



Universitat de Girona

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Marta GRATACÓS CUBARSÍ

ISBN: 978-84-691-5739-8

Dipòsit legal: GI-780-2008

Universitat de Girona
Departament de Química



Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal

Marta Gratacós Cubarsí
Juliol 2007

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
IRTA-Monells
Unitat Química Alimentària



Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal

Marta Gratacós Cubarsí
Setiembre 2007

Tutor de la Tesis Doctoral
Dr J.A García Regueiro

Director de la Tesis Doctoral
Dr. M. Castellari

Dr. José Antonio García Regueiro, profesor asociado del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Girona y jefe de la Unidad de Química Alimentaria del IRTA Monells

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado “**Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal**” ha sido realizado por la licenciada en Farmacia Marta Gratacós Cubarsí en la Unidad de Química Alimentaria del IRTA Monells.

Y para que conste, firma la presente

Dr. José Antonio García Regueiro
Monells, Setiembre 2007

La Tesis Doctoral se ha realizado en la Unidad de Química Alimentaria del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-Monells) gracias a una beca predoctoral de formación de personal investigador (FPI) **BES-2003-0866** concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

El conjunto de trabajos realizados han sido posibles gracias a la financiación, por parte del MEC, de los proyectos **AGL-2002-04448-C-02-02** “Residuos de fármacos en los productos de origen animal: Propuestas para la simplificación de las metodologías analíticas” y **AGL-2002-04635-C-04-01** “Desarrollo de métodos rápidos para el control de corticosteroides en producción animal”.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr Massimo Castellari, Director de esta Tesis Doctoral y al Dr José Antonio García Regueiro en calidad de tutor, por su apoyo incondicional y su dedicación, así como por sus valiosas sugerencias, sin las cuales, no hubiera sido posible la elaboración de estos trabajos.

Igualmente quisiera agradecer al Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)-Monells y a su Director Josep Maria Monfort por dejarme realizar estos trabajos en este Instituto y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC) por la financiación de los proyectos AGL-2002-04635-C-04-01, AGL-2002-04448-C-02-02 y la beca BES-2003-0866.

Asimismo, hago extensivo mi agradecimiento a todos mis compañeros de la Unidad de Química Alimentaria, especialmente a la Dra. Carmen Sárraga y a la Dra María Hortós por sus muestras de interés y apoyo.

De igual manera, quiero agradecer el gran apoyo recibido por parte de todos los otros becarios, Núria, Bego, Anna, María, Pedro y a los compañeros de la Estación Experimental del IRTA del Prat de Llobregat.

Por último, me gustaría resaltar la paciencia y el cariño recibido por parte de Oriol, Jaume, Joan, Anna, Berta, Josep, Teresa, Xavi y Gemma.

A la meva àvia Anita

RESUMEN

La utilización de algunas sustancias antimicrobianas y algunos corticosteroides como promotores del crecimiento es una práctica ilegal en la UE.

El control de la administración de estos compuestos se realiza analizando muestras obtenidas en las granjas como la leche, huevos, orina y sangre o muestras obtenidas en el matadero como el tejido muscular, hepático, renal y adiposo.

Una nueva aproximación para la detección y el control de estas prácticas puede ser el análisis del pelo. Esta matriz presenta ciertas ventajas frente a las matrices convencionales, ya que además de ofrecer una fácil manipulación, almacenaje y transporte, proporciona un periodo útil de detección más amplio.

El análisis del pelo se ha utilizado en medicina forense, toxicología y en medicina del deporte para controlar el consumo de drogas de abuso y de agentes dopantes. Más de un centenar de compuestos, fundamentalmente drogas de abuso, agentes anabolizantes y psicofármacos se han detectado en pelo humano así como en el de algunos animales de producción y de carreras. En los últimos años, se ha observado la acumulación en pelo equino de algunos compuestos antimicrobianos de la familia de las sulfonamidas, quinolonas y β -lactámicos.

Aunque existan algunos trabajos publicados referentes al análisis de compuestos orgánicos en el pelo, hoy por hoy, los métodos analíticos así como los principales mecanismos por los cuales estas sustancias se acumulan, no están del todo claros ni bien definidos. Además, muchas sustancias no se han estudiado y de momento, se desconoce si se acumulan en el pelo.

En este trabajo se desarrollan protocolos de análisis rápidos y específicos para detectar residuos de sulfametacina (SMZ), enrofloxacino (ENR) y dexametasona (DEX) en pelo, músculo e hígado de animales de producción (vacuno y porcino). Asimismo, se confirma la deposición de estos compuestos en el pelo de animales tratados y se evalúa el pelo como matriz analítica y de control de la administración de estos compuestos en producción animal.

ABSTRACT

The use of antimicrobial substances and some corticosteroids as growth promoters is an illegal practice in the EU countries. Generally, the monitoring programs include the analysis of edible tissues (muscular, hepatic, renal and fat), but other biological samples are also used such as milk, eggs, urine, and blood, all of them obtained during different animal growing stages. A new approximation to detect and control these practices could be hair analysis. This matrix offers certain advantages if compared to conventional tissues, these advantages include an easier sample manipulation, keeping, transportation, and a larger window of detection.

Hair analysis has been used in forensic medicine, toxicology and sport medicine to control the consumption of drugs of abuse and doping agents. More than one hundred of compounds mainly drugs of abuse, doping agents and psychodrugs have been already detected in human and animal hair. Recently, the accumulation in hair of some antimicrobials (β -lactamics, quinolones, sulphonamides) has also been reported.

Although there are few articles dealing about the analysis of organic compounds in animal hair, nowadays, the analytical protocols as well as the mechanisms of drugs incorporation into hair are not well known and defined. A part from this, a lot of substances have never been studied before and their accumulation in hair is unknown.

The objectives of this work are to develop rapid and specific analytical protocols to detect residues of sulphamethazine (SMZ), enrofloxacin (ENR) and dexamethasone (DEX) in hair, muscle and liver of treated animals (cattle and pigs).

The accumulation of these compounds in the hair of treated animals as well as the evaluation of the hair as an analytical tool to control the administration of these compounds is studied and evaluated in this work.

Abreviaturas

APCI	Ionización química a presión atmosférica
CT's	Corticosteroides
CE	Electroforesis capilar
DAD	Detector de diodos
ELISA	Enzimainmunoensayo
ESI	Ionización por electrospray
FLD	Detector de fluorescencia
GC	Cromatografía de gases
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LC	Cromatografía líquida
LC-MS/MS	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas/masas
LLE	Extracción líquido-líquido
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas
MIP	Polímeros de huella molecular
MM	Modo mixto en extracción en fase sólida
NP	Fase normal
PABA	Ácido para-aminobenzoico
QA's	Quinolonas
RP	Fase reversa
SA's	Sulfonamidas
SCX	Intercambio catiónico en fase sólida
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Micro extracción en fase sólida
TLC	Cromatografía en capa fina o planar
WP	Withdrawal period (periodo de retirada)

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 EMPLEO DE PRODUCTOS VETERINARIOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	1
1.3 CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DE ABASTO	3
<i>Consecuencias para la salud humana.....</i>	<i>3</i>
<i>Problemas tecnológicos.....</i>	<i>5</i>
<i>Problemas en el medio ambiente</i>	<i>5</i>
1.4 LAS SULFONAMIDAS	7
1.4.2 <i>Estructura química</i>	<i>8</i>
1.4.3 <i>Farmacocinética y farmacodinamia.....</i>	<i>8</i>
1.4.4 <i>Utilización y posología en veterinaria</i>	<i>11</i>
1.4.5 <i>Problemas relacionados con la presencia de residuos de sulfonamidas en los alimentos.....</i>	<i>12</i>
1.5 LAS QUINOLONAS	13
1.5.1 <i>Historia de las quinolonas</i>	<i>13</i>
1.5.2 <i>Estructura química</i>	<i>13</i>
1.5.4 <i>Utilización y posología en veterinaria</i>	<i>16</i>
1.5.5 <i>Problemas relacionados con la presencia de residuos de quinolonas en los alimentos.....</i>	<i>16</i>
1.6 LOS CORTICOSTEROIDES	17
1.6.1 <i>Biosíntesis</i>	<i>17</i>
1.6.2 <i>Farmacocinética y farmacodinamia.....</i>	<i>17</i>
1.6.3 <i>Utilización y posología en veterinaria</i>	<i>19</i>
1.6.4 <i>Problemas relacionados con el empleo de corticosteroides.....</i>	<i>19</i>
1.7 CONTROL DE LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL	20
1.7.1 <i>Marco legal.....</i>	<i>20</i>
1.7.1.1 <i>Los Límites máximos de residuos</i>	<i>20</i>
1.7.1.2 <i>Planes Nacionales de control de residuos</i>	<i>21</i>
1.7.2 <i>Dificultades en el control de residuos</i>	<i>26</i>
1.8 EL ANÁLISIS DEL PELO PARA EL CONTROL DE RESIDUOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	28

1.9 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL	29
1.9.1 Métodos para el análisis de residuos de sulfonamidas en tejidos animales...	30
Extracción y purificación de las SA's	30
Detección de SA's	31
1.9.2 Métodos para el análisis de quinolonas en tejidos animales	33
Extracción y purificación de las QA's	34
Detección de QA's	35
1.9.3 Métodos para el análisis de dexametasona en muestras biológicas.....	36
Extracción y purificación de DEX	36
Detección de residuos de DEX	36
1.10 OBJETIVOS	39
1.11 BIBLIOGRAFÍA	40
<i>1.11.1 Referencias bibliográficas</i>	40
<i>1.11.1 Legislación: Reglamentos, Directivas y Decisiones</i>	57
2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
2.1RESULTADOS Y DISCUSIÓN GLOBALES	61
<i>2.1.1 Puesta a punto de metodologías analíticas para la detección de residuos de ENR, SMZ y DEX en distintos tejidos (pelo, hígado y músculo) de vacuno y porcino</i>	61
2.1.1.1 Métodos analíticos para la detección de SMZ, ENR y DEX en muestras de pelo de vacuno y porcino	61
2.1.1.1.1 Pre-tratamiento de la muestra y extracción	61
2.1.1.1.2 Purificación y detección	63
2.1.1.2 Métodos de Análisis para la detección de residuos de SMZ y ENR en las muestras de tejido	65
<i>2.1.2 Detección de residuos de SMZ, ENR y DEX en el pelo y otros tejidos obtenidos de animales tratados</i>	65
2.1.2.1 Acumulación de residuos de SMZ, ENR y DEX en el pelo animal	65
2.1.2.1.1 Cinética de deposición de los residuos de DEX, SMZ Y ENR en el pelo	67
2.1.2.1.2 Efecto del grado de pigmentación	68

2.1.2.1.3 Acumulación de metabolitos de SMZ, ENR y DEX en el pelo animal	69
2.1.2.2 Acumulación de residuos de SMZ y ENR en músculo e hígado de vacuno y porcino	70
2.1.2.3 Comparación de los niveles de residuos de SMZ, ENR y DEX en pelo, músculo e hígado de vacuno y porcino	71
2.2 DETECTION OF SULPHAMETHAZINE RESIDUES IN CATTLE AND PIG HAIR BY HPLC-DAD	73
2.3 A SIMPLIFIED LC-DAD METHOD WITH AN RP-C₁₂ COLUMN FOR ROUTINE MONITORING OF THREE SULFONAMIDES IN EDIBLE CALF AND PIG TISSUES.....	75
2.4 NOVEL APPROACH TO CONTROL SULFAMETHAZINE MISUSE IN FOOD-PRODUCING ANIMALS BY HAIR ANALYSIS	77
2.5 A RAPID HPLC-FLD METHOD FOR THE DETECTION OF QUINOLONES RESIDUES IN LIVESTOCK HAIR.....	79
2.6 ASSESSMENT OF ENROFLOXACIN AND CIPROFLOXACIN ACCUMULATION IN PIG AND CALF HAIR BY HPLC AND FLUORIMETRIC DETECTION.....	83
2.7 HAIR ANALISIS FOR THE RETROSPECTIVE DETECTION OF DEXAMETHASONE ADMINISTRATION IN CALVES.	85
2.8 BIBLIOGRAFÍA	91
2.8.1 <i>Referencias bibliográficas</i>	91
3.CONCLUSIONES.....	95
4. ANEXOS	97

1. Introducción

1.1 Empleo de productos veterinarios en producción animal

Los sistemas actuales de explotación intensiva de los animales de producción favorecen la aparición de procesos infecciosos y parasitarios que requieren la utilización de fármacos con fines profilácticos y/o terapéuticos. Asimismo, ciertos productos veterinarios pueden ser administrados fraudulentamente a los animales de abasto para ejercer un efecto promotor del crecimiento, reducir el estrés y evitar muertes durante el transporte de los animales al matadero y/o mejorar la calidad del producto final (Courtheyn y *col.*, 2002).

El uso global de las diferentes sustancias medicamentosas administradas a los animales de producción ya sea con fines autorizados o fraudulentos se desconoce, posiblemente como consecuencia de la gran dispersión en el sistema de distribución de los medicamentos y a la existencia de un mercado negro. Además, los datos disponibles acerca del consumo de los distintos compuestos se refieren más al volumen de ventas que al consumo efectivo.

Disponer de esta información es esencial para reducir el uso y el mal uso de los productos veterinarios en producción animal (Nunnery y *col.*, 2006).

Los datos referentes al total de productos veterinarios destinados a la Sanidad Animal (incluidos aquellos destinados a los animales de compañía), están disponibles a través de los distintos organismos oficiales de cada país. Aunque los datos referentes a usos están sólo disponibles en países como Suecia, Finlandia y Dinamarca (Sarmah y *col.*, 2006). Las cifras económicas que anualmente mueve el sector se pueden obtener a través de organizaciones nacionales e internacionales como Veterindustria o la Federación Internacional de la Sanidad Animal (I.F.A.H) aunque éstas tampoco especifican ni los usos ni los nombres de los principios activos.

El mercado mundial de productos destinados a la sanidad animal movió, en 2005, 14900 millones de dólares, de los cuales, un 59.8 % correspondieron a productos destinados a los animales de producción. Los antiparasitarios representaron un 28.4 % del total de ventas seguidos de biológicos (incluidas las vacunas, 22.6 %), anti-infecciosos (15.8 %), aditivos para piensos medicamentosos (13.0 %) y otros (20.2 %) (IFAH, 2006).

1.2 Utilización de antibióticos como promotores del crecimiento en producción animal

A mediados de los años cincuenta, como consecuencia de las observaciones de varios investigadores se empezaron a utilizar algunos antibióticos como promotores del crecimiento.

En 1942, Martin observó que cuando se administraba sulfanilamida a ratas de laboratorio, se conseguía disminuir la mortalidad de los animales e incrementar la tasa de crecimiento (Martin, 1942) y en 1946, Moore y *col.* obtuvieron el mismo resultado al añadir succinilsulfatiazol y estreptomina a la dieta de pavos. Estos primeros estudios parecían indicar que el efecto positivo en el crecimiento era debido a la supresión de los microorganismos patógenos (Moore y *col.*, 1946).

Pero en 1949, Stokstad y Jukes demostraron que en pavos sanos existía una mejora en la ganancia de peso cuando era adicionada al pienso la masa micelar seca resultante del proceso de fermentación de *Streptomyces aureofaciens* (con clortetraciclina), evidenciando un efecto estimulante o promotor del crecimiento de ciertos antibióticos administrados incluso a animales sanos (Stokstad y Jukes, 1950^{a,b}).

Varios estudios realizados para explicar los beneficios de los antibióticos como promotores del crecimiento apuntan, como mecanismo de acción principal, a la interacción de los antimicrobianos con la microflora digestiva, afectando así a la digestión, al metabolismo y a la absorción de elementos esenciales y aumentando la utilización de nutrientes (Anónimo, 2003).

