

Artículo original

APLICACIÓN DEL HPLC EN EL ESTABLECIMIENTO DEL PERIODO DE LATENCIA DE LA OXITETRACICLINA EN MÚSCULO DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*) EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN SEMI-INTENSIVO EN CUBA

A. Escobar*, R. Faure*, Dayana Sosa*, A. Betancourt*, Damaiky Hernández**

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10 San Jose de las Lajas, La Habana Cuba. Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu; **Grupo Empresarial para el Desarrollo del Cultivo de Camarón (GEDECAM)

RESUMEN: Se desarrolló una metodología para la determinación de oxitetraciclina en músculo de camarón por cromatografía líquida de alta resolución empleando columna de fase reversa y detección UV a 340 nm. La extracción se desarrolló con una solución McIlvaine-EDTA y los extractos fueron purificados empleando columnas de extracción fase sólida (C18-500mg-6mL). El método presentó un recobrado entre 78.2±9.9 % con una precisión menor del 10% en las concentraciones de 200 y 400 ng/g, la linealidad mostró un coeficiente de correlación mayor de 0.99 y el límite de detección fue 105 ng/g. Se estableció el periodo de latencia de la oxitetraciclina en músculo de camarones (*Litopenaeus vannamei*) entre 14-20 días cuando se suministra el alimento medicamentado a una dosis de 4g/kg durante 14 días en condiciones de producción semi-intensivo. Los análisis de residualidad en cinco camaronerías en el momento de la cosecha nos mostraron niveles de oxitetraciclinas superiores a 100 ng/g.

(Palabras clave: oxitetraciclina; HPLC; camarón; periodo de latencia)

APPLICATION OF HPLC IN THE OXYTETRACYCLINE LATENCY PERIOD ESTABLISHMENT IN THE SHRIMP MUSCLE (*Litopenaeus vannamei*) IN A SEMI-INTENSIVE PRODUCTION SYSTEM IN CUBA

ABSTRACT: A methodology for determining of oxytetracycline in shrimp muscle by high performance liquid chromatography was developed using reverse phase column and UV detection at 340 nm. Extraction was done with a solution McIlvaine-EDTA and the extracts purified using solid phase extraction columns (C18-6mL-500mg). The method showed a recovered between 78.2 ± 9.9% with a precision lesser than 10% in the concentrations of 200 and 400 ng/g, linearity showed a correlation coefficient higher than 0.99 and the detection limit was 105 ng/g. Oxytetracycline latency period in shrimp muscle (*Litopenaeus vannamei*) was set between 14-20 days when the medicated feed containing 4g/kg was supplied for 14 days under semi intensive production conditions. The analyses of residues in five shrimp farm at the harvest time showed oxytetracycline levels above 100 ng/g.

(Key words: oxytetracycline; HPLC; shrimp; latency period)

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en Cuba constituye un reglón importante en los planes de incrementar la seguridad alimentaria y en la exportación hacia diferentes mercados en Europa. La producción de camarón a nivel nacional se ha incrementado en los últimos años siendo de 2360 y 4348 t en el 2005 y-2006 respectivamente en relación al periodo 2000-2004 que fue de 1519 ± 634 t (1). La principal especie es el *Penaeus vannamei* introducida desde el 2003 y estabilizada a partir del 2005 en cinco camaronerías (Cultizaza, Cultisur, SanRos, Calisur y Guajaca) con un sistema de explotación semiintensivo-intensivo (2).

En los últimos 30 años, el cultivo del camarón en el mundo ha mostrado un marcado incremento en la presencia de enfermedades infecciosas y no infecciosas; sin embargo, entre las enfermedades infecciosas solamente cuatro tienen importancia económica para la industria acuícola estas son: el virus de la cabeza amarilla (YHV; Yellow Head Virus), el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV; White Spot Syndrome Virus), el virus de la necrosis hematopoyética (IHHNV; Infectious Hematopoyetic Hypodermic Necrosis virus) y el virus del síndrome Taura (TSV; Taura Syndrome Virus) (3). Con la finalidad de contrarrestar el impacto negativo de estas enfermedades se ha empleado diferentes tratamientos donde las quinolonas representan el mayor grupo de antibióticos sintéticos ampliamente usados en los últimos quince años (4) como agentes profilácticos y/o quimioterapéuticos e indicados para el tratamiento de varias especies de bacterias como *Vibrio harveyi* en *P. indicus* y *monodon* (5,6,7,8), *V. alginolyticus* en camarones y peces (9). Otros antibióticos son oxitetraciclina (OTC), amoxicilina, sarafloxacina, tetraciclina, estreptomycin, cloranfenicol, ácido nalidixico, ritromicina, entre otros (10,11,12).

