tejidos del animal, es decir, el tiempo en el cual la mitad del fármaco se ha eliminado del cuerpo, se observó que el tiempo de vida media para sulfametazina en músculo fue de 31.4 horas, para riñón de 33.6 horas y para hígado de 23.4 horas, siendo el riñón el tejido donde permanece un mayor tiempo el antibiótico, lo que provoca una mayor concentración en dicho tejido.

Confirmación de Resultados por Espectrometría de Masas

Los resultados obtenidos por el método de cromatografía de líquidos de alta resolución correspondientes a la transformación de sulfametazina a través del tiempo (24, 48 y 72 horas) y su acumulación en los tejidos de hígado, músculo y

riñón de cerdo, se confirmaron utilizando un detector de espectrometría de masas con trampa de iones.

El método permitió la identificación del ión $[M + H]^+$ para sulfametazina y su metabolito N⁴-acetilsulfametazina, ya que sus masas moleculares son de 278.32 para sulfametazina y de 320.34 para el metabolito N⁴-acetilsulfametazina. Las Figuras 8 y 9 muestran ejemplos de los espectros de masas correspondientes a los estándares de sulfametazina (Fig. 8) y N⁴-acetilsulfametazina, el cual corresponde a la sulfametazina acetilada en la posición N⁴ (Fig. 9). Éstos, presentaron una fracción de m/e de 227, la cual coincide con lo obtenido por Paulson y cols. (1985), al analizar el mismo metabolito por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

En la Figura 10 se muestra la confirmación tanto de sulfametazina (m/e 279.1), como de sus metabolitos N⁴-acetilsulfametazina (m/e 321.3), N⁴-desaminosulfametazina (m/e 261.1) y N⁴-glucuronilsulfametazina (m/e 476.5) en hígado, riñón y músculo de cerdo. La presencia de los iones característicos derivados de sulfametazina en las diferentes muestras analizadas, permitió la confirmación de los diversos residuos que estuvieron presentes en los distintos tejidos de cerdo. Como se mencionó anteriormente la sulfametazina por acción de desaminasas presentes en el tracto gastrointestinal forma el metabolito N⁴-desaminosulfametazina. El metabolito N⁴-acetilsulfametazina se forma por acción de enzimas acetiltransferasas y el metabolito N⁴-glucuronilsulfametazina se forma por acción de enzimas glucuroniltransferasas. Por lo cual, podemos decir que la sulfametazina dentro del cerdo *in vivo* formó diversos metabolitos.

Transformación de Sulfametazina Durante Congelación

Se han publicado diversos estudios para conocer la estabilidad de sulfametazina en los tejidos de hígado, riñón y músculo sometidos a bajas temperaturas, éstos se basan en el efecto que tiene el congelado de la carne sobre los niveles de sulfametazina, cuando ésta se adiciona directamente en el tejido (Cox y Krzeminski, 1982; Alfredsson y Olsson, 1998; Barreras, 2002).

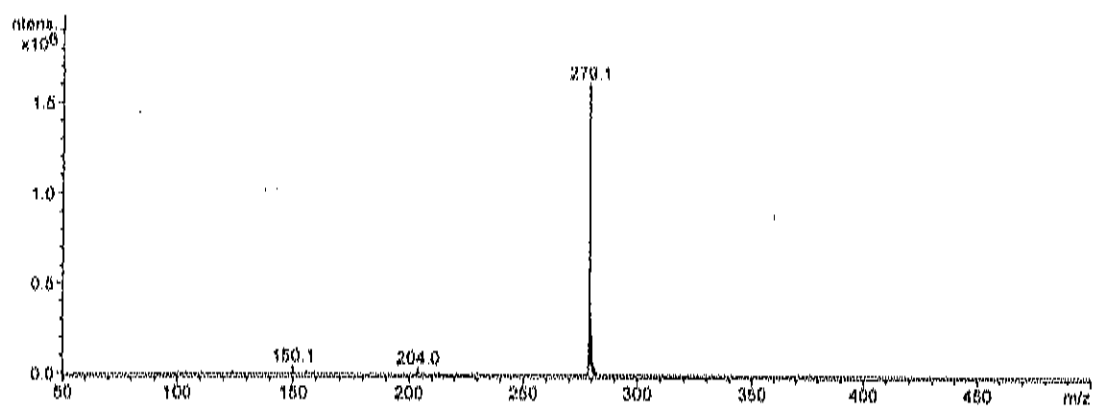


Figura 8. Espectro de masas de un estándar de sulfametazina

EM (m/e): 279.1

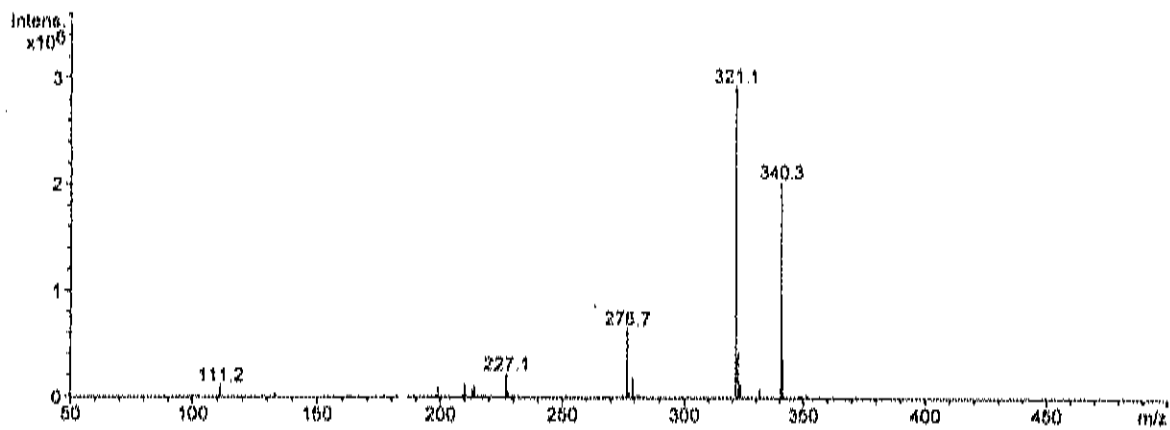


Figura 9. Espectro de masas de un estándar del metabolito N⁴-acetilsulfametazina

EM (m/e): 321.1

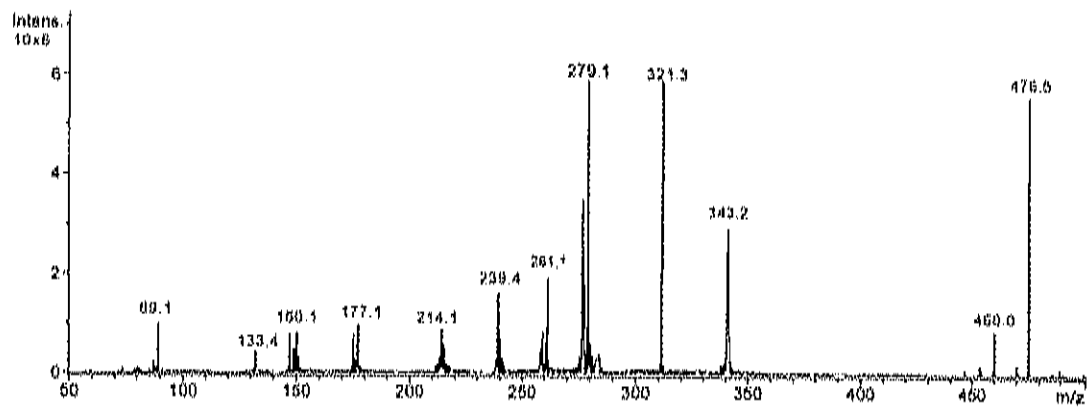


Figura 10. Espectro de masas de una muestra de hígado conteniendo sulfametazina y tres de sus metabolitos

N^4 -acetilsulfametazina: EM (m/e) 321.3, N^4 -desaminosulfametazina: EM (m/e) 261.1
 N^4 -glucuronilsulfametazina: EM (m/e) 476.5 y Sulfametazina: EM (m/e), 279.1.

A diferencia de las investigaciones publicadas, éste trabajo se realizó *in vivo*, ya que a los cerdos se les administró la sulfametazina a través del alimento durante 5 días, ésta se metabolizó y posteriormente muestras de riñón, hígado y lomo se colectaron y se almacenaron en congelación por seis meses.

La concentración de sulfametazina obtenida para el lomo fue de 1.67 ± 0.11 ppm al inicio del almacenamiento en congelación y después de 6 meses de almacenamiento se obtuvo una concentración de 0.98 ± 0.40 ppm, disminuyendo en un 41.31%. Esto concuerda con los resultados reportados por Alfredsson y Ohlsson (1998), quienes almacenaron músculo de porcino a -20 °C analizando la concentración de sulfametazina inicial, al primer, sexto y quinceavo mes reportando el comportamiento del antibiótico a lo largo de su almacenamiento finalizando la sulfametazina con una disminución del 50%.

