

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**RESIDUALIDAD DEL METABOLITO DE FURAZOLIDONA EN TEJIDOS DE  
CERDOS TRATADOS EXPERIMENTALMENTE**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

I.Q. SILVIA HERNÁNDEZ MONARRES

MEXICALI, B. C., MÉXICO

AGOSTO DEL 2008

**Residualidad del metabolito de furazolidona en tejidos de cerdos tratados experimentalmente. Tesis presentada por Silvia Hernández Monarres como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el Comité Particular indicado:**

---

Ph D. Fernando Figueroa Saavedra Almada  
Director

---

M. C. María del Carmen Bermúdez  
Co-Director

---

Ph D. Cristina Pérez Linares  
Asesor

---

M. C. Alberto Barreras Serrano  
Asesor

---

Ph D. Eduardo Sánchez López  
Asesor

---

Lugar y fecha

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, por la oportunidad de poder realizar mis estudios de postgrado, a mis maestros Dr. Cristina Pérez, M.C. Alberto Barreras y Dr. Eduardo Sánchez. Al Dr. Fernando Figueroa Saavedra por todo su apoyo y la confianza que ha depositado en mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante estos dos años de estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), especialmente a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos, a M.C. María del Carmen Bermúdez Almada por ofrecirme su apoyo en mi proyecto de investigación, por confiar en mí en todo momento, por sus acertados consejos y su apoyo incondicional. Muchas gracias.

A M.C. Angélica Espinosa Plascencia por su dedicación y paciencia pero sobre todo por ser un gran ser humano y M.C. Haydé Hayamaí González Carrillo por darme las herramientas científicas y técnicas para la realización de mi investigación. Gracias por su valioso y constante tiempo, así como también por sus consejos, sobre todo por la amistad y atenciones ofrecidas a mi persona.

Al personal del Laboratorio de Análisis Biológicos de CIAD, por su hermosa amistad que me brindaron desde el primer día, haciendo mi estancia más agradable en la institución, a las Q.B. Leticia Miranda Vázquez, Erika Fierros, Maria José Baca y María Eugenia Flores.

## DEDICATORIA

A Dios, gracias porque me has dado la vida y la salud, por tu amor y tu gran misericordia. Gracias Señor por tu hijo amado Jesús que me salvó, por todo lo que me has dado y por lo que me has negado también, porque se que todo esto, es conforme a tu sabiduría.

A mi esposo Jorge Vargas y a nuestra hija Valeria. Por sus oraciones, compañía, por su tolerancia, paciencia, comprensión, por estar conmigo en las buenas, pero sobre todo en las malas, porque me han dado fuerzas y amor hasta rebosar.

A mis padres, Silvia Monarres y Crispín Hernández por darme la vida, así como también a mi padre de vida Matías Rodríguez, que Dios los bendiga con salud y amor en abundancia, a Él doy gracias por haberlos puesto en mi camino, gracias por el sustento y amor que me han brindado durante todos los años de mi vida, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Karina, Raúl y Matías, gracias por ser parte de mi existencia, por su apoyo, porque sé que siempre podré contar con ustedes. Los amo, son la mejor familia que habría podido tener.

A mis amigos que siempre estuvieron conmigo, a la M.C. Alma Patricia Sotelo, a los M.V.Z. Mario Chávez Cervantes y Gustavo Ríos, así como también a los M.C. Dixie May y J. Carloman Herrera, gracias por la amistad tan bonita que me han manifestado, por los momentos tan gratos que he disfrutado en su compañía y el apoyo que me han dado, los quiero mucho.

## CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
INTRODUCCION .....	1
REVISION DE LITERATURA .....	3
Origen de los nitrofuranos y sus propiedades .....	3
Características fisicoquímicas de furazolidona .....	4
Mecanismo de acción de furazolidona .....	6
<i>Absorción</i> .....	7
<i>Excreción</i> .....	7
Uso de los nitrofuranos en la producción animal .....	10
Resistencia asociada a furazolidona y otros nitrofuranos .....	11
Residuos de furazolidona unidos a las proteínas.....	12
Toxicidad de la furazolidona .....	15
Regulación sanitaria relacionada con furazolidona .....	17
Alerta Sanitaria por presencia de residuos de furazolidona en carne de cerdo .....	20
Contaminación durante la producción de carne de cerdo .....	21
MATERIALES Y METODOS .....	24
Localización del área de estudio .....	24
Duración del estudio .....	24

Naturaleza de la población .....	24
Origen de las muestras .....	25
Metodología .....	25
Protocolo de validación de la metodología para la determinación de AOZ y aseguramiento de la calidad de los resultados .....	26
Sensibilidad .....	26
Linealidad .....	26
Exactitud y precisión .....	26
Variable evaluada .....	28
Análisis estadístico .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
CONCLUSIONES .....	31
LITERATURA CITADA .....	32

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág
1	Productos comerciales en México que contienen como sustancia activa de furazolidona .....	8

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Estructura química de la furazolidona compuesta de dos anillos: 1) 5-nitrofurano y 2) 3-amino-2-oxazolidona .....	5
2	Rutas de la biotransformación de la furazolidona en el organismo animal .....	9



## RESUMEN

### **Residualidad del metabolito de furazolidona en tejidos de cerdos tratados experimentalmente**

La Furazolidona, la cual pertenece al grupo de nitrofuranos, ha sido prohibida en la producción de alimentos de origen animal en países de la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá a partir de 1995. México, actualmente no cuenta con un marco regulatorio que prohíba el empleo de furazolidona (FZD) en la producción de carne de cerdo. Furazolidona al ser administrada, se metaboliza en el organismo del animal en tan solo 2 horas, resultando en la formación del metabolito 3-amino-2-oxazolidona (AOZ), el cual se enlaza a los tejidos, este metabolito tiene propiedades cancerígenas y genotóxicas. En este estudio se determinó la concentración de AOZ en los tejidos de hígado, músculo y riñón de cerdos tratados con dosis única de 0.55 mg de FZD por kg de peso vivo a cerdos en etapa de finalización mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con un detector de UV-Vis. No se detectaron residuos del metabolito de furazolidona en ninguna de las muestras de riñón, hígado y músculo con un límite de detección de  $1 \text{ ng g}^{-1}$ . Por lo que se concluye que a esta dosis administrada la concentración de residuos del metabolito de furazolidona es menor a  $1 \text{ ng g}^{-1}$ .

**Palabras claves:** Furazolidona, 3-amino-2-oxazolidona, cerdos, tejidos.

## ABSTRACT

### Residues of furazolidone metabolite in pigs experimentally treated

Furazolidone (FZD), it's an antibiotic which belongs to the group of nitrofurans, it has been prohibited in animal food production in countries of European Union, United States and Canada since 1995. Mexico, nowadays it does not rely on a regulative frame that should prohibit the employment of furazolidone in porcine meat production. Furazolidona once it has been administered, is metabolized in the organism of the animal in only 2 hours, resulting in the formation of 3-amino-2-oxazolidona metabolites (AOZ), which is protein-bound metabolites, this metabolites has carcinogenic and genotoxic properties. In this study AOZ's concentration was determined in liver, muscle and kidney of treated pigs with a unique dose of 0.55 mg of FZD per kg live weight using high Performance Liquid Chromatography with UV-vis detector. Residues of AOZ metabolites were not detected in any of the samples of kidney, liver and muscle by Detection Limits (LD's) levels of  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . Its conclude that dose equal or lower than 0.55 of FZD per kg live weight can not detected in the tissues evaluated here.

