

**UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



Efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en  
productos cárnicos previamente contaminados con oxitetraciclina  
y enrofloxacina

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN NUTRICIÓN Y DIETÉTICA**

**AUTOR**

Anicia Magaly Medina Prada  
Andrea Liliana Lumbre Soles

**ASESOR**

María del Carmen Taipe Aylas

Lima, Perú  
2020

Efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en  
productos cárnicos previamente contaminados con oxitetraciclina y  
enrofloxacin

## **DEDICATORIA**

De Anicia,

A mi esposo, mi mejor amigo, por ser el impulso y fuente de apoyo que necesité para desarrollarme en esta segunda profesión; la cual me complace enteramente. Por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio ocupó mi tiempo y esfuerzo.

Por acompañarme siempre en mis sueños, por creer en mí.

A mis pequeños hijos, por ser parte de mi motivación cada día.

A mis padres, por su apoyo incondicional en cada nuevo reto.

A mi compañera de tesis, por el mutuo esfuerzo puesto en este trabajo.

De Andrea,

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye éste.

A mi hermano, has sido una de las principales personas involucradas en ayudarme a que este proyecto fuera posible.

A mis amigos, sobre todo a mi compañera de tesis y a Paul por su constante motivación y paciencia.

## **AGRADECIMIENTO**

De Anicia y Andrea:

Al Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur y a la doctora María J. Pons Casellas por el financiamiento del proyecto y apoyo incondicional.  
A nuestra asesora María del Carmen Taipe Aylas por la perseverancia y confianza depositada en nosotras.

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacin, medido por la técnica de técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y técnica microbiológica de difusión en agar. **Métodos.** Para la detección de residuos de oxitetraciclina (OTC) y enrofloxacin (ENR) en muestras de carnes se empleó la prueba de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mientras que la actividad antimicrobiana de las carnes con residuos de OTC y ENR fue medida por la técnica microbiológica de difusión en agar. Se recolectaron muestras de carne de pollo (n=30) y res (n=30) en tres mercados tradicionales de Lima Metropolitana. Las muestras negativas fueron contaminadas experimentalmente con uno de los dos antimicrobianos y cocidas mediante la técnica de hervido y microondas. Los promedios de niveles de residuos y halos de inhibición fueron comparados mediante la prueba U de Mann Whitney. **Resultados.** Todas las muestras provenientes de los mercados fueron negativas a residuos antimicrobianos mediante HPLC. Los niveles de residuos de OTC y ENR fueron significativamente menores en las muestras cocidas a los 9 y 12 minutos, mediante hervido y 30 segundos mediante microondas comparado con las muestras sin cocción,  $p < 0.05$ . De igual modo la actividad antimicrobiana de las carnes con residuos de OTC y ENR fueron significativamente menores a los 9, 12 y 20 minutos al hervido y 30 segundos al microondas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. **Conclusiones.** La cocción redujo significativamente la cantidad de residuos de antimicrobianos y la actividad antimicrobiana de muestras de carnes con residuos de OTC y ENR conforme se incrementó el tiempo de cocción.

## ABSTRACT

**Objective.** To determine the effect of cooking on the level of antimicrobial residues in meat products previously contaminated with oxytetracycline and enrofloxacin, measured by the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) technique and microbiological agar diffusion technique. **Methods.** For the detection of oxytetracycline (OTC) and enrofloxacin (ENR) residues in meat samples, the high-performance liquid chromatography (HPLC) test was used, while the antimicrobial activity of meats with OTC and ENR residues was measured by the microbiological agar diffusion technique. Samples of chicken meat (n = 30) and beef (n = 30) were collected in three traditional markets of Metropolitan Lima. The negative samples were experimentally contaminated with one of the two antimicrobials and cooked using the boiling and microwave technique. The averages of levels of residues and inhibition halos were compared using the Mann Whitney U test. **Results.** All samples from the markets were negative for antimicrobial residues by HPLC. The levels of OTC and ENR residues were significantly lower in the samples cooked at 9 and 12 minutes, by boiling and 30 seconds by microwave compared to the samples without cooking,  $p < 0.05$ . Similarly, the antimicrobial activity of the meats with OTC and ENR residues were significantly lower at 9, 12 and 20 minutes after boiling and 30 seconds when microwave, this difference being statistically significant. **Conclusions.** Cooking significantly reduced the amount of antimicrobial residues and antimicrobial activity of meat samples with OTC and ENR residues as cooking time increased.

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1.Situación problemática.....	2
1.2.Formulación del problema .....	3
1.2.1.Problema general .....	3
1.2.2.Problemas específicos .....	3
1.3.Justificación de la investigación.....	3
1.4.Objetivos de la investigación.....	4
1.4.1.Objetivo general .....	4
1.4.2.Objetivos específicos .....	4
1.5.Hipótesis.....	5
1.5.1.Hipótesis alterna .....	5
1.5.2.Hipótesis nula.....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1.Antecedentes de la investigación .....	6
2.1.1.Antecedentes internacionales .....	6
2.1.1.1.Antecedentes sobre residuos de antimicrobianos en productos cárnicos	6
2.1.1.2.Antecedentes de efecto de cocción sobre residuos de antimicrobianos en productos cárnicos .....	7
2.1.2.Antecedentes nacionales .....	8
2.2.Bases teóricas .....	9
2.2.1.Resistencia a los antimicrobianos.....	9
2.2.1.1.¿Cómo se produce la resistencia antimicrobiana? .....	9
2.2.2.Principales tipos de antibióticos usados.....	9
2.2.2.1.Tetraciclinas.....	9
2.2.2.2.Quinolonas.....	9
2.2.3.Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los antimicrobianos .....	10
2.2.4.1.Métodos microbiológicos.....	10
2.2.4.1.1.Bacterias usadas en métodos microbiológicos.....	10
2.2.4.1.2.Pruebas de difusión agar .....	10

2.2.4.1.2.1. Formación de una zona de inhibición .....	11
2.2.4.1.2.2. Composición del medio de cultivo y pH .....	11
2.2.5. Riesgo del uso de antimicrobianos en la salud pública .....	11
2.2.5.2. Problemas toxicológicos.....	12
2.2.5.3. Cambios en la microbiota intestinal .....	12
2.2.5.4. Resistencia bacteriana por el uso de antimicrobianos en alimentos.....	12
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. Tipo de estudio y diseño de la investigación .....	13
3.2. Población y muestra .....	13
3.2.1. Tamaño de la muestra .....	13
3.2.2. Selección del muestreo .....	13
3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión.....	14
3.2.3.1. Criterios de inclusión .....	14
3.3. Variables.....	14
3.3.1. Definición conceptual y operacionalización de variables.....	14
3.4. Plan de recolección de datos e instrumentos .....	15
3.4.1. Plan de recolección de datos .....	15
3.4.2. Instrumentos.....	16
3.5. Plan de análisis e interpretación de la información.....	17
3.6. Ventajas y limitaciones.....	18
3.7. Aspectos éticos.....	18
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
5.1. Discusión.....	25
5.2. Conclusiones .....	27
5.3. Recomendaciones.....	27
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>
Anexo N°1: Operacionalización de variables.....	31
Anexo N°2: Flujograma de plan de recolección de datos .....	32
Anexo N°3: Preparación de material para el método de cribado microbiológico.	33
Anexo N°4: Contaminadas de manera experimental con OTC y ENR. ....	33
Anexo N°5: Muestras sometidas a cocción, sonicación y centrifuga. ....	34
Anexo N°6: Acondicionamiento de columnas para el HPLC. ....	35
Anexo N°7: Acondicionamiento del HPLC. ....	35
Anexo N°8: Sembrado del <i>Bacillus Subtilis</i> y diámetro del halo de inhibición. ....	36
Anexo N°9: Matriz de consistencia .....	37

<b>Anexo N°10: Carta de aprobación del protocolo de tesis por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud. ....</b>	<b>38</b>
<b>Anexo N°11: Glosario de términos.....</b>	<b>39</b>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud mundial ocasionando millones de infecciones y muertes en todo el mundo (1), los residuos antimicrobianos en los alimentos se deben al sobreuso de antibióticos que en su mayoría son empleados como dosis de profilaxis para mejorar el rendimiento del crecimiento de los animales de ganadería, lo cual ocasionaría riesgos para la salud del consumidor; como problemas toxicológicos, efectos mutagénicos y carcinogénicos, cambios de su microbiota intestinal ocasionando un desequilibrio en el mantenimiento gastrointestinal, entre otros (2,3).

Pocos estudios han demostrado el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos o si lo han hecho no han utilizado métodos de referencia para su determinación. Por lo tanto, se considera relevante investigar la presencia y actividad de antimicrobianos en alimentos de consumo diario. Es así que se origina la pregunta de si la cocción podría tener un efecto reductor del nivel de restos de antimicrobianos, sin embargo, para demostrar ello, se debe utilizar métodos muy sensibles como la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Debido al efecto de la temperatura en la degradación de las moléculas de residuos de antimicrobianos, los niveles de residuos podrían ser menores en los alimentos cocidos (carne de pollo y res) en comparación a los no cocidos. Para ello, proponemos determinar la presencia de niveles de residuos de antimicrobianos pre y post cocción de los alimentos y la medición de actividad antimicrobiana mediante la técnica de HPLC y la técnica microbiológica de difusión en agar, respectivamente.

La presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos podría exponer a alergias, incremento de la resistencia antimicrobiana, entre otros, motivo por el cual el Codex Alimentarius y la Norma Sanitaria del Ministerio de Salud del Perú proponen valores máximos permitidos que serán empleados en el estudio.

Así, nosotros proponemos determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacina, medido por la técnica de técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y técnica microbiológica de difusión en agar.

El presente estudio busca contribuir en el entendimiento de la termoestabilidad de antimicrobianos presentes en los alimentos, asimismo pretende contribuir con los conocimientos sobre inocuidad y manejo de los alimentos que son frecuentemente consumidos por la población.

## **CAPÍTULO I. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.1. Situación problemática**

La resistencia antimicrobiana se considera como uno de los principales problemas de salud mundial según el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), ocasionando 2 millones de infecciones y 23,000 muertes en los Estados Unidos; es probable que en otras regiones del mundo esta información pueda ser igual o mayor, como por ejemplo en los países que se encuentran en vía de desarrollo (América Latina) subyaciendo bajo un creciente número de muertes y prolongadas estancias hospitalarias debido a las dificultades para tratar los patógenos de una manera efectiva (1).

Los residuos antimicrobianos en los alimentos de origen animal se deben al mal uso y abuso de estos, ocasionando diversos riesgos para la salud de los consumidores; como la producción de toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros (2).

La transmisión antimicrobiana en alimentos se desencadena por la exposición de los antibióticos que son ampliamente utilizados en la producción animal para prevenir y tratar enfermedades, así como para mejorar el rendimiento del crecimiento; el mayor riesgo debido al uso de antibióticos en la ganadería, para los seres humanos, es la creación de un ambiente que promueve la aparición de bacterias resistentes (3).

Para regular y asegurar la inocuidad alimentaria, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboraron las normas internacionales del Codex Alimentarius para los alimentos; en ello se determina el límite máximo de residuos antimicrobianos (4). En el ámbito nacional el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), regula la implementación de alternativas para reducir los residuos de antibióticos debido a su posible efecto tóxico en el consumo humano.

En la actualidad el rol de la cadena alimentaria en la dispersión y adquisición de la resistencia a antimicrobianos es muy importante en la salud pública. Así, Azañero y col. detectaron y cuantificaron los residuos antimicrobianos en tejidos musculares de pollo en cuatro mercados de Lima; obteniendo resultados positivos por pruebas microbiológicas y por el método de HPLC (5). Del mismo modo, Al-Mashhadany y col. determinaron la presencia de residuos de antibióticos en carne de res cruda en la ciudad de Erbil, en Irak, así como el impacto de la temperatura en los residuos de antibióticos; concluyendo que la presencia de residuos antibióticos en muestras de carne eran altos y su persistencia se reducía notablemente con la cocción (6).

Con relación a lo anterior se realizó un estudio con el objetivo de cuantificar los niveles de antibióticos por el HPLC en pollos comercializados en el mercado Bazurto, tiendas de barrio y supermercados de la ciudad de Cartagena en Colombia (7). Se obtuvo como resultado que todas las muestras sobrepasaron los límites máximos, excepto las que provenían de supermercados.

Los tipos de cocción son empleados para diversas preparaciones culinarias y estas pueden influenciar en la cantidad de residuos antimicrobianos que presente el alimento (8). Se han demostrado en algunos estudios que estos residuos se ven

disminuidos conforme al tipo de cocción, quedando productos de degradación que representan un riesgo para la salud de la persona que lo van a consumir (9).

Por lo expuesto, la presencia de residuos de antimicrobianos representa un riesgo, no solo por el aumento en la resistencia antimicrobiana sino también por los efectos tóxicos como consecuencia de la degradación de estos antibióticos sometidos a los procesos de cocción. El presente estudio busca determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacin.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuál es el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacin?

### **1.2.2. Problemas específicos**

¿Cuál es el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos presentes en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacin evaluados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)?

¿Cuál es el efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana presente en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacin evaluados por la técnica microbiológica de difusión en agar?