En Cuba la OTC es el antibiótico más comúnmente usado en la acuicultura de camarones y se brinda en el pienso dosificado según el ciclo de vida. Cuando no se cumple los periodos de retiro o supresión del antibiótico antes la cosecha, pueden aparecer residuos de OTC en músculo que estén por encima del Límite Máximo Permisible (LMP) 200 ng/g y ocasionar riesgo para la salud humana (13,14,15).

Se ha estudiado la farmacocinética de la OTC en diferentes especies de camarones empleando distintas concentraciones y vías de administración, encontrándose una gran variabilidad en los tiempos de vida media de absorción y eliminación en dependencia de los modelos compartimentales empleados, lo que han conllevado que se establezcan tiempos de espera para la cosecha de los camarones que oscilan entre 8 y 30 días que garantice la inocuidad de los mismos (16,17,18,19,20,21,22). La amplia variación en los tiempos de espera puede estar dada además por condiciones ambientales que afectan la farmacocinética del antibiótico.

En Cuba se establece el periodo de latencia para la cosecha a partir de extrapolaciones de investigaciones reportadas en otras regiones, sin considerar las condiciones ambientales y los sistemas de producción a que están sometidos.

Se han descrito diferentes metodologías para la determinación de tetraciclinas en músculo de distintas especies empleando métodos microbiológicos y cromatográficos (23,24), en dependencia de las condiciones ensayadas la interpretación de los resultados pueden variar de un método a otro debido al límite de detección que se obtengan.

Fue objetivo del presente trabajo desarrollar una metodología por HPLC para el establecimiento del periodo de latencia de la oxitetraciclina en músculo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en un sistema de producción semi-intensivo suministrando alimento medicamentado durante 14 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las muestras: Se trabajó con muestras procedentes del estanque 33 de la camaronera 2 con una extensión de 8.6 ha y una biomasa circulando de 6.7t, se tomaron muestras de cinco puntos (extremo y centro del estanque) realizándose un pool de los camarones hasta completar una masa de 500g (muestra primaria). Los muestreos se realizaron a los tiempos cero, tres, seis, diez y catorce días durante el suministro del alimento medicamentado con OTC a una concentración de 4g/ kg (API-Camarón 4 20%) después de retirado el mismo se tomaron muestras a los tres, diez y dieciséis días. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su análisis. Una muestra de camarones fue obtenida en el litoral Sur de la camaronera de Cultisur en su habitat natural y se consideró como muestra blanco.

Reactivos y materiales: Todos los reactivos químicos empleados son de calidad reactivo de la firma comercial Fluka y Merck. Los patrones de oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina son provenientes de la casa comercial Sigma. Los papeles de filtro grado 1 y las columnas de fase sólida (C18) de 400 y 1000 mg son provenientes de la casa comercial Whatman, Merck y Supelco respectivamente.

Preparación de la muestra: Se tomaron muestras de camarones de forma aleatoria a partir de la muestra primaria para conformar una muestra contractual de 20 g, seguidamente se limpió el músculo teniendo cuidado de no dejar residuos de hepatopancrea, ya que puede provocar interferencias en el análisis.

Extracción de OTC: Se pesó 5.0 ± 0.1 g de la muestra previamente limpia por triplicado, se adicionó 20 mL de la solución extrayente (Solución McIlvaine-EDTA) y se agitó en una batidora durante 60 segundos, se traspasó a un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos, posteriormente se decantó la solución a un vaso de precipitado. Se adicionó nuevamente al tubo de centrifuga 20mL de la solución extrayente y se agitó durante 60 segundos en un agitador de tubo, se repitió el proceso de centrifugación y decantación mezclando cada sobrenadante. Una tercera extracción con 10 mL se realizó de igual manera que la anterior. Los eluatos obtenidos de las tres replicas se mezclaron en una sola muestra (~150 mL) y se filtró por un embudo buchner con una frita No 5 y papel de filtro Whatman 41. El filtrado se separó en dos porciones de 50 mL para su purificación en columna de fase sólida.

Purificación en fase sólida

Se empleó una columna de extracción de fase sólida reversa empacada con 400 y 1000 mg de C18 con capacidad de 3 y 6 mL respectivamente.