**Keywords:** Furazolidone, 3-amino-2-oxazolidinone, pigs, tissues.

## INTRODUCCIÓN

La Furazolidona (FZD), es un nitrofurano que fue utilizada indiscriminadamente a principios de los años 90's en la producción de carne de cerdo debido a sus bajos costos, gran disponibilidad en el mercado y los bajos niveles de resistencia generada por los microorganismos patógenos.

En el año 1995, en la Unión Europea fue prohibida junto con el resto de los nitrofuranos en la producción de alimentos de origen animal, incluyendo en porcicultura. Esto fue debido a que El Comité Mixto de FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), reportó que FZD es rápidamente metabolizada en el organismo de los animales tratados resultando en la formación de un numero ilimitado de metabolitos, de los cuales 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) ha sido identificado plenamente. Este metabolito es capaz de formar enlaces covalentes con las proteínas de los tejidos de hígado, músculo y riñón de los cerdos tratados. Este metabolito *in vivo* e *in vitro* presenta actividad cancerígena y genotóxica.

Posteriormente otros países como Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Japón entre otros, encontraron escasez en los datos que comprobaran la seguridad del empleo de FZD en porcicultura, por lo que adoptaron la misma medida. En México, no existe una regulación oficial que prohíba el uso de furazolidona, pero se encuentra en proceso de modificación la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, que establece una tolerancia

de residualidad de cero para furazolidona y sus metabolitos en tejidos animales.

El control de estos residuos en la carne de cerdo destinada al consumo local ha sido limitado en México, además que en el país no existen bases científicas suficientes que muestren a las autoridades correspondientes la importancia de apresurar la actualización de las Normas Oficiales Mexicanas relacionadas con el empleo de FZD en la producción de alimentos de origen animal para garantizar su inocuidad. Por lo que es importante enfatizar que se deben de tomar medidas regulatorias contundentes respecto al empleo de FZD en cerdos destinados al consumo humano, debido a que se pone en riesgo la salud de los consumidores por la constante exposición a los residuos de esta droga.

**Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue determinar la residualidad del metabolito de furazolidona en músculo, hígado y riñón de cerdos tratados experimentalmente.**

# REVISIÓN DE LITERATURA

## Origen de los nitrofuranos y sus propiedades

Los nitrofuranos (NF), fueron utilizados por primera vez en quimioterapia al ser descubiertos por Dood y Stillman en el año 1944, quienes observaron que al adicionar un grupo nitro en el carbono 5 (C<sub>5</sub>) del anillo furano, la molécula obtenía propiedades bacteriostáticas y que la variación en el radical unido al C<sub>2</sub> del anillo furano generaba un gran número de compuestos. (Monasterios et al., 2005).

Los principales derivados de 5-NF son nitrofurazona (NFZ), nitrofurantoina (NFT), nifursol (NFS), furaltadona (FTD) y furazolidona (FZD), los cuales son compuestos sintéticos que *in vitro* tienen actividad contra un amplio rango de patógenos. Se utilizan principalmente para combatir enfermedades causadas por protozoarios, hongos, bacterias Gram (-) como *Colibacilo*, *Haemophilus influenzae*, *Shigellas* y bacterias Gram (+), entre ellas *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus β-hemolítico*, *S. faecalis* (*Enterococcus*), *Neumococo* y el género *Clostridium* (Jager et al., 1997; Escobedo, 2004).

Los NF se metabolizan rápidamente, la mayor concentración de los NF en sangre se presenta a las 2 h de haber sido administrado y la mayor cantidad de esta concentración es eliminada del organismo a las 24 h principalmente por vía renal (Draisici et al., 1997).

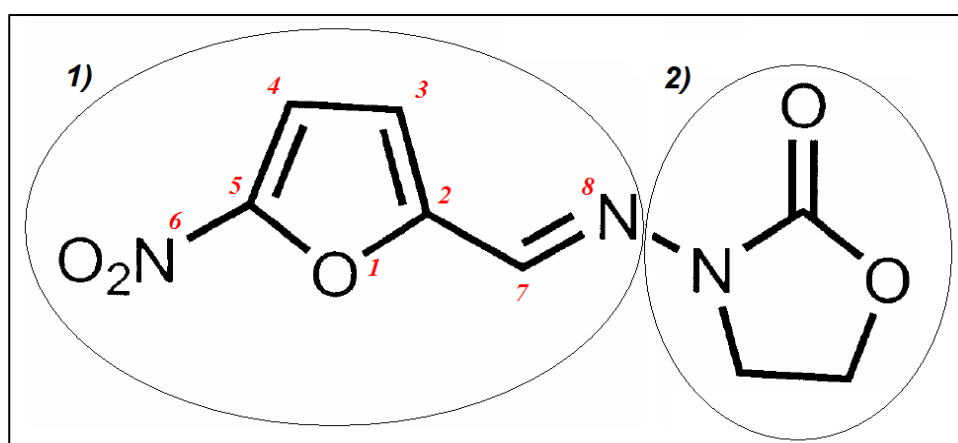
No obstante los metabolitos 3-amino-5-morpholinometil-1,3-oxazolidin-2-ona (AMOZ), 1-aminohidantoina (AHD), semicarbazida (SEM), 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ) y 3,5-dinitro-salicílico (DNSAH) son los resultantes de la biotransformación de FTD, NFT, NFZ, FZD y NFS, respectivamente (Cooper y Kennedy, 2007). Estas biomoléculas son más estables y más resistentes que los NF respectivos y tienen bajo peso molecular, entre 20 a 75 g mol<sup>-1</sup>, (Edder et al., 2003).

En general, los NF actúan disminuyendo los procesos oxidativos en las bacterias y reducen la generación de energía aprovechable por los microorganismos. Su mecanismo de acción antibacteriano es causado por la inhibición del metabolismo de los hidratos de carbono y el rompimiento de la cadena de RNA (Pérez et al., 2005).

### **Características fisicoquímicas de furazolidona**

Al igual que el resto de los compuestos heterocíclicos, la actividad antibacterial de FZD está dada por la presencia del grupo nitro en el C<sub>5</sub> (Figura 1), básicamente su estructura está compuesta por los anillos, 5-nitrofurano y 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) (Timperio et al., 2003).

El nombre químico de FZD es 3-(5-nitrofurfuriliden)-amino-2-oxazolidoninitro, el cual es particularmente efectivo contra *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Helicobacter*, *Campylobacter*,



(Timperio et al., 2003)

**Figura 1. Estructura química de la furazolidona compuesta de dos anillos: 1) 5-nitrofurano y 2) 3-amino-2-oxazolidona.**

protozoarios como *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*. En animales, también es utilizado como promotor de crecimiento. Las dosis que se utilizan varían de 8 a 400 mg kg<sup>-1</sup>, dependiendo del tratamiento que se requiera, ya sea profiláctico, terapéutico, control o promotor de crecimiento (Sumano y Ocampo, 1997).