En hígado se obtuvo una concentración de sulfametazina inicial de 2.09 ± 0.50 ppm, siendo la concentración final de 0.88 ± 0.15 ppm, disminuyendo en un 57.89%. Esta disminución a través del tiempo de almacenamiento es similar a lo reportado por Thomas y cols. (1997), sin embargo se menciona que la disminución a lo largo de 6 meses es muy pequeña, presentando una vida media de degradación de 457 días. Cabe aclarar que en dicho estudio el hígado fue contaminado con 10 ml de un estándar de sulfametazina preparado en acetona a una concentración de 20 ppm. Concluyendo que durante este proceso se pudo haber presentado una pérdida en la actividad enzimática provocando la degradación de residuos de sulfonamidas.

En el tejido de riñón se registró una concentración de sulfametazina inicial de 2.70 ± 1.00 ppm, siendo la concentración final de 1.19 ± 0.26 , disminuyendo en un 62.96%. Cox y Krzeminski (1982), almacenaron tejido de riñón conteniendo 2.2 ppm de sulfametazina por un período de 15 días a -20 °C, reportando que la disminución en las concentraciones de sulfametazina fueron muy pequeñas. Todas las concentraciones de sulfametazina obtenidas en este estudio, mostraron en los tejidos de músculo, hígado y riñón valores que se encuentran por arriba de los límites máximos permitidos (0.1 ppm).

En cuanto al metabolito N⁴-acetilsulfametazina se tuvieron concentraciones iniciales de 3.72±0.13 ppm en riñón, 0.87±0.028 ppm en hígado y en músculo fue de 0.53±0.064 ppm. Al término de los seis meses de congelación las concentraciones disminuyeron en los tres tejidos de cerdo.

No se han publicado investigaciones donde se haya estudiado la estabilidad de sulfametazina acetilada durante la congelación. Sin embargo, existe un estudio similar reportado por Parks (1994), en el cual, se monitoreó la estabilidad de los metabolitos acetilados de sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina en los tejidos de hígado y músculo de pollo. A los tejidos se les inyectó una concentración inicial de 4.0 ppm de los metabolitos y se almacenaron a -20 °C durante un período de un año. Al finalizar ese tiempo se obtuvo una disminución en la concentración de los metabolitos de 5.75% con respecto a la concentración inicial. Por lo que, se puede decir que al someter los tejidos a bajas temperaturas, se mantienen concentraciones del metabolito acetilado en los tejidos de músculo, hígado y riñón.

Cabe mencionar que en nuestra investigación las concentraciones obtenidas al término de los seis meses de congelación para sulfametazina acetilada, en hígado y músculo fueron bajas con una concentración promedio de 0.06±0.02 ppm para músculo y 0.05±0.01 ppm en hígado. Sin embargo, en riñón la concentración fue mayor con un nivel promedio de 0.18±0.04 ppm.

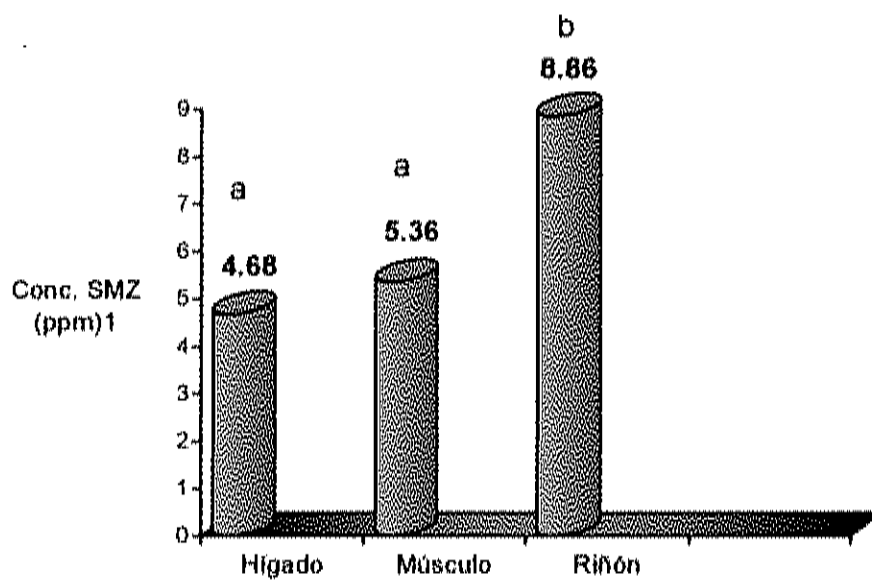
Estas concentraciones no se pueden comparar con las referencias de alguna norma oficial existente, ya que en la NOM-004, en la cual se marcan los límites máximos permitidos para sulfonamidas no se consideran los metabolitos de sulfametazina. Esto debe ser tomado en cuenta, porque aunque los metabolitos no tienen actividad farmacológica siguen manteniendo sus propiedades toxicológicas al igual que la sulfametazina.

En la Figura 11 correspondiente a sulfametazina y en la Figura 12 correspondiente a su metabolito acetilado se muestran las concentraciones en base seca de cada uno de los compuestos tomando en cuenta cada uno de los tejidos con la finalidad de observar la acumulación del antibiótico en ellos, durante su almacenamiento en congelación.

Se observa que a través del tiempo fue el riñón en el que la concentración se mantuvo más alta con un promedio de 8.86 ppm. En músculo fue de 5.36 ppm y para hígado de 4.68 ppm. En el caso de sulfametazina acetilada los niveles también se mantuvieron más altos en riñón, con una concentración promedio de 4.63 ppm, en músculo fue de 1.02 ppm y para hígado de 1.07 ppm. El análisis de varianza arrojó diferencias significativas de los dos compuestos en riñón con respecto a los otros dos tejidos con una probabilidad <0.05 .

En las Figuras 13 y 14 se muestra el comportamiento que presentó la sulfametazina y el metabolito acetilado en el transcurso de los seis meses de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el caso de sulfametazina se bloqueó el efecto del tejido y se observaron diferencias ($P<0.05$) del inicio y tercer mes de almacenamiento con respecto al cuarto, quinto y sexto mes (Fig. 13). Para sulfametazina acetilada donde se aplicó el mismo análisis, se observaron diferencias ($P<0.05$) del inicio con respecto al cuarto, quinto y sexto mes de almacenamiento en congelación (Fig. 14). En la Figura 15 se muestra la confirmación por espectrometría de masas de una muestra de hígado conteniendo sulfametazina (Fig. 15a), N^4 -acetilsulfametazina (Fig. 15b), N^4 -desaminosulfametazina y N^4 -glucuronilsulfametazina, los cuales también estuvieron presentes en los tejidos de riñón y músculo.

En base a la disminución que presentaron estos compuestos, se puede decir que la sulfametazina y su metabolito acetilado fueron inestables, presentándose disminuciones de los niveles contenidos en los tejidos, durante su almacenamiento en congelación. Este comportamiento puede ser debido a las transformaciones ocurridas, dando como resultado un aumento en la formación de los metabolitos N^4 -glucuronilsulfametazina y N^4 -desaminosulfametazina.

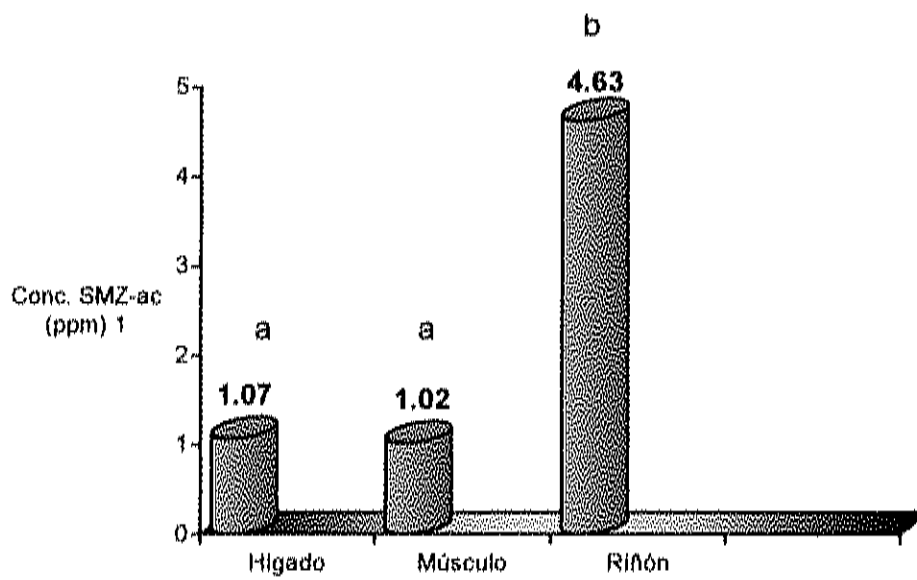


^{a,b} existe diferencia ($P < 0.05$)

Recuperación promedio: $88.22 \pm 9.3\%$

¹Base seca

Figura 11. Concentraciones de sulfametazina (ppm) en los tres diferentes tejidos de porcino sometidos a almacenamiento en congelación.