1.3 Consecuencias de la utilización de antimicrobianos en animales de abasto

La administración de antibióticos a animales de abasto destinados al consumo humano facilita el control de enfermedades infecciosas y permite una mejora de la producción al promover el crecimiento. Sin embargo, dependiendo del tiempo transcurrido entre la administración de un antibiótico y el sacrificio (tiempo de espera) pueden quedar residuos de estas sustancias en los distintos tejidos utilizados como alimento o destinados a la obtención de los mismos. Estos compuestos y sus metabolitos son eliminados a través de las heces u orina de los animales tratados dispersándose en el medio ambiente. Además de estas consecuencias, la presencia de residuos de antibióticos en la leche o la carne destinada a la obtención de productos fermentados puede conllevar a la aparición de problemas de tipo tecnológico y/o económico.

Consecuencias para la salud humana

La utilización de algunos antimicrobianos en animales de producción puede provocar en el consumidor efectos adversos relacionados con la toxicidad propia del compuesto suministrado. Por ejemplo, el cloranfenicol se ha asociado con el desarrollo de anemias aplásicas en individuos susceptibles (Schmid, 1983; Page, 1991^{a,b}) después del consumo de carnes obtenidas de animales tratados con este compuesto. Como consecuencia, y al no poder establecer límites máximos de residuos (LMRs) seguros para este compuesto, la utilización de cloranfenicol en producción animal se prohibió (CVMP 2002^a).

Asimismo, se han descrito casos de reacciones alérgicas atribuidas al consumo de carnes contaminadas con estreptomycin (Tinkelman y Bock, 1984) y penicilina (Tscheuschner, 1972; Kanny y col., 1994; Raison-Peyron y col., 2001). Estas reacciones alérgicas pueden ocurrir en individuos previamente sensibilizados, pero los procesos de sensibilización son poco probables debido a las bajas concentraciones de antígenos que permanecen en los alimentos (Dewdney y col., 1991; Burgat, 1991; Diez y Calderón, 2006), aunque se sospecha que muchos casos pasan inadvertidos porque dan lugar a reacciones secundarias con sintomatología menos aguda como son reacciones de fotosensibilización y picores, atribuibles a otras causas.

Durante los últimos años, la utilización de antibióticos en producción animal, especialmente la administración de estos compuestos a bajas dosis durante períodos de

tiempo relativamente largos, ha sido tema de debate para verificar si ha contribuido a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Salisbury y col., 2002), ejerciendo una presión selectiva y promoviendo la diseminación de bacterias resistentes en el medio ambiente y en los sistemas gastrointestinales de los animales (Tollefson y col., 2004; Nunnery y col., 2006). Estas bacterias pueden afectar a los humanos si son patógenas o bien transferir genes de resistencia a patógenos humanos (Nunnery y col., 2006).

Este problema ya fue debatido en 1969 por el Comité Swann que estudió estos efectos después de relacionar la aparición de un brote de salmonelosis en humanos con el tratamiento de terneras con antibióticos (Swann, 1969). El Comité finalmente recomendó utilizar para los animales de producción antibióticos no utilizados en medicina humana y sólo bajo prescripción veterinaria.

Durante varios años, en la UE, algunos antibióticos fueron permitidos como promotores del crecimiento. Pero en 1997, la avoparcina fue prohibida y dos años más tarde se prohibió la espiramicina, la bacitracina, la tilosina y la virginamicina, todas ellas sospechosas de haber contribuido a la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

En 1998, un Comité de la Organización Mundial de la Salud (WHO) concluyó que el uso de fluoro-quinolonas en animales de producción había contribuido a la aparición de cepas de *Salmonella* y *Campylobacter* resistentes a las quinolonas (WHO, 1998) y en 2003, otro Comité formado por la Food and Drug Administration (FDA), la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) concluyó que existía una evidencia clara de efectos adversos para la salud humana debido al incremento de microorganismos resistentes a algunos antibióticos como consecuencia de la utilización de antimicrobianos en animales de abasto (WHO Joint FAO/OIE/WHO, 2003).

En 2001, la Comisión Europea propuso ir sustituyendo progresivamente hasta eliminar definitivamente los agentes antimicrobianos utilizados como promotores del crecimiento (avilamicina, flavofosfolipol, monesina y salinomicina) antes de enero de 2006 (Comisión Europea, 2001^a). Otro ejemplo de la creciente preocupación por parte de las autoridades competentes en este sector, es la reciente prohibición en EU del uso de quinolonas en aves de corral (US FDA, 2005).

Problemas tecnológicos

En varios trabajos se describe la influencia de los procesos tecnológicos sobre los residuos que se pueden encontrar en los alimentos. Los tratamientos térmicos, pueden disminuir las concentraciones residuales de estos compuestos en los alimentos (Moats, 1999). Se han realizado varios estudios de estabilidad para residuos de penicilina (Rose y col., 1997), cloranfenicol (Shakila y col., 2006), sulfonamidas y tetraciclinas (Podhorniak y col., 1999; Korner y col., 2001; Kuhne y col., 2001) durante procesos de calentamiento, aunque la mayoría de ellos sólo estudian la desaparición del compuesto principal y no tienen en cuenta la aparición de otros compuestos de degradación.

Las carnes contaminadas con residuos de antibióticos, si se utilizan para la obtención de productos fermentados, pueden presentar fermentaciones anormales y fallos de los cultivos iniciadores. Asimismo, la presencia de estos residuos en la leche puede inhibir o alterar el crecimiento de los microorganismos necesarios para la fabricación de queso y/o de yogur (Smit y col., 1994; Grunwald y Petz, 2003).

Además, los residuos de antibióticos podrían llegar incluso a alterar el desarrollo de la flora microbiana contaminante, lo que podría ocasionar el enmascaramiento de algunos agentes patógenos durante el control bacteriológico de los alimentos.

Problemas en el medio ambiente

Algunos de los antibióticos administrados como promotores del crecimiento se absorben poco en el tracto gastrointestinal de los animales, eliminándose a través de las heces a elevadas concentraciones. Otros antibióticos, por el contrario, se absorben a nivel intestinal, pero sus metabolitos pueden ser eliminados por la orina. Como consecuencia, la práctica de utilizar los purines como fertilizantes y adobo favorece aún más la dispersión de estas sustancias en el medio ambiente (Sarmah y col., 2006).

Cada vez aparecen más estudios que describen la detección de residuos de antibióticos en agua y sedimentos (Jorgensen y Halling-Soerensen, 2000) y estudian los efectos negativos que pueden ejercer a medio y a largo plazo en los organismos y microorganismos que habitan estos ecosistemas (Colinas y col., 1994; Migliore y col., 1995, 1996; Halling-Soerensen y col., 2000, 2002; Halling-Soerensen 2001; Díaz-Cruz

y *col.*, 2003; Agerso y *col.*, 2006; Schmitt y *col.*, 2006). En algunos sedimentos cercanos a explotaciones ganaderas se ha detectado un aumento de cepas bacterianas resistentes a algunos antibióticos (Herwig y *col.*, 1997; Krapac y *col.*, 2005) y varios autores han estudiado la estabilidad de estos compuestos en los purines y suelos para obtener más información acerca de su persistencia en el medio ambiente (Halling-Soerensen y *col.*, 2003^{a,b}; Kay y *col.*, 2004; Halling-Soerensen y *col.*, 2005; Hamscher y *col.*, 2005; Krapac y *col.*, 2005).

Debido a todos estos efectos, se han propuesto varias alternativas a los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento. Estas alternativas consisten en utilizar sustancias de origen natural que presenten un efecto antibacteriano directo o indirecto como algunos enzimas, ácidos orgánicos, prebióticos, oligosacáridos, aceites, extractos vegetales, vitaminas y micro-minerales (Cancho y *col.*, 2000).

1.4 Las Sulfonamidas

1.4.1 Historia de las sulfonamidas

Las sulfonamidas (SA's) son un grupo importante de antibacterianos sintéticos que se introdujeron en medicina a mediados de los años treinta.

Estos compuestos se sintetizaron por primera vez en 1908 mientras se estudiaban los colorantes de tipo azo, posteriormente, en 1913, se observó que la chrysolidina presentaba una pronunciada actividad antibacteriana *in vitro*. Domagk (1935), quien descubrió que el *Prontosil rubrum* también presentaba esta actividad *in vivo*, cuando era administrado a ratas infectadas por *Streptococcus haemolyticus* ganó el Premio Nobel en 1939.

En ese mismo año, científicos del Instituto Pasteur atribuyeron al grupo sulfanilamida de la molécula la actividad antibacteriana (**Figura 1**). Estos acontecimientos favorecieron que se estudiaran en profundidad durante los siguientes años y aparecieran nuevas moléculas en el mercado. En la actualidad existen más de 5000 drogas de tipo sulfamida o sulfanilamida pero sólo se utilizan 33 en terapéutica, algunas como antimicrobianas (sulfonamidas) y otras como diuréticas.

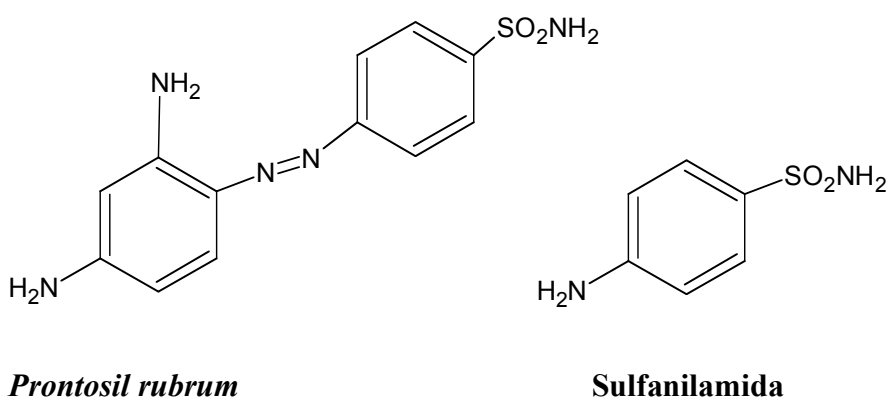


Figura 1: Estructura química del *Prontosil rubrum* y de la sulfanilamida.

1.4.2 Estructura química

Las SA's químicamente derivan del núcleo esencial de la *para*-aminobencenosulfonamida (sulfanilamida) que se caracteriza por un núcleo de benceno con un grupo amino (NH₂) y otro SO₂NH₂. El átomo de nitrógeno amídico está parcialmente sustituido por un resto heteroarilo (heterociclo), responsable de las propiedades farmacocinéticas que presentan (**Tabla 1**) (Korolkovas y Burckhalter, 1979).

La mayoría de las SA's son solubles en disolventes orgánicos polares como el etanol, la acetona y el acetonitrilo, pero son relativamente insolubles en los disolventes apolares. Las SA's también presentan una elevada variabilidad en cuanto a polaridad y características anfotéricas debido al enlace NH ácido adyacente al grupo sulfonilo y al carácter básico del grupo amino situado en la posición *para* del anillo bencénico. Las características anfotéricas que presentan hacen que los coeficientes de partición de estas moléculas entre las fases acuosas y las orgánicas puedan variar mucho en función del pH del medio (Horwitz, 1981).

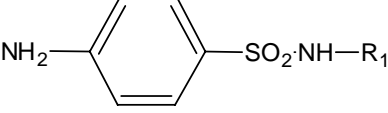
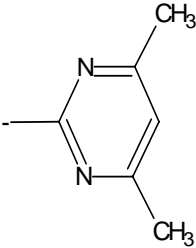
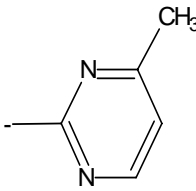
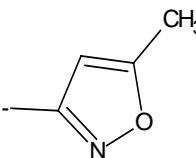
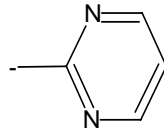
1.4.3 Farmacocinética y farmacodinamia

Mecanismo de acción

Las SA's son sustancias bacteriostáticas que actúan impidiendo la síntesis del ácido fólico en las bacterias. El ácido fólico es un elemento esencial en la síntesis de las bases púricas y por lo tanto, determinante en la síntesis de los ácidos nucleicos en las células eucariotas y procariotas. Sin embargo, las paredes bacterianas son impermeables al ácido fólico exógeno y tienen que sintetizárselo intracelularmente a partir del ácido *para*-aminobenzoico (PABA).

Por su estructura análoga al PABA, las SA's inhiben competitivamente la incorporación del PABA a la pteridina, un paso necesario en la síntesis del ácido fólico, y como resultado se obtiene una disminución de nucleótidos que desemboca en la inhibición del crecimiento bacteriano (COF, 1995). Este mecanismo fue elucidado en 1940 por Woods y Fildes (COF, 1995).

Tabla 1: Nombre químico y estructura de algunas SA's (Korolkovas y Burckhalter, 1979).

Estructura química de la Sulfanilamida		
		
Nombre	Nombre químico	R1
Sulfametacina (SMZ)	N'-(4,6-dimetil-2-piridinil)sulfanilamida	
Sulfameracina (SMR)	N'-(4-metil-2-piridinil)sulfanilamida	
Sulfametoxazol	N'-(5-metil-3-isoxazolil)sulfanilamida	
Sulfacetamida	N-sulfacetamida	_COCH3
Sulfadiacina (SDZ)	N'-2-piridinilsulfanilamida	

Podría esperarse que este mecanismo fuera citotóxico para el ser humano, pero el enzima inactivado en este proceso (la dihidrofolato-sintetasa) es entre 50 y 1000 veces menos sensible a las SA's que su homónimo bacteriano (COF, 1995). Las SA's son activas frente a un amplio espectro de bacterias, aunque actualmente abundan cepas bacterianas

que han desarrollado mecanismos de resistencia como resultado de los más de cincuenta años de utilización. Estos compuestos actúan preferentemente sobre bacterias Gram negativas y tienen un efecto significativo frente a algunas especies anaerobias patógenas como *Clostridium* spp., aunque también muestran un leve efecto sobre algunos protozoos, como *Plasmodium* spp. y *Toxoplasma* spp., así como sobre algunas Clamidas y Micobacterias (Flórez, 1997).

Absorción

La mayor parte de las SA's presentan una buena biodisponibilidad por vía oral, pero su absorción puede verse disminuida en rumiantes adultos y en especies monogástricas si se administran junto a los alimentos (USP, 2000). Las SA's se pueden administrar por distintas vías como la oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrauteriana o tópica en función de la localización de la infección o la preparación comercial utilizada.

Distribución

Las SA's se distribuyen ampliamente por el organismo y algunas incluso atraviesan la placenta, pero las características de distribución dependen básicamente del estado de ionización de la SA, del grado de vascularización del tejido, de la presencia de barreras específicas de difusión, de la fracción de la dosis administrada que se une a las proteínas plasmáticas y de sus pKa's. Además, la unión a las proteínas plasmáticas depende, también, de la concentración sérica de fármaco libre. Por ejemplo, la unión de la sulfametacina (SMZ) a la albúmina plasmática de cerdo es débil e interacciona en el locus específico para la warfarina (Munsey y *col.*, 1996).

Biotransformación o metabolismo

Las SA's se metabolizan principalmente en el hígado aunque también se dan procesos de transformación en otros órganos. Las reacciones mayoritarias que tienen lugar son la acetilación, la conjugación con glucurónidos y la hidroxilación aromática (Mitchell y *col.*, 1986).