Acondicionamiento: Se pasó 15 ml de metanol y seguidamente 15 mL de agua. Sin dejar secar la columna se adicionó 25 ó 50 ml de extracto filtrado en correspondencia con la columna empleada de 400 mg o 1000 mg respectivamente. Una vez cargada toda la muestra se lavó la columna con 20-25 mL de agua. Todo este proceso se realizó a un flujo lento 5ml/min (1-5Kpa ó 0-3 in Hg).

Lavada la columna se incrementó el vacío para lograr que no quede residuos de agua en la misma seguidamente se retornó a las condiciones de operación normal que garantiza un flujo lento y se adicionó entre 6 y 7 mL de ácido oxálico metanólico y se recolectó en un tubo de ensayo. (Todo este proceso se realizó a un flujo lento para garantizar un buen recobrado de la sustancia adsorbida en la columna).

Todo el eluato purificado se concentró por rotoevaporación a 40°C hasta sequedad y se almacenó seco a -20°C hasta su análisis. La muestra seca se reconstituyó en 500 ó 1000 μ L en correspondencia con la cantidad de muestra purificada ya sea 25 ó 50 mL respectivamente.

Análisis Cromatográfico

Equipamiento: Se empleó un cromatógrafo líquido de la firma comercial Knauer con detector UV 340nm en un rango de 0.005 y una columna de fase reversa Lichropher C18 (25 cm x 4.6 mm y 5 µm), como fase móvil se empleó una mezcla de ácido oxálico 0.13%:acetonitrilo: metanol (60:30:10 v/v/v), el flujo fue 1.0 mL/min y se aplicaron 10 µL de la muestra previa-mente filtrada por 0,45µm. La conexión de la interface se hace al puerto de 100 mV y los cromatogramas fueron registrados usando una interfase TIC-8EA y procesados con el software BIOCROM.

Para el establecimiento del procedimiento se evaluaron los indicadores de: especificidad linealidad de la curva de calibración, límite de detección y de cuantificación, exactitud y precisión. A continuación se mencionan cada uno:

Especificidad Se preparó una solución madre (SM) de los patrones de tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina en metanol a una concentración de 1 mg/ml. La solución de trabajo (ST) se preparó a partir de una dilución de la SM con la fase móvil a una concentración de 10 µg/mL. Como muestra blanco se empleó el extracto procedente de los camarones cosechado en el mar.

Linealidad: Se procesaron cuatro concentraciones en un rango de 1-10 µg/mL del patrón de referencia por triplicado para determinar la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación entre el área y la concentración del analito. Para la determinación del límite de detección y cuantificación se procesaron curvas en el rango normal de la determinación (1-10 µg/mL) y en una cercana al límite de detección (0.5 -1.5 µg/mL) por triplicado en cada uno de los puntos. Se procedió a determinar los valores de LD y LC y se consideró tres y diez desviaciones estándar del blanco para (n) medidas individuales (ecuaciones 1 y 2).

$$\text{Límite de detección} = (Y_{bl} + 3 S_{bl})/b \quad (1)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = (Y_{bl} + 10 S_{bl})/b \quad (2)$$

La sensibilidad de calibración corresponde con la pendiente de la curva de calibración y la sensibilidad analítica es el cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Exactitud: Se prepararon tres niveles de concentración de oxitetraciclina por triplicado (200, 400 y 800 µg/g en una muestra de camarón natural cosechado en el litoral sur y se determinó el recobrado por comparación de las cantidades teóricas con los valores determinados empleando dos tipos de columnas de fase sólida (Merck y Supelco).

Precisión

Se procesaron en condiciones óptimas (equipo, analista y lotes de reactivos idéntico) 10 réplicas de una misma muestra en las concentraciones de 200 y 400 ng/g, realizando el análisis en el mismo día. Se determinó la media y la desviación estándar (Sr) empleando la estadística descriptiva del programa Microsoft Office Excel 2003 y el rango crítico (RC) mediante la ecuación (1).

$$RC(n) = f(n) \times Sr \dots\dots\dots(4)$$

Donde:

Sr es la desviación estándar

f(n) es el factor de rango crítico para una n determinada (para muestra duplicada el factor es 2.8

RESULTADOS DISCUSIÓN

La metodología empleada en este trabajo combina diferentes procedimientos como es el uso de columna de extracción de fase sólida en la purificación y la determinación por HPLC con detección UV empleando columna de fase reversa (19,25,26), sin embargo, el uso de la misma requiere de una validación previa que muestre confiabilidad en los resultados donde se analice la especificidad, la linealidad, el recobrado, la precisión y los límites de detección cuantificación como los principales parámetros a evaluar en un ensayo cuantitativo (27).

