

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**ESTUDIO PILOTO SOBRE EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE  
ANTIBIOTICOS EN PECHUGA DE POLLOS  
COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE AMBATO.**

Trabajo de investigación previo a la obtención del grado de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**Autor:**

VANESSA PAOLA ESTRELLA CHIRIBOGA

**Tutor:**

ING. JORGE RICARDO GUERRERO LÓPEZ.

Ambato – Ecuador

2017

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, VANESSA PAOLA ESTRELLA CHIRIBOGA, portadora de la cédula de identidad número: 1722637384, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“ESTUDIO PILOTO SOBRE EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN PECHUGA DE POLLOS COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE AMBATO”**. Es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

---

**Vanessa Paola Estrella Chiriboga.**  
C.I. 1722637384

## **DERECHO DE AUTOR**

Al presentar el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: **“ESTUDIO PILOTO SOBRE EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN PECHUGA DE POLLOS COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE AMBATO”**, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

---

**Vanessa Paola Estrella Chiriboga.**  
**C.I. 1722637384**

## AGRADECIMIENTOS

*Primero un agradecimiento profundo a Dios que me permitió llegar a este punto de mi vida profesional, mi amado padre con sus sabias palabras me supo guiar por el camino de la vida desde niña siempre supo que iba a llegar a cumplir mis sueños muchas gracias por todo su apoyo incondicional. Mi madre luz en mi vida siempre estuvo ahí cuando más la necesitaba.*

*Un agradecimiento profundo a mi tutor Ing. Jorge Ricardo Guerrero López un excelente ser humano y un profesor ejemplar, gracias por todo su apoyo en todo el transcurso de mi vida universitaria.*

*Agradezco a la Dra. Mayra Montero y al Dr. Marco Rosero maravillosos profesores dedicando su vida a los estudiantes, profesionales únicos y me honra decir que fueron pilares fundamentales en la realización y culminación de este trabajo de investigación, muchas gracias por todo su apoyo.*

*Un agradecimiento rotundo a la doctora Paulette Andrade encargada del laboratorio de Contaminantes Pecuarios por darme la apertura de realizar esta investigación en el laboratorio y por brindarme todos sus conocimientos respectivos.*

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo de investigación el cual fue realizado con amor, dedicación y esfuerzo, me gustaría dedicar a mi padre Pedro Estrella y mi madre Maritza Chiriboga son los mejores mentores de vida.*

*Una dedicación muy especial a mis hermanos Paola Estrella y Hervin Estrella gracias a su apoyo no hubiera podido llegar a culminar este nuevo paso en mi vida profesional.*

*Especialmente dedico este trabajo a mi mejor amigo, compañero en el camino de la vida, mi gran amor la persona que sin importar todos los problemas que tengamos siempre está ahí para apoyarme Ing. Jonathan Oliveiros Silva Ruilova.*

## APROBACIÓN

**“ESTUDIO PILOTO SOBRE EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN PECHUGA DE POLLOS COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE AMBATO”.**

**REVISADO POR:**

-----  
Ing. Jorge Ricardo Guerrero López.  
TUTOR.

-----  
Dr. Marco Rosero.  
BIOMETRISTA.

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:**

-----  
Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez.  
PRESIDENTE

-----  
Fecha

-----  
Dra. Mayra Montero.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

-----  
Fecha

-----  
Dr. Marco Rosero.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

-----  
Fecha

## ÍNDICE

RESUMEN.....	xiv
SUMMARY .....	xv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN. ....	1
CAPITULO II .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes Investigativos.....	3
2.2. Categorías Fundamentales o Marco Conceptual.....	10
2.2.1. Antibióticos.....	10
➤ Generalidades .....	10
➤ Tilosina.....	11
➤ Enrofloxacina. ....	11
➤ Sulfonamida. ....	12
2.2.2. Residuos de Medicamentos Veterinarios.....	12
➤ Generalidades.....	12
➤ Residuo Indicador. ....	12
➤ Límite Máximo para residuos de Medicamentos Veterinarios (LMR).....	12
➤ Tiempo de Suspensión y Tiempo de Retención.....	13
2.2.3. Ingestión Diaria Admisible (IDA). ....	13
➤ Generalidades.....	13
➤ Tejido Diana.....	14
➤ Carne de Pollo.....	14
2.2.4. Ensayos ELISA. ....	14
➤ Generalidades.....	14
➤ Kit de formato ELISA para Enrofloxacina. ....	15
➤ Kit de Formato ELISA para Sulfonamidas. ....	15

➤ Kit de Formato ELISA para Tilosina.....	16
CAPITULO III.....	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	17
3.1. HIPÓTESIS.....	17
3.2. OBJETIVOS .....	17
3.2.1. Objetivo General.....	17
3.2.2. Objetivo específico.....	17
CAPÍTULO IV.....	18
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....	18
4.1. Ubicación del Ensayo.....	18
4.2. Caracterización del Lugar .....	18
4.3. Equipos y Materiales.....	18
4.3.1. Materiales .....	18
4.3.2 Equipos.....	19
4.4.3 Reactivos .....	19
4.5. Factores en Estudio .....	19
4.6. Analisis Estadístico .....	19
4.6.1. Cálculo de la Muestra.....	20
4.7. Manejo de la Investigación .....	23
4.7. Variable Respuesta.....	32
4.8. Procesamiento de la Información.....	32
CAPÍTULO V .....	32
RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	32
5.1. Resultados.....	32
5.2. Discusión.....	34
CAPÍTULO VI.....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35



6.1. Conclusiones.....	35
6.2. Recomendaciones.....	36
6.3. BIBLIOGRAFÍA .....	37
CAPITULO VIII .....	41
PROPUESTA.....	41
8.1 Datos Informativos.....	41
8.2 Antecedentes de la Propuesta.....	41
8.3 Justificación.....	42
8.4 OBJETIVOS .....	43
8.4.1. Objetivo general .....	43
8.4.2. Objetivos específicos .....	43
8.5 Análisis de Factibilidad.....	43
8.6 Fundamentación .....	43
8.7 Metodología .....	44
8.8 Administración.....	44
8.9 Previsión de la Evaluación .....	44
6.4. ANEXOS .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Límites máximos de residuos de antibióticos.....	13
<b>TABLA 2.</b> Mercados que expenden carne de pollo.....	20
<b>TABLA 3.</b> Muestreo estratificado.....	22
<b>TABLA 5.</b> Resultados test de tukey.....	33

## ÍNDICE DE ANEXOS.

ANEXO. 1	Compra de las pechugas de pollo en el mercado modelo.....	45
ANEXO. 2	Compra de las pechugas de pollo en el mercado américa.....	45
ANEXO. 3	Codificación de las muestras.....	45
ANEXO. 4	Colocación de las muestras en el congelador.....	45
ANEXO. 5	Colocación de las muestras en los diferentes coolers con gel refrigerante y hielo.....	45
ANEXO. 6	Codificación de las muestras en el laboratorio de agrocalidad.....	45
ANEXO. 7	Preparación de las muestras.....	46
ANEXO. 8	Pechuga cortada en cuadrados pequeños.....	46
ANEXO. 9	Se colocó en el homogenizador maestro de tejidos marca omni.....	46
ANEXO. 10	Muestra procesada.....	46
ANEXO. 11	Rotulación de los tubos de plástico.....	46
ANEXO. 12	Tubos rotulados.....	46
ANEXO. 13	Pesaje de los tubos de plástico.....	47
ANEXO. 14	Pesaje de las muestras para los análisis.....	47
ANEXO. 15	Pipetear 1 volumen de 10x sample extraction buffer.....	47
ANEXO. 16	Colocar en un vaso de 100ml.....	47
ANEXO. 17	Mezclar con 9 volúmenes de agua destilada tipo II.....	47
ANEXO. 18	Reactivo 1 x sample extraction buffer ya preparado.....	47
ANEXO. 19	Medir en una probeta 6.5 volúmenes de 1xsample extraction buffer.....	48
ANEXO. 20	Medir en una probeta 3.5 volúmenes de metanol al 100%.....	48
ANEXO. 21	Muestra preparada de 35 % metanol/ sample extraccion buffer.....	48
ANEXO. 22	Fortificación de las muestras 1a y 1b.....	48
ANEXO. 23	Colocación en el vortex por 1 minuto.....	48
ANEXO. 24	Preparación de las muestras para enrofloxacin. Añadir a cada tubo 4ml de 35% metanol/ sample extraction buffer.....	49
ANEXO. 25	Añadir a cada muestra 50ul del tampón de extracion de carne (buffer I).....	49
ANEXO. 26	Colocar las muestras en una gradilla.....	49
ANEXO. 27	Muestras después de colocar los reactivos.....	49
ANEXO. 28	Vorterizar las muestras por 10 minutos a máxima velocidad.....	49
ANEXO. 29	Muestra ya vorterizada.....	49
ANEXO. 30	Centrifugar las muestras por 10 minutos a 4.000 rpm.....	50
ANEXO. 31	Muestra ya centrifugada.....	50
ANEXO. 32	Transferir 50 ul del sobrenadante a un tubo nuevo y añadir a cada muestra 25 uL del tampón de extracción de carne (buffer II).....	50
ANEXO. 33	Añadir 1.5 ml de 35% metanol/ sample extraction buffer y vorterizar por 30 seg.....	50
ANEXO. 34	Preparación de las muestras para el análisis tilosina.....	50
ANEXO. 35	Añadir 5ml de metanol y 3ml de hexano.....	50
ANEXO. 36	Vorterizar por 12 minutos a velocidad media.....	51
ANEXO. 37	Muestra vorterizada.....	51
ANEXO. 38	Centrifugar por 10 minutos a 4.000 rpm.....	51
ANEXO. 39	Muestra centrifugada.....	51
ANEXO. 40	Remover completamente las capas superiores del hexano.....	51
ANEXO. 41	Transferir 1ml de la capa inferior a un tubo de vidrio.....	51
ANEXO. 42	Rotulación de los tubos de vidrio.....	52
ANEXO. 43	Evaporador rotatorio.....	52
ANEXO. 44	Utilizar el evaporador rotatorio para secar la muestra.....	52
ANEXO. 45	Pipetear 0.5 ml del sample extraction buffer.....	52
ANEXO. 46	Añadir en cada muestra y mezclar bien.....	52
ANEXO. 47	Traspasar el contenido hacia un tubo nuevo.....	52

ANEXO. 48	Vorterizar por 2 minutos y centrifugar por 1 minuto a 4.000rpm.....	53
ANEXO. 49	Muestra ya centrifugada.....	53
ANEXO. 50	Preparación de las muestras para sulfonamida. Añadir 6ml de acetato de etilo en cada muestra.....	53
ANEXO. 51	Vorterizar por 3 minutos a máxima velocidad.....	53
ANEXO. 52	Muestra vorterizada.....	53
ANEXO. 53	Centrifugar por 5 minutos a 4.000 rpm.....	53
ANEXO. 54	Muestra centrifugada.....	54
ANEXO. 55	Transferir 4ml del sobrenadante del acetato de etilo a un nuevo tubo de plástico y a un tubo de vidrio.....	54
ANEXO. 56	Máquina de gas nitrógeno.....	54
ANEXO. 57	Mitad de las muestras se colocaron en la máquina de gas de nitrógeno para secarlas.....	54
ANEXO. 58	Tubos secándose.....	54
ANEXO. 59	Mitad de las muestras se colocaron en el evaporador rotativo para secarlas.....	54
ANEXO. 60	Disolver el residuo seco en 2ml de hexano.....	55
ANEXO. 61	Transferir el residuo a un nuevo tubo de plástico y añadir 1ml del sample extraction buffer en cada muestra.....	55
ANEXO. 62	Vorterizar por 1 minuto a máxima velocidad.....	55
ANEXO. 63	Centrifugar por 10 minutos a 4.000 rpm.....	55
ANEXO. 64	Muestra centrifugada.....	55
ANEXO. 65	Descartar la capa superior del hexano.....	55
ANEXO. 66	Reactivos que se utilizan para el análisis elisa enrofloxacin.....	56
ANEXO. 67	Reactivos que se utilizan para el análisis elisa enrofloxacin.....	56
ANEXO. 68	Estándares que se utilizan para el análisis elisa enrofloxacin.....	56
ANEXO. 69	Plato que se utilizan para el análisis elisa enrofloxacin.....	56
ANEXO. 70	Estándares que se utilizan para el análisis elisa tilosina.....	56
ANEXO. 71	Plato que se utilizan para el análisis elisa tilosina.....	56
ANEXO. 72	Reactivos que se utilizan para el análisis elisa tilosina.....	57
ANEXO. 73	Reactivos que se utilizan para el análisis elisa tilosina.....	57
ANEXO. 74	Estándares que se utilizan para el análisis elisa sulfonamida.....	57
ANEXO. 75	Plato que se utilizan para el análisis elisa sulfonamida.....	57
ANEXO. 76	Sacar la placa ya que tiene que estar a temperatura ambiente.....	57
ANEXO. 77	Llenar la hoja de registro de muestras para análisis elisa.....	57
ANEXO. 78	Añadir 50 ul de cada estándar por duplicado.....	58
ANEXO. 79	Los estándares se colocan de menor a mayor concentración.....	58
ANEXO. 80	Añadir 50 ul de cada muestra en diferentes pocillos.....	58
ANEXO. 81	Añadir 100 ul del anticuerpo #1.....	58
ANEXO. 82	Añadir en cada muestra sin topar los pocillos.....	58
ANEXO. 83	Mezclar bien durante 1 minuto.....	58
ANEXO. 84	En el caso de la prueba elisa sulfonamida se debe pipetear hacia arriba y hacia abajo en cada muestra.....	59
ANEXO. 85	Incubar el plato por 30 minutos.....	59
ANEXO. 86	Desechar el líquido.....	59
ANEXO. 87	Lavar el plato 3 veces con 250 ul de la solución de lavado 1x.....	59
ANEXO. 88	Lavar utilizando una pipeta multicanal.....	59
ANEXO. 89	Agitar la placa para quitar todos los residuos del anticuerpo #1.....	59
ANEXO. 90	Desechar el líquido.....	60
ANEXO. 91	Agitar después de cada lavado antes de desechar el líquido.....	60
ANEXO. 92	Después del último lavado invertir la placa y golpear suavemente sobre la toalla de papel.....	60
ANEXO. 93	Añadir 150 ul de la solución anticuerpo #2.....	60
ANEXO. 94	Añadir en cada pocillo sin topar el fondo.....	60
ANEXO. 95	Incubar el plato por 30 minutos.....	60

<b>ANEXO. 96</b> Añadir 100 ul del sustrato TMB.....	61
<b>ANEXO. 97</b> Mezclar la placa agitándola durante 1 minuto.....	61
<b>ANEXO. 98</b> Incubar la placa durante 15 minutos.....	61
<b>ANEXO. 99</b> Resultados post incubación.....	61
<b>ANEXO. 100</b> Añadir 100 uL del stop buffer.....	61
<b>ANEXO. 101</b> Para parar la reacción enzimática.....	61
<b>ANEXO. 102</b> Resultados post stop buffer.....	62
<b>ANEXO. 103</b> Insertar la placa en el equipo elisa para el análisis los resultados.....	62
<b>ANEXO. 104</b> Placa de sulfonamide.....	62
<b>ANEXO. 105</b> Placa de sulfonamide.....	62
<b>ANEXO. 106</b> Placa de tilosina.....	62
<b>ANEXO. 107</b> Placa de tilosina.....	62
<b>ANEXO. 108</b> Placa de enrofloxacin.....	63
<b>ANEXO. 109</b> Placa de enrofloxacin.....	63
<b>ANEXO. 110.</b> Pesos de las pechugas en el mercado América.....	63
<b>ANEXO. 111.</b> Pesos de las pechugas en el mercado Modelo.....	64
<b>ANEXO. 112.</b> Pesos de las muestras para el análisis elisa.....	64
<b>ANEXO. 113.</b> Resultados del análisis elisa.....	66
<b>ANEXO. 114.</b> Análisis de la varianza (MO).....	73
<b>ANEXO. 115.</b> Análisis de la varianza (AM).....	74
<b>ANEXO. 116.</b> Registro de muestras para análisis elisa (ENROFLOXACINA).....	75
<b>ANEXO. 117.</b> Registro de muestras para análisis elisa (TILOSINA).....	76
<b>ANEXO. 118.</b> Registro de muestras para análisis elisa (SULFONAMIDE).....	77

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue analizar la presencia de residuos de antibióticos (sulfonamida, enrofloxacin y tilosina) en pechuga de pollos comercializados en los mercados Modelo y América en la ciudad de Ambato. Se realizó un muestreo estratificado proporcionado considerando cada mercado como un estrato y dentro de este se realizó un estudio simple al azar por medio de sorteo. Del mercado Modelo se tomaron 26 muestras y del mercado América se tomaron 27 muestras. Con un total de 53 muestras. El análisis de las muestras se realizó a través de ELISA. En el mercado Modelo existen residuos del antibiótico sulfonamida en 9 locales expendedores de carne de pollo con un promedio total de (4,16 ug/kg) y en 2 locales se obtuvieron residuos de enrofloxacin (15,11 ug/kg). En el mercado América se encontraron residuos del antibiótico sulfonamida en 13 locales con un promedio total de (15.57 ug/kg) y en cinco locales se detectaron residuos de enrofloxacin (14,18 ug/kg). No se detectó el antibiótico tilosina en ninguno de los dos mercados analizados. Se concluye que existen residuos de antibióticos sulfonamida y enrofloxacin en la carne de pollo pero los valores no superan los 100 ug/kg establecidos por las normas del Codex Alimentarius (2015) y la Comisión Europea (2010).