El tipo y la tasa de metabolización de estos compuestos dependen de varios factores como son la dosis de fármaco administrada, la edad, las condiciones fisiológicas y dieta del animal (Struble y Paulson, 1988) y las condiciones ambientales donde se encuentran.

Los metabolitos N₄-acetil no presentan actividad antimicrobiana y los hidroxilados presentan una actividad variable entre el 2,5 y el 39,5% (Nouws y *col.*, 1987).

En los cerdos, la SMZ es transformada principalmente a N₄-acetilsulfametacina, desamino-sulfametacina y en el conjugado N₄-glucosa (Mitchell y *col.*, 1986). En la leche de vaca se ha observado como metabolito mayoritario de SMZ el conjugado N₄-lactosa (Paulson y *col.*, 1992).

Excreción

Las SA's se excretan por la orina, aunque pueden, en menor proporción, encontrarse en las heces. También se han detectado en la leche de vaca a concentraciones de pocos µg/L (Paulson y *col.*, 1992; McEvoy y *col.*, 1999). Entre los factores implicados en la excreción urinaria de las SA's se encuentran la filtración glomerular, la secreción y reabsorción tubular y el pH urinario.

1.4.4 Utilización y posología en veterinaria

La utilización de SA's en medicina humana es escasa, únicamente se reservan para el tratamiento de determinadas infecciones urinarias. En veterinaria, por el contrario, su uso está muy extendido. Las SA's se utilizan normalmente para tratar y/o evitar infecciones agudas como actinobacilosis, coccidiosis, mastitis, metritis, infecciones respiratorias y toxoplasmosis.

La dosis terapéutica habitual de la SMZ es de 220 mg/kg p.v. (peso vivo) diarios por vía oral o parenteral, y la dosis inicial se disminuye a la mitad en dosis posteriores tanto en vacuno como en porcino (Manual Merck, 2000).

La SMZ, sola o combinada con Clortetraciclina (CTC), también aumenta la ganancia media diaria de peso y mejora el índice de conversión de los alimentos en vacuno (Gallo y Berg, 1995) y porcino (Hathaway y *col.*, 1996), por lo que se ha administrado como promotor del crecimiento a dosis de 50-100 mg/Kg de pienso (Anónimo, 2004).

1.4.5 Problemas relacionados con la presencia de residuos de sulfonamidas en los alimentos

Los posibles problemas derivados de la utilización de las SA's en producción animal son la aparición de cepas bacterianas resistentes a estos compuestos y de alergias debidas a las propiedades alergénicas (Blanchflower y Rice, 1988).

Algunos estudios indicaron que la SMZ presentaba propiedades carcinogénicas después de observar el desarrollo de adenomas en la glándula tiroides de animales de experimentación (Littlefield y *col.*, 1989). En 1994, la SMZ fue evaluada por el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives teniendo en cuenta su probable efecto carcinogénico, problemas de hipereactividad y de sensibilización y se advirtió que el LMR debía ser el mínimo posible que permitiera unas buenas prácticas en veterinaria. Éste está fijado en 100 µg/Kg para todas las sustancias pertenecientes a este grupo de compuestos en los diferentes tejidos diana (músculo, grasa, hígado, riñón y leche) (Anexo I del Reglamento 2377/90/CE y Reglamento 508/1999/CE).

A pesar de los controles realizados, las SA's continúan utilizándose frecuentemente, incluso sin respetar los periodos de retirada (aproximadamente de 28 días en carne). Prueba de ello son los resultados del Plan Nacional de Residuos de 2002, en el que de las 26 notificaciones por la superación de los LMR más de un 50% fueron debidas a la presencia de sustancias pertenecientes a esta familia de compuestos (Comisión Europea, 2002).

En varios análisis realizados en carnes y en productos animales destinados al consumo humano se han encontrado trazas de SA's, en algunos casos incluso a concentraciones superiores a los LMR (Arancibia y *col.*, 2003; Hela y *col.*, 2003; Pena y *col.*, 2004).

1.5 Las Quinolonas

1.5.1 Historia de las quinolonas

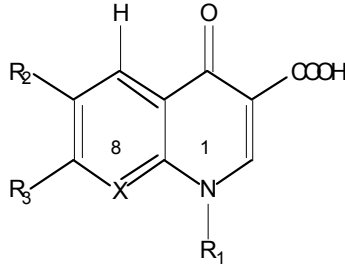

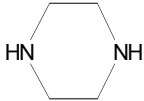

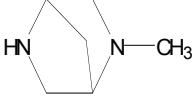
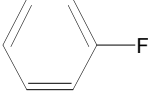
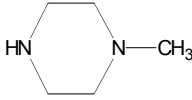

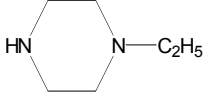
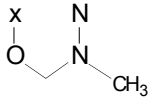
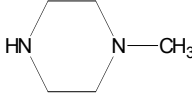
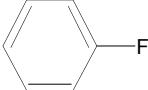
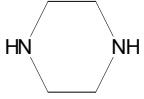
Las quinolonas (QA's) son agentes antibacterianos ampliamente utilizados en medicina veterinaria y humana. En 1962, mientras se desarrollaban compuestos para el tratamiento del paludismo (cloroquina) se descubrieron las propiedades antibacterianas del ácido nalidíxico (Leshner y *col.*, 1962). A partir de esta molécula, se sintetizaron otros compuestos como el ácido oxonílico, piromídico y pipemídico. En 1973, apareció la primera quinolona con un átomo de flúor, la flumequina y en 1978, el norfloxacin (NOR) (Florez, 1997). Desde entonces, multitud de compuestos han sido sintetizados como el enrofloxacin (ENR), el ciprofloxacino (CPR), el marbofloxacino (MAR), el ofloxacino (OFL), el sarafloxacino (SAR) y el difloxacino (DIF).

1.5.2 Estructura química

La estructura química de las QA's está basada en el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, del que derivan 4 grupos de compuestos según las posiciones de la molécula que presentan sustituciones por nitrógeno (Florez, 1997). Las quinolinas contienen un átomo de nitrógeno en la posición 1, las naftirinas contienen otro en la posición 8, las cinolinas en la posición 1 y 2, y las piridopirimidinas en las posiciones 6 y 8 (Hernandez-Arteseros y *col.*, 2002). Todas las QA's contienen un grupo carboxílico en la posición 3 que les confiere características ácidas (**Tabla 2**). Las 7-piperazinilquinolonas (PQ) que incluyen el ENR, CPR, MAR, NOR, OFL, SAR y DIF, contienen grupos amino adicionales que les confieren características básicas. Por lo tanto, las PQ, en solución acuosa, pueden estar presentes como cationes, aniones o zwitteriones, mientras que las otras quinolonas únicamente pueden estar en forma ácida o neutra.

Las QA's son compuestos solubles en disolventes orgánicos polares y en soluciones acuosas ácidas y básicas, pero son insolubles en disolventes apolares como el *n*-hexano y el tolueno (Hernandez-Arteseros y *col.*, 2002).

Tabla 2: Nombre químico y estructura de algunas QA's utilizadas en producción animal.

				
Nombre de la quinolona	R ₁	R ₂	R ₃	X
Ácido nalidíxico	C ₂ H ₅	H	CH ₃	N
Ciprofloxacino (CPR)		F		C
Danofloxacino (DAN)		F		C
Difloxacino (DIF)		F		C
Enrofloxacino (ENR)		F		C
Marbofloxacino (MAR)		F		C
Sarafloxacino (SAR)		F		C

1.5.3 Farmacocinética y farmacodinamia

Mecanismo de acción

Las QA's son sustancias bactericidas que penetran en las células bacterianas a través de las porinas. Una vez en el interior de las células, actúan inhibiendo la ADN-girasa una enzima cuya función es reparar el ADN para la transcripción (Florez, 1997). Estos

compuestos son muy activos frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias (Schroeder, 1989; USP, 2000), aunque cada vez están apareciendo más cepas bacterianas resistentes a estos compuestos.

Absorción

La mayor parte de las QA's presentan una buena biodisponibilidad por vía oral e intramuscular (USP, 2000). El enrofloxacin (ENR), una fluoro-quinolona de uso exclusivo en veterinaria, es absorbido ampliamente en especies monogástricas y animales pre-rumiantes, aunque en rumiantes adultos, su absorción puede verse disminuida en un 10-50 % (USP, 2000).

Distribución

Las QA's se distribuyen ampliamente por los distintos órganos y tejidos incluyendo el tejido adiposo (CVMP, 1998).

Biotransformación o metabolismo

La mayor parte de los procesos de metabolización de las QA's ocurren en el hígado. El metabolito principal del ENR es el ciprofloxacino (CPR) una fluoro-quinolona muy utilizada en medicina humana para el tratamiento de infecciones bacterianas, aunque otros metabolitos como el oxoenrofloxacin y el desetilen-ciprofloxacino también se han detectado en vacuno (CVMP, 2002^b). En varios tejidos de cerdo, los niveles residuales de ENR observados después de un tratamiento farmacológico fueron superiores a los niveles de su metabolito principal (CPR) mientras que en vacuno, se observaron niveles similares de ambos compuestos (CVMP, 1998).

Excreción

Las QA's se excretan mayoritariamente por la orina, aunque también pueden eliminarse a través de la leche y la bilis. Algunas QA's se encuentran en las heces a elevadas concentraciones debido a procesos de circulación enterohepática.

1.5.4 Utilización y posología en veterinaria

Las QA's son compuestos muy utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria. En veterinaria, las QA's se utilizan normalmente para tratar y/o evitar infecciones respiratorias, urinarias y gastrointestinales.

La dosis terapéutica habitual del ENR es de 2,5-5 mg/kg p.v. (peso vivo) diarios por vía oral, subcutánea o intramuscular (Manual Merck, 2000). Estas dosis son aplicables tanto a vacuno como a porcino.

1.5.5 Problemas relacionados con la presencia de residuos de quinolonas en los alimentos

La utilización de QA's en veterinaria se ha relacionado con la aparición de cepas bacterianas de *Salmonella* sp. y *Campylobacter* sp., resistentes a las QA's (WHO 1998, WHO Joint FAi/OIE/WHO 2003, Lovine y Blaser 2004).

Las fluoro-quinolonas se han administrado a aves de corral durante mucho tiempo a dosis subterapéuticas para obtener un efecto promotor del crecimiento y preventivo de enfermedades infecciosas, pero recientemente se ha prohibido su uso en USA, incluso como terapéuticos (US FDA, 2005).

Debido a la elevada metabolización de ENR a CPR en algunas especies animales, el LMR para el ENR está definido como la suma de ambos compuestos (CPR + ENR) y éste está comprendido entre 100 y 300 µg/Kg en función del tejido diana (músculo, grasa, hígado, riñón y leche) y la especie animal (Anexo I del Reglamento 2377/90/CE, Reglamento 1181/2002/CE).

1.6 Los corticosteroides

Los corticosteroides (CT) son sustancias derivadas de las hormonas naturales sintetizadas en la corteza adrenal. El grupo de hormonas naturales se divide en mineralocorticoides (aldosterona y corticosterona), responsables de la regulación del equilibrio hidrosalino y en glucocorticoides (cortisol y cortisona) que intervienen en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Los CT pueden tener un origen natural o semisintético (análogos estructurales de los primeros) (Flórez, 1997).

1.6.1 Biosíntesis

Los CT naturales son biosintetizados a partir del colesterol endógeno y exógeno. A partir del esteroide natural cortisol, se han sintetizado numerosos derivados sintéticos con el objetivo de modificar la intensidad y la duración del efecto farmacológico y disminuir los efectos secundarios típicos de estos compuestos.

Entre ellos se encuentra la dexametasona (DEX) que es un análogo sintético de la hidrocortisona (**Figura 2**).

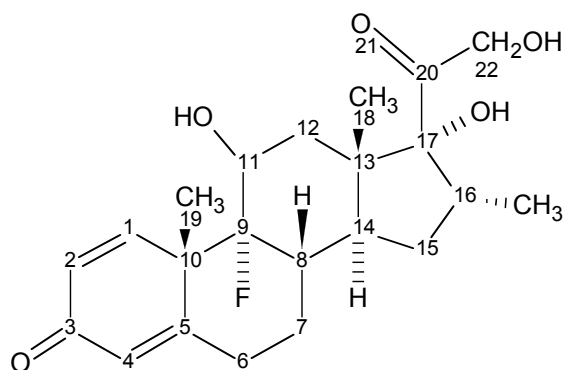


Figura 2: Estructura de la Dexametasona.

1.6.2 Farmacocinética y farmacodinamia

Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción y efectos que ejercen los CT sobre los organismos vivos son muy variados. Los CT actúan a partir de la interacción con receptores esteroidales específicos localizados intracelularmente. Penetran en las células por difusión pasiva y

se fijan a su receptor. En una segunda fase, el complejo CT-Receptor sufre un proceso de translocación, se fija al ADN nuclear y da lugar a la formación de ARN y a la síntesis de las correspondientes proteínas que en última instancia, mediarán los efectos fisiológicos y farmacológicos de los CT (USP, 2004).

Absorción

Los CT se absorben rápidamente por vía intramuscular. Por vía oral, su biodisponibilidad es variable en función de la especie animal de destino y tipo de CT administrado.

Distribución

Los CT presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas y una elevada distribución. En humanos se ha observado que un 95% del cortisol endógeno viaja unido a la transcortina (USP, 2004).

Biotransformación o metabolismo

El metabolismo de los CT tiene lugar mayoritariamente en el hígado y muchos de los CT se administran como profármacos para que sea en el hígado dónde estos se activen. La DEX en el hígado es transformada principalmente en su derivado 6-hidroxilado y en conjugados con sulfato o ácido glucurónico, aunque pueden encontrarse otros derivados hidroxilados. En el hígado es dónde estos residuos se mantienen durante más tiempo por lo que el hígado es el tejido diana preferentemente utilizado para el análisis de CT (CVMP, 1997).

Excreción

Los CT se eliminan rápidamente por orina como droga madre o como conjugados y pueden encontrarse en menores proporciones en heces debido a procesos de recirculación enterohepática.

1.6.3 Utilización y posología en veterinaria

En clínica veterinaria, los CT se utilizan como terapia hormonal sustitutiva a dosis fisiológicas y a dosis terapéuticas, como antiinflamatorios esteroidales, agentes gluconeogénicos, inmunosupresores y abortivos. Generalmente se administran para el tratamiento de enfermedades metabólicas (ej:cetosis) en rumiantes y como antiinflamatorios en otras especies animales (USP, 2004).

Al administrar DEX a dosis subterapéuticas de 0.1-0.5 mg/Kg de pienso, se consigue un aumento de peso y una mejora del ratio de conversión de los alimentos (Courtheyn y col., 1998, 2002). La DEX a veces también se ha utilizado fraudulentamente para enmascarar procesos inflamatorios durante los controles *postmortem* realizados en el matadero (Mallison y col., 1995). Asimismo, también se administra DEX conjuntamente con β -agonistas u otros anabolizantes para conseguir efectos sinérgicos (Calvarese y col., 1994; Istasse y col., 1988).

1.6.4 Problemas relacionados con el empleo de corticosteroides

Estudios toxicológicos han revelado que algunos CT pueden inducir la actividad aminotransferasa en el hígado de ratas y se han establecido LMR para la DEX en distintas matrices biológicas variables entre 0,3 y 2 μ g/Kg (CVMP, 1997; Reglamento 1646/2004/CE).

Los CT frecuentemente se administran como antiinflamatorios o como promotores del crecimiento, sobretodo en vacuno. Durante el año 2003, el número de muestras de vacuno analizadas durante la ejecución de los planes nacionales de control que mostraron niveles de CT superiores a los LMR legales aumentaron bastante en Europa, pasando de 69 muestras positivas en 2002 a 122 en 2003 (Comisión Europea, 2003).

