



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Determinación de la cinética y tiempo de retiro de varias  
formulaciones de Oxitetraciclina en camarón blanco del Pacífico  
(*Litopenaeus vannamei*)

# T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA

**SYBYL MAHARANY LAREDO BELLO**

TUTOR: LUIS OCAMPO CAMBEROS

COMITÉ TUTORAL:  
FRANCISCO TRIGO TAVERA  
MANUEL JIMENEZ ESTRADA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

A quienes amo más en la vida y les debo todo, los que me enseñaron a esforzarme para lograr mis metas mis padres, Matilde Bello y Adolfo Laredo, a quienes les agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida. Por compartir y dedicar gran parte de sus vidas conmigo y por darme aliento para la ardua tarea de caminar hacia la perspectiva de un nuevo día. A ustedes le debo lo que soy.

A mi hermana Ioanis Laredo, quien siempre me ha guiado y protegido como buena hermana mayor, la cual a sido para mí un pilar fundamental para cumplir mis metas.

A quien hace poco más de un año se convirtió en mi ángel de la guarda y que estoy segura que desde el cielo vela por nosotros en todo momento, mi abuelita Humbertina Galán, el más claro ejemplo de amor, comprensión, sacrificio y esfuerzo que he tenido en mi vida. Estés donde estés tu presencia crece en mi cada día.

A Hugo Conde, mi casi cuñado, por estar siempre al lado de la familia y preocuparse en todo momento por nuestro bienestar.

A Rafael Dominguez, mi novio, por estar siempre a mi lado, ofreciendo comprensión, amor, cariño y protección, que se esfuerza por ser cada día mejor para mi. Gracias por tus consejos y por el amor que siempre me has brindado. Te quiero.

A la pequeña "mugrosita" de la casa, mi perrita Zoe, quien todos los días me recibe con cariño, gratitud y aprecio.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyar mis estudio a través del programa de becas para alumnos de posgrado.

Agradezco al laboratorio Avimex, y muy en especial al Director Técnico Dr. Ernesto Soto Priante por hacer posible el financiamiento de esta tesis y facilitarme en todo momento las cosas necesarias para el desarrollo de la misma.

Mi más amplio agradecimiento al Dr. Luis Ocampo Camberos, director de esta tesis, que me brindó en todo momento su invaluable y generoso apoyo el cual hizo posible esta investigación.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología y al Departamento de Especies Productivas no Tradicionales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las facilidades proporcionadas para este trabajo.

También quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Reyes López Ordaz por su asesoría estadística. Así como al Dr. Francisco Trigo Tavera y al Dr. Jiménez Estrada Manuel por fungir como un excelente comité tutorial.

De igual forma al laboratorio de Toxicología que me brindó todas las facilidades para el análisis de las muestras, pero muy en especial al Dr. René Rosiles y el Dr. Janitzio Bautista por su ayuda desinteresada e incondicional y por ser un pilar fundamental para este trabajo, ya que sin ellos difícilmente hubiera sido posible.

Agradezco a mis amigos y compañeros, Yamel, Nubia, Mariana, Víctor, Mayela, Erika, Hugo, Carlos, Alejandro y Erick, por estar conmigo en todo momento, apoyarme y alentame.

Finalmente, quisiera expresar mi agradecimiento a quienes estuvieron vinculados de alguna manera en este proyecto: la Sra. Aurelia y Jaime Ballina, laboratoristas de toxicología; Sra, Felisa, Angélica y Leobardo, laboratoristas del depto. de farmacología; el Dr. Héctor Sumano, profesor e investigadores del depto. de farmacología; Dr. Juan Horta investigadores del laboratorio de toxicología, quienes me proporcionaron la asesoría necesarias para realizar este proyecto.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud.

# ÍNDICE

## 1. Índice de cuadros

## 2. Índice de figuras

## 3. Introducción

## 4. Antecedentes

### 4.1 Camaronicultura

### 4.2 Factores que condicionan la camaronicultura

#### 4.2.1 Factores que dependen del camarón

#### 4.2.2 Factores dependientes de agente etiológico

#### 4.2.3 Factores dependientes del medio ambiente

### 4.3 Enfermedades en camarones cultivados

### 4.4 Medicación en la Acuicultura

#### 4.4.1 Medicamentos aprobados para la camaronicultura

#### 4.4.2 Vías de administración en camarón

#### 4.4.3 Fármacos antibacterianos en la camaronicultura

##### 4.4.3.1 Fluoroquinolonas

##### 4.4.3.2 Fenicoles

##### 4.4.3.3 Derivados de ácido fosfónico

##### 4.4.3.4 Tetraciclinas

###### 4.4.3.4.1 Oxitetraciclinas

#### 4.4.4 Problemas, riesgos y restricciones en la medicación de camarones

## 5. Justificación

## 6. Hipótesis

## 7. Objetivos

## 8. Material y Método

### 8.1 Pérdida de OTC en dietas medicadas por pelletización

#### 8.1.1 Elaboración de dietas y pérdida por manufactura

#### 8.1.2 Toma de muestras

#### 8.1.3 Análisis estadísticos

### 8.2 Pérdida de OTC en dietas medicadas por lixiviación

#### 8.2.1 Toma de muestras

#### 8.2.2 Análisis estadísticos

### 8.3 Farmacocinética por vía oral de tres preparas de OTC incluidos en el alimento

#### 8.3.1 Farmacocinética en camarones bajo condiciones de laboratorio

##### 8.3.1.1 Preparación de contenedores

##### 8.3.1.2 Ración de alimento medicado

8.3.1.3 Toma y análisis de muestras

8.3.1.4 Análisis estadísticos

8.3.2 Farmacocinética de OTC en camarones dentro de estanques de producción semi-intensivos

8.3.2.1 Estanques y organismos

8.3.2.2 Aplicación de alimento medicado

8.3.2.3 Toma y análisis de muestras

8.3.2.4 Análisis estadísticos

8.4 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de laboratorio y estanquería

8.4.1 Residuos de OTC en sedimentos tratados bajo condiciones de laboratorio

8.4.2 Residuos de OTC en sedimentos de estanques de producción tipo semi-intensivos

8.4.3 Análisis estadísticos para los sedimentos del ensayo en laboratorio y estanques

## **9. Resultados**

9.1 Validación de los métodos y eficiencia de extracción

9.2 Concentración de OTC en premezclas y pérdida del fármaco en dietas medicadas por pelletización

9.3 Pérdida de OTC en dietas medicadas por el proceso de lixiviación

9.4 Farmacocinética de camarones en condiciones de laboratorio

9.5 Farmacocinética de camarones en condiciones de estanquería

9.6 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de laboratorio

9.7 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de estanquería

## **10. Discusión**

## **11. Conclusiones**

## **12. Literatura citada**

## **13. Cuadros**

## **14. Figuras**

## **15. Anexos**

# 1. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los productos de uso en la camaronicultura de acuerdo a sus características y acción.

Cuadro 2. Listado de antimicrobianos autorizados para su uso en el control de las enfermedades bacterianas que afectan a los crustáceos cultivados.

Cuadro 3. Listado de antimicrobianos autorizados para el uso en el control de las enfermedades causadas por protozoarios parásitos que afectan a los crustáceos cultivados.

Cuadro 4 Límites máximos permitidos de residuos de antimicrobianos en crustáceos cultivados.

Cuadro 5. Tipos de Tetraciclinas desarrolladas de acuerdo con su origen.

Cuadro 6. Principales características fisicoquímicas del grupo de las Tetraciclinas.

Cuadro 7. Composición de la dieta para camarón propuesta por Tacon (1987).<sup>91</sup>

Cuadro 8. Cantidad de alimento requerido para el ensayo de laboratorio.

Cuadro 9. Número de camarones colectados por cada contenedor de las tres dietas con OTC en el experimento de laboratorio.

Cuadro 10. Datos de la curva estándar de OTC por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Cuadro 11. Días de muestreo y número de camarones colectados por cada estanque alimentados con las tres dietas con OTC en el experimento de campo.

Cuadro 12. Muestras de los sedimentos utilizados en las peceras para determinar la presencia de OTC.

Cuadro 13. Días de muestreos en sedimentos de estanques sometidos a una exposición de OTC por un periodo de 7 días.

Cuadro 14. Halos de inhibición obtenidos en 10 diluciones de OTC por el método de difusión de agar para la curva estándar.

Cuadro 15. Medias y desviación estándar del porcentaje de recuperación por el método de adición para alimento de camarón.

Cuadro 16. Medias y desviación estándar del porcentaje de recuperación en sedimentos por el método de adición.

Cuadro 17. Porcentaje de recuperación en músculo y hepatopáncreas por el método de adición cuantificado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Cuadro 18. Porcentaje de recuperación de OTC en hemolinfa por el método de adición determinado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Cuadro 19. Concentraciones de oxitetraciclina encontradas en las tres premezclas utilizadas para elaborar el alimento medicado, además de muestras antes y después de ser pelletizadas. Las premezclas de oxitetraciclina usadas fueron: grupos A y B blindadas y el grupo C sin blindar. Hubo una reducción estadísticamente significativa de la actividad del antibacteriano, expresada como concentración cuando cualquiera de las tres premezclas con los ingredientes del alimento fueron pelletizadas ( $P < 0.001$ ).

Cuadro 20. Media y desviación estándar de los valores obtenidos de OTC por lixiviación en los tres alimentos pelletizados, puestos en acuarios con 40 ‰ de salinidad, a 23 – 25 °C y pH 7.6 – 7.8.

Cuadro 21. Análisis histopatológico de 30 animales colectados en los tanques antes de iniciar el ensayo en el laboratorio.

Cuadro 22. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio ( $n=6$ ).

Cuadro 23. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio ( $n=6$ ).

Cuadro 24. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio ( $n=6$ ).

Cuadro 25. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por la administración de los alimentos medicados (A-C) con oxitetraciclina vía oral administrado por 7 días a una dosis de 140 mg/Kg de peso vivo por día. Se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio y las de estanquería. Es importante destacar que no hay diferencia significativa entre la temperatura y la salinidad registrada en cada uno de los ensayos ( $P > 0.05$ ).

Cuadro 26. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio ( $n=6$ ).



Cuadro 27. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

Cuadro 28. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

Cuadro 29. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

Cuadro 30. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

Cuadro 31. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

Cuadro 32. Análisis histopatológico de 30 animales colectados en los estanques antes de iniciar el ensayo de campo.

Cuadro 33. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 34. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 35. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 36. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 37. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 38. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 39. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 40. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 41. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

Cuadro 42. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina experimental blindada) (n=6).

Cuadro 43. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina experimental blindada) (n=6).

Cuadro 44. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina comercial no blindada) (n=6).

## 2. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural general de las tetraciclinas y las sustituciones que dan origen a sus diferentes miembros.

Figura 2. Distribución de las peceras utilizadas en el proceso de lixiviación para cada tratamiento, dieta A y dieta B blindadas y dieta C no blindada.

Figura 3. Puntos de inyección para fijar camarones empezando por el hepatopáncreas que es inyectado por ambos lados (1), en la parte anterior del hepatopáncreas dorsal a la cabeza (2), y en el primer (3), tercer (4) y sexto segmento (5) abdominal.<sup>4</sup>

Figura 4. Distribución de los contenedores de fibra de vidrio donde se realizó el ensayo en condiciones de laboratorio.

Figura 5. Método de los Trapezoides para cálculo de Área Bajo la Curva (AUC). Concentraciones registradas de un fármaco luego de una administración oral, donde se observa la descomposición del área bajo la curva en distintos segmentos (1 al 6). El cálculo en el segmento 1 se realiza por medio de la formula geométrica de Base x altura / 2. Los segmentos 2-5 son trapezoides, cuya superficie se calcula: Base x (H + h / 2). El segmento 6, que teóricamente llega hasta el infinito, se calcula Área 6 = Concentración inicial / constante de eliminación.

Figura 6. Puntos de muestreo para cada uno de los estanque de producción semi-intensiva \* con sus respectivos tratamientos, con las entradas (E) y las salidas (S) del agua.

Figura 7. Gráfica de regresión lineal de la curva estándar para OTC utilizada en el análisis para determinar el principio activo en premezclas, alimentos y sedimentos.

Figura 8. Gráfica de la curva estándar para OTC por HPLC utilizada en el análisis para determinar el principio activo en músculo y hemolinfa.

Figura 9. Lixiviación de oxitetraciclina en agua salada a 40 ‰, presentando una curva exponencial de segundo orden ( $r > 0.99$ ) de la actividad antibacterial, expresada como concentración, en alimento pelletizado para camarón preparado con tres premezclas de oxitetraciclina: A y B blindadas y C sin blindar.

Figura 10. Concentraciones de oxitetraciclina registras en músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo

por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 11. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en hemolinfa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 12. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en hepatopáncreas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Figura 13. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en sedimento utilizado en cada uno de los ensayos con las 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## RESUMEN

La oxitetraciclina (OTC) es probablemente el fármaco más usado a nivel mundial en la camaronicultura, por ser eficaz contra una amplia gama de bacterias. El presente estudio evaluó el desempeño de 3 diferentes premezclas de OTC, dos blindadas (grupos A y B) y una forma comercial sin blindar (grupo C) a una concentración de 2000 ppm. Así mismo, fueron observadas con respecto a su pérdida a través de la elaboración del alimento, lixiviación en el tiempo, concentración en tejidos y hemolinfa de camarón, así como su persistencia en sedimentos. Estos ensayos fueron realizados en laboratorio y estanques de producción. La concentración de la OTC durante el proceso de pelletización en los 3 grupos se redujo aproximadamente al 50%, sin diferencias estadísticas significativas entre grupos ( $P < 0.001$ ). Cuando los pellets de los 3 grupos se sujetaron a lixiviación (40 g de sal/L, 23 – 25° C y pH 7.6 – 7.8), hubo una pérdida rápida del fármaco de aproximadamente 50% en 30 minutos ( $P < 0.001$ ), descrita por una curva exponencial de segundo orden. Estas 3 preparaciones de fármacos se administraron a camarones subadultos *Litopenaeus vannamei* por un periodo de 7 días (140 mg/kg de peso vivo) en condiciones de laboratorio y estanquería, encontrándose diferencias estadísticas en las concentraciones en los camarones, incluso cuando se trataron con la misma premezcla. Sin embargo, las concentraciones de OTC del grupo C, fueron estadísticamente más bajas en ambas pruebas con respecto a los grupos A y B. La premezcla B alcanzó la mayor concentración en los tejidos y la hemolinfa en ambas pruebas, en condiciones de laboratorio y estanques ( $P < 0.05$ ). La persistencia del fármaco en sedimentos en condiciones de laboratorio y estanques, no fue mayor a 15 y 10 días respectivamente en los 3 grupos ( $P < 0.05$ ). Se concluye que el uso de blindajes adecuados en los principios activos utilizados para acuicultura, pueden modificar notablemente la cinética del fármaco, incrementando su eficiencia, optimizando su dosis, con el consecuente ahorro económico, pero todavía más importante, permite el establecer una dosificación racional y por lo tanto, cuanto más baja es la concentración, más bajo son los residuos en los productos acuícolas.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, camarón, oxitetraciclina, alimento-pelletizado, lixiviación, cinética.

## ABSTRACT

Oxytetracycline (OTC) is probably the most worldwide used drug in aquaculture shrimp, because it is effective against a wide range of bacteria. The present study evaluated OTC performance in 3 different premixes, two shielded (groups A and B) and a commercial form without shield (group C) to a 2000 ppm concentration. By the same way, it was observed with respect to its losses through feed elaboration, leaching time, tissues and hemolymph shrimp concentration, as well as sediment persistence. These assays were conducted in laboratory and ponds production. OTC concentration during pelleting process in the 3 groups was reduced approximately to 50%, revealed no statistically significant differences among groups ( $P < 0.001$ ). When pellets of the 3 groups were subjected to leach (40 g salt/L, 23 - 25° C and pH 7,6 - 7,8), there were a quickly drug loss approximately 50% in 30 min ( $P < 0.001$ ), described by a second order exponential decay. These 3 drug presentations, were administered to subadult shrimps *Litopenaeus vannamei* by 7 days period (140 mg/kg body weight) in laboratory and ponds conditions; there was statistical difference in shrimp concentrations, even when deal with the same premix. Nevertheless, OTC concentrations in group C treated, it was statistically difference lower in both tests with respect to the groups A and B. Premix B reached the greater tissues and hemolymph concentration in both trials, ponds and laboratory conditions ( $P < 0.05$ ). Drug persistence in sediment at laboratory and ponds conditions, was not greater to 15 and 10 days respectively in the 3 groups ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the use of suitable shields in drugs in aquaculture, can remarkably change drug kinetic, increasing efficiency, optimizing its dose, with the consequent economic saving, but still more important, allow to establish a rational dosification and therefore the lower the concentration, the lower the remainders in aquaculture products.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, shrimp, oxytetracycline, food-pelleting, leaching, kinetic.

### 3. INTRODUCCIÓN

La producción de pesquerías tradicionales a nivel mundial alcanzó su máxima captura en 1989, con 90 millones de toneladas métricas (TM), y desde entonces estas pesquerías han continuado siendo explotadas muy cerca de este nivel, que probablemente está próximo al máximo de producción sostenida posible. Es obvio que cualquier producción adicional tienen que ser generada por la acuicultura. En la última década, la acuicultura fue el único sector de las pesquerías que creció, y el desarrollo de los cultivos de camarón tuvo un papel muy importante<sup>1</sup>.

No obstante, desde los inicios de la actividad camaronícola, el acelerado incremento de la producción no fue de la mano con el desarrollo de la tecnología y prácticas de manejo sustentable, lo cual provocó que pequeños y grandes acuicultores actuaran de manera independiente para resolver sus necesidades tecnológicas, motivo por el cual la industria camaronera sigue surgiendo a pesar de que desde su desarrollo a adolecido de manejos estandarizados, sobre todo en el control de enfermedades infecciosas.

Una de las mayores limitantes en la industria camaronícola, es el efecto de las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia en sistemas de cultivo de alta densidad y laboratorios productores de postlarva<sup>2</sup> principalmente las causadas por virus,<sup>3</sup> debido a que el nivel de estrés aumenta, provocando el desarrollo de la enfermedad clínica. No obstante, los camarones peneidos (camarones de interés comercial, tales como *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*), también son atacados por otros agentes patógenos de etiología bacteriana, micótica, protozoaria, parasitaria, tóxica y contaminantes que afectan a diferentes tejidos u órganos,<sup>4</sup> los cuales en muchas ocasiones se encuentran en el agua que se utiliza en su cultivo<sup>2</sup>, pero las enfermedades virales son las que provocan las pérdidas más grandes.<sup>5</sup> Países como Taiwán (1987-1988), China (1993-1994), Indonesia (1994-1995), India (1994-1996), Ecuador (1993-1996), Honduras (1994-1997) y México (1994-1997) han sufrido colapsos significativos en la producción debido a distintas enfermedades.<sup>6</sup>

Una de las enfermedades más comúnmente observadas en camarones cultivados es la Vibriosis (causada por bacterias el género *Vibrio spp.*). Las postlarvas y camarones juveniles son los principalmente infectados presentando altas mortalidades<sup>7</sup> y grandes pérdidas económicas.

La alternativa más común para contrarrestar los daños provocados ha sido la aplicación y/o utilización de antibióticos en los estanques y laboratorios de producción

de postlarvas.<sup>8, 9</sup> La oxitetraciclina (OTC), un bacteriostático de amplio espectro de la familia de los antibióticos tetracíclicos, junto con la enrofloxacin son los antibióticos mayormente empleados por la industria camaronera en países como México.<sup>10-13</sup> Sin embargo, es escasa la información que se tiene sobre la disposición de la OTC en los camarones, al igual que el tiempo que dura en el organismo, así como los residuos en el medio ambiente, siendo determinante para saber las dosis adecuadas, la eficiencia, tiempo de permanencia en el ambiente y el tiempo requerido de depuración para su consumo.

Comúnmente la administración de antibióticos en cualquier animal acuático es en el alimento. Sin embargo, cuando el alimento es elaborado, el ingrediente activo se pierde en las distintas etapas del proceso (mezclado, molido, expandido, acondicionado, pelletizado).<sup>14, 15</sup> Aunque esas pérdidas en el caso de la OTC, podrían deberse a una combinación de dos factores, la alta temperatura prolongada durante el proceso y la quelación por el calcio y otros iones divalentes y trivalentes (Mg, Al, Fe, Zn) presentes en los ingredientes del alimento.<sup>16</sup>

Por otro lado, cuando un pellet elaborado con OTC tiene contacto con el agua (alrededor de 25°C y 40 g/L (‰) de salinidad como condiciones de cultivo), se lixivia<sup>a</sup> evitando que la concentración original no sea consumida por los camarones en tratamiento.

Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el comportamiento de la OTC con respecto a su pérdida a través de los procesos de elaboración del alimento, por lixiviación en el tiempo, concentración alcanzada en tejidos y hemolinfa de camarón y presencia en sedimentos, con la finalidad de aportar datos que ayuden a entender la farmacocinética de la OTC administrada por vía oral en camarones de cultivo, además de determinar la cantidad de dicho fármaco disponible en el pellet, la prevalencia en sedimentos y determinación de tiempos de retiro.

---

<sup>a</sup> Referido a lixiviación que involucra el proceso de separación de una sustancia soluble de una insoluble por lavado con algún solvente, como el agua.<sup>17</sup>



## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Camaronicultura

En los últimos diez años, el sector camaronícola experimentó un rápido crecimiento en los más de 55 países productores en el mundo<sup>1</sup>, siendo la actividad económica que ha alcanzado un crecimiento acelerado en las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Debido a que los “stocks” y las especies para captura en altamar se volvieron sobreexplotados por los avances tecnológicos, las pesquerías se desplazaron más allá de los mares vecinos marginales y el hombre se vio obligado a abandonar algunas pesquerías tradicionales. Así a fines del último milenio, las capturas de especies acuáticas (peces, crustáceos y moluscos) alcanzaron los 85 millones de toneladas por año,<sup>18</sup> de estas 1.6-2.2 millones de toneladas corresponden a las capturas de camarón silvestre de bahía y alta mar, lo cual resulta insuficiente para satisfacer la demanda a nivel mundial. Sin embargo, la demanda de camarón puede ser satisfecha únicamente a través de la camaronicultura.<sup>19</sup>

Según datos aportados por la FAO (Food and Agriculture Organization), la producción global de camarones cultivados en 1999 fue de 1.13 millones de toneladas, lo cual representa un aumento global de un 5.21% con respecto a la producción de 1.08 millones de toneladas estimadas para 1998.<sup>20</sup> En el caso de México, noveno productor de camarón a nivel mundial, se ha registrado un crecimiento continuo de la siguiente forma: 1998 se obtuvieron 23,749 toneladas de camarón cultivado; 1999 registró 29,120 toneladas; 2000 con una producción de 33,480 toneladas; 2001 se obtuvieron 48,014 toneladas; 2002 con 45,853 toneladas y en el 2003 ascendió a 62,361 toneladas.<sup>21</sup>

En la actualidad más de 30 especies de camarón son cultivables en estanques, sin embargo, solamente unas cuantas son de importancia en términos de producción para consumo a gran escala. Cinco especies incluyen casi toda la producción acuícola asiática, siendo el camarón tigre *Penaeus monodon* el más utilizado debido a su gran tamaño y rápido crecimiento. *Fenneropenaeus merguensis* y *Fenneropenaeus indicus* son los cultivados comúnmente en Asia. Otras especies importantes en la región son *Fenneropenaeus chinensis*, cultivada en China, y *Marsupenaeus japonicus* en Japón, Taiwán, China y Brasil.<sup>5</sup> En América hay dos especies comúnmente cultivadas, *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*.<sup>19</sup>

Entre 1-1.5 millones de hectáreas de las zonas costeras del mundo han sido convertidas en granjas camaronícolas, principalmente en países como China,

Tailandia, India, Indonesia, Filipinas, Malasia, Ecuador, México, Honduras, Panamá y Nicaragua.<sup>19</sup> En algunas localidades de estos países, el crecimiento de la industria camaronícola ha alcanzado un desarrollo tal, que ha sido acompañado de un debate controvertido sobre los impactos ambientales, económicos y sociales. Estos impactos han provocado caídas significativas en la producción, brote de enfermedades y la implementación de regulaciones sobre las operaciones acuícolas, además de diversas preocupaciones relacionadas con la salud, el uso y sostenibilidad de la zona costera.<sup>19</sup>

## **4.2 Factores que condicionan la camaronicultura**

Los camarones pueden verse afectados por contaminantes procedentes de fuera de sus hábitats normales, y también de su propia actividad, ya que el agua, hace mucho más difícil la prevención y control de la contaminación biótica y abiótica. Un ejemplo de ello es el pellet no consumido que es administrado a los estanques, además del detritus, principalmente las heces (en primer término el amonio) que son sedimentados en los estanques, desestabilizando el nicho ecológico de los camarones.<sup>22</sup>

Cuando los sedimentos son removidos, se produce un enturbiamiento del agua que se mueven en la masa acuática, provocando por un lado un contacto directo entre los camarones de hábitos bentónicos y la posible ingesta de estos, en los cuales se encuentran los organismos vectores de microorganismos u otros agentes microscópicos patógenos como virus, rickettsias, clamidias, bacterias, hongos, protozoarios y metazoarios parásitos.

La calidad del agua en la que los camarones habitan es, sin lugar a dudas de gran importancia para su subsistencia, y principal objetivo en cualquier granja camaronícola, puesto que se persigue mantener la calidad de agua dentro de los límites de tolerancia de las especies de camarones que se cultivan.

La temperatura es uno de los factores más importantes del medio, debido a su efecto directo sobre los procesos metabólicos de los organismos acuáticos, así como en la concentración de oxígeno disuelto.<sup>23</sup>

Por otro lado, la descarga de los efluentes de los estanques camaronícolas y criaderos de postlarvas esta asociada con la degradación ambiental de las aguas receptoras. Estas mismas aguas receptoras frecuentemente sirven como agua de ingreso para las granjas y criaderos vecinos, lo cual puede proporcionar el medio para esparcir agentes de enfermedades. Sin embargo, también condicionan la salud de los crustáceos y peces salvajes cerca de dichas instalaciones.

Todos los factores mencionados son elementos clave que condicionan la camaricultura en todos sus aspectos, cualitativos y cuantitativos, sobre todo la rentabilidad de la misma. No obstante las enfermedades infecciosas y parasitarias son los que mayor impacto tienen.<sup>24</sup>

Es conocido que la causa de una enfermedad infecciosa esta dada generalmente por una combinación de factores que incluyen a un huésped susceptible, en un ambiente con malas condiciones u hostiles las cuales engloban las características de calidad físico-química y biológica del agua, pueden generar estrés a los organismos y además de la presencia del agente patógeno. Se ha postulado que la sola presencia de un patógeno no es suficiente para ocasionar una enfermedad, sino que es la combinación de los factores mencionados los que perturban el funcionamiento normal del organismo y merman su capacidad para combatir a dicho patógeno. En otras palabras muchos de los organismos considerados patógenos son en realidad oportunistas cuando las condiciones ambientales son favorables al camarón.<sup>1, 25</sup> Así, los camarones en condiciones naturales resisten bien a los patógenos, pero una vez en condiciones de producción con una alta densidad y hacinamiento en las instalaciones de cultivo, se postula que el nivel de estrés aumenta y se puede desarrollar la enfermedad clínica,<sup>1, 2</sup> lo que definirá la medicina profiláctica o terapéutica, frente a la enfermedad.

#### **4.2.1 Factores que dependen del camarón**

El camarón, desempeña un papel importante en el desarrollo de los procesos patológicos, puesto que factores como la especie, la variedad, el sexo, la edad, el estado de muda o el estado fisiológico, hacen al crustáceo más susceptible a determinados microorganismos. Por otro lado existe un componente básico que determinará el grado de susceptibilidad del animal frente a cualquier agente patógeno, se trata de su base inmunológica.

#### **4.2.2 Factores dependientes del agente etiológico**

Una gran parte de los microorganismos que presentan mayor predisposición para infectar o infestar a varios crustáceos, entre ellos camarones de cultivo, se encuentran de forma latente en el medio donde se desarrollan, afectando de forma variable a cada organismo. No obstante, cualquier agente etiológico que se presente en camarones peneidos en cualquier parte del globo terráqueo, puede provocar una enfermedad a los camarones de localidades completamente alejadas, inclusive en algunos casos, a otro tipo de crustáceos, o simplemente pueden llegar a ser portadores sanos de

distintos agentes patógenos, afectando por tanto de forma diferente a los diversos hospedadores.<sup>24</sup>

Será necesario conocer aspectos de virulencia y patogenicidad de los agentes así como sus mecanismos de transmisión, fuentes de agente y vías de entrada, ya que algunos agentes patógenos como los virus pueden mutar y volverse patógenos para especies en las que anteriormente no producía enfermedad.<sup>24</sup> El conocimiento de estos aspectos dependerá el éxito de las medidas de lucha y control de enfermedades que se instauren.

#### **4.2.3 Factores dependientes del medio ambiente**

Uno de los agentes importantes dentro del desarrollo de una enfermedad se encuentra el medio ambiente en donde viven los animales, fundamentalmente las características del agua son las que crean un ambiente adecuado o inadecuado para los organismo, así como para la multiplicación de los agentes patógenos.

Las enfermedades no infecciosas incluyen el efecto directo de todos los factores medioambientales en la salud de los organismos. Pueden desencadenarse brotes de enfermedades infecciosas debido a situaciones medioambientales adversas, que incluyen cualquier estrés que actúe sobre el camarón, por cambios en el medio físico o bien por la propia gestión de los camarones, incluyendo el manejo, clasificación, hacinamiento e incluso la administración de tratamientos.

Por otro lado, existe un eminente deterioro del medio ambiente, proveniente de la gran explotación camaronícola, lo cual depende del tipo de cultivo empleado, la alimentación suministrada y los antibióticos suministrados en las granjas. De estos últimos, se ha postulado que ha traído adicionalmente como principal efecto el deterioro de la salud humana, ya que provoca el desarrollo de resistencia bacteriana a múltiples antibióticos presentes en el agua y el sedimento.

Es por ello que se han adoptado medidas en la producción para no degradar el medio ambiente y a su vez desarrollo de técnicas económicas y socioeconómicas aptas para la explotación de cultivo.