## **1.3. Justificación de la investigación**

En los países desarrollados, se ha evaluado previamente si los residuos de antibióticos pueden destruirse mediante procedimientos de cocción, pasteurización o procesos de enlatado (10,11). Tradicionalmente, la estabilidad térmica de los antibióticos se ha estudiado en base a un cambio en la concentración utilizando métodos de prueba microbiológicos. Sin embargo, se han realizado pocos estudios que evalúen la estabilidad térmica de los residuos de antimicrobianos utilizando métodos microbiológicos y por HPLC (10).

Se han publicado pocos reportes sobre el efecto de la cocción en la estabilidad de los residuos de antimicrobianos en carne, o los resultados no están claros (12). Estudios previos reportaron la presencia de residuos de neomicina en huevos, y estos fueron bastantes estables después de aplicar diferentes métodos de cocción, aunque los estudios son antiguos (13). El problema más importante de estos estudios es el instrumento utilizado para medir los residuos de antimicrobianos los cuáles generalmente se encuentran en niveles ínfimos en los alimentos. Por ello, es necesario una técnica con alta sensibilidad y especificidad para detectar los residuos. El estudio actual propone utilizar el HPLC la cuál es una de las técnicas de mejor calidad y alta eficiencia que asegura una detección mínima. Así el presente estudio podría contribuir en explicar el efecto de la temperatura sobre los residuos de antimicrobianos asegurando una detección mínima en las muestras procesadas, especialmente después del tratamiento de cocción.

Actualmente, los laboratorios de inocuidad alimentaria cuentan con equipamiento moderno para realizar pruebas de inocuidad y seguridad de los alimentos. Así, los equipos de HPLC están siendo utilizados en diferentes laboratorios en el Perú y en todo el mundo. Sin embargo, el potencial de estos instrumentos aún no ha sido explorados en distintos escenarios como el que se propone en el estudio de investigación. Las técnicas propuestas en el presente estudio son de fácil replicación y permitirán en un futuro sentar las bases para el análisis de termoestabilidad de diferentes antimicrobianos presentes en productos de consumo humano.

Una de las principales consecuencias del consumo de alimentos de origen animal con residuos de antimicrobianos es el aumento en el riesgo de trastorno de la microbiota intestinal, pudiendo ésta causar un desequilibrio, debido a que se considera crucial para la salud y bienestar, por sus funciones de: mantenimiento gastrointestinal e inmunológico, entre otros desórdenes metabólicos (14). Este efecto podría verse modificado según el tiempo y tipo de cocción al cual son sometidos los alimentos. Asimismo, el efecto de la cocción en los residuos de antimicrobianos podría generar sub productos tóxicos para el individuo (9).

Sin embargo, algunos estudios reportan que a pesar que el alimento sea sometido a algún proceso de cocción podrían contener residuos de antibióticos, pero esto varía según el método de detección. Por lo expuesto y con el fin de controlar la concentración inicial de residuos antimicrobianos en las muestras de carnes, es conveniente realizar un estudio de tipo experimental. En ese sentido, la presente tesis buscó conocer el efecto de dos tipos de cocción (hervido y microondas) sobre residuos de antibióticos medido por un método de alta sensibilidad y especificidad, asimismo determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de estos alimentos según su tiempo y tipo de cocción.

Según el Estatuto del Colegio de Nutricionistas del Perú: “el nutricionista, como profesional de las ciencias de salud, desarrolla acciones de evaluación en el campo de alimentación y control de calidad de recursos alimentarios y aseguramiento de la inocuidad alimentaria con el propósito de contribuir a la calidad de vida y bienestar de la población” (15), buscando el presente estudio contribuir con el conocimiento para establecer mejoras en la seguridad y salud de las personas a través de la calidad e inocuidad de los productos cárnicos.

#### **1.4. Objetivos de la investigación**

##### **1.4.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacin, medido por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y técnica microbiológica de difusión en agar, 2020.

##### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos presentes en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacin evaluados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

- Determinar el efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana presente en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacin evaluados por la técnica microbiológica de difusión en agar.

## **1.5. Hipótesis**

### **1.5.1. Hipótesis alterna**

- El nivel de residuos de antimicrobianos, medido por HPLC, es diferentes en los alimentos cocidos (carne de pollo y res) en comparación a los no cocidos.

### **1.5.2. Hipótesis nula**

- El nivel de residuos de antimicrobianos, medido por HPLC, es igual en los alimentos cocidos (carne de pollo y res) en comparación a los no cocidos.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Antecedentes de la investigación**

En la búsqueda de antecedentes tanto internacionales como nacionales, los artículos encontrados son del 2010 al 2019.

#### **2.1.1. Antecedentes internacionales**

##### **2.1.1.1. Antecedentes sobre residuos de antimicrobianos en productos cárnicos**

En la tesis de Acevedo en el 2015, el objetivo de su trabajo fue cuantificar los niveles de sulfametoxazol, norfloxacin, ciprofloxacino y lincomicina en pollo comercializado en el Mercado Bazurto, tiendas de barrio y supermercados de la ciudad de Cartagena en Colombia. Para este objetivo se obtuvieron 10 muestras al azar de cada sitio de procedencia, teniendo en total 30 muestras para el estudio. La cuantificación de residuos de antimicrobianos fue realizada por HPLC y los resultados fueron comparados con los niveles máximos permitidos del Codex Alimentarius. Finalmente, se obtuvo que el 100% de las muestras provenientes de mercados y tiendas de barrio sobrepasaron los niveles de residuos permitidos. Mientras que las muestras obtenidas de supermercados, fueron las que tenían los niveles más bajos de residuos permitidos, especialmente de sulfametoxazol y ciprofloxacina (7).

Ramatla y col. en el 2017, evaluaron los residuos de antibióticos en carne cruda utilizando diferentes métodos analíticos (ELISA, TLC y HPLC). Analizaron un total de 150 muestras de carne cruda de los puntos de venta para detectar residuos de ciprofloxacina, estreptomina, tetraciclina y sulfanilamida. En general, el análisis de ELISA para los niveles medios de residuos de ciprofloxacina y estreptomina estaban por encima del límite recomendado por el límite máximo de residuos (LMR) del Codex, mientras que el 3% de las muestras contenían residuos de múltiples fármacos (16).

Jammoul A. y col. en el 2019, realizaron una evaluación de residuos de antibióticos en muestras de carne de pollo en el Líbano. El objetivo de este estudio fue detectar los residuos de antibióticos de 80 muestras de pollo recolectadas en granjas ubicadas en diferentes regiones del Líbano. Se evaluaron 30 antibióticos de cuatro clases diferentes (sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas y betalactámicos) mediante el uso de cromatografía líquida-espectrometría de masas. La evaluación de los residuos de antibióticos en 80 muestras de músculos de pollo demostró que el 77,5% de las muestras estaban al menos contaminadas con residuos de antibióticos, de los cuales el 53,75% estaban expuestos a la coexistencia de residuos de múltiples fármacos, así mismo los niveles de residuos de sarafloxacin, amoxicilina y penicilina G estaban por encima del límite de residuo máximo recomendado (LMR) según la Comunidad Europea (17).

### 2.1.1.2. Antecedentes de efecto de cocción sobre residuos de antimicrobianos en productos cárnicos

Naoto Furusawa y col. en el 2000 demostraron el efecto de cocción en residuos de sulfonamida en músculo de pollo, a través de la prueba de HPLC. En este estudio se contó con 15 pollos adultos de seis semanas, de los cuales se dividieron en 4 grupos y se les brindó una dieta basal más una concentración de sulfonamida a 100mg/kg. Al séptimo día de alimentación fueron sacrificados y se procedieron a analizar las muestras. Los procesos de cocción fueron hervidos, asado y microondas. Se obtuvo como resultado que en el proceso de hervido se redujo entre 45% al 61% en 12 minutos y en asado entre 38% al 40%, al cocinar en el microondas se redujo entre 35% al 40% en 1 minuto (18).

Gratacós-Cubarsí y col. en el 2007, evaluaron residuos antimicrobianos de tetraciclina (TC) y anhidrotetraciclina (ATC) en pollo y carne de cerdo en diferentes condiciones de procesamiento térmico. Estos fueron sometidos al microondas y ebullición por diferentes tiempos, para determinar la cantidad de antibióticos se empleó la prueba de HPLC. Se encontró que los procedimientos térmicos de microondas y ebullición redujeron la concentración inicial de TC entre el 56% y 82%, lo cual puede confirmar la reducción en la concentración de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, mientras que los residuos de ATC no se vieron afectados. También se encontró que la actividad biológica de algunos antibióticos puede disminuir en un 12% a 50% después de cocinarlo a una temperatura de 50°C – 90°C por 20 minutos (19).

Espinosa-Plascencia y col. en el 2012, evaluaron el efecto del congelado y cocinado sobre residuos de oxitetraciclina (OTC) en camarón de cultivo. Los camarones fueron sometidos a una dieta con OTC de 5000 mg/kg por 14 días, posteriormente se realizó el tratamiento de congelación, hervido y frito por 3 minutos. Se determinó la reducción de OTC en un 29.72% por medio de la congelación, 36.3% por el hervido y 59.6% por el frito (20).

Vivienne y col. en el 2018, demostraron que el tostado y hervido redujeron significativamente la concentración de oxitetraciclina en la carne de aves en un 53.6%, asimismo demostraron que el microondas redujo la concentración de residuos en un 49.1%, sin embargo este último resultado no fue estadísticamente significativo (12).

Al-Mashhadany y col. en el 2019, detectaron la presencia de residuos de antibióticos en carne de res cruda en la ciudad de Erbil en Irak, así como el impacto de la temperatura en los residuos de antibióticos. Para ello recogieron un total de 250 muestras de mercados minoristas y las analizaron con técnicas microbiológicas en placas pre inoculadas con *Bacillus subtilis*. La incidencia global de residuos de antibióticos fue de 10,8%. La tasa más alta se detectó en enero (16,7%). La cocción durante treinta minutos desactiva completamente los residuos de antibióticos. En conclusión, la presencia de residuos antibióticos en muestras de carne en la ciudad de Erbil eran altos y su persistencia se reduce notablemente con la cocción (6).

## 2.1.2. Antecedentes nacionales

A nivel nacional, estudios previos han descrito la presencia de residuos de antimicrobianos en muestras de carne de pollo y res empleando el HPLC. Como por ejemplo en:

Una tesis realizada por Azañero en el año 2010, detectó y cuantificó el nivel de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima. Se empleó el método microbiológico de disco difusión de las cuatro placas, para posteriormente cuantificarlos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Obtuvieron resultados positivos por HPLC demostrando que los niveles sobrepasaron el límite máximo de residuos (LMR) para sulfametoxazol en 75% de las muestras (mayor a 100ug/Kg de músculo), para norfloxacino en 100% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo) y para ciprofloxacino en 50% de las muestras (mayor a 100 ug/Kg de músculo) (5).

En la tesis de Albújar en el 2015, el objetivo fue determinar la presencia de residuos de antimicrobianos (tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim y gentamicina) en hígados de pollo comercializados en el mercado modelo de Piura, mediante el método microbiológico de las tres placas. Las muestras obtenidas fueron sembradas en placas con *Bacillus subtilis* y ajustado a diferentes Ph. Se encontró que 68 hígados (34,69%) resultaron positivos, 22 hígados (11,22%) resultaron negativos y 106 hígados (54,08%) resultaron sospechosos a la prueba, concluyendo que los hígados de pollo que se expenden en el mercado de Piura presentan residuos de antimicrobianos. Se encontraron con más frecuencia Tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim y Gentamicina (21).

En la tesis de Villalobos en el 2018, determinaron la presencia de enrofloxacina en carne de pollo adquirida del mercado La Hermelinda, en Trujillo. Para ello, analizaron 25 muestras de carne (pechuga de pollo) para presencia de residuos de enrofloxacina mediante la técnica de ELISA. Finalmente, encontraron que el 58% de todas las muestras tenían residuos de antimicrobianos, detectándose hasta un máximo de 41.20 µg/kg en algunas muestras. Sin embargo, y tomando como referencia los valores de la Norma Técnica de Salud N° 120-MINSA/DIGESA-V.01, los niveles de residuos detectados se encontraban dentro de los límites permitidos para consumo (22).

Mediante la revisión bibliográfica a nivel nacional podemos concluir que no se han realizado estudios a cerca del efecto de la cocción sobre los residuos antimicrobianos en muestras de pollo y res.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Resistencia a los antimicrobianos**

La resistencia antimicrobiana se origina cuando los microorganismos como bacterias, hongos, virus o parásitos cambian y esto ocasiona que ciertos fármacos usados en el tratamiento para infecciones sean ineficaces. Los microorganismos que resisten la mayoría de antibióticos se les conoce como ultrarresistentes (23).

#### **2.2.1.1. ¿Cómo se produce la resistencia antimicrobiana?**

La resistencia a los antimicrobianos es un proceso que parece de forma natural que en su mayoría se deben por modificaciones genéticas. El principal problema de esta resistencia es que ciertos factores pueden acelerarlos como: el mal uso y/o abuso de los antimicrobianos, debido a que no hay una correcta administración para tratar infecciones víricas, también se emplean como estimulantes del crecimiento de animales o como dosis profiláctica para prevenir enfermedades (23).