1.7 Control de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal

1.7.1 Marco legal

La legislación Comunitaria requiere que cualquier fármaco sea evaluado exhaustivamente antes de su autorización en base a criterios de calidad, seguridad y eficacia. Los fabricantes deben demostrar que el nuevo producto a comercializar es seguro para el consumidor, el administrador, las especies animales de destino y el medio ambiente. En la Directiva del Consejo 96/23/CE se define como residuo cualquier sustancia de acción farmacológica, productos de transformación u otras sustancias que se transmitan a los productos animales y puedan resultar nocivos para la salud humana y un tratamiento ilegal como la utilización de sustancias o productos no autorizados por la Comunidad o aunque autorizados se administren con fines o condiciones distintas a las autorizadas.

1.7.1.1 Los Límites máximos de residuos

Durante el proceso de evaluación y de autorización de nuevos productos veterinarios, se establecen, entre otras cosas, los límites máximos de residuos (LMRs) del compuesto admisibles en los distintos tejidos y partes comestibles de los animales destinados al consumo humano, incluyendo los huevos, la leche y la miel. El proceso de definición de estos límites está descrito en el Reglamento del Consejo 2377/90/CE del 26 de Junio que ha sido constantemente actualizado por numerosos Reglamentos (www.pharmacos.eudra.org/F2/mrl/index.htm)

El LMR de una sustancia se define como “el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/Kg o en µg/Kg sobre la base del peso en fresco) autorizado en la Comunidad o reconocido como admisible en un producto alimenticio”. Los cálculos de estos valores (LMR) se basan en el tipo y en la cantidad de residuos que no constituyen ningún riesgo toxicológico significativo para la salud humana. Se tiene en cuenta el IDA (ingesta diaria admisible) o un IDA temporal, un factor de seguridad adicional y otros riesgos relativos a la salud pública así como aspectos relacionados con la tecnología alimentaria.

El Reglamento 2377/90 consta de 4 anexos. En el anexo I se indican las sustancias que tienen establecido un LMR, en el II las sustancias que por su inocuidad no precisan de un LMR, en el III las que tienen establecido un LMR con carácter temporal y en el IV las prohibidas para las cuales, debido a su toxicidad, no se les puede establecer un LMR. Los valores de los LMR están definidos según residuo marcador, especie animal y tejido diana, en la **Tabla 3** se muestran los LMR para ENR, SMZ y DEX.

Está determinadamente prohibido en cualquier estado miembro la administración de medicamentos veterinarios a animales destinados al consumo humano si la Comunidad previamente no los ha evaluado y autorizado así como la administración de sustancias incluidas en el anexo IV del Reglamento 2377/90. Únicamente los productos veterinarios que contengan principios activos incluidos en los anexos I, II y III se pueden administrar. En 1996, la UE también prohibió el empleo en ganadería de ciertas sustancias con acción hormonal y tireostática así como el de β -agonistas. El instrumento legal son la Directiva del Consejo 96/22/CE y la Directiva del Parlamento y Consejo 2003/74/CE.

Durante el proceso de evaluación y autorización de nuevos productos veterinarios se define también un tiempo de espera, que es el tiempo que debe transcurrir entre la administración de un medicamento y el aprovechamiento de los alimentos obtenidos del animal tratado, con el único objetivo de que no existan residuos de los medicamentos en los alimentos o que los residuos presentes estén por debajo de los respectivos LMR.

1.7.1.2 Planes Nacionales de control de residuos

Las medidas de control para monitorizar ciertas sustancias y sus residuos en los animales vivos y productos derivados están definidas en la Directiva del Consejo 96/23/CE.

Los residuos se clasifican en dos grupos: sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas (grupo A) y medicamentos veterinarios y contaminantes (grupo B), ambos especificados en el anexo I de la Directiva del Consejo 96/23/CE. En la **Tabla 4** están detallados los dos grupos de residuos.

Tabla 3: Límites Máximos de Residuos establecidos para SMZ, ENR y DEX (Reglamentos 1646/2004/EC, 1181/2002/EC y 508/1999/EC).

¹ la combinación de todas las sustancias pertenecientes al grupo de las sulfonamidas no debe sobrepasar los 100µg/Kg.

² El LMR hace referencia a grasa y músculo en proporciones naturales.

³ Para porcino el LMR hace referencia a grasa y piel en proporciones naturales.

⁴ Para aves el LMR hace referencia a grasa y piel en proporciones naturales.

Sustancias farmacológicamente activas	Residuo marcador	Especie animal	LMRs(i g/Kg)	Tejido diana
Todas las sustancias pertenecientes al grupo de las sulfonamidas ¹	Droga madre	Todas las especies animales	100	Músculo
			100	Grasa
			100	Hígado
			100	Riñón
		Bovino, ovino, caprino	100	Leche
Enrofloxacino	Suma de Enrofloxacino y Ciprofloxacino	Todas las especies animales excepto bovino, ovino, aves caprino, porcino y conejos	100	Músculo ²
			100	Grasa
			200	Hígado
			200	Riñón
		Bovino, ovino, caprino	100	Músculo
			100	Grasa
			300	Hígado
			200	Riñón
			100	Leche
		Porcino, conejos	100	Músculo
			100	Grasa ³
			200	Hígado
			300	Riñón
		Aves	100	Músculo
			100	Grasa ⁴
200	Hígado			
300	Riñón			
Dexametasona	Dexametasona	Bovino	0,3	Leche
			0,75	Músculo
		Bovino, porcino, equino	2	Hígado
			0,75	Riñón

En la Directiva del Consejo 96/23/CE también se establece que los distintos estados miembros deben realizar planes nacionales de control de residuos para los grupos de sustancias detallados en el anexo II de la misma. Los objetivos principales de los planes

nacionales de control de residuos son asegurar que en los distintos tejidos y productos derivados de los animales de producción no se superen los LMR establecidos y que no estén presentes en los alimentos residuos de sustancias prohibidas. Como máximo, el 31 de marzo de cada año cada estado miembro debe comunicar a la Comisión los resultados del plan nacional de residuos.

Estos planes nacionales deben cumplir con las normas de muestreo especificadas en el anexo IV de la Directiva del Consejo 96/23/CE donde también se establece la frecuencia, la cantidad de muestra y el tipo de matriz a muestrear para detectar la presencia de los distintos residuos. En la Decisión de la Comisión 97/747/CE se establecen normas adicionales para determinados productos de origen animal como la leche, los huevos y la miel.

Para el control de estas sustancias y el desarrollo de los planes nacionales de control de residuos, la Unión Europea ha establecido varios laboratorios de referencia comunitarios (CRL) designados en el anexo V de la Directiva del Consejo 96/23/CE y un laboratorio nacional de referencia en cada país. Las funciones de cada CRL están definidas en el anexo V de la Directiva del Consejo 96/23/CE e incluyen el desarrollo y validación de métodos analíticos de referencia, la difusión de información a los distintos laboratorios nacionales de referencia sobre los avances en metodología analítica y equipamientos, la implementación del aseguramiento de la calidad y el asesoramiento técnico y científico de la Comisión. En España, el organismo oficial responsable del plan nacional de control de residuos es la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (A.E.S.A).

Durante el período 1998-2004 se analizaron un 0,2-0,3 % del total de animales de consumo sacrificados en la UE. Del total de muestras analizadas, el porcentaje de muestras positivas por incumplimiento de los LMR varió del 0,5 al 1,5% en función del año. Durante ese período de tiempo, la mayor parte de las muestras positivas fueron debidas a la presencia de inhibidores donde están incluidos los β -lactámicos, las tetraciclinas, las sulfonamidas y las quinolonas (**Figura 3**).

Tabla 4: Grupos de residuos y laboratorios de referencia comunitarios responsables del análisis de cada grupo de residuos, especificados en el anexo I y V de la Directiva del Consejo 96/23/CE. Abreviaturas: CRLs: F (AFSSA, Site de Fougères, Francia), G (BVL, Berlin, Alemania), NL (RIVM, Bilthoven, Holanda), I (ISS, Rome, Italia).

^b Compuestos analizados en el respectivo Laboratorio de referencia comunitario según acción farmacológica. Tabla adaptada de *Stolker y Brinkmann, 2005*.

Grupo A y B de sustancias y sus laboratorios de referencia (CRL) responsables	
Grupo	CRL ^a
Grupo A: Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas	NL
Estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres	NL
Agentes antitiroideos	NL
Esteroides	NL
Resorcylic Acid Lactones (incluido Zeranol)	NL
β-agonistas	G
Sustancias incluidas en el Anexo IV del Reglamento (CEE) 2377/90	^b
Grupo B: Medicamentos veterinarios ¹ y contaminantes	
Sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas, quinolonas	F
Otros medicamentos veterinarios	
Antihelmínticos	G
Anticoccidianos, incluidos nitroimidazoles	G
Carbamatos y piretroides	I
Tranquilizantes	NL
Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	G
Otras sustancias que ejerzan una actividad farmacológica	^b
Otras sustancias y contaminantes medioambientales	
Compuestos organoclorados, incluidos los PCB	I
Compuestos organofosforados	I
Elementos químicos	I
Micotoxinas	NL
Colorantes	F
Otros	^b

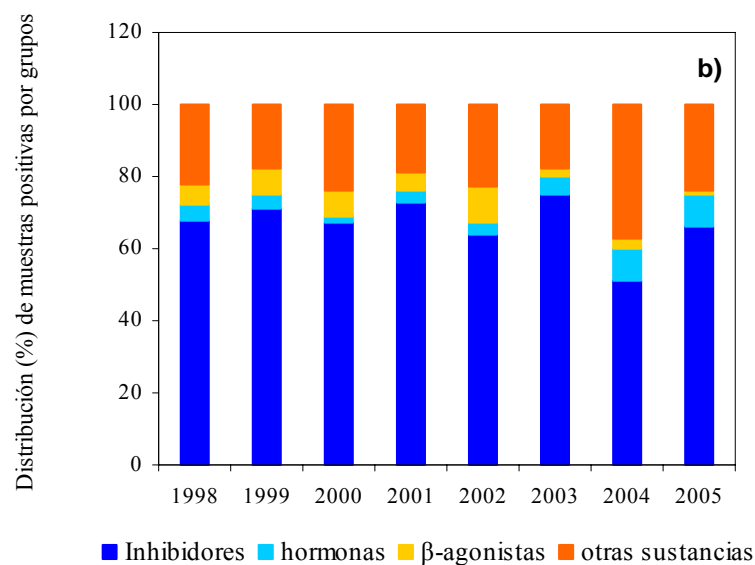
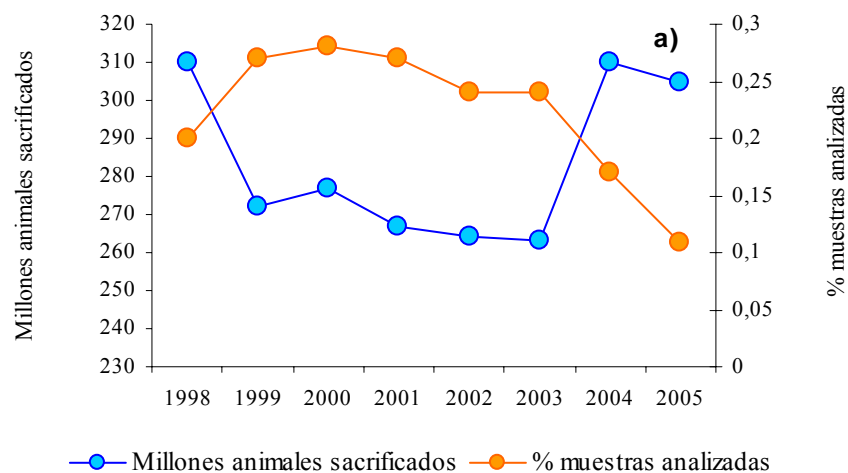


Figura 3: **a)** Porcentaje de muestras analizadas del total de animales sacrificados durante el período 1998-2005 en la UE y total de animales sacrificados durante el mismo periodo de tiempo. **b)** Distribución de muestras positivas (que no cumplieron con los LMR legales durante el período 1998-2005) en función del grupo de sustancias (Comisión Europea, 1997-2005).

Las muestras positivas podrían deberse, entre otras cosas, a la administración de sustancias sin respetar las dosis, tiempos de espera, pauta terapéutica o instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante o prescritas por el veterinario. Asimismo, también podrían ser la consecuencia de administrar estos compuestos ilegalmente como promotores, preventivos, o sin supervisión veterinaria.

La Decisión de la Comisión 2002/657/CE implementa la Directiva del Consejo 96/23/CE y establece criterios y procedimientos para la validación de los métodos analíticos y para asegurar la calidad y la posibilidad de comparación de los resultados generados por los distintos laboratorios de referencia. Además, establece un criterio común para la interpretación de los resultados e introduce un procedimiento para establecer los límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL). Estos valores son particularmente importantes para las sustancias que no están autorizadas o que están específicamente prohibidas (incluidas en el anexo IV del Reglamento 2377/90 o incluidas en el Grupo A de la Directiva del Consejo 96/23/CE). Actualmente, únicamente se han establecido los MRPLs para el verde malaquita (Decisión de la Comisión 2004/25/CE), el cloranfenicol, los nitrofuranos y el acetato de medroxiprogesterona (Decisión de la Comisión 2003/181/CE).

1.7.2 Dificultades en el control de residuos

Cuando se administra una sustancia al ganado con fines fraudulentos se recurre a varias técnicas para enmascarar estas prácticas y evitar los controles realizados por las autoridades competentes.

Éstas incluyen, entre otras, la administración de dosis muy bajas, la combinación de distintas sustancias del mismo grupo químico a dosis inferiores a las habituales, la combinación de sustancias de distintos grupos químicos con efectos sinérgicos, la administración de análogos sintéticos de promotores del crecimiento, la administración de sustancias que no están incluidas en los planes nacionales de control y la administración de sustancias rápidamente metabolizadas o eliminadas por el organismo (Aerts y *col.*, 1995; Courtheyn y *col.*, 2002).

A parte de estas acciones adoptadas para obstaculizar su control, varios factores pueden dificultar la detección de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.

Algunos de estos problemas son la rápida eliminación de algunos de los compuestos debido a procesos de metabolización y la transformación de las sustancias suministradas en metabolitos diferentes. Además, a nivel analítico, se necesitan técnicas muy sensibles, selectivas y específicas para detectar los residuos y demostrar que una sustancia está presente en un tejido a una concentración determinada debido a una administración externa (Courtheyn y col., 2002).

Los inconvenientes principales del análisis de varios de los tejidos utilizados en los planes nacionales de control (músculo, hígado, riñón, grasa) son que estas muestras únicamente pueden obtenerse después del sacrificio de los animales y que los residuos son detectables durante un período de tiempo relativamente corto como consecuencia del metabolismo endógeno. Otros problemas son la distinta composición tisular ya sea de la misma especie, de distintas especies o de distintos individuos que puede causar variaciones de los parámetros de recuperación y sensibilidad de un mismo método analítico, y los procesos de metabolización *in vitro* de los residuos presentes en un tejido si las muestras no se almacenan adecuadamente (Aerts y col., 1995).

Por estas razones, los planes de control de las sustancias incluidas en los grupos A y B de la Directiva 96/23/CE incluyen, como medidas disuasorias, el análisis de otras muestras para el control de la administración como el pienso y el agua de bebida. El pienso es una matriz compleja debido al alto contenido en proteína y azúcares pero las concentraciones habituales de los medicamentos en el pienso (0.1-100 mg/Kg) son generalmente más elevadas que las que se pueden encontrar en los tejidos animales (1-100 µg/Kg) y consecuentemente, más fáciles de detectar (Stolker y Brinkman, 2005).