### **4.3 Enfermedades en camarones cultivados**

Cuando nos referimos a la palabra enfermedad, según Jory (2001),<sup>1</sup> el término está definido por “cualquier anormalidad en la estructura o función del animal”, sin embargo

habría que tomar en cuenta las interacciones entre el organismo, su entorno y a su vez el agente causal del problema, tal como lo definen otros autores.<sup>26</sup>

En el caso de los organismos acuáticos, el cambio de condiciones ambientales puede coadyuvar a desencadenar enfermedades, dentro de las principales causas están las siguientes reportadas por Jory (2001):<sup>1</sup>

- ☞ Niveles bajos de oxígeno disuelto
- ☞ Valores extremos de pH, salinidad y temperatura
- ☞ Deterioro o cambios súbitos de calidad de agua, o aumento en la tasa de recambio de agua que causa cambios bruscos en la temperatura, salinidad, pH, dureza y otros parámetros.
- ☞ Fluctuación de pH mayores de 0.5 unidades entre la mañana y la tarde
- ☞ Altos niveles de sólidos en suspensión
- ☞ Concentraciones sub-letales de pesticidas u otras sustancias tóxicas en el agua, tales como amonio o anhídrido sulfhídrico
- ☞ Muerte súbita de fitoplancton, que altera la calidad de agua
- ☞ Presencia de agentes patógenos.

Por otro lado, los problemas nutricionales como una mala alimentación, alimento en descomposición y administración de sustancias tóxicas en la dieta son también factores que influyen en la salud de los camarones.<sup>23</sup>

A pesar de que todos los factores mencionados pueden ocurrir en diferentes climas, grados de intensificación y especies, todos tienen como factores en común la rápida expansión, la carencia de control ambiental y el incremento de la incidencia de las enfermedades.<sup>6</sup>

Los camarones son atacados por varios agentes etiológicos; tales como diversos virus provocando enfermedades como Mancha Blanca (WSSV), Síndrome de Taura (TSV), Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) y Hepatopancreatitis Viral (HPV) entre las más comunes; protozoarios como gregarinas, adherencia por epicomensales, haplosporidios y helmintos; además de bacterias causando distintas enfermedades tales como Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP), Micobacteriosis, infecciones por Rickettsias y enfermedades causadas por *Vibrio spp.* (Síndrome de la

Gaviota), todas ellas se han atribuido al deterioro o cambios bruscos de la calidad del agua.<sup>27</sup>

Muchas de las enfermedades, especialmente las causadas por virus, son controladas principalmente con el manejo de la calidad de agua. Sin embargo, a diferencia de las enfermedades virales, las enfermedades bacterianas además de ser controladas con el manejo de agua, pueden ser erradicadas con la ayuda de fármacos específicos para cada patógeno cuando son detectadas a una etapa temprana.

La frecuencia con la que los camarones de cultivo son infectados por diversas bacterias es alta, ya que las condiciones del agua en los estanques es sometida a frecuentes cambios los cuales afectan a los organismos generando la enfermedad, es por ello que en los últimos años, se han generado diversas alternativas para prevenir y controlar las enfermedades. Los daños provocados por estas últimas, han sido contrarrestados con la aplicación, utilización, o ambos de antibióticos en los estanques y laboratorios de producción de postlarvas; sin embargo, se postula que la oxitetraciclina (OTC) es uno de los antibióticos más ampliamente utilizados.

No obstante, algunas medidas alternativas que se podrían recomendar para lograr un control de las enfermedades en la camaronicultura, son el suministro de postlarva altamente saludable, alimento de buena calidad con el uso de agentes profilácticos, incluyendo probióticos, buena calidad del agua y densidades de siembra baja.

#### **4.4 Medicación en la acuicultura**

La camaronicultura emplea diversas sustancias químicas a un nivel bajo si la comparamos con actividades como la agricultura y la ganadería. Sin embargo, esta cantidad relativamente pequeña, implica el uso de varias preparaciones de origen químico, como son los fármacos, y biológico como extractos de plantas, las cuales son vertidas en el agua y a su vez el los sedimentados de los estanques de producción por adición al agua o bien incorporados en el alimento administrado. Todos los productos utilizados en la camaronicultura, tanto químicos como biológicos, se encuentran clasificados (Cuadro 1), tomando en cuenta su acción.

Es muy recurrente que productos como los fertilizantes (contribuye a la formación del fitoplancton) y la cal (utilizado como desinfectante) sean utilizados en la explotaciones camaronícolas de forma frecuente, el resto de los productos, incluyendo los distintos fármacos, se utiliza en menor grado.

Aunque la utilización de medicamentos en la industria acuícola es relativamente baja cuando se compara con otros aditamentos, es indispensable cuando se confirma la presencia de un agente patógeno en el cultivo. Sin embargo, de manera ideal la determinación del fármaco más efectivo se realiza por medio de pruebas de sensibilidad antibiótica del patógeno específico, teniendo en cuenta factores tales como las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del medicamento. Pero en términos reales de producción, nunca se practica de esta forma durante una mortalidad activa, donde los factores principales son la velocidad, eficiencia y costos del tratamiento. En el mejor de los casos, la confirmación del agente causal y a su vez la sensibilidad del mismo a distintos antibióticos pueden ser considerados después de que se dio comienzo el tratamiento.<sup>28</sup>

Por otro lado, se ha postulado que el uso de antibióticos se incrementa en la camaronicultura de tipo intensivo. La justificación es controlar principalmente las enfermedades bacterianas. Sin embargo, el uso indiscriminado de medicamentos puede causar muchos problemas al medio ambiente<sup>29</sup> que podría dar como consecuencia el desarrollo de bacterias resistentes en el agua y los sedimentos de los estanques de cultivo, aunado a posibles problemas de persistencia de residuos de antibióticos en especies acuícolas.<sup>30</sup>

Por otro lado los estudios con respecto al comportamiento de fármacos en crustáceos son muy pocos, sin embargo, en los últimos años una prioridad del desarrollo acuícola ha sido obtener mejores medicamentos con la finalidad de no solo obtener buenos resultados contra los agentes causantes de las enfermedades sino que también para que el antibiótico llegue en dosis correctas a los organismos<sup>31</sup> sin olvidar el peligro que podría ocasionar esto a la salud humana y el posible daño al medio ambiente. Con base en lo anterior, es menester conocer el comportamiento de los medicamentos desde el manejo de la materia prima, hasta la administración de los fármacos a los organismos cuantificando su prevalencia en el tejido animal y en el sedimento.

#### **4.4.1 Medicamentos aprobados en al camaronicultura**

Idealmente, el uso de fármacos en la camaronicultura se presenta cuando los métodos enfocados en el manejo de la calidad de agua no son suficientes para mitigar o controlar alguna enfermedad, por lo tanto se recurre al uso de algún antimicrobiano para iniciar un tratamiento curativo. Sin embargo, muchas veces el uso de cualquier sustancia química en los estanques de producción no se encuentra bajo estas

condiciones, ya que en muchas ocasiones, se abusa de estas sustancias con el fin de obtener una mejor producción, implicando un deterioro del medio ambiente, además de ser un riesgo para la salud humana. Con base en lo anterior, muchos países se han preocupado por vigilar y establecer el uso de sustancias químicas, principalmente los fármacos, con la finalidad de garantizar un nivel elevado de seguridad y eficacia en el animal tratado y al mismo tiempo, proteger la salud del consumidor de los productos alimenticios tratados.<sup>11</sup>

En el caso de los medicamentos para uso veterinario, muchos países han establecido que los fármacos deben satisfacer una serie de requerimientos sobre seguridad y eficacia. A consecuencia de esto, países como los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea, entre otros, han autorizado el uso de varios fármacos para el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano y parasitarias en la acuicultura, restringiendo otros, en tanto se genera la información necesaria para permitir su uso y prohibiendo aquellos que científicamente se ha demostrado que representan un riesgo para la salud humana.<sup>32</sup> Por otro lado, dentro de los medicamentos aprobados, se incluye que los residuos del medicamento que pueden estar presentes en los tejidos animales, deben estar abajo de determinados niveles, para garantizar la inocuidad cuando los animales son consumidos. A estos niveles se le conoce como Límites Máximo de Residuos (LMR).<sup>28</sup>

Los LMR y el tipo de fármacos tanto aprobados como prohibidos varía entre cada país, pero a su vez no siendo muy diferente en Norteamérica (Canadá, Estados Unidos de Norteamérica y México), pero en Asia, existe una mayor cantidad de medicamentos aprobados y distintos LMR, sin embargo unas de las prioridades es tratar de unificar criterios y decisiones para aprobar o prohibir diversos medicamentos a nivel mundial.<sup>28</sup>

En el caso de México, tercer exportador de camarón a los Estado Unidos de Norteamérica desde el año 2000,<sup>21</sup> se ha creado el Proyecto de la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-059-PESC-2004)<sup>32</sup> con la finalidad de regular el tipo, la dosis y los LMR de los antimicrobianos usados en el cultivo de crustáceos (Cuadros 2, 3 y 4) y así disminuir el riesgo al ambiente y la salud pública.

En caso de presentarse en alguna granja de camarón o en un laboratorio de producción de postlarvas una enfermedad, siendo el agente causal una bacteria, en México están autorizados el uso de Oxitetraciclina, Sarafloxacina, Enrofloxacina, Florfenicol y Fosfomicina, donde el uso depende del agente patógeno a tratar. Por otro lado medicamentos como Monensina, Salinomicina y Semduramicina se encuentran



autorizados para el uso en el control de las enfermedades causadas por protozoarios parásitos.

Dentro de los antibióticos no aptos para el control de las enfermedades de origen bacteriano y parasitario que afectan a los crustáceos, en la producción de nauplios y postlarvas y en la engorda, la misma norma (PROY-NOM-059-PESC-2004) prohíbe los  $\beta$ -lactámicos y aquellos que científicamente se ha demostrado representan un riesgo para la salud humana, tal es el caso del cloranfenicol, los nitrofuranos, nitroimidazoles y sulfonamidas.<sup>32</sup>

#### **4.4.2 Vías de administración en camarón**

Sin tomar en cuenta si algunos antibacterianos se encuentran autorizados para su uso en medicina veterinaria, muchos de ellos se han empleado en peces de ornato u otro tipo de animales domésticos, los cuales tienen restricción para su aplicación en acuicultura. Una gran cantidad de medicamentos pueden ser administrados mediante inyección parenteral, como se realiza en muchos animales. Sin embargo, en los peces es poco impracticable cuando se pretende medicar una producción y en el caso de una producción de camarón es prácticamente imposible.

La mayoría de los tratamientos se realizan en granjas bajo condiciones de estrés y enfermedad donde hay que tomar en cuenta aspectos como una aplicación económica y práctica además de un costo bajo del fármaco.

Los tratamientos se pueden aplicar de dos formas, de manera profiláctica o terapéutica. La primera esta referida a la aplicación rutinaria de uno o varios antibióticos antes que los signos clínicos de alguna enfermedad común dentro del sistema se haga presente por lo general este tratamiento no exige el diagnóstico previo del patógeno.<sup>28</sup>

La utilización de este tratamiento intenta evitar el ataque de patógenos comunes con dosis bajas de antibióticos por periodos relativamente prolongados.

Sin embargo, el uso rutinario de este tratamiento le resta importancia a la verdadera necesidad y efectividad de los antibióticos, incrementando la resistencia bacteriana,<sup>33</sup> por ello es recomendable evitar este tipo de tratamiento.

Los tratamientos terapéuticos en condiciones ideales depende del diagnóstico preciso del agente patógeno. Una vez confirmados los signos clínicos de la enfermedad y un

diagnostico positivo del agente, su protocolo consiste en el empleo de uno o varios antibióticos por lapsos cortos y mayores concentraciones.

Se persigue utilizar medicamentos solo cuando sean requeridos y al mismo tiempo disminuyendo el riesgo del desarrollo de bacterias resistentes en los sedimentos y agua de los estanques de cultivo. Por otro lado, las altas concentraciones suministradas permiten una rápida acción del compuesto reduciendo la mortalidad de los organismos, aunque podrían presentarse problemas de palatabilidad en el alimento cuando se administran el fármaco por vía oral.<sup>33</sup>

Las vías prácticas de administración de fármacos en especies acuícolas son por baños y la vía oral. Los tratamientos por medio de baños son más simples, de fácil aplicación y baja inversión comparado con los tratamientos por vía oral. Los baños son comúnmente aplicados en peces y en menor grado en camarones de alto costo unitario como son los reproductores.

Los tratamientos por medio de baños se emplean generalmente para eliminar o reducir bacterias presentes en el agua así como parásitos externos puesto que la adición de él o los fármacos se realiza directamente en el medio ambiente o sumergiendo a los animales enfermos en tanques más pequeños con el fármaco disuelto. Es útil cuando el estadio larval de camarones o peces es pequeño y es difícil suministrar una dosis oral en estos organismos. No obstante su uso es limitado por cuestiones de impacto ambiental y debido a los inevitables efectos deletéreos sobre la flora bacteriana esencial en la mayoría de los filtros ocupados en granjas de peces y laboratorios de producción de postlarvas de camarón.<sup>28</sup>

En los tratamientos por baños es posible incorporar varios fármacos o químicos con la finalidad de atacar varios problemas o simplemente para tratar de hacer más efectivo el tratamiento, pero hay que tomar en cuenta los posibles efectos tóxicos hacia los organismos en tratamiento. Por otro lado, hay que considerar que las sustancias aplicadas en los baños, deben encontrarse de forma activa una vez disuelta en el agua de cultivo, ya que muchos compuestos se pueden convertir en complejos inactivos por acción del pH, luz, temperatura, materia orgánica, etc., por ejemplo las tetraciclinas forman complejos con los cationes divalentes con grandes reducciones en la biodisponibilidad.

Se han efectuado ensayos que involucran la realización de baños con OTC en camarones de importancias comercial, donde se han reportado dificultades debido a que gran parte del antibiótico se inactiva con algunos compuestos presentes en el

agua de mar, donde la única opción es utilizar una mayor cantidad de antibiótico para poder llegar a un tratamiento efectivo.<sup>34</sup>

Los baños pueden ser llevados de dos formas, por inmersión (sumergir a los organismos en un medio que tenga el fármaco por periodos de tiempo variable, el cual depende de la gravedad y concentración utilizada) y por refluo (llevado a cabo en granjas principalmente de peces donde el fármaco es adicionado en forma concentrada en la entrada de agua, permitiendo que esta se disuelva por todo el estanque, la duración depende de la inactividad del fármaco por el ambiente y los recambios de agua).

Por lo tanto, excepto en casos limitados como los expuestos anteriormente, la única manera práctica de asegurar la captación adecuada de cantidades controladas y efectivas de un fármaco es peces y camarones es mediante la vía oral, en particular para los antibacterianos, la cual permite una dosificación controlada a una gran población siendo ideal para las condiciones de cultivo sin requerir mayores modificaciones.<sup>35</sup>

Inevitablemente, existen limitaciones para la vía de administración oral, uno de ellos esta dado por la uniformidad en la suministración del alimento medicado en los estques, originando que los animales que se encuentran más débiles reciban poco alimento, aunado con la inapetencia que se ha reportado por enfermedades causadas por *Vibrio spp.* y *Rickettsias*, donde el porcentaje de ingesta diaria en juveniles *penaeus* baja desde un 78 hasta un 100% en comparación con animales sanos.<sup>7</sup> De esta forma, los organismos que requieren una pronta medicación son privados de ella por la mala distribución y una inapetencia.

En este tipo de tratamiento es importante tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los fármacos a utilizar, ya que muchos de ellos pueden ser hidrosolubles, provocando una pérdida rápida del principio activo cuando el alimento tiene contacto con el agua de cultivo. Es por ello, que idealmente debe de ocuparse antibióticos poco solubles en agua o desarrollar blindajes que puedan, en el mejor de los casos, evitar o disminuir la pérdida del fármaco por acción del medio.

Los métodos para medicar los alimentos pueden variar en dos formas. El primero esta dado por la elaboración de alimentos medicados, donde el fármaco se incorpora dentro del alimento, es decir, es mezclado con los ingredientes de la dieta y sometido a distintos procesos como temperaturas (75 - 95°C) y presión altas (620-740 psi),<sup>36-38</sup> los cuales alteran de forma significativa algunos fármacos por medio de una

degradación térmica, aunado con la posible quelación del antibiótico con los compuestos presentes en la dieta, dando como resultado una dieta medicada con concentraciones sub terapéuticas de poca eficiencia antibacterial. A pesar de lo anterior, cuando el alimento es vertido en los estanques presenta una lixiviación.<sup>39</sup>

El método alternativo es “untar” el medicamento sobre el alimento comercial, normalmente utilizando un agente como el aceite de pescado que actúa como vehículo y como agente adhesivo para recubrir el pellet y así unir ambos. Por lo anterior se han ocupado una variedad de vehículos y agentes adhesivos para la medicación del alimento para peces y camarones de manera externa, con el fin de ayudar al fármaco a tener una mayor estabilidad y eficacia del antibiótico así como mantener la forma y textura del alimento balanceado.<sup>40</sup> Algunos de estos son el alginato de sodio, aceite de pescado, gelatina, almidones, etc., pero son pocos los reportes que mencionan su aplicación en dietas medicadas. No obstante, Duis y col. (1995),<sup>74</sup> estudiaron la lixiviación de los antibióticos OTC, ácido oxolinico, amoxicilina y sulfonamida, usando aceite de hígado de bacalao y alginato de sodio más calcio como recubridores. Las pérdidas de los antibióticos recubiertas con aceite de pescado fueron altas, con pérdidas entre 42 y 67% después de permanecer 15 minutos de inmersión. Por el contrario, cuando se utilizó alginato de sodio más calcio las pérdidas disminuyeron entre 63 y 24% en el mismo tiempo de inmersión.

Por otro lado, otros autores han explicado que los recubridores típicamente usados como la zeína, alginatos y otras matrices coloidales, actúan con éxito en sustancias con alto peso molecular e insolubles en agua, mientras que, al usar estos recubridores para eliminar la lixiviación de compuestos de bajo peso molecular y solubles en agua, como los antibióticos, vitaminas y aminoácido, su capacidad de retención es mínima aumentando las pérdidas por lixiviación.<sup>41</sup>

Una de las ventajas de “untar” el alimento con el fármaco es que la preparación del alimento medicado se puede realizar en las mismas estaciones de cultivo, lo que permite realizar una intervención rápida frente a un evento o enfermedad. Sin embargo, en este método existen más limitaciones que ventajas, una de ellas está dada por la inapropiada distribución del fármaco en el alimento y al mismo tiempo los excipientes de la premezcla utilizada pueden ocasionar problemas haciendo que el vehículo, más allá de poseer o no propiedades adherentes, podría tener implicaciones en la palatabilidad y la disponibilidad farmacológica.

Como ya se mencionó antes, donde se desarrolla una enfermedad clínica, es

inevitable que se produzca pérdida de apetito y es probable que cualquier cambio en el sabor del alimento probablemente incrementa aún más las probabilidades de poca aceptación del mismo, inclusive el aceite de pescado (ingrediente común en la elaboración de dietas para camarón), provoca un cambio del sabor del alimento, a su vez, tanto el aceite de pescado como alginatos se ha determinado inapropiados por las pérdidas que se generan por lixiviación.<sup>28</sup>

Cualquier aceptación disminuida del alimento hace que las propiedades de lixiviación del alimento medicado sean más importantes al incrementarse la pérdida del fármaco si los animales consumen de forma más lenta. La fijación insuficiente e irregular del fármaco aumenta su pérdida en el agua en el tiempo que transcurre desde que el alimento es ofrecido hasta su consumo.

Estos factores combinados hacen que el control de la dosificación sea marcadamente más dificultoso en los peces, pero en el caso de los camarones, donde se desarrollan en medios marinos (presencia de un alto nivel de cationes divalentes) hacen el tratamiento aun más complicado por la combinación de iones y materia en el agua con el antibacteriano.

Otro método menos frecuente, pero también usado en la acuicultura, sobre todo en peces, es la administración parenteral, el cual es considerado el método mas efectivo y directo para la administración de antibióticos. Sin embargo, la inyección de soluciones antibióticas es una alternativa poco común en la mayoría de los cultivos acuícola, ya que la cantidad y el tamaño de los organismos son factores limitantes, inclusive a pesar de trabajar con un número pequeño de organismos, el estrés provocado por la captura y punción limita el uso de esta técnica.<sup>42</sup>

La aplicación de la administración parenteral esta destinada a evaluar nuevos antibióticos estudiando la farmacocinética y biodisponibilidad del antibiótico<sup>43</sup> y para combatir enfermedades en peces y camarones reproductores. Estudios realizados con diferentes antibióticos en peces<sup>44-46</sup> y crustáceos,<sup>47, 48</sup> han preferido el método parenteral debido a que, a diferencia de otros métodos permite conocer con relativa certeza la cantidad real de fármaco que ha sido suministrada y aprovechada por el organismo.

No obstante, gran parte de las investigaciones sobre el uso de antibióticos en el crecimiento de peces y camarones,<sup>30,49</sup> así como estudios relacionados con la farmacocinética<sup>50</sup> y residualidad en tejidos de peces,<sup>51, 52</sup> mencionan a la administración oral como la técnica mas efectiva para suministrar antibióticos mediante

dietas medicadas.

Por otro lado, autores como Corliss (1979),<sup>100</sup> Montoya y Reyes (2002)<sup>14</sup> y Weifen y col. (2004)<sup>86</sup> han realizado evaluaciones sobre la acumulación y eliminación de OTC administrada por medio de la alimentación en camarones peneidos sanos. Las concentraciones utilizadas en sus experimentos variaron desde 0.81 hasta 10, 000 mg OTC/kg por periodos de 3 a 21 días.

#### **4.4.3 Fármacos antibacterianos en la camaronicultura**

Los ensayos con agentes antibacterianos en acuicultura comenzaron tan pronto como estuvieron disponibles los fármacos, particularmente en los Estados Unidos de Norteamérica, donde la sulfamerazina fue introducida en 1948. A medida que fueron incorporándose nuevos fármacos en medicina humana y veterinaria, con rapidez se investigaron para su aplicación en animales acuáticos. Aunque la acuicultura continúa expandiéndose, el rango de medicinas veterinarias que están legítimamente disponibles para los acuicultores es limitado y ha sido reducido en años recientes.

Los pocos grupos a considerar en México son 4: Fluoroquinolonas, Fenicoles, Derivados del Ácido Fosfónico y Tetraciclinas.

##### **4.4.3.1 Fluoroquinolonas**

La Enrofloxacin y el Sarafloxacin son dos fluoroquinolonas aprobadas para su uso en el cultivo de crustáceos comestibles en México.

La enrofloxacin es un antibiótico de amplio espectro, utilizado en medicina veterinaria y humana para el tratamiento de varias infecciones.<sup>53</sup> Es derivada del ácido carboxílico y obtenida por síntesis total, de amplio espectro de acción sobre bacterias gram positivas y negativas. Su mecanismo de acción se basa en su acción sobre los ácidos nucleicos, interfiriendo en su síntesis por la inhibición de la enzima DNA girasa. Por sus ventajas se ha empezado a utilizar en el cultivo de camarones *L. vannamei*.<sup>9</sup>

En acuicultura un antibiótico sintético ampliamente usados en los últimos quince años<sup>54</sup> como agente profilácticos y terapéutico e indicados para el tratamiento de varias especies de bacterias como *Vibrio harveyi* en *Penaeus indicus*, *P. monodon*<sup>55, 56</sup> y *V. alginolyticus* en camarones y peces.<sup>57</sup>

Este antibiótico ha generado estudios desde su introducción en la acuicultura,<sup>35</sup> que

en su mayoría han sido enfocados al área de piscicultura.<sup>58</sup> No obstante, la enrofloxacin esta señalada como causante del desarrollo de resistencias para las fluoroquinolonas en aislamientos humanos, por la inclusión de esta en la medicina veterinaria.<sup>59</sup>

La sarafloxacin también se derivaba del ácido carboxílico y se utiliza diluida en el agua de bebida o incorporada en el alimento, esta última indicación es aplicable para peces. Puede quelarse a los iones metálicos que se encuentren presentes.

Su mecanismo de acción esta dado por hidrolizar la molécula del DNA, bloquea a la topoisomerasa II y aumenta la capacidad fagocítica además de bloquear el proceso de reparación celular. Actúa contra *Mycoplasma sp.* y *Vibrio spp.* Las bacterias presentan baja resistencia. Al administrarse por VO, tiene una buena absorción. Se distribuye ampliamente en los tejidos pero se inactiva al tener contacto con el suelo.

#### **4.4.3.2 Fenicoles**

El florfenicol es un antibiótico sintético de amplio espectro, activo contra bacterias gram positivas y gram negativas. Inhibe la síntesis de la proteína al unirse en la subunidad 50s ribosomal de las bacterias, principalmente por la inhibición de la peptidil-transferasa, evitando la transferencia de aminoácidos a la cadena peptídica en formación de proteínas bacterianas. En la mayoría de las especies, se distribuye ampliamente en los tejidos y órganos.

Se utiliza tanto en la producción de camarones y peces para el control y tratamiento de enfermedades bacterianas como *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Shigella spp.*, entre otras. Tiene un espectro más amplio que el cloranfenicol y es cerca de 100 veces más potente.<sup>53</sup>

En camarones las dosis son de 250 partes por millón (ppm) de 7 a 10 días y se recomienda un tiempo de retiro de 30 días antes de la cosecha.

#### **4.4.3.3 Derivados del ácido fosfónico**

En este grupo, existen 3 fármacos, pero solo la fosfomicina esta aprobada en la camaronicultura. La fosfomicina es un antibacteriano de amplio espectro, sin relación estructural con ningún otro fármaco. La produce el *Streptomyces spp* y *Pseudomona syringer*. Actúa sobre las bacterias gram positivas y gram negativas. La resistencia

para este fármaco es baja.

En términos de farmacodinamia, inhibe el primer paso en la síntesis de la pared celular por la piruvil-transferasa. Su característica bactericida esta dada por el enlace epóxido en su molécula y la unión directa del fósforo.

Por otro lado, la farmacocinética en peces no esta establecida, pero se sabe que posee un bajo peso molecular que le permite una gran biodisponibilidad en todos los líquidos orgánicos y no es destruido ni activado por enzimas bacterianas. En mamíferos, la absorción por vía oral (a nivel de la mucosa gástrica e intestinal), es más bajas que por vía parenteral. Su unión a proteínas plasmáticas es baja y la vida media plasmática es de 1.5-2 horas.

Con base en lo anterior, es evidente que la fosfomicina es una excelente herramienta para el control de la vibriosis en peces y camarones, además representa uno de los fármacos con mayores posibilidades en la terapia de apoyo en el caso de problemas vírales, sobre todo en el camarón (por ejemplo, para WSSV) y probablemente en otras especies debido a su notable efecto inmunomodulador. Sin embargo, poco o nada se ha hecho con relación a esta notable actividad en el caso de problemas vírales en la mayoría de las especies domésticas, al igual que en la acuicultura, por tanto, es razonable el aventurar que la fosfomicina puede atenuar el impacto de una infección viral primero, al disminuir la carga bacteriana (efecto bactericida) y segundo al actuar como un agente inmunomodulador ayudando al animal al fortalecer y eficientizar su sistema inmune.<sup>53</sup>

#### **4.4.3.4 Tetraciclinas**

Son un grupo de antibióticos descubiertos a finales de los años 40's, producidos por *Streptomyces sp.*, pero también han sido elaborados de forma sintética (Cuadro 5). Son compuestos derivados del anillo policíclico naftacenocarboxamida y todas tienen la misma estructura básica, formada por 4 anillos unidos en línea, donde las diferencias entre cada una de ellas se centra en la sustituciones de algunos radicales (Fig. 1) con características fisicoquímicas muy similares (Cuadro 6). Este grupo de fármacos es de amplio espectro al inhibir casi todas las bacterias gram positivas y en menor grado las negativas además de rickettsias. Son bien absorbidos, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 1-3 horas después de su administración, reduciéndose con la presencia de calcio, hierro y magnesio. La resistencia a estos



fármacos esta mediada por plásmidos a este antibiótico que se produce por la alteración de la penetración de las tetraciclinas en las bacterias o cuando se forman proteínas que protegen al ribosoma de la unión de las tetraciclinas a su sitio blanco.<sup>53</sup>

#### **4.4.3.4.1 Oxitetraciclinas**

De este grupo solo la OTC esta aprobada para su uso en la camaronicultura, además por sus características es la tetraciclina que más se utiliza en la terapéutica humana<sup>60</sup> y veterinaria.<sup>53</sup>

La OTC se prescribe en cultivos de camarón con la finalidad de tratar vibriosis, NHP e infecciones bacterianas por rickettsias.<sup>61</sup> Es un producto del metabolismo del *Streptomyces rimosus*. Es primeramente un bacteriostático y se cree que inhibe la síntesis de proteínas de las bacterias al ligarse a la subunidad 30S ribosómica por uniones quelantes con los grupos fosfato en el RNA mensajero, bloqueando la fijación del aminoacil RNA de transferencia al sitio aceptor del complejo RNA mensajero – ribosoma y, en consecuencia, la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.<sup>53</sup> Tiene un amplio espectro antimicrobiano contra Gram-positivos y Gram-negativos.<sup>60</sup>

Se ha observado que la OTC ayuda a obtener una mejor conversión alimenticia, ya que ajusta favorablemente la flora intestinal, lo cual permite mayor aprovechamiento de la síntesis de vitaminas por suprimir la presencia de microorganismos que compiten por esto productos. Al mismo tiempo adelgaza las paredes intestinales y estimula el consumo de agua, con lo que se aumenta la permeabilidad, facilita la dispersión y absorción de los alimentos.

También se cree que elimina microorganismos que podrían producir una enfermedad los cuales pueden mantener al animal en estado de estrés.

Sin embargo, su estabilidad química se encuentra alterada por factores ambientales como la luz, el calor, el pH, la presión, la salinidad del agua<sup>62</sup> y la materia orgánica.

Se ha determinado que la incidencia de luz de tipo directa (luz visible de 300-800 nm) e indirecta sobre la OTC ocasiona una inactividad bacteriana del fármaco, tal como describen Lunestad y col. (1995),<sup>76</sup> quienes sometieron a un periodo de luz una solución de OTC en tubos de cuarzo sumergidos a un metro de agua de mar, donde después de 21 días de exposición por efectos de la luz la OTC perdió su actividad microbiana. De la misma forma, Samuelsen (1989),<sup>103</sup> evaluó el proceso degradatorio

de la OTC con diferentes condiciones de luz y temperatura. En su experimento determinó pérdidas del 80% a 15°C y 40% a 4°C, concluyendo que la luz es un factor relevante en la pérdida del antibiótico, así como la temperatura también juega un rol importante en la actividad antibacteriana.

Por otro lado, la salinidad del agua ocupada en los estanques interfiere significativamente la actividad de la OTC. Esta agua, se encuentra rica en elementos químicos como el sodio, potasio, calcio y magnesio,<sup>63</sup> los cuales han sido mencionados como los posibles causantes de la inactividad de ciertos antibióticos, como la OTC frente a las bacterias patógenas, debido a la capacidad de dicho fármaco por formar complejos con los iones de calcio y magnesio.<sup>64, 65</sup>

Goodman y Gilman (1996)<sup>60</sup> por su parte, mencionaron que la pérdida de la actividad antibacteriana por la unión de la OTC con el calcio y magnesio, debe producirse por la alteración de la carga molecular del antibiótico, lo que impide su paso a través de las membranas biológicas lipídicas provocando una incapacidad de ingresar en las bacterias para actuar sobre los ribosomas.