### **2.2.2. Principales tipos de antibióticos usados**

#### **2.2.2.1. Tetraciclinas**

Poseen actividad antimicrobiana por su unión a la subunidad 30s de los ribosomas de microorganismos sensibles. A concentraciones terapéuticas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro inhibiendo el crecimiento de una extensa variedad de bacterias, protozoos y muchos organismos intracelulares tales como *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Rickettsia spp.* (24). Entre las tetraciclinas disponibles y más usadas en avicultura a nivel nacional tenemos oxitetraciclinas. Asimismo, algunos tipos de tetraciclinas pueden ser usadas también como promotor del crecimiento y se administra por medio del alimento o del agua de bebida (25).

La oxitetraciclina (OTC) es una sustancia producida por el crecimiento de ciertas cepas bacterianas. La OTC es un polvo cristalino de color amarillo poco soluble en agua, se puede disolver en mediante soluciones ácidas o básicas; así mismo se clasifica por liposolubilidad como hidrosoluble que presenta una absorción oral disminuida (10).

#### **2.2.2.2. Quinolonas**

Su principal mecanismo de acción se encuentra medido por su capacidad de interacción con la enzima bacteriana girasa del ácido desoxirribonucleico (ADN-22 girasa) que es responsable de permitir el enlace circular de las cadenas del ADN enrollado, para que el cromosoma sea organizado dentro de la célula bacteriana (26). Estas son bactericidas que poseen una buena actividad frente a la mayoría de bacterias gramnegativas, especialmente de la familia *Enterobacteriaceae*, y sensibilidad variable frente a grampositivas (27).

La enrofloxacin es una quinolona de tercera generación. Este antibiótico es de amplio espectro, y es de uso exclusivo en veterinaria para el tratamiento y control de enfermedades en animales de granja (por ejemplo, bovinos, porcinos, etc.) y

en animales de compañía (perros y gatos). La enrofloxacin también es considerada una fluoroquinolona.

### **2.2.3. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los antimicrobianos**

La temperatura es uno de los factores más importantes que pueden alterar la estabilidad de los antimicrobianos. Las constantes de velocidad de reacción dependen de la temperatura las cuáles se duplican o triplican cada vez que aumenta la temperatura, causando una degradación constante de las moléculas presentes. Así, el aumento de temperatura puede causar pérdida de estabilidad y de acción de la actividad antimicrobiana o pérdida de la capacidad de actividad farmacológica (28).

Mediante el microondas se emite irradiación electromagnética de longitud de onda desde un magnetrón y ondas electromagnéticas, las cuales se dirigen de manera directa a los alimentos produciendo un calentamiento rápido y desigual, a menos que el producto sea pequeño (18).

Sobre el uso y consumo de alimentos, la cocción implica un aumento progresivo de temperatura y es uno de los factores más importantes que influyen en la degradación de antimicrobianos presentes en estos alimentos (28).

### **2.2.4. Métodos analíticos utilizados en la detección de residuos de antibiótico**

#### **2.2.4.1. Métodos microbiológicos**

Los métodos de *screening* se establecen en el cultivo de un microorganismo en agar que tiene resistencia o sensibilidad frente a uno o varios antibióticos que se encuentran como residuos en los tejidos de origen animal o en sus productos. Se permite detectar la presencia de numerosos compuestos antimicrobianos, pero carece de especificidad, ya que no distingue entre sustancias de una misma familia terapéutica y tampoco son apropiados para la detección de compuestos sin actividad microbiana (29).

Los factores que pueden ocasionar alteraciones en los resultados en la prueba microbiológica son: la concentración del inóculo, el pH y espesor del medio, el tiempo de incubación y temperatura (30).

#### **2.2.4.1.1. Bacterias usadas en métodos microbiológicos**

El límite de detección de la prueba microbiológica para determinar antimicrobiano depende en su mayoría de la sensibilidad innata de la bacteria usada (31). En la presente investigación se empleará la bacteria *Bacillus subtilis*, la cual se ha utilizado en diversos estudios por su sensibilidad a una amplia gama de antibióticos, y por su disponibilidad comercial.

#### **2.2.4.1.2. Pruebas de difusión agar**

Las pruebas de difusión en agar son métodos clásicos en microbiología que consiste en medir un halo de inhibición alrededor de la muestra problema. El fundamento es descrito a continuación:

#### 2.2.4.1.2.1. Formación de una zona de inhibición

En las pruebas de difusión en agar, este se inocula en forma estandarizada, y la muestra se coloca en su superficie. Durante las primeras horas de difusión, la concentración de los antimicrobianos en el borde de la muestra es relativamente alta y disminuye drásticamente conforme se aleja de la muestra (32). El resultado de una prueba de inhibición es el resultado de una carrera entre la propagación de los antimicrobianos por difusión y el crecimiento de los organismos en la prueba (33).

#### 2.2.4.1.2.2. Composición del medio de cultivo y pH

Se ha determinado que el pH del medio afecta la actividad de ciertos antimicrobianos por ese motivo en la tabla 1, se menciona que tipo de microorganismo y que pH es óptimo para una adecuada detección de antibióticos en las muestras.

**Tabla 1:** Composición del medio de cultivo y pH. Tabla tomada de Azañero y col. (5)

Grupos de inhibidores	Microorganismos	pH del medio (a 37° C)
Penicilina y tetraciclina	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	6.0
Sulfonamidas	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	7.2
Aminoglucósidos	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	8.0
Macrólidos	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9341	8.0

#### 2.2.5. Riesgo del uso de antimicrobianos en la salud pública

El uso masivo e indefinido de antibióticos conlleva a consecuencias negativas como la generación de cepas bacterianas resistentes (34) y la presencia de residuos en los productos de consumo humano, sobretodo en leche y carne (35).

Los residuos antimicrobianos en alimentos comprenden una variedad de riesgos para la salud humana. Estos riesgos dependen de la frecuencia y grado de la exposición que tenga la persona al alimento (36).

##### 2.2.5.1. Reacciones de hipersensibilidad

En su mayoría las bajas concentraciones de antibióticos alergénicos, ejemplo los  $\beta$  lactámicos no alcanzan sensibilizar pacientes, sin embargo pueden haber excepciones; si alcanzarán a desencadenar reacciones que en lo general no son graves, eventualmente, pueden llegar a serlo (anafilaxia) (37).

Es importante mencionar que los  $\beta$  lactámicos como la penicilina amoxicilina-cloxacilina y cefalosporinas, debido a que el 10% de la población manifiesta reacciones de hipersensibilidad cuando son expuestos a estos medicamentos, aún en escasas concentraciones (38).

### **2.2.5.2. Problemas toxicológicos**

Los problemas toxicológicos son complicados de comprobar debido a las bajas concentraciones residuales de estas drogas. El riesgo de toxicidad directa de antibióticos o sus metabolitos en el tejido animal es bajo (39).

Los derivados fenícolos, tianfenicol y florfenicol, pueden generar algún tipo de mielosupresión dosis dependiente, que conlleva a suprimir el tratamiento o la dosis; no son capaces de producir anemia aplásica que puede producir el cloranfenicol, por ese motivo el cloranfenicol ha sido prohibido en algunos países (37).

### **2.2.5.3. Cambios en la microbiota intestinal**

Según la OMS menciona que el riesgo de trastorno de la microbiota por presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos es baja (36). Las bacterias que se encuentran presentes en el intestino actúan como barrera para que las bacterias patógenas no se implanten y desencadenan una enfermedad, sin embargo, los antibióticos pueden disminuir la cantidad total de las bacterias o matar selectivamente algunas especies importantes (36).

### **2.2.5.4. Resistencia bacteriana por el uso de antimicrobianos en alimentos**

En su mayoría se emplean la misma clase de antibióticos en animales y humanos, en algunas ocasiones se le añade a sus alimentos y agua para promover el crecimiento. La exposición a dosis bajas o subterapéuticas de antibióticos presenta mayor probabilidad de generar resistencia a comparación de las dosis para tratamiento o prevención de infecciones en animales productores de alimentos (39).

Esta resistencia puede ocasionar fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre o a los genes que son portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (39). ocasionando que las infecciones por bacterias patógenas resistentes requieren un tratamiento más difícil y a la vez más caro, por ese motivo es un problema de salud pública y de sanidad animal; de igual manera como una carga económica (37).

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Tipo de estudio y diseño de la investigación**

El presente estudio es de tipo experimental (40), debido que se tuvo control directo de la variable cocción y se midió si esta influye en el nivel de residuos de antimicrobianos. El enfoque del estudio es de tipo cuantitativo debido a la naturaleza y manejo de las variables, además se midieron las variables en un determinado contexto y se analizaron las mediciones obtenidas utilizando métodos estadísticos para llegar a las conclusiones. El alcance es de tipo explicativo porque está dirigido a responder por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiestan (40). Los residuos de antimicrobianos fueron identificados por la técnica microbiológica de difusión en agar y HPLC en productos de carne de pollo y res, en muestras compradas de tres de los mercados tradicionales más grandes y frecuentados de Lima metropolitana.

### **3.2. Población y muestra**

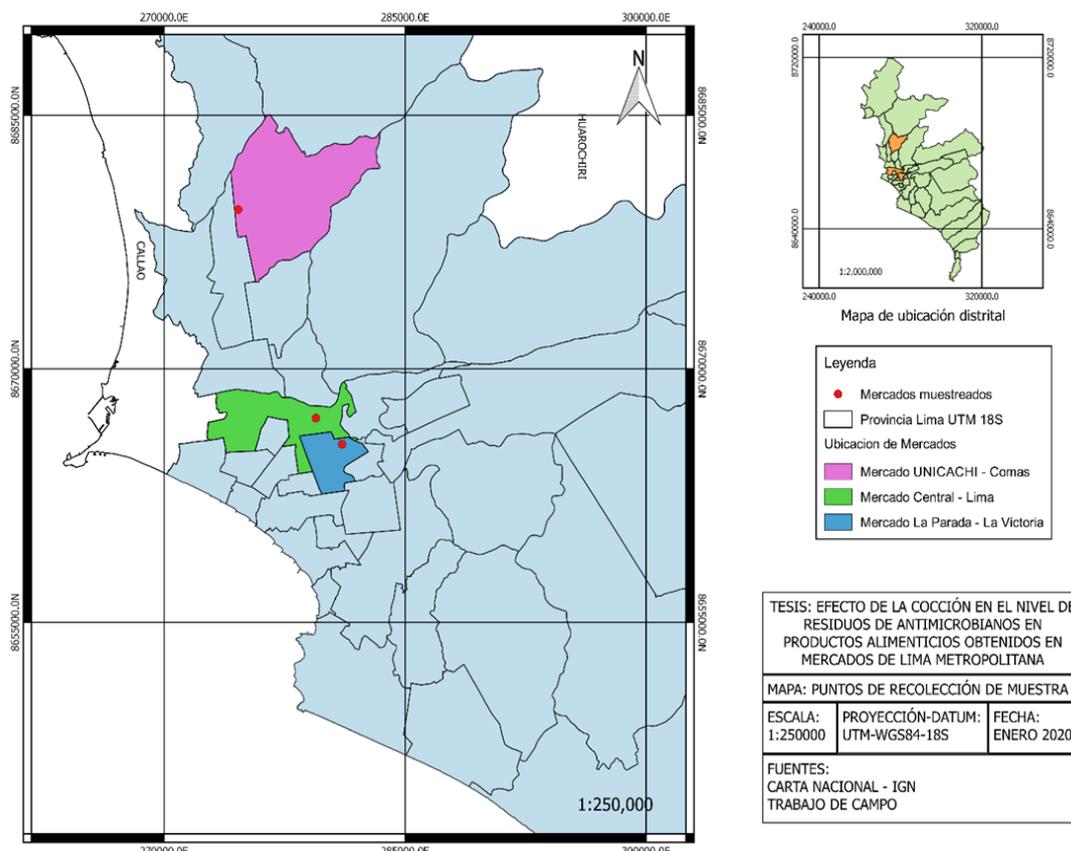
#### **3.2.1. Tamaño de la muestra**

Asumiendo un intervalo de confianza del 95%, un poder de estudio del 80%, una diferencia mínima esperada post cocción o entre carnes de pollo y res del 30% o más, que es lo que se ha reportado previamente en la literatura para presencia de antimicrobianos en carnes con y sin cocción. Se estimó que se requerían un mínimo de 12 muestras de carne pollo y 12 de res para realizar los experimentos.

#### **3.2.2. Selección del muestreo**

El presente estudio al ser un estudio de tipo experimental, no aplicó un tipo de muestreo. Para adquirir los especímenes que fueron utilizados en el presente estudio, se recolectaron 30 especímenes de carne de pollo y 30 de res, adquiridos de tres mercados tradicionales de Lima. La ubicación y distribución de compra se muestra en la Figura 1. Del total de especímenes recolectados, se seleccionó 6 de cada tipo (pollo y res) que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión, mencionados en la sección 3.1.3.

**Figura 1.** Puntos de recolección de muestras de carne en Lima Metropolitana.



### 3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

#### 3.2.3.1. Criterios de inclusión

- Productos de carne de pollo o res del día, conservando sus características organolépticas.
- Productos adquiridos en mercados de Lima Metropolitana.
- Para los experimentos, las muestras de res y pollo deben ser negativos a residuos de oxitetraciclina (OTC) y enrofloxacina (ENR) por HPLC.