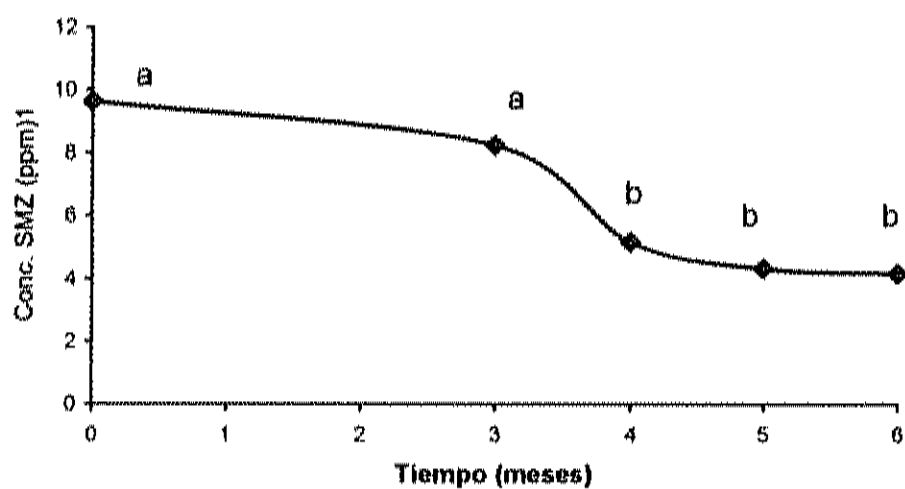


^{a,b} Existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

Recuperación promedio: $98.75 \pm 7.8\%$

1 Base seca

Figura 12. Concentraciones de sulfametazina acetilada (ppm) en los tres tejidos de porcino sometidos a almacenamiento en congelación.

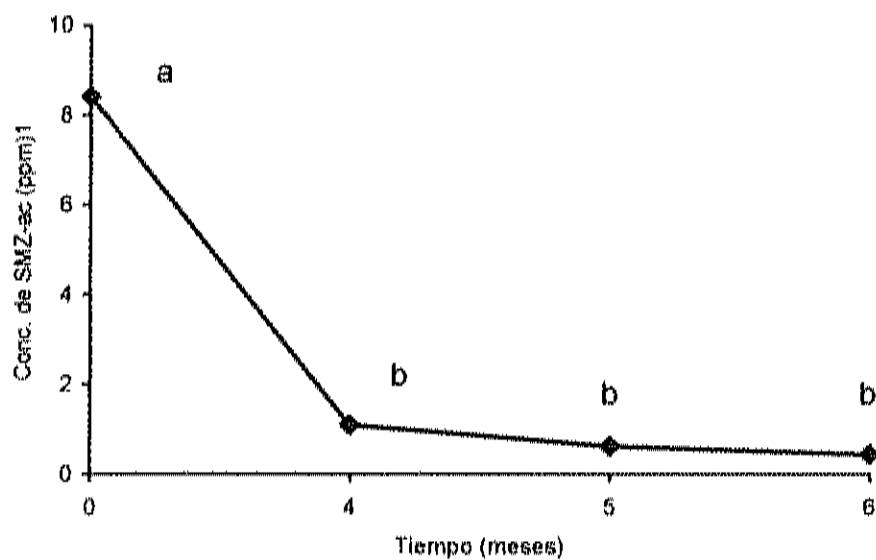


^{a,b} Existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

Recuperación promedio: $88.22 \pm 9.3\%$

1Base seca

Figura 13. Comportamiento de sulfametazina a través del tiempo de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



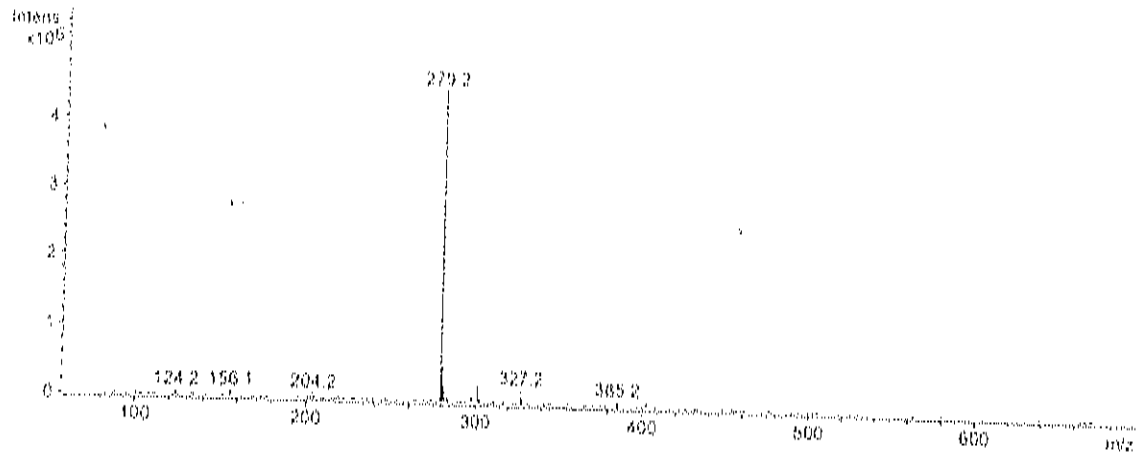
^{a,b} Existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

Recuperación promedio: $98.75 \pm 7.8\%$

1 Base seca

Figura 14. Comportamiento de sulfametazina acetilada a través del tiempo de almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

a)



b)

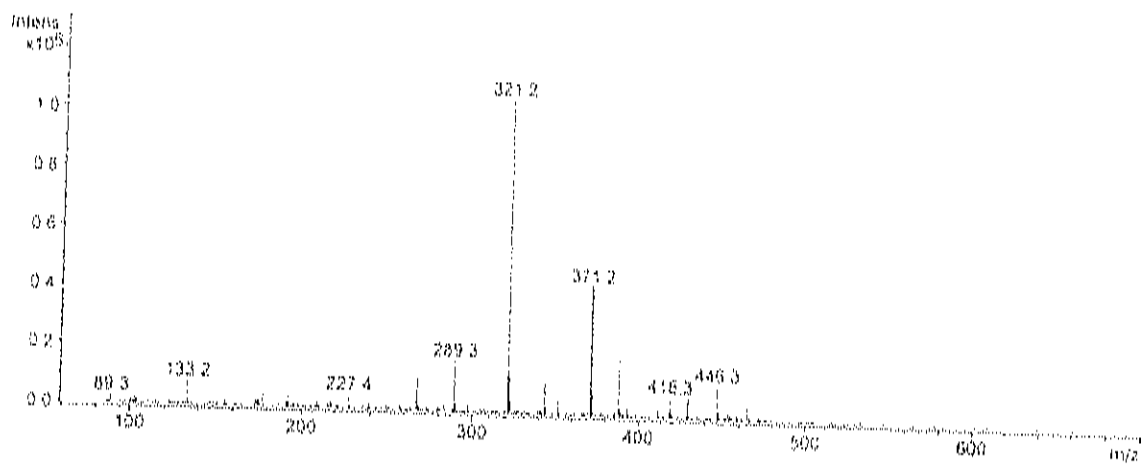


Figura 15. Espectros de masas de una muestra de hígado que fue sometida al proceso de congelación conteniendo sulfametazina y uno de sus metabolitos.

- a) Sulfametazina: EM (m/e), 279.2.
- b) N^4 -acetilsulfametazina: EM (m/e), 321.2

Se sabe que durante congelación se siguen presentando reacciones bioquímicas en los tejidos cárnicos (Barreras, 2002). Por lo que, en el presente estudio se sugiere que en los tejidos de hígado, músculo y riñón de cerdo congelados se presentó la desaminación de la sulfametazina favoreciendo la formación del metabolito N⁴-desaminosulfametazina (Fig. 16a). Esto concuerda con las disminuciones de concentración que presentó la sulfametazina a través de los seis meses de congelación aplicados en el presente estudio (Fig 13).