FZD no altera la flora intestinal y posee una alta sensibilidad contra otras especies de *salmonella*, lo que fundamenta su uso común contra enfermedades gastrointestinales como cólera y fiebre tifoidea en medicina humana y en la producción animal. Debido a los bajos niveles de resistencia de enteropatógenos a FZD, ha sido la mejor alternativa cuando las bacterias han generado resistencia contra otros antibióticos comunes como cloranfenicol (Townson et al., 1994).

### **Mecanismo de acción de furazolidona**

El mecanismo de acción de FZD es a través de la interferencia con enzimas bacterianas, especialmente las involucradas en la degradación aeróbica o anaeróbica de la glucosa y el piruvato, interfiriendo en la síntesis de la pared celular bacteriana como sitio primario de acción. El mecanismo de acción parece tener relación con la inducción de profagos y la alteración del DNA bacteriano. Se ha comprobado que la FZD inhibe la síntesis del DNA, produciendo filamentación y mutación del microorganismo. La FZD se absorbe poco en el tracto digestivo, sitio donde es metabolizada e inactivada, la distribución de la fracción absorbida es desconocida. Aproximadamente el 5%



de FZD se excreta por vías urinarias junto con algunos metabolitos. En el Cuadro 1 se muestran algunos productos comerciales de furazolidona disponibles, hasta el año del 2006, en México (Prontuario de Especialidades Veterinarias, 2006).

**Absorción:** El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), reportó que FZD es rápidamente metabolizada en el organismo de los animales tratados. Estudios realizados con radiomarcadores para FZD demostraron la formación de metabolitos estables en varios tejidos y la persistencia de éstos, aún en períodos de retiro prolongados. Así mismo, ensayos con ratas, mostraron que estos metabolitos son absorbidos en el tracto gastrointestinal y son alojados en el hígado (Gottshall y Wang, 1995; Food Standards Australia New Zealand, 2004)

Cuando se lleva a cabo la reducción del grupo nitro en el anillo de nitrofurano, se forman moléculas que tienen la capacidad de unirse con los aminoácidos de las proteínas, estos enlaces logran ser reversibles y permiten la formación de distintas moléculas (Figura 2). En un medio ácido, la porción no unida de la molécula de AOZ, es liberada de la proteína, formando metabolitos reactivos en microsomas y hepatocitos de hígado en cerdo, estas moléculas de AOZ son detectadas como residuos en animales que fueron tratados con FZD (International Programme on Chemical Safety, 2006).

**Excreción:** Estudios con [<sup>14</sup>C]Furazolidona en cerdos mostraron que 24 h después de la administración de una dosis vía oral, la concentración más alta

**Cuadro 1. Productos Comerciales con sustancia activa de furazolidona utilizadas en México**

<b>Nombre</b>	<b>Presentación</b>	<b>Tiempo de retiro recomendado</b>
<b><i>NF-180</i></b>	Suspensión 10 g/100 mL Tabletas 5 mg/tableta	7 días
<b><i>Topazone</i></b>	Polvo aerosol 7.5 g/100	No aplica
<b><i>Fura-feed 11%</i></b>	Premezcla 110 g/kg	5 días
<b><i>Fura-feed 22%</i></b>	Premezcla 220 g/kg	
<b><i>Furamix-22</i></b>	Premezcla 220 g/kg	30 días
<b><i>Furavi-22</i></b>	Premezcla 220 g/kg	7 días

(Prontuario de Especialidades Veterinarias, 2006)



de residuos de la droga se encontró en hígado seguido por riñón, músculo y grasa. La cantidad de residuos de AOZ enlazado a los tejidos representó un 7.5%. Estas mismas muestras de tejidos liofilizados, fueron administradas a ratas para determinar la biodisponibilidad de los residuos unidos a las proteínas. Se encontró el 40% de residuos de [<sup>14</sup>C]Furazolidona en el hígado de las ratas a las 24 h de retiro, estos residuos disminuyeron hasta un 19%, 45 días después. Mientras tanto, los residuos de AOZ en músculo no mostraron cambios significativos, siendo al día 1, de 37% y a los 45 días de retiro el 41% (Gottshall y Wang, 1995).

### **Uso de los nitrofuranos en la producción animal**

La NFZ fue el primer NF aprobado para su uso en medicina veterinaria por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA ó Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica (EUA), en 1948. Posteriormente, en 1953, la FZD se utilizó en el tratamiento de tifoidea, paratifoidea en pavos y pollos (Chu y López, 2007).

Hasta los años 90's, los 4 NF (FZD, FTD, NFZ, NFT) fueron ampliamente utilizados en la Unión Europea (UE) debido a sus bajos costos, efectividad y gran disponibilidad en el mercado (FAO, 2004a, 2004b; Mottier et al., 2005), lo que facilitó su uso en la producción de cerdos, aves, bovinos, en la acuicultura y apicultura, contra enfermedades gastrointestinales causadas por *Escherichia coli*, *Salmonella*, otras bacterias y protozoarios. Al mismo

tiempo se utilizaron ampliamente como aditivos en los alimentos como promotores de crecimiento (Draisci et al., 1997; Finzi et al., 2005).

A mediados de los años 90's, el quinto miembro de esta familia de NF, el NFS, empezó a utilizarse ampliamente debido a la prohibición de los cuatro NF, empleándose específicamente para el tratamiento de histomoniasis en pavos (Vahl, 2005).

No obstante, algunos estudios demostraron que los NF pueden ser carcinogénicos en ratas y citotóxicos para células de mamíferos en cultivo, lo que sugiere que este potencial toxicológico pone en riesgos la salud del consumidor debido a la ingesta de productos de origen animal contaminados con FZD u otros NF (Draisci et al., 1997). Además, otra causa de riesgo a la salud por la presencia de residuos de NF en los alimentos, es el incremento de resistencia bacteriana a estos antibióticos ya que en México, aún se continúan utilizando en medicina humana (Niyogi et al., 1995).

### **Resistencia bacteriana asociada a furazolidona**

En 1984, investigaciones realizadas mostraron bajos niveles de resistencia a FZD en comparación con otros antibióticos. Sin embargo, brotes de enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella*, *E. Coli* y *Vibrio colerae* han aparecido por el uso indiscriminado de FZD y otros NF en la producción de cerdos y otras especies destinadas al consumo humano (Townson et al., 1994).

Otros estudios realizados comprobaron que FZD a concentraciones por debajo de la dosis letal de algunos microorganismos lograron adaptarse, adquiriendo resistencia a dosis terapéuticas del antibiótico (Basak, 1995).

Niyogi et al. (1995), aislaron cepas de *Vibrio colerae* 01 obtenidas de pacientes diagnosticados con cólera, donde encontraron que estas cepas eran resistentes a FZD, lo que generó un problema, ya que FZD era el único antibiótico utilizado en mujeres embarazadas y niños diagnosticados con cólera.

En Portugal el uso ilegal de NF en la producción avícola ha contribuido a la prevalencia de *S. enteritis* en el músculo de las aves y por consecuencia a la presencia de salmonelosis en humanos. Además, se cree que el uso indiscriminado de NF pudo ser la causa de la multiresistencia de dos clones de *Salmonella typhimurium*, que han sido diseminados en este país (Antunes et al., 2006).