#### 3.2.3.2. Criterios de exclusión

- Productos cárnicos congelados.

### 3.3. Variables

#### 3.3.1. Definición conceptual y operacionalización de variables

Para el presente estudio, se trabajaron con dos variables dependientes que se clasificaron como cuantitativas continuas. Las cuales fueron, residuos de antimicrobianos que se determinó mediante HPLC dando valores finales en ug/kg y la variable actividad antimicrobiana de los alimentos con residuos de antimicrobianos se identificó por la técnica microbiológica de difusión de agar obteniendo un halo de inhibición en mm (Anexo N°1).

### **3.4. Plan de recolección de datos e instrumentos**

A continuación, se detalla el plan de recolección, los instrumentos y el procesamiento de las muestras.

#### **3.4.1. Plan de recolección de datos**

El esquema general de recolección y manejo de las muestras se detallan en el Anexo N°2. Brevemente se describe los procedimientos los cuales incluyeron:

##### **Tiempo 1.** Obtención y transporte de la muestra.

- Se recolectaron muestras de carne de res y pollo en los mercados tradicionales del norte como Unicachi de Comas, Caquetá de San Martín de Porres y del centro La Parada de La Victoria.
- Las muestras fueron transportadas en bolsas estériles a 4°C hasta las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur en Villa El Salvador para su posterior procesamiento.

##### **Tiempo 2.** Preparación de materiales.

- Para la técnica de HPLC, se preparó el Buffer McIlvaine. Para ello se empleó 13.805 g de fosfato de sodio y 4.656 g de ácido cítrico. Estos se diluyeron en 500 ml de agua destilada y se ajustó a un pH de 5.
- Para la elaboración de la fase móvil se adicionó 40 ml de ácido oxálico, 2.5ml de metanol y 7.5 ml de acetonitrilo.
- Para el método de cribado microbiológico se preparó placas Petri con agar Mueller Hinton según la metodología propuesta por Azañero (5). Brevemente, en tres envases con 400 ml de agua destilada se disolvió 15.2 gramos de agar, los cuales se ajustaron a un pH 6.0 y 8.0; luego se autoclavó a 121°C durante por 15 minutos. Finalmente, se procedió a plaquear el medio en placas Petri en la cámara de flujo laminar para asegurar su esterilidad (Anexo N°3).

##### **Tiempo 3.** Preparación de las muestras.

- Todas las muestras de pollo y res fueron analizadas por HPLC para determinar la presencia de residuos antimicrobianos. Procedimiento explicado en el “Tiempo 4”.
- Tres muestras negativas a residuos antimicrobianos confirmados mediante HPLC fueron contaminadas de manera experimental con OTC y ENR. Para ello, en 40g de carne previamente molida de pollo o res se le adicionó 0.25mg de OTC o ENR respectivamente para las pruebas por HPLC y de 1mg de OTC o ENR para la técnica microbiológica de difusión en agar (ver más adelante en “Tiempo 5”). La mezcla se dejó en reposo por 24h en refrigeración a 4°C hasta su uso (Anexo N°4).
- Posteriormente las muestras fueron sometidas a la cocción de acuerdo al protocolo propuesto por Gratacaos y col (19). Brevemente, se pesó 10 gramos de muestra y fueron colocadas en tubos Falcon® de 50ml para realizar las cocciones correspondientes. Se hirvió cada tubo con muestra durante 9 y 12 minutos (para los experimentos con HPLC) y 9, 12 y 20 minutos (para la técnica microbiológica de difusión en agar) a baño María con una temperatura constante de 100°C. Adicionalmente, un tubo muestra fue sometido al microondas (500W) durante 30 segundos. Después se procedió a enfriar las muestras en el congelador por 10 minutos. En cada tubo se adicionó 30 ml de buffer McIlvaine y se procedió a sonicar por 30 minutos. Se adicionó a cada tubo 10 ml de etanol y se volvió a sonicar por 2

minutos. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, se centrifugó cada tubo por 5 minutos a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) y se procedió a recolectar el sobrenadante mediante filtración por succión (Anexo N°5).

#### **Tiempo 4.** Determinación de nivel de residuos de antimicrobianos por HPLC.

- Para el HPLC, se acondicionaron las columnas con 15 ml de metanol y 15 ml de agua destilada para activarlas. Se procedió a cargar las muestras con el sobrenadante, posteriormente fueron lavadas con 7 ml de buffer McIlvaine y 7 ml de agua destilada, se eluyó con 5 ml de metanol y por último se secó lo eluido en baño María (Anexo N°6).
- Se reconstituyó con 1 ml de la fase móvil, preparada previamente, y se sonó por 1 minuto. Posteriormente se recolectó lo reconstituido con ayuda de una jeringa de tuberculina para ser trasladado a un vial de 1 ml procediendo a la lectura mediante el equipo de HPLC (Anexo N°7).

#### **Tiempo 5.** Actividad antimicrobiana de productos alimenticios con residuos de antimicrobianos.

- Para determinar la actividad antimicrobiana de productos alimenticios con residuos de antimicrobianos se utilizó la metodología propuesta por Azañero (5) (5). Brevemente, en la cámara de flujo laminar, una vez solidificado el agar se sembró el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y se pesó 2 gramos de la muestra de carne de res y pollo previamente cocinada. Se colocó la muestra en la placa y se incubó por 24 horas a 37°C. La lectura fue realizada mediante la medición del halo de inhibición (Anexo N°8).

### **3.4.2. Instrumentos**

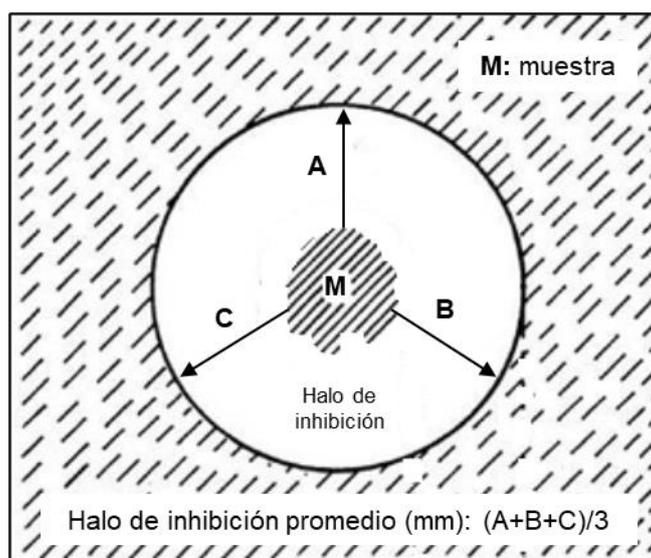
Para medir la presencia de residuos de antimicrobianos se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) mediante el método propuesto por Acevedo (7). Para ello, se tuvo en cuenta las condiciones cromatográficas las cuales varían según el tipo de antibióticos. Primero las muestras pasaron por un proceso de purificación con el buffer MacIlvaine que estuvo en un pH 5, este proceso consiste en que a cada muestra se le adicionó en un tubo Falcon® 30 ml de este buffer, se pesaron todos los tubos para que sean homogéneos, después fueron llevados al equipo de sonicación para romper las interacciones intermoleculares, seguidamente se pasaron por la centrifuga por 5 minutos a 5,000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se pasó por un cartucho de extracción de fase sólida C-18, previamente acondicionada para la recolección del antibiótico y su filtración. La extracción del analito en el cartucho fue realizada por elución con 5 ml de metanol.

La solución de metanol se filtró e inyectó en el equipo de cromatografía. El instrumento utilizado para detectar los residuos de antimicrobianos fue el cromatógrafo 1260 Infinity II LC con detector de diodos (HPLC-DAD). El HPLC es una de las técnicas con la más alta eficiencia y sensibilidad en la detección de residuos de antimicrobianos en muestras de alimentos.

Para medir la variable actividad antimicrobiana de alimentos se realizó la técnica microbiológica de difusión en agar (5). Para ello, se colocó en una placa petri un medio nutritivo (agar Müller-Hinton) sólido con un microorganismo sensible a los antimicrobianos (*Bacillus subtilis*), sobre este medio se colocó un trozo de muestra de 2 gramos con antibióticos con y sin cocción, posteriormente la placa se incubó a la temperatura de desarrollo óptima del microorganismo por un periodo de 16 horas. Las

muestras con residuos de antimicrobianos inhibieron el desarrollo de los microorganismos con lo cual se observó una zona de inhibición alrededor de la muestra; obteniendo como resultado el halo de inhibición (Figura 2). Es importante mencionar que el medio utilizado (Müller Hinton) es considerado el mejor para la prueba de sensibilidad; teniendo en cuenta para su preparación la dilución de la base deshidratada que varía de acuerdo a cada fabricante, el pH se determinó después de la solidificación del agar y se ajustó a 6.0 y 8.0 a temperatura ambiente; y se procedió a sembrar una bacteria sensible a todos los antimicrobianos (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) a una concentración de 0.5 McFarland.

**Figura 2.** Determinación del halo de inhibición formado alrededor de la muestra de carne contaminada.



Para el presente estudio, las tesis tuvieron un periodo de entrenamiento de 2 meses que se realizó en paralelo durante la compra de productos cárnicos. El entrenamiento fue guiado por un químico y una microbióloga y consistió en conocer el funcionamiento del HPLC, preparación de insumos como buffer McIlvaine, fase móvil, dilución de los antimicrobianos (OTC y ENR), recolección del antimicrobiano por las columnas de extracción de fase sólida (acondicionamiento, carga de muestras, lavado o limpieza y elución) y además la técnica microbiológica de difusión en agar; preparación del agar Müller-Hinton, bacteria *Bacillus subtilis* a una concentración de 0.5 McFarland y modificación de pH. A pesar del entrenamiento las tesis siempre contaron con el acompañamiento de dichos profesionales para el momento de lectura e interpretación de los resultados.

### 3.5. Plan de análisis e interpretación de la información

Los datos recolectados fueron ingresados a una base de datos en Microsoft Excel y posteriormente analizados mediante el programa estadístico de Stata® versión 14.0. El análisis descriptivo de las variables cuantitativas continuas residuos de antimicrobianos y actividad antimicrobiana de los alimentos con residuos de antimicrobianos fueron determinadas por el promedio  $\pm$  DS. Los datos obtenidos fueron evaluados por la prueba de Shapiro-Wilk, demostrando no cumplir con una distribución normal, por lo que se optó por una prueba no paramétrica para el análisis bivariado. Así, para la comparación de las concentraciones de antimicrobianos y de halos de inhibición bacteriana entre tipo de muestras se utilizó la prueba estadística U de Mann Whitney. Por último, se consideró

una diferencia estadísticamente significativa a un  $p < 0.05$  y no significativas a un valor de  $p \geq 0.05$ .

### **3.6. Ventajas y limitaciones**

Una de las ventajas del estudio, es que se empleó una prueba altamente específica para determinar el nivel de residuos de antimicrobianos: HPLC. Adicionalmente, se midió la actividad antimicrobiana de las muestras con residuos antimicrobianos, es decir si la muestra realmente tenía un efecto antimicrobiano *in vitro* frente a bacterias sensibles (*Bacillus subtilis*). Para esto último, la presente investigación contó con el uso de una técnica microbiológica de difusión en agar que determinó el halo de inhibición. Una de las limitaciones más importantes fue el costo de la prueba por ese motivo el tamaño de muestras fue limitado y ajustado a los recursos propios del laboratorio que financió el trabajo.

### **3.7. Aspectos éticos**

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, ver Reg: CE-507 (Anexo N°10). En todo momento se mantuvo el anonimato de los puestos de expendio y de los vendedores que participaron en el estudio.

El estudio tuvo como unidad de análisis a las muestras de carnes compradas en los establecimientos. No se requirió ningún tipo de participación ni de información de los vendedores. Al no involucrar sujetos humanos en el estudio de investigación no se utilizó ningún tipo de consentimiento informado.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Entre el periodo del 20 y 30 de diciembre del 2019 se recolectaron 30 especímenes de carne de res y 30 especímenes de carne de pollo, de tres mercados de Lima Metropolitana. Si bien no fue el objetivo del estudio de estimar la frecuencia (proporción) de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos, es interesante resaltar que todos los especímenes que fueron analizados por HPLC fueron negativos para los residuos OTC y ENR.

Los especímenes de carne y pollo sirvieron para los experimentos de contaminación con residuos de antimicrobianos obteniendo los siguientes resultados:

### **Resultado 1. Efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en carne de pollo evaluado por HPLC.**

En las muestras de carne de pollo, las concentraciones de OTC y ENR fueron significativamente mayores en las muestras no cocidas (tiempo 0) en comparación con las muestras hervidas o expuestas al microondas (Tabla 2). Esta diferencia fue mayor conforme se incrementó el tiempo de cocción: porcentaje de reducción a los 12 minutos de 60.8% y 63.04% para residuos de OTC y ENR respectivamente.