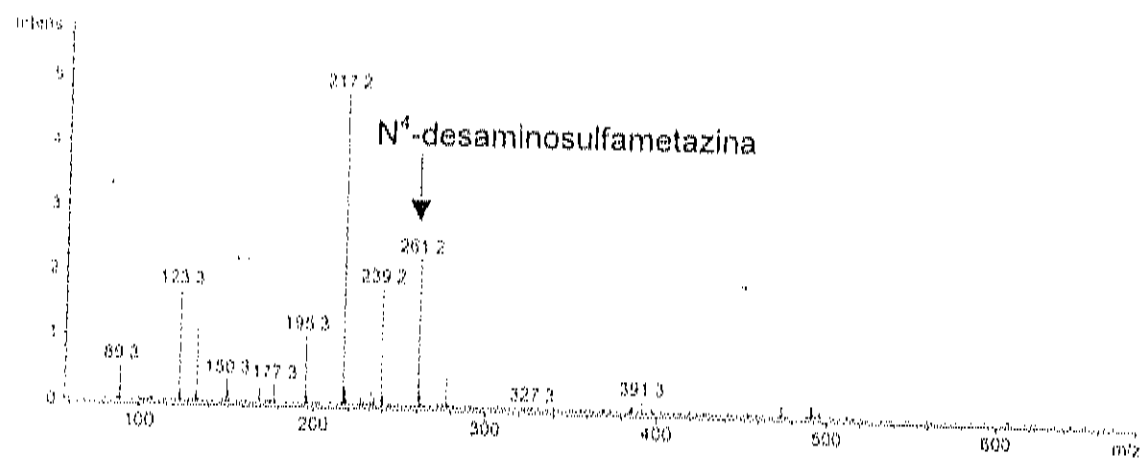
No se observó la formación del metabolito N⁴-glucosilsulfametazina durante congelación como se menciona en algunas publicaciones (Paulson y cols. 1981, Giera y cols. 1982^b), sin embargo se podría pensar que el metabolito N⁴-acetilsulfametazina favoreció el incremento en la formación del metabolito N⁴-glucuronilsulfametazina (Fig. 16b).

La formación del grupo glucuronil se pudo ver favorecida por la desacetilación del metabolito acetilado, ya que durante congelación presentó el mismo comportamiento de disminución que la sulfametazina. Cabe la posibilidad que este grupo acetilo se haya unido a una molécula de glucosa, la cual está a su vez unida previamente a la sulfametazina, formando así el N⁴-glucuronilsulfametazina.

En cuanto a la unión de la sulfametazina con la molécula de glucosa, Mitchell y cols. (1985) inyectaron cantidades iguales de sulfametazina en los tejidos de hígado y músculo, posteriormente los almacenaron a -20 °C durante 254 días y obtuvieron que no toda la sulfametazina se unió a la glucosa. Por lo tanto, mencionan que esta unión puede ser el resultado de su metabolismo, una reacción no enzimática o una combinación de estos procesos.

El estudio de Mitchell coincide con el de Giera y cols. (1982), quienes observaron que al adicionar glucosa al tejido de hígado en congelación no se incrementó la concentración del metabolito. También, al hervir el extracto hepático observaron que no disminuyó la síntesis de conjugados. Por lo que, sugieren que la conversión no es un proceso enzimático y que el tiempo de almacenamiento es un factor determinante para su formación.

a)



b)

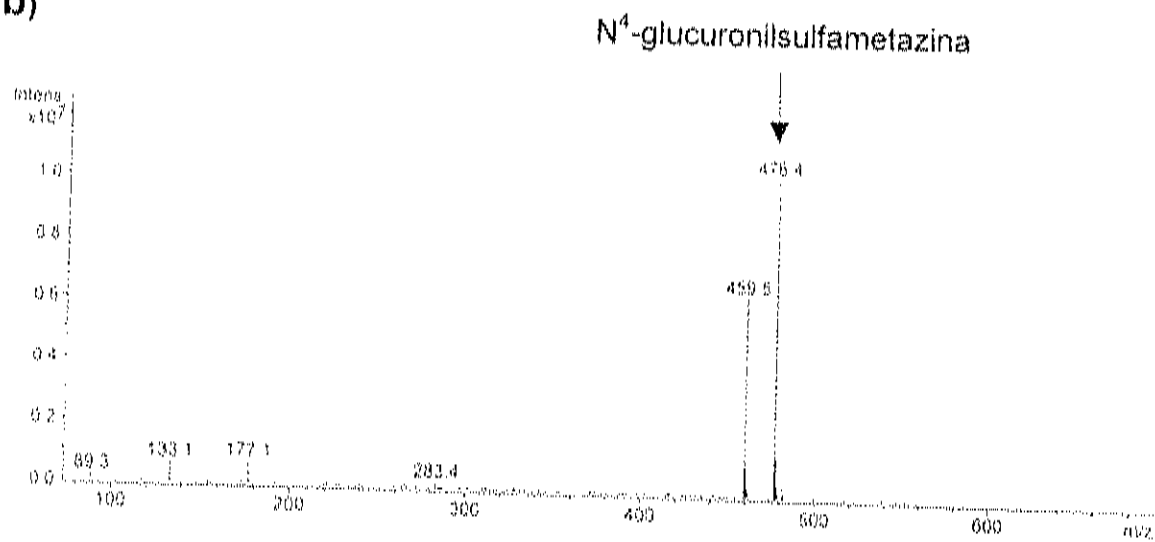


Figura 16. Espectros de masas de una muestra de hígado conteniendo dos de los metabolitos de sulfametazina.

- a) Hígado en congelación N⁴-desaminosulfametazina: EM (m/e), 261.1.
b) Hígado en congelación N⁴-glucuronilsulfametazina: EM (m/e), 476.4.

Transformaciones de Sulfametazina Durante Cocinado

Estandarización del Método de Hervido

En las pruebas preliminares que se realizaron se observó que el mayor porcentaje de reconversión del metabolito acetilado a la sulfametazina, se obtuvo aplicando las condiciones de calentamiento a 100° C durante 5 horas y ajustando el pH de la solución con HCl 0.1 N. El análisis se hizo con tres repeticiones.

Los resultados de reconversión que se obtuvieron fueron de 55.46%, 48.82% y 44.88% para cada repetición. Dichos resultados mostraron reproducibilidad obteniendo un promedio de reconversión de 49.72 ± 5.34 con un coeficiente de variación de 10.75%, el cual se encuentra dentro del rango establecido como aceptable que es $\leq 12\%$ (FSIS, 1987).

Aún cuando no se ha reportado algún estudio donde se apliquen las condiciones anteriormente mencionadas, Fisher y cols. (1992) reportaron que el metabolito glucosilado en solución acuosa a 95° C, por 5 horas de calentamiento y en condiciones ácidas se reconvierte en un 100% a sulfametazina.

En nuestro estudio la reconversión a sulfametazina fue aproximadamente del 50%, esta diferencia puede ser por el tipo de metabolito. El otro 50% se reconvirtió a un compuesto desconocido teniendo un tiempo de retención de 16 minutos (Fig. 17b).

En la Figura 17 se puede observar el estándar del metabolito acetilado, su reconversión a sulfametazina después del tratamiento de hervido y el estándar de sulfametazina. Se puede apreciar que los tiempos de retención coinciden, lo que demuestra la hidrólisis del metabolito para formar de nuevo la sulfametazina.

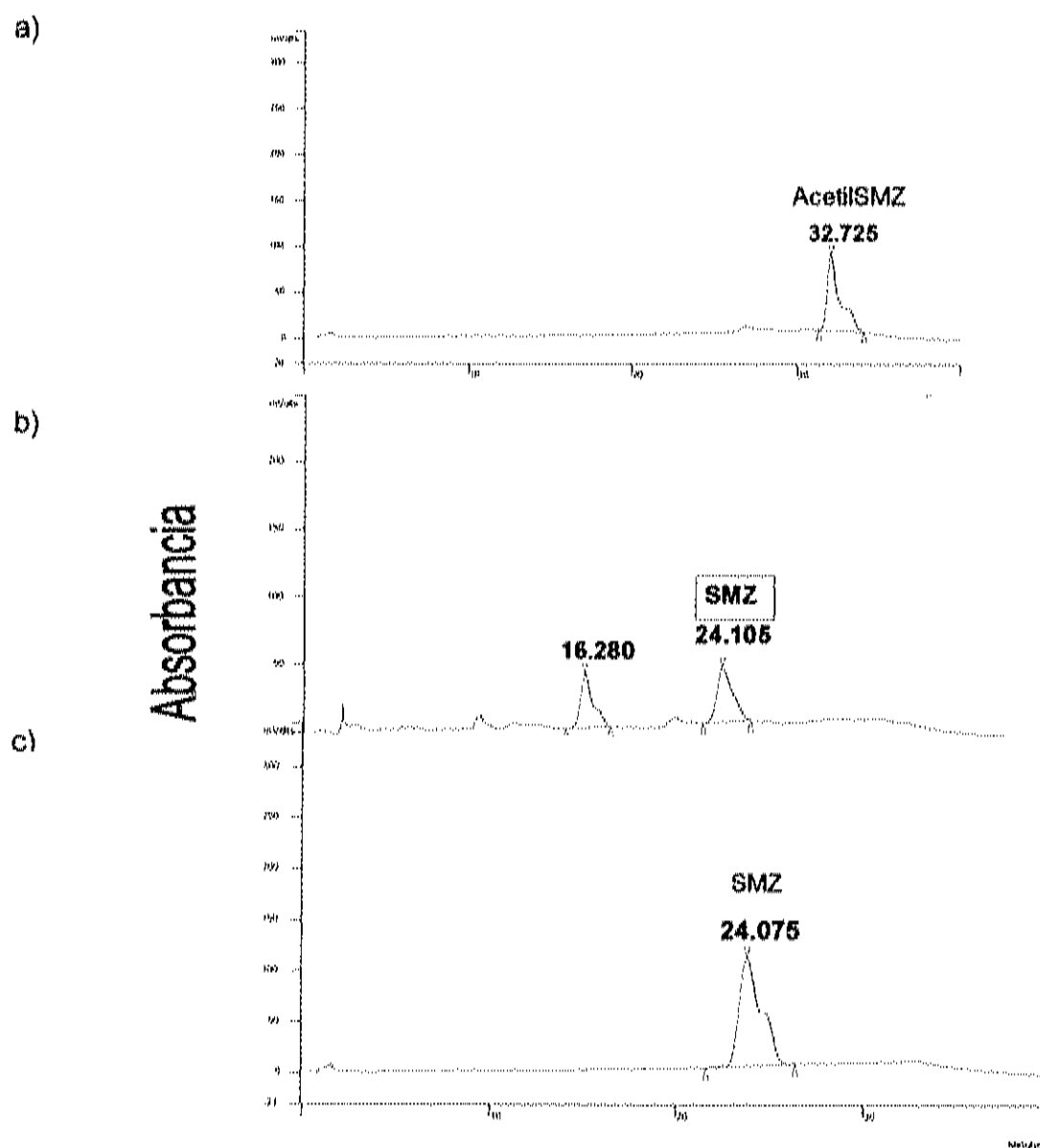


Figura 17. Cromatogramas de la reconversión del metabolito acetilado a sulfametazina.