### **Residuos de furazolidona unidos a las proteínas**

La unión proteína-residuo se define como aquellos residuos que no son extraídos de los tejidos utilizando medios acuosos o solventes orgánicos (Pereira et al., 2004). Estudios realizados con cerdos mostraron que mediante el metabolismo propio del animal, los NF presentan una reducción del grupo nitro en el anillo furano, dando lugar a la formación de compuestos intermedios reactivos, capaces de formar enlaces covalentes con los aminoácidos de las

proteínas y de esta forma transferirse de un órgano a otro (Hoogenboom et al., 2002).

Investigaciones realizadas en tejidos de cerdo (hígado, riñón y músculo) que fueron tratados con FZD indicaron que la concentración total del metabolito AOZ no disminuyó una vez que el tejido fue sometido a diferentes tratamientos térmicos como el freído, asado o cocinado en microondas (Cooper y Kennedy, 2007).

Los residuos de AOZ que se encontraron en los tejidos fueron biológicamente activos una vez que fueron consumidos por una segunda especie, estos residuos fueron absorbidos y metabolizados derivando en la formación de  $\beta$ -hidroxietilhidrazina (HEH), la cual es una molécula con propiedades carcinogénicas. Esto demuestra la necesidad de monitorear los residuos de FZD en alimentos, para descartar la presencia de residuos perjudiciales a la salud de los consumidores (McCracken y Kennedy, 1997a; McCracken et al., 2001).

A través de los años se han llevado a cabo diversas investigaciones en muestras de tejidos de cerdos tratados con FDZ. McCracken y Kennedy (1997b), analizaron muestras de hígado de cerdos que habían sido tratados con FZD a dosis terapéuticas por un período de 5 días y mantenidas en refrigeración de 0 a 48 h obteniendo intervalos de concentración entre 697-1001 ng g<sup>-1</sup> y 1435-1840 ng g<sup>-1</sup> de AOZ unido a proteínas y AOZ en forma libre respectivamente.

McCracken et al. (2000) obtuvieron concentraciones de  $3.0 \text{ ng g}^{-1}$  de residuos de AOZ en muestras de bilis de cerdos a los cuales se les administró FZD y una concentración de  $0.3 \text{ ng g}^{-1}$  en cerdos que no habían recibido el tratamiento pero que estuvieron en contacto con los animales tratados, señalando que no es posible establecer diferencia si los residuos de AOZ corresponden a animales tratados o se debe a una contaminación por contacto con animales que fueron tratados con el antibiótico. Se argumentó además, que este riesgo puede ocurrir durante el transporte o en la planta de sacrificio donde los cerdos son expuestos a un ambiente contaminado con FZD, aún cuando la exposición sea por un periodo de 2 h (McCracken y Kennedy, 1997c).

Posteriormente, Leitner et al. (2001), llevaron a cabo un estudio en el cual los cerdos fueron alimentados con dietas conteniendo nitrofuranos (entre ellos FZD) a dosis aproximadas de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso del animal y fueron administradas de 3 a 4 porciones por día. Al tercer día, los cerdos fueron sacrificados y el músculo fue analizado obteniendo una concentración de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  de residuos de AOZ.

Hoogenboom et al. (2002) administraron a cerdos dosis de FZD de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal por dos días, con la finalidad de investigar la ruta que seguía el metabolito AOZ en forma libre en el tracto gastrointestinal, al tercer día se les administró una dosis única de  $250 \text{ mg}$  de AOZ. Posteriormente, la



medición de los residuos se llevó a cabo en muestras de sangre, donde se encontraron concentraciones superiores a  $0.03 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Cooper y Kennedy (2005), realizaron un estudio similar, en lechones de ocho semanas de edad a los cuales les fueron administradas dosis terapéuticas de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de nitrofuranos durante 10 días, entre ellos, FZD. Al décimo día fue suspendido el tratamiento y los días restantes hasta el sacrificio los lechones fueron alimentados normalmente (sin el antibiótico). Se lograron detectar niveles de 3 a  $11 \text{ mg kg}^{-1}$  de residuos de AOZ en un período de 0 a 6 semanas después de suspender el tratamiento.

### **Toxicidad de la furazolidona**

Los ensayos toxicológicos realizados tanto *in vitro*, como *in vivo*, demostraron que FZD tiene la capacidad de alterar al DNA de las células, formar tumores en tejidos sanos y provocar alteraciones en el desarrollo embrionario (González, 2006).

Además, el mayor inconveniente del empleo de FZD y del resto de los NF en la producción de los animales para consumo humano, es el potencial que poseen de promover la formación de tumores, o bien, el efecto carcinogénico que ocasionan (Smith et al., 1998).

Hoogenboom et al. (1991), reportan que *in vitro*, FZD y su metabolito AOZ inhiben la acción de la enzima monoaminooxidasa (MAO) en hepatocitos de cerdos, de manera reversible. En ratas tratadas con FZD y AOZ por vía oral,

está inhibición se presenta principalmente en hígado y cerebro. Sin embargo, al ser administrada FZD por vía intramuscular no existe tal efecto, por lo que se considera que en el tracto gastrointestinal (GI) esta involucrado directamente.

El metabolito de  $\beta$ -hidroxietilhidrazina (HEH), una cantidad de este metabolito es formado por la biotransformación de AOZ y responsable de las propiedades cancerígenas de la droga (Klee et al., 1999), el cual inhibe de manera irreversible la acción de la MAO, lo que causa el incremento de 5-hidroxitriptamina en el cerebro que estimula el potencial vasopresor de la tiramina (Ali y Bartlet, 1982; Timperio et al., 2003).

Otros metabolitos formados durante la biotransformación de FZD no son significativamente tóxicos ya que son metabolizados a su forma inactiva. Aproximadamente el 65% de los residuos se unen a proteínas y aproximadamente el 12% del total de estos residuos corresponde a la formación de AOZ. Como el metabolismo de los residuos continúa, el contenido total de residuos en el hígado disminuye y la proporción de los residuos de AOZ se incrementa hasta un 83% en periodos de retiro de hasta 6 semanas (O'Keeffe et al., 2006).

Un aspecto importante es que los metabolitos biológicamente activos como AOZ persisten en los tejidos utilizados como alimentos y pueden ser detectados 6 semanas después del tratamiento con FZD. Los residuos de AOZ son un indicativo de que los animales fueron tratados con la droga original (Verdon et al., 2007).

Jager et al. (1997), reportaron que el tratamiento con FZD interfiere con las enzimas mitocondriales. Estudios *in vitro* con NF (NFT, FZD y FTD), mostraron que estas drogas inhiben la producción/liberación de aldosterona y de otros corticoides, en el caso de corticosterona y cortisol disminuyeron hasta un 50% solo en deoxicortisol no hubo cambios, para progesterona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona se observaron incrementos de más del 200%, traducándose esto en alteraciones en la calidad seminal y espermatogénesis (Peralta et al., 2003).

En base a los resultados de los estudios toxicológicos, se llegó a la conclusión que el empleo de FZD y del resto de los NF, en la producción de animales destinados al consumo humano, no es seguro ya que ponen en riesgo la salud del consumidor debido a la ingesta de estos alimentos contaminados con residuos de NF y sus metabolitos (Gao et al., 2007).

### **Regulación sanitaria relacionada con la furazolidona**

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y los gobiernos de diferentes países, se han planteado la cuestión del uso de estos fármacos, entre ellos NF, en todos los sectores de la producción, con especial referencia a los riesgos potenciales para la salud pública. Muchos gobiernos han introducido, modificado o fortalecido los reglamentos nacionales sobre el empleo de medicamentos en los sistemas de producción (FAO, 2002).