**Palabras claves:** antibióticos, ELISA, mercados, pechuga de pollo, Codex Alimentarius.

## SUMMARY

The objective of this research was to analyze the presence of residues of antibiotics (sulfonamide, enrofloxacin and tylosin) in chicken breast marketed in Modelo and América markets in the city of Ambato. A stratified sampling was performed considering each market as a stratum and within this a simple randomized study was carried out by drawing lots. Of the Model market, 26 samples were taken and 27 samples were taken from the American market. With a total of 53 samples. Samples were analyzed by ELISA. In the Model market there are residues of the antibiotic sulphonamide in 9 chicken meat retailers with a total average of (4.16 ug / kg) and 2 residues of enrofloxacin (15.11 ug / kg) were obtained. In the Americas market, residues of the antibiotic sulphonamide were found in 13 premises with a total average of 15.57 ug / kg and in five sites residues of enrofloxacin (14.18 ug / kg) were detected. The antibiotic tylosin was not detected in any of the two analyzed markets. It is concluded that residues of antibiotics sulfonamide and enrofloxacin exist in chicken meat but values do not exceed 100 ug / kg established by Codex Alimentarius (2015) and European Commission (2010) standards.

**Key words:** antibiotics, ELISA, markets, chicken breast, Codex Alimentarius.

# **CAPÍTULO I.**

## **INTRODUCCIÓN.**

Los antibióticos se han convertido en una parte integral de la industria avícola a menudo son utilizados para diversos objetivos como el tratamiento y prevención de enfermedades, así como aumentar la eficiencia en la alimentación actuando como promotores de crecimiento y disminuyendo pérdidas económicas para los productores (Attari, et al., 2014). En los últimos años el sector agroalimentario en todo el mundo se ha enfrentado a la diseminación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los que intervienen residuos de medicamentos veterinarios; lo cual pone de manifiesto el manejo indebido de los fármacos durante las prácticas agropecuarias y el incumplimiento de los tiempos de retiro de los medicamentos (Moquillaza, 2012).

Por lo cual la producción avícola busca alternativas para mejorar la calidad de la carne disminuyendo la presencia de contaminantes que alteren la misma, un factor importante es la detección de residuos de antibióticos los cuales ha recibido una enorme atención a nivel mundial de agencias reguladoras y salud pública (Attari, et al., 2014), existe un alto índice de toxicidad directa en los seres humanos siendo una amenaza alarmante (Nisha, 2008) causando diversos efectos en la salud humana, como la aparición de episodios de hipersensibilidad, reacciones alérgicas, mutagenicidad y cambios en la microbiota intestinal normal (Panzenhagen, et al., 2016).

Toda esta problemática, sumada a la necesidad de preservar la salud pública, llevó a las autoridades sanitarias a establecer límites máximos permisibles de residuos sugeridos en los diferentes tejidos de las especies de animales que sirven para el consumo humano (LMRs) por el (Codex Alimentarius del 2015 y la Comisión Europea del 2010), cuyo estándar pretende establecer niveles de tolerancia para la seguridad alimentaria, sin embargo para cumplir con los tiempos de entrega del producto no existe un cumplimiento de las normas establecidas. Los sectores



humano, animal y vegetal tienen la responsabilidad compartida de prevenir o minimizar las presiones de selección de resistencia antimicrobiana tanto en patógenos humanos como no humanos (Panzenhagen, et al., 2016).

En los animales productores de alimentos, los residuos deplecionan con velocidades muy variadas dependiendo de muchos factores tales como la naturaleza del compuesto, su formulación, vía de administración y especies de animales tratados (Mestorino, 2009). En el caso de la enrofloxacin el tiempo de retiro recomendado son de 5 a 7 días, la cual es una quinolona que tiene una amplia actividad antibacteriana tanto para Gram positivos y negativos (Panzenhagen, et al., 2016), y es comúnmente utilizada en la producción avícola, en relación a la sulfonamida los tiempos de retiro son variables de 4 a 15 días y juega un importante rol en la terapéutica de enfermedades bacterianas y protozoarias en medicina veterinaria (Mestorino, 2009).

El análisis de residuos de medicamentos veterinarios en productos de origen animal se ha venido desarrollado intensamente en los últimos años y representa una nueva tendencia desde el punto de vista de inocuidad alimentaria (Panzenhagen, et al., 2016), hay distintas técnicas disponibles para el screening o barrido rápido de muestras pero en los últimos años las técnicas basadas en inmunoafinidad, como los test ELISA han sido ampliamente usados para este tipo de análisis debido a que son fáciles de usar, sensibles, rápidos y permiten analizar un gran número de muestras de forma simultánea (Riera, 2010). Bajo este contexto el objetivo de la presente investigación fue realizar un análisis de residuos de antibióticos en pechuga de pollos comercializados en la ciudad de Ambato.

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.**

De acuerdo a lo publicado por Rodríguez en el año 2003, la carne de pollo es la más consumida dentro de nuestro país. Su precio económico, una composición nutricional óptima y unas características organolépticas ideales para todas las edades, favorecen y aumentan su consumo. Por lo tanto no la exime de riesgos, sobre todo químico y microbiológico, debido al sistema de producción intensivo que se emplea en la mayoría de los galpones. Sin embargo, son controlables con gran facilidad. El consumidor asocia mayoritariamente la carne de pollo a dos características principales que definen su comportamiento en el momento de la compra: su bajo precio y una imagen de seguridad generalmente alta. Presenta un precio relativamente económico en comparación con otras carnes, debido a la práctica de una producción intensiva e integrada en la que las aves se encuentran en galpones cerrados donde se simulan las mejores condiciones de crecimiento y se alimentan con piensos controlados. La imagen de seguridad viene dada por el bajo número de infecciones alimentarias asociadas a la carne de pollo. Esta imagen fue máxima coincidiendo con la crisis de las vacas locas. La posterior disminución del consumo de carne de bovino incrementó la demanda de proteína animal cárnica dirigida hacia el cerdo y el pollo, para luego direccionarse hacia el pollo con la aparición de los brotes de fiebre aftosa y peste porcina. A pesar de las características favorables, la carne de pollo, como producto perecedero que es, posee diversos peligros que han de ser controlados, sobre todo los de origen microbiológico. Es por ello que resulta indispensable la aplicación de medidas preventivas y de control a todos los niveles, desde la producción hasta la preparación y consumo por parte de los consumidores. (Rodríguez, 2003).

Según la publicación “Los principales antibióticos recomendados para pollo de engorde (broiler)”, en los centros agropecuarios del municipio de Pasto,

departamento de Nariño, Colombia según comentan Martínez, Benavides, Córdoba y Ortiz, solo el 37,65 % de los almacenes agropecuarios tiene personal capacitado para desempeñar la labor de prescribir medicamentos veterinarios. Los medicamentos más recomendados en los almacenes agropecuarios son los antibióticos (52,94 %), dentro de los cuales se destacan las quinolonas (39,98 %), seguidas del grupo inmunológico o vacunas (18,82 %), principalmente la vacuna de Newcastle cepa B1 Hitchner (8,24 %), el grupo de vitaminas (14,11 %), los antiparasitarios (12,94 %) y el grupo de los mucorreguladores (1,17 %). Las conclusiones a las que llegaron es que la mayoría de los almacenes agropecuarios no cuenta con personal capacitado para la formulación o prescripción de medicamentos. El 51 % de estos medicamentos se maneja fuera del rango terapéutico (sobredosis o subdosis). El uso terapéutico más recomendado es para el tratamiento de enfermedades respiratorias y digestivas, y la vía de administración oral es la más común sin realizar ningún tipo de advertencia ni precaución (Martinez, Benavides, Cordova, & Ortiz, 2014).

En la presente investigación se analizó la eficacia de un kit de prueba de enrofloxacin ELISA para detectar la presencia de residuos de enrofloxacin en tejidos de pollos de engorde en comparación con LC-MS / MS. Se obtuvieron tejidos de broiler de 72 muestras de 60 músculos de pechuga, seis grupos de hígados (500 g cada uno) y seis grupos de riñones (500 g cada uno) de seis mataderos diferentes. En cada matadero se recolectaron músculos de pechuga de 10 cadáveres y charcas de hígados y riñones de aproximadamente 200 cadáveres de la misma manada. ELISA y HPLC se utilizaron para identificar y cuantificar la contaminación de las muestras con enrofloxacin. Un total de 72% de las muestras analizadas contenían residuos de enrofloxacin detectados por ELISA y 22,2% por LC-MS / MS. Los valores medios de contaminación por enrofloxacin encontrados en la pechuga de pollo por ELISA y HPLC fueron de 8,63 y 12,25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Ninguna de las muestras superó el límite máximo de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  según ambos métodos establecidos por la Unión Europea y el Ministerio de Agricultura de Brasil. Todas las muestras positivas para los residuos de enrofloxacin detectados por LC-MS / MS fueron también positivas por ELISA. Estos datos confirman la eficacia de la prueba ELISA y sugieren su uso como método de detección de residuos de enrofloxacin en tejidos

avícolas debido a sus rápidos resultados, bajo precio y facilidad de aplicación (Panzenhagen, et al. 2016).

Esta investigación tuvo como objetivo determinar las cantidades residuales de cloranfenicol y enrofloxacin en pollos de engorde, músculo y muestras de hígado recogidas en los mercados locales de la ciudad de Tabriz, al noroeste de Irán. Se recolectaron 90 cadáveres de pollos de engorde de diferentes mercados locales de Tabriz durante julio / agosto de 2013. Se recolectaron muestras aleatorias de muslo y músculo de pechuga y de hígado y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis. A continuación, las muestras se ensayaron usando un ensayo inmunoabsorbente (ELISA) de acuerdo con el protocolo de cada kit de antibióticos. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el programa informático SAS 9.1. Ochenta y dos muestras (91/1%) contenían residuos de enrofloxacin, aunque la concentración media ( $\pm$  DE) de enrofloxacin fue menor que el valor máximo de los límites máximos de residuos (LMR) de la Unión Europea ( $P < 0,001$ ). Por otra parte, 28 (31/1%) tuvieron concentraciones detectables de cloranfenicol, mientras que no se definió ningún valor de LMR para el cloranfenicol porque su uso ha sido prohibido en los animales alimentarios. La frecuencia de contaminación con enrofloxacin fue considerable para las muestras analizadas. Además, la presencia de cloranfenicol en casi un tercio de las muestras parece ser una amenaza para la salud pública debido a su uso ilegal en animales de consumo, incluidas las aves de corral (Attari, et al., 2014).

Molero, Pérez, Sánchez y Serrano. (2006), manifiestan en su investigación realizada para determinar la presencia de residuos de enrofloxacin en los tejidos (músculos e hígado) de pollos beneficiados en cuatro plantas ubicadas en el Municipio San Francisco del estado Zulia, Venezuela, se tomó un pollo directamente de los expendios ubicados en cada planta durante cinco días consecutivos, dando un total de 20 pollos. El análisis de las muestras se realizó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La presencia de enrofloxacin se encontró por encima de los límites máximos de residuos sugeridos por la Agencia de Alimentos y Medicamentos o Agencia de Drogas y Alimentos con sus siglas en inglés Food and Drug Administration (FDA), Codex Alimentario y la Agencia Europea de evaluación de

medicamentos (EMA), al alcanzar los siguientes resultados; 3,5 mg/kg en muslo, 3,81 mg/kg en pechuga y 3,62 mg/kg en hígado (Molero, et al., 2006).

Kadim et al, (2010), señalan que en su investigación realizada en Sultanato de Omán; la administración de antibióticos u hormonas para pollos de engorde con fines terapéuticos y para mejorar el rendimiento puede dar lugar a depósito de residuos en sus cuerpos. Esto podría ser un peligro potencial para la salud humana, la exposición a estos residuos. El objetivo de este estudio fue detectar los niveles de residuos de tetraciclina, estreptomicina, sulfametazina, cloranfenicol, trenbolon, estradiol-17, y la testosterona en la carne de pollo que se comercializan en el Sultanato de Omán. El inmunoabsorbente ligado a enzimas técnicas de análisis para la detección de residuos en 128 músculos de la pechuga de pollo de engorde, en representación de varias empresas procesadoras de aves de corral procedentes de seis países que representan a cuatro continentes. En general, las muestras contenían niveles diferentes de residuos de diferentes antibióticos y hormonas. Los niveles de tetraciclina osciló entre 35 y 56 ug/kg (media 45,9), estreptomicina osciló entre 30 y 155 ug/kg (media de 100,0), los niveles de sulfametazina osciló entre 0,079 y 5,60 ug/kg (media 1,07); trenbolon osciló entre 0,70 y 3,12 ug/kg (media 1,67); 17-B estradiol varió desde 0,06 hasta 2,00 ug/kg (media 0,70); cloranfenicol varió desde 5,00 hasta 74,00 ug/kg (media 14,38), y la testosterona fue de 4 a 70 ug/kg (media 25,53). No hubo diferencias significativas entre los niveles de residuos de antibióticos y hormonas, ni entre las empresas y los países. Tampoco hubo diferencias significativas en los residuos de antibióticos y agentes anabólicos, con la excepción de trenbolon entre los continentes. Este estudio indicó que la carne de pollo para asarla, presenta distintos niveles de residuos de varios agentes antibióticos y anabolizantes. Aunque los niveles de algunos de estos residuos no superan los límites máximos permitidos, aún no se sabe si constituyen un peligro para la salud humana (Kadim et al, 2010).

La presencia de residuos de tetraciclinas en la carne de pollo puede representar una ingesta constante de dosis subterapéuticas para las personas que la consumen. El principal problema asociado con una ingesta de dosis subterapéuticas de un antibiótico es la aparición de cepas bacterianas resistentes al antibiótico en cuestión. Una bacteria se hace resistente a agentes antimicrobianos cuando se ve expuesta en

dosis tan bajas, que algunas de ellas no mueren y desafían diversos mecanismos de resistencias. Estas adaptaciones permiten a las bacterias resistentes sobrevivir a un tratamiento posterior con el antibiótico e incluso, a otras drogas a las que no ha sido expuesta. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de oxitetraciclina y clortetraciclina en pechugas de pollo provenientes de una de las principales granjas avícolas que surten a expendios de la Ciudad de Guatemala. Para el efecto se desarrolló un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de fase reversa y detección ultravioleta. Este método fue una adaptación de los descritos por Y Onji y col. y por D. Fletouris y col. 12,31, e incluye una efracción con HCl y cromatografía de adsorción con Amberlita WAD-2 previo al análisis por HPLC. Tres de las 30 muestras analizadas presentaron residuos de tetraciclinas; estando presente en todas ellas la oxitetraciclina (0.067 - 0.567 ppm) y en una la clortetraciclina (3.7 ppm). Las tres muestras presentaron contenidos mayores a los Niveles Máximos de Residuos aceptables para consumo humano (< 0.25 ppm) establecidos por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) (Ramírez & Velásquez, 2012).

Dentro de esta investigación las 5 familias de antibióticos (sulfonamidas, estreptomina, tetraciclinas, eritromicina, penicilina) que se determinaron por Moreno, Bermúdez, García, Languré, Flores y Orantes. (2002) la que se encontró con mayor frecuencia fue la de las sulfonamidas, la cual se detectó en las tres especies estudiadas, con porcentajes de frecuencia de 7,3, 7,3 y 10,6% para bovino, aves y porcino, respectivamente. Esto puede deberse tanto a su amplio uso, como al alto poder residual de las mismas. Las concentraciones promedio más altas de antibióticos se detectaron para estreptomina (0,13-0,56 µg/g), seguida por tetraciclinas (0,12-0,16 µg/g) y sulfonamidas (0,02-0,09 µg/g). La eritromicina estuvo presente en una de las muestras de riñón, penicilina se detectó en los 3 tejidos de una muestra de bovino. Al comparar los niveles de antibióticos detectados en las muestras con los límites máximos de residuos permitidos en los tejidos comestibles (hígado, riñón y músculo) de bovino, que establecen 0,5 µg/g para estreptomina, 0,25 µg/g para tetraciclina, 0,1 µg/g para sulfonamidas y eritromicina y 0,04 µg/g para penicilina. Se puede señalar que para el caso de cloranfenicol se presentaron valores fuera de la norma en 4 muestras de músculo, 2 de riñón y 1 de hígado, y esto

fue debido a que para dicho antibiótico se tiene establecido un valor de cero, por lo que cualquier nivel detectado se encuentra fuera de la normatividad. En base a los resultados obtenidos, se puede señalar que es amplio el uso que se hace de estos compuestos en la producción ganadera y avícola de la región noroeste del país de México. Ha cambiado favorablemente en las prácticas de uso de los antimicrobianos en las industrias ganadera y avícola (Moreno, y otros, 2002).