Las heces, la orina y el pelo, constituyen un tercer grupo de muestras complementarias utilizadas para el control de la administración de sustancias prohibidas que, al igual que el agua y el pienso, pueden obtenerse en cualquier momento durante el periodo de engorde de los animales sin causarles prácticamente ningún perjuicio. Pero en la orina y en las heces, al igual que en los otros tejidos (músculo, hígado, riñón, grasa), los residuos son detectables durante un período de tiempo relativamente corto como consecuencia de los procesos de metabolismo y de eliminación.

1.8 El análisis del pelo para el control de residuos en producción animal

En el artículo “*Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production*” se revisan los principales trabajos publicados durante los últimos años acerca del análisis del pelo de los animales de producción. Aspectos como la biología del pelo, la estructura, los mecanismos de incorporación de las drogas en el pelo y los factores que afectan a la deposición de distintas sustancias en este tejido están incluidos, así como toda aquella información referente al muestreo, a los métodos de extracción, purificación y de análisis disponibles hasta el momento.

Las principales ventajas, inconvenientes y posibles aplicaciones del análisis del pelo para el control de la administración de sustancias medicamentosas al ganado también se discuten en este trabajo.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. (2006). Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 834(1-2), 14-25. Ver anexo I.

1.9 Métodos analíticos para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los productos de origen animal

Las muestras biológicas (leche, huevos, hígado, riñón, grasa y músculo) utilizadas para el control de residuos en producción animal pueden contener concentraciones traza del analito de interés del orden de $\mu\text{g/Kg}$ y gran cantidad de compuestos interferentes que dificultan la detección de los residuos. Tradicionalmente, se han empleado métodos microbiológicos para detectar algunos residuos de medicamentos veterinarios en los productos de origen animal. Estos métodos permiten detectar la presencia de numerosos compuestos antimicrobianos, pero carecen de especificidad al no discriminar entre sustancias de una misma familia terapéutica y no son válidos para la detección de compuestos sin actividad antimicrobiana (Aerts y *col.*, 1995).

Previamente al análisis, no se conoce qué tipo de residuos se encuentran en las muestras ni a qué intervalo de concentraciones. Este hecho obliga al analista a recurrir a técnicas de criba y posteriormente a técnicas más específicas de confirmación.

La función de un método criba es detectar con rapidez la presencia de una sustancia o tipo de sustancias al nivel de interés; se utilizan para cribar muchas muestras simultáneamente en busca de posibles resultados positivos y están diseñados para evitar falsos negativos (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). Las técnicas de análisis utilizadas con esta finalidad se basan en métodos inmunológicos, microbiológicos y cromatográficos, aunque actualmente los métodos criba más utilizados son los enzimaninmunoensayos (ELISA), los biosensores, la HPTLC y la HPLC (Toldrá y Reig, 2006) y para los antimicrobianos, los métodos microbiológicos.

Los métodos de confirmación, por el contrario, son aquellos que permiten obtener información adicional para la cuantificación e identificación inequívoca del analito (Decisión de la Comisión 2002/657/CE).

En los últimos años, los avances técnicos de la cromatografía de líquido acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) han contribuido a su elección como método oficial de confirmación en el campo del análisis de residuos de algunos compuestos (Kennedy y *col.*, 1998; Niessen, 1998; Stolker y Brinkman, 2005).

1.9.1 Métodos para el análisis de residuos de sulfonamidas en tejidos animales

Debido a la extensa utilización de estas sustancias a lo largo de los años, se han desarrollado numerosos métodos para su detección en los diferentes tejidos o productos derivados de vacuno, porcino, aves y pescado (Horwitz, 1981; Guggisber y *col.*, 1992; Wang y *col.*, 2005). La mayoría de estos métodos son válidos para varias sustancias pertenecientes a esta familia de compuestos (métodos multiresiduo) y están basados en técnicas cromatográficas (Horwitz, 1981; Guggisber y *col.*, 1992; Wang y *col.*, 2005).

Extracción y purificación de las SA's

La extracción de las SA's de las diferentes matrices animales (tejido muscular, hígado, riñón, leche y huevos) se lleva a cabo normalmente con disolventes o mezclas de disolventes orgánicos como la acetona, el acetato de etilo y el acetonitrilo (Ikai y *col.*, 1991; Tarbin y *col.*, 1999; Ito y *col.*, 2000; Kao y *col.*, 2001; Hela y *col.*, 2003).

También están descritas extracciones con fluidos supercríticos (SFE) (Cross y *col.*, 1993; Combs y *col.*, 1997; Din y *col.*, 1997; Arancibia y *col.*, 2003), extracciones asistidas por microondas (MAE) (Akhtar y *col.*, 1998), extracciones realizadas mediante sistemas de dispersión en fase sólida (MSPD) (Reimer y Suárez, 1991; Shearan y *col.*, 1994; Kishida y Furusawa, 2001 y 2003; Bogialli y *col.*, 2003^a) y con soluciones acuosas (Bogialli y *col.*, 2003^b; Kishida y Furusawa, 2003; Maudens y *col.*, 2004; Posyniak y *col.*, 2005).

Los métodos utilizados más frecuentemente para la purificación de muestras en la detección de residuos son los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de fase reversa (RP). En el caso de las sulfonamidas, debido a las características anfotéricas que presentan, los más utilizados son los de fase normal (NP) y los de intercambio iónico (Ikai y *col.*, 1991; Mooser y Kock, 1993; Ito y *col.*, 2000). La utilización de cartuchos SPE-RP requiere de un paso previo de desengrasado (deffating) y de evaporación o dilución del disolvente orgánico utilizado durante el proceso de extracción (Kao y *col.*, 2001; Hela y *col.* 2003). Las extracciones realizadas con soluciones acuosas permiten cargar los cartuchos SPE-RP directamente sin necesidad de pasos previos. Utilizando los cartuchos SPE de fase normal, se pueden extraer las SA's con disolventes orgánicos y cargar los extractos directamente en las columnas SPE para su purificación (Ikai y *col.*, 1991).

Otras técnicas de purificación descritas en la bibliografía se basan en membranas de ultrafiltración (Furusawa, 2000-2001), diálisis (McGrane y *col.*, 1999) o el empleo de resinas de intercambio aniónico y alúmina (Schwartz y Lightfield, 1995). Algunos autores no realizan una purificación, únicamente diluyen o evaporan el extraente utilizado, reconstituyen el extracto y lo inyectan directamente en el sistema cromatográfico (Akhtar y *col.*, 1998; Ueno y Aoki, 1996; Ueno y *col.*, 1999; Furusawa y Kishida, 2004) consiguiendo así, disminuir el tiempo de análisis.

En otros estudios están descritas extracciones líquido-líquido (LLE) con disolventes orgánicos apolares y tampones, aprovechando así las características anfotéricas que presentan estas moléculas (Takeda y Akiyama, 1991; Mooser y Kock, 1993; Simeonidou y *col.*, 1996; Gehring y *col.*, 1997). Una interesante aproximación a la purificación de muestras con SA's es la utilización de columnas de inmunoafinidad (Martbauer y *col.*, 1996) y los sistemas con polímeros de huella molecular (MIP's) (Zheng y *col.*, 2004; Chen y *col.*, 2005; de Prada y *col.*, 2005).

La necesidad de disminuir el tiempo de análisis ha motivado al desarrollo de distintos sistemas de purificación y detección "on-line" que permiten aumentar el número de muestras que se pueden analizar en un mismo día (Van Eeckout y *col.*, 2000).

Detección de SA's

- Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos para la determinación de SA's están basados en test de inhibición microbiológica, que requieren tiempos de incubación superiores a las 12 horas (cultivos "overnight") pero presentan la ventaja de poder procesar muchas muestras simultáneamente. Además, necesitan pequeñas cantidades de muestra, un equipamiento mínimo, no requieren un pretratamiento de la muestra muy laborioso y tienen un coste relativamente bajo. El principal inconveniente que presentan es su falta de poder de discriminación entre diferentes grupos de antimicrobianos y su escasa capacidad de detectar metabolitos inactivos microbiológicamente (Okerman y *col.*, 1998^{a,b}; Braham y *col.*, 2001; Dey y *col.*, 2005). Los Límites de detección (LOD) de estos métodos de análisis

pueden variar entre 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 8 mg/Kg (Pena y *col.*, 2004) en función de la matriz y tipo de sulfonamida y normalmente se reservan como métodos de criba.

- Métodos inmunológicos

Existen en el mercado varios kits ELISA para la detección de una o varias sulfonamidas a niveles de pocos $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Estos tipos de test resultan suficientemente específicos en muchas matrices y son muy utilizados como métodos de criba (Haasnoot y *col.*, 1996; Crabbe y Van Peteghem, 2002; He y *col.*, 2005). Algunos kits se han desarrollado en formato “strip” para la detección de SA’s presentes en muestras líquidas como la orina o la leche *in situ* (Verheijen y *col.*, 1999) y otros son capaces de detectar simultáneamente metabolitos inactivos (Haasnoot y *col.*, 1996; He y *col.*, 2005).

Los anticuerpos también se han utilizado para la fabricación de biosensores que se han empleado para realizar pruebas criba de varias SA’s en extractos de tejido muscular porcino (Bjurling y *col.*, 2000; McGrath y *col.*, 2005).

- Métodos cromatográficos

Cuando se emplea la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS), las SA’s requieren de una derivatización previa para se aumente su volatilidad y se originen fragmentos de peso molecular válidos para el análisis de trazas en muestras biológicas (altamente complejas)(Mooser y Kock, 1993). Por estas razones normalmente se recurre a reacciones de metilación o acilación (Nose y *col.*, 1976; Goodspeed y *col.*, 1978; Manuel y Steller, 1981; Munns y Roybal, 1982; Matusik y *col.*, 1990; Mooser y Kock, 1993; Cannavan y *col.*, 1996). Aún así, la GC/MS no es la técnica más adecuada para el análisis de estos compuestos debido al elevado número de etapas que se deben realizar antes del análisis por GC (Niessen, 1998).

La TLC también se ha utilizado como método de criba derivatizando las SA’s con fluorescamina para su detección (Reimer y Suarez, 1991; Unruh y *col.*, 1993). En el transcurso de los años, la TLC ha sido mejorada pero sigue siendo una técnica poco precisa y de difícil cuantificación, por lo que se reserva como método de criba.

Sin duda alguna, la técnica más utilizada para el análisis de los residuos de sulfonamidas es la cromatografía líquida (LC). Algunos métodos se basan en la derivatización post columna (Gehring y *col.*, 1997; Smallidge y Albert, 2000; Maudens y *col.*, 2004) o precolumna de las SA's (Takeda y Akiyama, 1991; Tsai y Kondo, 1995; Simeonidou y *col.*, 1996; Salisbury y *col.*, 2004) con fluorescamina y detección por fluorescencia (FLD). En algunos casos, ciertas SA's se han derivatizado con 4-dimetilaminobenzaldehído y han sido detectadas a 450nm para minimizar la presencia de sustancias interferentes (Akhtar y *col.*, 1998).

La HPLC acoplada a detectores UV o DAD se ha aplicado, por su mayor simplicidad, para la cuantificación de las SA's presentes en distintas matrices animales, utilizando el máximo de absorción próximo a 270 nm que presentan estos compuestos (Baliz y *col.*, 1994; Furusawa, 2000-2002; Kao y *col.*, 2001; Pecorelli y *col.*, 2004).

La HPLC-MS es una técnica muy apropiada para la determinación de SA's porque permite la confirmación de la identidad de los compuestos analizados. La mayoría de los métodos LC-MS publicados para el análisis de SA's se basan en la HPLC/APCI-MS y HPLC/ESI-MS (Combs y *col.*, 1997; Kennedy y *col.*, 1998; Niessen, 1998; Tarbin y *col.*, 1999; Fuh y Chan, 2001; Di Corcia y Nazzari, 2002; Gentili y *col.*, 2004; Msgati y Nindi, 2004). A bajos voltajes de ionización, la fragmentación molecular es mínima y puede ser útil trabajar en estas condiciones para la cuantificación. Para confirmar la naturaleza de los analitos, existen fragmentos típicos de esta familia de compuestos con pesos moleculares de 156 ($[M-RNH_2-SO]^+$) y 108 ($[M-RNH_2]^+$), estos dos, son los iones más utilizados como iones diagnóstico (Kennedy y *col.*, 1998; Niessen, 1998; Ito y *col.*, 2000; Di Corcia y Nazzari, 2002).

1.9.2 Métodos para el análisis de quinolonas en tejidos animales

El análisis de los residuos de QA's en tejidos animales, al igual que para la mayoría de antimicrobianos, tradicionalmente se ha realizado mediante análisis microbiológicos (Okerman y *col.*, 1998^{a,b}; Choi y *col.*, 1999; Myllyniemi y *col.*, 2001; Okerman y *col.*, 2001). Pero este tipo de analíticas son relativamente lentas, poco precisas y poco específicas, no pudiendo detectar la presencia de metabolitos inactivos (Carlucci, 1998).

De manera simplificada, el análisis de QA's incluye una extracción con un solvente adecuado seguida de una o varias etapas de purificación y la detección mediante LC-DAD, LC-FLD o LC-MS/MS. La mayoría de estos métodos son válidos para el análisis simultáneo de varias sustancias pertenecientes a la misma familia de compuestos (Hernández-Arteseros y *col.*, 2002).

Extracción y purificación de las QA's

La extracción de las QA's de las diferentes matrices animales (tejido muscular, hígado, riñón, leche y grasa), se ha llevado a cabo mediante diferentes aproximaciones. Se han descrito extracciones con disolventes orgánicos polares como acetato de etilo, etanol, metanol y acetonitrilo, con soluciones acuosas tamponadas y disolventes orgánicos inmiscibles (cloroformo, diclorometano) y mezclas hidro-orgánicas ácidas o básicas (Hernández-Arteseros y *col.*, 2002). Están también descritas extracciones con fluidos supercríticos (SFE) y extracciones asistidas por microondas (Shim y *col.*, 2003, Hermo y *col.*, 2005).

Los métodos utilizados más frecuentemente para la purificación de los extractos incluyen cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de fase reversa (RP) tipo C₁₈ (Horie y *col.*, 1994; Delepine y *col.*, 1998; Gigosos y *col.*, 2000; Cinquina y *col.*, 2003; Dong y *col.*, 2005) o poliméricos (Posyniak y *col.*, 1999; Samanidou y *col.*, 2005), aunque debido a las características químicas que presentan las QA's, los cartuchos de intercambio catiónico y mixto también son muy utilizados (Tarbin y *col.*, 1992; Roybal y *col.*, 1997; Johnston y *col.*, 2002; Roybal y *col.*, 2002; Toussaint y *col.*, 2002).

Otras técnicas de purificación descritas en la bibliografía son aquellas basadas en sistemas de diálisis (Schneider y Donoghue, 2000; Schneider, 2001; Lolo y *col.*, 2005), membranas de ultrafiltración, cromatografía de inmunoafinidad (Holtzapple y *col.*, 1999; 2001) y extracciones líquido-líquido (LLE) (Hernandez-Arteseros y *col.*, 2002; Carreras y *col.*, 2004; García y *col.*, 2005), aunque también están descritos varios métodos que no incluyen ninguna etapa de purificación de los extractos (Strelevitz y Linhares 1996; Yorke y Froc, 2000; Chu y *col.*, 2002; Schneider y *col.*, 2005; Verdon y *col.*, 2005).