En 1992, JECFA fracasó en establecer una Ingesta Diaria Admisible (ADI) o un Límite Máximo de Residuo (MRL) para FZD, ya que se basaron en la evidencia de que este compuesto posee actividad carcinogénica y genotóxica; además de carecer de datos relacionados con la cantidad y toxicidad de sus metabolitos, incluyendo los unidos a las proteínas; esto mismo ocurrió con NFZ (Hormazábal y Asp, 2004).

Debido a esto la UE empezó a cuestionarse el uso de estas drogas en la práctica veterinaria, pero no fue sino hasta 1993 cuando fueron prohibidos FTD, NFT, NFZ y enlistados en el Reglamento (CEE) 2901/93, el cual no incluía a FZD y concedía la autorización de su uso. Sin embargo, debido a la escasez de datos que comprobaran la seguridad de la droga y sus metabolitos, se concluyó que no había ningún dato favorable ni justificable para permitir el uso de FZD en la medicina veterinaria, por lo que fue prohibida en 1995 por la Comisión de Regulación 1442/95 (Cooper et al., 2005).

Por lo que UE, estableció límites mínimos de funcionamiento exigidos (MPRL) de  $1 \text{ ng g}^{-1}$  para el metabolito de FZD y el resto de los NF, con el fin de garantizar el mismo nivel de protección en los países de la UE. Este límite ha servido como base al resto de los países, principalmente aquellos que exportan alimentos a la UE (Decisión de la Comisión 2003/181/CE).

En 1992, países como Australia y Japón impidieron el uso de los NF en la producción de alimentos, ya que al no poder establecer los Límites Máximos de Residuos (MRLs) implementaron "Cero tolerancia de estos residuos en

alimentos”. En EUA se prohibió el uso de FTD y el resto de los NF seguían siendo autorizados, FZD y NFZ fueron prohibidos para uso tópico 10 años después. En el año 1999, Tailandia al igual que Japón no pudieron establecer MRLs por lo que se frenó la importación y uso de FZD y NFZ en la producción de alimentos. En el año 2002 se extendió la prohibición de uso a todos los NF (FAO, 2004b).

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) es el órgano encargado de crear normas y vigilar la inocuidad de los alimentos de origen animal o vegetal, en el caso de los NF solo se limita la prohibición oficial en acuicultura, dejando a otros sectores como la porcicultura la posibilidad de utilizar estos fármacos (SAGARPA, 2004).

En 1994, la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) decretó a través del Diario Oficial de la Federación, la Norma Oficial Mexicana (NOM-004-ZOO-1994), en la cual se dan las especificaciones para el control de residuos tóxicos en carne y vísceras de bovinos, equinos, porcinos y ovinos provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país. Esta norma fue modificada en 1996, sin contemplar los residuos de FZD y sus metabolitos, pero actualmente se encuentra en proceso de modificación con la finalidad de establecer una tolerancia de residualidad de cero para furazolidona y sus metabolitos en tejidos animales (NOM-004-ZOO-1996).

Las autoridades de los diferentes países han elaborado programas de vigilancia y control de residuos tóxicos en alimentos de origen animal para garantizar la inocuidad y calidad de estos productos. Dicho monitoreo se lleva a cabo en los alimentos cárnicos de importación y en los producidos en el país para garantizar que estas leyes y reglamentos sean cumplidos (FAO, 1996).

### **Alerta sanitaria por presencia de residuos de furazolidona en carne de cerdo**

Cualquier concentración de FZD y/o su metabolito, detectada en los alimentos es considerada una violación a la ley (Conneely et al., 2002). Por lo que durante el año 2004, se realizó un monitoreo de los metabolitos de los NF en carne de cerdo al detalle ( $n=1500$ ) en diferentes puntos de venta, en 15 países de Europa, durante el periodo de abril a septiembre de 2002. Lograron detectar metabolitos de FZD y FTD en 0.8 % de las muestras analizadas (O'Keeffe et al., 2004).

En el año 2004, se notificó mediante el Sistema de Alerta Rápida para Productos Alimentarios, la detección de metabolitos de FZD en carne de cerdo proveniente de Italia (Cooper et al., 2004).

En Portugal, en el año 2002 se encontraron residuos de AOZ en productos avícolas, lo que llevó a la destrucción de 1.5 millones de aves. En la UE se encontraron residuos de NF en productos acuícolas procedentes de Taiwan, China, Bangladesh, India, Indonesia y Tailandia, importados de la

India, Brasil, Israel, Francia y México, así como en miel procedente de Vietnam y Argentina (Cooper y Kennedy, 2007).

Datos del Ministerio de Agricultura de Brasil reportaron la identificación de los metabolitos AOZ y AMOZ en carne de aves de corral destinada al consumo humano e importada a Brasil durante los años 2002 y 2003 (Decisión de la comisión 2002/794/CE; Pereira et al., 2004). En México, durante el año 2006, se encontraron metabolitos de FZD y FTD en el 4.5% del total de muestras de músculo de cerdo analizadas (SAGARPA, 2007).

### **Contaminación durante la producción de carne de cerdo**

En algunos países, el uso de FZD y del resto de los NF no está prohibido en la producción de alimentos de origen animal destinados para el comercio nacional, pero si lo esta para aquellos productos destinados a la UE. Esta situación aumenta la posibilidad de que los alimentos destinados a la exportación provengan de animales alimentados con dietas contaminadas. En Tailandia, se han detectado NF en premezclas vitaminadas y medicamentos sin etiqueta que fueron colectados durante 3 años (McCracken et al., 2005a).

La presencia de AOZ en tejidos animales, puede no solo ocurrir por el tratamiento directo de FZD, sino también por la contaminación de alimentos que son administrados a cerdos no tratados ó por la contaminación de los mismos corrales, durante el transporte y en el rastro donde los cerdos son sacrificados (Leitner et al., 2001).

McCracken et al. (2000), reportaron que es posible diferenciar entre los cerdos que han sido tratados con FZD de aquellos que estuvieron en contacto con alguna fuente de contaminación con este antibiótico. El indicativo está dado por el cociente entre las concentraciones de AOZ en bilis/riñón, para los animales que fueron contaminados, el valor debe ser menor a 0.3 y un valor mayor a 3 será para los cerdos que fueron tratados con FZD.

En otros sectores de producción, como el de las aves, se encontró que en pollos que fueron alimentados con concentraciones muy bajas de FZD (0.01% de la dosis terapéutica), se alcanzaron niveles de AOZ de  $1.1 \pm 0.2$  y  $0.33 \pm 0.3$  ng g<sup>-1</sup> en hígado y músculo, respectivamente. Para conocer el potencial de contaminación de los NF en el ambiente, se colocaron pollos en un gallinero que fue previamente ocupado por aves que habían sido tratadas con FZD a 3000 ng g<sup>-1</sup>. 24 h después de haber sido expuestos los pollos, se encontraron residuos de AOZ en concentraciones de  $0.13 \pm 0.04$  y  $0.10 \pm 0.03$  ng g<sup>-1</sup> en hígado y músculo, respectivamente (McCracken et al., 2005b).