En el presente estudio, siguiendo la recomendación de las medidas de control del Consejo de las Comunidades Europeas, realizó Azañero y Limaymanta. (2010) un muestreo de carne de pollo en cuatro zonas comerciales: Mercado Central, Supermercado Metro, Mercado Eco, Mercado La Aurora en Lima cercado, donde se tomaron cinco muestras de cada mercado, teniendo un total de veinte muestras. La metodología empleada para detectar la presencia o ausencia de residuos de antibióticos tuvo como referencia el método microbiológico de difusión de las cuatro placas, para luego cuantificarlos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados obtenidos por ensayo microbiológico fueron positivos ya que se obtuvo halos de inhibición en al menos una de las placas ensayadas de cada muestra de 2mm de ancho. Por el método cuantitativo por HPLC se obtuvieron resultados que sobrepasan el Límite Máximo de Residuos (LMR) para sulfametoxazol en 75% de las muestras (mayor a 100ug/Kg de músculo), para norfloxacin en 100% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo) y para ciprofloxacino en 50% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo) (Azañero & Limaymanta, 2010).

Cota, Hurtado, Pérez y Alcántara. (2014). Manifiestan que se encontró un mayor número de cepas bacterianas aisladas de aves que fueron resistentes a diversos antibióticos, siendo en el pollo la mayor incidencia de estas, como se muestra en el 60% de los estudios analizados. En lo que respecta a la multiresistencia, las especies de *Salmonella* aisladas mostraron mayor prevalencia como se observa en el 70% de los estudios de esta revisión. Los betaláctamicos y las quinolonas fueron los antibióticos a los cuales las cepas bacterianas aisladas presentaron la mayor frecuencia de resistencia, siendo la ampicilina uno de los antibióticos presentes en ocho estudios y el ácido nalidíxico en seis respectivamente. Como se ha

documentado en este estudio, el uso rutinario de los antibióticos en el alimento de animales destinados para el consumo humano ha contribuido a incrementar la generación de bacterias resistentes lo que conlleva a un problema mayor de salud pública. Esta situación crea la necesidad de implementar estrategias relacionadas a la inocuidad de los alimentos y al uso racional de los fármacos en la producción pecuaria como lo recomienda la Norma Oficial (NOM-004-ZOO-1994), ya que en México el uso de estos medicamentos en la industria veterinaria no se está llevando a cabo como lo marcan las autoridades correspondientes. Los expertos coinciden en que es necesario mejorar la vigilancia, utilizar otras medidas como mejores vacunas, medios de diagnóstico y medidas de control de infecciones y así prevenir y controlar la resistencia a los antibióticos (Cota, et al., 2014).

No debe permitirse el uso de antibióticos que puedan resultar en la deposición de residuos en la carne, la leche y los huevos en los alimentos destinados al consumo humano. Si el uso de antibióticos es necesario, como en la prevención y el tratamiento de enfermedades animales, debe observarse un período de retención hasta que los residuos sean insignificantes o ya no se detecten. El uso de antibióticos para lograr un mejor rendimiento en el crecimiento y la eficiencia de la alimentación, para sincronizar o controlar el ciclo reproductivo y el rendimiento reproductivo también suelen conducir a efectos residuales nocivos. La preocupación por los residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal se produce en dos ocasiones; Uno que produce una amenaza potencial para la toxicidad directa en seres humanos, en segundo lugar es si los bajos niveles de exposición a los antibióticos resultarían en la alteración de la microflora, causar la enfermedad y el posible desarrollo de cepas resistentes que causan el fracaso de la terapia antibiótica en situaciones clínicas. Se establece un período de espera para proteger a los seres humanos de la exposición de los alimentos añadidos con antibióticos. Se impone una gran responsabilidad al veterinario y al productor de ganado para observar el período de retirada de un medicamento antes del sacrificio para asegurar que no se produzca concentración ilegal de residuos de drogas en la carne, la leche y el huevo (Nisha, 2008).



La seguridad alimentaria está relacionada con el uso de fármacos y sus residuos, ejemplo de ellos, son las sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol, que se han encontrado en diferentes animales de abasto. En esta revisión, se incluyen diversas técnicas para el análisis. Dentro de las técnicas existentes hoy en día se destacan el empleo de biosensores por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual permite manejar gran número de muestras debido a su bajo costo y facilidad operativa, siendo un ensayo rápido para la evaluación cualitativa y presuntiva de los antibióticos en los alimentos de origen animal. Aunque su especificidad y sensibilidad depende del antibiótico a analizar, siempre se tendrá que utilizar métodos de confirmación los cuales permiten obtener información adicional para la cuantificación e identificación inequívoca del analito. Como técnicas de confirmación se utilizan, generalmente, cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por ello, es pertinente evaluar los factores que limitan sus costos de implementación (equipamiento, capacitación técnica, infraestructura de laboratorios, costo por análisis, tiempo entre la recolección y el resultado); destacando la dificultad de analizar grandes volúmenes de muestras en tiempos reducidos, indispensable para llevar a cabo programas de vigilancia y control efectivos, o el requerimiento de tratamientos de muestra laboriosos y equipos costosos, por lo que es necesario desarrollar nuevos métodos simples y rápidos (Talero, Medina, & Núñez, 2014).

## **2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL.**

### **2.2.1. ANTIBIÓTICOS.**

#### **➤ GENERALIDADES.**

Son compuestos químicos que producidos por microorganismos, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar a la bacteria u otros microorganismos. Vemos, por lo tanto, que esta definición distingue entre compuestos químicos producidos por microorganismos y compuestos antimicrobianos obtenidos por síntesis (por ejemplo, sulfamidas, trimetoprim). Esta distinción, no obstante, es más bien académica, y uno

encuentra que la palabra antibiótico, a menudo se usa actualmente para incluir ambos grupos de agentes antimicrobianos. El triángulo terapéutico como complejo plurifactorial que describe la terapéutica antibiótica abarca a hospedador, bacteria y antibiótico elegido. El concepto central de la acción antibiótica es la toxicidad selectiva, esto es, inhibición selectiva o destrucción del crecimiento del microorganismo patógeno, sin alterar a las células del hospedador. El antibiótico ideal no debería tener ningún efecto indeseable sobre el paciente, sólo debería ser letal para el microorganismo patógeno (Ramón, 2007).

➤ **TILOSINA.**

La Tilosina es un antibiótico macrólido que es esencialmente activo contra las bacterias Gram-positivas y mycoplasmas. Es también activo contra algunas bacterias Gram-negativas, espiroquetas, algunas rickettsia y clamidia. En las dosis habituales recomendadas, la tilosina actúa bacteriostáticamente. Inhibe la síntesis de la proteína de microorganismos sensibles mediante la unión a las sub unidades del ribosoma 50-S mediante la inhibición la etapa de translocación. La mayoría de las cepas de mycoplasmas de aves de corral son altamente susceptibles a la tilosina (EFARVET, 2012-2017).

➤ **ENROFLOXACINA.**

La Enrofloxacin es un quimioterápico con potente acción bactericida mediante el bloqueo de la ADN-girasa, una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al ADN, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo. La posología recomendada en aves es a una dosis de 10 a 20 mg/kg p.v. vía oral en el agua de bebida. Normalmente son suficientes 3 días de tratamiento. En caso de salmonelosis prolongar el mismo 2 días más. Se absorbe principalmente en el intestino delgado y las concentraciones séricas máximas se encuentran entre los 30 y 60 minutos posteriores a la administración. La vida media sérica posterior a una aplicación oral es de 3 a 4 horas (Molero, et al., 2006).

➤ **SULFONAMIDA.**

Es un antibacteriano de amplio espectro con efecto bacteriostático, evitando la muerte bacteriana inmediata y la consecuente liberación de sus endotoxinas. Previene la utilización bacteriana normal del PABA (ácido para-aminobenzóico) para la síntesis de ácido fólico; es un inhibidor competitivo de la enzima bacteriana responsable de la incorporación del PABA al ácido dihidropterico, el precursor inmediato del ácido fólico (Moreno, y otros, 2002).

**2.2.2. RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS.**

➤ **GENERALIDADES.**

Incluyen los compuestos de origen y/o sus metabolitos, presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como los residuos de impurezas relacionadas con el medicamento veterinario correspondiente (Rospigliosi, 2012).

➤ **RESIDUO INDICADOR.**

Residuos cuya concentración disminuye en una relación conocida con el nivel de residuos totales en los tejidos, huevos, leche u otros tejidos animales. Deberá contarse con un método de análisis cuantitativo específico para medir la concentración del residuo con la precisión requerida (Rospigliosi, 2012).

➤ **LÍMITE MÁXIMO PARA RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS (LMR).**

Concentración máxima de residuos, resultante del uso de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o ug/kg sobre el peso), que se permita legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo. Se basa en el tipo y la cantidad de residuos considerados como carentes de todo riesgo toxicológico para la salud humana. Cuando se establece un LMR también se tiene en

cuenta los residuos presentes en los alimentos de origen vegetal y/o en el medio ambiente (Rospigliosi, 2012).

**TABLA 1. Límites Máximos de Residuos de Antibióticos.**

<b>Límites Máximos de Residuos de Antibióticos</b>		
<b>Antibióticos</b>	<b>Producto</b>	<b>LMR (ug/kg)</b>
Enrofloxacina	Músculo	100
Tilosina	Músculo	100
Sulfonamida	Músculo	100

*Fuente:* (CODEX ALIMENTARIUS , 2015).

*Fuente:* (Comisión Europea, 2010).

#### ➤ **TIEMPO DE SUSPENSIÓN Y TIEMPO DE RETENCIÓN.**

Es el período que transcurre entre la última administración de un medicamento y la recolección de tejidos comestibles o productos provenientes de un animal tratado, que asegura que el contenido de residuos en los alimentos se ajusta el límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (Rospigliosi, 2012).

#### **2.2.3. INGESTIÓN DIARIA ADMISIBLE (IDA).**

##### ➤ **GENERALIDADES.**

Es la estimación realizada por el comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA) de la cantidad de un medicamento veterinario, expresada sobre la base del peso del cuerpo, que puede ser ingerida diariamente durante la vida sin presentar un riesgo apreciable para la salud (peso humano promedio: 60kg) (Rospigliosi, 2012).

➤ **TEJIDO DIANA.**

Es el tipo de tejido pertinente a obtener del animal de la especie, tratado con el medicamento veterinario, para determinar la naturaleza y los niveles de sus residuos a verificar para el cumplimiento de los límites máximos del medicamento, según el uso previo de los mismos (Rospigliosi, 2012).

➤ **CARNE DE POLLO.**

La carne de pollo es una de las más consumidas en nuestro país y en los de nuestro entorno. Su bajo precio, una composición nutricional proteica adecuada y unas características organolépticas aceptables para todas las edades, favorecen su consumo. Ello no la exime de riesgos, sobre todo químico y microbiológico, debidos al sistema de producción intensivo que se emplea. Todos ellos, sin embargo, son controlables con relativa facilidad. El consumidor asocia mayoritariamente la carne de pollo a dos características fundamentales que definen su comportamiento en la cesta de la compra: su bajo precio y una imagen de seguridad generalmente alta (Rodríguez, 2003).

#### **2.2.4. ENSAYOS ELISA.**

➤ **GENERALIDADES.**

Hay distintas técnicas disponibles para el screening o barrido rápido de muestras pero en los últimos años las técnicas basadas en inmunoafinidad, como los test ELISA que consisten en ensayos con inmunosorbentes ligados a una enzima (“enzyme linked immunosorbent assay”) han sido ampliamente usados para este tipo de análisis inicial debido a que son fáciles de usar, sensibles, rápidos y permiten analizar gran número de muestras de forma simultánea. Los límites de detección dependerán de la extracción y limpieza que se le haga a la muestra. Dependiendo de la matriz a analizar, la preparación de la muestra consta desde una simple dilución con tampón, en el caso más sencillo, hasta una hidrólisis enzimática y una extracción

en fase sólida (SPE). Los métodos inmunológicos son específicos para cada tipo de analito, están basados en una reacción antígeno-anticuerpo. En los últimos años se han desarrollado un gran número de inmunoensayos para la detección de residuos en alimentos (Riera, 2010).

➤ **KIT DE FORMATO ELISA PARA ENROFLOXACINA.**

Este kit proporciona una extracción única de enrofloxacin de pienso, miel, carne, leche, tejido, suero y orina. Ofrece una mayor flexibilidad con un protocolo de preparación de muestra rápido y orgánico. El método rápido es más rápido y no emplea reactivos orgánicos, mientras que el método orgánico es más lento pero ofrece mayor sensibilidad. Rápido - Resultados en menos de 2 horas independientemente del número de muestras. Alta reproducibilidad y alta recuperación (75 - 95%) (Bioo Scientific , 2015).

➤ **KIT DE FORMATO ELISA PARA SULFONAMIDAS.**

Es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de sulfonamida en pescado, camarón, miel, riñón, hígado, carne (carne, pollo y cerdo), leche, leche en polvo, suero, orina y agua. Las sulfonamidas son ampliamente utilizadas como aditivos para piensos de engorde de terneros y cerdos. Las sulfonamidas también se usan en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones intestinales, mastitis y otras enfermedades. Por lo tanto, pueden producirse residuos de sulfonamida en los alimentos de origen animal. Según la legislación de la administración de medicamentos y alimentos (Food and Drug Administration: FDA) y la UE, el límite máximo de residuos para todas las sustancias Del grupo sulfonamida son 100 partes por billón (ppb) en músculo, grasa, hígado y riñón, y 100 partes por billón (ppb) en leche. Aunque los métodos físico-químicos como la cromatografía líquida de alta presión son ampliamente utilizados para la detección de sulfonamidas, su aplicación para la rutina El cribado de numerosas muestras está limitado por el coste y la instrumentación.

Alternativamente, los inmunoensayos enzimáticos (ELISA) muestran considerables ventajas Sobre los métodos convencionales. El Kit de Prueba de ELISA de Sulfonamida permite a las agencias reguladoras internacionales, fabricantes de alimentos y procesadores y las organizaciones de control de calidad, para detectar la sulfonamida por debajo del límite máximo de residuos en varios tipos de muestras en respuesta a las preocupaciones del cliente sobre la seguridad alimentaria. Alta sensibilidad, alta recuperación (> 80%), resultados más rápidos: menos de 2 horas desde la muestra hasta los resultados y resultados consistentes y reproducibles (Bioo Scientific , 2015).

➤ **KIT DE FORMATO ELISA PARA TILOSINA.**

Es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de tilosina en miel, carne, hígado, riñón, leche y orina. Este kit ofrece una mayor flexibilidad con un protocolo de preparación de muestra rápido y orgánico. El Método Rápido es más rápido y no emplea reactivos orgánicos, mientras que el Método Orgánico es más lento pero ofrece mayor sensibilidad. Rápido (10 - 40 minutos), método de extracción rentable ofrece altas tasas de recuperación de > 80%. Detección de tilosina sensible - límite de detección de 1 partes por billón (ppb) (Bioo Scientific , 2015).

## **CAPITULO III**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

Existen residuos de antibióticos en la carne de pollos faenados expendidos en los principales mercados de la ciudad de Ambato que superan el límite máximo permitido por el sistema de salud Codex Alimentarius (2015) y la Comisión Europea (2010).

#### **3.2. OBJETIVOS**

##### **3.2.1. Objetivo General.**

Analizar la presencia de residuos de antibióticos en pechuga de pollos comercializados en la ciudad de Ambato.

##### **3.2.2. Objetivo específico.**

- Determinar los niveles de residuos de enrofloxacin, sulfonamidas y tilosina (ug/kg) en carne de pollos faenados comercializados en los mercados Modelo y América.
  
- Comparar los resultados obtenidos con las normas de salud alimentaria (Codex Alimentarius del año 2015 y la Comisión Europea del año 2010).



## **CAPÍTULO IV**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO**

La presente investigación se realizó en los mercados América y Modelo del cantón Ambato, ubicada a 78°; 37' 11''; de longitud con relación al Meridiano de Greenwich y a 1° 13' 28'' de latitud sur con relación a la Línea Equinoccial, a 2 567 msnm (Merkel, 2016).

#### **4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR**

El clima es cálido y templado, con precipitaciones durante todo el año. La temperatura media anual es de 14.6 °C y las precipitaciones son alrededor de 504 mm (Merkel, 2016).

#### **4.3. EQUIPOS Y MATERIALES**

##### **4.3.1. MATERIALES**

- Muestras del músculo pectoral torácico (pechuga) de pollos.
- Caja de guantes de manejo N.- 6.5.
- Mascarilla industrial.
- Mandil.
- Filipino.
- Bolsas para empacar (ziploc).
- Fundas de plástico pequeñas.
- Tabla para picar.
- Cuchillo.
- Cooler para el transporte de las muestras.
- Pipetas de 10-20-100-1000 uL.
- Pipeta multicanal: 50-300 uL.
- Vasos de precipitación de 100,500 y 1000 ml.
- Balones de vidrio.

- Kits de diagnóstico en formato ELISA para la detección y cuantificación de enrofloxacin, sulfonamidas y tilosina.
- *Suministros de oficina*
  - Hojas.
  - Computadora portátil.
  - Impresora.
  - Marcador permanente.
  - Cinta adhesiva.

#### **4.3.2 EQUIPOS**

- Homogeneizador de tejidos.
- Congelador.
- Equipo ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- Evaporador giratorio.
- Gas nitrógeno.
- Mezclador Vortex.
- Centrifuga.