- a) Estándar de N^A-acetilsulfametazina
- b) Estándar de sulfametazina acetilada después del tratamiento de hervido
- c) Estándar de sulfametazina

Hervido y Asado

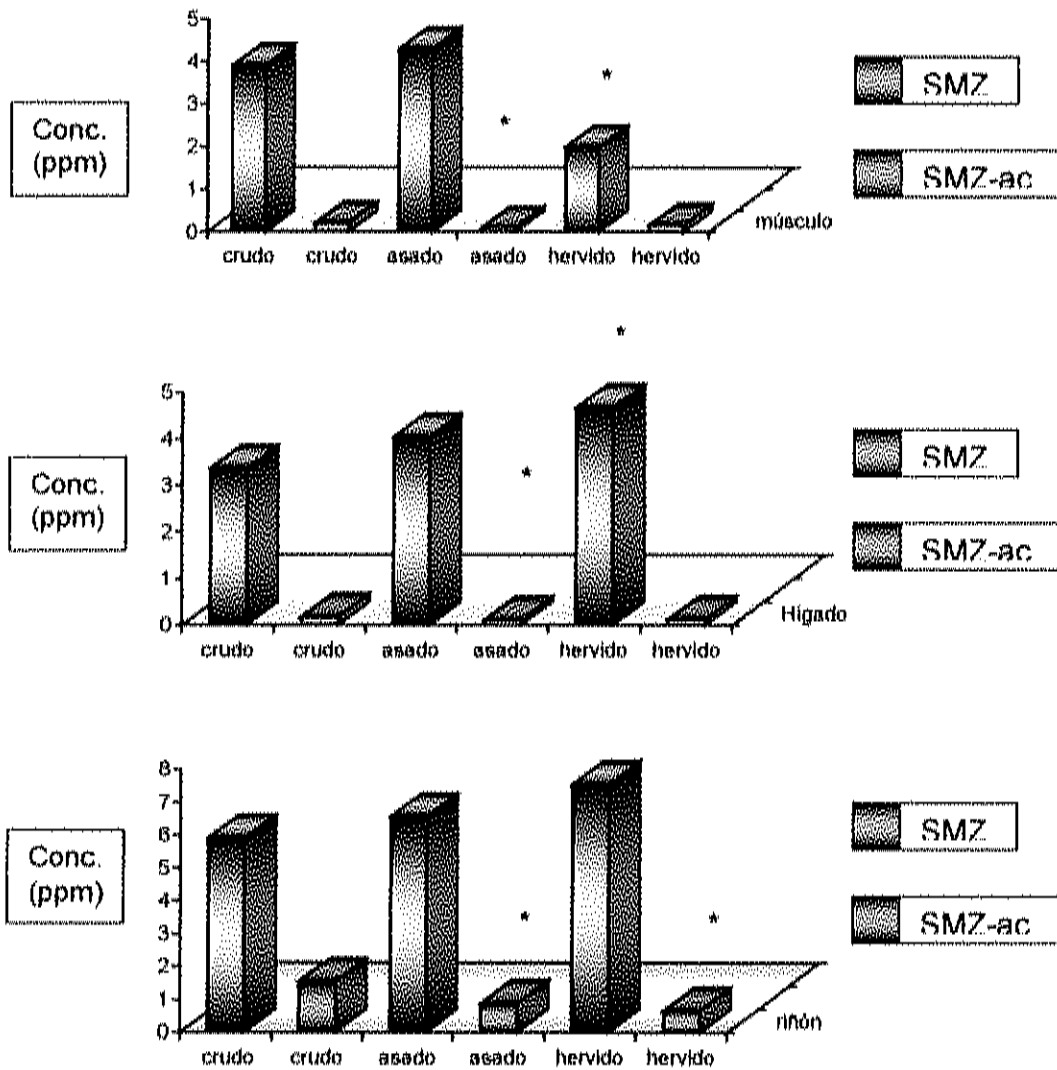
La naturaleza química del alimento donde se encuentran los residuos de antibióticos juegan un papel importante en la estabilidad de estos residuos al someterse a congelación y cocinado. En este caso, se tiene que la composición del músculo incluye fibras, tejido conectivo, tejido adiposo, cartilago y hueso.

Las proteínas sarcoplásmicas tales como mioglobina y proteínas glicolíticas son solubles en agua. Las proteínas miofibrilares, tales como miosina y actina son solubles en soluciones concentradas de sal. El colágeno y elastina son insolubles en ambos (Rose, 2000).

Al cocinarse, los tejidos cárnicos presentan diversos cambios tales como desnaturalización de proteínas sarcoplásmicas, lo que ocurre entre 40 a 90° C, mientras que actina y tropomiosina son insolubles a temperaturas por arriba de los 80° C. También se presenta una pérdida de agua, la grasa es expulsada de las áreas de almacenamiento a medida que el tejido se contrae y se dan cambios en el pH. Los compuestos orgánicos volátiles son producidos durante el cocinado y algunos de ellos contribuyen al sabor de la carne (Charley, 1991).

Existen pocas investigaciones sobre los efectos de congelación y cocinado sobre los residuos contenidos en la carne. En ellas se menciona que tales efectos térmicos pueden ocasionar una disminución de la cantidad del antibiótico por formación de otros metabolitos, permanencia de los niveles de sulfametazina sin cambio o incrementar su cantidad al someterla a calentamiento (O'Brien y cols. 1981; Rose y cols. 1995; Fisher y cols. 1992; Alfredsson y Olhsson, 1998).

En la Figura 18 se muestra el comportamiento de la sulfametazina y su metabolito acetilado al someterse a cocinado los tejidos de hígado, músculo y riñón. Cabe aclarar, que la aplicación de estos tratamientos se hizo con tres repeticiones obteniendo el mismo comportamiento para cada uno de los tejidos. Se puede observar que las concentraciones de sulfametazina después del cocinado se incrementaron con respecto a la concentración en tejido crudo.



* Existen diferencias ($P < 0.05$) con respecto a tejido crudo

Figura 18. Comportamiento de sulfametazina y su metabolito acetilado en los tejidos de músculo, hígado y riñón al someterlos a los diferentes tratamientos térmicos.

En el caso del metabolito acetilado el comportamiento fue inverso al de la sulfametazina, es decir, las concentraciones disminuyeron con respecto a las encontradas en tejido crudo, lo cual nos indica que hubo una reconversión del metabolito a la sulfametazina por efecto del calentamiento.

Lo obtenido en este estudio coincide con lo reportado por Rose y cols. (1995) quienes analizaron hígado y músculo de cerdo, observando la reconversión de N⁴-acetilsulfametazina a sulfametazina durante el proceso de derivatización, que se llevó a cabo con HCl 10 mM. Ellos concluyeron que la concentración del metabolito disminuyó un 25% después del tratamiento de cocinado y se vió favorecido por las condiciones ácidas. En nuestro estudio la concentración de este metabolito en el tratamiento de asado en sartén disminuyó en un 38.88% y en hervido disminuyó el 23%.

La excepción a este comportamiento se presentó en el tejido de músculo al someterlo a hervido, donde se observó que las concentraciones, tanto de sulfametazina como del metabolito acetilado disminuyeron con respecto a las obtenidas en tejido crudo. Como se mencionó anteriormente, los tejidos sufren diferentes efectos al someterse a cocinado. En este caso al someter el músculo a tratamiento de hervido donde las condiciones fueron de 5 horas a 100° C, las cuales fueron muy drásticas, se presentó una desnaturalización de proteínas y de grasa contenida entre las fibras musculares lo que probablemente ocasionó una lixiviación del antibiótico por efecto del ácido y la temperatura. Esto ocasionó que una parte de la sulfametazina se transfiriera al líquido de cocción, ya que al analizarlo, éste presentó una concentración de 0.44 ppm. Sin embargo, aunque esta concentración se suma a la obtenida que fue de 2.01 ± 0.23 ppm, se sigue presentando una disminución con respecto a la inicial (3.92 ± 0.20 ppm).