**Tabla 2.** Efecto del tiempo de cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en carne de pollo medido por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (min)	OTC <sup>(1)</sup>			ENR <sup>(2)</sup>		
		C <sup>(3)</sup> (µg/kg)	R <sup>(4)</sup> (%)	Valor p <sup>(5)</sup>	C <sup>(3)</sup> (µg/kg)	R <sup>(4)</sup> (%)	Valor p <sup>(5)</sup>
<b>Hervido</b>	0	6250.00 ± 0.00	0	Referencia	6250.00 ± 0.00	0	Referencia
	9	4202.64 ± 1218.05	32.76	0.0369	4319.09 ± 196.27	30.89	0.0369
	12	2449.69 ± 665.95	60.8	0.0369	2309.1 ± 117.99	63.04	0.0369
<b>Microondas</b>	0.5	3648.56 ± 930.67	41.62	0.0369	1411.55 ± 117.46	77.42	0.0369

<sup>(1)</sup> Oxitetraciclina, <sup>(2)</sup> Enrofloxacina, <sup>(3)</sup> Concentración (promedio de concentración ± DS), <sup>(4)</sup> Reducción, <sup>(5)</sup> Prueba de U de Mann Whitney.

### **Resultado 2. Efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en carne de res evaluado por HPLC.**

En las muestras de carne de res, las concentraciones de OTC y ENR fueron significativamente mayores en las muestras no cocidas (tiempo 0) en comparación con las muestras hervidas (Tabla 3). Esta diferencia fue mayor conforme se incrementó el tiempo de cocción: porcentaje de reducción a los 12 minutos de 55.15% y 54.21% para residuos de OTC y ENR respectivamente. Las muestras expuestas al microondas presentaron una reducción de más de 60% de residuos de antimicrobianos, sin embargo, no se pudo calcular diferencia estadística debido al pequeño número de muestras (n=2) de cada experimento.

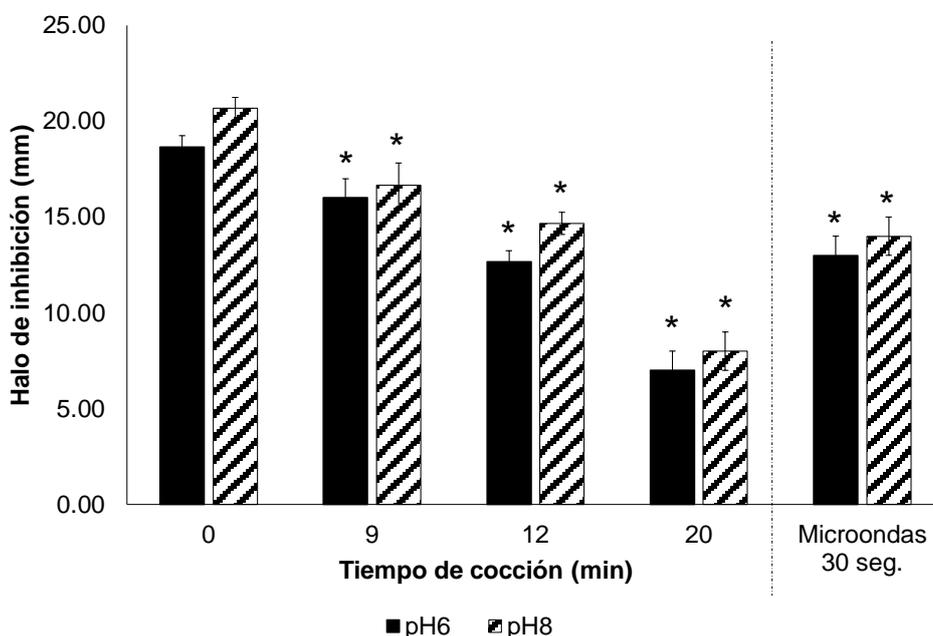
**Tabla 3.** Efecto del tiempo de cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en carne de res medido por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (min)	OTC <sup>(1)</sup>			ENR <sup>(2)</sup>		
		C <sup>(3)</sup> (µg/kg)	R <sup>(4)</sup> (%)	Valor p <sup>(5)</sup>	C <sup>(3)</sup> (µg/kg)	R <sup>(4)</sup> (%)	Valor p <sup>(5)</sup>
<b>Hervido</b>	0	6250.00 ± 0.00	0	Referencia	6250.00 ± 0.00	0	Referencia
	9	5283.49 ± 293.54	15.46	0.0369	4988.00 ± 563.07	20.19	0.0369
	12	2803.11 ± 127.87	55.15	0.0369	2861.67 ± 98.65	54.21	0.0369
<b>Microondas</b>	0.5	2353.65 ± 910.53	62.34		1935.47 ± 61.35	69.03	

<sup>(1)</sup> Oxitetraciclina, <sup>(2)</sup> Enrofloxacin, <sup>(3)</sup> Concentración (promedio de concentración ± DS), <sup>(4)</sup> Reducción, <sup>(5)</sup> Prueba de U de Mann Whitney.

### **Resultado 3.** Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de carne de pollo con enrofloxacin.

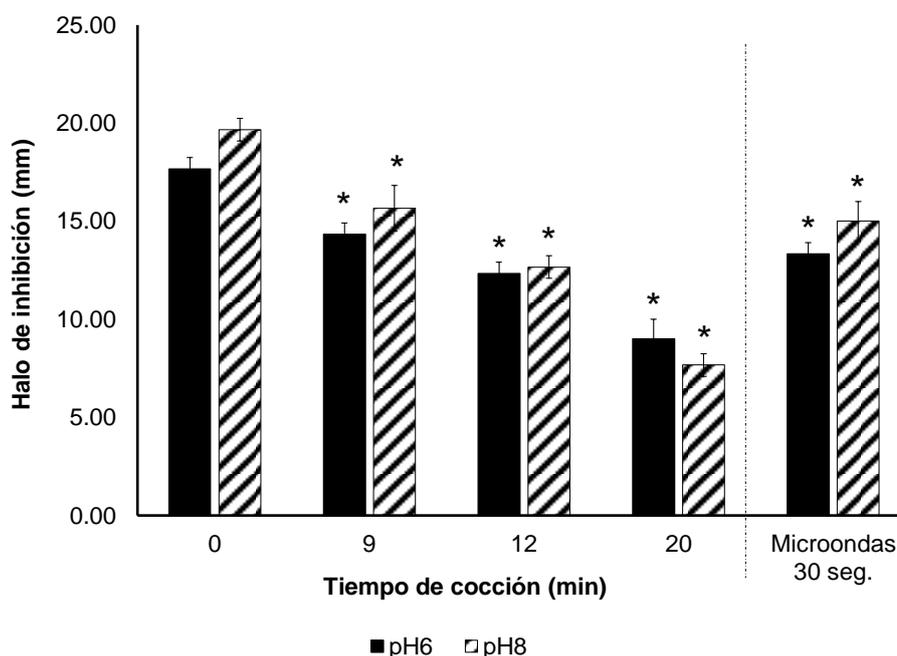
Para ENR en muestras de carne de pollo: en muestras realizadas con pH de 6, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 0.0463$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0463$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos ( $p = 0.0463$ ). En muestras realizadas con pH de 8, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 0.0431$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0463$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos ( $p = 0.0463$ ) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Efecto del tiempo de cocción en la actividad antimicrobiana de carne de pollo con enrofloxacin (1mg). Actividad antimicrobiana de la carne de pollo con ENR frente a *Bacillus subtilis* mediante la técnica de difusión en agar bajo dos condiciones: agar Muller-Hinton a pH 6 y a pH 8. Cada barra representa un promedio de 3 experimentos ± DS. El asterisco (\*) representa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para la comparación entre las barras de un tiempo de cocción  $\geq 9$  minutos mediante hervido y la cocción mediante microondas versus la muestra sin cocción (0 minutos), mediante la prueba U de Mann Whitney.

#### **Resultado 4. Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de carne de res con enrofloxacin.**

Para ENR en muestras de carne de res: en muestras realizadas con pH de 6, el halo de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 0.0431$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0463$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos ( $p = 0.0431$ ). En muestras realizadas con pH de 8, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 0.0431$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0431$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos ( $p = 0.0463$ ) (**Figura 4**).

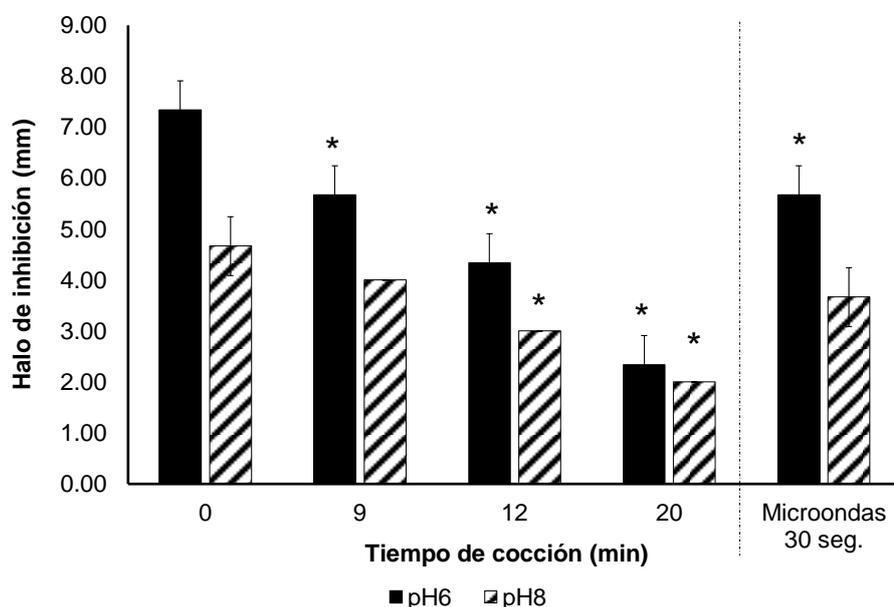


**Figura 4. Efecto del tiempo de cocción en la actividad antimicrobiana de carne de res con enrofloxacin (1 mg).** Actividad antimicrobiana de la carne de pollo con ENR frente a *Bacillus subtilis* mediante la técnica de difusión en agar bajo dos condiciones: agar Muller-Hinton a pH 6 y a pH 8. Cada barra representa un promedio de 3 experimentos  $\pm$  DS. El asterisco (\*) representa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para la comparación entre las barras de un tiempo de cocción  $\geq 9$  minutos mediante hervido y la cocción mediante microondas versus la muestra sin cocción (0 minutos), mediante la prueba U de Mann Whitney.

#### **Resultado 5. Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de carne de pollo con oxitetraciclina.**

Para OTC en muestras de carne de pollo: en muestras realizadas con pH de 6, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 0.0431$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0431$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos ( $p = 0.0431$ ). En muestras realizadas con PH de 8, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0.1138$ ), 12 minutos ( $p = 0.0339$ ), 20 minutos ( $p = 0.0339$ ), así como de las que fueron colocadas en el

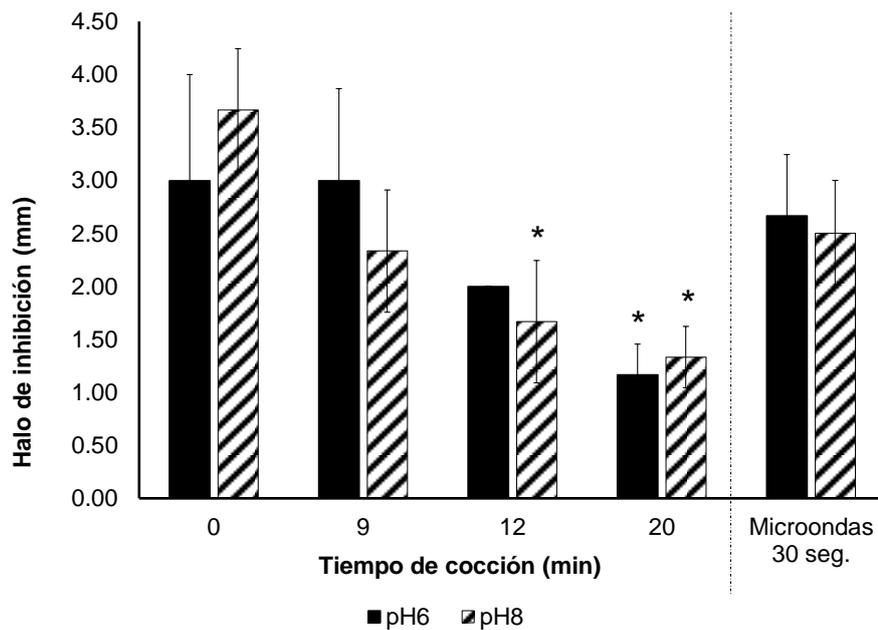
microondas por 30 segundos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0.0990$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Efecto del tiempo de cocción en la actividad antimicrobiana de carne de pollo con oxitetraciclina (1mg).** Actividad antimicrobiana de la carne de pollo con OTC frente a *Bacillus subtilis* mediante la técnica de difusión en agar bajo dos condiciones: agar Muller-Hinton a pH 6 y a pH 8. Cada barra representa un promedio de 3 experimentos  $\pm$  DS. El asterisco (\*) representa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para la comparación entre las barras de un tiempo de cocción  $\geq 9$  minutos mediante hervido y la cocción mediante microondas versus la muestra sin cocción (0 minutos), mediante la prueba U de Mann Whitney.