McCracken et al. (2005a), llevaron a cabo una investigación para determinar si los residuos de NF (entre ellos FZD) podían transferirse de pollos que fueron tratados a sus crías, encontrando que los huevos de éstos presentaban concentraciones de AOZ menores a 1567 ng g<sup>-1</sup>. Sin embargo, una vez nacidas las crías esta concentración disminuía hasta ya no detectarse después de 21 días de nacidos, esto fue debido a una combinación de factores, por un lado se dio una dilución por el incremento en la masa corporal



y otro factor fue la disminución debida a la excreción gradual de los metabolitos por las crías.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Localización del área de estudio**

Los cerdos fueron obtenidos de un sistema de cría intensivo en las instalaciones del Modelo Experimental de Producción Porcina del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. El sacrificio se realizó en la planta Tipo Inspección Federal (TIF) No. 54, localizada en Mexicali, B. C. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Biológicos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., ubicado en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

### **Duración del estudio**

El período de experimentación y análisis de las muestras en el laboratorio comprendió a partir del mes de Octubre de 2007 a Mayo de 2008.

### **Naturaleza de la población**

Se emplearon 60 cerdos sanos (entre machos castrados y hembras) castrados de la raza *York x Ladrance*, con un peso promedio al sacrificio de  $90 \pm 1$  Kg.

## **Origen de las muestras**

Los cerdos fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 12 cerdos cada uno. A cada cerdo se le suministró de manera experimental una dosis única de 5 mL de NF-180 basados en la recomendación del fabricante, esta dosis equivale a 0.55 mg de furazolidona por Kg de peso vivo del animal vía oral (o bien 550 ng g<sup>-1</sup>). Cada uno de los grupos fue sacrificado a diferentes tiempos: 3 y 24 h; 5, 7 y 10 días después de la administración de la dosis de furazolidona.

Un total de 180 muestras de hígado, riñón y músculo con un peso promedio de 100 g fueron tomados después del sacrificio de los cerdos, empacados, etiquetados y almacenados a -20 °C para posteriormente ser transportadas al laboratorio donde fueron almacenadas a la misma temperatura hasta su análisis.

## **Metodología**

Se empleó el método propuesto por Finzi et al. (2005) con algunas modificaciones, como fueron ajustar el pH a 7.0 empleando K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 M y NaOH 2.0 M. La extracción de 3-amino-2-oxazolidona (AOZ) se llevó a cabo adicionando 5 mL de acetato de etilo grado cromatográfico (J. T. Baker, Inc. USA) y repitiendo esta operación dos veces. El extracto se llevó a sequedad total en un baño de agua a 40°C y aire comprimido. El extracto seco fue resuspendido con 1 mL de fase móvil, que consistió en acetato de amonio 0.1

M a pH 7.4 y acetonitrilo (70:30, v/v), se agitó por 20 seg empleando un vortex (Thermolyne, Maxi mix II tipo 37600) y posteriormente se filtró con acrodisc de 13 mm (Acrodisc PTFE, Gelman) con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , el eluato fue colectado en un vial de 2 mL color ámbar. Todos los reactivos utilizados en el análisis fueron grado cromatográfico.

### ***Protocolo de validación de la metodología para la determinación de AOZ y aseguramiento de la calidad de los resultados***

La metodología empleada en esta investigación se desarrolló en base al Procedimiento de Validación de Métodos de Prueba (2008), el cual incluye los parámetros de sensibilidad, linealidad, precisión y exactitud. Cada uno de estos parámetros fue evaluado en los diferentes tejidos de músculo, hígado y riñón. Los resultados de la validación de la metodología fueron los siguientes:

***Sensibilidad:*** El Límite de detección (LD) para el compuesto de AOZ fue de  $1 \pm 0.03 \text{ ng mL}^{-1}$  con un %CV de 3.0%, este LD coincide con el límite mínimo de funcionamiento exigido por la UE de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  (Decisión 2002/657/CE). Para el Límite de cuantificación (LC) se estableció un nivel de  $3.76 \pm 0.17 \text{ ng g}^{-1}$  con un porcentaje de coeficiente de variación %CV de 3.45%.

***Linealidad:*** Para el parámetro de linealidad del sistema se obtuvo un valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) de  $0.9979 \pm 0.0024$  con un %CV de 0.24% el cual indicó que la metodología utilizada para la determinación de AOZ fue lineal en un intervalo de concentración de 1 a  $8 \text{ ng mL}^{-1}$  (Jenke, 1996).

**Exactitud y precisión:** La evaluación se realizó mediante la obtención del %R en muestras adicionadas con el estándar de AOZ, en los tres tejidos. El valor promedio de %R obtenido para hígado, riñón y músculo fue de 72.72%, 85.85% y 94.13%, respectivamente. La precisión evaluada mediante el parámetro de repetibilidad se obtuvo %CV de 0.03, 0.04 y 0.05 para músculo, riñón e hígado, respectivamente. El %R y los %CV obtenidos se encuentran dentro de la especificación del método que son de %R 70-130% y %CV≤20% (USDA, 2001). Lo que demuestra la exactitud y precisión del método.

En todos los análisis realizados para la determinación de AOZ en los distintos tejidos de los cerdos tratados, se incluyó un blanco reactivo y una muestra blanco (control negativo) y una muestra adicionada con una concentración de AOZ de 4 ng g<sup>-1</sup> de AOZ (control positivo) para evaluar el %R de cada análisis. Esto con la finalidad de mantener un aseguramiento de la calidad en los resultados generados.

Los estándares y muestras adicionadas a una concentración conocida, que se utilizaron en los análisis, fueron preparados partiendo de alícuotas de una solución de trabajo de AOZ a una concentración de 12.5 ng mL<sup>-1</sup> preparada en metanol. Esta solución se preparó partiendo de un estándar puro de AOZ con una pureza de 99.4% (Vetranal, Rediel-Haen), disuelto en metanol grado cromatográfico (J. T. Baker, Inc. USA).

El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) Varian Modelo 9010 (Varian Instrument

Inc., Palo Alto, CA.), una columna Zorbax 300SB C<sub>18</sub> con tamaño de partícula de 3.5 µm de 100 x 2.1 mm de diámetro interno en fase inversa (Agilent, Technologies, Inc.) y un volumen de inyección de 100µL. La fase móvil consistió en una mezcla de acetato de amonio 0.1 M a un pH 7.4 y acetonitrilo (70:30, v/v) a un flujo de 0.3 mL min<sup>-1</sup> con una bomba terciaria. Se empleó un detector UV-Vis Varian, Modelo 9050 (Varian Instrument Inc. Palo Alto, CA.) con lámpara de deuterio a una longitud de onda de 275 nm. El cromatógrafo de líquidos se acopló a una computadora Intel Inside con procesador Celeron y un monitor Lanix Modelo 521 X. El programa computacional utilizado fue el Star LC Chromatography Workstation Ver. 5.