#### **4.4.3 REACTIVOS**

- N-hexano.
- Metano.
- Acetato de Etilo.

#### **4.5. FACTORES EN ESTUDIO**

Residuos de antibióticos: enrofloxacin, sulfonamidas y tilosina en el músculo pectoral torácico de pollos de los mercados Modelo y América.

#### **4.6. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Se elaboró un análisis de los centros de expendio de carne de pollo faenados en los mercados de la ciudad de Ambato; los cuales se detallan en la tabla dos:

**Tabla 2.** Mercados que expenden carne de pollo.

<b>MERCADOS</b>	<b>CENTROS DE EXPENDIO</b>
<b>MODELO</b>	<b>14</b>
CENTRAL	6
URBINA	7
SUR	5
<b>AMERICA</b>	<b>30</b>
MAYORISTA	10
SIMÓN BOLIVAR	8
COLÓN	8
PRIMERO DE MAYO	5
LA DOLOROSA	9
PACAHANO	2
SANTA CLARA	1

Al analizar la información de la tabla dos se desprende que el Mercado modelo y el Mercado América tienen mayor número de locales; a los cuales se realizó un muestreo estratificado según la fórmula propuesta por (Ferreira, 1996). Se consideró a cada mercado como un estrato y dentro de cada estrato se realizó un muestreo simple al azar.

#### **4.6.1. CÁLCULO DE LA MUESTRA**

El tamaño muestral se determinó mediante la fórmula propuesta por (Ferreira, 1996).

$$n = \frac{Z^2 * P * Q * N}{Z^2 * p * Q + N * e^2}$$

En donde:

- n= Tamaño de la muestra
- Z= nivel de confiabilidad 95% -----  $0,95/2= 0,4750$ ----- Z= 1,96
- P= Probabilidad de ocurrencia (0,5)

- Q= Probabilidad de no ocurrencia (1-0,5)= 0,5
- N= Población
- e= Error de muestreo 5% (0,05)

$$n = \frac{(1.96)^2 * (0.5) * (0.5) * 44}{(1.96)^2 * (0.5) * (0.5) + 44 * (0,05)^2}$$

$$n = \frac{42,2576}{0.9604 + 0.11}$$

$$n = \frac{42.2576}{1,0704}$$

$$n = 40 \text{ Locales.}$$

➤ **Fracción Muestral (Fm):**

$$Fm = \frac{n}{N}$$

En donde:

- n= Tamaño de la muestra.
- N= Población.

$$Fm = \frac{40}{44}$$

$$Fm = 0.9$$

➤ **Número de puestos**

$$14 * 0.9 = 13$$

$$30 * 0.9 = 27$$

➤ **Muestreo Aleatorio Estratificado Proporcional**

<b>MERCADOS</b>	<b>NÚMERO DE PUESTOS</b>
A. Modelo:	(14)
B. América:	(30)
<b>Total:</b>	<b>44</b>

**Tabla 3.** Muestreo Estratificado.

<u>ESTRATO</u>	<u>LOCALES</u>	<u>Número de locales a muestrearse</u>	<u>Número de muestras a tomarse en cada local</u>
A	14	13	26
B	30	27	27
TOTAL	44		53

**Número de pocillos: 59**

**Número de mercados: 2**

$$59 / 2 = \underline{30}$$

***Número de muestras a tomarse en cada local de cada mercado***

$$30 / 13 = 2,3 \quad 26 \text{ muestras en total} \quad (\text{Mercado Modelo})$$

$$30 / 27 = 1,1 \quad 27 \text{ muestras en total} \quad (\text{Mercado América})$$

Del mercado Modelo se tomaron dos muestras de cada local dando un total de 26 muestras, del mercado América se tomaron una muestra de cada local dando un total de 27 muestras. Con un total general de 53 muestras pero como en la placa podemos utilizar 59 pocillos se realizó un sorteo en el cual se tomaron tres muestras extras de cada mercado para poder llenar todos los pocillos.

➤ **Muestreo Probabilístico**

- ***Muestreo al Azar***

En un recipiente se introdujeron papeles que identificaron a cada uno de los locales de cada mercado, después de sacar el primer papel se devolvió y revolvió con el resto, a fin de que todos sigan teniendo la misma probabilidad de ser seleccionado, de 14 locales que tiene el mercado modelo se tomaron 13 para la recolección de la muestra, de

30 locales que tiene el mercado América se tomaron 27 para la recolección de la muestra.

#### **4.7. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente proyecto se realizó durante el mes de marzo del año 2017. Las muestras fueron tomadas el día de mayor afluencia de venta de este producto; el día domingo para el mercado América, y el día lunes del mercado Modelo. Para proteger la integridad biológica de origen de cada pechuga se colocaron en bolsas para empacar (ziploc), se rotuló del número del puesto, el nombre del mercado de donde se obtuvo la muestra y la fecha de recolección.

Las muestras fueron refrigeradas a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Se transportaron con la ayuda de un cooler al laboratorio de Agrocalidad localizado en la ciudad de Quito.

Posteriormente se prepararon las muestras; por lo cual se pesó las pechugas en una balanza analítica, cortándola en cuadrados pequeños, (después de cada muestra se lavó el cuchillo y la tabla para picar con; detergente, agua destilada tipo I y alcohol, para evitar la contaminación entre muestras). Luego se colocó en el homogenizador marca OMNI un puñado de la pechuga cortada, durante 30 segundos a 4000 rpm, luego se retiró la carne de pechuga y se colocó en fundas previamente rotuladas (después de cada proceso se lavó el triturador y las cuchillas con; detergente, agua destilada tipo I y alcohol, para evitar la contaminación entre muestras). Luego se pesó las fundas con el material triturado.

4.7.1. Preparación para el análisis de muestras para enrofloxacina:

##### **4.7.1.1 Preparación de los reactivos.**

**a) Preparación de 1X tampón de extracción de muestras (sample extraction buffer).**

Se mezclaron 1 volumen de 10X sample extraction buffer con 9 volúmenes de agua destilada.

**b) Preparación de 35% metanol / tampón de extracción de muestras (sample extraction buffer).**

Se mezclaron 6.5 volúmenes de 1X sample extraction buffer con 3.5 volúmenes de metanol al 100%.

#### **4.7.1.2 Preparación de las muestras.**

- a) Se rotularon los 59 tubos de plástico de 15ml con la codificación correspondiente.
- b) De la muestra cpp-17-001 se dividió en tres (A-B-C), luego se fortificó las muestras 1A y 1B.
- c) Se pesó 1.0 gr de la muestra homogenizada y se añadió 4ml de 35% Metanol / Tampón de Extracción de Muestras (sample extraction buffer) y 50 uL Tampón de extracción de carne (Buffer I).
- d) Posteriormente se vortericizó por 10 minutos a máxima velocidad.
- e) Se centrifugó por 10 minutos a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F).
- f) Se transfirió 50 uL del sobrenadante a un tubo y se añadió 25 uL del tampón de extracción de carne (Buffer II) y 1,5ml de 35% Metanol / tampón de Extracción de Muestras (sample extraction buffer), se vortericizó por 30 segundos.
- g) Se tomó 50 uL del sobrenadante para el análisis.
- h) *Nota: Factor de Dilución 20.*
- i) El factor de dilución se utiliza para realizar el cálculo final ya que el análisis ELISA se realiza en forma líquida se tiene que transformar a fase sólida para que los resultados salgan en ug/kg.

4.7.2. Protocolo de la prueba del kit de ELISA para enrofloxacin.

#### **4.7.2.1 Preparación de los reactivos.**

##### **a) Preparación de 1X HRP- anticuerpo conjugado #2**

Se mezcló 1 volumen del 100 X HRP- Anticuerpo Conjugado #2 con 99 volúmenes del diluyente del anticuerpo #2.

##### **b) Preparación de 1X solución de lavado**

Se mezcló 1 volumen del 20X Solución de Lavado con 19 volúmenes de agua destilada.

#### **4.7.2.2 Protocolo de prueba ELISA.**

- a) Primeramente se llenó la hoja de registro de muestras para análisis ELISA.
- b) Se añadió 50 uL de cada estándar de enrofloxacinina por duplicado en diferentes pocillos (añadir los estándares en el plato solamente en orden de menor concentración a mayor concentración) y 50 uL de cada muestra en diferentes pocillos de muestra, de la primera muestra se hizo por triplicado (A, B, C) fortificando las muestras A, B y cada diez muestras se hizo un duplicado.
- c) Posteriormente se añadió 100 uL del anticuerpo #1 y se mezcló bien, balanceando suavemente la placa manualmente durante 1 minuto.
- d) Se incubó el plato por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F).
- e) Se desechó el líquido.
- f) Se lavó el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X, utilizando una pipeta multicanal, después del último lavado se invirtió la placa y suavemente se golpeó la placa sobre toallas de papel hasta que no exista ningún residuo de agua sobre la toalla de papel, con una punta desechable se reventó suavemente las burbujas que puedan quedar en los pocillos teniendo en cuenta de no tocar con la punta desechable el fondo del pocillo.
- g) Se limpió la parte posterior de la placa con la toalla de papel para quitar rastros de huellas digitales.
- h) Se añadió 150 uL de la solución 1X anticuerpo #2, luego se incubó el plato por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F).
- i) Principalmente se evitó la luz directa del sol y el contacto con las baldosas frías de la mesa durante la incubación. Se cubrió la placa de microtitulación mientras se incubaba utilizando un pedazo de papel aluminio del tamaño de la placa.
- j) Se desechó el líquido.
- k) Se lavó el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X, después del último lavado se invirtió la placa y suavemente se golpeó la placa sobre toallas de papel hasta que no exista ningún residuo de agua sobre la toalla de papel, con una punta desechable reventar



- suavemente las burbujas que puedan quedar en los pocillos teniendo en cuenta de no tocar con la punta desechable el fondo del pocillo.
- l) Luego se limpió la parte posterior de la placa con la toalla de papel para quitar rastros de huellas digitales.
  - m) No se permitió que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
  - n) Luego se añadió 100 uL del sustrato TMB. Tiempo la reacción inmediatamente después de añadir el sustrato. Se mezcló la solución agitando suavemente la placa manualmente durante 1 minuto mientras se incubaba.
  - o) No se volvió a colocar ningún sustrato en el recipiente original para evitar cualquier posible contaminación. Cualquier solución de sustrato que presente coloración es indicativa de deterioro y debe descartarse. Cubrir la placa de microtitulación mientras se incubaba.
  - p) Después se incubó por 15 minutos en un cuarto a temperatura de (20-25°C) (68-77°F).
  - q) Se añadió 100 uL del Stop Buffer para parar la reacción enzimática.
  - r) Luego se leyó el plato después de adicionar el stop buffer, se leyó con 450 nanómetros (nm) longitud de onda.
  - s) Antes de la lectura, se utilizó una toalla de papel que no desprenda pelusa para limpiar la parte inferior de la placa asegurándose de que no haya humedad ni huellas dactilares que interfieran con las lecturas.
  - t) Se procedió al análisis específico de enrofloxacin.

#### 4.7.3. Preparación para el análisis de muestras para tilosina:

##### 4.7.3.1 Preparación de la muestra

###### a) Método de extracción con disolvente orgánico

- Se rotularon los 59 tubos de plástico de 20ml con la codificación correspondiente.
- De la muestra cpp-17-001 se dividió en tres (A-B-C), luego se fortificó las muestras 1A y 1B.
- Se pesó 5.0 gr de la muestra homogenizada y añadir 5ml de metanol y 3ml de hexano.
- Después se vortericizó vigorosamente por 12 minutos velocidad media usando un Vortex multitubo.

- Se centrifugó por 10 minutos a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente de (20-25°C) (68-77°F).
- Se removió completamente las capas superiores del hexano, luego se transfirió 1ml de la capa inferior a un tubo, se utilizó un evaporador rotatorio para secar la muestra en un baño de agua a 50-60 ° C bajo presión reducida.
- Alternativamente la muestra se secó soplando gas nitrógeno en un baño de agua a 50-60 ° C.
- Posteriormente se añadió 0.5ml del tampón de extracción de muestras (sample extraction buffer) y se vortizó por 2 minutos.
- Se centrifugó por 1 minuto a 4.00 revoluciones por minuto (rpm).
- Después se usó 50 uL del sobrenadante para el análisis.
- *Nota: Factor de Dilución 1.*

#### 4.7.4. Protocolo de la prueba del kit de ELISA para tilosina.

##### 4.7.4.1 Preparación de los reactivos

###### a) Preparación de 1X HRP- anticuerpo conjugado #2

Se mezcló 1 volumen del 100 X HRP- Anticuerpo Conjugado #2 con 99 volúmenes del diluyente del anticuerpo #2.

###### b) Preparación de 1X solución de lavado

Se mezcló 1 volumen del 20X Solución de Lavado con 19 volúmenes de agua destilada.

##### 4.7.4.2 Protocolo de prueba ELISA

- a) Se llenó la hoja de registro de muestras para análisis ELISA.
- b) Se añadió 50 uL de cada estándar de enrofloxacin por duplicado en diferentes pocillos (añadir los estándares en el plato solamente en orden de menor concentración a mayor concentración) y 50 uL de cada muestra en diferentes pocillos de muestra, de la primera muestra

se hizo por triplicado (A, B, C) fortificando las muestras A, B y cada diez muestras se hizo un duplicado.

- c) Se añadió 100 uL del anticuerpo #1 y se mezcló bien balanceando suavemente la placa manualmente durante 1 minuto.
- d) Se incubó el plato por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F).
- e) Se desechó el líquido.
- f) Posteriormente se lavó el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X, utilizando una pipeta multicanal, después del último lavado se invirtió la placa y suavemente se golpeó la placa sobre toallas de papel hasta que no exista ningún residuo de agua sobre la toalla de papel, con una punta desechable se reventó suavemente las burbujas que puedan quedar en los pocillos teniendo en cuenta de no tocar con la punta desechable el fondo del pocillo.
- g) Se limpió la parte posterior de la placa con la toalla de papel para quitar rastros de huellas digitales.
- h) Se añadió 150 uL de la solución 1X anticuerpo #2, luego se incubó el plato por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F).
- i) Se evitó la luz directa del sol y el contacto con las baldosas frías de la mesa durante la incubación. Se cubrió la placa de microtitulación mientras se incubaba utilizando un pedazo de papel aluminio del tamaño de la placa.
- j) Se desechó el líquido.
- k) Se lavó el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X, después del último lavado se invirtió la placa y suavemente se golpeó la placa sobre toallas de papel hasta que no exista ningún residuo de agua sobre la toalla de papel, con una punta desechable reventar suavemente las burbujas que puedan quedar en los pocillos teniendo en cuenta de no tocar con la punta desechable el fondo del pocillo.
- l) Luego se limpió la parte posterior de la placa con la toalla de papel para quitar rastros de huellas digitales.
- m) No se permitió que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
- n) Luego se añadió 100 uL del sustrato TMB. Tiempo la reacción inmediatamente después de añadir el sustrato. Se mezcló la solución

agitando suavemente la placa manualmente durante 1 minuto mientras se incubaba.

- o) No se volvió a colocar ningún sustrato en el recipiente original para evitar cualquier posible contaminación. Cualquier solución de sustrato que presente coloración es indicativa de deterioro y debe descartarse. Cubrir la placa de microtitulación mientras se incubaba.
- p) Después se incubó por 15 minutos en un cuarto a temperatura de (20-25°C) (68-77°F).
- q) Se añadió 100 uL del Stop Buffer para parar la reacción enzimática.
- r) Luego se leyó el plato después de adicionar el stop buffer, se leyó con 450 nanómetros (nm) longitud de onda.
- s) Antes de leer, se utilizó una toalla de papel que no desprenda pelusa para limpiar la parte inferior de la placa asegurándose de que no haya humedad ni huellas dactilares que interfirieran con las lecturas.
- t) Se procedió al análisis específico de tilosina.

4.7.5. Preparación para el análisis de muestras para sulfonamida:

#### **4.7.5.1 Preparación de los reactivos**

- a) **Preparación de 1X tampón de extracción de muestras (sample extraction buffer).**

Se mezcló 1 volumen de 10X sample extraction buffer con 9 volúmenes de agua destilada.

#### **4.7.5.2 Preparación de la muestra**

- a) Se homogenizó una cantidad razonable de la muestra con un mezclador adecuado.
- j) Posteriormente se rotularon los 59 tubos de plástico de 15ml con la codificación correspondiente. De la muestra cpp-17-001 se dividió en tres (A-B-C), luego se fortificó las muestras 1A y 1B.
- b) Se pesó 3 gr de la muestra homogenizada y se mezcló con 6ml de acetato de etilo, después se vortizó por 3 minutos a máxima velocidad.
- c) Se centrifugó por 5 minutos a 4.000 revoluciones por minuto (rpm) a temperaturas ambiente de (20-25°C) (68-77°F).