#### **Resultado 6. Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de carne de res con oxitetraciclina.**

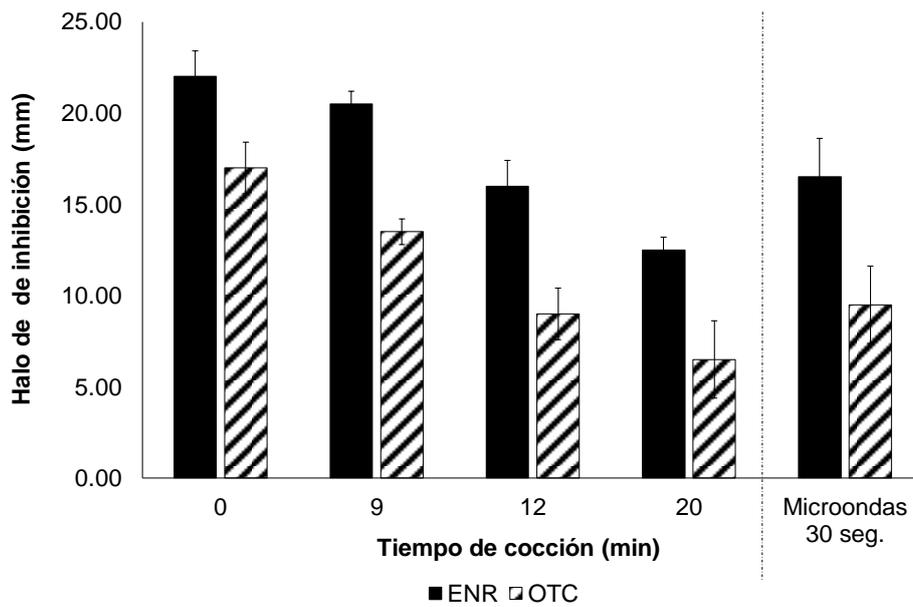
Para OTC en muestras de carne de res: en muestras realizadas con PH de 6, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue similar al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos ( $p = 1.0000$ ), y mayor a las que fueron hervidas 12 minutos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0.1213$ ), 20 minutos ( $p = 0.0463$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0.6374$ ). En muestras realizadas con pH de 8, el halo de inhibición de las muestras antes de ser hervidas fue mayor al halo de inhibición de las que fueron hervidas 9 minutos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0,0679$ ), 12 minutos ( $p = 0.0431$ ), 20 minutos ( $p = 0.0431$ ), así como de las que fueron colocadas en el microondas por 30 segundos (diferencia no estadísticamente significativa,  $p = 0.0722$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Efecto del tiempo de cocción en la actividad antimicrobiana de carne de res con oxitetraciclina (1mg).** Actividad antimicrobiana de la carne de pollo con OTC frente a *Bacillus subtilis* mediante la técnica de difusión en agar bajo dos condiciones: agar Muller-Hinton a pH 6 y a pH 8. Cada barra representa un promedio de 3 experimentos  $\pm$  DS. El asterisco (\*) representa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para la comparación entre las barras de un tiempo de cocción  $\geq 9$  minutos mediante hervido y la cocción mediante microondas versus la muestra sin cocción (0 minutos), mediante la prueba U de Mann Whitney.

**Resultado 7. Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de residuos de antimicrobianos.**

Adicionalmente, expusimos los residuos de antimicrobianos puros a la cocción durante 9, 12 y 20 minutos encontrando una menor actividad antimicrobiana frente a *B. subtilis* a los 20 minutos para ENR (halo promedio  $\pm$  DS de 12.50mm  $\pm$  0.71mm) y OTC (halo promedio  $\pm$  DS de 6.50mm  $\pm$  2.12mm). Sin embargo, no se pudo calcular diferencia estadística con el basal (sin exposición a cocción) debido al pequeño número de muestras ( $n=2$ ) de cada experimento.



**Figura 7. Efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana de residuos de antimicrobianos (1mg).** Actividad antimicrobiana de la enrofloxacina (ENR) y oxitetraciclina (OTC) frente a *Bacillus subtilis* mediante la técnica de difusión en agar agar Muller-Hinton a pH 6. Cada residuo fue hervido a 9, 12 y 20 minutos o expuesto al microondas por 30 segundos. Cada barra representa un promedio de 2 experimentos  $\pm$  DS.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

### 5.1. Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacin, medido por la técnica de técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y técnica microbiológica de difusión en agar.

Para ello obtuvimos las muestras de carne de tres mercados representativos de Lima metropolitana. Si bien no fue el objetivo principal del estudio, analizamos el total de muestras de carne en búsqueda de dos de los antimicrobianos más utilizados en la crianza de animales: ENR y OTC. Todos los especímenes analizados mediante HPLC fueron negativas a ambos antimicrobianos y pudieron ser utilizadas en los experimentos de contaminación con residuos de dichos antimicrobianos y, de manera experimental, poder controlar la concentración de dichos residuos y estudiar su efecto ante la cocción.

Nuestro estudio determinó que los niveles de residuos de ENR y OTC en carne de pollo y res contaminada experimentalmente con dichos residuos disminuyeron significativamente conforme aumentaba el tiempo de cocción. Pudiendo reducir hasta más de 60% de los residuos de antimicrobianos. Si bien la temperatura es uno de los factores más importantes que pueden alterar la estabilidad de los antimicrobianos (29), varios estudios han demostrado su efecto en la reducción de tetraciclina (en carne de pollo hasta un 56% y en carne de cerdo hasta un 82%) (19), sulfonamida (en carne de pollo, hasta un 61%) (18) y OTC en (carne de camarón, hasta un 36.3%) (20).

La degradación porcentual de las tetraciclinas se encuentra dentro del rango de 2% al 100%, incluso la OTC es menos estable al calor a comparación a otros antibióticos de esta clase como la doxiciclina. Asimismo, la OTC se puede degradar casi por completo durante la ebullición, debido a su inestabilidad en medios acuosos por reacciones hidrolíticas; a comparación que en medios lipídicos (41). Del mismo modo, los procesos de cocción causan desnaturalización de la proteína, pérdida de agua, grasa, entre otros; lo cual conlleva a la modificación de la concentración de residuo, estructura química o solubilidad del antibiótico (8).

En un estudio previo, se determinó que la OTC en carne de res disminuyó hasta un 69.6% al ser hervido, y hasta un 53.2% al ser expuesto al microondas (8). Si bien, Rana y col. no utilizaron muestras de carne de pollo en sus experimentos, sus resultados sí concuerdan con nuestro estudio donde obtuvimos una reducción de hasta un 62.34% en carne de res y adicionalmente una reducción de hasta 60.8% en carne de pollo.

Del mismo modo, en el caso de las muestras con residuos de ENR sometidas a cocción se observó que la reducción porcentual fue del 30.89% a 77.42% en carne de pollo y en carne de res 32.78% a 60.8%. De manera similar, el estudio de Lolo y col. demostró el efecto de cocción en residuos de ENR en pechuga de pollo, la cual fue sometida a proceso de hervido por 10 minutos y microondas 3.5 minutos, obteniendo como resultados la disminución porcentual de residuos de ENR en una 55.54% a 62.79% en el hervido y 47.20% a 65.45% en el microondas, sin embargo, no incluyeron otro tipo de carne en sus experimentos. Esta degradación que presentan las quinolonas se puede explicar por la cinética de primer orden y a la temperatura sometida, la ENR es un poco más estable en agua que el ciprofloxacino y norfloxacino (10).

Evidencia previa demuestra que la carne con alto contenido de grasa sometidas a cocción en el microondas presenta una mayor degradación de antibióticos, a diferencia

de las carnes con bajo contenido de grasa (10). Con el fin de maximizar el efecto en la degradación de los residuos de antimicrobianos, es que en el presente estudio no se realizó la extracción de soxhlet (desengrasado) en ninguna de las muestras utilizadas.

Si bien la evidencia existente utiliza el método de HPLC por ser una técnica altamente eficaz y sensible para la detección de residuos de antimicrobianos, en el presente estudio quisimos detectar además si la cocción afectó a la actividad antimicrobiana de dichos residuos mediante la técnica de difusión en agar. Para ello, realizamos los experimentos bajo dos condiciones, agar a pH 6 y a pH 8 no encontrando diferencias entre los resultados de ambos medios. Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad antimicrobiana dependiente del tiempo de cocción, siendo mayor a los 20 minutos. Del mismo modo, Vivienne y col. describieron previamente que esta técnica a un pH 6.0 ante *Bacillus subtilis* fue más sensible a las tetraciclinas, obteniendo un halo de inhibición en carne de ave cruda contaminadas con OTC de 7 mm y después de la cocción mediante hervido durante 30 minutos un halo promedio de 2.13 mm ( $p < 0.05$  para la comparación de ambos halos) y mediante microondas un halo promedio de 3.56 mm (este último no significativo) (12).

Si bien el objetivo del estudio no fue determinar la frecuencia de residuos de antimicrobianos en especímenes de carne, nuestro estudio es el primero que buscó identificar dos de los residuos de antimicrobianos más utilizados (ENR y OTC) no encontrando residuos mediante la técnica de HPLC. Estos resultados muestran que no se utilizaron estos antimicrobianos para las especies animales analizadas o que estos fueron utilizados, pero tal vez fueron expulsados o degradados por el metabolismo animal antes de ser sacrificados y distribuidos para su consumo. Además, nuestros resultados no concluyen en que no se utilicen antimicrobianos, sino más bien que posiblemente otros antimicrobianos sean los más frecuentes como previamente fueron descritos por Azañero y col. en mercados tradicionales y supermercados de Lima metropolitana en el año 2010, detectando en su estudio: sulfametoxazol, norfloxacino y ciprofloxacino en carne de pollo (5).

Según la OMS, la seguridad alimentaria es “*el acceso a alimentos inocuos, nutritivos, en cantidad suficiente y es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud*” (42). Por ello se debe considerar en la producción ganadera que el uso excesivo de medicamentos, como los antimicrobianos, expone a los consumidores a sustancias o residuos potencialmente tóxicos poniendo en riesgo a largo plazo la salud de las personas.

Es importante tener en cuenta que la inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están estrechamente relacionadas para mantener la salud de los consumidores. Por lo tanto, los residuos antimicrobianos presentes en los alimentos son un problema de salud pública, debido al efecto perjudicial que tiene en las personas como la alteración de la composición de la microbiota intestinal, ocasionando desequilibrios homeostáticos intestinales predisponiendo a que la persona presente una infección entérica y enfermedades inflamatorias intestinales (43).

Estos residuos también pueden ocasionar reacciones alérgicas o hipersensibilidad inmediata de tipo I con presencia de IgE que es responsable de estas reacciones, incluso en algunas ocasiones se pueden presentar ambas causando dificultades como disfagia, disnea, dermatitis por contacto, anafilaxia, angioedema, broncoespasmo y urticaria (44,45). De esta manera se evidencia que los alimentos insalubres generan un círculo vicioso de enfermedad en la población más vulnerable, pudiendo la cocción de los mismos ser un mecanismo para disminuir la concentración de antimicrobianos.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones, por ejemplo, solo se realizó el análisis de dos antimicrobianos. Sin embargo, la ENR y OTC son dos de los antimicrobianos más utilizados en la crianza de animales. Por otro lado, en los análisis mediante HPLC y actividad antimicrobiana con carne contaminada con residuos de antimicrobianos solo se trabajó con una concentración en cada uno. Si bien nuestro estudio pudo demostrar un efecto del tiempo de cocción sobre el nivel de residuos antimicrobianos, no pudimos demostrar si este efecto cambiaba de acuerdo a la concentración del residuo. Es importante resaltar que la prueba de HPLC es una prueba costosa, por lo que se tuvo que priorizar los experimentos con una única concentración.

## **5.2. Conclusiones**

- La cocción disminuye significativamente la cantidad de residuos de OTC y ENR presentes en productos de carne de pollo y carne de res evaluados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- La cocción disminuye significativamente la actividad antimicrobiana de productos de carne de pollo y res con residuos antimicrobianos de OTC y ENR.
- El tiempo de cocción influye en el nivel de residuos antimicrobianos, resultando en un menor nivel de residuos a un tiempo de cocción más prolongado.