En la Figura 1 se muestra el perfil cromatográfico de las tetraciclinas en las condiciones ensayadas detectando las tres tetraciclinas (tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) y clortetraciclina (CTC)) cuando se analiza por separados con tiempos de retención de 3.94, 4.57 y 6.67 min respectivamente, sin embargo no se puede determinar la oxitetraciclina y la tetraciclina si están presente en una misma muestra ya que la resolución entre ellos es menor que 1. Estos resultados no comprometen la evaluación de la residualidad en músculos de camarones ya que en Cuba solamente es permitido emplear la OTC para el tratamiento de las enfermedades.

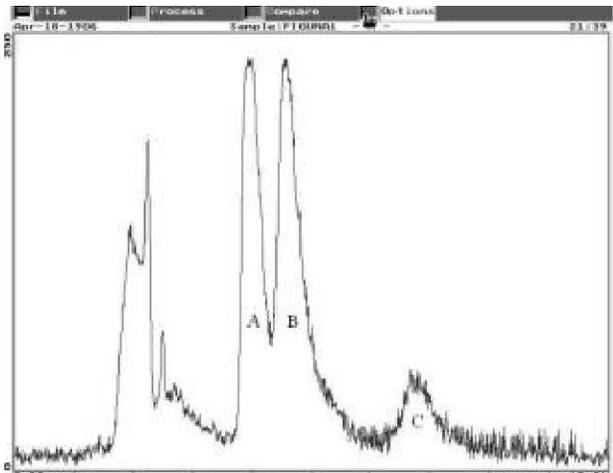


FIGURA 1. Perfil cromatográfico de las tetraciclinas empleando un sistema de HPLC con columna de fase reversa .A= tetraciclina, B= oxitetraciclina y C= Clortetraciclina./ *Chromatographic profile of tetracyclines using HPLC system with column of reverse phase C18. A Tetracycline; B Oxytetracycline and C Chlortetracycline.*

En la Figura 2 no se observa interferencia por parte de la matriz con el tiempo de retención de la OTC, cuando la muestra blanco es purificada por columna de fase sólida C18 (1g capacidad de 6mL) lo que permite identificar la misma si esta presente en la muestra.

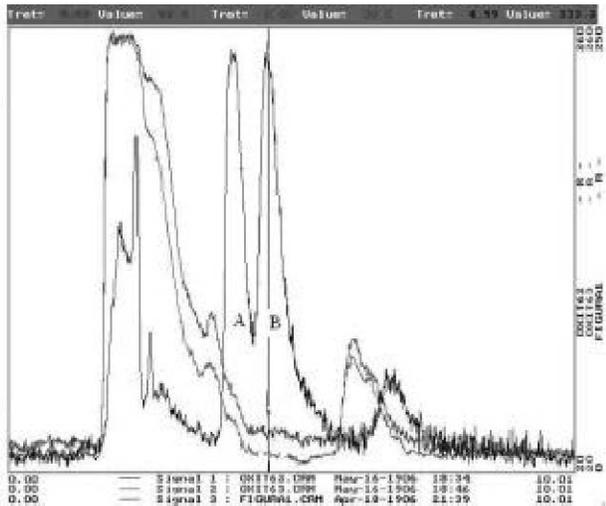


FIGURA 2. Perfil cromatográfico de muestra blanco con respecto al patrón de oxitetraciclina empleando columna de fase reversa C18 (1g capacidad 6 mL). A= tetraciclina, B= oxitetraciclina./ *Chromatographic profile of white sample system with regard to the oxytetracycline pattern using column of reverse phase C18 (1g capacity 6 mL).. A Tetracycline; B Oxytetracycline.*

El recobrado de la oxitetraciclina se muestra en la Tabla 1 donde se emplearon dos tipos de columna de extracción de fase sólida con una media general de 78.2±9.9 % estando en el mismo orden que el planteado por la AOAC que es de mayor de 95% (28). El análisis por tipo de columna mostró que las columnas de Supelco con una masa de 1000 mg muestra un mayor recobrado que la columna de 400 mg cuando se analizan las concentraciones de 400 y 800 ng/g, lo que puede explicarse por una saturación de la cantidad de masa presente en la columna debido al efecto matriz, cuando se analiza el recobrado con estas mismas concentraciones pero empleando un blanco de reactivos sin considerar la matriz el recobrado fue de 102.75±11.3%, lo que corrobora el planteamiento anteriormente mencionado.