- d) Se transfirió 4ml del sobrenadante del acetato de etilo (corresponde a 2 gr de la muestra original) en un nuevo balón de vidrio y se usó el evaporador rotativo para secar la muestra en un baño de agua a 50-60°C bajo presión reducida.
- e) Alternativamente la muestra se secó soplando gas nitrógeno en un baño de agua a 50-60 ° C.
- f) Se disolvió el residuo seco en 2ml de n-hexano, luego se transfirió el residuo a un nuevo tubo previamente codificado.
- g) Se añadió 1ml de 1X Tampón de Extracción de Muestras (sample extraction buffer) y se mezcló por votex a máxima velocidad por 1 minuto.
- h) Se centrifugó por 10 minutos a 4.000 revoluciones por minuto (rpm), descartar la capa superior del hexano.
- i) Después se usó 50 uL de la capa acuosa inferior de la muestra en el pocillo, en caso de que se haya generado emulsión se debe eliminar la capa superior de n-hexano e incubar la capa acuosa inferior en baño de agua durante 3 minutos a 80-95°C.
- j) *Nota: Factor de Dilución 0.5.*
- k) Si es necesario, la muestra obtenida de la etapa 7 se puede diluir con 1 x tampón de extracción de muestra (sample extraction buffer).

4.7.6. Protocolo de la prueba del kit de ELISA para sulfonamida:

#### **4.7.6.1 Preparación De Los Reactivos**

##### **a) Preparación de 1X Solución de Lavado**

Se mezcló 1 volumen del 20X Solución de Lavado con 19 volúmenes de agua destilada.

#### **4.7.6.2 Protocolo De Prueba ELISA**

- a) Se llenó la hoja de registro de muestras para análisis ELISA.
- b) Se añadió 50 uL de cada estándar de Sulfonamida (SMX) por duplicado en diferentes pocillos (se añadió los estándares en el plato en orden de menor concentración a mayor concentración).

- c) Se añadió 50 uL de cada muestra en diferentes pocillos de muestra, de la primera muestra se hizo por triplicado (A, B, C), se fortificó las muestras A, B y cada diez muestras se hizo un duplicado.
- d) Se añadió 50 uL del conjugado sulfonamida (HRP) a cada pocillo, se añadió 50 uL del anticuerpo de sulfonamida a cada pocillo. Inmediatamente después se mezcló en el pocillo pipeteando hacia arriba y hacia abajo una vez (este es un paso muy importante para evitar valores de OD inconsistentes).
- e) Después de añadir el anticuerpo a todos los pocillos, se mezcló gentilmente los pocillos balanceando manualmente el plato por 1 minuto.
- f) Se incubó el plato por 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) (68-77°F), se cubrió el plato con un pedazo de papel aluminio.
- g) Se desechó el líquido.
- u) Después se lavó el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X, después del último lavado se invirtió la placa y suavemente se golpeó la placa sobre toallas de papel hasta que no exista ningún residuo de agua sobre la toalla de papel, con una punta desechable se reventó suavemente las burbujas que puedan quedar en los pocillos teniendo en cuenta de no tocar con la punta desechable el fondo del pocillo.
- v) Se limpió la parte posterior de la placa con la toalla de papel para quitar rastros de huellas digitales.
- h) No se permitió que la placa se seque al aire entre los pasos de trabajo.
- i) Después se añadió 100 uL del sustrato TMB. Tiempo la reacción inmediatamente después de añadir el sustrato. Se mezcló la solución balanceando suavemente la placa manualmente durante 1 minuto mientras se incubaba.
- j) No se volvió a colocar ningún sustrato en el recipiente original para evitar cualquier posible contaminación. Cualquier solución de sustrato que presente coloración es indicativa de deterioro y debe descartarse. Cubrir la placa de microtitulación mientras se incubaba.
- k) Después se incubó por 15 minutos en un cuarto a temperatura de (20-25°C) (68-77°F).

- l) Se añadió 100 uL del Stop Buffer para parar la reacción enzimática.
- m) Posteriormente se leyó el plato después de adicionar el stop buffer, se leyó con 450 nanómetros (nm) longitud de onda.
- n) Antes de leer, se utilizó un paño que no desprenda pelusa para limpiar la parte inferior de la placa asegurándose de que no haya humedad ni huellas dactilares que interfieran con las lecturas.
- o) Se procedió al análisis específico de sulfonamidas.

#### **4.7. VARIABLE RESPUESTA**

Después de haber realizado el análisis ELISA en los mercados Modelo y América, los resultados arrojaron que existe la presencia de residuos de enrofloxacin y sulfonamida. Por el contrario no se encontraron residuos de tilosina en la carne de pollo de ninguno de los mercados analizados.

#### **4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

En la presente investigación utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2015 para el procesamiento de la información.

## **CAPÍTULO V**

### **RESULTADO Y DISCUSIÓN**

#### **5.1. RESULTADOS.**

Los datos analizados pertenecientes a los locales expendedores de carne de pollo en el Mercado Modelo dieron como resultado la presencia de antibióticos tales como sulfonamida en 7 muestras y 2 muestras contaminadas de enrofloxacin con valores promedios de (4,16 ug/kg), (15,11 ug/kg) respectivamente. Mientras que en el Mercado América se encontraron residuos del antibiótico sulfonamida en 15

muestras con un promedio total de (15.57 ug/kg) y en 5 muestras se detectaron residuos de enrofloxacin (14,18 ug/kg). Obteniendo como resultado mayor presencia de antibiótico enrofloxacin en el Mercado Modelo y Sulfonamida en el Mercado América, con niveles que oscilaron entre 2,44 a 12,35 ug/kg para enrofloxacin y 0,43 a 4,75 ug/kg para sulfonamida.

**TABLA 4.** *Resultados Test de Tukey.*

<b>ANTIBIÓTICOS</b>	<b>MERCADO MODELO</b>	<b>MERCADO AMÉRICA</b>
<b>Sulfonamida</b>	0.15 (a)	0.52 (b)
<b>Enrofloxacin</b>	0.56 (a)	0.47 (a b)
<b>E. E</b>	0.06	0.05
<b>C.V. (%)</b>	29.79	25.98
<b>P - Valor</b>	0.3107	0.0291

**C.V.:** coeficiente de variación.

**E.E:** error experimental.

En la tabla 4, se observa que los datos obtenidos en el Mercado Modelo no mostraron diferencias significativas ( $P=0,3107$ ) en relación al antibiótico sulfonamida y enrofloxacin con valores de 0.15 ug/kg y 0.56 ug/kg correspondientemente. Mientras que en el Mercado América se observan diferencias significativas ( $P=0,0291$ ) del antibiótico enrofloxacin 0.47 ug/kg y sulfonamida 0.52 ug/kg.

Entre los mercados Modelo y América existen diferencias significativas en relación con los dos antibióticos: sulfonamida con valores 0,15 ug/kg y 0,52 ug/kg respectivamente, siendo el mercado América donde existe una mayor presencia de este antibiótico, por el contrario existe mayor presencia del antibiótico enrofloxacin



en el mercado Modelo con valores de 0,56 ug/kg y en el mercado América con 0,47 ug/kg.

Con los valores obtenidos se demuestra que existen residuos de antibióticos sin embargo son inferiores a los límites permitidos que emiten el Codex Alimentarius del año 2015 y la Comisión Europea del año 2010 por lo tanto cumple con las normas establecidas.

## **5.2. DISCUSIÓN.**

El músculo pectoral torácico fue utilizado dentro de esta investigación para el análisis de los antibióticos enrofloxacina y sulfonamida ya que ambos fármacos presentan una alta biodisponibilidad en los fluidos, órganos corporales y una elevada concentración de suero en los tejidos corroborado por (García, et al., 1999) y (Reyes, et al., 2011), por lo tanto al ser el músculo más voluminoso debe ser siempre explorado y además es un indicativo del estado nutricional del ave expresado por (Cano, 2010).

Elisa se destaca por su bajo costo y facilidad operativa, considerándose como un ensayo rápido para la evaluación cualitativa y presuntiva de los antibióticos en los alimentos de origen animal confirmado por (Talero, Medina, & Núñez, 2014), el cual utiliza biosensores por inmunoabsorción ligado a enzimas que permiten manejar 96 muestras por pocillo, concordando la investigación por parte de (Buket, y otros, 2013) manejando 59 pocillos con un duplicado cada 10 muestras, demostrando la eficiencia de las pruebas kits ELISA (enrofloxacina, sulfonamida) como método de detección y cuantificación de residuos de antibióticos lo cual es ratificado por (Panzenhagen, et al., 2016).

Los resultados de la presente investigación revelaron que existen residuos de enrofloxacina en el momento de la comercialización los cuales oscilan entre 2,44 a 12,35 ug/kg, mientras que en el estudio de (Attari, et al., 2014) las muestras presentan niveles superiores oscilando entre 24,24 a 28,93 ug/kg. En Brasil, (Panzenhagen, et al., 2016) tuvo como resultados niveles de enrofloxacina entre 3,6 a 47,9 ug/kg, siendo estos valores superiores a los obtenidos dentro de esta investigación. En 22 muestras de tejido de pollo analizadas se encontraron residuos

de sulfonamida con niveles que oscilaban entre 0,43 a 4,75 ug/kg, lo cual es parcialmente consistente con (Kadim, et al., 2010) oscilando entre 0,079 a 5,60 ug/kg de sulfametazina.

El Codex Alimentarius (2015) y la Comisión de la Unión Europea (2010) manejan 100 ug/kg para los antibióticos enrofloxacina y sulfonamida, además el reglamento sobre la inocuidad de los Alimentos en Chile (1999) corrobora estos valores, al obtener dentro de esta investigación como promedio total 15,11 ug/kg en el mercado Modelo y 14,18 ug/kg en el mercado América de enrofloxacina y de sulfonamida 4,16 ug/kg y 15.57 ug/kg en los mercados Modelo y América respectivamente, podemos decir que los valores se encuentran por debajo del límite máximo permitido ya que esto podría estar relacionado a que los productores respetan en cierto grado el tiempo de retiro del animal antes de pasar a la venta.

Como se ha descrito anteriormente por (Attari, et al., 2014) la detección de residuos de antibióticos ha recibido una enorme atención mundial de agencias reguladoras y salud pública, por lo cual su preocupación es alarmante manifestado por (Nisha, 2008), ya que la exposición humana a productos animales que contienen niveles considerables de residuos de antibióticos puede inducir y transferir resistencia a patógenos humanos, también causar varios problemas incluyendo respuesta inmunológica alterada y trastorno de la flora intestinal en individuos susceptibles señalado por (Chang, et al. 2015), por lo tanto aunque estos resultados son inferiores al límite establecido es una alerta ya que existe la presencia de estos antibióticos.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **6.1. CONCLUSIONES.**

- Existen residuos de antibióticos enrofloxacina y sulfonamida en la carne de pollos faenados expendidos en los mercados Modelo y América de la ciudad de Ambato.

- Los datos analizados en el Mercado Modelo dieron como resultado la presencia de antibióticos tales como sulfonamida en 7 muestras y 2 muestras contaminadas de enrofloxacin con valores promedios de (4,16 ug/kg), (15,11 ug/kg) respectivamente. Mientras que en el Mercado América se encontraron residuos del antibiótico sulfonamida en 15 muestras con un promedio total de (15.57 ug/kg) y en 5 muestras se detectaron residuos de enrofloxacin (14,18 ug/kg). Obteniendo una mayor presencia del antibiótico enrofloxacin en el Mercado Modelo y Sulfonamida en el Mercado América. No se detectaron residuos de tilosina en ninguno de los dos mercados analizados.
- A pesar de que los valores encontrados están por debajo de los límites establecidos por el Codex Alimentarius del año 2015 y la Comisión Europea del año 2010 que son 100ug/kg de cada antibiótico, son valores que indican la presencia de residuos de estos antibióticos pero que están dentro del nivel permisible.

## **6.2. RECOMENDACIONES.**

- Realizar análisis de diversos tipos de antibióticos también a nivel de hígado, riñón y huevos en pollos faenados y comercializados en los centros de expendio.
- Realizar este análisis en todos los mercados expendedores de carne de pollo y sus frigoríficos aledaños.
- Hacer un estudio primario de proveedores con el objetivo de analizar las características sanitarias de la carne que se expenden en los centros de expendio.

### 6.3. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, D., Montero, P., & Jaimes, J. (2015). Determinación de Antibióticos y Calidad Microbiológica de la Carne de Pollos comercializada en Cartagena Colombia. *Revista Científica SCIELO*, 26(1), 26, doi: 10.4067/S0718-07642015000100008.
- Andriuoli, A. Z. (2015). Congreso de Avicultura. *El Agro, Edición 195*, 4.
- Arango, C. J., & Maya, J. J. (2010). *Epidemiología Veterinaria* (Vol. 16). (J. Morales, Ed.) México: El Manual Moderno.
- Attari, V., Abbasi, M., Abedimanesh, N., Ostadrahimi, A., & Gorbani, A. (2014). Investigation of Enrofloxacin and Chloramphenicol Residues in Broiler Chickens Carcasses Collected From Local Markets of Tabriz, Northwestern Iran. *Health Promot Perspect*, 151-157. doi: 10.5681/hpp.2014.020.
- Azañero, G., & Limaymanta, M. (7 de Diciembre de 2010). *Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado*. Lima : Universidad Naional Mayor de San Marcos.
- Bioo Scientific . (2015). Food & Feed Safety (Product Catalog). *Bioo Scientific*,1-36.
- Buket, E., Kaynak, F., Dermirhan, B., Ozgacar, S., Oktem, A., & Abbasoglut, U. (2013). Screening of quinolone antibiotic residues in chicken meat and beef sold in the markets of Ankara, Turkey. *Poultry Science* . doi; 10.3382/ps.2013-03072.
- Cano, F. (2010). *Anatomía específica de aves: aspectos funcionales y clínicos*. Murcia, España: Universida de Murcia, Facultad de Veterinaria.
- CODEX ALIMENTARIUS . (2015). Límites Máximos de Rsiduos (LMR) y Recomendaciones sobre la Gestión de Riesgos (RGR) para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos . *CODEX ALIMENTARIUS Normas Internacionales de los Alimentos* , 1-40.

- Comisión Europea. (2010). COMMISSION REGULATION (EU) on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits. *Official Journal of the European Union*, 1-72.
- Cota, E., Hurtado, L., Pérez, E., & Alcántara, L. (2014). Resistencia a Antibióticos de Cepas Bacterianas Aisladas de Animales Destinados al Consumo Humano . *Revista Iberoamericana de Ciencias* , 1-11.
- Chang, Q., Wang, W., Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. (Marzo de 2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be. *Pub Med*. doi; 10.1111/eva.12185.
- EFARVET. (20 de Julio de 2012-2017). *Terapéutica Veterinaria*. Obtenido de <http://www.terapeuticaveterinaria.com/nosotros>
- García, O., gorla, N., Ludres, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G., & Puelles, I. (1999). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Blackwell Science*, 209-212. Doi: 10.1046@j.1365-2885.1999.00211.
- Frerreira, P. V. (1996). *Estadística Experimental Aplicada Agronomía* . Maceió: Universidad Federal de Alagoas .
- Izquierdo, P., Mavárez, R., Ysambertt, F., Piñero, M., Torres, G., & Allara, M. (2010). Extracción de oxitetraciclina en carne de pollo: estudios de rendimiento con aumento de la fase polar del solvente de extracción. *Revista Científica SCIELO*.
- Kadim, O., Mahgoub, W., Al Marzooqui, R., & Al-Mábal, Y. (2010). *Ensayo inmunoenzimático para detección residuos de antibióticos y hormonas en la carne de pollo en el Sultanato de Omán* . Lima : Universidad Nacional Jorge Basadre Grdhmann .
- Martínez, J. M., Melo, C. J., Córdova, M. J., & Ortiz, J. P. (2014). Diagnóstico de los Principales Antibióticos Recomendados para Pollos de Engorde (Broiler) por los Centros Agropecuarios de Pasto, Nariño, Colombia . *Revista Medica Veterinaria* , 99-100-101.

- Mel Dolors . (31 de Agosto de 2014). *Nutricion y Dieta Dukan* . Obtenido de Nutricion y Dieta Dukan : <http://meldolors.blogspot.com/2014/08/>
- Merkel, A. (03 de diciembre de 2016). *CLIMATE-DATA.ORG*. Obtenido de Clima AMbato: <https://es.climate-data.org/location/2957/>
- Mestorino, N. (2009). *Antimicrobianos en Avicultura* (Vol. 296). La Plata, Argentina : Departamento de Farmacología Especial y Toxicología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Ministerio de Salud Departamento de Asesoría Jurídica. (1999). *Fija Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos Destinados al consumo Humano*. Chile: Diario Oficial.
- Molero, G., Pérez, M., Sanchez, A., & Serrano, M. (2006). Residuos de Enrofloxacin en Tejidos Hepáticos y Muscular de Pollos Beneficiados en el Municipio de San Francisco en el Estado de Zulia, Venezuela . *Revista Científica FCV-LUZ* , 1-5.
- Moreno, L., Bermúdez, M., García, L., Larguré, A., Flores, M., & Orantes, C. (2002). Estudios de Residuos Tóxicos en Tejidos Animales Destinados al Consumo . *Revista Científica FCV-LUZ*, 1-7.
- Moquillaza, L. A. (2012). *Estudio de los niveles de residuos de antibióticos en músculo e hígado de pollos beneficiados en la ciudad de Tacna*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grdhrmann, Tacna, Perú .
- Nisha, A. (2008). Antibiotic Residues - A Global Health Hazard. *Veterinary World*, Vol.1(12), 375-377.
- Panzenhagen, N., Waldemir, S., Gouvêa, R., Oliveira, A., Barreto, F., Pereira, V., & Aquino, A. (2016). Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS. *FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A*, 639-643. doi: 10.1080/19440049.2016.1143566.
- Ramírez, A., & Velásquez, R. (2012). Determinación de Residuos de Tetraciclinas en Carnes de pollo que se consumen en la Ciudad de Guatemala . *Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas* , 1-5.