Este efecto fue similar al observado por Rose y cols. (1995), quienes sometieron músculo de cerdo a diferentes métodos de cocinado. En el caso de hervido obtuvieron una disminución en la concentración de sulfametazina que fue de 37 mg/Kg a 34 mg/Kg, mencionando que al analizar el líquido de cocción la concentración aumentó y fue muy similar a la inicial.

Esto mismo, sucedió con el músculo de cerdo asado a la parrilla, presentándose una disminución del 30%, sin embargo, el líquido no se pudo analizar por la evaporación del mismo.

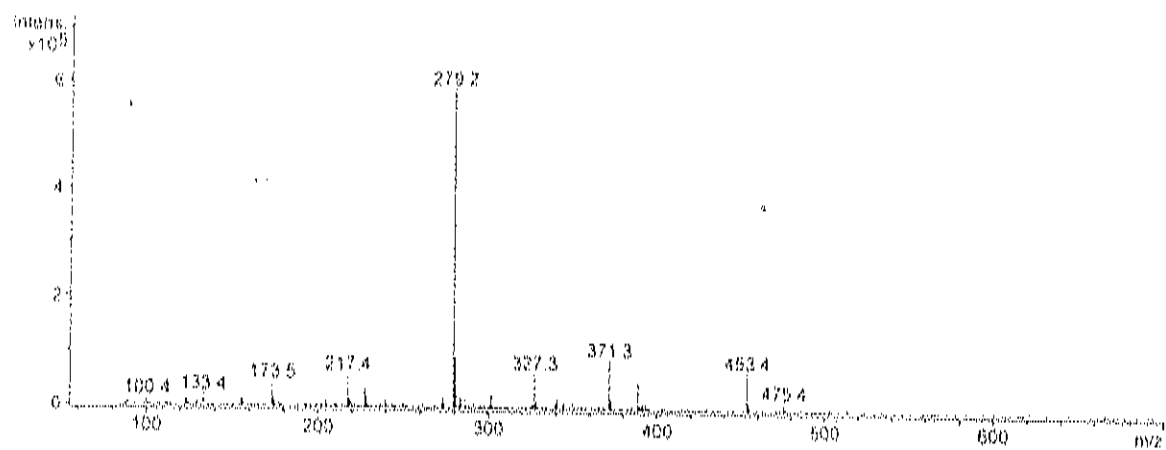
Otra de las razones por las cuales se pudo haber disminuido la concentración de sulfametazina en el músculo podría ser la formación de estructuras más grandes, ya que en el espectro de músculo hervido (Fig. 19b) comparado con el músculo crudo (Fig. 19a) se observa la presencia de un ión adicional.

A pesar de que las condiciones de hervido fueron muy drásticas permanecen concentraciones de sulfametazina y su metabolito en cada uno de los tejidos. Esto, coincide con el estudio de Rose y cols. (1995), donde someten a hervido 25 mg de sulfametazina a 100° C durante 6 horas. Encontrando que a pesar de que el tiempo del tratamiento es mucho más largo que las condiciones normales de cocinado, la sulfametazina se mantiene estable.

Para el caso de hervido en hígado y riñón no se presentó el mismo comportamiento que para músculo. Esto se puede deber a la complejidad de estos tejidos, ya que contienen mayor cantidad de enzimas. En cuanto a su composición química, el hígado y riñón contienen mayor cantidad de proteína (6%) y contienen un 86% menos de grasa (Charley, 1991), por lo que, es difícil que se presente una lixiviación durante cocinado en estos tejidos. Además, se ha reportado que la sulfametazina puede estar ligada a proteínas por medio de enlaces covalentes, lo que favorece su presencia después de los tratamientos térmicos (Fisher y cols. 1992; Silverman, 1992; Rose, 2000).

En la Tabla 1 se pueden observar las concentraciones de sulfametazina y su metabolito antes (crudo) y después de los tratamientos de cocinado (hervido y asado), mostrando que hubo diferencias ($P < 0.05$). Se puede observar como se dió la reconversión del metabolito a sulfametazina en los tratamientos de asado para los tres tejidos. En músculo el metabolito disminuyó de 0.22 ppm a 0.11 ppm (50%), en hígado fue de 0.18 ppm a 0.11 ppm (38.88%) y en riñón fue de 1.55 ppm a 0.89 ppm (57.41%).

a)



b)

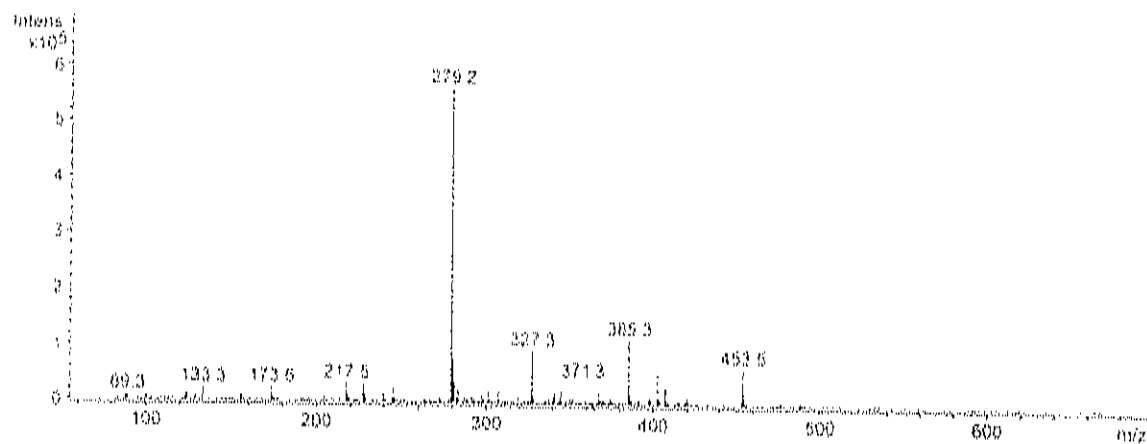


Figura 19. Espectros de masas de una muestra de músculo conteniendo sulfametazina.

- a) Músculo crudo, sulfametazina: EM (m/e), 279.2.
- b) Músculo hervido, sulfametazina: EM (m/e), 279.2.

Tabla 1. Cambios en concentración (ppm) de sulfametazina y su metabolito acetilado producidos por el cocinado en hígado, músculo y riñón.

	Músculo		Hígado		Riñón	
	SMZ	SMZ-ac	SMZ	SMZ-ac	SMZ	SMZ-ac
Crudo	3.92 ^a	0.22 ^a	3.37 ^a	0.18 ^a	5.92 ^a	1.55 ^a
Asado	4.31 ^a	0.11 ^b	4.05 ^a	0.11 ^b	6.57 ^a	0.89 ^b
Hervido	2.01 ^b	0.17 ^a	4.68 ^b	0.13 ^a	7.56 ^a	0.67 ^b

Medias. ^{a,b}Diferente literal dentro de la misma columna, indica diferencia estadística ($P < 0.05$) de crudo con respecto a los tratamientos de cocinado para cada uno de los tejidos.

En el tratamiento de hervido la reconversión del metabolito a sulfametazina se dió en los tejidos de músculo disminuyendo de 0.22 ppm a 0.17 ppm (22.72%), en hígado de 0.18 ppm a 0.13 ppm (27.77%) y en riñón que fue de 1.55 ppm a 0.67 ppm (43.22%).

Los tratamientos de asado y hervido aplicados en este estudio no fueron destructivos para sulfametazina y sus metabolitos en ninguno de los tejidos de cerdo, puesto que las concentraciones registradas en base húmeda para sulfametazina en el tratamiento de asado fueron de 1.61 ± 0.12 ppm en músculo, en hígado de 1.49 ± 0.12 ppm y en riñón de 2.24 ± 0.36 ppm. En el tratamiento de hervido las concentraciones fueron de 0.33 ± 0.04 ppm en músculo, 0.85 ± 0.00 ppm en hígado y 1.08 ± 0.124 en riñón. En el caso del metabolito N^d-acetilsulfametazina después del tratamiento de asado se registró una concentración de 0.04 ± 0.00 ppm en músculo, 0.04 ± 0.00 ppm en hígado y 0.24 ± 0.06 ppm en riñón. Para hervido la concentración fue de 0.02 ± 0.00 ppm en músculo, 0.03 ± 0.00 ppm en hígado y 0.20 ± 0.07 ppm en riñón.

Se han realizado dos estudios donde se sometieron hígado y músculo a diversos tratamientos como hervido, asado, freído, asado a la parrilla, rostizado y microondas, demostrando que la sulfametazina permanece presente (Fisher, 1992; Rose y cols. 1995).