Posteriormente, Lunestad y Goksoyr (1990)<sup>16</sup> demostraron que al diluir OTC en concentraciones de 0.5 a 100 ppm en agua de mar, tal solo el 5% del antibiótico se mantiene libre, debido a que el restante 95% demostró su capacidad de quelación frente a los iones calcio y magnesio presentes en el agua de mar, por lo que es importante considerar las características del compuesto antes de entrar en contacto con el medio acuoso.

Estudios efectuados con otros compuestos antibacterianos, realizados por Ratcliffe y Smith (1983)<sup>66</sup> y Smith y Lewis (1988)<sup>67</sup> determinaron que el pH del agua junto con el ion magnesio, son los causantes de una baja actividad antibacteriana de la flumequina principalmente en rangos de pH altos. Esta indicación sugiere que la complejación entre las cargas negativas de flumequina y el ion magnesio, contribuye en los efectos inhibitorios del antibiótico.

En términos de farmacocinética el comportamiento de la OTC se encuentra bien definido en algunos mamíferos, por ejemplo, por vía IM, se absorbe bastante bien y se detecta en plasma a los 15 min., para alcanzar su C<sub>max</sub> en 1 h. Mantiene cifras terapéuticas durante 6-12 h, aproximadamente. Por vía IV lenta en vacas, se han logrado concentraciones tisulares más homogéneas y mayores en el tracto urogenital, que cuando se aplica diluida en lavados uterinos. En caballos por IV a razón de 10 mg/kg, se alcanzan concentraciones plasmáticas elevadas a los 30 min. después de la

inyección.<sup>53</sup> Sin embargo, en especies acuícolas los estudios de farmacocinética de la OTC han estado dirigidos mayormente a peces tanto de interés acuícola como pesquero y a su vez, no están del todo establecidos, debido a las diferencias entre las especies,<sup>68-70</sup> ya que se ha observado una vida media de distribución entre 0.735-2.08 h con vida media de eliminación desde 22.5 h hasta 115 h por IV.

Existen muy pocos datos farmacocinéticos enfocados a camarones de cultivo, los cuales a su vez difieren entre las especies estudiadas, tal es el caso del estudio realizado por Reed y col. (2004),<sup>88</sup> donde reportan una dosis de 11.1 mg/kg aplicada directamente en el seno venoso de camarones *Litopenaeus setiferus*, obteniendo una vida media de distribución de 2.1 h y una vida de eliminación de 22.3 h, datos que varían de dos estudios realizados en *Penaeus monodon* y *P. japonicus* donde se reporta que por la misma vía de administración se dosificó con 10 y 25 mg/kg respectivamente, obteniendo valores de vida media de distribución y eliminación de 0.89 y 23.1 h para *P. monodon* y *P. japonicus* una vida media de distribución de 0.45 h y eliminación de 24.7 h.<sup>71,72</sup>

Cuando la OTC se administra por vía oral de forma forzada en *P. monodon* (10 mg/kg) y *P. japonicus* (50 mg/kg), la concentración máxima alcanzada (Cmax) esta reportada en 20.6 y 24.3 h, en un tiempo de 6 y 10 h respectivamente.<sup>71, 72</sup>

Es muy probable que las variaciones expuestas, entre los peces y los camarones se deba a las diferencias fisiológicas de cada uno y a su vez los contrastes entre especies de camarones y la vía de administración se deba a la variedad intrínseca de las especies analizadas, aunque en ambos casos por ser animales poikilotermos, no hay que descartar la posibilidad de que la temperatura pudo jugar un papel muy importante en el comportamiento del fármaco, ya que éstas variaron desde 16°C para la trucha arcoiris, hasta 30°C para *P. monodon*.

#### **4.4.4 Problemas, riesgos y restricciones en la medicación de camarones**

La medicación en la acuicultura básicamente contempla 4 aspectos que la limitan y podrían ocasionar muchos problemas. El primero se origina en el momento de la elaboración de las dietas medicadas, dado por las características fisicoquímicas propias del fármaco, ya que en el proceso, los fármacos pueden perder su actividad por las condiciones a las cuales son sometidas a lo largo del proceso, siendo la temperatura el factor que mas afecta al medicamento. La degradación originada

dependerá de la sensibilidad del fármaco a estos cambios, por ejemplo, en el caso de la OTC Frelier (1995)<sup>73</sup> reporta que las pérdidas se deben a efectos de humedad, temperatura y presión donde la pérdida del antibiótico se encuentra entre el 10 y 40% en dietas elaboradas a nivel comercial. Reforzando lo anterior, Montoya y Reyes (2002)<sup>14</sup> determinaron que la OTC pierde un 18.7% de su concentración original en alimento elaborado en una planta piloto. Estos problemas pueden ser compensados incrementando una cantidad adicional del antibiótico al inicio del proceso, sin embargo se necesitan realizar pruebas para determinar con exactitud esta cantidad.

Por otra parte, el medicamento elaborado enfrentara un segundo inconveniente, la pérdida que se pudiera generar cuando es puesto en contacto con el medio acuoso donde habitan los organismos, lo cual implica una pérdida de su concentración y por ende una posible subdosificación a lo que mucho denominan fenómeno de lixiviación, por lo que es importante tomar en cuenta este aspecto si se desea realizar una medicación efectiva.

La lixiviación podría ser disminuida utilizando fármacos que sean insolubles en agua, sin embargo, muchos fármacos como la OTC son solubles en dicho compuesto.

Los mismos factores que influyen en la pérdida del fármaco en el proceso de elaboración son los que también deterioran la pérdida por lixiviación, tales como la temperatura del agua, el pH y hasta en algunos casos autores como Duis y col. (1995),<sup>74</sup> argumenta que también la relación volumen-área del pellet o el aumento del área superficial del pellet y de la salinidad,<sup>75</sup> además de las características químicas del antibiótico,<sup>16, 76</sup> no obstante el factor que afecta en mayor forma la pérdida del fármaco es la salinidad, causando hasta un 73% de pérdida.<sup>14</sup>

Con respecto a estudios sobre el proceso de lixiviación, podemos mencionar el realizado por Pearson y Charatchakool (1999),<sup>77</sup> donde determinaron que las pérdidas de OTC en dietas medicadas para peces eran mayores al 40% después de 30 minutos de inmersión en agua salobre a 27°C. De igual forma, un trabajo que comparó el efecto aglutinante del aceite de hígado de bacalao *versus* el alginato de sodio en dietas recubiertas con OTC, obtuvo pérdidas del 50.5% y 24.1%, respectivamente, después de 15 minutos de lixiviación en agua dulce a 12°C, pH 6.5, con aireación constante.<sup>74</sup>

Recientemente Rigos y col. (1999)<sup>39</sup> comprobaron como el alimento balanceado pierde más OTC (47%) si esta es aplicada como recubrimiento del pellet junto con aceite de pescado, que si se la incluye en la elaboración de la dieta (pérdida del 6%), después

de haber permanecido por 3 minutos en agua salada a 24°C.

El tercer problema se deriva del anterior porque sin duda el mecanismo que influye en mayor o menor presencia de residuos de antibióticos en sedimentos de piscinas camaroneras es la pérdida del fármaco por lixiviación,<sup>78</sup> casando un gran problema de impacto ambiental, el cual daña a las bacterias de los estanques y a los animales silvestres que habitan cerca de las granjas camaroneras haciéndolos resistencias a los antibióticos.

Con la finalidad de obtener datos sobre el impacto que tiene la OTC en el ambiente, se han realizado diversos estudios para verificar la resistencia bacteriana a este antibiótico en estanques de producción de camarón. Tendencia y De la Peña,<sup>13,79</sup> informan que la resistencia antibiótica se encuentra asociada al uso de antimicrobianos en los estanques. Por su parte, Nygaard y col. (1992)<sup>78</sup> experimentaron con bacterias de sedimentos marinos encontrando una gran resistencia a la OTC cuando fueron tratadas con éste medicamento.

Por último, las reacciones adversas a los fármacos y el mal usos de ellos es un problema importante que involucra un buen tratamiento y una camaronicultura sustentable. Una de las acciones que llevan a tener reacciones adversas al fármaco es la extrapolación de dosis o concentraciones terapéuticas de una especie a otra, inclusive de un género a otro y sin embargo en muchos casos las diferencias en la actividad de enzimas de biotransformación explican las diferentes respuestas entre especies o las diferencias innatas en la fisiología de las especies. No obstante, también hay que tener en cuenta los residuos de fármacos en tejido que puede generar una mala medicación, para poder determinar los tiempos de retiro adecuados antes de que los organismos sean cosechados y puedan ocasionar un problema de salud pública.

En la actualidad existen diversos métodos para estimar y cuantificar los residuos de antibióticos en tejidos de origen animal, algunos de estos son: pruebas microbiológicas, inmunoensayos (ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sistema de ensayo receptor (CHARM III),<sup>80</sup> entre otros. Actualmente, el método por HPLC es uno de los más ampliamente utilizados, por su precisión; un ejemplo de ello son los trabajos realizados por Carson y col. (1998),<sup>81</sup> Ueno y col. (2000)<sup>82</sup> quienes utilizaron esta técnica para cuantificar residuos de tetraciclina y oxitetraciclina en camarones e identificar diversos medicamentos en peces y camarones respectivamente.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Con la expansión y globalización de la industria camaronícola, la exigencia comercial de producir eficientemente camarón en forma intensiva genera naturalmente el deseo de prevenir las enfermedades. Muchas de las enfermedades virales se pueden limitar con medidas de bioseguridad, y se pretende generar otras alternativas para su control, tales como inmunoestimulantes.<sup>83, 84</sup>

El profesionalista encargado del control y salud de los camarones ha participado tradicionalmente y mayormente en el control y tratamiento de las enfermedades bacterianas<sup>11</sup> para las cuales, la alternativa más común para contrarrestar los daños provocados ha sido la aplicación y/o utilización de antibióticos en los estanques y laboratorios de producción de postlarvas.<sup>8, 9</sup> Así, el uso de antibióticos de manera profiláctica (prevenir el brote de enfermedades) y terapéutica (tratar las enfermedades) se hizo común entre los acuicultores de los países productores.<sup>11, 12, 23, 85</sup> No obstante, los antibióticos también se han utilizado como promotores de crecimiento tal como reportan Weifen y col. (2004)<sup>86</sup> en China, aunque dicha práctica ha sido prohibida en la unión Europea. Empero, la utilización de antibióticos ha beneficiado a la industria camaronera al enfrentar el deterioro de los organismos que presentan enfermedades infecciosas o no infecciosas. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos compuestos, ocasionado por la carencia de normativas homogéneas propias de cada país,<sup>11</sup> se postula que ha traído como principales efectos el deterioro de la salud humana y la calidad del medio ambiente, ya que provoca el desarrollo de resistencia bacteriana a múltiples antibióticos presentes en el agua y el sedimento.<sup>87</sup> Sin embargo, también ha ocasionado problemas con respecto a la efectividad de tratamientos y residuos presentes cuando los animales son sacados al mercado.

Los fármacos aprobados para la acuicultura de camarón varían en cada país, por ejemplo, en México los antibióticos aceptados con fines terapéuticos son: oxitetraciclina, sarafloxacina, enrofloxacina, florfenicol, fosfomicina, monensina, salinomicina y semduramicina (Cuadro 2 y 3).<sup>87</sup> A nivel mundial, el uso de estos fármacos es muy frecuente, sin embargo, se presume que la OTC es uno de los antibióticos más ampliamente utilizado, en países como Ecuador, Filipinas, Perú, México, China, Tailandia, Indonesia, Colombia y Honduras, entre otros.<sup>10-13</sup> Se le usa con la finalidad de tratar enfermedades bacterianas provocadas principalmente por

*Vibrio spp.* y en menor grado por *Rickettsia*, *Mycobacterium spp.* y las bacterias tipo *Rickettsias* responsables de causar hepatopancreatitis necrozante (NHP).<sup>88</sup>

En los animales acuáticos se administra comúnmente la OTC en el alimento, ya sea por inclusión del antibiótico durante la preparación del pellet o mediante baños externos con OTC en aceite de pescado<sup>b</sup>. Sin embargo, cuando el alimento tiene contacto con el agua, la OTC por ser hidrosoluble, se lixivia provocando por un lado un posible desarrollo de cepas resistentes de bacterias presentes en el ambiente, y por el otro que la concentración de OTC inicial no se encuentre disponible para los organismos. A menudo, ambos factores, tanto la pérdida del antibiótico por elaboración y por suministro, ocasionan que la cantidad de OTC ingerida por los camarones no sea suficiente para lograr un tratamiento terapéutico, lo cual resulta en reducción de la eficiencia de la OTC y avance en la infección, ya que muy probablemente no se logre alcanza la concentración en músculo y hemolinfa suficiente que pueda cubrir la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la bacteria causante de la infección, tales como *Vibrio spp.* (CMI de 0.1- 12.5 µg/ml).<sup>89</sup> Sin embargo, no existe información sobre cual es la concentración máxima alcanzada de OTC por vía oral suministrando dietas medicadas de tipo comercial por un tiempo prolongado, ni tampoco con exactitud los tiempo se que requiere para que el animal se encuentre libre de dicho fármaco y además éste sea degradado en sedimentos.

Existe información sobre farmacocinéticas realizadas por vía oral o intrasinal en distintas especies de camarones cultivados, donde en ambos casos las dosis fueron controladas en laboratorio y los resultados varían de especie a especie.<sup>71, 72, 88</sup> Sin embargo, los datos obtenidos de los estudios en laboratorio podrían variar significativamente con respecto a estanques de cultivo, donde las condiciones ambientales cambian constantemente, ya que no se sabe con exactitud que cantidad de fármaco se suministró (se sabe que en animales poiquilotermos como los camarones, mucho procesos fisiológicos, como la frecuencia de alimentación están determinados por la temperatura del agua).<sup>71</sup> Además, aunado a la perdida generada por el proceso de lixiviación lo cual limita que se conozcan con certeza el comportamiento farmacocinético del fármaco.

En términos comerciales, las pérdidas de la OTC en la elaboración de dietas y lixiviación, podrían ser disminuidas con el desarrollo de blindajes capaces de aislar al

---

<sup>b</sup> World Aquaculture Society, 1997 en Boletín nicovita Camarón de Mar (2002).<sup>112</sup>

fármaco de las condiciones ambientales adversas pero al mismo tiempo ser liberada dentro del camarón para poder ser absorbida y dar una mayor eficacia.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se determinó la cinética de tres preparados de OTC (dos blindadas y uno sin blindar), desde las pérdidas del fármaco por el proceso de elaboración (pelletizado) y lixiviación en agua salada, hasta la concentración máxima de OTC alcanzada en hemolinfa, músculo y heptopáncreas cuando se suministraron los alimentos en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) en condiciones de laboratorio y estanquería, así como las concentraciones y tiempo de persistencia del antibacteriano alcanzados en los sedimentos.



## 6. HIPÓTESIS

La pérdida de OTC por el proceso de pelletización y lixiviación en agua salada será significativamente mucho mayor en el alimento preparado con la premezcla de OTC que no esta blindada comparada con las dos premezclas blindadas.

Es posible establecer una cinética para OTC en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) utilizando el músculo, hemolinfa y hepatopáncreas como base del comportamiento en la concentración de la biomasa.

Las concentraciones de OTC alcanzadas en músculo, hemolinfa y hepatopáncreas serán mayores en los camarones tratados con OTC blindada.

Es viable determinar la persistencia de residuos de OTC y el tiempo que se requiere para llegar por debajo de los Límites Máximos de Residuos (LMR) en camarones medicados con dicho fármaco.

La persistencia de OTC en sedimentos de estanques que han recibido tratamientos con OTC tiene una duración no mayor a 30 días.

## 7. OBJETIVOS

- Evaluar el grado de degradación de 3 premezclas comerciales de OTC incluidas en el alimento (dos blindadas y una sin blindar) cuando son expuestas a un proceso de pelletización y lixiviación en agua salada a 40 ‰ determinando cual de ellas evita más la pérdida del principio activo.
- Determinar mediante trabajos de laboratorio y estanquería la cinética para 3 preparados diferentes de OTC en camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) utilizando músculo, hemolinfa y hepatopáncreas, tomando como base el comportamiento de la concentración en la biomasa y a su vez establecer cual de ellas alcanza una mayor concentración.
- Determinar el tiempo que se requiere para llegar por debajo de los Límites Máximos de Residuos (LMR) en camarones medicados con OTC cuantificando la persistencia de residuos de dicho fármaco.
- Evaluar la persistencia de la OTC en sedimentos tratados con dicho fármaco en condiciones de laboratorio y estanques de producción semi-intensiva de camarón y comparar cual de los tres preparados persiste más tiempo.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Pérdida de OTC en dietas medicadas por pelletización**

En su mayoría la elaboración de alimentos para camarón se realizar por medio de un proceso que se denomina pelletización, el cual consiste en una aplicación de calor, humedad y presión mecánica capaces de agrupar los ingredientes utilizados en partículas más grandes de naturaleza estable (pellet). No obstante, la OTC es un fármaco sensible a muchas de estas condiciones y puede perder su actividad durante el proceso de elaboración.

#### **8.1.1 Elaboración de dietas y pérdida por manufactura**

Con la finalidad de determinar la pérdida de la OTC en dietas medicadas se ocuparon 2 premezclas blindadas experimentales al 20% de hidrocloreto de oxitetraciclina (OTC), donadas por el laboratorio Avimex (México) y una premezcla comercial sin blindar. Un primer experimento fue realizado en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con la finalidad de determinar la concentración real de OTC en las premezclas por medio de potencia microbiológica a partir del método de difusión de agar propuesto por Bennett y col. (1966)<sup>90</sup> utilizando una bacteria *Bacillus cereus* ATCC (American Type Culture Collection) 11778 sensible a OTC. Este método se basa en la medición del área de inhibición del crecimiento bacteriano por la presencia del fármaco y comparando con un estándar de referencia. La curva estándar fue obtenida al preparar 10 series de una solución madre de OTC, obteniendo 9 diluciones a partir de ésta solución como se describe en el anexo 1.

En un segundo experimento se elaboraron 3 dietas medicadas con las premezclas anteriormente analizadas, las cuales fueron adicionadas de forma individual al resto de los ingredientes de la dieta para alcanzar una concentración de 2000 mg/Kg. Dos de las premezclas se encontraban blindadas, es decir, recubiertas por un polímetro que idealmente protegía a la OTC del ambiente.

Los grupos se denominaron de la siguiente forma de acuerdo al tipo de premezcla utilizada para su elaboración: para las blindadas, la premezcla A (producto experimental de Avimex, México) como el grupo A, Premezcla B (producto experimental de Avimex, México) denominado como grupo B. La diferencia entre estas dos premezclas esta atribuida al tipo de polímero utilizado para encapsular la OTC, sin

embargo, no se determinaron estas diferencias en el presente trabajo. La OTC sin blindar fue una premezcla comercial denominada como grupo C.

La composición de los ingredientes para todas las dieta (Cuadro 7) fue basada de acuerdo a los requerimientos nutricionales para camarón citados por Tacon (1987).<sup>91</sup>

Las condiciones del proceso de pelletización fueron llevados a 82 – 145° C y a una presión de 620-740 psi.<sup>38</sup> Durante el proceso de pelletización, el aglutinante ocupado fue Maxi-Bond® un adhesivo de tipo comercial.

### **8.1.2 Toma de muestras**

En el primer experimento, 6 muestras por triplicado de cada premezcla comercial fueron analizadas y en el caso del proceso de pelletización, igualmente fueron tomadas 6 muestras por triplicado cuando los ingredientes de las dietas y las premezclas se encontraban mezclados y de forma idéntica cuando el proceso fue finalizado (pelletización). Las concentraciones fueron determinadas por el método de difusión de agar propuesto por Bennett, y col. (1966).<sup>90</sup> Las muestras fueron puestas en refrigeración por no más de 7 días hasta su análisis.

### **8.1.3 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos del efecto por pelletización en los alimentos medicados, referidos como antes de pelletizar y después de pelletizado, fueron analizados en el programa estadístico SAS (SAS System V. 8.8 2004, Institute Inc.) y la diferencia en la concentración promedio expresada en la actividad antibacterial de las 3 premezclas fue comparada usando una prueba de ANOVA, con la variación de modelos mixtos por mediciones repetidas para cada grupo.

## **8.2 Pérdida de OTC en dietas medicadas por lixiviación**

Para evaluar la influencia de la salinidad sobre la degradación de la OTC, se cuantificó por triplicado la cantidad de medicamento perdido de los alimentos elaborados (dietas A-C), cuando se colocaron en agua con una salinidad de 40 ‰ (g/L).

La metodología a seguir fue la siguiente: Se mantuvieron 9 peceras de vidrio con 40 L de agua ajustada a una salinidad de 40 ‰, temperatura entre 23 -25 °C (termostato

LED 200 Watts Dymax) y un pH cercano a 7.8 (potenciómetro Conductronic pH20), con aireación continua de 6.79-6.56 mg/L (Oxímetro WTW OXI 315i).

La sal ocupada fue sal comercial para acuario marino Coralife Salt<sup>®</sup> (Energy Savers Unlimited) libre de fosfatos y nitratos, enriquecida con Calcio a 390-410 ppm y Magnesio a 1250-1300 ppm con un pH 8.2-8.3 como sustituto de agua de mar. De esta sal se disolvieron aproximadamente 35g por cada litro de agua destilada y desmineralizada que fue ajustada hasta alcanzar una salinidad de 40 ‰ con ayuda de un conductímetro (Conductronic CL35), que mide cloruro de sodio.

Por cada grupo se utilizaron 3 peceras en las condiciones antes mencionadas, las cuales no poseían ningún sistema de filtrado debido a que el experimento tuvo una duración de 2.5 hrs. La temperatura y el suministro de aire fueron mantenidos en cada pecera de forma independiente. La disposición de cada una se observa en la figura 2. Posteriormente se adicionaron 100 g de alimento por cada réplica de los tres tratamientos.

### **8.2.1 Toma de muestras**

Se colectaron muestras de 5 g de alimento sedimentado de cada pecera a los 0, 1, 5, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después del contacto de los pellets con el agua generando un total de 72 muestras.

Las muestras tomadas fueron colocadas en una estufa por 8 horas a 25 °C aproximadamente, posteriormente se colocaron en un desecador por un periodo de 3 horas. Consecutivamente fueron conservadas a -20 °C hasta su análisis. La determinación del principio activo fue por el método por difusión de agar citado Bennett y col. (1966)<sup>90</sup> (Anexo 1), donde las 72 muestras fueron cuantificadas por triplicado.

### **8.2.2 Análisis estadísticos**

La pérdida del principio activo de la OTC a través del tiempo por el proceso de lixiviación, expresada en términos de concentración, fueron analizadas al comparadas las medias por el análisis de modelos mixtos a través de un análisis de ANOVA, en el paquete estadístico SAS (SAS System V. 8.8 2004, Institute Inc.).

## **8.3 Farmacocinética por vía oral de tres preparados de OTC incluidos en el alimento**

Con la finalidad de determinar la farmacocinética de la oxitetraciclina (OTC) cuando es dosificada por vía oral, se administraron tres dietas medicadas a razón de 2000 ppm de principio activo a camarones sub adultos de cultivo *Litopenaeus vannamei* clínicamente sanos por un periodo de 7 días seguido de una dieta no medicada hasta cumplir 15 días post-tratamiento, cuantificando la persistencia de OTC en músculo, hemolinfa y hepatopáncreas de camarón bajo condiciones de laboratorio y en estanquería de producción.

### **8.3.1 Farmacocinética en camarones bajo condiciones de laboratorio**

El análisis farmacocinético en condiciones controladas se realizó en la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Autónoma de Nayarit. Se utilizaron camarones juveniles *L. vannamei* (camarón blanco del Pacífico), provenientes de una granja de producción de la región. La talla promedio de los animales fue de  $8.72 \pm 2.28$  g.

Es importante mencionar que antes de iniciar el experimento fueron tomados 30 camarones al azar, a los cuales se les realizó un análisis histopatológico para descartar la posible presencia de alguna enfermedad clínica principalmente de etiología viral en los camarones utilizados (Anexo 2).

#### **8.3.1.1 Preparación de contenedores**

Se prepararon 6 contenedores de fibra de vidrio con una capacidad de 200 L cada uno, la distribución de los estanques se observa en la figura 4, estos fueron previamente lavados y desinfectados con solución clorada. Posteriormente fueron llenados con agua marina a una salinidad de  $33 \pm 1.5$  ‰, temperatura  $24.2 \pm 1.02$  °C y pH de 7.8 acuerdo con la NOM-EM-006-PESC-2004.<sup>87</sup>

En el fondo de cada contenedor, se colocó una capa de 15 cm de espesor de un sustrato,<sup>92</sup> éste fue sedimento de un estanque de una granja camaronera que no ocupó OTC ni ningún otro medicamento por lo menos en 2 ciclos de producción (1 año), la composición del sustrato era mayormente de arcilla.

El sedimento fue colectado por triplicado en la entrada, parte media y salida de un estanque, el cual se homogenizó y después fue llevado al laboratorio para su distribución en los contenedores.

El sedimento junto con el agua se dejó circulando por un periodo de 7 días, para estabilizar el medio. Una vez transcurrido este tiempo, los camarones fueron colocados en grupos de 60 por cada contenedor. Después de un periodo de adaptación de 10 días, se inició el ensayo. El recambio del agua fue del 200% diariamente.<sup>14</sup>

### **8.3.1.2 Ración de alimento medicado**

El alimento ocupado para dosificar a los camarones con OTC en cada grupo (A-C) fue el mismo, tanto en la fase de laboratorio como en la fase de estanques, al igual que el utilizado en los estudios de lixiviación. Los tanques 1 y 5 fueron alimentados con la dieta A, el 2 y 3 con el alimento que tenía el blindaje B y los contenedores 4 y 6 fueron alimentados con la dieta C (Fig. 4), todos dosificados a 140 mg/kg de peso vivo.

La cantidad de alimento que se elaboró para cada grupo o tratamiento, se observa en el Cuadro 8, el cual contempla la fase de aclimatación con dieta no medicada, las dietas medicadas y el alimento para manutención después de finalizada la etapa de aplicación del fármaco.

La cantidad de alimento suministrado al día fue el 7 % de peso vivo por camarón, la ración fue repartida en 2 porciones, la primera a las 8:00 AM y la segunda a las 04:00 PM, es importante mencionar que nunca hubo una alimentación forzada.

En el periodo de aclimatación (10 días) los camarones se alimentaron con dieta libre de OTC, terminado este periodo, se mantuvieron en inanición por 2 días. Una vez cumplido este plazo, se procedió a iniciar el periodo de administración de las dietas medicadas (2000 mg/kg), por un periodo de 7 días.

Al terminar la etapa de medicación, hasta su finalización el día 34 del experimento, se administró la dieta no medicada para todos los grupos.

### **8.3.1.3 Toma y análisis de muestras**

Con un total de 10 muestreos, se colectaron 3 camarones de forma aleatoria (Cuadro 9) por cada tanque a partir del día 13 del experimento hasta el día 34 del experimento,

haciendo un total de 60 camarones colectados por grupo en todo el periodo de experimentación.

A los camarones colectados se les extrajo la hemolinfa (Anexo 3) y el hepatopáncreas. Una vez obtenidos se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  al igual que el resto del animal hasta su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en ingles) con la finalidad de determinar la concentración de OTC en hemolinfa (Anexo 4), músculo y hepatopáncreas (Anexo 5). El método de HPLC se basa en la medición del área bajo la curva registrada en un detecto UV como resultado de la presencia del fármaco y comparando con un estándar de referencia. La curva estándar fue obtenida al preparar 10 series de una solución de OTC con 7 diluciones como se detalla en el cuadro 10.

#### **8.3.1.4 Análisis estadísticos**

Con la finalidad de determinar los datos farmacocinéticos, se obtuvieron las concentraciones promedio de OTC para cada muestra analizada (músculo, hemolinfa y hepatopáncreas) por tratamiento (Grupo A, B y C) en función del tiempo durante y después de la administración del fármaco por vía oral. Estos datos fueron introducidos en el programa PKAnalyst (MicroMath, PKAnalyst, Scientific Software) para ser probados en diferentes modelos farmacocinéticos. El modelo se seleccionó de acuerdo al ajuste de los datos a varias ecuaciones exponenciales usando un análisis de regresión no lineal con el mayor nivel de confiabilidad ( $R > 0.9$ ).

Los datos farmacocinéticos tales como la constante de eliminación ( $K_e$ ), vida media de eliminación ( $K_e\ 1/2$ ), constante de absorción ( $K_a$ ), vida media de absorción ( $K_a\ 1/2$ ), área bajo la curva (AUC), concentración máxima alcanzada ( $C_{max}$ ) y tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T\ C_{max}$ ), fueron obtenidos para cada muestra por tratamiento. La vida media de eliminación,  $K_e\ 1/2$ , fue determinada por  $K_e$ , la tasa constante de eliminación de la función logarítmica de la concentración del fármaco por el tiempo (Ecuación 1), la vida media de absorción,  $K_a\ 1/2$ , fue determinada por  $K_a$  (Ecuación 2) y el área bajo la curva, AUC, se calculó por medio de método de integración trapezoidal de la curva concentración-tiempo para cada tejido y tratamiento (Fig. 5).

$$K_e\ 1/2 = \ln 2/K_e \quad \text{Ecuación 1}$$

$$K_a\ 1/2 = \ln 2/K_a \quad \text{Ecuación 2}$$



Adicionalmente, fue utilizado un análisis de ANOVA de modelos mixtos con mediciones repetidas para determinar si existían diferencias significativas de las concentraciones alcanzadas de OTC entre los tres tratamientos (A, B y C) en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas por día de muestreo.

### **8.3.2 Farmacocinética de OTC en camarones dentro de estanques de producción semi-intensivos**

Con la finalidad de comparar los resultados farmacocinéticos encontrados en camarones tratados bajo condiciones controladas, se decidió realizar un estudio farmacocinético bajo condiciones de estanquería en una granja de tipo semi-intensivo donde las condiciones ambientales como la temperatura y la salinidad varían de forma independiente, las cuales podrían afectar los parámetros cinéticos de la OTC administrada vía oral, ya que como es bien sabido muchos procesos fisiológicos en animales poiquilotermos están determinados por las condiciones ambientales del medio donde se desarrollan ocasionando cambios en la frecuencia de alimentación y por ende la cantidad de fármaco consumida. Con base en lo anterior, se evaluó la concentración de OTC en músculo, hemolinfa y hepatopáncreas de camarones clínicamente sanos en estanques de producción semi-intensivos, administrando 3 dietas medicadas a razón de 2000 ppm, donde dos de ellas tenían un polímero que blindaba a la OTC. El periodo de medicación fue de 7 días, seguido de un suministro de alimentación balanceada hasta cumplir 15 días post-tratamiento.