DetECCIÓN DE QA'S

Para el análisis de estos compuestos, la cromatografía de líquidos (LC) ha sido la técnica más utilizada, aunque también existen varios métodos basados en la cromatografía de gases (GC), la electroforesis capilar (CE) y métodos inmunológicos (EIA) (Duan y Yuan, 2001; Barron y *col.*, 2001; Horstkotter y *col.*, 2002; Bucknall y *col.*, 2003; Wang y *col.*, 2005).

Algunas QA's presentan una elevada respuesta fluorimétrica a pH bajos (Hernández-Arteseros y *col.*, 2002) por lo que en numerosos métodos se utilizan detectores de fluorescencia (FLD)(Horie y *col.*, 1994; Strelevitz y Linhares 1996; Rose y *col.*, 1998; Posyniak y *col.*, 1999; Roybal y *col.*, 1997; Yorke y Froc, 2000; Chu y *col.*, 2002; Roybal y *col.*, 2002; Carreras y *col.*, 2004; Ho y *col.*, 2004; Dong y *col.*, 2005; García y *col.*, 2005; Kirbis y *col.*, 2005; Schneider y *col.*, 2005; Verdon y *col.*, 2005). Para la detección de estos compuestos por FLD, la λ de excitación generalmente se fija entre 275 y 280 nm y la de emisión entre 440 y 450 nm, dependiendo del compuesto estudiado.

Los detectores UV o DAD también se han utilizado para el análisis de estos compuestos que presentan dos bandas de absorción típicas, una entre 245-290 nm y otra entre 300-350 nm (Gigosos y *col.*, 2000; Maraschiello y *col.*, 2001; Samanidou y *col.*, 2005).

La mayoría de los métodos LC-MS utilizados se basan en la HPLC/APCI-MS y HPLC/ESI-MS (Delepine y *col.*, 1998; Kennedy y *col.*, 1998; Niessen, 1998; Turnipseed y *col.*, 1998; Johnston y *col.*, 2002; Toussaint y *col.*, 2002; Hatano, 2004).

Los métodos basados en HPLC-FLD y HPLC-MS son muy sensibles, aunque a diferencia de la HPLC-FLD, la HPLC-MS permite detectar la presencia de metabolitos no fluorescentes (Van Vyncht y *col.*, 2002).

1.9.3 Métodos para el análisis de dexametasona en muestras biológicas

Extracción y purificación de DEX

La extracción de DEX de las muestras biológicas generalmente se realiza con disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, eter dietílico) o soluciones acuosas ácidas o alcalinas (Courtheyn y *col.*, 1994; Hartmann y Steinhart, 1997; Iglesias y *col.*, 1999; Cirimele y *col.*, 2000; Van den Hauwe y *col.*, 2001; Raul y *col.*, 2002; Cherlet y *col.*, 2004). Cuando se considera que en las muestras están presentes metabolitos conjugados, se realiza una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa o extractos de *Helix pomatia* para liberar el compuesto base y mejorar la sensibilidad del análisis (Courtheyn y *col.*, 1994; Marchand y *col.*, 2000; Brambilla y *col.*, 2001; Amendola y *col.*, 2003). Pero debido a la complejidad de este paso, se ha propuesto su sustitución por otro tipo de hidrólisis como la ácida (O’Keeffe y *col.*, 2003).

La purificación de los extractos casi siempre se realiza con cartuchos SPE tipo C₈ (Hartmann y Steinhart, 1997), C₁₈ (Bévalot y *col.*, 2000; Cirimele y *col.*, 2000), sílica (Mallison y *col.*, 1995) o combinaciones de ellos (Antignac y *col.*, 2001).

También se han descrito métodos que utilizan extracciones con fluidos supercríticos (SFE) (Marchand y *col.*, 2000), extracciones LLE con Na₂CO₃ 10% (Antignac y *col.*, 2001), TBME (Brambilla y *col.*, 2001; Amendola y *col.*, 2003), acetato de etilo (Iglesias y *col.*, 1999) o pentano (Choi y Chung, 1999), la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a GC/MS (Kumazawa y *col.*, 2003) y la inmunocromatografía (Delahaut y *col.*, 1997).

Detección de residuos de DEX

El LMR de la DEX está fijado a niveles muy bajos (0,3 a 2 μ g/Kg) por lo que es necesario utilizar técnicas muy sensibles para cumplir la normativa. Además, las dosis terapéuticas administradas son relativamente bajas a causa de la elevada potencia farmacológica de estos compuestos. Debido a estos factores, para la determinación de CT en distintas muestras biológicas se utilizan mayoritariamente métodos inmunológicos como métodos de criba (Bambilla y *col.*, 2001; van Vyncht y *col.*, 1994)

y cromatográficos acoplados a la espectrometría de masas (GC-MS/MS y HPLC-MS/MS) para la confirmación (Stolke y *col.*, 2000; Pujos y *col.*, 2005; Ronquist-Nii y Edlund, 2005; Van den Hauwe y *col.*, 2005; Ho y *col.*, 2006).

Aunque existan varios métodos publicados basados en la GC (Kayganich y *col.*, 1990; Mallison y *col.*, 1995; Delahaut y *col.*, 1997; Courtheyn y *col.*, 1998; Bourgogne y *col.*, 2000; Huetos Hidalgo y *col.*, 2003), la baja volatilidad y la inestabilidad térmica de los CT complican la aplicación de esta técnica.

El trimetilsililimidazol es uno de los agentes sililizantes más efectivos porque puede reaccionar con los grupos hidroxilo posicionados en el C₁₁ de los CT a pesar del impedimento estérico (Amendola y *col.*, 2003).

Para reducir los tiempos requeridos para que se produzca la reacción de derivatización, se utilizan mezclas que contienen catalizadores y agentes reductores como MSTA:TMIS:DTE (1000:2:2 v/v/w) o MSTFA:TMIS:DTT (100:5:5 v/v/w) (Hartmann y Steinhart, 1997; Marchand y *col.*, 2000). Otras estrategias también descritas se basan en la utilización de un catalizador alcalino (piperidina) en sinergia con BSTFA (Chambaz y *col.*, 1969), la mezcla de MSTFA:NH₄I:DTE/2-mercaptoetanol o la formación de metoxi-trimetilsilil derivados (Amendola y *col.*, 2003).

Una técnica ampliamente utilizada (Mallison y *col.*, 1995; Delahaut y *col.*, 1997; Bourgogne y *col.*, 2000; Huetos Hidalgo y *col.*, 2003) en el caso de los CT, ha sido la oxidación con una mezcla de clorocromato de piridinio y acetato sódico durante 3 horas a 90 °C descrita por Kayganich y *col.* (1990) o una variación de ésta última pero más rápida con dicromato potásico en medio ácido durante 10 min a 40 °C desarrollada posteriormente por Courtheyn y *col.* (1998). El problema de esta reacción de oxidación es que modifica la estructura nativa del CT, dando lugar a la pérdida de la cadena lateral C₁₇ y la oxidación a cetonas de los grupos -OH presentes en C₁₁ y C₁₇. El resultado final, por lo tanto, en el caso de la DEX es un compuesto 3, 11, 17-triona, estable térmicamente pero sin la información estructural original y que puede ser común a otros CT que puedan estar presentes en la muestra (Amendola y *col.*, 2003).

El hecho de que el paso de derivatización para el análisis mediante GC resulte complicado, hace que cada vez se utilicen más métodos de análisis basados en la HPLC-MS que permite cuantificar, identificar y confirmar los resultados sin necesidad de derivatizar los analitos (de Wasch y *col.*, 1998; Fiori y *col.*, 1998; de Wasch y *col.*,

2000; Antignac y *col.*, 2001; Brambilla y *col.*, 2001; Draisci y *col.*, 2001; Van den Hauwe y *col.*, 2001; Antignac y *col.*, 2002; Arthur y *col.*, 2004; Cherlet y *col.*, 2004; Van den Hauwe y *col.*, 2005; Muñoz y *col.*, 2005). También están descritos métodos de separación por HPLC y detección por quimioluminiscencia después de hacer reaccionar los CT sintéticos con luminol (Iglesias y *col.*, 1999, 2000).

1.10 Objetivos

Los Objetivos principales de este trabajo fueron:

1. Desarrollar métodos rápidos y específicos para el análisis de residuos de enrofloxacino (ENR) y sulfametacina (SMZ) en pelo vacuno y porcino y de dexametasona (DEX) en pelo vacuno.
2. Confirmar la acumulación de ENR y SMZ en pelo vacuno y porcino y de DEX en pelo vacuno después de un tratamiento farmacológico con estos compuestos.
3. Estudiar el efecto de la pigmentación del pelo de vacuno en la deposición de los residuos de ENR, SMZ y DEX en pelo.
4. Estudiar el efecto del tiempo transcurrido después del tratamiento en la deposición de ENR y SMZ en pelo vacuno y porcino.
5. Comparar los niveles residuales de ENR y SMZ presentes en pelo, hígado y músculo después de un tratamiento farmacológico.

1.11 Bibliografía

1.11.1 Referencias bibliográficas

Aerts, M.M., Hogenboom, A.C., Brinkman, U.A. (1995). Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 667, 1-40.

Agerso, Y., Wulff, G., Vaclavik, E., Halling-Sorensen, B., Jensen, L.B. (2006). Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene tet(M) in soil microcosms. *Environ. Int.*, 32(7), 876-882.

Akhtar, M. H., Wong, M., Crooks, S. R., Sauve, A. (1998). Extraction of incurred sulphametazine in swine tissue by microwave assisted extraction and quantification without clean up by HPLC following derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. *Food Addit. Contam.*, 15(5), 542-547.

Amendola, L., Garriba, F., Botre, F. (2003). Determination of endogenous and synthetic glucocorticoids in human urine by gas chromatography-mass spectrometry followed microwave-assisted derivatization. *Anal. Chim. Acta*, 489, 233-243.

Anónimo. (2003) Corporate Communications and Counsel. Available at: <http://www.corpcoms.com/db/antibioticsreport.pdf> Oct 2003. Accessed: February 2005.

Anónimo. (2004) (Standarization of hormone and veterinary drug residue analysis in animal Products. Available at: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-51481373971961/unrestricted/etd.pdf>). Accessed: February 2004.

Antignac, J-P., Le Bizec, B., Monteau, F., Poulain, F., André, F. (2001). Multi-residue extraction-purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production. *J. Chromatogr. B.*, 757, 11-19.

Antignac, J-P., Le Bizec, B., Monteau, F., François, A. (2002). Study of natural and artificial corticosteroid phase II metabolites in bovine urine using HPLC-MS/MS. *Steroids*, 67, 873-882.

Arancibia, V., Valderrama, M., Rodriguez, P., Hurtado, F., Segura, R. (2003). Quantitative extraction of sulfonamides in meats by supercritical methanol-modified carbon dioxide: A foray into real-world sampling. *J. Sep. Sci.*, 26(18), 1710 –1716.

Arthur, K.E., Wolff, J.C., Carrier, D.J. (2004). Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 18(6), 678-684.

Balitz G., Benesch-Girke L., Börner S. Hewitt S. A. (1994). Comparison of the determination of four sulphonamides and their N⁴-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection. *J. Chromatogr. B.*, 661, 75-84.

Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Cano, J., Barbosa, J. (2001). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 759(1), 73-79.

- Bevalot, F., Gaillard, Y., Lhermitte, M.A., Pepin, G. (2000). Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 740(2), 227-236.
- Bjurling, P., Baxter, G.A., Caselunghe, M., Jonson, C., O'Connor, M., Persson, B., Elliott, C.T. (2000). Biosensor assay of silfadiazine and sulfamethazine residues in pork. *Analyst*, 125 (10), 1771-1774.
- Blanchflower, W. J., Rice, D. (1988). Extraction of sulfamethazine from feed samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(2), 302-304.
- Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Samperi, R. (2003)^a. A liquid chromatography mass spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish muscle tissues. *Anal. Chem.*, 75(8), 1798-1983.
- Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Sergi, M. (2003)^b. Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or triple-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17(11), 1146-1156.
- Bourgogne, E., Herrou, V., Mathurin, J., Becchi, M., Ceaurriz, J. (2000). Detection of exogenous intake of natural corticosteroids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: application to misuse sport. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 14, 2343-2347.
- Braham, R., Black, W.D., Claxton, J., Yee, A.J. (2001). A rapid assay for detection sulfonamides in tissues of slaughtered animals. *J. Food Protect.*, 64 (10), 1565-1573.
- Brambilla, G., Buiarelli, F., Cartoni, G.P., Coccioli, F., Colamonici, C., Fagiolo, A., Giannini, C., Neri, B. (2001). Determination of flumethasone in calf urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 755(1-2), 265-278.
- Bucknall, S., Silverlight, J., Coldham, N., Thorne, L., Jackman, R. (2003). Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. *Food Addit. Contam.*, 20(3), 221-228.
- Burgat, V. (1991). Residues of drugs of veterinary use in food. *Rev. Pr.*, 41(11), 985-990.
- Calvarese, S., Rubini, P., Urbani, G., Ferri, N., Ramazza, V., Zucchi, M. (1994). Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *Analyst*, 19(12), 2611-2615.
- Cancho-Grande, B., García-Falcón, M., Simal-Gándara, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3, 39-47.
- Cannavan, A., Hewitt, S.A., Blanchflower, W.J., Kennedy, D.G. (1996). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of sulphamethazine in animal tissues using a methyl/trimethylsilyl derivative. *Analyst*, 121(12), 1457-1461.
- Carreras, I., Castellari, M., Garcia Regueiro, J.A., Guerrero, L., Esteve-Garcia, E., Sarraga, C. (2004). Influence of enrofloxacin administration and alpha-tocopheryl acetate supplemented diets on oxidative stability of broiler tissues. *Poult. Sci.*, 83(5), 796-802.

- Carlucci, G. (1998). Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 812, 343-367.
- Chambaz, E. M., Horning, E. C. (1969). Conversion of steroids to trimethylsilyl derivatives for gas phase analytical studies: reactions of silylating reagents. *Anal. Biochem.*, 30, 7-24.
- Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P. (2004). Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 805(1), 57-65.
- Chen, Z., Zhao, R., Shangguan, D., Liu, G. (2005). Preparation and evaluation of uniform-sized molecularly imprinted polymer beads used for the separation of sulfamethazine. *Biomed. Chromatogr.*, 19(7), 533-538.
- Choi, J., Yee, A.J., Thompson, D., Samoluk, J., Mitchell, M., Black, W.D. (1999). Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using *Escherichia coli* as indicator organism. *J. AOAC Int.*, 82(6), 1407-1412.
- Chu, P.S., Wang, R.C., Chu, H.V. (2002). Liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in egg albumen and egg yolk of laying hens using fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 50(16), 4452-4455.
- Cinquina, A.L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo, F., Draisci, R., Fagiolo, A., Brizioli, N.R. (2003). Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Optimization and validation. *J. Chromatogr. A.*, 987(1-2), 221-226.
- Cirimele, V., Kintz, P., Dumestre, V., Gouille, J.P., Ludes, B. (2000). Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry. *Forensic Sci Int.*, 107(1-3), 381-388.
- COF (1995) Introducción a la química de los medicamentos (I). Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid.
- Colinas, C., Ingham, E., Molina, R. (1994). Population responses of target and non-target forest soil-organisms to select biocides. *Soil boil. Ciochem.*, 26, 41-47.
- Combs, M.T., Boyd, S., Ashraf-khorassani, M., Taylor, L.T. (1997). Quantitative recovery of sulfonamides from chicken liver, beef liver, and egg yolk via modified supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 45(5), 1779-1783.
- Courtheyn, D., Vercammen, J., De Brabander, H., Vandenreyt, I., Batjoens, P., Vanoosthuyze, K., Van Peteghem, C. (1994). Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry. *Analyst.*, 119(12), 2557-2564.
- Courtheyn, D., Vercammen, J., Logghe, M., Seghers, H., De Wasch, K., De Brabander, H. (1998). Determination of betamethasone and triamcinolone acetonide by GC-NCI-MS in excreta of treated animals and development of a fast oxidation procedure for derivatisation of corticosteroids. *Analyst.*, 123(12), 2409-2414.
- Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., de Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van de Wiele, M., Vercammen, J., de Wasch, K. (2002). Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Anal. Chim. Acta*, 473, 71-82.