También, se han realizado pocos estudios en productos cárnicos de cerdo, tales como, salchicha y jamón. Sin embargo, los resultados de las pocas investigaciones sobre el tema reportaron que a pesar del proceso y tratamiento térmico aplicado durante éstos procesos, se mantienen las concentraciones de sulfametazina (Epstein y cols. 1988; Fisher y cols. 1992; Moats, 1999; González, 2002).

CONCLUSIONES

Los resultados del bioensayo con cerdos expuestos a una dosis única de sulfametazina, mostraron las diversas transformaciones metabólicas que se dieron en los organismos *in vivo*, formando metabolitos, como el N⁴-acetilsulfametazina, N⁴-desaminosulfametazina y N⁴-glucuronilsulfametazina, identificados a partir de las 24 horas después de la administración del antibiótico. Además, se observó que las biotransformaciones de sulfametazina y su metabolito N⁴-acetilsulfametazina presentaron un comportamiento lineal.

Se dió la acumulación de residuos de sulfametazina y sulfametazina acetilada en los tejidos de hígado, músculo y riñón después de exponer a los cerdos durante 5 días al antibiótico, siendo mayor la acumulación en riñón con respecto a los demás tejidos.

Durante el proceso de congelación por seis meses, la sulfametazina y sulfametazina acetilada presentaron una disminución de sus niveles en los tejidos de porcino. Sin embargo, a pesar del tiempo de almacenamiento, las concentraciones de sulfametazina en los tres tejidos se mantuvieron por arriba del límite máximo permitido (0.1 ppm) establecido en la normatividad mexicana. Las concentraciones de sulfametazina acetilada estuvieron en el rango de 0.05 a 0.18 ppm en los tejidos de hígado, músculo y riñón.

Mediante espectrometría de masas se confirmó la presencia de sulfametazina, N⁴-acetilsulfametazina, además, N⁴-desaminosulfametazina y N⁴-glucuronilsulfametazina durante la congelación.

En los tratamientos de cocinado se dió la hidrólisis del metabolito acetilado formando de nuevo la sulfametazina original. Para el caso de asado en músculo la reconversión fue del 50% (0.22 a 0.11 ppm), en hígado del 38.88% (0.18 a 0.11 ppm) y en riñón del 57.41% (1.55 a 0.89 ppm). En el tratamiento de hervido la reconversión fue del 22.72% (0.22 a 0.17 ppm) en músculo, 27.77% (0.18 a 0.13 ppm) en hígado y 43.22% (1.55 a 0.67 ppm) en riñón.

Por espectrometría de masas se confirmó la presencia de sulfametazina y sus tres metabolitos después de la aplicación de los tratamientos de cocinado.

Las transformaciones de sulfametazina además de presentarse en los cerdos *in vivo*, se observaron en los tejidos durante congelación y cocinado. Se observó que la sulfametazina como tal, o bien, sus metabolitos permanecen en los tejidos de porcino, aún después de que éstos son sometidos a congelación y cocinado.

En base al potencial toxicológico y residual que presenta la sulfametazina y sus metabolitos, lo cual constituye un riesgo potencial a la salud del consumidor, los hallazgos de esta investigación indican la importancia que tiene el que se determine tanto la sulfametazina como sus metabolitos, y que éstos se consideren en las regulaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Águila, R. R. Medicación en el agua de bebida de los cerdos. *Porcicultores*, 2000^a, 15, 4-10.
- Águila, R. R. Medicación en el alimento de los cerdos. *Porcicultores*, 2000^b, 18, 23-30.
- Alfredsson, G.; Ohlsson, A. Stability of sulphonamide drugs in meat during. *Food additives and contaminants*. 1998, 15 (3), 302-306.
- AOAC. *Official Methods of Analysis*. Sections 934-01. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. USA. 1990, 15.
- Augsburg, K. J. Sulfa residues in pork: an update. *Journal of Animal Science*. 1989, 67, 2817-1821.
- Barreras, T. I. Efecto del Almacenamiento en congelación sobre el nivel de sulfametazina y su metabolito N⁴-acetilsulfametazina en carne de porcino. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, 2003, pp. 25-26.
- Benet, Z. L.; Kroetz, L. D., Sheiner, B. L. Dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En *las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Hardman, G. J.; Limbird, E. L., Molinoff, B. P., Ruddon, W. R.; Goodman, G. A. (eds). 9a ed. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana: México, D. F. 1996, pp. 1123-1129.
- Bermúdez, A. M. C.; Miranda, V. L.; Espinosa, P. A.; Valenzuela, Q. A. I.; Vázquez, M. L. Residuos de sulfonamidas en músculo de porcinos sacrificados en la región noroeste de México. *Revista Científica. FCV* 2001, 11 (2), 127-131.
- Bevill, F. R. Sulfonamides. In: *Handbook series in zoonoses*; Steele, J. H.; Beran, G. W. (eds); CRD Press, Inc.: Bora Ratón, Florida, 1984, 355-365.
- Biehl, G. L.; Bevill, F. R.; Limpoka, M.; Koritz, K. G. Sulfamethazine residues in swine. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutical*. 1981, 4, 285-290.
- Biehl, G. L. Residuos medicamentosos en cerdos. *Nuestro acontecer porcino*. 1994, 2 (7), 8-14.

- Breeders, R. Uso de promotores del crecimiento. *Industria avícola*, 2000, 47 (7), 14-18.
- Bugyei, K.; Black, D.W.; Mcewen, S.; Meek, A. Detecting sulfamethazine residues in chicken tissues using the delvotest sp system. *Journal of Food Protection*, 1995, 58 (8), 922-926.
- Cox, L. B.; Krzeminski, F. L. Drug residues in animal tissues. *Journal of Association Official Analytical Chemistry*, 1982, 65 (6), 1311-1315.
- Charley, H. Carne. En *Tecnología de Alimentos*. (1ª. Ed). Limusa: México, D. F., 1991, pp. 519-586.
- Don Franco, A. D.; Webb, J.; Taylor, E. C. Antibiotic and sulfonamide residues in meat: implications for human health. *Journal of Food Protection*, 1990, 53 (2), 178-185.
- Epstein, L. R.; Randecker, V.; Corrao, P.; Keeton, T. J.; Cross, R. Influence of heat and cure preservatives on residues of sulfamethazine, chloramphenicol, and cyromazine in muscle tissue. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 1988, 36, 1009-1012.
- Fisher, J. L.; Thulin, J. A.; Zabik, E. M.; Booren, M. A.; Poppenga, H. R.; Chapman, J. K. Sulfamethazine and its metabolites in pork: effects of cooking and gastrointestinal absorption of residues. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 1992, 40, 1677-1682.
- FSIS-USDA. Food safety and inspection service. Determining acceptability of methods for regulatory purposes (2.2.3). *Chemistry Laboratory Quality Assurance Handbook*. Vol. II. United State Department of Agriculture. Beltsville, M.D. U.S.A. 1987.
- Fuentes, V. N. C. Dinámica de eliminación de sulfametazina, cuantificación en suero, hígado y músculo de porcino. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, 1999, pp. 1 y 25.
- García, M. A.; Castillo, B. *Cromatografía líquida de alta resolución*, 1ª ed. Limusa: Madrid, España, 1988, pp. 13.
- Garfield, M. F. *Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos*. AOAC International. ed española: Estados Unidos, 1993, pp. 73-76.

- Gibbons, N. S.; Kaneene, B. J.; Lloyd, W. J. Chemical residues in U. S. Meat and poultry: suggestions for improvement in the USDA/FSIS population-sampling programs. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 1996, 16 (4), 222-226.
- Giera, D. D.; Sieck, F. R.; Graper, K. L.; Mertz, L. J.; Herberg, J. R. Metabolism of [14C] sulfamethazine in swine. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1982^a, 30, 263-266.
- Giera, D. D.; Abdulla, F. R.; Occolowitz, L. J.; Dorman, E. D.; Mertz, L. J.; Sieck, F. R. Isolation and identification of a polar sulfamethazine "metabolite" from swine tissue. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1982^b, 30, 260-263.
- Glenn, K. D.; Cannavan, A.; McCracken, J. R. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *Journal Chromatography A*. 2000, 882, 37-52.
- González, C. H. H. Estabilidad de sulfametazina y su metabolito N⁴-acetil sulfametazina en carne y productos cárnicos de cerdo procesados térmicamente. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, 2002, pp. 37-47.
- Gums, G. J. Assessing the impact of antimicrobial resistance. *American Journal Health-Syst Pharmacology*. 2002, 59, s4-s6.
- Heaton, L. K.; Smith, C. G.; Sofos, N. J.; Aaronson, M. J.; Jones, K. D. Analysis of pork products for chemical residues. *Journal of Muscle Foods*. 1996, 7; 213-224.
- Hogg, R.; Totthill, J.; Smith, C. Screening for sulphonamide residues in animal tissue using the Charm II sequential receptor assay. Australian Government Analytical Laboratories. 1989.
- Hokanson G. C.; Singer, D. C. editors. *Methods Validation. A Laboratory Quality Handbook of Best Practices*. ASQ Quality Press. Milwaukee Wisconsin. 2001, pp. 235.
- Katz, E. S.; Sue, B. M. Antibiotic residues in food and their significance. *Food Biotechnology*, 2000, 14 (3), 147-171.