#### **8.3.2.1 Estanques y organismos**

Se eligieron 3 estanques de una granja de producción de camarón ubicada en el estado de Sonora, a 250 km de ciudad Obregón, donde no fue utilizado ningún antibiótico en 2 ciclos de producción, con el objetivo de evitar alteraciones en los resultados a obtener.

Las dimensiones de los estanques fueron de aproximadamente 10 ha y el agua de cada estanque fue abastecida por el mismo canal reservorio para todos.

La densidad de siembra fue la misma (aproximadamente de 14 organismos/ m<sup>2</sup>) y las postlarvas sembradas fueron de *L. vannamei* de la misma talla, edad y lugar de procedencia. El porcentaje de recambio de agua se estimó en un 22% diario.

Para dar inicio al suministro de las dietas medicadas se requirió que los camarones alcanzaran una talla entre  $10.2 \pm 1.66$  g promedio en los tres estanques.

Fue necesario realizar análisis de histopatología (Anexo 2) de los organismos de cada uno de los estanques, con la finalidad de corroborar que no se encontraran afectados por alguna enfermedad a nivel clínico, principalmente de etiología viral. Los camarones utilizados para este fin fueron capturados al azar en cada uno de los estanque, procesando en total 30 animales por muestreo.

### **8.3.2.2 Aplicación de alimento medicado**

Se administraron tres alimentos balanceados medicados con OTC a razón de 2000 ppm elaborados con las mismas premezclas que en los experimentos anteriores, dos de ellos con una OTC blindadas y el otro sin blindar. Los tratamientos fueron asignados de la misma forma que en los experimentos anteriores, es decir, premezcla A (producto experimental de Avimex, México) como el grupo A, premezcla B (producto experimental de Avimex, México) denominado como grupo B y la OTC sin blindar fue una premezcla comercial llamado grupo C.

El alimento balanceado no medicado suministrado antes y después de la medicación fue de la marca Purina<sup>®</sup>.

Todos los alimentos ocupados en este ensayo, se almacenaron en un lugar con luz mínima, sin humedad y estibando no más de 10 sacos.

Las raciones y la frecuencia de alimentación (aproximadamente dos veces al día), dependieron de la cuantificación del consumo de los organismos por medio de las canastillas de alimentación que son colocadas en los estanques.

Al alcanzar un peso de  $10.2 \pm 4.66$  g se dio inicio a la administración de las dietas medicadas en los 3 estanques, por un periodo de 7 días con una dosis de 140 mg/kg de peso vivo, seguido de una alimentación con una dieta no mediada para todos los estanques.

### **8.3.2.3 Toma y análisis de muestras**

El monitoreo de organismos acuáticos en muchas ocasiones se dificulta por diversas razones por ejemplo, la extensión de los estanques, la distribución de los organismos, la falta de visualización de los mismos, entre otras.

Sin embargo, si se realizan muestreos frecuentes, el comportamiento de la población se puede ver reflejado en dichos muestreos, es por ello que fueron monitoreados semanalmente cada uno de los estanques como se explica a continuación.

Se realizaron 11 muestreos como se especifica en el cuadro 11 donde se capturaron 50 camarones por cada uno de los estanques, eligiendo 5 puntos al azar en cada estanque.

A los camarones se les extrajo la hemolinfa de la misma forma que en el ensayo del laboratorio (Anexo 3) y también se obtuvo el músculo abdominal y el hepatopáncreas para analizar el contenido de OTC por medio de HPLC en las muestras (Anexo 4 y 5). El almacenamiento de las muestras tomadas fue de -20 °C hasta su proceso.

#### **8.3.2.4 Análisis estadísticos**

El promedio de las concentraciones alcanzadas de OTC para músculo, hemolinfa y hepatopáncreas, por tratamiento, se analizaron de la misma forma que los resultados obtenidos en el ensayo de laboratorio. Para mas detalles, ver la sección de análisis estadísticos de las pruebas de farmacocinética en camarones bajo condiciones de laboratorio.

### **8.4 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de laboratorio y estanquería**

#### **8.4.1 Residuos de OTC en sedimentos tratados bajo condiciones de laboratorio**

Con la finalidad de determinar la persistencia de OTC en sedimento de las peceras que fueron tratadas con éste fármaco, se realizaron muestreos antes, durante y después de recibir el tratamiento como se observa en el cuadro 12.

La toma de muestras de los sedimentos en los contenedores fue realizada tomando pequeñas muestras de 9 puntos a través de toda la superficie. Estas muestras se homogenizaron para formar una sola de aproximadamente 100 g. colocándolo en bolsas de polietileno selladas de forma hermética alejándolas de la luz y mantenidas a -20°C hasta su análisis. Esto fue repetido en los 6 tanques durante los 5 tiempos de muestreo, generando un total de 30 muestras analizadas por triplicado por medio del método microbiológico de difusión de agar según Bennett y col. (1966)<sup>90</sup> (Anexo 6).

#### **8.4.2 Residuos de OTC en sedimentos de estanques de producción tipo semi-intensivos**

Las muestras para análisis de residuos de OTC en sedimento de los estanques de camarón fueron obtenidas de los mismos estanques donde se llevó a cabo la administración del alimento medicado (Grupos A-C). A través de todo el experimento, se realizaron 6 muestreos como se detalla en el cuadro 13.

Los muestreos se realizaron por triplicado en la entrada, parte media y salida de los estanques (Fig. 6) tomando aproximadamente 10g de sedimento por cada punto, generando un total de 9 muestras por estanque, las cuales se homogenizaron y se subdividieron en tres sub-muestras que fueron mantenidas en bolsas de polipropileno selladas a -20 °C hasta su posterior análisis por microbiología de difusión de agar<sup>90</sup> (Anexo 6).

#### **8.4.3 Análisis estadísticos para los sedimentos del ensayo en laboratorio y estanques**

La persistencia y las concentraciones alcanzadas de OTC en el sedimento para ambos ensayos (laboratorio y estanquería), se determinó por medio de una regresión lineal. Las diferencias entre las concentraciones alcanzadas se realizaron por medio de un análisis de ANOVA con variedad de modelos mixtos.

Las variables farmacocinéticas cuantificadas fueron la constante de eliminación ( $K_e$ ), vida media de eliminación ( $K_e \frac{1}{2}$ ), área bajo la curva (AUC), concentración máxima alcanzada ( $C_{max}$ ) y tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T_{C_{max}}$ ). La  $K_e \frac{1}{2}$  fue determinada por la ecuación 1 (descrita en el análisis estadístico para los animales en laboratorio) y el AUC por el método trapezoidal como se especifica en la figura 5.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Validación de los métodos y eficiencia de extracción

Para determinar las concentraciones de OTC en premezclas, alimentos y sedimentos se utilizó el método microbiológico de difusión de agar.<sup>90</sup> La validación de éste método se basó en la determinación de una curva estándar, la cual fue lineal con una escala semilogarítmica en un rango de 500 - 0.391 µg/ml siendo el coeficiente de correlación >0.99 como se observa en la figura 7. Se obtuvo un total de 100 mediciones que fueron el resultado del análisis de 10 series de diluciones preparadas en diferentes días de forma independiente pero con la misma OTC (Cuadro 14). El límite de detección fue de 0.391 µg/ml, sin embargo no se observó un crecimiento constante de la bacteria, es por lo anterior que el límite de cuantificación confiable fue de 0.78 µg/ml.

La eficiencia de extracción en alimentos y premezclas se comprobó por el método de adición donde se eligieron 4 concentraciones distintas de OTC con 4 repeticiones, obteniendo un porcentaje de recuperación de  $99.64 \pm 0.6 \%$  como se observa en el cuadro 15.

El método utilizado para determinar la eficiencia de la extracción en el caso de sedimentos fue el mismo que el de los alimentos, es decir, se realizó una adición de 4 diferentes concentraciones por cuadruplicado a sedimentos libres de OTC, obteniendo una porcentaje de recuperación de  $70.31 \pm 1.45 \%$  (Cuadro 16).

El análisis de hemolinfa, músculo y hepatopáncreas se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La validación de método fue determinada por una curva de regresión lineal con un rango de 0.1 -  $1.5625^{-3}$  µg/µl donde el coeficiente de correlación fue > 0.99 (Cuadro 10, Fig. 8). El límite de detección se obtuvo probando distintas diluciones de OTC en forma descendente, obteniendo una concentración de 0.05 µg/ml.

La validación del método de extracción para el músculo, hemolinfa y hepatopáncreas se realizó la adición de una cantidad de OTC en muestras libres de dicho fármaco. En el caso del músculo y el hepatopáncreas (Cuadro 17) el porcentaje de recuperación fue  $78.19 \pm 0.95\%$  y  $70.80 \pm 2.29\%$  respectivamente. En el caso de la hemolinfa el porcentaje de recuperación fue de  $88.23 \pm 1.50\%$  (Cuadro 18).

## **9.2 Concentración de OTC en premezclas y pérdida del fármaco en dietas medicadas por pelletización**

El cuadro 19 reúne la información relevante sobre la cantidad de OTC detectada en las tres premezclas utilizadas en el experimento, y también el alimento mezclado con la premezcla antes y después del pelletizado.

Las comparaciones de las medias entre las premezclas (A-C) y entre el alimento antes de pelletizar no se reveló una diferencias estadísticamente significativa entre grupos ( $P < 0.001$ ), es decir, tanto las premezclas y los alimentos antes de pelletizar iniciaron con concentraciones sin diferencias.

Por otro lado, en éste mismo cuadro está claro que cuando los alimentos medicados fueron pelletizados, la concentración de OTC en el grupo C fue estadísticamente inferior a los valores correspondientes obtenidos para el grupo B (1022  $\mu\text{g/g}$  en el grupo C vs. 1243  $\mu\text{g/g}$  en el grupo B;  $P = 0.0086$ ). Es decir, los pellets hechos con la premezcla del grupo C contiene 11.01% menos OTC que los pellets hechos con la premezcla B, teniendo 48.9% menos de OTC que concentración teóricamente esperada (2000  $\mu\text{g/g}$ ); pero este comportamiento no se repitió al comparar los alimentos pelletizados con los grupos C vs. A de quien los pellets contuvieron 1111.4  $\mu\text{g/g}$  (44.43% menos de la concentración teóricamente esperada). Las diferencias entre C y A era entonces, no estadísticamente significativa.

## **9.3 Pérdida de OTC en dietas medicadas por el proceso de lixiviación**

La figura 9 ilustra, para los estudios de lixiviación, que la OTC sufrió un abrupto y bien definido declive de la actividad antibacteriana. Después de 30 minutos, más de la mitad de la concentración se perdió en todos los grupos. Sin embargo, mas tarde el decremento de la concentración sigue una pendiente diferente en los alimentos elaborados con las premezclas blindadas (grupos A y B) ya que tienden a una estabilidad. La pendiente del decremento en el grupo C no cambió tan notoriamente como en los grupos con OTC blindada (A y B) el cual sigue una pendiente muy pronunciada cuesta abajo. El comportamiento de los tres grupos fue ajustado dentro de una curva exponencial con una pendiente de segundo orden explicado por un análisis de regresión ( $R^2 > 0.99$ ). Las concentraciones de OTC en pellets preparados

con blindajes (A y B) a los 150 minutos fueron estadísticamente más altos que los pellets preparados con premezclas de OTC sin blindar (premezcla C) ( $P < 0.001$ ). No obstante, las pérdidas en todos los pellets elaborados, usando las tres premezclas sometidos a un proceso de lixiviación, fue considerable, alcanzando las siguientes concentraciones a las 2.5 h de lixiviado: A =  $401 \pm 12 \mu\text{g/g}$  (80% de pérdida); B =  $306 \pm 8 \mu\text{g/g}$  (85% de pérdida); C =  $38 \pm 11 \mu\text{g/g}$  (98% de pérdida) (Cuadro 20).

## 9.4 Farmacocinética de camarones en condiciones de laboratorio

Antes de iniciar la administración vía oral de la OTC en los camarones en condiciones de laboratorio, se realizó un análisis histopatológico a 30 animales, 5 por cada tanque (10 por tratamiento) donde se observó una presencia de epibiontes y gregarinas en casi todo los animales analizados y la presencia aparente de *Vibrio spp.* en el 10% de los organismos analizados, considerados como organismos que se encuentran frecuentemente cohabitando con los camarones y otros crustáceos (Cuadro 21). Por lo tanto, no se determinó ninguna enfermedad que pudiera limitar o modificar los resultados de la administración de OTC en los animales.

En los cuadros 22, 23 y 24 se listan los promedio de las concentraciones cuantificadas en el tejido muscular de los camarones para los grupos A, B y C, respectivamente. En todos los días muestreados, se encontraron diferencias significativas entre los 3 tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10), alcanzando mayor concentración el músculo de camarones tratados con la premezcla del grupo B (blindada) y de acuerdo con los datos farmacocinéticos (Cuadro 25), siendo superior en un 37.35 % que el grupo tratado con la premezcla A (blindada) y una 72.79% que la premezcla C (sin blindar), con una  $C_{\text{max}}$  de  $7.01 \mu\text{g/g}$  en el quinto día del tratamiento y descendiendo hasta  $4.63 \mu\text{g/g}$  al décimo día después de la última dosis.

En el caso del músculo de camarones alimentados con la premezcla del grupo A, las concentraciones se mantuvieron entre  $4.32\text{-}3.10 \mu\text{g/g}$  en todo el ensayo a diferencia del músculo correspondiente al grupo C el cual después de alcanzar su  $C_{\text{max}}$  al tercer día de tratamiento ( $3.13 \mu\text{g/g}$ ), ésta desciende rápidamente hasta alcanzar el límite de detección a los 10 días post-tratamiento (Fig. 10, Cuadro 25).

Las concentración de OTC alcanzadas en la hemolinfa de camarón por grupo, se detallan en los cuadros 26 (grupo A), 27 (grupo B) y 28 (grupo C) los que se comparan en la figura 11, en la que se observa una diferencia significativa entre los 3 tratamiento en todos los días muestreados ( $P < 0.05$ ) alcanzando una mayor concentración el grupo A, medicado con la premezcla A, a los 3 días de tratamiento. De acuerdo con los parámetros farmacocinéticos (Cuadro 25), la concentración de OTC presente durante todo el ensayo del grupo A, es superior en un 40.85% a la registrada por B y 74.45% mayor que el grupo C. La persistencia del fármaco se observó hasta los 10 días después de la última dosis para la hemolinfa del grupo A (blindada) cuantificando 1.15  $\mu\text{g/ml}$ , 0.36  $\mu\text{g/ml}$  para el grupo B (blindada) y por debajo del límite de detección (0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) para el grupo C (sin blindar) a los 5 días post-tratamiento.

De los tres tipos de muestras analizadas, el hepatopáncreas fue el que mayor concentración de OTC registró en los 3 tratamientos. Las concentraciones cuantificadas para este órgano de los grupos A, B y C se describen en los cuadros 29, 30 y 31 respectivamente. El grupo B (blindada) fue el que presentó la mayor concentración de manera no significativa el último día de tratamiento (día 7) correspondiente a 20.27  $\mu\text{g/g}$ , seguido del grupo C (sin blindar) con 17  $\mu\text{g/g}$  y finalmente el grupo A (blindada) con 10.62  $\mu\text{g/g}$  alcanzados a los 7 días post-tratamiento (Fig. 12). Sin embargo, tal como se muestra en los parámetros farmacocinéticos obtenidos (Cuadro 25), la vida media de eliminación del fármaco en hepatopáncreas fue mayor en el grupo A (blindada) con 99.02 h, comparado con el grupo C y B, los cuales presentaron una vida media de eliminación de 90.02 y 35.55 h respectivamente.

## **9.5 Farmacocinética de camarones en condiciones de estanquería**

En el análisis histopatológico realizado a 30 animales (10 de cada estanque) antes de iniciar la medicación, determinó que existía a nivel subclínico la presencia de virus que podrían desarrollar enfermedades como WSSV y TSA (Cuadro 32). Sin embargo, no se observaron signos clínicos de la enfermedad ni tampoco una disminución en la alimentación, por lo anterior se procedió a iniciar con la medicación.

Los resultados de las concentraciones en músculo de los tres grupos alimentados con



diferentes premezclas de OTC (A, B, y C) se listan en los cuadros 33, 34 y 35. La presencia del fármaco se detectó a las 12 horas después de la primera dosis en los grupos A y C, y para el caso de B la OTC se encontró en niveles detectables hasta las 24h. Por otra parte, la determinación del fármaco en este tejido, mostró que el grupo A alcanzó su C<sub>max</sub> el día 5 de medicación con una concentración de 3.78 µg/g de tejido, mientras que tan solo 1 día después del inicio de la medicación el grupo B registró su C<sub>max</sub> de 4.21 µg/g de tejido, dejando muy por debajo de forma significativa (P<0.05) las concentraciones alcanzadas por el grupo C el cual registro una C<sub>max</sub> de 1.43 µg/g a los 3 días de tratamiento (Fig. 10, Cuadro 25). Es importante destacar que no hubo diferencia significativa (P>0.05) entre los grupos A y B desde el tercer día medicado hasta el primer día post-tratamiento. Sin embargo, la OTC del grupo A dejó de ser detectada a los 3 días de haber terminado el tratamiento. Con respecto a las concentraciones alcanzadas por el grupo C (OTC sin blindar) descendieron después del tercer día de medicación llegando al límite de detección a los 3 días post-tratamiento.

Con respecto a las concentraciones registradas en hemolinfa, la premezcla que registró mayor concentración de forma significativa (P<0.05) fueron los camarones del grupo A (blindada) el cual fue de 16.2 µg/ml alcanzada a los 3 días después de la primera dosis (Fig. 11, Cuadro 36), seguido del grupo B (blindada) el cual después de alcanzar su C<sub>max</sub> a los 3 días de medicación (8.4 µg/ml, cuadro 25) mantuvo concentraciones entre 7.4 y 7.9 µg/ml hasta el séptimo día de tratamiento (Cuadro 37). El grupo C (sin blindar) fue el que registró la menor concentración de forma significativa (P<0.05) en todos los días muestreados con una C<sub>max</sub> de 3.9 µg/ml a los 3 días medicado (Cuadro 25) manteniéndose en un rango de 3.9 – 0.9 µg/ml hasta los 5 días post-tratamiento. En los 3 grupos se llegó al límite mínimo cuantificable a los 7 días después de la cesación del fármaco, es decir, no se cuantificó mas de 0.05 µg/ml. De acuerdo con el AUC registrada en cada grupo durante todo el experimento (Cuadro 25), el grupo A (blindada) fue mayor que B (blindada) un 49.13% y un 82.78% con respecto al AUC del grupo C (sin blindar).

Las concentraciones que se registraron en hepatopáncreas se enlistan en los cuadros 39 en el caso del grupo A, 40 para el grupo B y 41 para el grupo C, donde se observan la media y la desviación estándar de cada muestreo, los cuales fueron graficadas como se observa en la figura 12. En esta figura, se observa claramente que el grupo C fue el que de forma significativa (P<0.05) registró la mayor C<sub>max</sub> con 74 µg/g a las

12 h después de la primera dosis (Cuadro 25). Sin embargo, después del primer día medicado la concentración del fármaco siguió una pendiente muy pronunciada, la cual declinó hasta 1.3  $\mu\text{g/g}$  a los 7 días de medicación, registrando así, las concentraciones mas bajas después del tercer día de medicación hasta el final del experimento ( $P < 0.05$ ). Por su parte, el grupo que fue alimentado con la premezcla B (blindada) fue el que registró de forma significativa ( $P < 0.05$ ), una mayor concentración después del tercer día de medicación hasta el décimo días post-tratamiento con un rango de 54.3 – 8.6  $\mu\text{g/g}$  con una  $C_{\text{max}}$  de 57.1  $\mu\text{g/g}$  y un  $T_{\text{max}}$  de 24h (Cuadro 25). El grupo A (blindada) fue significativamente mayor que el grupo C y menor que el grupo B, con una  $C_{\text{max}}$  de 49.5  $\mu\text{g/g}$  a las 12 h después de la primera dosis (Cuadro 25). De los datos farmacocinéticos que se enlistan en el cuadro 25, podemos determinar por medio de la AUC que el grupo B tuvo una mayor concentración de fármaco durante todo el ensayo de un 35.35 % con respecto al grupo A y un 66.44 % comparado con el grupo C.

## **9.6 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de laboratorio**

Se realizaron 6 muestreos de sedimentos para cada grupo durante todo el ensayo. Los resultados se observan en los cuadros 42, 43 y 44 para los grupos A, B y C, respectivamente. Los datos de los cuadros están representados en la figura 13, donde se observa que el grupo C (sin blindar) registró la mayor  $C_{\text{max}}$  de 35  $\mu\text{g/g}$  a los 7 días de medicado significativamente ( $P < 0.05$ ) descendiendo hasta el límite de detección a los 7 días post-tratamiento. Por su parte el sedimento tratado con la premezcla A (blindada) presentó una  $C_{\text{max}}$  a los 7 días de tratamiento de 23.24  $\mu\text{g/g}$  (Cuadro 25), a diferencia de los sedimentos del grupo B (blindada) registró una  $C_{\text{max}}$  de 29.01  $\mu\text{g/g}$  a los 7 días medicado. Sin embargo, el fármaco fue detectado a los 10 días post-tratamiento con una concentración de 0.36  $\mu\text{g/g}$ , siendo el grupo B el que registró la mayor permanencia del fármaco de manera significativa ( $P < 0.05$ ).

Al compara el AUC la concentración de OTC en el sedimento del grupo C es mayor un 15.82 % que el grupo B y un 32.29 % cuando es comparado con el grupo A (Cuadro 25).

## **9.7 Persistencia de OTC en sedimentos bajo condiciones de estanquería**

Las concentraciones de OTC en los sedimentos de los estanques de producción semiintensiva de camarón blanco sometidos a un periodo de medicación por 7 días se listan en los cuadros 45, 46 y 47 para lo grupo A, B y C, respectivamente, los cuales se pueden apreciar gráficamente en la figura 13. Los datos farmacocinéticos se observan en el cuadro 25.

El grupo C (OTC comercial sin blindaje) registró la mayor concentración de OTC a los 7 días del tratamiento con una  $C_{max}$  de 312  $\mu\text{g/g}$  de forma no significativa ( $P > 0.05$ ) con respecto al grupo B, el cual registró una  $C_{max}$  de 286.9  $\mu\text{g/g}$ . Por otra parte, el grupo A, registró significativamente ( $P < 0.05$ ) las concentraciones más bajas en los muestreos correspondientes a los 5 y 7 días medicados, teniendo su  $C_{max}$  a los 7 días post- tratamiento (83.04  $\mu\text{g/g}$ ).

Tal como se observa en la figura 13, la persistencia de la OTC fue mayor en el grupo A y menor en el grupo C (no detectado a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$  a los 7 días post-medicados). Sin embargo, la concentración del grupo A decae rápidamente hasta no detectar el fármaco a los 10 días post-tratamiento. En el caso del grupo B, la OTC no es detectada después de 10 días post-tratamiento.

## 10. DISCUSIÓN

El uso de la OTC en la investigación esta fundamentada en que esté es el fármaco de mayor uso en la industria camaronera para combatir enfermedades provocadas por vibrios y rickettsias<sup>10-13</sup> además de la escasa información sobre la disposición y tiempo de retiro del fármaco cuando es administrado a los camarones, para que estos puedan ser consumidos con seguridad libres de residuos.

Antes del proceso de pelletización, las concentraciones de OTC de las tres premezclas evaluadas (A, B y C), no variaron estadísticamente como se muestra en el cuadro 18. Sin embargo, el proceso de pelletización de la OTC usando Maxi-Bond<sup>®</sup> como aglutinante, a una temperatura de 82 – 145 °C, presión de 620-740 psi y con 15% de humedad, redujo casi por mitad la actividad antibacterial de todos los preparados, expresada como concentración de OTC (A = 44%; B = 38% y C = 50%). Sin embargo, se detectó una diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los datos del preparado B vs. C, sugiriendo que las premezclas blindadas (A y B) reducen ligeramente la degradación del principio activo. Sin embargo, aun es necesario mucho trabajo antes de que se pueda obtener una protección eficaz del 100%, puesto que en este ensayo, casi 1000 µg/g de OTC se perdieron durante el proceso de pelletización del alimento medicado, con lo que se incrementan los costos de producción de dicho alimento. Algunos de estos hallazgo fueron predecibles, por reportes de otras investigaciones<sup>16,62</sup> donde se demostró que la OTC es propensa a ser quelada cuando se encuentra sujeta a factores medioambientales o mezclada con los ingredientes del alimento bajo condiciones como temperaturas relativamente altas (> 43 °C), salinidad, pH alcalino o luz.<sup>76</sup> En particular, Mohny y col. (1997)<sup>93</sup> resaltaron a la temperatura como el factor degradante más eficaz contra la OTC y el proceso de pelletización requiere normalmente temperaturas cercanas a los 60 °C.

En este estudio la pérdida de OTC definida como la actividad antibacterial por la concentración, debido a la pelletización, es mucho más pronunciada que la reportada por Frelier (1995)<sup>73</sup> la cual fue del 10 a 40% y reafirmando lo anterior, Montoya y Reyes (2002)<sup>14</sup> reportaron una pérdida del 12.5 al 25.8%. Otros autores reportan, con una OTC no blindada en pellets extrudizados, una pérdida del 30% de la concentración.<sup>94</sup> Este valor también es más bajo que los que se obtuvieron en este estudio, incluso comparando con las oxitetraciclinas blindadas (38 a 49% de pérdida).

Con base en lo anterior, la función de la capa externa del polímero que blindada las premezclas de OTC de los grupos A y B, se puede considerar que tuvo poca eficiencia para evitar degradación cuando se pelletizan. También, las diferencias entre los autores pueden atribuirse a los métodos analíticos que se utilizaron en cada caso.

Por otro lado, en este ensayo, se obtuvo un proceso de lixiviación bien definido por un decremento exponencial de segundo orden de la OTC para los tres grupos de pellets, preparados con OTC blindada y no blindada. Aunque se observó una mayor protección en los grupos A y B, las diferencias de la concentración después de 150 minutos reveló un efecto protector de 15 a 20% comparando con la premezcla de OTC no blindada. No obstante, la pérdida de la actividad antibacterial expresada como concentración es de 80% para el grupo A (grupo que estadísticamente presentó la mayor concentración de OTC) tomando como referencia la concentración teórica inicial de 2000 ppm con respecto a la concentración a los 150 min (400 ppm). Esto significa que si un camarón ingiere alimento pelletizado ablandado en el fondo del estanque, después de 150 minutos, éste se podría dosificar, considerando la OTC blindada del grupo A, con 400 µg OTC/g de alimento, y no con 2000 µg/g, como teóricamente se esperaría. Sin tomar en cuenta la palatabilidad, un camarón de 7g en condiciones óptimas puede tener una ingesta de comida diaria equivalente a 4.4% de su peso corporal.<sup>1</sup> Esto significa que éste camarón en particular estaría ingiriendo 123.2 µg (17.6 mg/kg de masa corporal). Ésta cantidad de OTC probablemente es suficiente para cubrir, la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para la mayoría de los microorganismos *Vibrio spp.* (0.1 - 12.5 µg/ml).<sup>89, 95</sup> La disponibilidad de una OTC no blindada se podría reducir notoriamente en comparación con una blindada (cuadro 20). En tal caso, la dosis final para un camarón similar será de tan sólo 1.7 mg/kg de biomasa. En contraste, un camarón infectado con *Vibrio spp.* que también pesa 7 g, presenta un consumo de alimento de 0 - 1% con respecto a su peso corporal,<sup>7</sup> por lo tanto, la dosis total de OTC consumida por el camarón es reducida a 4 mg/kg de masa corporal si se emplea una OTC blindada. En tal caso la OTC improbablemente reunirá el requisito necesitado para cubrir los valores de la CMI's.

Una detección temprana de camarones enfermos por *Vibrio spp.* es relativamente simple por un procedimiento de laboratorio.<sup>7</sup> En este estado, el consumo de alimento no es drásticamente obstaculizado, y por consiguiente es posible medicar con OTC; pero esto podría ser sólo si una OTC blindada se emplea en la fabricación del pellet para camarón.

Con base en lo anterior, se decidió administrar los distintos alimentos probados en el proceso de pelletizado y lixiviación a camarones *Litopenaeus vannamei* sanos en condiciones de laboratorio y estanquería ya que se ha observado que los hábitos alimenticios de las especies de peneidos pueden variar de forma considerable,<sup>96, 97</sup> lo cual puede afectar al comportamiento de los organismos y por ende la eficiencia del fármaco cuando es administrado.

Se han realizado estudios sobre la farmacocinética de la OTC en especies de camarones de importancia comercial como *Litopenaeus setiferus*,<sup>88</sup> *Penaeus monodon*<sup>71</sup> y *Litopenaeus vannamei*<sup>98</sup> donde la administración del fármaco se realiza por vía intrasínusal. Sin embargo no se han reportado estudios que describan una farmacocinética de OTC con multidosis por vía oral, como en el presente trabajo. Existen estudios que reportan la acumulación y pérdida de la OTC cuando es administrada por vía oral en especies como *Penaeus chinensis*,<sup>86</sup> *P. monodon*,<sup>99</sup> *P. setiferus*<sup>100</sup> y *L. stylirostris*.<sup>93</sup> No obstante, los intervalos de dosificación (de 1 a 3 veces al día), los días de tratamiento (de 3 a 21 días) y cantidad de fármaco en la dieta (entre 1000 y 10000 ppm de OTC) varían considerablemente, lo que tiene como consecuencia que las concentraciones alcanzadas y la persistencia del fármaco en los animales en estos estudios presente diferencias imponentes.

De acuerdo con los resultados obtenidos cuando la OTC se administró a camarones sanos en condiciones controladas de laboratorio (salinidad  $33 \pm 1.5$  ‰, temperatura  $24.2 \pm 1.02$  °C y pH de 7.8), las diferencias entre los grupos, expresadas como concentraciones cuantificadas en músculo, hemolinfa y hepatopáncreas, fueron más notables y de mayor importancia terapéutica. No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo en estanques de producción donde las condiciones fisicoquímicas del agua tuvieron una mayor variación (salinidad  $34.77 \pm 3.97$ , temperatura  $25.81 \pm 2.52$  y pH de 7.2-7.9), en algunos casos reforzaron los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio.