### **Variable evaluada**

La concentración del metabolito de AOZ en cada uno de los tejidos fue evaluada mediante la respuesta obtenida de la respuesta cromatográfica, calculando el área bajo la curva del pico cromatográfico correspondiente a AOZ el cual es proporcional a la concentración del analito (USDA, 1991; Palma et al., 2006)

### **Análisis estadístico**

Con los datos de las concentraciones obtenidos del análisis de las muestras fueron analizados mediante estadística descriptiva obteniendo media ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (*DE*) y el coeficiente de variación porcentual (%*CV*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras de tejidos de hígado, riñón y músculo obtenidas del bioensayo realizado con los cerdos, tomadas en los tiempos 3 y 24 h, 5, 7 y 10 días posteriores a la administración de furazolidona (FZD), no se detectó la presencia de residuos de 3-amino-2-oxazolidona (AOZ). La dosis administrada de FZD vía oral a los cerdos fue de  $550 \text{ ng g}^{-1}$ , observándose que aún en tiempos de retiro menores a 24 h, con un límite de detección (LD) de AOZ de  $1 \text{ ng g}^{-1}$ , la acumulación del metabolito de AOZ se dio a un nivel menor a esta concentración ( $1 \text{ ng g}^{-1}$ ), o bien, no se dio.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden deberse a que la dosis administrada de FZD fue única, ya que McCracken et al. (1997), reportan que al administrar dosis de  $0.5 \text{ mg Kg}^{-1}$  de FZD a cerdos, por al menos 5 días en el alimento, son suficientes para que sean detectados concentraciones de AOZ en hígado y riñón por arriba de  $600 \text{ ng g}^{-1}$ , mientras que en músculo solo son detectados cuando se administran concentraciones de FZD mayores a  $2.3 \text{ mg Kg}^{-1}$ , como aditivo en los alimentos.

En otras investigaciones, la administración de FZD a los cerdos fue a dosis terapéuticas a través del alimento ( $400 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) hasta por 5 días y los tiempos de retiro en un intervalo de 0 a 6 semanas. Bajo estas condiciones, reportaron que las concentraciones de AOZ son mayores en hígado y riñón por arriba de los  $1000 \text{ ng g}^{-1}$  en tiempos de retiro menores a una semana.

Conforme avanza el tiempo de retiro, estas concentraciones de AOZ disminuyen en hígado y riñón y se incrementan en músculo permaneciendo constantes (McCracken et al., 1997; McCracken y Kennedy, 1997a; Cooper y Kennedy, 2005).

La diferencia de los resultados de estos estudios, comparado con lo encontrado en nuestra investigación, puede ser debida a la forma de administración de FZD. Los estudios señalados, realizaron la medicación vía oral a través del alimento, y en este trabajo se realizó aplicando la dosis directamente vía oral como una suspensión.

Otros estudios enfatizan la importancia que tiene la temperatura de almacenamiento de los tejidos sobre las concentraciones de AOZ presentes en las muestras, ya que éstas pueden disminuir hasta un 27% al ser almacenadas a 4°C por más de 48 h (McCracken y Kennedy, 1997c; Cooper y Kennedy, 2007). En este estudio, las muestras fueron almacenadas en un tiempo promedio de 5 días a 20°C antes de su análisis. Por lo que la temperatura de almacenamiento de los tejidos en este estudio, no pudo ser una causa por la que no se detectara la presencia de AOZ en las muestras, ya que la temperatura a la que se almacenaron los tejidos hasta su análisis fue de -20°C, con el fin de asegurar la preservación del analito por varios meses. Por lo que se considera que no existieron pérdidas de la concentración de AOZ en los tejidos durante el período de almacenamiento.



## CONCLUSIONES

No se detectaron residuos del metabolito de AOZ en las muestras de músculo, hígado y riñón de cerdos tratados con FZD con una dosis única vía oral, administrada a las 3 y 24 h y a los 5, 7 y 10 d de retiro. Lo que demuestra que a una dosis única de 0.55 mg por Kg de peso las concentraciones del metabolito de furazolidona AOZ son menores a  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ ,

## LITERATURA CITADA

- Ali, B. H. and A. L. Bartlet. 1982. Inhibition of monoamine oxidase in chickens and ducklings by a microbial metabolite of furazolidone. *Q. J. Exp Physiol.* 67:69-79.
- Antunes, P., J. Machado, and L. Peixe. 2006. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* *Clin. Microbiol. Infect.* 12(11):1047-1049.
- Basak, J. 1995. Inter-strand cross-linking of *Vibrio cholerae* DNA induced by furazolidone: a quantitative assay by four simple methods. *Mutation research* 327:5-15.
- Conneely, A., A. Nugent and M. O'Keeffe. 2002. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues. *Analyst.* 127:705-709.
- Cooper, K. M., C. T. Elliot and D. G. Kennedy. 2004. Determination of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurano furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay. *Food Additives and Contaminants* 21(9)841-848.
- Cooper, K. M. and D. G. Kennedy. 2005. Nitrofurano antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs-a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse. *Analyst.* 130, 466-468.
- Cooper, K. M., P. P. J. Mulder, J. A. Rhijn, L. Kovacsics, R. J. McCracken, P. B. Young and D. G. Kennedy. 2005. Depletion of four nitrofurano antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissue and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV. *Food additives and Contaminants* 22(5):406-414.
- Cooper, K. M. and D. G. Kennedy. 2007. Stability studies of metabolites of nitrofurano antibiotics during storage and cooking. *Food Additives and Contaminants* 24(9):935-942.
- Decisión de la Comisión 2002/794/CE. Relativa a determinadas medidas de protección con respecto a la carne de aves de corral, los productos a base de carne de aves de corral y los preparados a base de carne de aves de corral destinados al consumo humano e importados de Brasil.
- Decisión de la Comisión 2003/181/CE. Establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen animal.

- Draisci, R., G. Luigui, L. Luca, P. Luca, B. Gianfrasco, S. Luigi, and G. Pasquale. 1997. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 777:201-211.
- Edder, P., Vargas S., Ortelli D. and Corvi, C. 2003. Análisis of nitrofurans metabolites in food by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *Clin. Chem. Lab. Med.* Berlin, New York. 41(12):1608-1614.
- Escobedo, C. 2004. Available: [http://148.243.4.124/conapeme/manual\\_antibioticos/nitrofuranos.pdf](http://148.243.4.124/conapeme/manual_antibioticos/nitrofuranos.pdf) access Juny, 9. 2007.
- FAO. 1996. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. 14: La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Químico de Control de los Alimentos. (Estudio FAO: Alimentación y Nutrición -14/14]
- FAO. 2002. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Available: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s00.htm>. access Juny 7. 2006
- FAO. 2004a. Producción y Sanidad Animal: Uso de antimicrobianos en animales de consumo, Incidencia del desarrollo de resistencia en salud pública. Argentina.
- FAO. 2004b. Technical workshop on residues of substances without ADI/MRL in food. Bangkok, Thailand. <http://www.fao.org/docrep/008/y5723e/y5723e00.htm#Contents>. Access May 11. 2007.
- FAO/OMS. 2005. Conferencia regional FAO/OMS Inocuidad de los alimentos para las Américas y el Caribe. San José, Costa Rica.
- Finzi, K. J., D. J. Luis, S. Mauro and D. N. Gilberto. 2005. Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 824: 30–35
- Food Standards Australia New Zealand. 2004. Nitrofurans in prawn: A toxicological review and risk assessment. Tec. Report series No.31. Available: [http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/31\\_Nitrofurans%20in%20prawns\\_e dit.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/31_Nitrofurans%20in%20prawns_e dit.pdf). Accessible: February, 18. 2007.
- Gao, A., Q. Chen, Y. Cheng, J. Lei and L. Zeng. 2007. Preparation of monoclonal antibodies against a derivative of semicarbazide as a metabolic target of furazolidone. *J. Anal. Chim.* 592:58-63.