- Ramón, A. (2007). *Antibióticos de Uso Veterinario y su Relación con la Seguridad Alimentaria y Salud Pública*. Madrid: Instituto de España Real Academia de Ciencias Veterinarias .
- Riera, M. M. (2010). *Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos de medicamentos en animales de granja*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Reyes, I., Schneider, J., Blore, P., & Donoghue, D. (2011). The relationship between blood and muscle samples to monitor for residues of the antibiotic enrofloxacin in chickens. *Poultry Science*, 481-485. Doi: 10.3382/ps.2010-01057.
- Rodríguez, J. (26 de Agosto de 2003). *Eroski Consumer*. Obtenido de Los riesgos controlables de la carne de pollo: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/08/26/7981.php>
- Rospigliosi, M. (2012). *Ley general de salud. Resolución Ministerial* (pág. 42). Lima: Ministerio de salud.
- Talero, V., Medina, O., & Núñez, W. (8 de Diciembre de 2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, Vol (19), 11-29.

## **CAPITULO VIII**

### **PROPUESTA**

#### **8.1 DATOS INFORMATIVOS**

Tema: “Análisis secuencial de residuos de antibióticos en carne, hígado y riñón de pollos comercializados en los diversos centros de expendio de la ciudad de Ambato”.

#### **8.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

La carne de pollo es la más consumida dentro de nuestro país. Su precio económico, composición nutricional óptima y características organolépticas ideales para todas las edades, favorecen y aumentan su consumo. Por lo tanto no la exime de riesgos, sobre todo químico y microbiológico, debido al sistema de producción intensivo que se emplea en la mayoría de los galpones; sin embargo, son controlables con gran facilidad. El consumidor asocia mayoritariamente la carne de pollo a dos características principales que definen su comportamiento en el momento de la compra: su bajo precio y una imagen de seguridad generalmente alta (Rodríguez, 2003).

La seguridad alimentaria está relacionada con el uso de fármacos y sus residuos, ejemplo de ellos, son las sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol, que se han encontrado en diferentes animales de abasto. En esta revisión, se incluyen diversas técnicas para el análisis. Dentro de las técnicas existentes hoy en día se destacan el empleo de biosensores por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual permite manejar gran número de muestras debido a su bajo costo y facilidad operativa, siendo un ensayo rápido para la evaluación cualitativa y presuntiva de los antibióticos en los alimentos de origen animal (Talero, Medina, & Núñez, 2014).

Por ende este trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Ambato principalmente en los mercados Modelo y América ya que son los que contienen una mayor cantidad de puestos y existe una mayor comercialización de este tipo de carne, dentro de esta investigación no se encontraron niveles de antibióticos superiores a los límites máximos de residuos que exige las normas de salud del Codex Alimentarius



del 2015 y la Comisión Europea del 2010, no se detectó el antibiótico tilosina, pero si existió la presencia de sulfonamidas y enrofloxacin en menor grado, lo que indica que los productores avícolas respetan el tiempo de retiro del producto antes de ofrecerlo hacia los consumidores. Razón por la cual es necesario expandir este análisis hacia todos los centros de comercialización de pollos faenados en la ciudad de Ambato tanto en frigoríficos como en los demás mercados (central, urbina, sur, mayorista, simón bolívar, colón, primero de mayo, la dolorosa, pachano, santa clara).

Es muy escasa la información sobre la utilización del equipo ELISA que es un análisis el cual se rige mediante inmuno-adsorción ligado a enzimas para la detección y semi-cuantificación de los antibióticos tilosina, sulfonamida y enrofloxacin en pechuga de pollo, tiene varios usos ya sea en pechuga de pollo, hígado de pollo, huevos, leche, miel, carne de vaca, etc.

### **8.3 JUSTIFICACIÓN**

La avicultura es una industria reconocida a nivel mundial y ocupa en el mundo un importante sitio dentro del sector agropecuario, siendo Tungurahua uno de los principales productores en lo que es pollos de engorde y aves de postura.

En nuestro país el consumo de carne de pollo ha aumentado considerablemente ya que es una de las carnes más saludables para el consumidor específicamente para niños, personas de la tercera edad y personas que se encuentran hospitalizadas ya que se trata de una carne de fácil digestión, baja en grasas y carbohidratos, aunque destaca mucho su contenido en Ácido Fólico, Vitamina B3, Vitamina B6 entre otros.

La seguridad de los alimentos que consumimos se ha convertido en una prioridad fundamental tanto para los consumidores como para las industrias productoras y los poderes públicos. Particularmente, los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan no solo productos de baja calidad, sino que además constituyen un riesgo para la salud de los consumidores. Por ende se han utilizado varios métodos para la detección de residuos de antibióticos uno de ellos es por medio del equipo ELISA el cual permite manejar gran número de muestras debido a su bajo costo y facilidad operativa, siendo un ensayo rápido para la evaluación cualitativa.

## **8.4 OBJETIVOS**

### **8.4.1. Objetivo general**

Establecer un análisis secuencial de residuos de antibióticos en pollos (carne e hígado) dentro de todos los centros de expendio de la ciudad de Ambato (mercados y frigoríficos).

### **8.4.2. Objetivos específicos**

Analizar la presencia de residuos de diversos antibióticos (ug/kg) en pollos faenados dentro de todos los mercados y frigoríficos de la ciudad de Ambato.

## **8.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

Esta investigación por ser un estudio piloto es totalmente factible a nivel social, al realizar un acuerdo con la institución Agrocalidad se podría realizar a nivel general en todos los mercados que comercializan carne de pollo, ya que es una necesidad fundamental conocer que los productores respeten los tiempos de retiro y al utilizar el método ELISA lo sabremos de manera rápida sin la preocupación de utilizar equipos de alta tecnología difíciles de manejar y costosos.

## **8.6 FUNDAMENTACIÓN**

Ambato es una de las ciudades de mayor crecimiento en el Ecuador; por lo que el comercio formal e informal también crece a la par. La seguridad de los alimentos que consumimos se ha convertido en una prioridad fundamental tanto para los consumidores como para las industrias productoras y los poderes públicos.

Para lo cual todas las entidades encargadas de la seguridad alimentaria rigen ciertas normas o límites máximos de residuos de antibióticos en carne de pollo y si superan estos límites representarían un posible riesgo latente para los consumidores ya que se han demostrado en varios países como por ejemplo Colombia que la ingesta de carne pollos que superan este límite han causado que los niños se vuelvan resistentes a varios antibióticos poniendo en riesgo la vida de ellos. El uso indiscriminado de los antibióticos también causa que los animales se vuelvan resistentes a diversos

antibióticos y por ende crean la necesidad de implementar en mayor frecuencia o superar su posología establecida, a su vez promueven utilizar medicamentos de mayor fuerza de acción causando un deterioro total del animal y a su vez de su carne, llegando a producir efectos secundarios letales hacia los consumidores.

Por ende es nuestro deber como veterinarios promover una avicultura orgánica o mantener constante el análisis de antibióticos en los principales centros de expendio de carne de pollo por medio de diversos métodos específicamente el ELISA ya que es uno de los más rápidos existentes a nivel mundial.

## **8.7 METODOLOGÍA**

- Realizar un monitoreo secuencial en los diversos centros de expendio de la ciudad de Ambato tanto en sus mercados como en frigoríficos.
- Implementar un convenio con Agrocalidad para mantener vigente el respectivo análisis.
- Analizar diversos tipos de antibióticos y promotores de crecimiento ya sea en carne de pollo como también en hígado.

## **8.8 ADMINISTRACIÓN**

La administración de esta investigación estará a cargo de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato y la institución de Agrocalidad.

## **8.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Se recomienda realizar la evaluación del proyecto para que los resultados sean confiables y así poder incentivar a los productores avícolas para que implementen la avicultura orgánica o tengan un mayor control de las enfermedades de las aves y a los consumidores a exigir que se venda carne que estén controlados por las autoridades respectivas, así se podrá mejorar la salud de las personas y destacarnos como país libre de residuos de antibióticos.

## 6.4. ANEXOS



**Anexo.1** Compra de las pechugas de pollo en el Mercado modelo.



**Anexo. 2** Compra de las pechugas de pollo en el Mercado américa.



**Anexo. 3** Codificación de las muestras.



**Anexo. 4** Colocación de las muestras en el congelador.



**Anexo. 5** Colocación de las muestras en los diferentes coolers con gel refrigerante y hielo.



**Anexo. 6** Codificación de las muestras en el laboratorio de Agrocalidad.



**Anexo. 7** Preparación de las muestras.



**Anexo. 8** Pechuga cortada en cuadrados pequeños.



**Anexo. 9** Se colocó en el homogenizador maestro de tejidos marca OMNI.



**Anexo. 10** Muestra procesada.



**Anexo. 11** Rotulación de los tubos de plástico



**Anexo. 12** Tubos rotulados.



**Anexo. 13** Pesaje de los tubos de plástico



**Anexo. 14** Pesaje de las muestras para los análisis.



**Anexo. 15** Pipetear 1 volumen de 10X Sample Extraction Buffer.



**Anexo. 16** Colocar en un vaso de 100ml.



**Anexo. 17** Mezclar con 9 volúmenes de agua destilada tipo II.



**Anexo. 18** Reactivo 1 X Sample Extraction Buffer ya preparado.



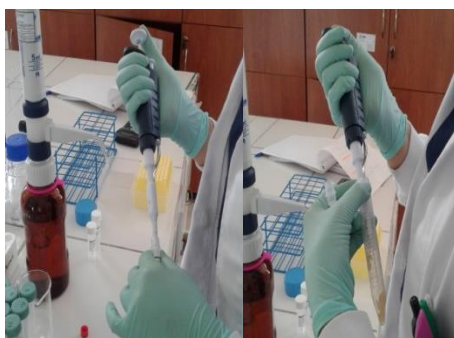
**Anexo. 19** Medir en una probeta 6.5 volúmenes de 1X Sample Extraction Buffer.



**Anexo. 20** Medir en una probeta 3.5 volúmenes de metanol al 100%.



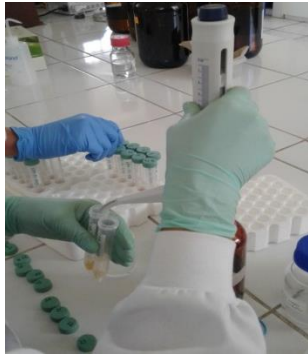
**Anexo. 21** Muestra preparada de 35 % Metanol/ Sample Extraccion Buffer.



**Anexo. 22** Fortificación de las muestras 1A y 1B



**Anexo. 23** Colocación en el Vortex por 1 minuto.



**Anexo. 24** Preparación de las muestras para enrofloxacin. Añadir a cada tubo 4ml de 35% metanol/ Sample Extraction Buffer



**Anexo. 25** Añadir a cada muestra 50uL del tampón de extracion de carne (Buffer I).



**Anexo. 26** Colocar las muestras en una gradilla.



**Anexo. 27** Muestras después de colocar los reactivos.



**Anexo. 28** Vortezizar las muestras por 10 minutos a máxima velocidad.



**Anexo. 29** Muestra ya vortezizada.





**Anexo. 30** Centrifugar las muestras por 10 minutos a 4.000 rpm.



**Anexo. 31** Muestra ya centrifugada.



**Anexo. 32** Transferir 50 uL del sobrenadante a un tubo nuevo y añadir a cada muestra 25 uL del tampón de extracción de carne (Buffer II).



**Anexo. 33** Añadir 1.5 ml de 35% metanol/ Sample extraction Buffer y Vorterizar por 30 segundos.



**Anexo. 34** Preparación de las muestras para el análisis tilosina.



**Anexo. 35** Añadir 5ml de metanol y 3ml de hexano.



**Anexo. 36** Vorterizar por 12 minutos a velocidad media.



**Anexo. 37** Muestra vorterizada.



**Anexo. 38** Centrifugar por 10 minutos a 4.000 rpm.



**Anexo. 39** Muestra centrifugada.



**Anexo. 40** Remover completamente las capas superiores del hexano.



**Anexo. 41** Transferir 1ml de la capa inferior a un tubo de vidrio.



**Anexo. 42** Rotulación de los tubos de vidrio.



**Anexo. 43** Evaporador Rotatorio.



**Anexo. 44** Utilizar el evaporador rotatorio para secar la muestra.



**Anexo. 45** Pipetear 0.5 ml del sample Extraction Buffer



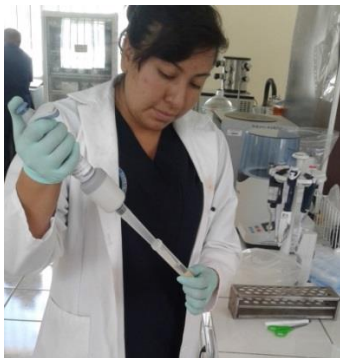
**Anexo. 46** Añadir en cada muestra y mezclar bien.



**Anexo. 47** Traspasar el contenido hacia un tubo nuevo.



**Anexo. 48** Vorterizar por 2 minutos y centrifugar por 1 minuto a 4.000rpm. **Anexo. 49** Muestra ya centrifugada



**Anexo. 50** Preparación de las muestras para sulfonamida. Añadir 6ml de acetato de etilo en cada muestra. **Anexo. 51** Vorterizar por 3 minutos a máxima velocidad.



**Anexo. 52** Muestro vorterizada

**Anexo. 53** Centrifugar por 5 minutos a 4.000 rpm.



**Anexo. 54** Muestra centrifugada.



**Anexo. 55** Transferir 4ml del sobrenadante del acetato de etilo a un nuevo tubo de plástico y a un tubo de vidrio.



**Anexo. 56** Máquina de gas nitrógeno.



**Anexo. 57** Mitad de las muestras se colocaron en la máquina de gas de nitrógeno para secarlas.



**Anexo. 58** Tubos secándose.



**Anexo. 59** Mitad de las muestras se colocaron en el evaporador rotativo para secarlas.



**Anexo. 60** Disolver el residuo seco en 2ml de hexano.



**Anexo. 61** Transferir el residuo a un nuevo tubo de plástico y añadir 1ml del Sample Extraction Buffer en cada muestra.



**Anexo. 62** Vortear por 1 minuto a máxima velocidad.



**Anexo. 63** Centrifugar por 10 minutos a 4.000 rpm.



**Anexo. 64** Muestra centrifugada.



**Anexo. 65** Descartar la capa superior del hexano.



**Anexo. 66** Reactivos que se utilizan para el análisis ELISA enrofloxacina.



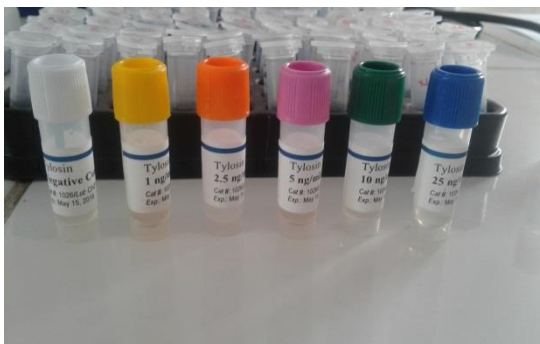
**Anexo. 67** Reactivos que se utilizan para el análisis ELISA enrofloxacina.



**Anexo. 68** Estándares que se utilizan para el análisis ELISA enrofloxacina.



**Anexo. 69** Plato que se utilizan para el análisis ELISA enrofloxacina.



**Anexo. 70** Estándares que se utilizan para el análisis ELISA tilosina.



**Anexo. 71** Plato que se utilizan para el análisis ELISA tilosina.



**Anexo. 72** Reactivos que se utilizan para el análisis ELISA tilosina.



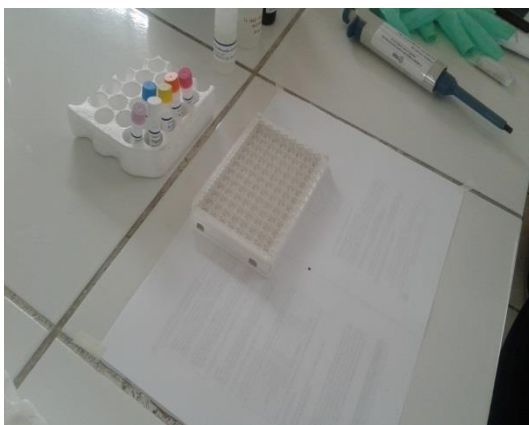
**Anexo. 73** Reactivos que se utilizan para el análisis ELISA tilosina.