Como se detalla en la figura 10, en el ensayo de laboratorio, el grupo B alcanzó una mayor concentración en tejido muscular durante todos los días del muestreo, manteniendo una concentración del 83.33% después de 10 días al término de la dosificación con respecto a la concentración alcanzada el último día (6.19 µg/g). Este comportamiento es muy similar a lo obtenido con la premezcla A, pero difiere de los resultados obtenidos por la premezcla C (OTC comercial sin blindar) la cual después de alcanzar su C<sub>max</sub> al tercer día (3.13 µg/g) la concentración del fármaco desciende

rápidamente hasta no ser detectado a los 10 días post-tratamiento a diferencia de los grupo A y B, donde aun es detectada la OTC. Estos resultados difieren con lo obtenido en las pruebas de campo para las OTC blindadas, ya que no hay una diferencia entre los grupos A y B en todo ensayo pero si al comparar ambos con el grupo C. El grupo A alcanza su C<sub>max</sub> a los 5 días de la medicación (3.78 µg/g) y el grupo B a las 24 hrs de medicación (4.21 µg/g) pero ambas OTC no son detectadas a los 3 y 5 días post-tratamiento respectivamente. En el caso del grupo C, la C<sub>max</sub> se alcanza a los 3 días de tratamiento (1.43 µg/g).

Las concentraciones de ambos ensayos, laboratorio y estanquería, son superiores a las reportadas por Bumrungkunakorn y col. (2004),<sup>99</sup> quienes administraron una dieta a razón de 2000 ppm de OTC en el alimento a camarones *P. monodon* por un periodo de 5 días, donde cuantificaron una C<sub>max</sub> de 0.87 ppm a las 12 hrs. después de la primera dosis en condiciones de laboratorio, seguido de un decremento drástico después de las 24 hrs. de tratamiento, a pesar de que el fármaco se administró por 4 días posteriores. Por su parte, Corliss (1979)<sup>100</sup> reportó concentraciones mas bajas en *P. setiferus* comparadas con el grupo B y valores muy cercanos al con respecto al grupo A del presente estudio, a pesar de que la administración del fármaco se realizó por un periodo de 21 días con dietas medicadas a razón de 1000 ppm (C<sub>max</sub> = 1 y 1.04 µg/g; T<sub>max</sub> = 21 días en ambos caso), 5000 ppm (C<sub>max</sub> = 3.4 y 3.52 µg/g; T<sub>max</sub> = 14 y 7 días respectivamente) y 10000 ppm (C<sub>max</sub> = 4.2 y 3.08; T<sub>max</sub> = 21 y 3 días respectivamente).

Weifen y col. (2004)<sup>86</sup> administraron OTC a juveniles de *P. chinensis* en dietas elaboradas con 2000 µg de OTC/g de alimento, por un periodo de 3 días. En este ensayo, los autores reportan una C<sub>max</sub> de 4.27 µg/g de tejido muscular alcanzados a las 3 hrs. después de la primera administración. A pesar de que esta concentración supera las C<sub>max</sub> alcanzadas en los ensayos en estanques de los grupos A, B y ensayos de laboratorio y de campo para el grupo C, las concentraciones descienden drásticamente hasta alcanzar 0.19 µg de OTC/g de músculo a los 3 días de medicación, lo cual no sucede con las OTC's de los grupo A y B (OTC's blindadas), las cuales se mantienen durante todo el periodo de tratamiento. Sin embargo, un comportamiento similar se observa en el grupo C (OTC no blindada) para ensayos de laboratorio y estanquería, donde después de alcanzar la C<sub>max</sub>, la concentración de OTC desciende a pesar de seguir siendo alimentados con pellet medicado (Fig. 10).

Es importante mencionar que ninguno de los trabajos antes mencionados cuantificó la concentración de OTC en sus dietas, por lo tanto, es posible que la cantidad de OTC administrada en los ensayos no haya sido la reportada, puesto que en este trabajo se ha determinado una pérdida de la OTC cercana al 50% durante el proceso de pelletización (Cuadro. 19). Con base en lo anterior, las diferencias entre las concentraciones encontradas en este ensayo y los estudios reportados por otros autores antes mencionados, es debida a la concentración de OTC real en las dietas y las condiciones de los experimentos, ya que todos los ensayos de los autores antes mencionados fueron realizados en el laboratorio, donde las condiciones son controladas.

Por otro lado, Mohney y col. (1997)<sup>93</sup> realizaron un estudio de residuos de OTC en *L. stylirostris* los cuales alimentaron por 14 días con un pellet elaborado con 1500 µg de OTC/ g de alimento. La Cmax reportada en este trabajo (5.19 µg de OTC/g de músculo) lo que supera a todas las Cmax registradas en este ensayo con excepción del grupo B en pruebas de laboratorio (Cmax = 7.01). Sin embargo, estos resultados pueden ser explicados por la concentración de OTC presente en las dietas, puesto que Mohney y col. (1997)<sup>93</sup> cuantificaron una concentración de 1455 µg de OTC/g de alimento al inicio del experimento y en el presente estudio la concentración de las dietas fueron menores a esta cantidad (A = 1111.4, B = 1242.45 y C = 1022.2 µg de OTC/g de alimento).

Ninguno de los estudios anteriores reporta el uso de OTC blindada o recubierta por un polímero que evite la pérdida del fármaco, es por esto y con base en lo anterior, que se podría afirmar que la persistencia de OTC en músculo de camarones tratados, esta influencia por el blindaje de las premezclas A y B, las cuales brindan una protección terapéutica más completa y por mayor tiempo.

No obstante, aun cuando ya no sea posible cuantificar OTC en músculo, no se puede garantizar que el fármaco sea eliminado completamente del camarón, ya que hay evidencia de que una gran parte de OTC se deposita en la cutícula formando complejos di y trivalentes con los iones de calcio presentes dando lugar a moléculas de Ca-Oxitetraciclina considerablemente estables<sup>86</sup> lo cual hace suponer que probablemente exista una gran concentración de OTC en cutícula cuando ya no se detecta en ningún órgano. Sin embargo, esta se elimina rápidamente cuando el camarón entra en periodo de muda. No obstante, la concentración de OTC depositada en la cutícula no se cuantificó en este ensayo, ya que en el mercado esta es la parte



que tiene menos importancia comercial, es por ello que el esfuerzo se centró a cuantificar las concentraciones en músculo.

La eliminación de OTC en músculo de camarón correspondientes a los ensayos de laboratorio fue más lenta que en los ensayos de estanquería. En los ensayos de laboratorio, los grupos A y B se detectaron concentraciones de 3.2 y 4.63  $\mu\text{g/g}$  a los 10 días post-tratamiento, obteniendo una vida media de eliminación ( $K_e \frac{1}{2}$ ) de 630.13 y 577.62 hrs. respectivamente. El grupo C alcanzó el límites de detección (LD) de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , a los 10 días post-tratamiento y la  $K_e \frac{1}{2}$  fue de 83.51 hrs. Con respecto a los ensayos en estanques, la OTC de los grupo A y C no fue detectada a los 3 días post-tratamiento y el grupo B a los 5 días post-tratamiento con una  $K_e \frac{1}{2}$  de 56.82, 29.88 y 50.59 h respectivamente. Por su parte, Weifen y col. (2004)<sup>86</sup> no detectaron OTC a primer día post-tratamiento (LD = 0.05  $\mu\text{g/g}$ ), Corliss (1979)<sup>100</sup> para los grupos medicado con 1000 ppm no detectó OTC a los 3 días post-tratamiento y los grupo tratado con 5000 ppm no se detecto entre 7 y 14 días post-tratamiento. Bumrungekunakorn y col. (2004)<sup>99</sup> no reportaron OTC a los 7 días post-tratamiento a más de 0.02  $\mu\text{g/ml}$ . Finalmente Mohny y col. (1997)<sup>93</sup> no describieron concentraciones a más de 0.2  $\mu\text{g/ml}$  a los 5 días post-tratamiento.

Con respecto a los ensayos de las concentraciones alcanzadas en hemolinfa de camarones en laboratorio y estaquería podemos destacar que los valores de  $C_{\text{max}}$  en hemolinfa difieren de manera significativa entre los 3 grupos de los ensayos de laboratorio (Cuadro 25), siendo mayores en el grupo A (28.25  $\mu\text{g/g}$ ) que en los grupos B y C (13.38 y 5.73  $\mu\text{g/g}$ ) respectivamente. Esto es confirmado con los resultados obtenidos en los ensayos de estanquería, ya que A alcanza la mayor concentración (16.2  $\mu\text{g/ml}$ ), seguido de B (8.4  $\mu\text{g/ml}$ ) y finalmente de C (3.9  $\mu\text{g/ml}$ ). Lo anterior puede ser obra del blindaje en los principios activos de los 2 primeros compuesto, no así del tercero (grupo C). Lo anterior pone de manifiesto las ventajas del blindaje y protección del principio activo lo cual aumentará una mayor eficacia, menores costos y sobre todo un manejo inteligente y más racional de la medicación, evitando así una sub dosificación que pudieran impactar en los fenómenos de resistencia, como se ha descrito en estudios anteriores.<sup>31, 79, 101</sup> Así mismo se podrá afirmar que los niveles alcanzados en la hemolinfa son adecuados para la terapéutica de un problema sistémico, siendo el de mejor elección la OTC del grupo A.

No hay informes de la concentración de OTC en hemolinfa cuando los camarones son dosificado por varios días vía oral. Los reportes existentes denotan las

concentraciones alcanzadas en hemolinfa de camarones después de una dosis intrasínusal, es decir, dentro del seno venoso del camarón. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Sangrungruang y col. (2004),<sup>71</sup> quienes dosificaron a camarones con 10 µg de OTC/g de camarón dentro del seno venoso, obteniendo una C<sub>max</sub> de 41.6 µg de OTC/ml de hemolinfa. Sin embargo, estos datos no pueden ser comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

En suma, la vida media de eliminación de los preparados A y B en hemolinfa de ensayos en laboratorio (73.7 vs. 48.1 h) y ensayos de estanquería (70.7 vs. 31.4 h), también contribuyen a mantener niveles terapéuticos varias veces por arriba de los valores de las CMI's de la mayoría de los patógenos que afectan al camarón según lo reportado por Takahashi y col. (1985)<sup>89</sup> (0.1-12.5 µg/ml) durante más tiempo con relación al preparado C, lo cual contribuye a una mayor efectividad dado que la OTC es un fármaco tiempo-dependiente, es decir, para la OTC, el tiempo en que las bacterias son expuestas a concentraciones de antimicrobiano en el cual se excede la CMI, es la mayor determinante de la eficacia clínica y el objeto de la terapia buscando el mantener los niveles de OTC por arriba de la CMI del patógeno el mayor tiempo posible.

Por otro lado, si bien las concentraciones en hemolinfa del preparado B fueron menores a las del preparado A para ambas pruebas (laboratorio y estanquería), en hepatopáncreas sucedió a la inversa, poniendo de manifiesto la excelente distribución que tuvo dicho preparado convirtiéndose en la mejor opción terapéutica para el control de las principales enfermedades infecciosas del camarón (Vibriosis, Rickettsiosis, etc.) dado a que este órgano es el principal lugar que afectan estos padecimientos.<sup>7</sup> Existen pocos trabajos sobre las concentraciones alcanzadas en hepatopáncreas después de una dosis oral, probablemente por la complejidad de extracción de la OTC en dicho órgano. Bumrungkunakorn y col. (2004)<sup>99</sup> determinaron las concentraciones de OTC en hepatopáncreas después de un tratamiento con OTC (2000 ppm) por 5 días, registrando 19.05 µg de OTC/g de hepatopáncreas a los 30 minutos después de la primera dosis. Sin embargo, esta concentración decae rápidamente hasta registrar una concentración de 1 µg/g a tan solo 24 hrs. de medicado. Las concentraciones oscilan entre 0.67 y 0.88 µg/g de los 2 a los 4 días medicado y el límite de detección (0.02 µg/ml) es alcanzado a partir del día 5 post-tratamiento. Estos resultados fueron muy inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, inclusive con respecto a la OTC no blindada (grupo C) para los ensayos de laboratorio y estanquería. Estas diferencias

son probablemente influenciadas por el método de cuantificación del fármaco, la eficiencia de extracción y la interferencia de la gran cantidad de proteínas, lípidos y otras sustancias presentes en el hepatopáncreas.

Es importante mencionar que, mientras en hemolinfa y hepatopáncreas de los camarones tratados en los ensayos de laboratorio con las premezclas A y B (blindadas), las concentraciones de OTC se encuentran entre 0.36 y 4.19  $\mu\text{g/g}$  a los 10 días post-tratamiento, en músculo se encuentran entre 3.2 y 4.63  $\mu\text{g/g}$ , esto muy probable se debe a un proceso de redistribución de la OTC presente en hepatopáncreas y hemolinfa lo cual contribuye a una alta acumulación del fármaco en músculo.<sup>86, 102</sup>

En México, se encuentra aprobado el uso de fármacos como la OTC para la camaronicultura. Sin embargo, los animales tratados deben salir al mercado respetando los límites máximos residuales (MRL).<sup>32</sup> Para la OTC el MRL es de 0.1 ppm cantidad que en este trabajo es alcanzada a los 5 días post-tratamiento en músculo de camarones que fueron tratados bajo condiciones de estanquería en los 3 grupos.

Por otro lado, se sabe que una gran parte de la OTC que es administrada a los camarones se deposita en el sustrato. Sin embargo, la persistencia del fármaco es influenciada directamente por diversos factores ambientales, tal es el caso de la temperatura, el pH, la cantidad de iones en el agua, la descomposición del propio sedimento, entre otros.<sup>62, 103</sup>

En este trabajo, no se registró una diferencia significativa de la concentración de OTC en el sedimento de los ensayos en laboratorio durante todo el periodo muestreado de los 3 grupos analizados y la persistencia de 2 de ellos, A y C, fue de tan solo 7 días después del último día de medicación y 10 días post-tratamiento para el grupo B. En contraste, los ensayos de estanquería si presentaron diferencias significativas entre las concentraciones alcanzadas de los grupos B y C vs. A, es decir, significativamente los grupos B y C presentaron las concentraciones mas altas de hasta 286.9 y 312  $\mu\text{g/g}$  respectivamente a los 7 días de medicado, mientras que el grupo A presentó 83  $\mu\text{g/g}$  a los 7 días post-tratamiento. Sin embargo, para todos los grupos en ambos ensayos, no se detectó OTC a los 10 días post-tratamiento.

Existen varios trabajos sobre la persistencia de OTC en sedimentos de granjas camaroneras y peces. Tan solo 3 de ellos han informado que la presencia de OTC

puede ser de 14-20 días,<sup>104</sup> de 66 días con una vida media de 16 días,<sup>105</sup> o hasta de 9-419 días,<sup>106</sup> todas post-tratamiento. En este estudio, la vida media para todos los grupos y ensayos va desde 11.14 hasta 45.6 h, las cuales son más cortas que las reportadas por Coynea y col. (1994).<sup>105</sup> Por su parte, Lalumera y col. (2004)<sup>107</sup> reportan que no se detecta OTC en los alrededores de granjas de peces marinos en tan solo 5 días post-tratamiento.

Sin embargo la diferencia entre los resultados obtenidos se deben principalmente a las condiciones del agua y los métodos utilizados para su determinación. En este trabajo, la cantidad de OTC presente en los sedimentos se determinó por un método microbiológico, por el cual probablemente sólo se detectó cerca del 5% de la concentración, ya que Lunestad y Goksoyr (1990)<sup>16</sup> reportan que cerca del 5% de la OTC en estanques presenta un efecto antibacterial, es por ello que no se detectó el fármaco más tiempo.

No obstante, los fármacos deben permanecer de forma activa el menor tiempo posible en los sedimentos de las granjas, debido a que pueden conducir al desarrollo de cepas bacterianas presentes en los estanques resistentes a los fármacos y a su vez, estos patógenos pueden afectar a los organismos de cultivo<sup>13</sup> e incluso especies nativas de las zonas cercanas a las granjas.

Con base en lo anterior, la protección de éste fármaco debe investigarse, porque una reducción ligera en consumo del alimento o un tiempo de lixiviación largo puede producir niveles inadecuados de OTC en los animales. Ésta es una tarea farmacéutica que no sólo debe tener en cuenta estabilidad de OTC sino también la palatabilidad de la capa extrema de las partículas de OTC.

## 11. CONCLUSIONES

El proceso estándar de elaboración de pellets para alimento de camarón con oxitetraciclina (OTC) reduce, aproximadamente a la mitad, la actividad antibacterial de este fármaco. Ni la OTC sin blindar, ni las dos OTC blindadas pudieron prevenir la pérdida de la actividad antibacterial. Sin embargo, se detectó una diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los datos del preparado B vs. C, sugiriendo que las premezclas blindadas (A y B) reducen levemente la degradación del principio activo, siendo la premezcla B la que ofrece la mejor protección.

Cuando los pellets con OTC fueron puestos en contacto con agua a 40 ‰ de salinidad y entre 23-25 °C, fue observado un rápido decremento de la actividad antibacterial, el cual se describe por un decremento exponencial de segundo orden para cualquiera de la OTC, acumulando la mayor pérdida los pellets elaborados con la premezcla sin blindar (grupo C). No obstante, después de 30 minutos, más de la mitad de la actividad antibacterial de la OTC se pierde, no importando si esta blindada o no. Sin embargo, a partir de este momento, el decremento tiene una caída diferente en las premezclas blindadas, mostrando un retraso en la pérdida de la actividad antibacterial comparado con la pérdida continua de la OTC en la premezcla no blindada. Después de 60 minutos, las premezclas de OTC A y B retuvieron cerca del 20% de su actividad antibacterial mientras la premezcla C tenía tan sólo el 7% de la actividad antibacterial. No obstante, la premezcla A retuvo la mayor concentración de OTC durante todo el proceso de lixiviación de forma no significativa con respecto a la premezcla B.

Tales diferencias pueden ser importantes cuando es considerado un progreso de cualquier enfermedad, al igual que los hábitos alimenticios de las diferentes especies de camarón. Así, la OTC blindada puede tener un papel importante proporcionando la cantidad apropiada de OTC a diferentes especies de *Penaeus spp.* bajo un proceso de enfermedad.

Con respecto a los estudios farmacocinéticos en condiciones de laboratorio y estanquería, se obtuvieron diferencias estadísticas importantes, incluso en animales trados con la misma premezcla. Estas diferencias, probablemente fueron originadas por las distintas condiciones en las que se desarrollaron los experimentos, es decir, en las pruebas de laboratorio, las condiciones medioambientales fueron estables, lo que no es posible hacer bajo condiciones de cultivo en estanques de producción de 10 ha.

Estadísticamente, las concentraciones de OTC registradas para todos los grupos fueron más altas en los camarones bajo condiciones de laboratorio.

A pesar de las diferencias entre los grupos en condiciones de laboratorio y estanquería, las concentraciones de OTC alcanzadas en los camarones tratados con la premezcla del grupo C (sin blindar) fueron estadísticamente más baja en ambas pruebas con respecto a los grupos que fueron dosificados en las premezclas blindadas (A y B) en los 3 tejidos analizados (músculo, hemolinfa y hepatopáncreas), llegando más rápido al límite de detección.

Con respecto a las concentraciones de OTC alcanzadas en los grupos con premezclas blindadas, en músculo y hepatopáncreas, el grupo B ofrece las mayores concentraciones. En el caso de la hemolinfa, el grupo A es el que mayor concentración alcanzó. Con base en lo anterior, la OTC del grupo A es una excelente opción para combatir problemas sistémicos, donde se requiere una gran concentración del fármaco en la hemolinfa. Sin embargo, el grupo B posee una mejor distribución puesto que el fármaco se encuentra mayormente en hepatopáncreas, órgano que es infectado por patógenos como vibrios y rickettsias que causan importantes padecimientos, convirtiéndose así en la mejor opción terapéutica.

En términos farmacológicos, los blindajes interfieren en parámetros como la vida media de absorción, vida media de eliminación,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  y AUC, tal como se observó en este experimento. En consecuencia, la persistencia del fármaco en el tejido comestible es modificada, ya que para los camarones alimentados con la premezcla no blindada, el Límite Máximo de Residuos (MRL) aprobado en México (0.1 ppm) es alcanzado al primer día post-tratamiento mientras que para las premezclas blindadas A y B es de 3 y 5 días post-tratamiento respectivamente. Con base en lo anterior, el músculo de los camarones tratados con las 3 premezclas se encuentra por debajo de los MRL después de 5 días de cesación del fármaco y pueden ser cosechados para su consumo sin ser un riesgo para la salud humana.

La persistencia de las OTC's probadas en sedimentos de estanques y laboratorio de cada uno de los grupos, presentó diferencias estadísticas notables. En el caso de las pruebas de laboratorio, la persistencia de OTC fue de 7 días post-tratamiento en los tres grupos con concentraciones similares en todo el experimento. Sin embargo, en condiciones de estanquería los grupos tratados con las premezclas B y C presentaron la mayor concentración, persistiendo en los 3 grupos hasta los 10 días post-tratamiento. Por lo tanto, el papel del blindaje sobre la degradación de la OTC no tuvo

ningún efecto, ya que se alcanzaron concentraciones parecidas en los tres grupos, al igual que el tiempo necesario para su degradación.

Con base en lo anterior, se podría establecer que el desarrollar blindajes para fármacos con uso acuícola, pueden cambiar la eficiencia del fármaco y por lo tanto la respuesta de los organismos. No obstante, es recomendable una detección temprana de camarones enfermos por *Vibrio spp.* actividad relativamente simple por procedimientos de laboratorio.<sup>7</sup> Puesto que en este estado, la ingesta no es drásticamente obstaculizada, y por consiguiente es posible medicar de forma más eficiente. Sin embargo, el desarrollo de blindajes es más importante cuando la detección no se hace en las etapas tempranas de la enfermedad, ya que, puede existir una reducción en consumo del alimento y/o el alimento puede estar sometido a un largo tiempo de lixiviación provocando niveles inadecuados de OTC al ser ingerida. Ésta es una tarea farmacéutica que no sólo debe tener en cuenta la estabilidad de OTC sino también la palatabilidad de la capa extrema de las partículas del fármaco.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la importancia de blindar o recubrir el principio activo del fármaco utilizado, evitando su degradación o pérdida desde el proceso de pelletización y lixiviación asegurando así una mayor biodisponibilidad y por ende una mayor concentración del mismo en los sitios clave (músculo, hemolinfa y hepatopáncreas), por arriba de los valores de las CMI's de los principales patógenos que afectan al camarón. Además, el diseño aquí propuesto, podría servir como modelo para la evaluación de otros fármacos de uso en la camaricultura, con lo cual se contará con la información farmacológica necesaria para el diseño de regímenes de dosificación inteligente pero sobre todo racionales, evitando tanto la subdosificación (problemas de resistencia bacteriana), como la sobredosificación (mayor tiempo de retiro y persistencia de residuos por arriba de los límites máximos permitidos) contribuyendo también a una exportación más confiable sin los riesgos de rechazo por países importadores al contener el camarón residuos por arriba de los niveles máximos permitidos.

## 12. LITERATURA CITADA

- 1.- Jory DE. Manejo integral del alimento de camarón, de estanques de producción camaroneros, y principios de bioseguridad. Simposium Internacional de Acuicultura 2001. SAGARPA- CONAPESCA. 2001.
- 2.- Brock JA, Main KL. A guide to the common problems and Diseases of cultured *Penaeus vannamei*. The World Aquaculture Society y The Oceanic Institute Makapuu Point. USA, 1994.
- 3.- Rodríguez MG, Linné MA, Rodríguez DC, Monroy YG, Mata JS. Boletín del programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Manual de enfermedades de camarones Peneidos en México. UAM Xochimilco 2001; 2 (14): 1-11.
- 4.- Clifford III HC. Manual de operación para el manejo de Súper Shrimp en estanques, Súper Shrimp, S. A. de C. V. División de Manejo de Enfermedades 1997: 105.
- 5.- Rosenberry B. World Shrimp Farming. Shrimp News International, San Diego 1998.
- 6.- Páez-Osuna F, Gracia A, Flores-Verdugo F, Lyle-Fritch LP, Alonso-Rodríguez R, Roque A, Ruiz-Fernández AC. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. Mar Pollut Bull 2003; 46: 806-815.
- 7.- Lightner DV. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: McVey JP, editor. CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Ratón 1993; 1.
- 8.- Treviño L, Cruz E, Ricque D. Aplicación del uso de promotores de crecimiento en acuicultura: antibióticos. Memorias del primer simposium internacional de nutrición y tecnología de alimentos para la acuicultura. Universidad Autónoma de Nuevo León. In: Toro L M. Distribución de los residuos de enrofloxacin en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Informe Técnico. CEMAIM – ESPOL. Ecuador 2000 – 2001: 27.
- 9.- Valle J. Comparación in vitro de los efectos de la litofloxina, norfloxacin y crustaxina sobre bacterias asociadas a camarón – estudio preliminar in situ de la litofloxina. Publireportaje Farmavet. In: Toro L M. Distribución de los residuos de enrofloxacin en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Informe Técnico. CEMAIM – ESPOL. Ecuador 2000 – 2001:27.
- 10.- Cuenca C, Bermúdez C, Espinoza A, Gómez-Gil B, Roque A. Evaluación de la concentración de oxitetraciclina en tejidos de postlarvas de *Litopenaeus vannamei*



utilizando como bioacarreadores nauplios de *Artemia franciscana*. Boletín Informativo. CIAD, 2002. Available from: URL: <http://www.ciad.mx/boletin/jul-ago-02/Oxitetraciclina.pdf>.

- 11.- FAO. Estado actual de la pesca y acuicultura a nivel mundial. Food and Agriculture Organization, 2000. Available from: URL:<http://www.fao.org/DOCREP/003/x8002S/x8002s00.htm#TopOfPage>
- 12.- Uyaguari M. Acumulación de antibióticos y su efecto sobre la comunidad bacteriana presentes en sedimentos de piscinas camaroneras. Boletín Informativo Quincenal. ESPOL - Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar (FIMCM). CENAIM, 2002; 53: 1.
- 13.- Tendencia EA, De la Peña LD. Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 2002; 213 (1-4): 1-13.
- 14.- Montoya N, Reyes E. Acumulación/ eliminación de oxitetraciclina en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y su residualidad en dietas artificiales para camarón. *Panorama Acuícola* 2002; 7(5).
- 15.- Montoya N, Toro L. Pérdidas por proceso de manufactura y lixiviación en enrofloxacina en dietas medicadas para camarones *Penaeus vannamei*. Boletín Informativo El Mundo Acuícola 2000; 6 (2): 52-53.
- 16.- Lunestad B, Goksoyr J. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Dis Aquat Organ* 1990; 9: 67-72.
- 17.- Clark G. The encyclopedia of chemistry. Chapman & Hall, LTD. Londres 1964: 1037.
- 18.- Rana KJ, Immink AJ. Farming of aquatic organisms, particularly the Chinese and Thai experience. In: Shepard C. editor, *Seas at the Millenium: An environmental evaluation*. Pergamon, Elsevier Science Ltd. Oxford, 2000: 165-177.
- 19.- Páez-Osuna F. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environ Manage* 2001; 28: 131-140.
- 20.- FAO. Anuario Estadísticas de Pesca. Food and Agriculture Organization. Producción de Acuicultura, 1999; 88 (2).
- 21.- SAGARPA. Anuario estadístico de Pesca 2001. Producción Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, 2001.
- 22.- Boyd CE. Water quality in ponds for aquaculture. Birmingham Publishing Company, Birmingham, AL. 1990: 482.

- 23.- Aguilera PH, Noriega PC, Guzmán JC. ¿Qué es la Acuicultura?. Secretaría de Pesca, México, 1996: 60.
- 24.- Auró AA. Apuntes de Sanidad Acuícola. Taller de cultivo de camarón y otras especies acuícolas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, 2002: 410.
- 25.- Morales M.C., Chávez M. S. Manual para la detección de enfermedades en camarones peneidos utilizando análisis en fresco. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Sonora, México, 1999: 68.
- 26.- Lightner DV, Redman RM. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 1998; 164: 201-220.
- 27.- Gómez-Gil BA, Roque A., García Flores L. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el Impacto del uso de antimicrobianos. In: Páez-Osuna F, editor. Camaronicultura y Medio Ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2003.
- 28.- Alderman DJ. Empleo de fármacos antimicrobianos en acuicultura. In: Prescott J, Baggot J, Walter R. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria. Tercera Edición*. Intermédica. Buenos Aires, 2002: 595-612.
- 29.- Hektoen H, Berge J, Hormazabal V, Yndestad M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 1995; 133: 175-184.
- 30.- Rawles S, Kocabas A, Delbert M. Dietary supplementation of Terramicyn and Romeo 30 does not enhance growth of channel catfish but does influence tissue residues. *World Aquacult Soc* 1997; 122: 393-401.
- 31.- Chanratchakool P, Pearson M, Limsuwan C, Roberts R. Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricus. *J Fish Dis* 1995; 18: 79-82.
- 32.- SAGARPA. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-PESC-2004, que regula el uso de antimicrobianos en el cultivo de crustáceos en la república mexicana, 2004.
- 33.- Bell T. Principals of shrimp culture chemotherapy. In: Wyban J. editor. *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. WAS, Baton Rouge, LA, 1992: 227-237.
- 34.- Roque A, Turnbull J, Gomez-Gil B. Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to the marine shrimp *Penaeus monodon*. *J World Aquacult Soc* 1998; 29 (2): 249-251.

- 35.- Alderman DJ. Fisheries Chemotherapy: A Review. British Crown, England, 1988: 3.
- 36.- Slinger S, Razzaque A, Cho C. Effects of feed processing and leaching on the losses of certain vitamins in fish diets. World Symposium Finfish Nutrition and Feeds Hamburg 1979 20-23 June. Berlin: 2.
- 37.- Cuzon G, Guillaume J, Cahu C. Composition preparation and utilization of feeds for crustacea. *Aquaculture* 1994; 124: 253-267.
- 38.- Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, McCallum IM, Hickling D. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture* 2001; 196: 87-104.
- 39.- Rigos G, Alexis M, Nengas I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid include in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquac Res* 1999; 25: 814-847.
- 40.- Tacon A. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación (organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación), 1989: 288-290.
- 41.- Langdon C, Buchal M. Comparison of lipid-walled microcapsules and lipid spray beads for the delivery of water-soluble, low molecular-weight material to aquatic animals. *Aquacult Nutr* 1998; 4: 275-284.
- 42.- Herwing N. Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases. A manual of fish pharmacology and material medical. Charles C. Thomas, Springfield, III, 1979.
- 43.- Lewbart G, Valden S, Dun J, Manaugh C, Whitt D, Doi A, Smith T, Flammer K. Pharmacokinetic of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomun*) after intramuscular, oral and bath administration. *Aquaculture* 1997; 127: 124-128.
- 44.- Uno K. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in healthy and vibriosis-infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 1996; 134: 33-42.
- 45.- Uno K, Auki T, Ueno R, Maeda I. Pharmacokinetics of oxytetracycline in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following bolus intravenous administration. *Fisheries Sci* 1997; 63 (1): 90-93.
- 46.- Sohlberg S, Aulie A, Soil N. Temperature- dependent absorption and elimination of flumequine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *Aquaculture* 1994; 119: 1-10.