Comisión Europea (1999). 1998 Report on residue monitoring results in food from animal origin in the Member States - Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2000). 1999 Report on residue monitoring results in food from animal origin in the Member States - Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea. (2001)^a Comunicación de la Comisión, de 20 de junio de 2001, relativa a una estrategia comunitaria contra la resistencia a los antimicrobianos [COM (2001) 333 final, Volumen I - no publicada en el Diario Oficial].

Comisión Europea (2001)^b. Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2000, (Council Directive 96/23/EC) Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2002). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2001, (Council Directive 96/23/EC) Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2003). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2002, (Council Directive 96/23/EC) Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2003). Reflection paper on residues in foodstuff of animal origin. Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2004). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2003, (Council Directive 96/23/EC) Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Comisión Europea (2005). Commission Staff Working Paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2004, (Council Directive 96/23/EC) Available at: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/control_en.htm Accessed: November 2006.

Crabbe, P., Van Peteghem, C. (2002). Rapid and sensitive scening of sulfamethazine in porcine urine with and enzyme-linkes immunosorbent assay and field-portable immunofiltartion assay. *J. Food Prot.*, 65, 820-827.

Cross, R. F., Ezzell, J. L., Richter, B.E. (1993). The supercritical fluid extraction of polar drugs (sulphonamides) from inert matrices and meat animal products. *J. Chromatogr. Sci.*, 31(5), 162-169.

- CVMP. (1995)^b. Sulphonamides Summary report (2). EMEA/MRL/026/95 Available at: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/002695en.pdf> Accessed: November 2006.
- CVMP. (1997). Dexamethasone Summary report (2). EMEA/MRL/195/97 CORRIGENDUM. March 1997 Available at: [http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/Dexamethasone\(1\).pdf](http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/Dexamethasone(1).pdf) Accessed: November 2006.
- CVMP. (1998). Enrofloxacin Summary report (2). EMEA/MRL/388/98-FINAL July 1998. Available at: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/019597en.pdf> Accessed: November 2006.
- CVMP. (2002)^a. Cloramphenicol Summary report. Available at <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/082002en.pdf> Accessed: November 2006.
- CVMP. (2002)^b. Enrofloxacin Summary report (5). EMEA/MRL/820/02-FINAL January 2002 Available at: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/038898en.pdf> Accessed: November 2006.
- De Baere, S., Baert, K., Croubels, S., De Busser, J., De Wasch, K., De Backer, P. (2000). Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analyst*, 125(3), 409-415.
- Delepine, B., Hurtaud-Pessel, D., Sanders, P. (1998). Simultaneous determination of six quinolones in pig muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Analyst*, 123, 2743-2747.
- Delhaut, P., Jacquemin, Y., Colemonts, M., Dubois, J., De Graeve, H., Deluyker, J. (1997). Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatography-mass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 696, 203-215.
- De Prada, A.G.V., Martinez-Ruiz, P., Reviejo, A.J., Pingaron, J.M. (2005). Solid-phase molecularly imprinted on-line precocentration and voltametric determination of sulfamethazine in milk. *Anal. Chim. Acta*, 539(1-2), 125-132.
- Dey, B.P., Reamer, R.P., Thaker, N.H., Thaler, A.M. (2005). Calf antibiotic and sulfonamide test (CAST) for screening antibiotic and sulfonamide residues in calf carcasses. *J. AOAC Int.*, 88(2), 440-446.
- De Wasch, K., De Brabander, H., Courtheyn, D., Van Peteghem, C. (1998). Detection of corticosteroids in injection sites and cocktails by MSn. *Analyst*, 123(12), 2415-2422.
- De Wasch, K., De Brabander, H.F., Van de Wiele, M., Vercammen, J., Courtheyn, D., Impens, S. (2001). Differentiation between dexamethasone and betamethasone in a mixture using multiple mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 926(1), 79-86.
- Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., Verschueren, C. (1991). Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food Chem. Toxicol.*, 29(7), 477-483.
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.*, 22(6), 340-351.

- Di Corcia, A., Nazzari, M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A.*, 974(1-2), 53-89.
- Díez, P. Calderón, V (2006). Empleo de antibióticos en veterinaria. Available on line at: http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0497/rev1.html Accessed: March 2005.
- Din, N., Bartle, K.D., Clifford, A.A., Mc Cormak, A., Catle, L. (1997). Supercritical fluid extraction of sulphamethazine and its metabolites from meat tissues. *J. Chromatogr.Sci.*, 35, 31-37.
- Domagk, G. (1935). Ein beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Meed. Wschr.*, 61, 250-253.
- Dong, L., Liu, Y., Wang, X., Zhong, F., Peng, L., Yue, X., Gao, L. (2005). Simultaneous determination of four fluoroquinolone residues in edible chicken tissues by reversed-phase high performance liquid chromatography]. *Se Pu*, 23(3), 285-288.
- Draisci, R., Marchiafava, C., Palleschi, L., Cammarata, P., Cavalli, S. (2001), Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroid residues in bovine liver. *J. Chromatogr. B.*, 753, 217-223.
- Duan, J., Yuan, Z. (2001). Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *J Agric Food Chem.*, 49(3), 1087-1089.
- Fiori, M., Pierdominici, E., Longo, F., Brambilla, G. (1998). Identification of main corticosteroids as illegal feed additives in milk replacers by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 807(2), 219-227.
- Florez, J. (1997). *Farmacología humana* (3^a ed.) Ed. Masson, Pamplona.
- Fuh, M.R.S., Chan, S.A. (2001). Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Talanta*, 55(6), 1127-1139.
- Furusawa, N. (2000). Simplified determining procedure for routine residue monitoring of sulphamethazine and sulphadimethoxine in milk. *J. Chromatogr. A.*, 898 (2), 185-191.
- Furusawa, N. (2001). Determining the procedure for routine monitoring of sulfamethazine in edible animal tissues. *Biomed. Chromatogr.*, 15(4), 235-239.
- Furusawa, N. (2002). Determination of sulfonamide residues in eggs by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 85(4), 848-851.
- Furusawa, N. (2003). A clean and rapid liquid chromatographic technique for sulfamethazine monitoring in pork tissues without using organic solvents. *J. Chromatogr. Sci.*, 41(7), 377-380.
- Furusawa, N., Kishida, K. (2004). Determining sulfamethazine in pork using HPLC with a 100% water mobile phase. *LC GC North America*, 22(11), 1092-1096.
- Gallo, G.F., Berg, J.L. (1995). Efficacy of a feed-additive antibacterial combination for improving feedlot cattle performance and health. *Can. Vet. J.*, 36(4), 223-224.

- Garcia, M.A., Solans, C., Calvo, A., Hernandez, E., Rey, R., Bregante, M.A., Puig, M. (2005). Determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residue studies. *Biomed. Chromatogr.*, 19(1), 27-31.
- Gehring, T.A., Rushing, L.G., Thompson, H.C.J. (1997). Determination of sulfonamides in edible salmon tissue by liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, 80(4), 751-755.
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S., Sergi, M., Olmi, C., Curini, R. (2004). Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15), 4614-4624.
- Gigosos, P.G., Revesado, P.R., Cadahia, O., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. (2000). Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A.*, 871(1-2), 31-36.
- Goodspeed, D.P., Simpson, R.M., Ashworth, R.B., Shafer, J.W., Cook, H.R. (1978). Sensitive and specific gas-liquid chromatographic-spectrophotometric screening procedure for trace levels of five sulfonamides in liver, kidney, and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61(5), 1050-1053.
- Guggisberg, D., Mooser, A.E., Koch, H. (1992). Methods for the determination of sulphonamides in meat. *J. Chromatogr.*, 624(1-2), 425-437.
- Grunwald, L., Petz, M. (2003). Food processing effects on penicillins in milk and yogurt residues. *Anal. Chim. Acta*, 483, 73-79.
- Haasnoot, W., Korsrud, G.O., Cazemier, G., Maneval, F., Keukens, H., Nouws, J. (1996). Application of an enzyme immunoassay for the determination of sulphamethazine residues in swine urine and plasma and their use as predictors of the level in edible tissue. *Food Addit. Contam.*, 13(7), 811-821.
- Halling-Sorensen, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40(4), 451-460.
- Halling-Sorensen, B., Lutzhoft, H.C., Andersen, H.R., Ingerslev, F. (2000). Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.*, Suppl 1:53-8; discussion 63-65.
- Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Tjornelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42(3), 263-271.
- Halling-Sorensen, B., Lykkeberg, A., Ingerslev, F., Blackwell, P., Tjornelund, J., (2003)^a. Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere*, 50(10), 1331-1342.
- Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., Ingerslev, F., Jensen, L.B.(2003)^b. Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 7-16.

- Halling-Sorensen, B., Jacobsen, A.M., Jensen, J., Sengelov, G., Vaclavik, E., Ingerslev, F., (2005). Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: a field-scale study in southern Denmark. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(4), 802-810.
- Hamscher, G., Pawelzick, H.T., Hoper, H., Nau, H. (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(4), 861-868.
- Hartmann, S., Steinhart, H. (1997). Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 704, 105-117.
- Hatano, K. (2004). Simultaneous determination of quinolones in foods by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 45(5), 239-244.
- Hathaway, M.R., Dayton, W.R., White, M.E., Henderson, T.L., Henningson, T.B. (1996). Serum Insulin-like Growth Factor (IGF-I) concentrations are increased in pigs fed antimicrobials. *J. Anim. Sci.*, 74, 1541-1547.
- He, J.H., Shen, J.Z., Suo, X., Jiang, H.Y., Hou, X.L. (2005). Development of a monoclonal antibody-based ELISA for detection of sulfametazine and N4-acetyl sulfamethazine in chicken breast muscle tissue. *J. Food Sci.*, 70 (11), 113-117.
- Hela, W., Brandtnewr, M., Widek, R., Schuh, R. (2003). Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC_DAD for detection. *Food Chem.*, 83, 601-608.
- Hermo, M.P., Barrón, D., Barbosa, P. (2005). Determination of residues of quinolones in pig muscle Comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Anal. Chim. Acta*, 539, 77-82.
- Hernandez-Arteseros, J.A., Barbosa, J., Compañó, R., Prat, M.D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A.*, 945(1-2), 1-24.
- Herwig, R.P., Gray, J.P., Weston, D.P. (1997). Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound. *Washington Aquaculture*, 149, 263-283.
- Ho, C., Sin, D.W., Tang, H.P., Chung, L.P., Siu, S.M. (2004). Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *J Chromatogr A.*, 1061(2), 123-131.
- Ho, E.N., Leung, D.K., Wan, T.S., Yu, N.H. (2006). Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A.* 1120(1-2), 38-53.
- Holtzapple, C.K., Buckley, S.A., Stanker, L.H. (2001). Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 754(1), 1-9.
- Holtzapple, C.K., Buckley, S.A., Stanker, L.H. (1999). Determination of four fluoroquinolones in milk by on-line immunoaffinity capture coupled with reversed-phase liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 82(3), 607-613.

- Horie, M., Saito, K., Nose, N., Nakazawa, H. (1994). Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 653(1), 69-76.
- Horstkotter, C., Jimenez-Lozano, E., Barron, D., Barbosa, J., Blaschke, G. (2002). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in chicken muscle by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 23(17), 3078-3083.
- Horwitz, W. (1981). Analytical methods for sulfonamides in foods and feeds. I. Review of methodology. *Off. Anal. Chem.*, 64, 104-130.
- Huetos-Hidalgo, O., Jiménez-López, M., Ajenjo, E., Carazo, M., San Andres, M., Reuvers, T.B.A. (2003). Determination of dexamethasone in urine by gas chromatography with negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 788, 137-146.
- Iglesias, Y., Fente, C.A., Vazquez, B., Franco, C., Cepeda, A., Mayo, S., Gigosos, P.G. (1999). Determination of dexamethasone in bovine liver by chemiluminescence high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 47(10), 4275-4279.
- Iglesias, Y.; Fente, C.; Vazquez, B.; Franco, C. y Cepeda, A. (2000). Chemiluminescence detection of nine corticosteroids in liver. *Analyst*, 125: 2071-2074.
- IFAH. (2006) Available at: <http://www.ifahsec.org/> Accessed: November 2006
- Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N., Hayakawa, J., Yamada, M., Harada, K., Suzuki, M., Nakazawa, H. (1991). Application of fan amino cartridge to the determination of residual sulphonamide antibacterials in meat, fish and egg. *J. Chromatogr.*, 541, 365-373.
- Istasse, L., Evrard, P., Van Eenaeme, C., Gielen, M., Maghuin-Rogister, G., Bienfait, J.M. (1988). Trenbolone acetate in combination with 17 beta-estradiol: influence of implant supports and dose levels on animal performance and plasma metabolites. *J. Anim. Sci.*, 66(5), 1212-1222.
- Ito, Y., Oka, H., Ikai, Y., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Nagase, H. (2000). Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 898 (1), 95-102.
- Johnston, L., Mackay, L., Croft, M. (2002). Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 982(1), 97-109.
- Jorgensen, S.E., Halling-Sorensen, B. (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40(7), 691-699.
- Kanny, G., Puygrenier, J., Beaudoin, E., Moneret-Vautrin, D.A. (1994). Alimentary anaphylactic shock: implication of penicillin residues. *Allerg. Immunol.*, 26(5), 181-183.
- Kao, Y.M., Chang, M.H., Cheng, C.C., Chou, S.S. (2001). Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Chicken and Swine Muscles by High Performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(2), 84-95.

- Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A.B.A. (2004). Fate of veterinary antibiotics in macroporus tile drained clay soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(5), 1136-1144.
- Kayganich, K., Watson, J.T., Kilts, C., Ritchie, J. (1990). Determination of plasma dexamethasone by chemical oxidation and electron capture negative ionization mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Sp.*, 19, 341-347.
- Kennedy, D.G., McCracken, R.J., Cannavan, A., Hewitt, S.A. (1998). Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *J. Chromatogr. A.*, 812(1-2), 77-98.
- Kirbis, A., Marinsek, J., Flajs, V.C. (2005). Introduction of the HPLC method for the determination of quinolone residues in various muscle tissues. *Biomed. Chromatogr.*, 19(4), 259-265.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2001). Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *J. Chromatogr. A.*, 937(1-2), 49-55.
- Kishida, K., Furusawa, N. (2003). Toxic/harmful solvents-free technique for HLC determination of six sulfonamides in meat. *J. Liq. Chrom & R. T.*, 26(17), 2931-2939.
- Korner, U., Kuhne, M., Wenzel, S. (2001). Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: methodology and examination of field samples. *Food. Addit. Contam.*, 18(4), 293-302.
- Korolkovas A, Burckhalter JH (1979) Compendio esencial de química farmacéutica. Ed. Reverté S.A Barcelona, 605.
- Krapac, I.G., Koike, S., Meyer, M.T., Snow, D.D., Chou, S-F.J., Mackie, R.I., Roy, W.R., Chee-Sandford, J.C. (2005). Long-term monitoring of the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance in groundwater near swine confinement facilities. Report of the CSREES project 2001-35102-10774.
- Kuhne, M., Korner, U., Wenzel, S. (2001). Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: the effect of heat treatments on bound tetracycline residues. *Food Addit. Contam.*, 18(7), 593-600.
- Kumazawa, T., Lee X-P., Sato, K., Suzuki, O. (2003). Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Anal. Chim. Acta*, 492, 49-67.
- Lescher, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P. (1962). 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.*, 91, 1063-1065.
- Littlefield, N.A., Gaylor, D.W., Blackwell, B.N., Allen, R.R. (1989). Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphametazine in B6C3F1 mice. *Food Chem. Toxicol.* 27(7), 455-463.
- Lolo, M., Pedreira, S., Fente, C., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. (2005). Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 53(8), 2849-2852.