**Anexo. 74** Estándares que se utilizan para el análisis ELISA sulfonamida.



**Anexo. 75** Plato que se utilizan para el análisis ELISA sulfonamida.



**Anexo. 76** Sacar la placa ya que tiene que estar a temperatura ambiente.

TIPO DE MUESTRA		ANÁLISIS											
		Corte pollo											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eluato	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
B	Eluato	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
C	Stk 0.5ppb	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
D	Stk 0.1ppb	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
E	Stk 0.25ppb	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
F	Stk 0.25ppb	Stk 1ppb	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
G	Stk 0.5ppb	QC	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000
H	Stk 0.5ppb	QC	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000	OP 1000

**Anexo. 77** Llenar la hoja de registro de muestras para análisis ELISA.





**Anexo. 78** Añadir 50 uL de cada estándar por duplicado.



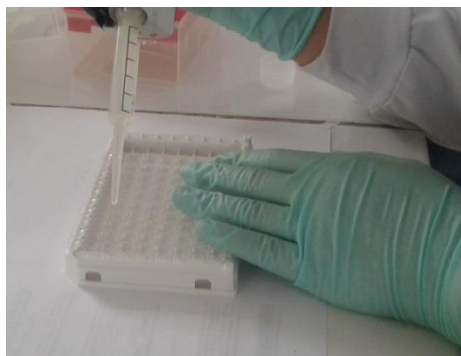
**Anexo. 79** Los estándares se colocan de menor a mayor concentración.



**Anexo. 80** Añadir 50 uL de cada muestra en diferentes pocillos.



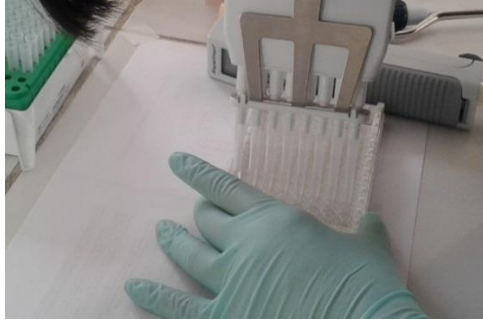
**Anexo. 81** Añadir 100 uL del anticuerpo #1.



**Anexo. 82** Añadir en cada muestra sin topar los pocillos.



**Anexo. 83** Mezclar bien durante 1 minuto los pocillos.



**Anexo. 84** En el caso de la prueba ELISA sulfonamida se debe pipetear hacia arriba y hacia abajo en cada muestra.



**Anexo. 85** Incubar el plato por 30 minutos.



**Anexo. 86** Desechar el líquido.



**Anexo. 87** Lavar el plato 3 veces con 250 uL de la solución de lavado 1X.



**Anexo. 88** Lavar utilizando una pipeta multicanal.



**Anexo. 89** Agitar la placa para quitar todos los residuos del anticuerpo #1.



**Anexo. 90** Desechar el líquido.



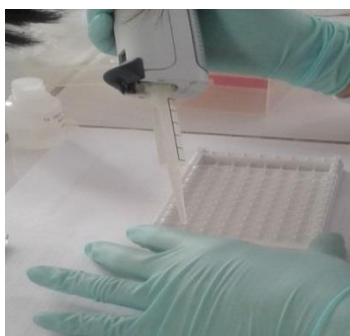
**Anexo. 91** Agitar después de cada lavado antes de desechar el líquido.



**Anexo. 92** Después del último lavado invertir la placa y golpear suavemente sobre la toalla de papel.



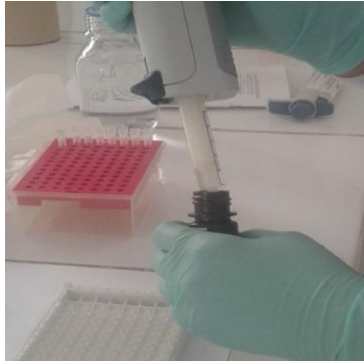
**Anexo. 93** Añadir 150 uL de la solución anticuerpo #2.



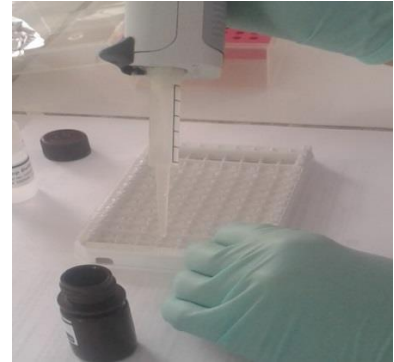
**Anexo. 94** Añadir en cada pocillo sin tocar el fondo.



**Anexo. 95** Incubar el plato por 30 minutos.



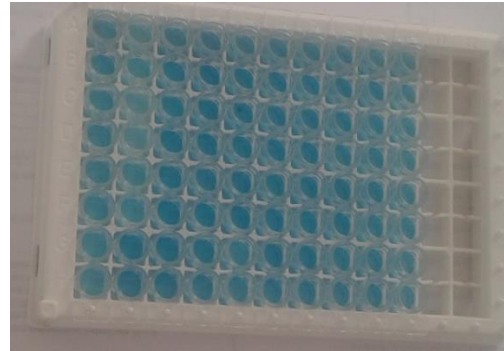
**Anexo. 96** Añadir 100 uL del sustrato TMB



**Anexo. 97** Mezclar la placa agitándola durante 1 minuto.



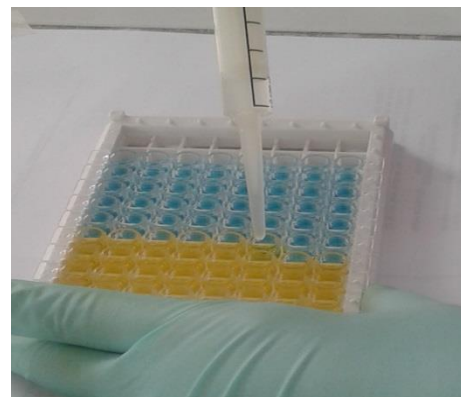
**Anexo. 98** Incubar la placa durante 15 minutos.



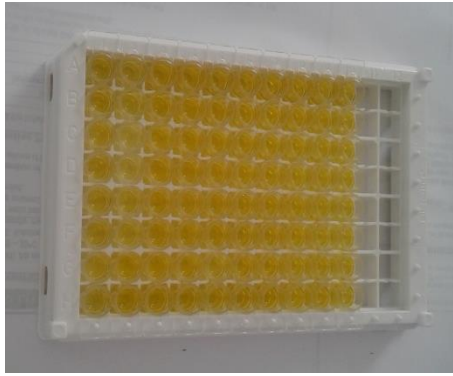
**Anexo. 99** Resultados post incubación.



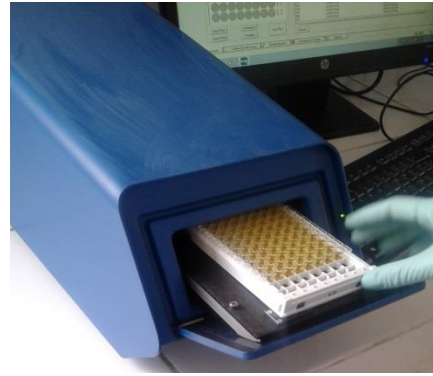
**Anexo. 100** Añadir 100 uL del Stop Buffer.



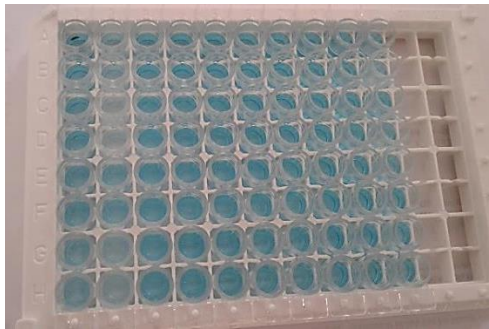
**Anexo. 101** Para parar la reacción enzimática



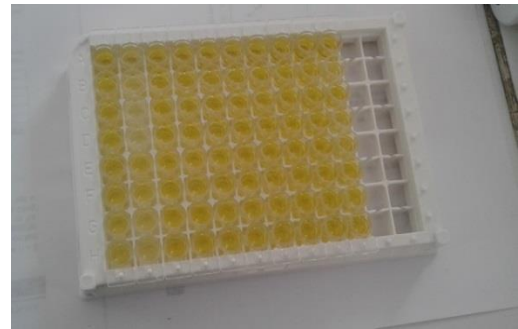
**Anexo. 102** Resultados post Stop Buffer.



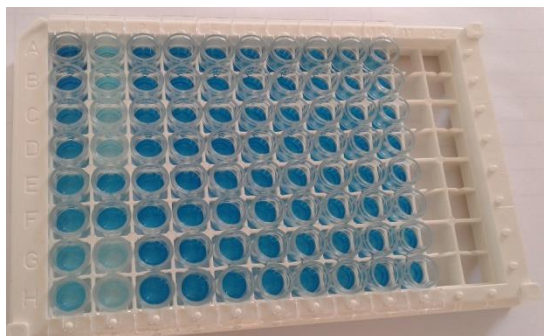
**Anexo. 103** Insertar la placa en el equipo ELISA para el análisis los resultados.



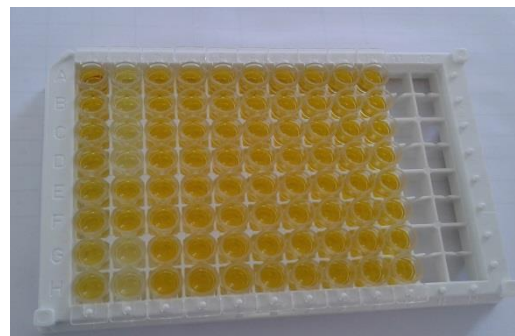
**Anexo. 104** Placa de Sulfonamide.



**Anexo. 105** Placa de Sulfonamide.



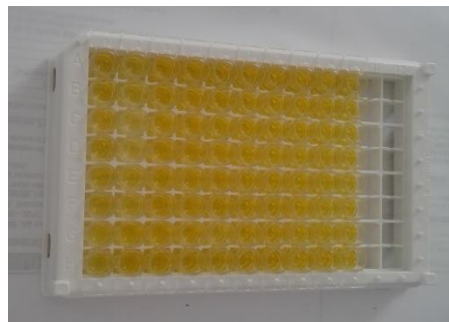
**Anexo. 106** Placa de Tilosina



**Anexo. 107** Placa de Tilosina



**Anexo. 108** Placa de Enrofloxacina.



**Anexo. 109** Placa de Enrofloxacina.

**Anexo 110.** Pesos de las pechugas en el mercado américa.

<b>PESOS DE LAS PECHUGAS EN EL MERCADO AMÉRICA</b>	
<i>Número del Puesto</i>	<i>Peso de la Muestra (gr)</i>
19	450
391	390
223	470
289	370
588 (A)	660
588 (B)	370
204	260
299	330
S/N	330
150	560
370	370
416	440
344 (A)	360
344 (B)	470
397	480
541	390
583	540
371	520
354	440
13	390
222	520
310	320
460	360
540	550
520	550
411	490
392	500
11	580
12	540
157	295

**Anexo 111.** Pesos de las pechugas en el mercado modelo.

<b>PESOS DE LAS PECHUGAS EN EL MERCADO MODELO</b>	
<i>Número del Puesto</i>	<i>Peso de la Muestra (gr)</i>
13 (A)	320
13 (B)	450
12 (A)	450
12 (B)	500
11 (A)	430
11 (B)	590
11 (C)	380
10 (A)	400
10 (B)	350
9 (A)	520
9 (B)	520
8 (A)	520
8 (B)	330
8 (C)	470
7 (A)	470
7 (B)	470
6 (A)	390
6 (B)	390
6 (C)	390
5 (A)	350
5 (B)	300
4 (A)	390
4 (B)	460
3 (A)	290
3 (B)	610
2 (A)	470
2 (B)	330
14 (A)	390
14 (B)	410

**Anexo 112.** Pesos de las muestras para el análisis ELISA.

<b>PESOS DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS</b>				
<i>Codificación</i>	<i>ENROFLOXACINA</i>	<i>SULFONAMIDA</i>	<i>TILOSINA (gr)</i>	
	<i>(gr)</i>	<i>(gr)</i>		
MO-2 (A)	CPP-17-001(A)	1.001	3.024	5.026
MO-2 (A)	CPP-17-001B	1.004	3.013	5.008
MO-2 (A)	CPP-17-001C	1.001	3.003	5.039
MO-2 (B)	CPP-17-002	1.005	3.015	5.024
MO-3 (A)	CPP-17-003	1.020	3.012	5.003
MO-3 (B)	CPP-17-004	1.016	3.010	5.002
MO-4 (A)	CPP-17-005	1.009	3.006	5.016
MO-4 (B)	CPP-17-006	1.007	3.019	5.009

---

MO-5 (A)	CPP-17-007	1.010	3.015	5.026
MO-5 (B)	CPP-17-008	1.015	3.012	5.016
MO-6 (A)	CPP-17-009	1.011	3.005	5.018
MO-6 (B)	CPP-17-010(A)	1.021	3.000	5.014
MO-6 (B)	CPP-17-010B	1.027	3.005	5.002
MO-6 (C)	CPP-17-011	1.019	3.005	5.011
MO-7 (A)	CPP-17-012	1.006	3.004	5.042
MO-7 (B)	CPP-17-013	1.000	3.006	5.023
MO-8 (A)	CPP-17-014	1.006	3.005	5.026
MO-8 (B)	CPP-17-015	1.009	3.003	5.005
MO-8 (C)	CPP-17-016	1.014	3.000	5.028
MO-9 (A)	CPP-17-017	1.011	3.000	5.014
MO-9 (B)	CPP-17-018	1.011	3.015	5.026
MO-10 (A)	CPP-17-019	1.000	3.013	5.010
MO-10 (B)	CPP-17-020(A)	1.002	3.012	5.002
MO-10 (B)	CPP-17-020B	1.014	3.003	5.016
MO-11 (A)	CPP-17-021	1.020	3.004	5.020
MO-11 (B)	CPP-17-022	1.016	3.007	5.019
MO-11 (C)	CPP-17-023	1.003	3.033	5.019
MO-12 (A)	CPP-17-024	1.009	3.007	5.015
MO-12 (B)	CPP-17-025	1.013	3.011	5.022
MO-13 (A)	CPP-17-026	1.017	3.018	5.013
MO-13 (B)	CPP-17-027	1.021	3.000	5.004
AM-12	CPP-17-028	1.030	3.002	5.011
AM-411	CPP-17-029	1.004	3.000	5.020
AM-289	CPP-17-030(A)	1.009	3.000	5.011
AM-289	CPP-17-030B	1.011	3.000	5.015
AM-299	CPP-17-031	1.027	3.002	5.009
AM-370	CPP-17-032	1.023	3.000	5.008
AM-583	CPP-17-033	1.008	3.007	5.002
AM-19	CPP-17-034	1.004	3.006	5.012
AM-392	CPP-17-035	1.010	3.000	5.014
AM-150	CPP-17-036	1.000	3.007	5.037
AM-157	CPP-17-037	1.020	3.012	5.020
AM344(A)	CPP-17-038	1.005	3.013	5.013
AM344(B)	CPP-17-039	1.000	3.021	5.015
AM-11	CPP-17-040(A)	1.017	3.010	5.026
AM-11	CPP-17-040B	1.015	3.005	5.024
AM-460	CPP-17-041	1.022	3.022	5.018
AM-310	CPP-17-042	1.002	3.017	5.023
AM-416	CPP-17-043	1.001	3.004	5.013
AM588(A)	CPP-17-044	1.013	3.031	5.000
AM588(B)	CPP-17-045	1.018	3.002	5.015
AM-540	CPP-17-046	1.004	3.004	5.014
AM-222	CPP-17-047	1.021	2.005	5.007
AM-391	CPP-17-048	1.015	3.002	5.013
AM-520	CPP-17-049	1.004	3.007	5.020
AM-223	CPP-17-050(A)	1.009	3.004	5.000
AM-223	CPP-17-050B	1.007	3.029	5.000

---



AM-371	CPP-17-051	1.018	3.000	5.028
AM-13	CPP-17-052	1.000	3.001	5.000
AM-541	CPP-17-053	1.023	3.011	5.022
AM-354	CPP-17-054	1.028	3.002	5.012
AM-397	CPP-17-055	1.011	3.020	5.019
AM-204	CPP-17-056	1.000	3.004	5.016
AM-S/N	CPP-17-057	1.010	3.019	5.008
MO-14 (A)	CPP-17-058	1.014	3.006	5.016
MO-14 (B)	CPP-17-059	1.012	3.022	5.020