- 47.- Park ED, Lightner DV, Milner N, Mayersohn M, Park DL, Gifford J, Bell T. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetropin in the penaid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 1995; 130: 113-128.
- 48.- Chien Y, Chen I. The distribution of oxytetracycline residue in *Penaeus monodon* culture system. Department of aquaculture. National Taiwan Ocean University, 1996.
- 49.- Corliss JP, Lightner D, Zein-Eldin Z. Some effects of oral doses of oxytetracycline and growth, survival and disease in *Penaeus aztecus*. *Aquaculture* 1997; 11: 355-362.
- 50.- Uno K, Auki T, Ueno R. Pharmacokinetics study of oxytetracycline in cultures rainbow trout, amago salmon, and yellowtail. *Nippon Suisan Gakk* 1992; 58 (6): 1151-1156.
- 51.- Somsiri T, Wannaprappa M, Soontornvit S. Accumulation of oxytetracycline in hybrid catfish (*Clarias gariepinus X C. macrocephalus*). *Dis Asia Aquacult II* 1997.
- 52.- Du W, Marshall M, Wheeler W, Mathews M, Gatli D, Rawles S, *et al.* Oxytetracycline, Sulfadimethoxine, and Ormatropin residues in channel catfish by HPLC. *J Food Sci* 1995; 60 (6).
- 53.- Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología Veterinaria*. 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill/Interamericana. México, 2006: 1000.
- 54.- Backhaus T, Scholze M, Grimme L. The single substance and mixture toxicity of the quinolones to the bioluminescent *Vibrio Fischeri*. *Aquat Toxicol* 2000; 49: 49-61.
- 55.- Abraham T, Manley R, Palaniappan R. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. *J Aquacult* 1997; 12: 11-8.
- 56.- Abraham T, Palaniappan R, Dhevendaran K. Epibiotic of luminous bacteria in penaeid shrimp *Penaeus indicus*. *Indian J Mar Sci* 1997; 26 (2): 209-212.
- 57.- Mishra S. Use of dot immunoassay for rapid detection of pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila* from shrimps and fishes. *Indian J Mar Sci* 1998; 27 (2): 222-226.
- 58.- Oshima Y, Fachrudin L, Ishida N, Imada N, Kobayashi K. Effect of drug-metabolizing Enzyme Activity induced by PCB on the resistance Time of Oxolinic Acid, Piromidomidec Acid and Nalidixic Acid in Carp. *Fisheries Sci* 1994; 62 (2): 302-306.

- 59.- Gómez-Gil B. Uso medico y veterinario de agentes antimicrobianos: implicaciones para la salud pública, una visión clínica de la resistencia antimicrobiana. *Noticias Epidemiológicas* 1998; 2 (12).
- 60.- Goodman y Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill Internacional. 9ª edición. México, 1996: 1996.
- 61.- Morales M.C. Necrosis del Hepatopáncreas (NHP) una enfermedad de alta prevalencia e incidencia en los camarones de cultivo. *Simposium Internacional de Acuicultura 2001*. SAGARPA – CONAPESCA, 2001: 181.
- 62.- Doi AM, Stoskopf MK. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. *J Aquat Anim Health* 2000; 12 (3): 246-253.
- 63.- Pykowics R, Kester D. The physical chemistry of seawater. *Rev Oceanography Mar Biol* 1971: 11-60.
- 64.- Barnes A, Hasting T, Amyes S. Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *J Fish Dis* 1995; 18: 463-465.
- 65.- Pursell L, Samuelsen O, Smith P. Reduction in the in vitro activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of  $Mg^{++}$  and  $Ca^{++}$  ions found in seawater. *Aquaculture* 1995; 135: 245-255.
- 66.- Ratcliffe N, Smith J. Effects of magnesium on the activity of quinolone antibacterial agent. *J Pharm Pharmacol* 1983: 35-59.
- 67.- Smith J, Lewis C. *Chemistry and mechanisms of action the quinolone antibacterials*. Academic- Press, London, 1988: 23-85.
- 68.- Björklund HV, Bylund G. Pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet Scand* 1991; 87: 298–299.
- 69.- Ueno R, Uno K, Aoki T. Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Proc Dis Asian Aquacult* 1995; 2: 523–531.
- 70.- Ueno R, Kinoshita A, Wakabayashi J. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment. *Aquaculture* 2004; 235: 53-63.
- 71.- Sangrungruang K, Chotchuang A, Ueno R. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in giant tiger prawn. *Fisheries Sci* 2004; 70: 467–472.

- 72.- Uno K. Pharmacokinetics of oxolinic acid and Oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 2004; 230: 1-11.
- 73.- Frelief PF. Early diagnosis and prevention of rikettsiosis in shrimp farming. College of Veterinary Medicine. Texas A&M University, USA, 1995.
- 74.- Duis K, Inglis V, Beveridge M, Hammer I. Leaching of four different antibacterial from oil-and alginate-coated fish feed pellets. *Aquac Res* 1995; 26: 549-556.
- 75.- Sermwatanakul A, Ounkon S. Oxytetracycline leaching from sinking pellets. In: *World Aquaculture 1997, Abstracts*. World Aquaculture Society, Seattle, Washington, USA, 1997: 419.
- 76.- Lunestad B, Samuelsen O, Fjelde S, Ervik A. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture* 1995; 134: 217-225.
- 77.- Pearson M, Charatchakool P. Leaching of oxytetracycline from surface coated shrimp feed. In: *The AAHRI Newsletter (abstracts)*, 1999. Available from: URL: <http://www.agri-aqua.ait.ac.th/aahri/seaadep/AAHI/Newlater>.
- 78.- Nygaard K, Lunestad BT, Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture* 1992; 104 (1-2): 31-36.
- 79.- Tendencia EA, De la Peña LD. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 2001; 195 (3-4): 193-204.
- 80.- Montoya N. Métodos de screening y confirmación para la detección de antibióticos: Cloranfenicol y Nitrofuranos. *Panorama Acuicola Magazine*. Mayo – Junio, 2003: 68-70.
- 81.- Carson MC, Ngoh AM, Hadley SW. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography–particle beam mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1998; 712 (1-2): 113-128.
- 82.- Ueno R, Sangrungruang K, Miyakawa M. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int* 2000; 23 (9): 629-633.
- 83.- Changa CF, Su MS, Chen HY, Liao IC. Dietary -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immun* 2003; 15 (4): 297-310.
- 84.- Huang CC, Song YL. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev Comp Immunol* 1999; 23 (7-8): 545-52.

- 85.- Baptista M. Uso indiscriminado de antibióticos y sus problemas. CENAIM- ESPOL, 2002.
- 86.- Weifen W, Hong L, Changhu X, Jamil K. Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environ Int* 2004; 30 (3): 367-373.
- 87.- Norma Oficial Mexicana NOM-EM-006-PESC-2004, que establece los requisitos de sanidad acuícola para la producción de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos, así como para su introducción a los estados unidos mexicanos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de enero de 2004.
- 88.- Reed LA, Siewicki TC, Shah J. C. Pharmacokinetics of oxytetracycline in white shrimp *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* 2004; 232: 11-28.
- 89.- Takahashi Y, Itami T, Nakagawa A, Nishimura H, Abe T. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Bate Bull Jpn Soc Sci Fish/ Nissuishi* 1985; 51 (10): 1639– 1643.
- 90.- Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 1966; 14: 170-177.
- 91.- Tacon A. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp; a training manual. The essential nutrients. FAO, GCP/RLA/075/ITA, 1987; 1: 117–130.
- 92.- Montoya N, Uyaguari M, Sotomayor M. Acumulación de antibióticos y su efecto sobre la comunidad bacteriana presente en sedimentos de piscinas camaroneras. *El Mundo Acuícola* 2002; 9 (1): 12-14.
- 93.- Mohny L, Williams RR, Bell TA, Lightner DV. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *Penaeus stylirostris* (Crustacea, Decapod), fed medicated feed for 14 days. *Aquaculture* 1997; 149: 193–202.
- 94.- Fernández-González R, García-Falcón MS, Simal-Gándara J. Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Anal Chim Acta* 2002; 455: 143-148.
- 95.- Mohny L, Bell TA, Lightner DV. Shrimp antimicrobial testing, I. In Vitro susceptibility of thirteen Gram-negative bacteria to twelve antimicrobials. *J Aquat Anim Health* 1992; 4: 257-261.
- 96.- Sedgwick RW. Influence of dietary protein and energy on growth, food consumption and food conversion efficiency in *Penaeus merguensis* de Man. *Aquaculture* 1979; 16: 17-30.

- 97.- Nunes AJP, Parsons GJ. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 2000; 187: 133-151.
- 98.- Chiayvareesajja S, Chandumpai A, Theapparatt Y, Faroongsarng D. The complete analysis of oxytetracycline pharmacokinetics in farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Vet Pharmacol Ther* 2006; 29: 409–414.
- 99.- Bumrungkunakorn M, Krichtitayawuth P, Wongsetthachai P, Yibchok-anun S, Wongtavatchai J. The quantitative analysis of oxytetracycline in black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) muscle tissue and hepatopancreas, after oral medication. *Thai J Vet Med* 2004; 34 (2): 85-92.
- 100.- Corliss JP. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture* 1979; 1 (6): 1-6.
- 101.- Chythanya R, Nayak D, Venugopal M. Resistencia de los antibióticos en la Acuicultura. *Acuicultura del Ecuador*. Ed. 2000; 35: 7-9.
- 102.- Reed LA, Siewicki TC, Shah JC. The biopharmaceutics and oral bioavailability of two forms of oxytetracycline to the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*. *Aquaculture* 2006; 258: 42-54.
- 103.- Samuelson OB. Degradation the oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from s fish farm. *Aquaculture* 1989; 83: 7-16.
- 104.- Douglas GC, Donald P, Weston Y, Millar V, Shoemaker C. Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture* 1996; 145: 55-75.
- 105.- Coynea R, Hiney M, O'Connorb B, Kerry J, Cazabona D, Smith P. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture* 1994; 123: 31 – 42.
- 106.- Björklund HV, Rabergh CMI, y Bylund G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 1991; 97: 85-96.
- 107.- Lalumera GM, Calamari D, Galli P, Castiglioni S, Crosa G, Fanelli R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 2004; 54: 661–668.
- 108.- Martínez EE, Shimoda W. Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds. *J Assoc Offic Anal Chem* 1988; 17 (3): 477-480.
- 109.- Bell TA, Lightner DV. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. Word Aquaculture Society. USA, Kansas, 1988: 114.



- 110.- Aguilar MM, Coutiño B, Salinas R. Manual general de técnicas y citoloquímicas. Las Prensas de Ciencias. México, 1996: 130.
- 111.- Jacobsen P, Berglind L. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* 1988; 70: 365–370.
- 112.- World Aquaculture Society. Washington State convention center, Seattle, Washington, USA, Resumen No. 464. In: *Boletín nicovita Camarón de Mar*. Lixiviación de oxitetraciclina desde pellets con hundimiento, Febrero 19-23, 2002; 7: Ed. 2.

## 13. CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los productos de uso en la camaronicultura de acuerdo a sus características y acción.

<b>Acción del Producto</b>	<b>Ejemplos</b>
Terapeutas y desinfectantes	Yodo, Formol, Verde de Malaquita, Oxitetraciclina, Cloramfenicol, Enrofloxacina.
Acondicionadores del agua y de los sedimentos	Cal, Zeolita
Descomponedores de la materia orgánica	Bacterias + preparaciones de enzimas
Algicidas y piscicidas	Compuestos del Cobre, Saponina
Promotores del crecimiento del fitoplancton	Fertilizantes Inorgánicos y Orgánicos
Aditivos alimenticios	Vitaminas, Minerales y Hormonas

Cuadro 2. Listado de antimicrobianos autorizados para su uso en el control de las enfermedades bacterianas que afectan a los crustáceos cultivados.

Antimicrobiano (Agente activo)	Dosis (mg/kg de biomasa)*	Tratamiento (Días)
Oxitetraciclina	120-240	7-12
Sarafloxacina	10-15	7-12
Enrofloxacina	4-10	10-15
Florfenicol *	4-10	10-15
Fosfomicina *	4-10	10-15

Fuente: PROY-NOM-059-PESC-2004, SAGARPA

\*Dosis sujetas a modificación

Cuadro 3. Listado de antimicrobianos autorizados para el uso en el control de las enfermedades causadas por protozoarios parásitos que afectan a los crustáceos cultivados.

Antimicrobiano (Agente activo)	Dosis (g/tonelada de alimento)*	Tratamiento (Días)
Monensina	200-400	7
Salinomicina	120-300	7-10
Semduramicina	50-150	7-10

Fuente: PROY-NOM-059-PESC-2004, SAGARPA.

\*Dosis sujetas a modificación

Cuadro 4. Límites máximos permitidos de residuos de antimicrobianos en crustáceos cultivados.

Fármaco	Concentración en tejido
<i>Oxitetraciclina</i>	0.1 ppm
<i>Enrofloxacina</i>	20 ppb
<i>Sarafloxacina</i>	20 ppb
<i>Fluorfenicol</i>	0.3 ppb

Fuente: PROY-NOM-059-PESC-2004, SAGARPA.

Cuadro 5. Tipos de Tetraciclinas desarrolladas de acuerdo con su origen.

Antibiótico	Origen
Clortetraciclina (aureomicina)	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Oxitetraciclina (terramicina)	<i>S. rimosus</i>
Tetraciclina (aeromicina)	Semisintética aislada de <i>Streptomyces</i> libre en crecimiento
Dimetil clortetraciclina (demeclociclina)	Mutante de <i>S. aureofaciens</i>
Rolitetraciclina Metaciclina Doxiciclina Minociclina Clomociclina Limeciclina	} Compuestos naturales o completamente sintéticos

Cuadro 6. Principales características fisicoquímicas del grupo de las Tetraciclinas

	Formula	Peso Molecular	UV max. (nm)	Valores de pK	Solubilidad	Ligeramente soluble	Casi insoluble
Tetraciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444	220, 268, 355	3.3, 7.7, 7.7	H <sub>2</sub> O, MeOH, EtOH, CHCl <sub>3</sub> , DMF, dioxano	Tolueno, éter, EtOAc, acetona	Hexano, Éter de petróleo, isooctano
Clortetraciclina	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	479	230, 263, 368	3.3, 7.4, 9.3	H <sub>2</sub> O, MeOH, DMF	EtOH, EtOAc, dioxano, acetona	Hexano, tolueno, éter, éter de petróleo, CHCl <sub>3</sub>
Oxitetraciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460	249, 276, 353	3.3, 7.3, 9.1	H <sub>2</sub> O, MeOH, EtOH, EtOAc, acetona, DMF	Éter, CHCl <sub>3</sub>	Hexano, tolueno, éter de petróleo
Doxiciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	462	267, 351		H <sub>2</sub> O, MeOH, dioxano, DMF		Hexano, éter de petróleo, isooctano

Fuente: Las bases farmacológicas de la terapéutica, Gooman y Gilman (1996); Farmacología Veterinaria, Sumano y Ocampo (2006).

Cuadro 7. Composición de la dieta para camarón propuesta por Tacon (1987)<sup>91</sup>

Ingrediente	% Inclusión
Harina de Pescado	33.8
Soya	30.0
Harina de Trigo	29.9
Harina de camarón	0.8
Aceite de pescado	1.15
Lecitina	0.5
Mezcla de Vitaminas <sup>a</sup>	0.5
Vit. C-StayC <sup>®</sup>	0.05
Lisina	0.5
Metionina	0.5
Aglutinante <sup>b</sup>	0.8

<sup>a</sup> La mezcla de vitaminas esta compuesta por: Vit. A, 4000 IU/g; B1, 24,000 mg/kg; B2, 16,000 mg/kg; DL Ca pantotenato, 30,000 mg/kg; B6, 30,000 mg/kg; B12, 80 mg/kg; C, 60,000 mg/kg; K3, 16,000 mg/kg; D3, 3200 IU/g; E, 60,000 mg/kg; H, 400 mg/kg; niacina, 20,000 mg/kg; ácido fólico 4000 mg/kg

<sup>b</sup> Maxi-Bond<sup>®</sup> (formaldehído urea/sulfato de calcio).

Cuadro 8. Cantidad de alimento requerido para el ensayo de laboratorio.

Tipo de dieta	Kilogramos de alimento por duración del ensayo
Dieta de aclimatación (s/medicamento)	3.0
Dieta medicada grupo A (premezcla A) OTC blindada	1
Dieta medicada grupo B (premezcla B) OTC blindada	1
Dieta medicada grupo C (Premezcla comercial) OTC sin blindar	1
Dieta después del periodo de medicación (s/medicamento)	4.0

Cuadro 9. Número de camarones colectados por cada contenedor de las tres dietas con OTC en el experimento de laboratorio.

	Días del experimento muestreados	Número de camarones colectados por cada tanque
Antes de medicar	0	3
Durante la medicación	0.5	3
	1	3
	3	3
	5	3
	7	3
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	3
	12	3
	14	3
	17	3

Cuadro 10. Datos de la curva estándar de OTC por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Concentración de OTC en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 4	Medición 5	Medición 6	Medición 7	Medición 8	Medición 9	Medición 10	Promedio	DE
0.1	18215	17995	18257	18531	18462	18152	18541	18317	18271	18312	18305.3	170.84
0.05	13536	13963	14952	14953	14743	14642	14921	14943	14869	14542	14606.4	483.57
0.025	12436	12539	12604	12548	12613	12641	12632	12698	12658	12698	12606.7	80.51
0.0125	10327	10742	10752	10321	10641	10741	10732	10542	10653	10732	10618.3	168.28
0.00625	8316	8542	8328	8532	8421	8329	8531	8373	8462	8531	8436.5	94.80
0.003125	7083	7147	7201	7053	7078	7064	7104	7089	7075	7102	7099.6	44.04
0.0015625	5095	5064	5053	5103	5098	5096	5121	5142	5165	5032	5096.9	40.16

DE= Desviación Estándar.

Cuadro 11. Días de muestreo y número de camarones colectados por cada estanque alimentados con las tres dietas con OTC en el experimento de campo.

	Días del experimento muestreados	Número de camarones colectados por cada estanque
Antes de medicar	0	50
Durante la medicación	0.5	50
	1	50
	3	50
	5	50
	7	50
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	50
	10	50
	12	50
	14	50
	17	50

Cuadro 12. Muestréos de los sedimentos utilizados en las peceras para determinar la presencia de OTC.

	Días del experimento muestreados	Cantidad colectada por contenedor (g)
Antes de medicar	0	100
Durante la medicación	5	100
	7	100
Después de la medicación (tiempo de retiro)	14	100
	17	100
	22	100



Cuadro 13. Días de muestreos en sedimentos de estanques sometidos a una exposición de OTC por un periodo de 7 días.

	Días del experimento muestreados	Cantidad colectada por contenedor (g)
Antes de medicar	0	90
Durante la medicación	5	90
	7	90
Después de la medicación (tiempo de retiro)	14	90
	17	90
	22	90

Cuadro 14. Halos de inhibición en mm, obtenidos de 10 diluciones de OTC por el método de difusión de agar para la curva estándar.

Concentración de OTC en $\mu\text{g/ml}$	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 4	Medición 5	Medición 6	Medición 7	Medición 8	Medición 9	Medición 10	Promedio	DE
500	38.18	38.10	38.13	37.80	38.24	37.99	37.73	38.21	37.79	39.10	38.127	0.390
250	36.01	35.98	37.85	36.12	37.43	35.23	36.61	37.06	38.03	35.65	36.597	0.957
125	32.21	33.70	35.62	36.30	34.54	33.71	32.15	31.90	33.25	33.70	33.708	1.461
62.5	29.45	31.34	32.71	33.06	29.95	30.85	31.45	31.10	31.09	30.03	31.103	1.148
31.25	28.65	29.97	30.50	30.61	28.41	29.85	29.91	28.84	30.50	30.41	29.765	0.831
15.625	25.92	27.49	27.68	26.59	25.99	26.48	27.32	27.70	27.65	27.52	27.034	0.715
7.8125	22.41	25.57	24.81	23.75	22.75	24.68	25.45	25.62	23.85	23.59	24.248	1.157
3.90625	20.42	20.74	20.22	20.45	20.61	20.35	20.15	20.80	20.29	20.51	20.454	0.215
0.78125	15.10	15.38	15.42	15.24	15.28	15.38	15.41	15.29	15.36	15.41	15.327	0.101
0.39063	12.86	11.76	12.63	12.63	11.85	11.98	12.47	12.74	11.57	12.65	12.314	0.472

DE= Desviación Estándar.

Cuadro 15. Medias y desviación estándar del porcentaje de recuperación por el método de adición para alimento de camarón.

Concentraciones adicionadas ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentraciones cuantificadas ( $\mu\text{g/g}$ ) media $\pm$ DE, n=4	Porcentaje Recuperado media $\pm$ DE, n=4
500	495 $\pm$ 17.32	99 $\pm$ 3.46
60	59.89 $\pm$ 1.55	99.69 $\pm$ 2.58
8	8.03 $\pm$ 0.27	100.38 $\pm$ 3.40
0.5	0.50 $\pm$ 0.01	99.50 $\pm$ 1.37
<b>Promedio</b>	<b>99.64</b>	
<b>DE</b>	<b>0.569</b>	

Cuadro 16. Medias y desviación estándar del porcentaje de recuperación en sedimentos por el método de adición.

Concentraciones adicionadas ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentraciones cuantificadas ( $\mu\text{g/g}$ ) media $\pm$ DE n=4	Porcentaje Recuperado media $\pm$ DE n=4
500	354.44 $\pm$ 18.63	70.89 $\pm$ 3.73
60	352.30 $\pm$ 12.41	70.46 $\pm$ 2.48
8	358.04 $\pm$ 14.05	71.61 $\pm$ 2.81
0.5	341.48 $\pm$ 13.52	68.29 $\pm$ 2.71
<b>% Promedio</b>	<b>99.64</b>	
<b>DE</b>	<b>0.569</b>	

Cuadro 17. Porcentaje de recuperación en músculo y hepatopáncreas por el método de adición cuantificado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

	Concentraciones adicionadas ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentraciones cuantificadas ( $\mu\text{g/g}$ ) media $\pm$ DE n=4	Porcentaje Recuperado media $\pm$ DE n=4
Músculo	5	4.35 $\pm$ 0.07	87.00 $\pm$ 1.47
	2	1.47 $\pm$ 0.05	73.50 $\pm$ 2.38
	1	0.72 $\pm$ 0.03	71.75 $\pm$ 2.50
	0.5	0.40 $\pm$ 0.02	80.50 $\pm$ 3.79
	<b>% Promedio</b>	<b>78.19</b>	
	<b>DE</b>	<b>0.95</b>	
Hepatopáncreas	5	3.62 $\pm$ 0.18	72.39 $\pm$ 3.9
	2	1.39 $\pm$ 0.04	69.58 $\pm$ 1.98
	1	0.71 $\pm$ 0.02	70.57 $\pm$ 1.60
	0.5	0.35 $\pm$ 0.01	70.68 $\pm$ 1.26
	<b>% Promedio</b>	<b>70.80</b>	
	<b>DE</b>	<b>2.29</b>	

Cuadro 18. Porcentaje de recuperación de OTC en hemolinfa por el método de adición determinado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Concentraciones adicionadas ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentraciones cuantificadas ( $\mu\text{g/g}$ ) media $\pm$ DE n=4	Porcentaje Recuperado media $\pm$ DE n=4
5	4.74 $\pm$ 0.04	94.80 $\pm$ 0.82
2	1.81 $\pm$ 0.02	90.63 $\pm$ 0.85
1	0.85 $\pm$ 0.02	84.50 $\pm$ 1.73
0.5	0.42 $\pm$ 0.01	83.00 $\pm$ 2.58
<b>% Promedio</b>	<b>88.23</b>	
<b>DE</b>	<b>1.50</b>	

Cuadro 19. Concentraciones de oxitetraciclina encontradas en las tres premezclas utilizadas para elaborar el alimento medicado, además de muestras antes y después de ser pelletizadas. Las premezclas de oxitetraciclina usadas fueron: grupos A y B blindadas y el grupo C sin blindar. Hubo una reducción estadísticamente significativa de la actividad del antibacteriano, expresada como concentración cuando cualquiera de las tres premezclas con los ingredientes del alimento fueron pelletizadas ( $P < 0.001$ ).

		Grupos							
		A		B			C		
	Concentración teórica	Concentración encontrada	Porcentaje recuperado	Concentración teórica	Concentración encontrada	Porcentaje recuperado	Concentración teórica	Concentración encontrada	Porcentaje recuperado
Premezclas (n=18)	200 (mg/g)	198.17 <sup>a</sup> ± 4.44 (mg/g)	99.09 ± 2.22	200 (mg/g)	198.80 <sup>a</sup> ± 2.75 (mg/g)	99.40 ± 1.38	200 (mg/g)	196.79 <sup>a</sup> ± 6.31 (mg/g)	98.40 ± 3.16
	2000 (µg/g)	1949.10 <sup>a</sup> ± 94.22 (µg/g)	97.46 ± 4.71	2000 (µg/g)	1960.21 <sup>a</sup> ± 87.43 (µg/g)	98.01 ± 4.37	2000 (µg/g)	1992.65 <sup>a</sup> ± 199.30 (µg/g)	99.63 ± 9.97
	2000 (µg/g)	1111.40 <sup>a,b</sup> ± 66.99 (µg/g)	55.57 ± 3.35	2000 (µg/g)	1242.45 <sup>b</sup> ± 33.59 (µg/g)	62.12 ± 16.80	2000 (µg/g)	1022.20 <sup>a</sup> ± 39.80 (µg/g)	51.11 ± 1.99

<sup>a, b</sup> Los valores dentro de una fila que comparten la misma literal no presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 20. Media y desviación estándar de los valores obtenidos de OTC por lixiviación en los tres alimentos pelletizados, puestos en acuarios con 40 ‰ de salinidad, a 23 – 25 °C y pH 7.6 – 7.8.

Tiempo (min)	Grupos					
	A		B		C	
	Concentración encontrada (µg/g)	Porcentaje de pérdida	Concentración encontrada (µg/g)	Porcentaje de pérdida	Concentración encontrada (µg/g)	Porcentaje de pérdida
<b>Inicial</b>	1111.40 ± 66.99 <sup>a,b</sup>	44.43	1242.45 ± 335.95 <sup>b</sup>	37.88	1022.20 ± 39.80 <sup>a</sup>	48.89
<b>1</b>	1088.42 ± 100.12 <sup>a</sup>	45.58	1228.29 ± 4.62 <sup>b</sup>	38.59	778.06 ± 29.20 <sup>c</sup>	61.10
<b>5</b>	1013.39 ± 43.02 <sup>a</sup>	49.33	781.26 ± 30.73 <sup>b</sup>	60.94	627.07 ± 32.68 <sup>c</sup>	68.65
<b>30</b>	542.71 ± 31.93 <sup>a</sup>	72.86	498.04 ± 17.48 <sup>a,b</sup>	75.10	448.72 ± 50.69 <sup>b</sup>	77.56
<b>60</b>	396.73 ± 16.92 <sup>a</sup>	80.16	398.67 ± 5.48 <sup>a</sup>	80.07	139.23 ± 26.8 <sup>b</sup>	93.04
<b>90</b>	392.37 ± 21.53 <sup>a</sup>	80.38	331.34 ± 14.79 <sup>a</sup>	83.43	92.64 ± 14.02 <sup>b</sup>	95.37
<b>120</b>	392.32 ± 21.80 <sup>a</sup>	80.38	352.57 ± 4.60 <sup>a</sup>	82.37	55.48 ± 13.68 <sup>b</sup>	97.23
<b>150</b>	401.41 ± 12.00 <sup>a</sup>	79.93	306.12 ± 7.91 <sup>b</sup>	84.69	37.52 ± 10.94 <sup>c</sup>	98.12

<sup>a, b, c</sup> Los valores dentro de una fila que comparten la misma literal no presentan diferencias significativas (p < 0.05).

Cuadro 21. Análisis histopatológico de 30 animales colectados en los tanques antes de iniciar el ensayo en el laboratorio

Enfermedades		Tanque							
		1 y 5 (Dieta A) 10*		2 y 3 (Dieta B) 10*		4 y 6 (Dieta C) 10*		Total 30*	
		P	%	P	%	P	%	P	%
Virales	WSSV	1	10	0	0	0	0	1	3.3
	IHHNV	0	0	0	0	0	0	0	0
	TSA	0	0	0	0	1	10	1	3.3
Bacterianas	Síndrome de bolitas blancas	2	20	0	0	1	10	3	10
	Contaminación por bacterias	0	0	0	0	0	0	0	0
	NHP	1	10	0	0	0	0	1	3.3
Por protozoarios	Huevos de cestodos	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gregarinas	5	50	9	90	7	70	21	70
	Esporozoarios	0	0	0	0	1	10	1	3.3
	Epibiontes	10	100	10	100	10	100	30	100
Otros	Descamación epitelial del intestino	1	10	0	0	0	0	1	3.3
	Calcificación metastásica	1	10	1	10	2	20	4	13.3
	Calcificación distófica	0	0	0	0	0	0	0	0
	Excesiva proteína en túbulos hepatopancreáticos	1	10	0	0	1	10	2	6.7
	Degeneración mucosa en branquias	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enteritis hemolítica	2	20	3	30	1	10	6	20
	Fibrosis del conducto deferente	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltración hemolítica en gónadas	0	0	0	0	0	0	0	0

P= número de organismos afectados

\*= número de organismos analizados

%= porcentaje que representan los animales enfermos

Cuadro 22. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	3.50	0.01
	1	3.83	0.003
	3	4.08	0.01
	5	4.11	0.01
	7	4.32	0.04
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	3.66	0.07
	12	3.10	0.09
	14	3.22	0.06
	17	3.20	0.07

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
 DE= Desviación estándar

Cuadro 23. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	6.25	0.1
	1	6.00	0.04
	3	6.45	0.09
	5	7.01	0.2
	7	6.19	0.05
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	6.02	0.02
	12	5.17	0.08
	14	5.02	0.03
	17	4.63	0.20

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
 DE= Desviación estándar



Cuadro 24. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	0.99	0.01
	1	3.05	0.002
	3	3.13	0.04
	5	2.57	0.06
	7	2.00	0.03
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	1.54	0.06
	12	0.91	0.01
	14	0.43	0.001
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
 DE= Desviación estándar

Cuadro 25. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por la administración de los alimentos medicados (A-C) con oxitetraciclina vía oral administrado por 7 días a una dosis de 140 mg/Kg de peso vivo por día. Se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio y las de estanquería. Es importante destacar que no hay diferencia significativa entre la temperatura y la salinidad registrada en cada uno de los ensayos ( $P > 0.05$ ).