TABLA 1. Recobrado de la Oxitetraciclina en músculo de camarones empleando diferentes columnas de extracción de fase sólida./ *Recovered of oxyteracycline in shrimp muscle tissue using different solid phase extraction column*

Columna	Conc. ng/g	Conc. ng/g	Recobrado %	Media general
Supelco Capacidad 6mL Masa 1000 mg	CN +OXT 400	327.3±32.1	76.1	84.66±4.02
	CN +OXT 800	700±28.3	87.50	
Merck (ADSORBEX) Capacidad 3mL Masa 400 mg	CN+OXT 200	147.6±14.9	73.78	71.70±2.36
	CN+OXT 400	276.5±50.1	69.13	
	CN+ OXT 800	577.5±16.3	72.19	
Merck (ADSORBEX) Capacidad 3mL Masa 400 mg	BC+OXT 200	221.5±58.7	110.75	102.75±11.31
	BC+OXT 400	379.6±39.0	94.9	

CN Muestra Blanco BC blanco de reactivo

En la Figura 3 se muestra la curva de calibración del patrón de OTC disuelta en la fase móvil desde 1 hasta 10.0 µg/ml, mostrando un coeficiente de regresión (r) y un coeficiente de correlación (r²) de 0.993 y 0.987 respectivamente. La recta de mejor ajuste fue $Y = -7.81 + 18.706X$. Por otra parte los resultados de la curva muestran que la correlación fue significativa para una $p < 0.05$. El coeficiente de

variación de la pendiente fue de 1.23 y el intervalo de confianza de la pendiente varió entre 15.28-22.13.

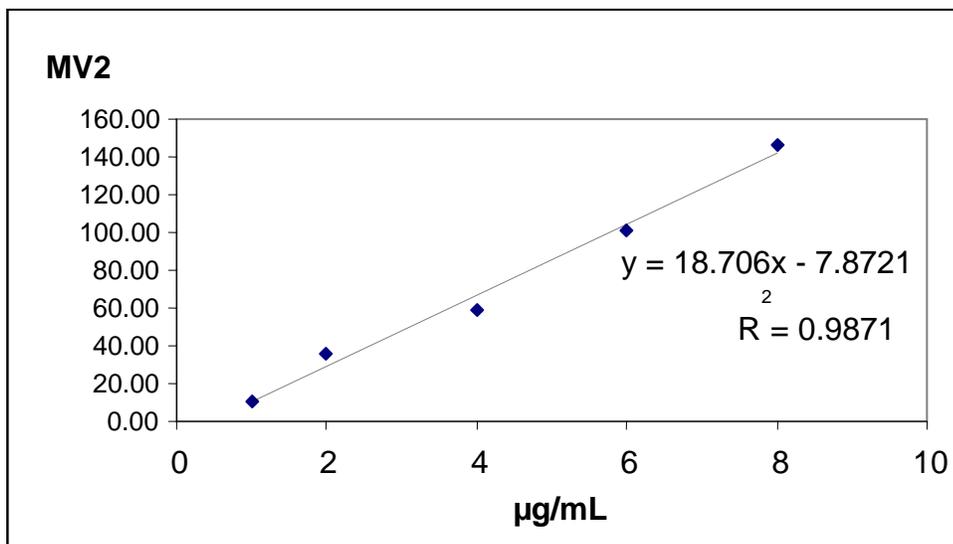


FIGURA 3. Curva de calibración de OTC disuelta en fase móvil (ácido oxálico 0.13%:acetonitrilo: metanol (60:30:10 v/v/v))./ *Oxytetracycline calibration curve dissolved in movil phase (Oxalic acid 0.13%:Acetonitrile: Methanol (60:30:10 v/v/v)).*

Los límites de detección y cuantificación mostraron valores de 105 y 170 ng/g respectivamente.

La precisión del ensayo se muestra en la Tabla 2 para las concentraciones de 200 y 400 ng/g , observándose que el coeficiente de variación es inferior al 10% lo que demuestra la fiabilidad del método. Un resultado satisfactorio para un estudio interno en correspondencia con la concentraciones estudiadas pueden alcanzar valores de coeficiente de variación hasta el 20% (28).