**MO:** Mercado Modelo.

**AM:** Mercado América.

**Anexo 113.** Resultados del análisis ELISA.

<b>RESULTADOS ANÁLISIS ELISA</b>				
<i>Número del Puesto</i>	<i>Codificación</i>	<i>SULFONAMIDA (ug/kg)</i>	<i>ENROFLOXACINA (ug/kg)</i>	<i>TILOSINA (ug/kg)</i>
MO-2 (A)	CPP-17-001	ND	ND	ND
MO-2 (B)	CPP-17-002	ND	ND	ND
MO-3 (A)	CPP-17-003	ND	ND	ND
MO-3 (B)	CPP-17-004	ND	ND	ND
MO-4 (A)	CPP-17-005	ND	ND	ND
MO-4 (B)	CPP-17-006	ND	ND	ND
MO-5 (A)	CPP-17-007	ND	ND	ND
MO-5 (B)	CPP-17-008	ND	ND	ND
MO-6 (A)	CPP-17-009	ND	ND	ND
MO-6 (B)	CPP-17-010	ND	ND	ND
<b>MO-6 (C)</b>	<b>CPP-17-011</b>	<b>0.43</b>	ND	ND
<b>MO-7 (A)</b>	<b>CPP-17-012</b>	<b>0.44</b>	ND	ND
MO-7 (B)	CPP-17-013	ND	ND	ND
MO-8 (A)	CPP-17-014	ND	ND	ND
MO-8 (B)	CPP-17-015	ND	ND	ND
MO-8 (C)	CPP-17-016	ND	ND	ND
<b>MO-9 (A)</b>	<b>CPP-17-017</b>	<b>0.4</b>	ND	ND
<b>MO-9 (B)</b>	<b>CPP-17-018</b>	<b>0.44</b>	ND	ND
<b>MO-10 (A)</b>	<b>CPP-17-019</b>	<b>0.59</b>	ND	ND
<b>MO-10 (B)</b>	<b>CPP-17-020</b>	<b>0.45</b>	ND	ND
<b>MO-11 (A)</b>	<b>CPP-17-021</b>	<b>0.48</b>	<b>12.35</b>	ND
<b>MO-11 (B)</b>	<b>CPP-17-022</b>	ND	<b>2.76</b>	ND
MO-11 (C)	CPP-17-023	ND	ND	ND
MO-12 (A)	CPP-17-024	ND	ND	ND
MO-12 (B)	CPP-17-025	ND	ND	ND
MO-13 (A)	CPP-17-026	ND	ND	ND

MO-13 (B)	CPP-17-027	ND	ND	ND
AM-12	CPP-17-028	ND	ND	ND
AM-411	CPP-17-029	ND	ND	ND
AM-289	CPP-17-030	ND	ND	ND
AM-299	CPP-17-031	ND	ND	ND
AM-370	CPP-17-032	ND	ND	ND
AM-583	CPP-17-033	ND	ND	ND
AM-19	CPP-17-034	ND	ND	ND
AM-392	CPP-17-035	ND	ND	ND
AM-150	CPP-17-036	ND	ND	ND
<b>AM-157</b>	<b>CPP-17-037</b>	<b>0.4</b>	ND	ND
AM344(A)	CPP-17-038	ND	ND	ND
<b>AM344(B)</b>	<b>CPP-17-039</b>	<b>0.93</b>	ND	ND
<b>AM-11</b>	<b>CPP-17-040</b>	<b>0.43</b>	ND	ND
<b>AM-460</b>	<b>CPP-17-041</b>	<b>0.41</b>	ND	ND
<b>AM-310</b>	<b>CPP-17-042</b>	<b>0.43</b>	ND	ND
<b>AM-416</b>	<b>CPP-17-043</b>	<b>0.45</b>	ND	ND
AM588(A)	CPP-17-044	ND	ND	ND
AM-588(B)	CPP-17-045	ND	ND	ND
<b>AM-540</b>	<b>CPP-17-046</b>	<b>0.424</b>	ND	ND
<b>AM-222</b>	<b>CPP-17-047</b>	<b>0.71</b>	<b>2.44</b>	ND
AM-391	CPP-17-048	ND	ND	ND
<b>AM-520</b>	<b>CPP-17-049</b>	<b>0.42</b>	ND	ND
<b>AM-223</b>	<b>CPP-17-050</b>	ND	<b>3.07</b>	ND
AM-371	CPP-17-051	ND	ND	ND
AM-13	CPP-17-052	ND	ND	ND
<b>AM-541</b>	<b>CPP-17-053</b>	<b>4.75</b>	ND	ND
<b>AM-354</b>	<b>CPP-17-054</b>	<b>0,42</b>	ND	ND
<b>AM-397</b>	<b>CPP-17-055</b>	<b>2.99</b>	<b>3.34</b>	ND
<b>AM-204</b>	<b>CPP-17-056</b>	<b>2.801</b>	<b>2.48</b>	ND
AM-S/N	CPP-17-057	ND	<b>2.85</b>	ND
<b>MO-14 (A)</b>	<b>CPP-17-058</b>	<b>0.4</b>	ND	ND
<b>MO-14 (B)</b>	<b>CPP-17-059</b>	<b>0.53</b>	ND	ND

ND: no detectado.

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/_CPP/09-FO01</b>
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	<b>Rev. 1</b>
		<b>Hoja 1 de 6</b>

Informe N°: LN-CPP-E17-001  
 Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

#### DATOS DEL CLIENTE

**Persona o Empresa solicitante:** Vanessa Estrella  
**Dirección:** La Armenia **Teléfono:** 0992917868  
**Provincia:** Pichincha **Cantón:** Quito **Correo Electrónico:** paho2092@yahoo.com  
**N° Factura/Memorando:** 41-M **N° Orden de Trabajo:** CPP-17-CGLS-0621

#### DATOS DE LA MUESTRA:

<b>Provincia:</b>	Tungurahua	<b>Tipo de muestra:</b>	carne de pollo
<b>Cantón:</b>	Ambato	<b>Conservación de la muestra:</b>	congelada
<b>Parroquia:</b>	-	<b>Tipo de envase:</b>	funda plástica
<b>Fecha de muestreo:</b>	19-20-mar-2017	<b>Fecha de inicio de análisis:</b>	22/03/2017
<b>Fecha de recepción de la muestra:</b>	22/03/2017	<b>Fecha de finalización de análisis:</b>	11/04/2017

#### RESULTADOS DEL ANÁLISIS

MÉTODO REFERENCIAL/ MÉTODO INTERNO: METODO ELISA

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANÁLITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-001	MO-2A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-002	MO-2B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-003	MO-3A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-004	MO-3B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-005	MO-4A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-006	MO-4B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-007	MO-5A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100



**LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS**  
 Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito  
 Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/PPP/09-FO01

Rev. 1

INFORME DE ANÁLISIS

Hoja 2 de 6

Informe N°: LN-PPP-E17-001  
 Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANALITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-008	MO-5B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-009	MO-6A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-010	MO-6B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-011	MO-6C	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,43		100
CPP-17-012	MO-7A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,44		100
CPP-17-013	MO-7B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-014	MO-8A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-015	MO-8B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-016	MO-8C	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-017	MO-9A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,4		100
CPP-17-018	MO-9B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,44		100
CPP-17-019	MO-10A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,59		100



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

**LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS**

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito  
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/\_CPP/09-F001

Rev. 1

**INFORME DE ANÁLISIS**

Hoja 3 de 6

Informe N°: LN-CPP-E17-001  
Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANALITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-020	MO-AB	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,45		100
CPP-17-021	MO-11A	ENROFLOXACINA	12,35	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,48		100
CPP-17-022	MO-11B	ENROFLOXACINA	2,76	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-023	MO-11C	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-024	MO-12A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-025	MO-12B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-026	MO-13A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-027	MO-13B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-028	AM-12	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-029	AM-411	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-030	AM-289	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-031	AM-299	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/CPP/09-FO01</b>
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	<b>Rev. 1</b>
		<b>Hoja 4 de 6</b>

Informe N°: LN-CPP-E17-001  
 Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANALITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-032	AM-370	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-033	AM-583	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-034	AM-19	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-035	AM-392	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-036	AM-150	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-037	AM-157	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,4		100
CPP-17-038	AM-344	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-039	AM-344B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,93		100
CPP-17-040	AM-11	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,43		100
CPP-17-041	AM-460	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,41		100
CPP-17-042	AM-310	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,43		100
CPP-17-043	AM-416	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,45		100



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRO

**LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS**

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito  
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/\_CPP/09-FO01

Rev. 1

**INFORME DE ANÁLISIS**

Hoja 5 de 6

Informe N°: LN-CPP-E17-001  
Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANALITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-044	AM-588	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-045	AM-588B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-046	AM-540	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,424		100
CPP-17-047	AM-222	ENROFLOXACINA	2,44	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,71		100
CPP-17-048	AM-391	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-049	AM-520	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,42		100
CPP-17-050	AM-223	ENROFLOXACINA	3,07	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-051	AM-371	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-052	AM-13	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-053	AM-541	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	4,75		100
CPP-17-054	AM-354	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,42		100
CPP-17-055	AM-397	ENROFLOXACINA	3,34	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	2,99		100

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASESORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRÍCO	<b>LABORATORIO DE CONTAMINANTES DE PRODUCTOS PECUARIOS</b> Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP, Tumbaco - Quito Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845	<b>PGT/PPP/09-FO01</b>  <b>Rev. 1</b>
	<b>INFORME DE ANÁLISIS</b>	<b>Hoja 6 de 6</b>

Informe N°: LN-CPP-E17-001  
 Fecha de Emisión Informe: 12-04-2017

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	ANALITO DETECTADO	RESIDUOS ENCONTRADOS (ug/kg)	MÉTODO	LMR** (ug/kg)
CPP-17-056	AM-204	ENROFLOXACINA	2,48	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	2,801		100
CPP-17-057	AM-5N	ENROFLOXACINA	2,85	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	ND		100
CPP-17-058	MO-14A	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,4		100
CPP-17-059	MO-14B	ENROFLOXACINA	ND	ELISA	100
		TILOSINA	ND		100
		SULFAMIDAS	0,53		100

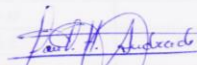
ND: No detectado ppb: Partes por billón (ng/kg).

\*\*Límites Máximos para Residuos (LMR) recomendados por la Comisión del Codex Alimentarius FAO/OMS 2015 o por el REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009

\*\*\*Es recomendable que todas las muestras positivas sean confirmadas con el método confirmatorio que es cromatografía con detección masas.

**Analizado por:** Paulette Andrade

**Observaciones:** NA



Quim. A. Paulette Andrade

**Responsable Técnico**

**Laboratorio de Contaminantes de Productos Pecuarios**

## Anexo 114. ANÁLISIS DE LA VARIANZA (MO)

### RESIDUOS MERCADO MODELO

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RESIDUOS MO	81	0,03	3,7E-03	588,70

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,51	2	2,26	1,15	0,3219
TRATAMIENTOS	4.51	2	2,26	1,15	0,3219
Error	153,00	78	1,96		
Total	157,51	80			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,91073**

*Error: 1,9615 gl: 78*



TRATAMIENTOS	Medias	N	E.E	
SULFONAMIDA	0,15	27	0,27	A
ENROFLOXACINA	0,56	27	0,27	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### **Anexo 115. ANÁLISIS DE LA VARIANZA (AM)**

#### **RESIDUOS MERCADO AMERICA**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RESIDUOS AM	90	0,07	0,05	267,85

#### **Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,95	2	2,47	3,16	0,0475
TRATAMIENTOS	4,95	2	2,47	3,16	0,0475
Error	68,18	87	0,78		
Total	73,13	89			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,54502**

*Error: 0,7837 gl: 87*

TRATAMIENTOS	Medias	N	E.E		
ENROFLOXACINA	0,47	30	0,16	A	B
SULFONAMIDA	0,52	30	0,16		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Anexo 116.** Registro de Muestras para Análisis ELISA (Enrofloxacin).

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	Blanco	Standard 4 1 ppb	Cpp-17-001	Cpp-17-009	Cpp-17-016	Cpp-17-023	Cpp-17-030B	Cpp-17-038	Cpp-17-045	Cpp-17-052		
<b>B</b>	Blanco	Standard 4 1 ppb	Cpp-17-002	Cpp-17-010A	Cpp-17-017	Cpp-17-024	Cpp-17-031	Cpp-17-039	Cpp-17-046	Cpp-17-053		
<b>C</b>	Standard 1 0.1 ppb	Standard 5 5 ppb	Cpp-17-003	Cpp-17-010B	Cpp-17-018	Cpp-17-025	Cpp-17-032	Cpp-17-040A	Cpp-17-047	Cpp-17-054		
<b>D</b>	Standard 1 0.1 ppb	Standard 5 5 ppb	Cpp-17-004	Cpp-17-011	Cpp-17-019	Cpp-17-026	Cpp-17-033	Cpp-17-040B	Cpp-17-048	Cpp-17-055		
<b>E</b>	Standard 2 0.25 ppb	Standard 4 1 ppb	Cpp-17-005	Cpp-17-012	Cpp-17-020A	Cpp-17-027	Cpp-17-034	Cpp-17-041	Cpp-17-049	Cpp-17-056		
<b>F</b>	Standard 2 0.25 ppb	Standard 4 1 ppb	Cpp-17-006	Cpp-17-013	Cpp-17-020B	Cpp-17-028	Cpp-17-035	Cpp-17-042	Cpp-17-050A	Cpp-17-057		
<b>G</b>	Standard 3 0.5 ppb	QC 1	Cpp-17-007	Cpp-17-014	Cpp-17-021	Cpp-17-029	Cpp-17-036	Cpp-17-043	Cpp-17-050B	Cpp-17-058		
<b>H</b>	Standard 3 0.5 ppb	QC 2	Cpp-17-008	Cpp-17-015	Cpp-17-022	Cpp-17-030A	Cpp-17-037	Cpp-17-044	Cpp-17-051	Cpp-17-059		

**Anexo 117.** Registro de Muestras para Análisis ELISA (Tilosina).

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	Blanco	Standard 4 10 ppb	Cpp-17-001	Cpp-17-009	Cpp-17-016	Cpp-17-023	Cpp-17-030B	Cpp-17-038	Cpp-17-045	Cpp-17-052		
<b>B</b>	Blanco	Standard 4 10 ppb	Cpp-17-002	Cpp-17-010A	Cpp-17-017	Cpp-17-024	Cpp-17-031	Cpp-17-039	Cpp-17-046	Cpp-17-053		
<b>C</b>	Standard 1 1 ppb	Standard 5 25 ppb	Cpp-17-003	Cpp-17-010B	Cpp-17-018	Cpp-17-025	Cpp-17-032	Cpp-17-040A	Cpp-17-047	Cpp-17-054		
<b>D</b>	Standard 1 1 ppb	Standard 5 25 ppb	Cpp-17-004	Cpp-17-011	Cpp-17-019	Cpp-17-026	Cpp-17-033	Cpp-17-040B	Cpp-17-048	Cpp-17-055		
<b>E</b>	Standard 2 2.5 ppb	QC 1 ppb	Cpp-17-005	Cpp-17-012	Cpp-17-020A	Cpp-17-027	Cpp-17-034	Cpp-17-041	Cpp-17-049	Cpp-17-056		
<b>F</b>	Standard 2 2.5 ppb	QC 1 ppb	Cpp-17-006	Cpp-17-013	Cpp-17-020B	Cpp-17-028	Cpp-17-035	Cpp-17-042	Cpp-17-050A	Cpp-17-057		
<b>G</b>	Standard 3 5 ppb	QC 2 25 ppb	Cpp-17-007	Cpp-17-014	Cpp-17-021	Cpp-17-029	Cpp-17-036	Cpp-17-043	Cpp-17-050B	Cpp-17-058		
<b>H</b>	Standard 3 5 ppb	QC 2 25 ppb	Cpp-17-008	Cpp-17-015	Cpp-17-022	Cpp-17-030A	Cpp-17-037	Cpp-17-044	Cpp-17-051	Cpp-17-059		

**Anexo 118.** Registro de Muestras para Análisis ELISA (Sulfonamide).

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	Blanco	Standard 4 15 ppb	Cpp-17-001C	Cpp-17-009	Cpp-17-016	Cpp-17-023	Cpp-17-030B	Cpp-17-038	Cpp-17-045	Cpp-17-052		
<b>B</b>	Blanco	Standard 4 15 ppb	Cpp-17-002	Cpp-17-010A	Cpp-17-017	Cpp-17-024	Cpp-17-031	Cpp-17-039	Cpp-17-046	Cpp-17-053		
<b>C</b>	Standard 1 0.5 ppb	Standard 5 50 ppb	Cpp-17-003	Cpp-17-010B	Cpp-17-018	Cpp-17-025	Cpp-17-032	Cpp-17-040A	Cpp-17-047	Cpp-17-054		
<b>D</b>	Standard 1 0.5 ppb	Standard 5 50 ppb	Cpp-17-004	Cpp-17-011	Cpp-17-019	Cpp-17-026	Cpp-17-033	Cpp-17-040B	Cpp-17-048	Cpp-17-055		
<b>E</b>	Standard 2 1.5 ppb	QC 5.0 ppb	Cpp-17-005	Cpp-17-012	Cpp-17-020A	Cpp-17-027	Cpp-17-034	Cpp-17-041	Cpp-17-049	Cpp-17-056		
<b>F</b>	Standard 2 1.5 ppb	QC 5 ppb	Cpp-17-006	Cpp-17-013	Cpp-17-020B	Cpp-17-028	Cpp-17-035	Cpp-17-042	Cpp-17-050A	Cpp-17-057		
<b>G</b>	Standard 3 5.0 ppb	Cpp-17-001A	Cpp-17-007	Cpp-17-014	Cpp-17-021	Cpp-17-029	Cpp-17-036	Cpp-17-043	Cpp-17-050B	Cpp-17-058		
<b>H</b>	Standard 3 5.0 ppb	Cpp-17-001B	Cpp-17-008	Cpp-17-015	Cpp-17-022	Cpp-17-030A	Cpp-17-037	Cpp-17-044	Cpp-17-051	Cpp-17-059		