- Keski-Hynnifla, H. Liquid Chromatography-and capillary electrophoresis-mass spectrometry in glucuronide analysis. Faculty of Science. Dissertation Academic. University of Helsinki, Finland, 2001, pp. 7-47.
- Kiser, S. J. Subtherapeutic uses of antibiotics and sulfonamides. In Handbook series in zoonoses. Steele, H. J.; Beran, W. G. (eds.). CRD Press, Inc. Bora Ratón, Florida, 1984, pp. 225-229.
- Klassen, C.D. and Rozman, K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. Cap. 5. Klassen, C. D. editor. Cassarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 5^ª Ed. Mc Graw-Hill, E.U.A. 1996. pp. 91-112.
- Kucers, A.; Bennett, Mck. N.; Kemp, R. J. Sulfonamides. In The use of antibiotics. A comprehensive review with clinical emphasis. 4th ed. J. B. Lippincott Company. Great Britain, 1984, pp. 1075-1106.
- Littlefield, A. N.; Gaylor, W. D. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in B6C3F1 mice. Food Chemistry Toxicology. 1989, 27 (7), 455-463.
- Long, A. R., Hsieh, C., Malbrough, M. S., Short, CH. R. and Baker, S. A. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatography determination of sulfadimethoxine in catfish (*ictalurus punctatus*) muscle tissue. Journal Association Official Analytical Chemistry. 1990, 73, 868-871.
- Mandell, L. G.; Petri, A. W. Fármacos antimicrobianos. En Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Hardman, G. J.; Limbird, E. L., Molinoff, B. P., Ruddon, W. R.; Goodman, G. A. (eds). 9ª ed. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana: México, D. F. 1993, 1123-1129.
- Mckellar, Q. A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. British Medical Journal. 1998, 317, 610-611.
- Mengelers, B. J.; Kleter, A. G.; Hoogenboom, P. A.; Kuiper, A. H.; Van Miert, M. A. The biotransformation of sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, trimethoprim and aditoprim by primary cultures of pig hepatocytes. Journal Veterinay Pharmacology Therapy. 1997, 20; 24-32.
- Mengelers, B. J.; Van Gogh, R. E.; Kuiper, A. H.; Pijpers, A.; Verheijden, M. H.; Van Miert, M. A. Pharmacokinetics of sulfadimethoxine and sulfamethoxazole in

- combination with trimethoprim after intravenous administration to healthy and pneumonic pigs. *Journal Veterinary Pharmacology Therapy*. 1995, 18, 243-253.
- Mitchell, D. A.; Paulson, D. G.; Zaylskie, G. R. Steady state kinetics of {4C-sulfamethazine [4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl) benzene [U-14C] sulfonamide}. *Drug metabolism and disposition*. 1985, 14 (2), 155-160.
- Mitchell, J. M.; Yee, J. A. Antibiotic use in animals and transfer of drug resistance to humans: should we stop treating animals with these drugs?. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. 1995, 15 (8), 484-487.
- Mitema, S. E.; Kikivi, M. G.; Wegener, C. H.; Stohr, K. An assessment of antimicrobial consumption in food producing animals in Kenya. *Journal Veterinary Pharmacology Therapy*. 2001, 24, 385-390.
- Moats, A. W. Advances in determination of antibiotic residues. *Journal Association Official Analytical Chemistry International*. 1997, 80 (1), 1-4.
- Moats, A. W. The effect of processing on veterinary residues in foods. *Advance Experiment Medical Biology*. 1999, 459, 233-241.
- Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, 1996. Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, córvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límite máximo permisible y procedimientos de muestreo. *Diario oficial de la federación* 25 de abril de 2001. México, D. F.
- NOM-012-ZOO-1993. Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. *Diario oficial de la federación* 17 de enero de 1995. México, D. F.
- NOM-040-ZOO-1995. Especificaciones para la comercialización de sales puras antimicrobianas para uso en animales o consumo por éstos. *Diario oficial de la federación* 10 de abril de 1996. México, D. F.
- NOM-059-ZOO-1997. Salud animal. Especificaciones de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Manejo técnico del material publicitario. *Ley Federal sobre Metrología y Normalización* 19 de enero de 2000. México, D. F.

- NOM-064-ZOO-2000. Lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Diario oficial de la federación 20 de diciembre de 2002. México, D. F.
- O'Brien, J. J.; Campbell, N.; Conaghan, T. Effect of cooking and cold storage on biologically active antibiotic residues in meat. *Journal Hygiene Cambridge*. 1981, 87, 511-523.
- Parks, O. W. Evidence for transformation of sulfamethazine to its N⁴-glucopyranosyl derivative in swine liver during frozen storage. *Journal Association Analytical Chemistry*. 1984, 67 (3), 566-569.
- Parks, O. W. Stability of sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine and their N⁴-acetyl derivatives in chicken tissues during frozen storage. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*. 1994, 77 (2), 486-488.
- Paulson, D. G.; Giddings, M. J.; Lamoureux, H. C.; Mansager, R. E.; Struble, B. C. The isolation and identification of ¹⁴C-sulfamethazine [4-amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl) [¹⁴C] benzenesulfonamide] metabolites in the tissues and excreta of swine. *Drug metabolism and disposition*. 1981, 9, 142-146.
- Paulson, D. G.; Mitchell, D. A.; Zaylskie G. R. Identification and quantification of sulfamethazine metabolites by liquid chromatography gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Association Official Analytical Chemistry*. 1985, 68 (5), 1000-1006.
- Pearson, A. M.; Gillett, T. A. *Processed meats*. 3a ed. Ed. Aspen; Estados Unidos de Norteamérica. 1999, pp. 129-130.
- Poirier, A. L.; Doerge, R. D.; Gaylor, W. D.; Miller, A. M.; Lorentzen, J. R.; Casciano, A. D.; Kadlubar, F. F.; Schwetz, A. B. An FDA review of sulfamethazine toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmaceutical*. 1999, 30, 217-222.
- Porter, S. Confirmation of sulfonamide residues in kidney tissue by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*. 1994, 119, 2753-2756.
- Renson, C.; Degand, G.; Rogister-Maghuin, G. Determination of sulphamethazine in animal tissues by enzyme immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 1993, 275, 323-328.

- Rose, D. M. Analyte stability during storage and processing. In: Current issues in Regulatory Chemistry. Kay, F. J.; MacNeil, M. D; O'Rangers J. J. (eds). AOAC International. San Diego, CA., 2000, 49-60.
- Rose, D. M.; Farrington, H. H. W.; Shearer, G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 3. sulphamethazine (sulphadimidine). Food Additives and Contaminants. 1995, 12 (6), 739-750.
- Rust, E. R. Sausage and processed meats manufacturing. Published by AMI Center for continuing education, American Meat Institute. Estados Unidos de Norteamérica. 1975.
- Sánchez, R. L.; Fuentes, H. V.; Sumano, L. H. Detección de residuos de sulfonamidas en carne y vísceras de bovinos sacrificados. Cebú. 1988, (14), 72-74.
- Shibamoto, T., Bjeldanes, L. F. Principles of toxicology. Introduction to Food Toxicology. 1993. Academic Press, Inc.; pp. 7-10.
- Silverman, B. R. The organic chemistry of drug design and drug action. Academic Press: United States of America, 1992, 277-351.
- Thomas, K. G.; Millar, G. R.; Anstis, W. P. Stability of sulfonamide antibiotics in spiked pig liver tissue during frozen storage. Journal of Association Official Analytical Chemistry International. 1997, 80 (5), 988-995.
- Tilles, A. S. Practical Issues in the management of hypersensitivity reactions: Sulfonamides. Southern Medical Journal. 2001, 94 (8), 817-824.
- Tollefson, L.; Ann, M. M. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. Journal Association Official Analytical Chemistry International. 2000, 83 (2), 245-254.
- Van Eeckhout, J. N.; Van Peteghem, H. C.; Helbo, C. V.; Maghiun-Rogister, C. G.; Cornelis, R. M. New database on hormone and veterinary drug residue determination in animal products. Analyst. 1998, 123, 2423-2427.
- Vree, T. B., Hekster, A.Y. Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites. In antibiotics and chemotherapy. Shonfeld (edr). Department of clinical pharmacy university Nijmegen. Netherlands, 1987, vol. 37, pp. 139-142.

Whipple, M. D.; Samuelson, G.; Heath, E. G.; Showalter, H. D. Tissue residue depletion and recycling of sulfamethazine in swine. *Journal of Animal Veterinary Medical Association*. 1981, 176 (15), 1348-1352.

Whipple, M. D.; Samuelson, G.; Heath, E. G.; Showalter, H. D. Tissue residue depletion and recycling of sulfamethazine in swine. *Journal of Animal Veterinary Medical Association*, 1981, 176 (15), 1348-1352.