TABLA 2. Resultados del estudio de precisión empleando columna de extracción de fase sólida (1g C18 y una capacidad de 6 mL)/ *Results of the precision study using Solid Phase Extraction column (1gr C18 and 6 mL of capacity)*

	200 ng/g	400 ng/g
Media	147	332.22
DS	10.6	21.54
RSD	7.2	6.48
Recobrado	73.8±5.3	83.06±5.4
Rango crítico	29.5	60.3

Existen diferentes procedimientos para la determinación de tetraciclinas en tejidos que se diferencian entre ellos en dos etapas fundamentales, la primera relacionada con la extracción y purificación de OTC del músculo, donde emplean columna de extracción de fase sólida (25,28,29) o separación por centrifugación (19,30), aspectos que disminuyen el tiempo del análisis y un menor gasto de reactivos con respecto a procedimientos convencionales de purificación en columna, el segundo aspecto son las condiciones utilizadas en el sistema de HPLC, cambiando fase móvil, columna y tipo de detector (19,25,28,29,30,31), en todos ellos se evalúan las principales características del ensayo relacionado con límite de detección, precisión y recobrado, sin embargo solamente uno aparece como método

oficial de la AOAC para la determinación de OTC en músculo de porcino y bovino (28), todo lo anterior confirma que todo nuevo método se debe someter a un proceso de validación que permita brindar resultados confiables. De manera general los recobrados oscilaron entre 75-112% con un coeficiente de variación inferior 20% en dependencia del ensayo.

En nuestro caso el límite de detección y el recobrado están en los mismos órdenes que se mencionaron anteriormente variando solo en el perfil cromatográfico. Los resultados obtenidos permiten determinar la presencia de oxitetraciclina en músculo de camarones en el orden de los 100 ng/g según lo establecido por el CEE y el CODEX (14,15) con indicadores de ensayos satisfactorios.

Los tiempos de espera para la cosecha de los camarones, posterior al tratamiento con antibióticos se fundamenta en los estudios farmacocinética, sin embargo los datos disponibles de farmacocinética de la OTC en mamíferos no puede aplicarse en camarones debido a que son especies acuáticas poiquiloterms con diferente anatomía y fisiología (19), por otra parte los estudios de farmacocinética realizados en especies de camarones refieren diferentes tiempos de absorción y eliminación, que puede estar dado por la especie, la temperatura del agua y la forma de administración (21).

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la acumulación y eliminación de OTC en músculo de camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* realizado en condiciones de producción semi-intensivo mostrando que a los seis días de estar suministrando el alimento medicamentado presentaron la mayor acumulación en el tejido y a los tres días de retirado el medicamento no aparecen residuos del mismo.

TABLA 3. Residualidad de Oxitetraciclina en músculo de camarones (ng/g) durante el suministro de alimentos medicamentados./ *Oxite tetracycline residues in shrimp muscle during the supply of medicated feed*

Puntos de Muestreo	T0	T3	T6	T10	T14	3 días	10 días	16 días
1	<LC	241	459.2	712.6	418	<LC	<LC	<LC
2	<LC	475.1	1029.3	633.4	411.7	<LC	<LC	<LC
3	<LC	158.4	2454.5	1805.2	1764	<LC	<LC	<LC
4	<LC	174.2	1425.2	633.4	601.7	<LC	<LC	<LC
5	<LC	221.7	2232.8	1504.4	285.0	<LC	trazas NQ	<LC
MEDIA ng/g		254.1	1520.2	1057.8	696.1			
Mediana		221.7	1425.2	712.6	418.0			
Valor Mínimo		158.4	459.2	633.4	285.0			
Valor Maximo		475.1	2454.5	1805.2	1764.0			

Un estudio similar de acumulación y eliminación de OTC en camarón (*Litopenaeus vannamei*) a nivel laboratorio realizado al nordeste de Brasil en el instituto de Ciencia del Mar, empleando una dieta de 4g de OTC/kg en dos experimentos encontraron que la concentración máxima de OTC en el tejido se obtuvo a los 7 y 12 días en cada ensayo, una vez retirado el medicamento la eliminación de la OTC fue muy rápida y a los 16 días se alcanzó la concentración de 0.1 µg/g (Nogueira-Lima et al., 2006). Un estudio donde se emplearon dietas con 2.5 y 5 g de OTC/kg en camarones (*Macrobrachium rosenbergii*) el máximo de concentración de OTC en el músculo fue reportado entre los 4 y 6 días, mientras a los 10 días después de haber retirado el alimento medicamentado la presencia de residuos se encontraba en valores permisibles (16).