## **5.3. Recomendaciones**

- Investigaciones futuras deberían experimentar con mayores rangos de cocción y diferentes concentraciones de los antimicrobianos, para así determinar el límite o el máximo efecto de la cocción sobre el residuo.
- Se recomienda trabajar con un mayor tamaño de muestras y provenientes de diferentes mercados tanto de Lima como de provincias.
- Se recomienda incluir otro tipo de cocción como frito, para así poder compararlo con las cocciones de hervido y microondas.
- Ampliar la detección a otros tipos de residuos de antimicrobianos empleados en la industria ganadera.
- Incluir el estudio de otros tipos de alimentos derivados de animales, como por ejemplo, el huevo y la leche.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha C, Reynolds ND, Simons MP. Emerging antibiotic resistance: A global threat and critical healthcare problem. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2015 [citado 17 de junio de 2019];32(1):139–45. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26102117>
2. Lozano M, Arias D. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* [Internet]. 2008 [citado 17 de junio de 2019];21(1):121–35. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v21n1/v21n1a12.pdf>
3. Jaramillo Benitez AI. Uso de antibióticos en la industria ganadera y los riesgos que presenta para la salud humana [Internet]. Pontificia Universidad Católica de Ecuador; 2018 [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/16030/monografia\\_final\\_unido\\_IMPRIMIR.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/16030/monografia_final_unido_IMPRIMIR.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Codex Alimentarius* [Internet]. 2018 [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>
5. Azañero Rodríguez GP, Chiroque Limaymanta MA. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010 [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1633>
6. Al-Mashhadany DA. Detection of antibiotic residues among raw beef in Erbil City (Iraq) and impact of temperature on antibiotic remains. *Ital J food Saf* [Internet]. 18 de marzo de 2019 [citado 17 de junio de 2019];8(1):7897. Disponible en: <https://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/view/7897>
7. Acevedo D, Montero PM, Jaimes JD. Determinación de Antibióticos y Calidad Microbiológica de la Carne de Pollo Comercializada en Cartagena (Colombia). *Inf tecnológica* [Internet]. 2015 [citado 18 de junio de 2019];26(1):71–6. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
8. Rana MS, Lee SY, Kang HJ, Hur SJ. Reducing veterinary drug residues in animal products: A review. *Food science of animal resources*. 2019 Oct;39(5):687.
9. Nguyen V, Nguyen V, Li C, Zhou G. The degradation of oxytetracycline during thermal treatments of chicken and pig meat and the toxic effects of degradation products of oxytetracycline on rats. *Journal of Food Science and Technology*. 2015 May 1;52(5):2842–50.
10. Tian L, Khalil S, Bayen S. Effect of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 22 de noviembre de 2017 [citado 18 de junio de 2019];57(17):3760–70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27052471>
11. Heshmati A, Salaramoli J, Kamkar A, Hassan J, Jahed G. Experimental study of the effects of cooking methods on tilmicosin residues in chicken. *J Vet Res* [Internet]. 1996 [citado 18 de junio de 2019];69(3):283–90. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153057089>
12. Vivienne EE, Josephine O-KO, Anaelom NJ. Effect of temperature (cooking and freezing) on the concentration of oxytetracycline residue in experimentally induced birds. *Vet world* [Internet]. febrero de 2018 [citado 18 de junio de 2019];11(2):167–71. Disponible en: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/February-2018/12.html>
13. Katz SE, Levine PR. Determination of neomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J Assoc Off Anal Chem* [Internet]. septiembre de 1978 [citado 18 de junio de 2019];61(5):1103–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/721728>

14. Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquím Clín Latinoam* [Internet]. 2013 [citado 8 de agosto de 2019];47(2):617–45. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53529348019.pdf>
15. Colegio de Nutricionistas del Perú. Estatuto del Colegio de Nutricionistas del Perú [Internet]. El Peruano 2018. Disponible en: <http://cnp.org.pe/wp-content/uploads/2018/10/estatuto-2018-en-el-peruanopdf.pdf>
16. Ramatla T, Ngoma L, Adetunji M, Mwanza M. Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods. *Antibiotics* [Internet]. 7 de diciembre de 2017 [citado 18 de junio de 2019];6(4):34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29215578>
17. Jammoul A, El Darra N. Evaluation of Antibiotics Residues in Chicken Meat Samples in Lebanon. *Antibiotics* [Internet]. 28 de mayo de 2019 [citado 18 de junio de 2019];8(2):69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31141997>
18. Furusawa N, Hanabusa R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food research international*. 2002 Jan 1;35(1):37-42.
19. Gratacós-Cubarsí M, Fernandez-García A, Picouet P, Valero-Pamplona A, García-Regueiro JA, Castellari M. Formation of tetracycline degradation products in chicken and pig meat under different thermal processing conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007 May 30;55(11):4610-6.
20. Plascencia AE, Arvayo PjJ, Carrillo HH, Almada MD. Efecto del congelado y cocinado sobre residuos de oxitetraciclina en camarón de cultivo. *Biotecnia*. 2011 Dec 30;13(3):12-21.
21. Albújar Canova RI. Residuos de antimicrobianos en hígados de pollo comercializados en el mercado Modelo de Piura por el método microbiológico de las tres placas [Internet]. Universidad Nacional de Piura / UNP. Universidad Nacional de Piura; 2015 [citado 18 de junio de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/882>
22. Villalobos Sipan NL. Evaluación de residuos de enrofloxacin en carne de pollo comercializado en el mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo [Internet]. Universidad Privada Antenor Orrego. Universidad Privada Antenor Orrego; 2017 [citado 18 de junio de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/3781>
23. Chamba VMC, Calero J de los Á, Torres JMA, Moscol GBT. La resistencia antimicrobiana: situación actual. *RECIMUNDO* [Internet]. 7 de abril de 2019 [citado 18 de junio de 2019];3(2):307–23. Disponible en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/447>
24. Giguère S, Prescott JF, Dowling P. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. John Wiley. John Wiley & Sons, Inc.; 2013. 683 p.
25. Colegio Médico Veterinario del Perú. *Vademecum Veterinario*. 2006. 3:73-477.
26. Glisson J. Uso de las Fluoroquinolonas en la Industria Avícola. *Mundo Avícola y Porc*. 1995;3(1):16–20.
27. Serrano D. Biodisponibilidad de los antimicrobianos en los nuevos sistemas de producción [Internet]. <http://www.apavic.com>. 2019. Disponible en: <http://www.apavic.com/html/sections/presentaciones/biodisponibilidad.asp>.
28. Roca Marugán MI. Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche [Internet]. Universidad Politécnica de Valencia; 2008. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/3022/tesisUPV2884.pdf>
29. Aerts MM, Hogenboom AC, Brinkman UA. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J Chromatogr B Biomed Appl* [Internet]. 5 de mayo de 1995 [citado 18 de junio de 2019];667(1):1–40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7663672>
30. Granelli K, Branzell C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 14 de marzo de 2007 [citado 18 de junio

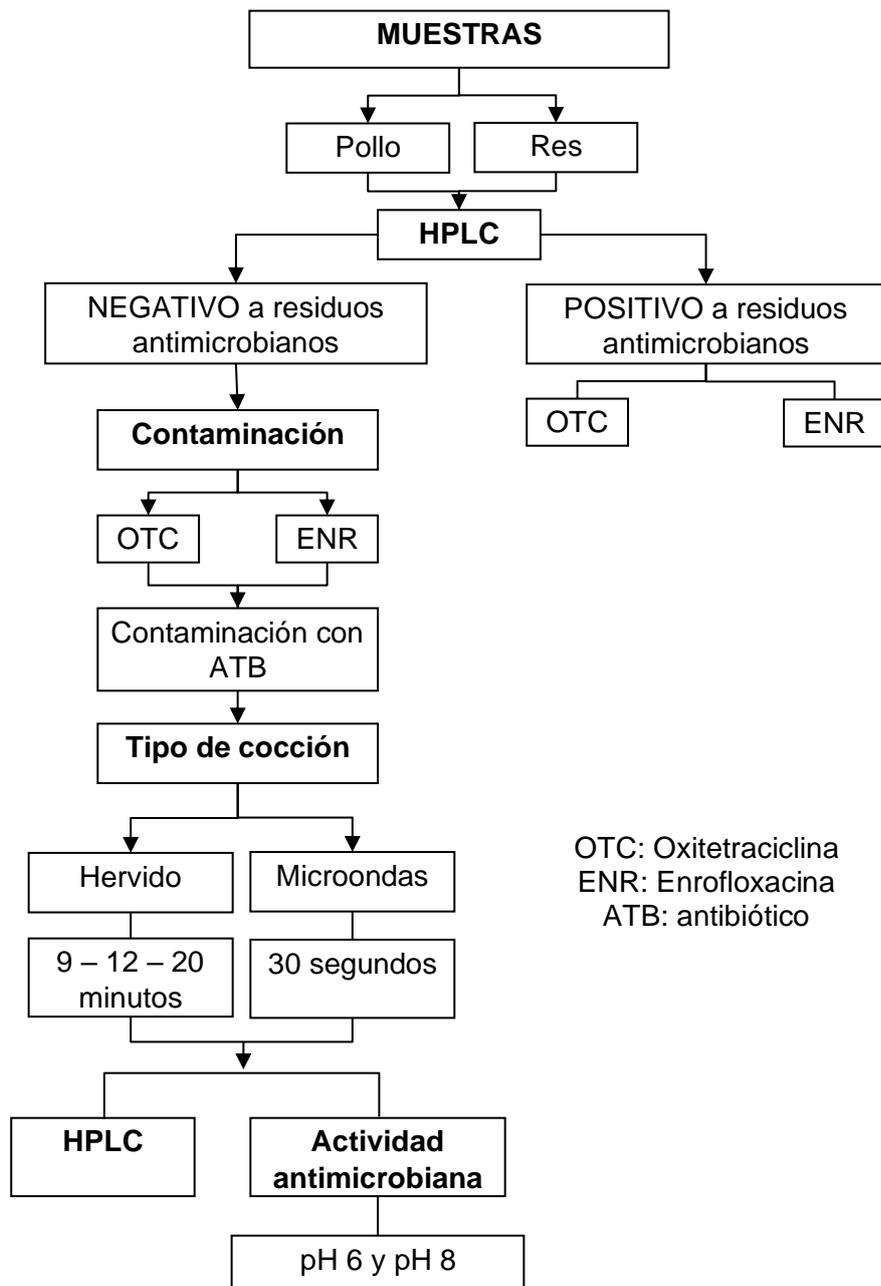
- de 2019];586(1–2):289–95. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267006023919>
31. Cooper K. The theory of antibiotic diffusion zones. Kavanaugh F, editor. New York: Academic Press, Inc.; 1972. 13 p.
  32. Barry A. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Lippincott Williams & Wilkins; 1976.
  33. Myllyniemi A-L. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat [Internet]. University of Helsinki; 2004 [citado 18 de junio de 2019]. Disponible en: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/myllyniemi/>
  34. Okolo MI. Bacterial drug resistance in meat animals: a review. *Int J Zoonoses* [Internet]. septiembre de 1986 [citado 18 de junio de 2019];13(3):143–52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549599>
  35. Ortega P, Arellano G, Morales M. Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la Salud Pública. *La Rev Investig clínica*. 1988;40:463–72.
  36. Dolliver H, Kumar K, Gupta S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *J Environ Qual* [Internet]. 2007 [citado 18 de junio de 2019];36(4):1224–30. Disponible en: <https://www.agronomy.org/publications/jeq/abstracts/36/4/1224>
  37. Errecalde JO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2004.
  38. San Martín B. Antibióticos y sulfas en sistemas de crianza intensiva. *TecnoVet* [Internet]. 1 de enero de 1998 [citado 18 de junio de 2019];4(2). Disponible en: <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/6245>
  39. World Health Organization. Antimicrobial. 2008.
  40. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México; 2006.
  41. Rose MD, Bygrave J, Farrington WH, Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxytetracycline. *Food Additives & Contaminants*. 1996 Apr 1;13(3):275-86.
  42. World Health Organization. Nutrición y Seguridad Alimentaria. 2020.
  43. Wlodarska M, Finlay BB. Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. *Mucosal immunology*. 2010 Mar;3(2):100-3.
  44. Guzmán MA, Salinas J, Toche P, Afani A. Alergia a beta-lactámicos. *Revista chilena de infectología*. 2004 Dec;21(4):285-98.
  45. Torres Florez FE. Determinación de la prevalencia de residuos de antibióticos en bovinos procesados en el frigorífico río frío.