- González, H. I. 2006. Nitrofuranos, un problema de salud. Sus aplicaciones en la producción animal y los métodos de detección en alimentos. Tesis Lic. Sonora, México.
- Gottshall, W. D. and R. Wang. 1995. Depletion and bioavailability of [<sup>14</sup>C]Furazolidone residues in swine tissue. *J. Agric. Food Chem.* 43:2520-2525.
- Hoogenboom, L. A. P., O. Tomassini, M. B. M. Oorsprong and H. A. Kuiper. 1991. Use of pig hepatocytes to study the inhibition on monoamine oxidase by furazolidone. *Fd Chem. Toxic.* 29(3):185-191.
- Hoogenboom, L. A. P., D. Gerard., S. Kim, I. C. Enninga, A. Johannes, H. Henri, B. M. Margot, O. Huveneers, C. M. Jan and A. K. Harry. 2002. Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11:273-287.
- Hormazábal, V. y Asp T. N. 2004. Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in meta by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. of Liq. Chrom. & Related tech.* 27(17):2759-2770.
- International Programme on Chemical Safety, Inchem. 2006. Furazolidone (WHO Foods Additives Series 31). Available: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je06.htm>. Accessed: Dicember, 4. 2006.
- Jager, P. L., G. J. de Graaf and H. C. Widjaja-Greefkes. 1997. Differential effects of nitrofurans on the production/release of steroid hormones by porcine adrenocortical cell in vitro. *Eur J. Pharmacol.* 331:325-331.
- Jenke, R. D. 1996. Chromatographic method validation: A review of current practices and process. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 19(5):737-757.
- Klee, S., Baumung, I., Kluge, K., Ungemach, F. R., Horne, E., O'Keeffe, M., De Angelis, I., Zucco. F. and Stamatati, A. 1999 A contribution to safety assessment of veterinary drug residues, in vitro intestinal toxicity and transport of covalently bound residues. *Xenobiotica*, 29:641-654.
- McCracken, R.J., M.A McCoy and D.G. Kennedy. 1997. The prevalence and possible causes of bound and extractable residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues. *Food Additives and Contaminants*, 14:287-294.

- McCracken, R. J. and D. G. Kennedy. 1997a The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effect of cooking upon residue concentrations. *Food Additives and Contaminants*, 14(5): 507-513.
- McCracken, R. J. and D. G. Kennedy. 1997b. Determination of the furazolidone, 3-amino-2-oxazolinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometric and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J. Chromatogr. B*. 691:87-94
- McCracken, R. J. and D. G. Kennedy. 1997c. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. 771:349-354.
- McCracken, R. J., M.A McCoy and D.G. Kennedy. 2000. Furazolidone residues in pigs: criteria to distinguish between treatment and contamination. *Food Additives and Contaminants*, 17(1):75-82.
- McCracken, R. J., D. E. Spence, S. D. Floyd and D. G. Kennedy 2001. Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in eggs. *Food Additives Contaminants* 18(11):954-959.
- McCracken, R. J., J. A. Van Rhinj y D. G. Kennedy. 2005b. Transfer of nitrofurans residues from parent broiler breeder chickens to broiler progeny. *Food Additives and Contaminants*, 46(3): 287-292.
- McCracken, R. J., J. A. Van Rhinj y D. G. Kennedy. 2005a. The occurrence of nitrofurans metabolites in the tissues of chickens exposed to very low dietary concentrations of the nitrofurans. *Food Additives and Contaminants*, 22(6): 567-572.
- Monasterios, M., E. Marilu y A. Milagros. 2005. Conformational analysis, electronic properties and molecular electrostatic potential of nitrofurans derivatives with antibacterial activity. *J. of Molecular Struct.* 748:49-55.
- Mottier, P., K. Sea-Ping, G. Eric, R. Janique, D. Thierry, G. Till y A.G. Philippe. 2005. Quantitative determination of four nitrofurans metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1067:85-91
- Niyogi, S. K., P. G. Sengupta, S. K. Bhattacharya, S. Garg, A. K. Mukhapadhyay y G. B. Nair. 1995. Emergence of furazolidone and co-trimoxazole resistant vibrio cholerae 01 in eastern India. *J. Infect* 30:265-266.

- NOM-004-ZOO-1994. Norma Oficial Mexicana de Control de Residuos Tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. Pub 11 de agosto 1996.
- O'Keeffe, M., A. Conneely, K. M. Cooper, D. G. Kennedy, L. Kovacsics, F. Andrea, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn y G. Trigueros. 2004. Nitrofurán antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey. *J. Anal. Chim.* 520:125-131.
- O'Keeffe, M., C. Anne, N. Audrey y D. Ashtown. 2006. Nitrofurans: Measuring tissue bound residues in meat. Teagasc Final Report No. 4848.
- Palma, C., C. Godoy, M. Arboix and R. Pérez. 2006 2006 Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. *Arch. Med. Vet.* 38:3
- Peralta, M. F., R. D. Mizzo y A. B. Vivas. 2003. Efecto de la furazolidona sobre los funcionamientos espermatogénicos y endocrinos de testículos de pavo (*Meleagris gallopavo*). *RIA.* 32(2):63-78.
- Pérez, F. N. A., V. L. Salvador, G. T. Rey, D. G. Gilberto, H. M. Carmen y H. C. Martha. 2005. Residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas organofosforados en leche y derivados. *Revista Carnilac Industrial.* 19 (6):12-18. Available: <http://www.alfa-editores.com/carnilac/Dic%2004%20-%20Enero%2005/Residuos%20de%20medicamentos.pdf>. Accessed: April 27. 2007.
- Pereira, A. S., J. L. Donato y G. De Nucci. 2004. Implications of the semicarbamide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. *Food Additives and Contaminants*, 21(1):63-69.
- Prontuario de Especialidades Veterinarias. 2006-2007 cd rom 26/ed
- SAGARPA. 2004. Manual de buenas prácticas de producción en granjas porcícolas. México.
- SAGARPA. 2007. Programa mexicano de monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes en alimentos de origen animal 2007 y resultados del 2006.
- Smith, D. J., G. D. Paulson y G. L. Larsen. 1998. Distribution of radiocarbon after intramammary intrauterine, or ocular treatment of lactating cows with carbon-<sup>14</sup> nitrofurazone<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 81:979-988.
- Sumano, L. H. S y Ocampo C. L. 1997. Farmacología veterinaria (2ª Ed). McGraw Hill Interamericana.

- Timperio, A. M., H. A. Kuiper y L. Zolla. 2003. Identification of a furazolidone metabolite responsible for the inhibition of amino oxidases. *Xenobiotica* 33(2): 153–167.
- Townson, S. M., P. F. L. Boreham, P. Upcroft y J.A. Upcroft. 1994. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropica* (56):173-194.
- USDA. United States Department of Agriculture. 1991. Analytical Chemistry Laboratory Guidebook. Residue Chemistry. Science and Technology. FSIS. Washington, D.C.
- Vahl, M. 2005. Analysis of nifursol residues in turkey and chicken meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 22(2)120-127.
- Verdon, E., C. Pierrick and S. Pascal. 2007. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC. *Anal. Chim.* 586: 336–347