Los estudios ante mencionados, incluyendo el nuestro se caracterizan por una rápida absorción y distribución de la OTC en músculo de camarones a las 24 horas de aplicar el tratamiento alcanzando la

máxima concentración entre los 4-7 días en dependencia de la dosificación, esto resultados esta acorde con los estudios realizado de farmacocinética de OTC donde se observa tiempo de vida media de absorción y volumen de distribución aparente menor de 0.3h y mayor de 700 ml/kg/h respectivamente en dependencia de la especie. En nuestro caso se observa una disminución de la concentración de OTC en el ultimo tiempo, un estudio realizado en camarones juveniles suministrando 1.5g de OTC/kg durante 14 días se observó una disminución leve de OTC en músculo en el último tiempo (14 días) (24), en el presente trabajo esta reducción fue mayor y puede ser debido a que trabajamos camarones adultos y estaban en tiempo de cosecha, lo que significa que el camarón consume menos alimento y por tanto la absorción de OTC también es menor, otro factor pudiera estar relacionado con el manejo de la alimentación (31).

De forma general existe el consenso que el establecimiento del momento de la cosecha se debe ajustar a las condiciones de cada sistema y que una vez determinado el mismo por métodos experimentales es recomendable dejar un tiempo mayor para garantizar la eliminación total (26), en nuestro caso no se encontraron niveles de cuantificables de OTC a los 3 10 y 16 días después de retirado el medicamento y sola-mente en una replica se detecto niveles trazas de OTC por lo que se recomendó establecer un tiempo de latencia entre 14 y 20 días después de haber suspendido el tratamiento.

En la Tabla 4 se muestra un estudio de lotes de camarones cosechados durante el 2007 procedentes de diferentes camaroneras una vez establecido el periodo de latencia y no se reportó la presencia de OTC por encima de 100 ng/g.

TABLA 4. Residuos de Oxitetracлина en músculo de camarones procedentes de camaroneras cubanas durante el periodo 2007./ *Oxytetracycline residues in shrimps muscle from Cuban farms during the period 2007*

Procedencia	BIOMASA tonelada	RESULTADO
Camaronera 1	8.0	< 100 ng/g
Camaronera 1	6.1	< 100 ng/g
Camaronera 1	6.3	< 100 ng/g
Camaronera 1	9.0	< 100 ng/g
Camaronera 5)	2.5	< 100 ng/g
Camaronera 3	6.0	< 100 ng/g
Camaronera 3	5.8	< 100 ng/g
Camaronera 3	14.2	< 100 ng/g
Camaronera 3)	5.3	< 100 ng/g
Camaronera 4	5.2	< 100 ng/g
Camaronera 3	6.0	< 100 ng/g
Camaronera 2	7.6	< 100 ng/g

Los resultados anteriores confirman que el procedimiento de HPLC resulta adecuado para la determinación de OTC en músculo de camarones y el periodo de latencia recomendado entre 14-20 días garantizo que después de aplicado el tratamiento con OTC en la concentración de 5g/kg en camarones (*Litopenaeus vannamei*) en un sistema de producción semi-intensivo no se encuentre residuos del mismo por encima del limite máximo permitido (100ng/g) por el CODEX.