## ANEXOS

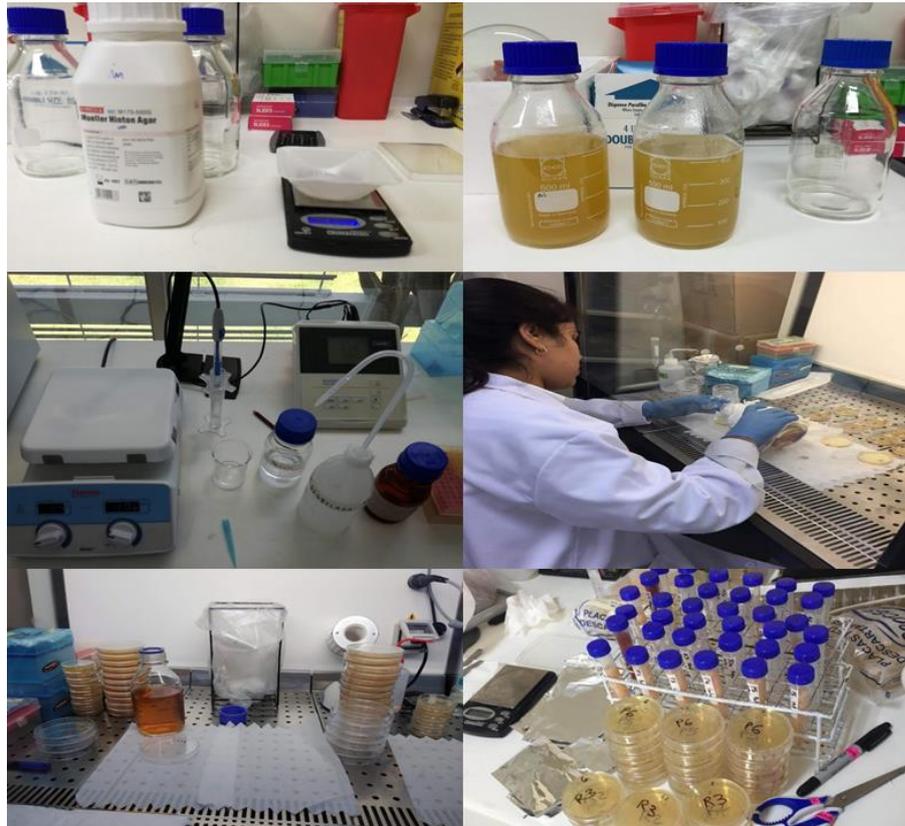
### Anexo N°1: Operacionalización de variables

Variables	Clasificación de las variables	Definición conceptual	Instrumentos	Indicador o punto de cohorte	Categorización o valores finales
Residuos de antimicrobianos	Cuantitativa continua	Los antimicrobianos son compuestos que permanecen en el organismo como consecuencia de un tratamiento o con fines profilácticos pudiendo dejar residuos de los medicamentos en los animales productores de alimentos (42).	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).	No aplica	Valores numéricos en µg/Kg de cada residuo de antimicrobiano
Actividad antimicrobiana de los alimentos con residuos de antimicrobianos	Cuantitativa continua	Actividad inhibitoria que presenta los alimentos con residuos sobre cultivo bacteriano (5).	Técnica microbiológica de difusión en agar	Halo de inhibición	Halo de inhibición en mm
Tiempo de cocción	Cuantitativa discreta	Exponer un determinado producto a la acción del calor a fin que cambie ciertas propiedades.	Equipo de baño maría Microondas	Hervido 100°C Microondas (500W)	Hervido: 9,12 y 20 minutos. Microondas: 30 segundos
Tipo de cocción	Cualitativa dicotómica	Proceso por el cual se eleva la temperatura del alimento mediante el agua modificando sus características o propiedades originales.	Equipo de baño maría Microondas	Hervido 100°C Microondas (500W)	Hervido Microondas
Productos alimenticios	Cualitativa politómica	Productos de origen animal	No aplica	No aplica	Carne de pollo Carne de res

**Anexo N°2:** Flujoograma de plan de recolección de datos



**Anexo N°3:** Preparación de material para el método de cribado microbiológico.



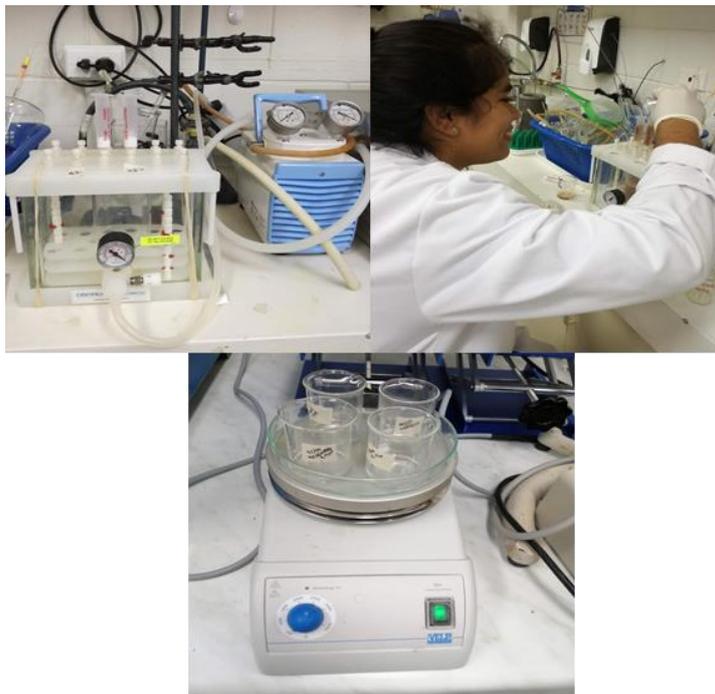
**Anexo N°4:** Contaminadas de manera experimental con OTC y ENR.



Anexo N°5: Muestras sometidas a cocción, sonicación y centrifugación.



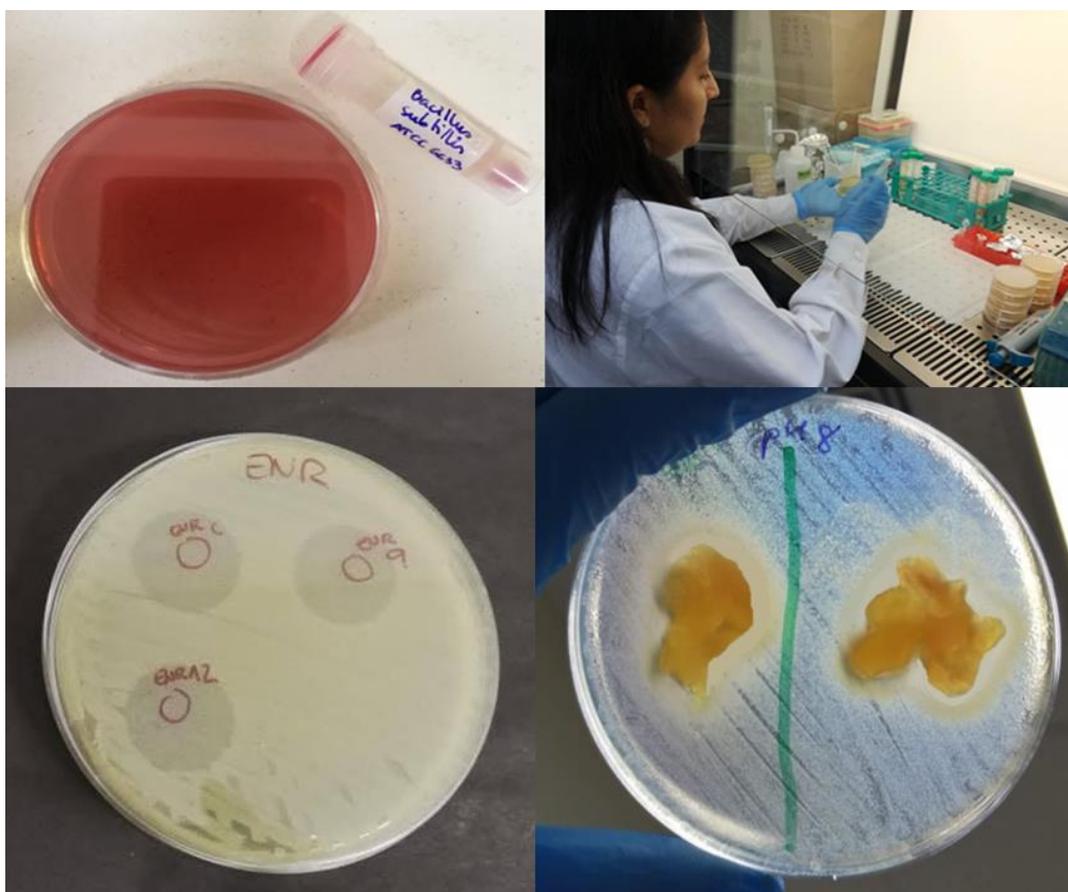
**Anexo N°6:** Acondicionamiento de columnas para el HPLC.



**Anexo N°7:** Acondicionamiento del HPLC.



**Anexo N°8:** Sembrado del *Bacillus Subtilis* y diámetro del halo de inhibición.



## Anexo N°9: Matriz de consistencia

Problemas	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores	Población y muestra	Diseño	Instrumentos	Análisis estadístico
<p><b>Problema general</b> ¿Cuál es el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacina?</p> <p><b>Problemas específicos</b> ¿Cuál es el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos presentes en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacina evaluados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)?</p> <p>¿Cuál es el efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana presente en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacina evaluados por la técnica microbiológica de difusión en agar?</p>	<p><b>Objetivo general</b> Determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos contaminados previamente con oxitetraciclina y enrofloxacina, medido por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y técnica microbiológica de difusión en agar, 2019.</p> <p><b>Objetivos específicos</b> Determinar el efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianos presentes en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacina evaluados por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Determinar el efecto de la cocción en la actividad antimicrobiana presente en carnes de pollo y res previamente contaminadas con oxitetraciclina y enrofloxacina evaluados por la técnica microbiológica de difusión en agar</p>	<p><b>Hipótesis alterna</b> El nivel de residuos de antimicrobianos, medido por HPLC, es diferentes en los alimentos cocidos (carne de pollo y res) en comparación a los no cocidos.</p> <p><b>Hipótesis nula</b> El nivel de residuos de antimicrobianos, medido por HPLC, es igual en los alimentos cocidos (carne de pollo y res) en comparación a los no cocidos.</p>	<p>1. Residuos de antimicrobianos. Indicador: no aplica.</p> <p>2. Actividad antimicrobiana de los alimentos con residuos de antimicrobianos. Indicador: halo de inhibición.</p> <p>3. Tiempo de cocción. Indicador: hervido 100°C, microondas (500W).</p> <p>4. Tipo de cocción. Indicador: hervido 100°C, microondas (500W).</p> <p>5. Productos alimenticios. Indicador: no aplica.</p>	<p><b>Muestra:</b> El presente estudio al ser un estudio de tipo experimental, no aplicó un tipo de muestreo. Para adquirir los especímenes que fueron utilizados en el presente estudio, se recolectaron 30 especímenes de carne de pollo y 30 de res, adquiridos de tres mercados tradicionales de Lima. Del total de especímenes recolectados, se seleccionó 6 de cada tipo (pollo y res).</p> <p><b>Criterios de inclusión:</b> -Productos de carne de pollo o res del día, conservando sus características organolépticas. -Productos adquiridos en mercados de Lima Metropolitana. -Para los experimentos, las muestras de res y pollo deben ser negativos a residuos de oxitetraciclina (OTC) y enrofloxacina (ENR) por HPLC.</p> <p><b>Criterios de exclusión:</b> -Productos cárnicos congelados.</p>	<p><b>Diseño:</b> Experimental</p> <p><b>Alcance:</b> Explicativo</p>	<p>1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)</p> <p>2. Técnica microbiológica de difusión en agar</p> <p>3. Equipo de baño maría y microondas</p> <p>4. Equipo de baño maría y microondas</p>	<p><b>Análisis descriptivo:</b> Las variables cuantitativas fueron analizadas como media <math>\pm</math> desviación estándar</p> <p><b>Análisis inferencial:</b> Para la comparación de concentraciones y los halos de las muestras crudas, hervidas y en el microondas; se empleó la prueba de U de Mann Whitney.</p>

**Anexo N°10:** Carta de aprobación del protocolo de tesis por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud.



Nº Reg.: CE-507

Los Olivos, 19 de Diciembre de 2019

**CARTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE TESIS POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**Señoritas:**

Medina Prada, Anicia Magaly  
Lumbre Soles, Andrea Liliana.

Por medio de la presente me permito hacer de su conocimiento que se ha realizado la revisión de su protocolo de tesis.

**"Efecto de la cocción en el nivel de residuos de antimicrobianas en productos alimenticios obtenidos en mercados de Lima Metropolitana"**

Cuyo asesor es la Prof. María Taípe Aylas. Se emite la presente CARTA DE APROBACIÓN, a fin de que prosiga con los trámites correspondientes en la elaboración de su tesis.

Sin otro particular me despido de usted.

Atentamente,



Dr. Luis Quiroz Avilés

Comité de Ética en Investigación

UNIVERSIDAD LICENCIADA • RES. N° 117 - 2018 - SUNEDU / CD

Esq. Constelaciones y Sol de Oro s/n. Urb. Sol de Oro - Los Olivos ☎ 533 00 08 📞 963 345 415 🌐 www.ucss.edu.pe

## **Anexo N°11:** Glosario de términos

**Actividad antimicrobiana:** Es la actividad de ciertas sustancias capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (33).

***Bacillus subtilis*:** Microorganismo sensible a los antimicrobianos (5).

**Oxitetraciclina:** Es un antimicrobiano bacteriostático de amplio espectro que pertenece al grupo de las tetraciclinas (10).

**Enrofloxacina:** Es un antimicrobiano de tercera generación, de amplio espectro y que pertenece a la familia de las quinolonas (26, 27).

**Escala de McFarland:** Es una escala de turbidez usada como referencia para aproximar la cantidad de bacteria presente en una suspensión líquida. Esta escala es usada frecuentemente en la técnica de disco de difusión en placa (5).

**Halo de inhibición:** Es la zona alrededor de la muestra con antimicrobiano, donde se observa que no ha habido un crecimiento bacteriano o este ha sido inhibido (33).

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla. Es una de las técnicas con la más alta eficiencia y sensibilidad en la detección de residuos de antimicrobianos en muestras de alimentos (7).

**Müller-Hinton:** Es un medio de cultivo enriquecido, utilizado comúnmente en las técnicas microbiológicas para detectar la susceptibilidad a antibióticos (33).

**Prueba de difusión en agar:** También llamada técnica de Kirby-Bauer. Es una técnica microbiológica para detectar la sensibilidad de un microorganismo frente a un antimicrobiano (33).