	GRUPO A							
	PUEBA EN ESTANQUE				PUEBA EN LABORATORIO			
	M	HEM	HEP	S ( $\mu\text{g/g}$ )	M	HEM	HEP	S ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Temperatura del agua (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>		27.50 $\pm$ 2.48				24.2 $\pm$ 1.02		
<b>Salinidad (%)</b>		38.00 $\pm$ 3.93				33.00 $\pm$ 1.5		
<b>Cmax (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	3.78	16.2	49.5	83.04	4.32	28.25	10.62	23.24
<b>T Cmax (h)</b>	120	72	12	336	168	72	336	168
<b>Ka (/h)</b>	0.0219	0.0208	0.02	-	0.0147	0.0175	0.0388	-
<b>Ke (/h)</b>	0.0122	0.0098	0.0153	0.0152	0.0011	0.0094	0.007	0.0604
<b>Ka <math>\frac{1}{2}</math> (h)</b>	31.64	33.32	34.65	-	47.14	39.60	17.86	-
<b>Ke <math>\frac{1}{2}</math> (h)</b>	56.82	70.73	45.30	45.60	630.13	73.74	99.02	11.48
<b>AUC (<math>\mu\text{g/h/ml}</math>)</b>	746.22	3007.8	9975	20469.72	1456.74	3972.96	2198.28	3924.48

Grupo A, Alimento elaborado con premezcla A (Blindado); Grupo B, Alimento elaborado con premezcla B (Blindado), Grupo C, Alimento elaborado con premezcla comercial (No blindado)

M, Músculo; HEM, Hemolinfa; HEP, Hepatopáncreas; S, Sedimento.

Cmax= Concentración máxima alcanzada.

T Cmax= Tiempo en el cual se alcanza la Cmax.

Ka= Taza constante de absorción.

Ke= Taza constante de eliminación.

Ka  $\frac{1}{2}$  = Vida media de absorción del fármaco.

Ke  $\frac{1}{2}$  = Vida media de eliminación del fármaco.

AUC = Área Bajo la Curva de la curva concentración-tiempo del fármaco a partir del cero a infinito.

Cuadro 25. Continuación...

	GRUPO B							
	PUEBA EN ESTANQUE				PUEBA EN LABORATORIO			
	M	HEM	HEP	S (µg/g)	M	HEM	HEP	S (µg/g)
<b>Temperatura del agua (°C)</b>		23.64 ± 2.35				24.2 ± 1.02		
<b>Salinidad (‰)</b>		31.60 ± 2.81				33.00 ± 1.5		
<b>Cmax (µg/ml)</b>	4.21	8.4	57.1	286.90	7.01	13.38	20.27	29.01
<b>T Cmax (h)</b>	24	72	24	168	120	12	168	168
<b>Ka (/h)</b>	0.0269	0.0292	0.0156		0.0213	0.1376	0.0282	
<b>Ke (/h)</b>	0.0137	0.0221	0.0058	0.0212	0.0012	0.0144	0.0195	0.0191
<b>Ka ½ (h)</b>	25.76	23.73	44.42		32.54	5.04	24.57	31.64
<b>Ke ½ (h)</b>	50.59	31.36	119.51	32.70	577.62	48.14	35.55	36.29
<b>AUC (µg/h/ml)</b>	757.02	1530	15430.2	51258.96	2325.24	2349.84	4158.84	4878.84

Grupo A, Alimento elaborado con premezcla A (Blindado); Grupo B, Alimento elaborado con premezcla B (Blindado), Grupo C, Alimento elaborado con premezcla comercial (No blindado)

M, Músculo; HEM, Hemolinfa; HEP, Hepatopáncreas; S, Sedimento.

Cmax= Concentración máxima alcanzada.

T Cmax= Tiempo en el cual se alcanza la Cmax.

Ka= Taza constante de absorción.

Ke= Taza constante de eliminación.

Ka ½ = Vida media de absorción del fármaco.

Ke ½ = Vida media de eliminación del fármaco.

AUC = Área Bajo la Curva de la curva concentración-tiempo del fármaco a partir del cero a infinito.

Cuadro 25. Continuación ...

	GRUPO C							
	PUEBA EN ESTANQUE				PUEBA EN LABORATORIO			
	M	HEM	HEP	S ( $\mu\text{g/g}$ )	M	HEM	HEP	S ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Temperatura del agua (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>		26.30 $\pm$ 2.55				24.2 $\pm$ 1.02		
<b>Salinidad (‰)</b>		34.70 $\pm$ 3.10				33.00 $\pm$ 1.5		
<b>Cmax (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	1.43	3.9	74	312.00	3.13	5.73	17.00	35.00
<b>T Cmax (h)</b>	72	72	12	168	72	72	168	168
<b>Ka (/h)</b>	0.0373	0.0196	0.001		0.0731	0.035	0.0113	
<b>Ke (/h)</b>	0.0232	0.0283	0.0259	0.0342	0.0083	0.0135	0.0077	0.0622
<b>Ka <math>\frac{1}{2}</math> (h)</b>	18.58	35.36	693.00		9.48	19.80	61.33	
<b>Ke <math>\frac{1}{2}</math> (h)</b>	29.88	24.49	26.76	20.27	83.51	21.34	90.02	11.14
<b>AUC (<math>\mu\text{g/h/ml}</math>)</b>	160.656	571.80	5178.6	55505.76	632.7	1015.14	3738.00	5796.00

Grupo A, Alimento elaborado con premezcla A (Blindado); Grupo B, Alimento elaborado con premezcla B (Blindado), Grupo C, Alimento elaborado con premezcla comercial (No blindado)

M, Músculo; HEM, Hemolinfa; HEP, Hepatopáncreas; S, Sedimento.

Cmax= Concentración máxima alcanzada.

T Cmax= Tiempo en el cual se alcanza la Cmax.

Ka= Taza constante de absorción.

Ke= Taza constante de eliminación.

Ka  $\frac{1}{2}$  = Vida media de absorción del fármaco.

Ke  $\frac{1}{2}$  = Vida media de eliminación del fármaco.

AUC = Área Bajo la Curva de la curva concentración-tiempo del fármaco a partir del cero a infinito.

Cuadro 26. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/ml}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	10.25	0.10
	1	8.64	0.08
	3	28.25	0.14
	5	22.54	0.09
	7	12.73	0.09
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	NSD	NSD
	12	5.28	0.06
	14	4.55	0.13
	17	1.15	0.06

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
DE= Desviación estándar

Cuadro 27. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/ml}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	13.38	0.05
	1	12.94	0.14
	3	11.90	0.19
	5	10.43	0.74
	7	9.93	0.24
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	5.51	0.08
	12	NSD	NSD
	14	0.47	0.02
	17	0.36	0.02

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
DE= Desviación estándar

Cuadro 28. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/ml}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
	0.5	NSD	NSD
Durante la medicación	1	2.87	0.01
	3	5.73	0.05
	5	3.90	0.062
	7	4.00	0.05
	8	4.30	0.10
Después de la medicación (tiempo de retiro)	12	0.90	0.02
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$

DE= Desviación estándar

Cuadro 29. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
	0.5	5.14	0.45
Durante la medicación	1	9.04	0.20
	3	7.00	0.50
	5	7.74	0.13
	7	5.48	0.69
	8	4.31	0.08
Después de la medicación (tiempo de retiro)	12	0.40	0.16
	14	10.62	0.07
	17	1.00	0.17

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$

DE= Desviación estándar

Cuadro 30. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	6.03	2.30
	1	6.00	1.50
	3	5.52	1.30
	5	7.20	2.10
	7	20.27	3.70
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	18.58	2.50
	12	17.33	3.60
	14	0.88	0.02
	17	4.19	0.3

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 31. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de laboratorio (n=6).

	Días muestreo	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	9.92	0.51
	1	10.10	1.06
	3	9.25	0.64
	5	9.20	0.12
	7	17.00	1.34
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	16.70	1.03
	12	7.13	0.05
	14	5.05	0.06
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 32. Análisis histopatológico de 30 animales colectados en los estanques antes de iniciar el ensayo de campo

Enfermedades		Estanque							
		1 (Dieta A)		2 (Dieta B)		3 (Dieta C)		Total	
		10*		10*		10*		30*	
		P	%	P	%	P	%	P	%
Virales	WSSV	2	20	1	10	1	10	4	13.3
	IHHNV	1	10	1	10	0	0	2	6.7
	TSA	2	20	2	20	1	10	5	16.7
Bacterianas	Síndrome de bolitas blancas	1	10	0	0	0	0	1	3.3
	Contaminación por bacterias	1	10	0	0	2	20	3	10
	NHP	1	10	1	10	2	20	4	13.3
Por protozoarios	Huevos de cestodos	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gregarinas	6	60	4	40	3	30	13	43.3
	Esporozoarios	2	20	0	0	0	0	2	6.7
	Epibiontes	7	70	8	80	2	20	17	56.7
Otros	Descamación epitelial del intestino	0	0	0	0	0	0	0	0
	Calcificación metastásica	6	60	4	40	2	20	12	40
	Calcificación distófica	0	0	0	0	0	0	0	0
	Excesiva proteína en túbulos hepatopancreáticos	2	20	1	10	3	30	6	20
	Degeneración mucosa en branquias	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enteritis hemolítica	1	10	4	40	2	20	7	23.3
	Fibrosis del conducto deferente	0	0	0	0	0	0	0	0
	Infiltración hemolítica en gónadas	0	0	0	0	0	0	0	0

P= número de organismos afectados

\*= número de organismos analizados

%= porcentaje que representan los animales enfermos



Cuadro 33. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	1.52	0.32
	1	2.59	0.63
	3	3.64	0.86
	5	3.78	0.02
	7	3.67	0.01
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	2.74	0.04
	10	NSD	NSD
	12	NSD	NSD
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 34. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	NSD	NSD
	1	4.21	0.09
	3	3.44	0.04
	5	3.43	0.05
	7	3.29	0.03
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	3.31	0.03
	10	1.32	0.01
	12	NSD	NSD
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 35. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en músculo de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	0.91	0.01
	1	1.31	0.06
	3	1.43	0.05
	5	0.61	0.04
	7	0.24	0.01
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	0.11	0.002
	10	NSD	NSD
	12	NSD	NSD
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 36. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/ml	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	5.70	0.90
	1	6.50	0.02
	3	16.20	1.20
	5	14.50	1.40
	7	12.50	1.60
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	10.00	1.80
	10	5.60	0.06
	12	4.00	0.02
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 37. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/ml	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	7.00	0.10
	1	7.40	0.20
	3	8.40	1.01
	5	7.40	0.60
	7	7.90	0.70
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	3.30	0.05
	10	0.70	0.03
	12	0.60	0.06
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 38. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hemolinfa de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/ml	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	0.90	0.20
	1	1.50	0.10
	3	3.90	0.30
	5	3.10	0.10
	7	2.40	0.05
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	1.00	0.01
	10	0.30	0.02
	12	0.90	0.03
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 39. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	49.50	3.10
	1	50.70	2.60
	3	41.20	1.60
	5	36.00	3.50
	7	38.70	2.40
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	24.90	1.90
	10	10.30	2.10
	12	6.30	0.50
	14	17.80	0.10
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 40. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	56.50	5.20
	1	57.10	6.10
	3	54.30	4.20
	5	52.80	4.60
	7	53.50	2.30
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	35.1	3.20
	10	26.5	3.70
	12	26.9	3.60
	14	30.6	2.10
	17	8.6	0.10

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 41. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en hepatopáncreas de camarones alimentados con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina no blindada) en condiciones de estanquería (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	0.5	74.00	5.21
	1	68.50	6.15
	3	28.80	3.51
	5	4.60	0.10
	7	1.30	0.05
Después de la medicación (tiempo de retiro)	8	3.20	0.09
	10	8.00	2.10
	12	1.80	0.01
	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 42. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla A (Grupo A, oxitetraciclina experimental blindada) (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en µg/g	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	5	16.84	3.60
	7	23.24	6.95
Después de la medicación (tiempo de retiro)	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD
	22	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05 µg/g  
DE= Desviación estándar

Cuadro 43. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla B (Grupo B, oxitetraciclina experimental blindada) (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	5	19.50	3.80
	7	29.01	10.20
Después de la medicación (tiempo de retiro)	14	0.61	0.07
	17	0.36	0.09
	22	NSD	NSD

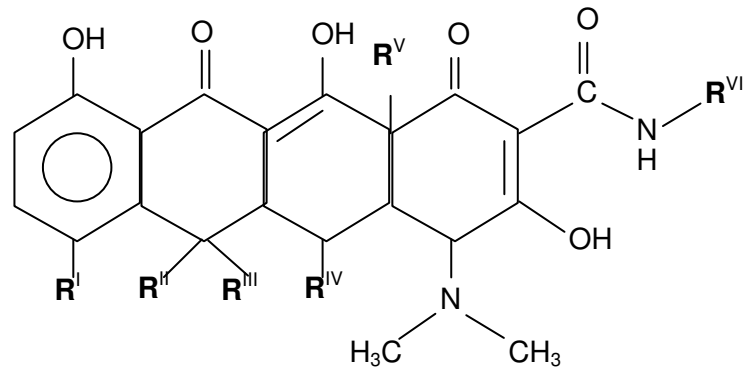
NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
DE= Desviación estándar

Cuadro 44. Medias y desviación estándar de la concentración de oxitetraciclina en sedimentos de los ensayos en el laboratorio, donde los camarones se alimentaron con la premezcla C (Grupo C, oxitetraciclina comercial no blindada) (n=6).

	Días del experimento muestreados	Concentración en $\mu\text{g/g}$	DE
Antes de medicar	0	NSD	NSD
Durante la medicación	5	24.00	3.40
	7	35.00	5.20
Después de la medicación (tiempo de retiro)	14	NSD	NSD
	17	NSD	NSD
	22	NSD	NSD

NSD= No se detecto a mas de 0.05  $\mu\text{g/g}$   
DE= Desviación estándar

## 14. FIGURAS



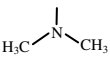
	R <sup>I</sup>	R <sup>II</sup>	R <sup>III</sup>	R <sup>IV</sup>	R <sup>V</sup>	R <sup>VI</sup>
Tetraciclina	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H
Clortetraciclina	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H
Oxitetraciclina	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	H
Doxiciclina	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	H
Minociclina		H	H	H	OH	H
Demeclociclina	Cl	H	OH	H	H	H

Figura 1. Fórmula estructural general de las tetraciclinas y las sustituciones que dan origen a sus diferentes miembros.

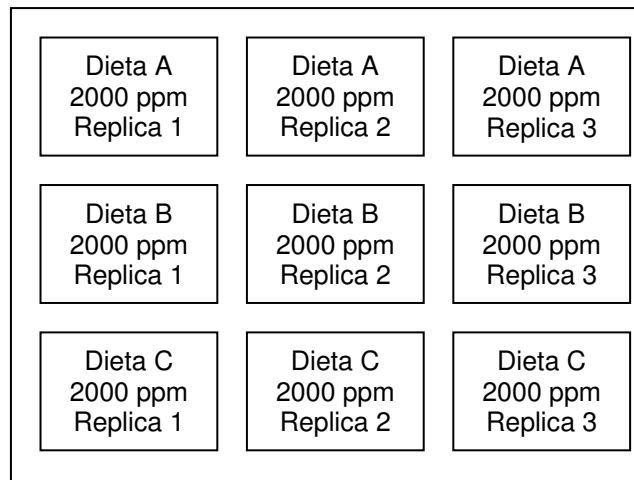


Figura 2. Distribución de las peceras utilizadas en el proceso de lixiviación para cada tratamiento, dieta A y B blindadas, dieta C con oxitetraciclina comercial sin blindar.

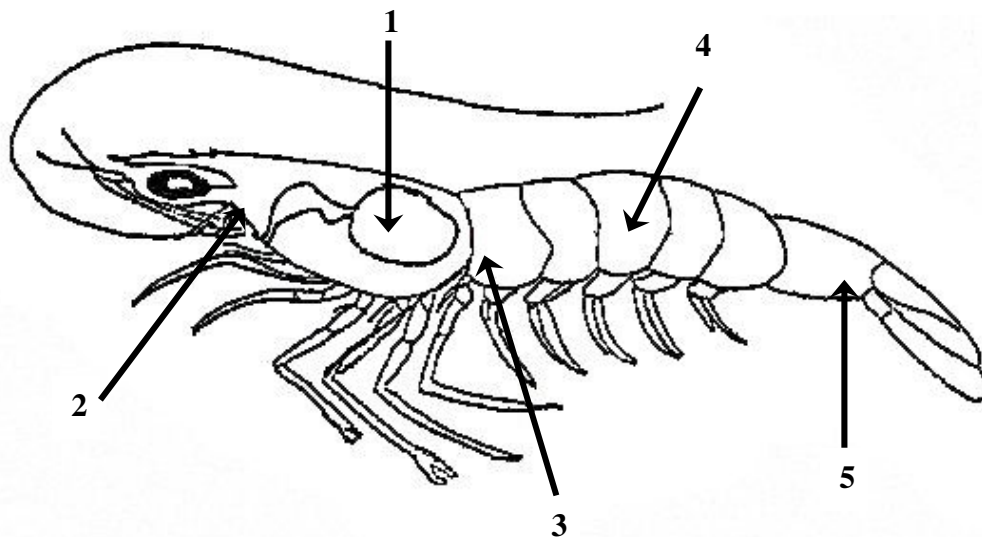


Figura 3. Puntos de inyección para fijar camarones empezando por el hepatopáncreas que es inyectado por ambos lados (1), en la parte anterior del hepatopáncreas dorsal a la cabeza (2), y en el primer (3), tercer (4) y sexto segmento (5) abdominal.<sup>4</sup>

<p>Tanque 1</p> <p>Dieta A 2000 ppm de OTC blindada Replica 1</p>	<p>Tanque 2</p> <p>Dieta B 2000 ppm de OTC blindada Replica 1</p>	<p>Tanque 3</p> <p>Dieta B 2000 ppm de OTC blindada Replica 2</p>
<p>Tanque 4</p> <p>Dieta C 2000 ppm de OTC sin blindar Replica 2</p>	<p>Tanque 5</p> <p>Dieta A 2000 ppm de OTC blindada Replica 2</p>	<p>Tanque 6</p> <p>Dieta C 2000 ppm de OTC sin blindar Replica 1</p>

Figura 4. Distribución de los contenedores de fibra de vidrio donde se realizó el ensayo de farmacocinética en condiciones de laboratorio.



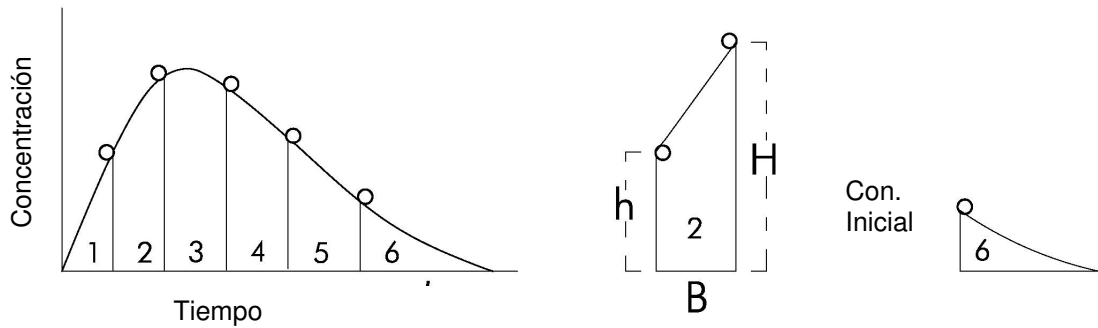


Figura 5. Método de los Trapezoides para cálculo de Área Bajo la Curva (AUC). Concentraciones registradas de un fármaco luego de una administración oral, donde se observa la descomposición del área bajo la curva en distintos segmentos (1 al 6). El cálculo en el segmento 1 se realiza por medio de la formula geométrica de Base x altura / 2. Los segmentos 2-5 son trapezoides, cuya superficie se calcula: Base x (H + h / 2). El segmento 6, que teóricamente llega hasta el infinito, se calcula Área 6 = Concentración inicial / constante de eliminación.

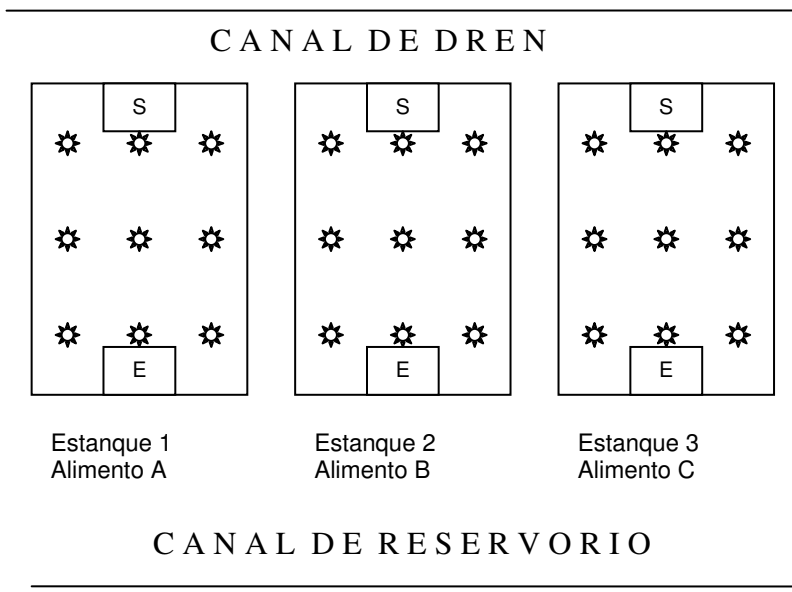


Figura 6. Puntos de muestreo para cada uno de los estanque de producción semi-intensiva \* con sus respectivos tratamientos, con las entradas (E) y las salidas (S) del agua.

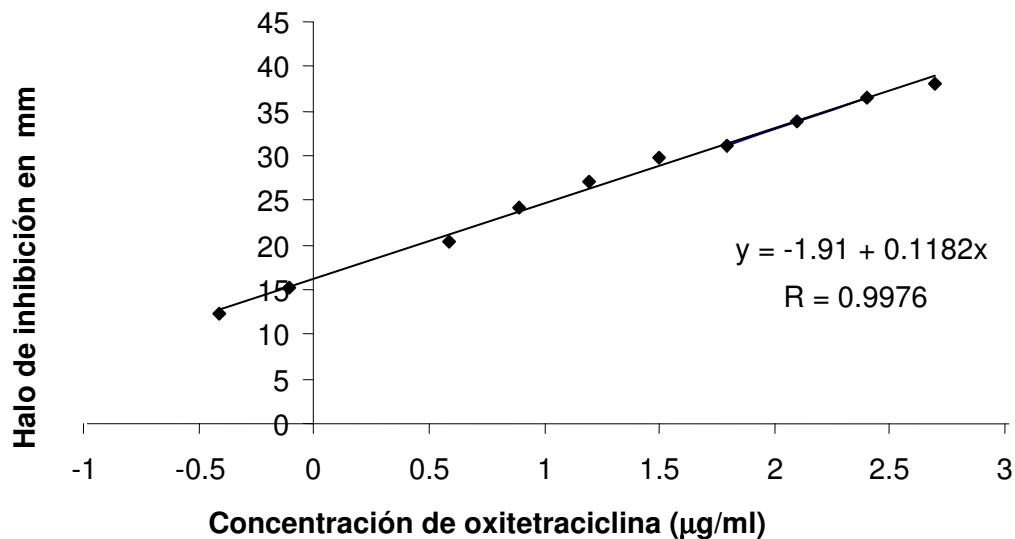


Figura 7. Gráfica de regresión lineal de la curva estándar para oxitetraciclina utilizada en el análisis para determinar el principio activo en premezclas, alimentos y sedimentos.

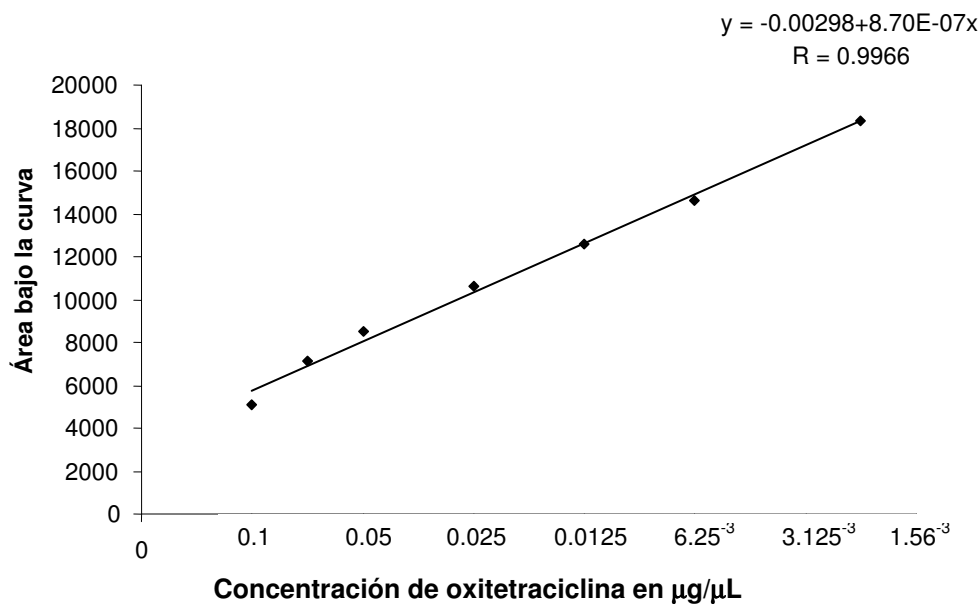


Figura 8. Gráfica de la curva estándar para oxitetraciclina por HPLC utilizada en el análisis para determinar el principio activo en músculo y hemolinfa.