REFERENCIAS

1. FIGIS. Production Global Aquaculture Production 1950-2006. '(Updated 2008, cited 2008 sep 25) available from: <http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>
2. GEDECAM. El cultivo de camarón Antecedentes, estado actual y perspectiva para su desarrollo en Cuba (Updated 2006, cited 2008 sep 25).available from: www.alide.org.pe/download/AsambleaAnt/Alide36/download36/AS36_T3_01_Perera_BANDREC.pdf
3. Gómez GB, Roque A, Guerra Flores AL. Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. En: Paez-Osuna F. (Ed.), Camaronicultura y medio ambiente. UNAM. 2001; 14:315-343. (Updated 04-Dec-2007 cited 2008 sep 25).available from <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/>
4. Backhaus T, Scholze M, Grimme L. The single substance and mixture toxicity of the quinolones to the bioluminescent Aquat Toxicol. 2000; 49 (1-2):49-61.
5. Abraham T, Manley R, Palaniappan R, Dhevendaran K. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp J. Aquacult. Tropics. 1997; 12 (1):1-8.
6. Abraham T, Palaniappan R, Dhevendaran K. Epibiotic infestation of luminous bacteria in penaeid shrimp *Penaeus indicus* (H Milne Edwards) larvae. Indian journal of marine sciences 1997; 26 (2):209-212.
7. Moriarty D. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 1998; 164(1-4): 351-358.
8. Pitogo C, Leaña E, Paner M. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture 1998; 164(1-4):337-349.
9. Mishra S. Use of dot immunoassay for rapid detection of pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila* from shrimps and fishes. Indian Journal of Marine Sciences 1998; 27(2):222-226.
10. Marin LGT. Distribución de los residuos de enrofloxacin en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Informe Técnico de CENAIM - ESPOL 2000-2001. (Updated 2008 cited 2008 sep 25).available from www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/tesisbib.html
11. Sangrungruang K, Endo M, Ueno R. Development of a method for forced oral administration of xenobiotics in shrimp. Fisheries Science 2004; 70(3):463-466.
12. Uno K, Aoki T, Kleechaya W, Tanasomwang V, Ruangpan L. Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues. Aquaculture 2006; 254:24-31.
13. Holmström K, Gräslund S, Wahlström, A, Pongshompoo S, Bengtsson B.E, Kautsky N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health, Vol. 38, 2003(3):255-266.
14. CODEX. Residuos de Medicamentos Veterinarios en alimentos. Límites Máximos de Residuos para Clortetraciclina/Oxitetraciclina/Tetraciclina en musculo de Langostino gigante. (Updated 2008 cited 2008 sep 25) available from: http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/jsp/vetd_q-e.jsp
15. CEE. REGLAMENTO (CEE) No 2377/90 DEL CONSEJO de 26 de junio de 1990.por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. (Updated 2008 cited 2008 sep 25) available from: http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-5/reg_1990_2377_consol/reg_1990_2377_consol_es.pdf
16. Brillantes S, Tanasomwang V, Thongrod S, Dachanantawitaya N. Oxytetracycline residues in

- giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *J Agric Food Chem.* 2001; 49(10):4995-4999.
17. Chiayvareesajja S, Chandumpai A, Theapparatt Y, Faroongsarng D. The complete analysis of oxytetracycline pharmacokinetics in farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics* 2006; 29(5):409-414.
 18. Poapolathep A, Poapolathep S, Imsilp K, Wannapat N, Klangkaew N, Kusutjarit N, et al. Distribution and Residue Depletion of Oxytetracycline in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Food Protection* 2008; 71(4):870-873.
 19. Reed L, Siewicki T, Shah J. Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* 2004; 232(1-4):11-28.
 20. Reed L, Siewicki T, Shah J. The biopharmaceutics and oral bioavailability of two forms of oxytetracycline to the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* 2006; 258(1-4):42-54.
 21. Sangrungruang K, Chotchuangand A, Ueno R. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in giant tiger prawn. *Fisheries Science* 2004; 70(3):467-472.
 22. Uno K. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 2004; 230(1-4):1-11
 23. Charoenraks T, Chuanuwatanahul S, Honda K, Yamaguchi Yk, Chailapakul, O. Analysis of Tetracycline Antibiotics Using HPLC with Pulsed Amperometric Detection. *Analytical Sciences* 2005; 21:241-245.
 24. Mohny L, Williams R, Bell T, Lightner D. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea: Decapod) , fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture* 1997; 149:193-202.
 25. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2005; 529(1-2):145-150.
 26. Nogueira-Lima A, Gesteira T, Mafezoli J. Oxytetracycline residues in cultivated marine shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) (Crustacea, Decapoda) submitted to antibiotic treatment. *Aquaculture* 2006; 254(1-4):748-757.
 27. ICH. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). (Updated 2005 cited 2008 sep 25) available from: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> .
 28. AOAC Official Method 995.09. Chlortetracycline, Oxytetracycline and Tetracycline in edible animal tissues. *Liquid Chromatographic Method*. AOAC 2000 2000; chapter 23, 23.1.17:20-24.
 29. Carson MC, Bullock G, Bebak-Williams J. Determination of Oxytetracycline Residues in Matrixes from a Freshwater Recirculating Aquaculture System. *Journal AOAC int.* 2002; 85(2):341-348.
 30. Furusawa N. A Simple and Solvent-free Method for Determining Tetracyclines in Prawns. *LC-GC Europe* 2008; 21(4):190-195.
 31. Lim C, Persyn, A. Alimentos comerciales y alimentacion de camarones. *Boletín nicovita Camarón de Mar* (Updated 2008 cited 2008 sep 25) [about 5 screens] available from: http://www.nicovita.com.pe/pdf/esp/boletines/bole_9901_01.pdf

(Recibido 21-10-2008; Aceptado 12-12-2009)