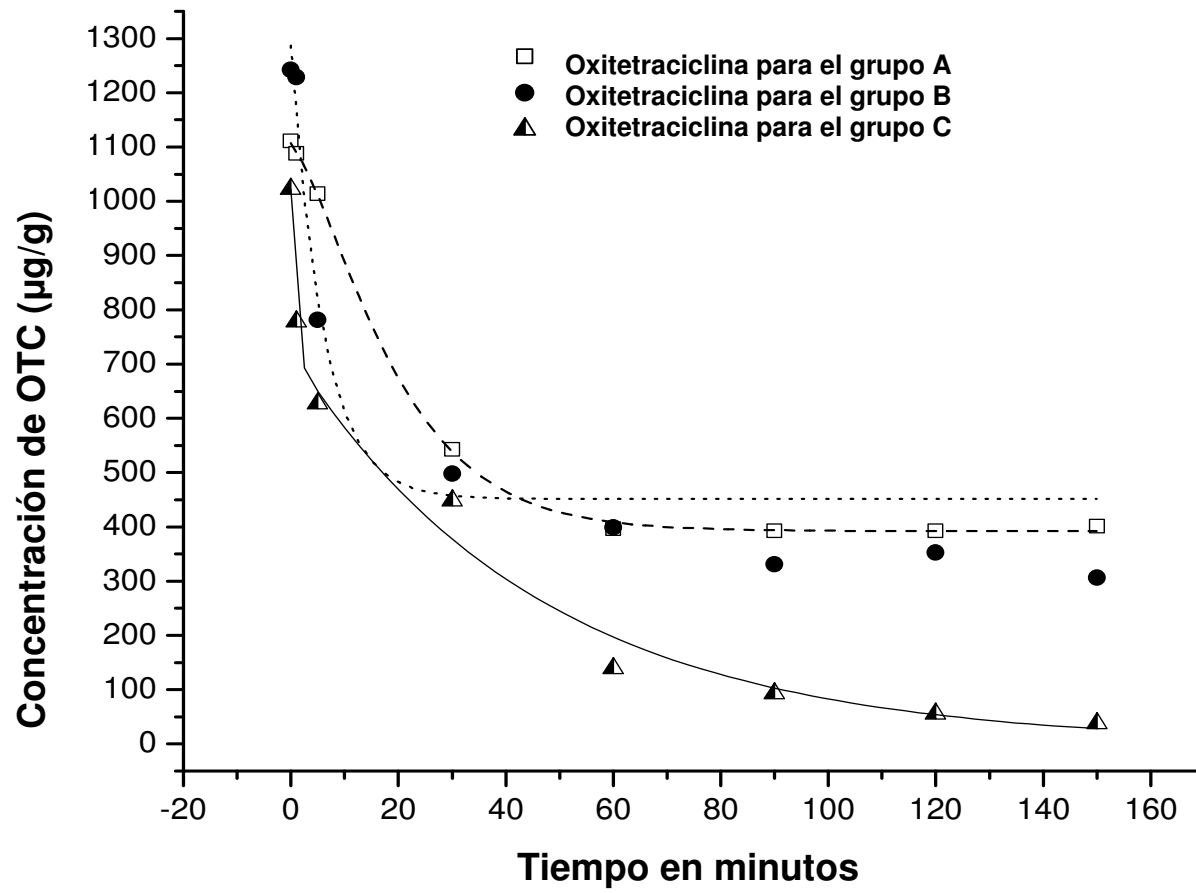
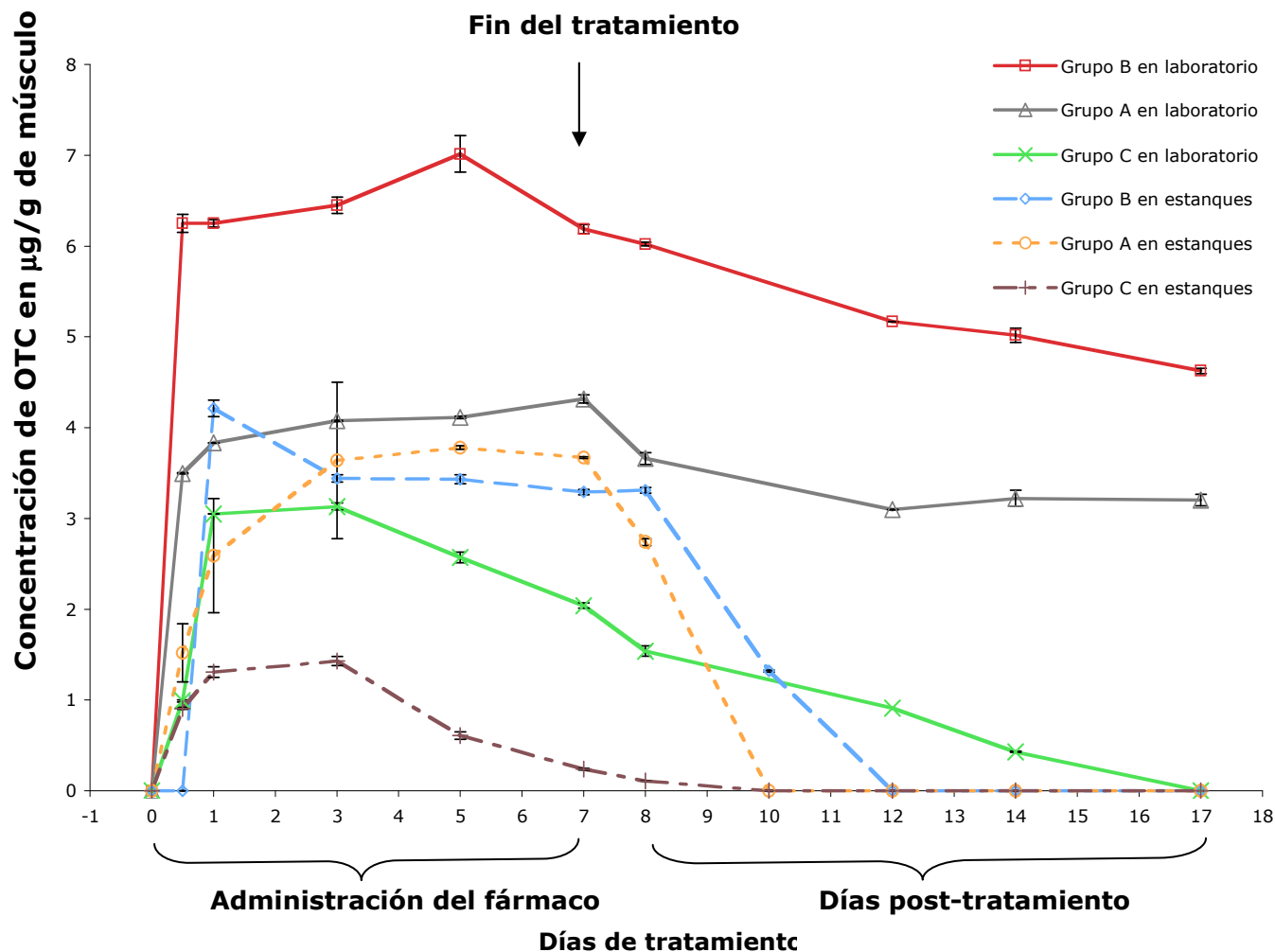
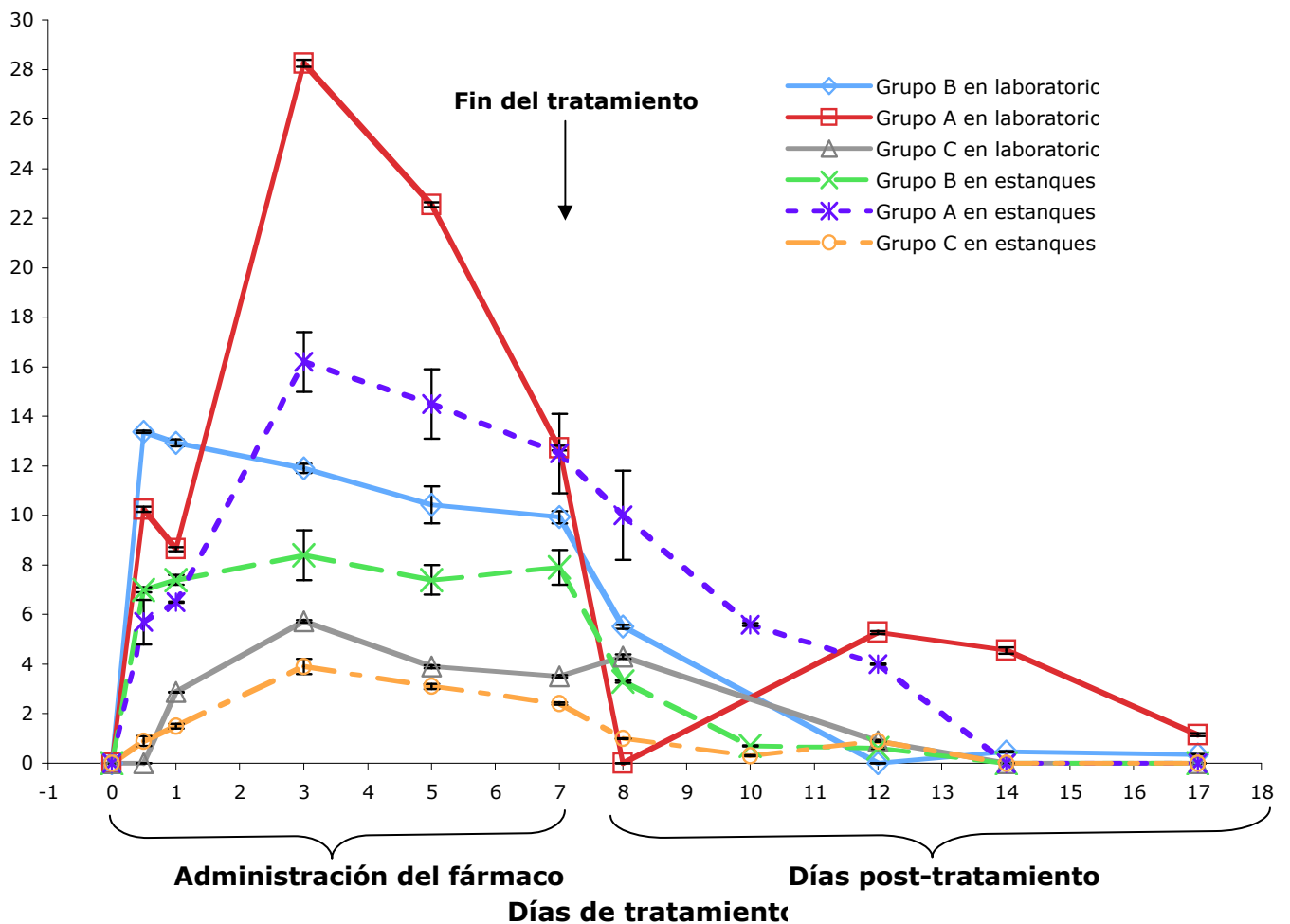


Figura 9. Lixiviación de oxitetraciclina en agua salada a 40 ‰, presentando una curva exponencial de segundo orden ( $r > 0.99$ ) de la actividad antibacteriana, expresada como concentración, en alimento pelletizado para camarón preparado con tres premezclas de oxitetraciclina: A y B blindadas y C sin blindar.



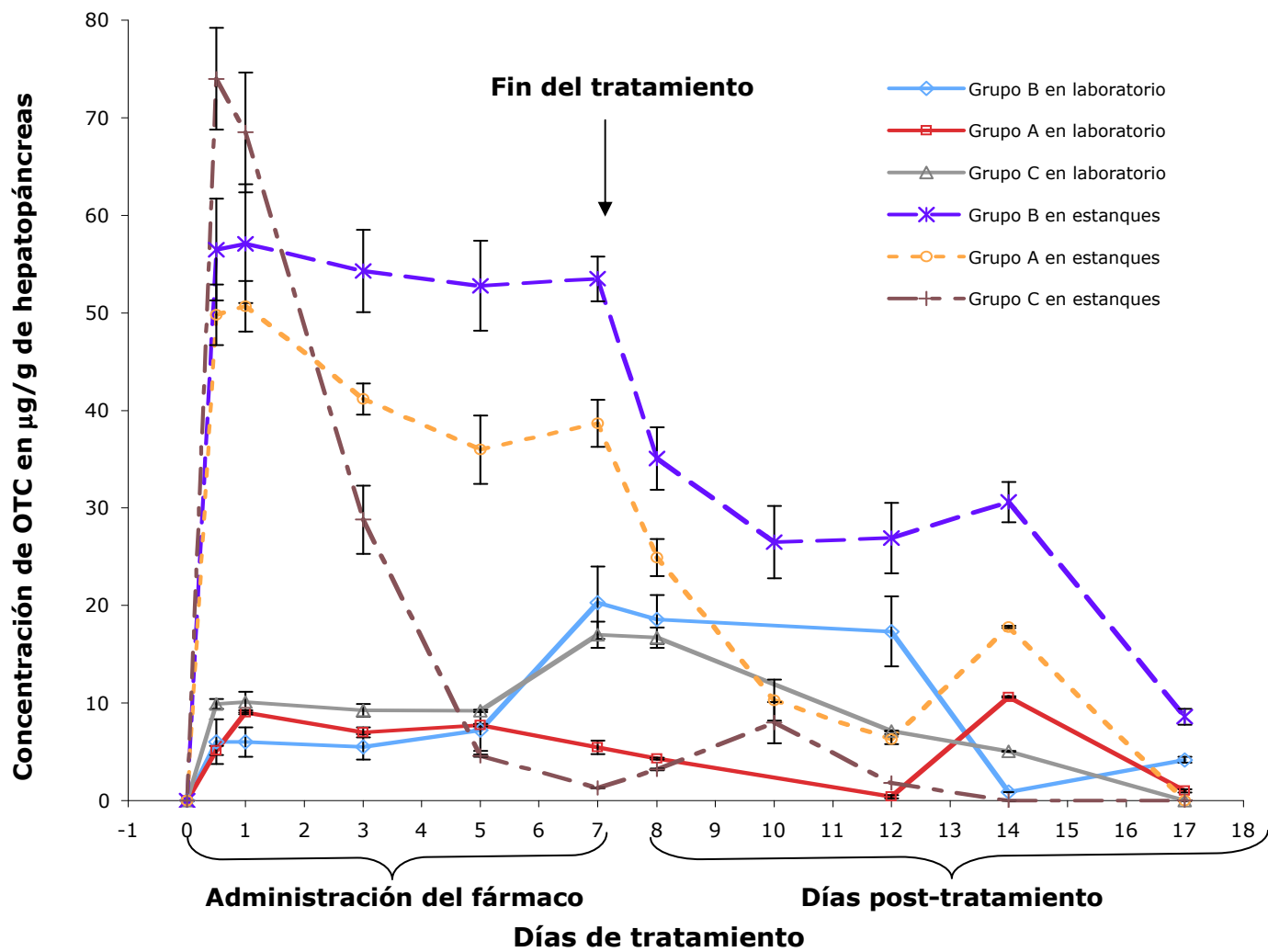
Tratamiento	Día de tratamiento									
	0.5	1	3	5	7	8	10	12	14	17
Grupo A Laboratorio	a	a	a	a	a	a		a	a	a
Grupo B Laboratorio	b	b	b	b	b	b		b	b	b
Grupo C Laboratorio	c, g	c, f	c, f	c	c	c		c	c	c
Grupo A Estanque	d, g	d, f	a, c	a, f	d, g	d, f	a	d, g	d, g	d, g
Grupo B Estanque	e	a	d, c	d, f	e, g	a, f	b	e, g	e, g	e, g
Grupo C Estanque	f, g	e	e	e	f	e	a	f, g	f, g	f, g

Figura 10. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



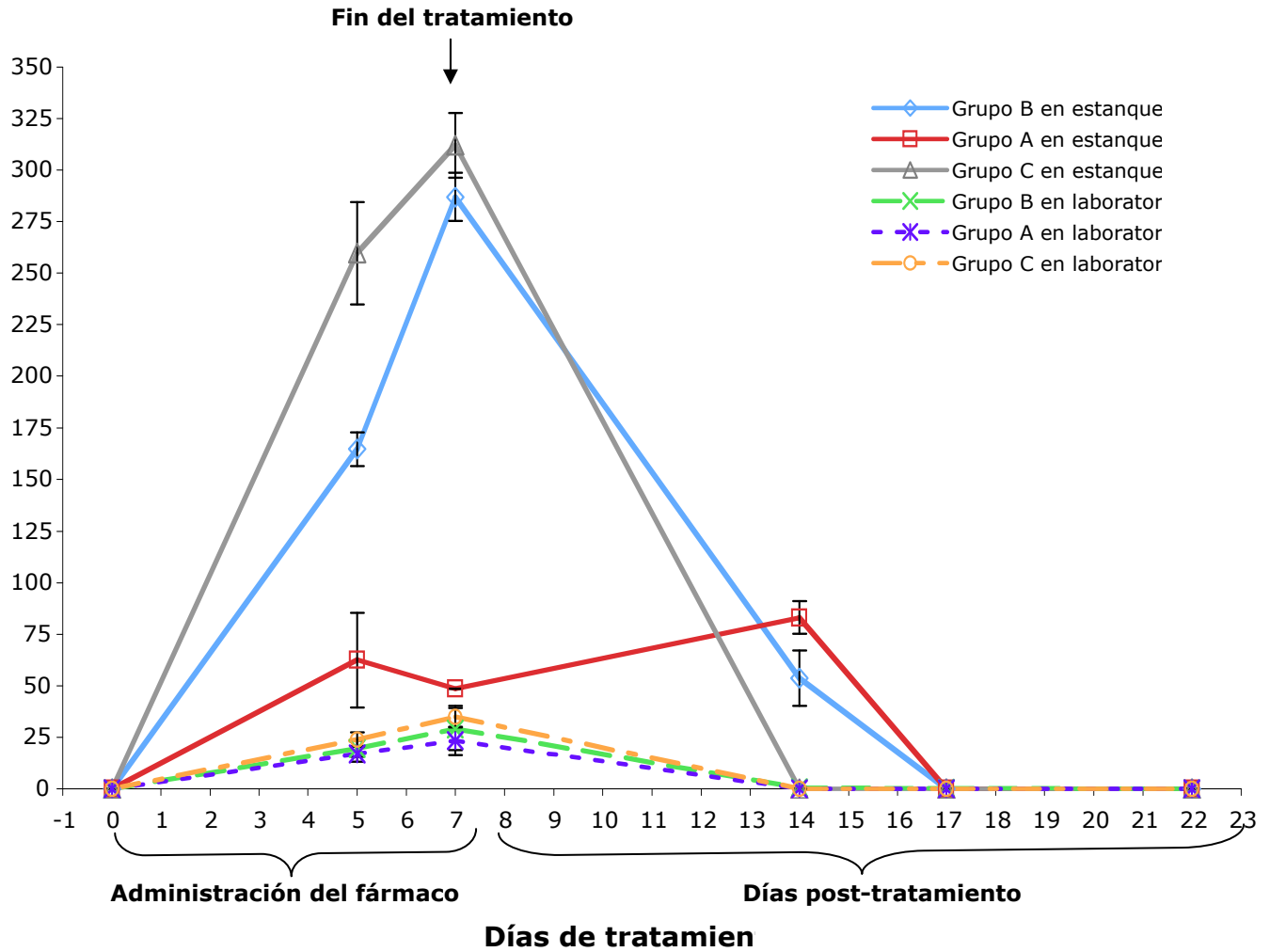
Tratamiento	Día de tratamiento									
	0.5	1	3	5	7	8	10	12	14	17
Grupo A Laboratorio	a	a	a	a	a	a		a	a	a
Grupo B Laboratorio	b	b	b	b	b	b		b	b	b
Grupo C Laboratorio	c	c	c	c	c	c, g		c, g	c, g	c, g
Grupo A Estanque	d, g	d	d	d	a	d	a	d	d, g	d, g
Grupo B Estanque	e, g	e	e	e	d	e, g	b, d	e	e, g	e, g
Grupo C Estanque	f	f	f	f	e	f	c, d	f, g	f, g	f, g

Figura 11. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en hemolinfa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



Tratamiento	Día de tratamiento										
	0.5	1	3	5	7	8	10	12	14	17	
Grupo A Laboratorio	a	a	a	a	a	a		a	a	a	
Grupo B Laboratorio	a	b	a	a	b, g	b, f		b	b, g	b	
Grupo C Laboratorio	a	a	b	a	c, g	c, f		c, g	c	c, g	
Grupo A Estanque	b, e	c, f	c	b	d	d	a	d, g	a	d, g	
Grupo B Estanque	c, e	d, f, e	d	c	e	e	b	e	e	e	
Grupo C Estanque	d	e	e	d	f	a	a	f	f, g	f, g	

Figura 12. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en hepatopáncreas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) medicados por 7 días a una dosis de 140 mg/kg de peso vivo por día, con 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



Tratamiento	Día de tratamiento				
	5	7	14	17	22
Grupo A Laboratorio	a	a	a	a	a
Grupo B Laboratorio	a	a	b	b	a
Grupo C Laboratorio	a	b	a	a	a
Grupo A Estanque	b	c	c	a	a
Grupo B Estanque	c	d, f	d	a	a
Grupo C Estanque	d	e, f	a	a	a

Figura 13. Concentraciones de oxitetraciclina registradas en sedimento utilizado en cada uno de los ensayos con las 3 distintas premezclas (Grupo A, B y C) en condiciones de laboratorio y estanquería. Las líneas continuas ilustran los ensayos en laboratorio y las punteadas en estanquería. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos por día de muestreo se observan en el diagrama. Los valores dentro de las columnas que no comparten literal presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 15. ANEXOS

### Anexo 1

#### Método microbiológico para OTC en premezcla y alimento

- 1.- Se pesaron 10 g de cada muestra previamente homogenizadas.
- 2.- Una vez pesados, se colocaron en contenedores de 250 ml donde se realizó la extracción agregando 50 ml de solución McBuffer A (614.5 ml de ácido cítrico al 0.10 M; 385.5 ml de fosfato de sodio dibásico anhidro al 0.20 M y 0.372 g de Na<sub>2</sub>EDTA, ajustado a pH 2 con HCl concentrado) mezclando por 20 min y centrifugados 15 min a 3500 rpm, el sobrenadante fue colectado y se realizó 1 extracción adicional agregando 50 ml de McBuffer B para cada muestra (614.5 ml de ácido cítrico al 0.10 M; 385.5 ml de fosfato de sodio dibásico anhidro al 0.20 M y 37.2 g de Na<sub>2</sub>EDTA, ajustado a pH 4.5 con NH<sub>4</sub>OH al 28%) de acuerdo al método de Martínez y Shimoda (1988).<sup>108</sup> La eficiencia de éste método de extracción se comprobó por la adición de una cantidad conocida de OTC a un alimento no medicado y procesada de la misma forma. Por otro lado, se procesaron 3 muestras de alimento para camarón sin antibiótico, con la finalidad de verificar la posible interferencia de otro compuesto diferente a la OTC en los halos de inhibición.
- 3.- Una vez realizada la extracción de la OTC, se recuperó toda la alícuota y se centrifugó 10 min a 2000 rpm. Del sobrenadante se tomó aproximadamente 2 ml y fue filtrado por membranas de nylon de 0.45 µm.
- 4.- El filtrado obtenido se cuantificó por medio del método microbiológico de difusión de agar descrito por Bennett y col. (1966)<sup>90</sup> utilizando una bacteria *Bacillus cereus* ATCC (American Type Culture Collection) 11778 sensible a OTC.
- 5.- Para realizar el método microbiológico se preparó el agar Mueller Hinton (Bioxon) con 38g/l, calentado y esterilizado a 120 °C por 15 min a 15lb.
- 6.- Posteriormente se tomó una asada de la bacteria ajustada a una concentración de 0.5 Mc Farland en agua destilada.



7.- Se esterilizaron tubos de ensayo de 10 y 15 ml y refractarios cuadrados pyrex de 21 x 20 cm colocando 200 ml de agar en cada placa y se procederá a sembrar la bacteria con 200µl de la solución Mc Farland.

8.- Posteriormente se prepararon las diluciones empezando con una solución madre pesando 50mg de oxitetraciclina al 99% de pureza (donada de Laboratorios Avimex<sup>®</sup>) y disolviendo en un matraz volumétrico de 100 ml con agua destilada (micronizando por 30 min). De esta solución, se tomo 1 ml y se homogenizó en un tubo que contenía 1 ml de agua destilada y desionizada, de este último, se tomó nuevamente 1 ml y se homogenizó en un tubo nuevo que contenía 1 ml de agua destilada y desionizada y así sucesivamente hasta completar 9 tubos. Las concentraciones finales obtenidas fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 0.781 y 0.391 µg ml<sup>-1</sup> de OTC.

9.- En el agar ya gelatinizado se realizan pozos con un sacabocados, depositando en cada uno 100 µl de las diferentes diluciones estándar y las muestras.

10.- Las placas fueron incubadas por un periodo de 24 horas a 28°C y al día siguiente se midieron los milímetros de halo de inhibición por medio de un Bernier digital.

11.- Los datos obtenidos se llevaron a una regresión lineal para obtener las concentraciones finales.

## **Anexo 2**

### **Análisis Histopatológico**

Para llevar a cabo un estudio histopatológico fue necesario seleccionar a los camarones que rápidamente fueron sacrificados, cortando su cordón nervioso e inmediatamente fijados en vivo, para evitar el proceso degenerativo del tejido.

### **Fijación**

La fijación en fresco se realizó en organismos con solución Davidson estándar. Esta solución se preparó de acuerdo con Bell y Lightner (1988)<sup>109</sup> de la siguiente forma:

Por cada litro 330 ml de alcohol etílico 95%, 220 ml de formalina (37-39%), 115 ml de ácido acético glacial y 335 ml de agua destilada. Esta solución se almacenó a temperatura ambiente.

Es importante mencionar que el ácido acético glacial se agregó al resto de la solución minutos antes de ser utilizado.

De acuerdo con el método descrito por Bell y Lightner (1988)<sup>109</sup> y Clifford III (1997),<sup>4</sup> la fijación siempre se empezó por el hepatopáncreas inyectando con una jeringa de 5 ml por ambos lados del cefalotórax, colocando la aguja en el centro del órgano, confirmando que se encuentra bien fijado con el cambio de color desde café/crema hasta rojo/naranja.

Posteriormente se inyectó la parte anterior del hepatopáncreas y arriba del estómago en la parte dorsal del cefalotórax. Después en un costado del abdomen en el centro del primer, tercer y sexto segmento, incluyendo la parte ventral de este último teniendo cuidado para evitar la perforación del intestino posterior (Fig. 3).

Una vez fijados, los camarones se sumergen en solución Davidson con un volumen de 10:1 en bolsas herméticas de polietileno por un periodo de 24 a 72 horas y después se preservarán en etanol 70% en una proporción de 2:1.<sup>7</sup>

## **Segmentación**

Los camarones fueron segmentados, separando el cefalotórax y el primero, tercero y sexto segmento abdominal, cortándolos longitudinalmente.<sup>109</sup>

## **Deshidratación**

Los segmentos cortados, fueron colocados en cápsulas para tejidos y posteriormente deshidratados con un histoquinette según el método descrito por Bell y Lightner (1988).<sup>109</sup>

Posterior al término del histoquinette las muestras fueron incluidas en parafina a aproximadamente 60 °C.

## **Corte**

Consecuentemente se realizaron cortes de 5 a 6 micras de grosor en un micrótomo. Los cortes se colocan en portaobjetos para su tinción con Hematoxilona y Eosina.<sup>110</sup>

## **Diagnóstico**

Las muestras tisulares se diagnosticaron por medio de observaciones a microscopio. Es conveniente hacer énfasis en que la mayor parte de las enfermedades observadas en camarones peneidos se caracterizan por tener lesiones histopatológicas de tipo patognomónico.

## **Anexo 3**

### **Extracción de Hemolinfa**

El método de extracción de hemolinfa ocupado en el presente trabajo de llevó a cabo de la siguiente forma:

- 1.- Se seleccionaron los organismos.
- 2.- El camarón capturado con una red se sacó y se eliminó el exceso de agua con una toalla de papel.
- 3.- Se limpió toda la zona ventral del cefalotórax, en la base de los periópodos con una torunda de algodón impregnada con alcohol al 70%.
- 4.- Posteriormente se realizó la extracción de la hemolinfa con una jeringa de insulina (aproximadamente 50µl, dependiendo del tamaño de camarón) conteniendo citrato de sodio al 10%, de tal manera que la aguja entre al seno ventral sin tocar algún órgano adyacente por la parte de la base del quinto periópodo. La hemolinfa es transparente, si se observaba algún otro color, la muestra es desechaba.
- 5.- La hemolinfa extraída se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml que estaban a baja temperatura.

## **Anexo 4**

### **HPLC para OTC en hemolinfa**

El método de determinación de OTC en hemolinfa por HPLC fue con base en el método propuesto por Reed y col. (2004)<sup>88</sup>.

La hemolinfa extraída fue combinada 1:1 con agua destilada y desionizada, adicionando 5 µl de TFA y centrifugada por 15 min a 13,840 g a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5810 R), el sobrenadante fue inyectado en la columna de HPLC.

Las condiciones de manejo un volumen fueron las siguientes: se inyectaron 20 µl con un tiempo de corrida de 10 min. El tipo de columna utilizada fue una C8 5 µm Perkin-Elmer 80 mm x 4.5 mm ID.

La fase móvil se compuso de una solución ácido oxálico 0.01 M – ACN- MeOH (60:30:10, v/v/v) filtrado antes de su uso. La velocidad del flujo fue de 1.5 ml/min y el tiempo de retención fue de aproximadamente 2 min.

La validación del método se realizó por medio de una curva de calibración para OTC en hemolinfa con un rango de 0.8 - 5 µg/ml con una regresión lineal donde el coeficiente de correlación fue >0.90.

El porcentaje de recuperación fue cuantificado por medio del método de adición donde una cantidad conocida de OTC fue adicionada en hemolinfa sin medicar, que después fue procesada y cuantificada.

## **Anexo 5**

### **HPLC para OTC en músculo y hepatopáncreas**

La cuantificación de oxitetraciclina (OTC) presenten en el músculo y hepatopáncreas de camarón blanco *L. vannamei* se realizó de la siguiente forma de acuerdo con Reed y col. (2004)<sup>88</sup>:

Los camarones fueron descongelados, se obtuvo el músculo y por cada día de tratamiento se realizó un homogenado. Del mismo modo, se realizó un homogenado de los hepatopáncreas colectados por tratamiento.

Los homogenados fueron colocados en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml, y se les adicionó un buffer con una relación de 2:10 veces el peso del músculo. El buffer consistió en una solución de ácido oxálico al 0.01 M – MeOH con una relación de 1:1 v/v. La manipulación de las muestras se realizó en condiciones de temperatura baja cercana a 4 °C para evitar el calentamiento de la muestra.

Se colocó una alícuota de 1 ml del homogenizado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y posteriormente centrifugado por 15 min. a 13 840 gravitaciones a una temperatura de 4 °C (Eppendorf, Centrifuge 5810 R).

El sobrenadante de las muestras de músculo se inyectó directamente a la columna para el análisis de la oxitetraciclina por HPLC. Las muestras correspondientes a los hepatopáncreas fueron filtradas a través de membranas de nylon de 0.45 µm previo a su inyección.

Las condiciones previas a la inyección de las muestras fueron como a continuación se especifica.

La determinación de la OTC se realizó por medio de fase reversa con un volumen de inyección de 20 µl con un tiempo de corrida de 10 min. El tipo de columna utilizada fue una C8 5 µm Perkin-Elmer 80 mm x 4.5 mm ID.

La fase móvil consistía en una solución ácido oxálico 0.01 M – ACN- MeOH (60:30:10, v/v/v) filtrado antes de su uso. La velocidad del flujo es de 1.5 ml/min y el tiempo de retención fue de aproximadamente 2 min.

La validación del método se realizó por medio de una curva de calibración para OTC en músculo con un rango de 0.8 - 5 µg/ml con una regresión lineal donde el coeficiente de correlación fue >0.90.

El porcentaje de recuperación fue cuantificado por medio del método de adición, donde a una muestra de músculo de camarón se le agregó una cantidad conocida de OTC y después fue extraída para determinar el porcentaje recuperado.

## Anexo 6

### Extracción y determinación de OTC en sedimentos

- 1.- Los sedimentos fueron descongelados con ayuda de un ventilador y alejados de la luz por aproximadamente 1 día.
- 2.- Una vez secos se molieron perfectamente con ayuda de un mortero para obtener una muestra homogénea.
- 3.- Del homogenado anterior se pesaron 5g y se le adicionó 20 ml de una solución 0.1M Na<sub>2</sub>EDTA – Buffer MacIlvaine a pH 4 (ácido cítrico al 0.1M y fosfato dibásico dihidratado al 0.2M, al cual se le adicionó Na<sub>2</sub>EDTA hasta alcanzar una concentración de 0.1M) y fue mezclado por 10 min. El homogenado se centrifugó por 10 min a 2500 rpm y se colectó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron 2 extracciones adicionales con 20 y 10 ml respectivamente con el mismo buffer.<sup>111</sup>
- 4.- Toda la alícuota proveniente de la extracción fue recuperada para ser evaporada a baño maría con agitación e inyección de nitrógeno hasta la evaporación completa de la misma.
- 5.- Cuando se evaporó por completo fue suspendida en 5 ml de agua desionizada y analizada por el método microbiológico de Bennett y col. (1966).<sup>90</sup>
- 6.- Para realizar el método microbiológico se prepara el agar Mueller Hinton (Bioxon) con 38g/l, calentado y esterilizado a 120 °C por 15 min a 15lb.
- 7.- Posteriormente se toma una asada de una resiembra bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 11778 sensible a OTC) ajustada a una concentración de 0.5 Mc Farland en agua destilada.
- 8.- Se esterilizan tubos de ensayo de 10 y 15 ml y refractarios cuadrados pyrex de 21 x 20 cm colocando 200 ml de agar en cada placa y se procedió a sembrar la bacteria con 200µl de la solución bacteriana con ayuda de un hisopo estéril.

9.- Posteriormente se prepararon las diluciones empezando con una solución madre pesando 50 mg de oxitetraciclina al 99% de pureza (donada de Laboratorios Avimex<sup>®</sup>) y disolviendo en un matraz volumétrico de 100 ml con agua destilada. De esta solución, se tomo 1 ml y se homogenizó en un tubo que contenía 1 ml de agua destilada y desionizada, de este último, se tomó nuevamente 1 ml y se homogenizó en un tubo nuevo que contenía 1 ml de agua destilada y desionizada y así sucesivamente hasta completar 9 tubos.

10.- En el agar ya gelatinizado se realizaron pozos con un sacabocados, depositando en cada uno 100  $\mu$ l de las diferentes diluciones estándar y las muestras.

11.- Las placas fueron incubadas por un periodo de 24 horas a 28°C y al día siguiente se midieron los milímetros de halo de inhibición por medio de un Bernier digital.

12.- Los datos obtenidos (mm de halo de inhibición) fueron analizados por medio de una regresión lineal para obtener las concentraciones.