- Lovine, N.M., Blaser, M.J. (2004). Antibiotics in animal feed and spread of resistant *Campylobacter* from poultry to humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 10 (6), 1158-1159.
- Mallison, E.T., Dreas, J. S., Wilson, R. T., Carolyn, H. A. (1995). Determination of Dexamethasone in liver and Muscle by liquid Chromatography and Gas chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 140-145.
- Manual MercK de veterinaria (2000). 5ª Ed. Grupo editorial OCEANO, Barcelona.
- Manuel, A.J., Steller, W.A. (1981). Gas-liquid chromatographic determination of sulfamethazine in swine and cattle tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64(4), 794-799.
- Maraschiello, C., Cusido, E., Abellan, M., Vilageliu, J. (2001). Validation of an analytical procedure for the determination of the fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 754(2), 311-318.
- Marchand, P., le Bizec, B., Gade, C., Monteau, F., Andre, F. (2000). Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 867(1-2), 219-233.
- Martin, G.J. (1942). Aminobenzoic acid and sulfonamides in rat nutrition. *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.*, 51, 56-59.
- Martlbauer, E., Dietrich, R., Usleber, E. (1996). Immunoaffinity chromatography as a tool for the analysis of antibiotics and sulfonamides. *Vet. Drug residues*, 636, 121-126.
- Matusik, J.E., Sternal, R.S., Barnes, C.J., Sphon, J.A. (1990). Confirmation of identity by gas chromatography/tandem mass spectrometry of sulfathiazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine and sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography/electron-capture detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(4), 529-533.
- Maudens, K.E., Zhang, G.F., Lambert, W.E. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, 1047, 85-92.
- McEvoy, J. D., Mayne, C. S., Higgins, H. C., Kennedy, D. G. (1999). Transfer of sulphamethazine from contaminated dairy feed to cows milk. *Vet. Rec.*, 24(17), 470-475.
- McGrane, M., O'Keeffe, M., Smyth, M.R. (1999). The analysis of sulphonamide drug residues in pork muscle using automated dialysis. *Analytical letters*, 32, 481-495.
- McGrath, T., Baxter, A., Ferguson, J., Haughey, S., Bjurling, P. (2005). Multi sulfonamide screening in porcine muscle using a surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 529, 123-127.
- Migliore, L., Brambilia, G., Cozzolino, S., Gaudio, L. (1995). Effects on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (panicum miliaceum, Pisum sativum and Zea mays). *Agric. Ecosyst. Environ.*, 52, 103-110.
- Migliore, L., Brambilia, G., Casoria, P., Civitareale, S.C., Gaudio, L. (1996). Effect of sulphadimethoxine contamination on barley (hordeum disticum L, Poaceae, liliopsida). *Agric. Ecosyst. Environ.*, 60, 121-128.

- Mitchell, A.D., Paulson, G.D., Saylskie, R.G., (1986). Steady state kinetics of ¹⁴C-sulfamethazine metabolism in swine. *Drug. Metab. Dispos.*, 14(2), 161-165.
- Moats, W.A. (1999). The effect of processing on veterinary residues in foods. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 459, 233-241.
- Moore, P.R., Evenson, A., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, C.A., Hart, E.B. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.*, 165, 437-441.
- Mooser, A.E., Kock, H. (1993). Confirmatory method for sulphonamide residues in animal tissues by gas chromatography and pulse positive ion-negative ion-chemical ionization mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 76, 976-982.
- Mtagati, T.A.M, Nindi, M.M, (2004). Southern and Eastern Africa Network for Analytical Chemists Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*, 64, 87-100.
- Munsey, T., Grigg, R.E., McCormack, A., Symonds, H.W., Bowmer, C.J. (1996). Binding of sulphamethazine to pig plasma proteins and albumin. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 19(2), 135-141.
- Munns, R.K., Roybal, J.E. (1982). Rapid gas-liquid chromatographic method for determination of sulfamethazine in swine feed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 65(5), 1048-1053.
- Muñoz, P., Blanca, J., Ramos, M., Bartolomé, M., García, E., Méndez, N., Gomez, J., Martín de Pozuelo, M. (2005). A versatile liquid chromatography–tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. *Anal. Chim. Acta*, 529, 137-144.
- Myllyniemi, A.L., Nuotio, L., Lindfors, E., Rannikko, R., Niemi, A., Backman, C.A. (2001). Microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *Analyst*, 126(5), 641-646.
- Niessen, W.M. (1998). Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 812(1-2), 53-75.
- Nose N, Kobayashi S, Hirose A, Watanabe A. (1976) Gas-liquid chromatographic determination of sulphonamides. *J. Chromatogr.* 123(1), 167-173.
- Nouws, J.F.M., Firth, E.C., Vree, T.B. (1987). Pharmacokinetics and renal clearance of sulfamethazine, Sulfamerazine and sulfadiazine and their N4-acetyl and hydroxyl metabolites in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 48(3), 392-402.
- Nunnery, J., Angulo, F.J., Tollefson, L. (2006). Public health and policy. *Prev. vet. Med.*, 73, 191-195.
- O’Keeffe, M.J., Martin S., Regan L. (2003). Validation of a multiresidue liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantitation and confirmation of corticosteroid residues in urine, according to the proposed SANCO 1085 criteria for banned substances *Anal. Chim. Acta*, 483, 341-350.
- Okerman, L., De Wasch, K., Van Hoof, J. (1998)^a. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst*, 123(11), 2361-2365.

- Okerman, L., van Hoof, J., Debeuckelaere, W. (1998)^b. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J. AOAC Int.*, 81(1), 51-56.
- Okerman, L., Croubels, S., De Baere, S., Van Hoof, J., De Backer, P., De Brabander, H. (2001). Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Addit Contam.*, 18(5), 385-393.
- Page, S.W. (1991)^a. Chloramphenicol 1. Hazards of use and the current regulatory environment. *Aust. Vet. J.*, 68, 1-2.
- Page, S.W. (1991)^b. Chloramphenicol 3. Clinical pharmacology of systemic use in the horse. *Aust. Vet. J.*, 68, 5-8.
- Paulson, G.D., Feil, V.J., Giddings, J.M., Lamoureux, C.H. (1992). Lactose conjugation of sulphonamide drugs in the lactating dairy cow. *Xenobiotica*, 22(8), 925-939.
- Pecorelli, I., Bibi, R., Fioroni, L., Galarini, R. (2004). Validation of a confirmatory method for the determination of sulphonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A*, 1032(1-2), 23-29.
- Pena, A., Serrano, C., Reu, C., Baeta, L., Calderon, V., Silveira, I., Sousa, J. C., Peixe, L. (2004). Antibiotic residues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Addit. Contam.*, 21(8), 749-755.
- Podhorniak, L.V., Leake, S., Schenck, F.J. (1999). Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *J. Food Prot.*, 62(5), 547-548.
- Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S., Niedzielska, J., Ellis, R. (1999). Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 13(4), 279-285.
- Posyniak, A., Zmudzki, J., Mitrowska, K. (2005). Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1087, 259-264.
- Pujos, E., Flament-Waton, M.M., Paise, O., Grenier-Loustalot, M.F. (2005). Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 244-254.
- Raison-Peyron, N., Messaad, D., Bousquet, J., Demoly, P. (2001). Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. *Allergy*, 56(8), 796-797.
- Raul, J.S., Cirimele, V., Ludes, B., Kintz, P. (2002). A single therapeutic treatment with betamethasone is detectable in hair. *J. Anal. Toxicol.*, 26(8), 582-583.
- Reimer, G.J., Suarez, A. (1991). Development of a screening method for five sulfonamides in salmon muscle tissue using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 555(1-2), 315-320.
- Ronquist-Nii, Y., Edlund, P.O. (2005). Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37(2), 341-350.

- Rose, M.D., Bygrave, J., Farrington, W.H., Shearer, G. (1997). The effect of cooking on veterinary drug residues in food. Part 8. Benzylpenicillin. *Analyst*, 122(10), 1095-1099.
- Rose, M.D., Bygrave, J., Stubbings, G.W. (1998). Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. *Analyst*, 123(12), 2789-2796.
- Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Turnipseed, S.B., Walker, C.C., Hurlbut, J.A. (1997). Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 80(5), 982-987.
- Roybal, J., Walker, C.C., Pfenning, A.P., Turnipseed, S.B., Storey, J.M., Gonzales, S.A., Hurlbut, J.A. (2002). Concurrent determination of four fluoroquinolones in catfish, shrimp, and salmon by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, 85(6), 1293-1301.
- Salisbury, J.G., Nicholls, T.J., Lammerding, A.M., Turnidge, J., Nunn, M.J. (2002). A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food producing animals. *Int. J. Antimicrob. agents*, 20, 153-164.
- Salisbury, C.D., Sweet, J.C., Munro, R. (2004). Determination of sulfonamide residues of food animals using automated precolumn derivatization and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, 87(5), 1264-1268.
- Salleras, L., Dominguez, A., Mata, E., Taberner, J.L., Moro, I., Salva, P. (1995). Epidemiologic study of an outbreak of clenbuterol poisoning in Catalonia, Spain. *Public Health Rep.*, 110(3), 338-342.
- Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N. (2005). Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *J. Sep. Sci.*, 28(6), 555-565.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 64(4), 497-507.
- Schmid, A. (1983). Chloramphenicol residues in foods of animal origin as a potential cause of aplastic anemia in man. *Fortschr. Med.*, 101(42), 1913-1920.
- Schmitt, H., Stoob, K., Hamscher, G., Smit, E., Seinen, W. (2006). Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microb. Ecol.*, 51(3), 267-276.
- Schneider, M.J., Donoghue, D.J. (2000). Multiresidue determination of fluoroquinolones in eggs. *J. AOAC Int.*, 83(6), 1306-1312.
- Schneider, M.J. (2001). Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using automated microdialysis-liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 39(8), 351-356.
- Schneider, M.J., Vazquez-Moreno, L., Bermudez-Almada, M. del C., Guardado, R.B., Ortega-Nieblas, M. (2005). Multiresidue determination of fluoroquinolones in shrimp by liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 88(4), 1160-1166.
- Schroder, J. (1989). Enrofloxacin: a new antimicrobial agent. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 60(2), 122-124.

- Schwartz, D.P., Lightfield, A.R. (1995). Practical screening procedures for sulfamethazine and N4-acetylsulfamethazine in milk at low parts-per-billion levels. *J. AOAC Int.* 78(4), 967-970.
- Shakila, R.J., Vyla, S.A.P, Kumar, R.S., Jeyasekaran, G., Jasmine, G.I. (2006). Stability of chloramphenicol residues in shrimp subjected to heat processing treatments. *Food Microbiol.*, 23, 47-51.
- Shearan, P., O'Keeffe, M., Smyth, M.R. (1994). Comparison of matrix solid phase dispersion (MSPD) with a standard solvent extraction method for sulphamethazine in pork muscle using high performance liquid and thin layer chromatography. *Food Addit. Contam.*, 11(1), 7-15.
- Shim, J.H., Shen, J.Y., Kim, M.R., Lee, C.J., Kim, I.S. (2003). Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, 51(26), 7528-7532.
- Simeonidou, E. J., Botsoglou, N. A., Psomas, I. E., Fletouris, D. J., (1996). LC analysis of multiple sulfonamide residues in chicken muscle using pre-column derivatization and fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 19(14), 2349-2364.
- Skrabalak, D.S, Covey, T.R, Henion, J.D. (1984). Qualitative detection of corticosteroids in equine biological fluids and the comparison of relative dexamethasone metabolite/dexamethasone concentration in equine urine by micro-liquid chromatography—mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 315, 359-372.
- Smallidge, R.L., Albert, K. (2000). Determination of sulfamethazine in swine and cattle feed by reversed-phase liquid chromatography with post-column derivatization: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 83(2), 260-268.
- Smit, L.A., Hoogenboom, L.A., Berghmans, M.C., Haagsma, N. (1994). Stability of sulphadimidine during raw fermented sausage preparation. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 198(6), 480-485.
- Stokstad, E.L.R., Jukes, T.H. (1950)^a. Further observations of the animal protein factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 72, 523-528.
- Stokstad, E.L.R., Jukes, T.H. (1950)^b. Growth promoting effect of aureomycin on turkey poults. *Poult. Sci.*, 29, 611-612.
- Stolke, A.A.M., Schwillens, P.L.W.J., van Ginkel, L.A., Brinkman, U.A. (2000). Comparison of different liquid chromatography methods for the determination of corticosteroids in biological matrices. *J. Chromatogr. A.*, 893(1), 55-67.
- Stolker, A.A., Brinkman, U.A. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals. *J. Chromatogr. A.*, 1067(1-2), 15-53.
- Strelevitz, T.J., Linhares, M.C. (1996). Simultaneous determination of danofloxacin and N-desmethyl danofloxacin in cattle and chicken edible tissues by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 675(2), 243-50.
- Struble, C.B., Paulson, G.D. (1988). The metabolism and deamination of [14]sulphamethazine in a germ-free pig: the influence of nitrate and nitrite. *Food Chem. Toxicol.*, 26(9), 797-801.

- Swann. (1969). Joint U. Committee of House of Parliament. Report on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine (“Swann report”). London: Her Majesty’s Stationery Office; 1969.
- Takeda, N., Akiyama, Y. (1991). Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. *J. Chromatogr.*, 558(1), 175-180.
- Tarbin, J.A., Tyler, D.J., Shearer, G. (1992). Analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography following cation exchange clean-up. *Food Addit. Contam.*, 9(4), 345-350.
- Tarbin, J.A., Clarke, P., Shearer, G. (1999). Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography–mass-selective detection and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 729, 127-138.
- Tinkelman, D.G., Bock, S.A. (1984). Anaphylaxis presumed to be caused by beef containing streptomycin. *Ann. Allerg.*, 53(3), 243-244.
- Toldrá, F., Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods, *Trends Food Sci. Tech.*, 17, 482–489.
- Tollefson, L., Karp, B.E. (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et maladies infectieuses*, 34, 514-521.
- Toussaint, B., Bordin, G., Janosi, A., Rodriguez, A.R. (2002). Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney. *J. Chromatogr. A.*, 976(1-2), 195-206.
- Tsai, C.E., Kondo, F. (1995). Liquid chromatographic determination of fluorescent derivatives of six sulfonamides in bovine serum and milk. *J. AOAC Int.*, 78(3), 674-678.
- Tscheuschner, I. (1972). Penicillin anaphylaxis following pork consumption. *Z. Haut. Geschlechtskr.*, 47(14), 591-592.
- Turnipseed, S.B., Walker, C.C., Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Hurlbut, J.A. (1998). Confirmation of fluoroquinolones in catfish muscle by electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 81(3), 554-562.
- Ueno, R., Aoki, T. (1996). High-performance liquid chromatographic method for the rapid and simultaneous determination of sulfamonomethoxine, miloxacin and oxolinic acid in serum and muscle of cultured fish. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 682(1), 179-181.
- Ueno, R., Sangrungruang, K., Miyakawa, M. (1999). A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Res. Int.*, 32, 629-633.
- Unruh, J., Sewartz, D.P., Barford, R.A. (1993). Quantitation of sulphamethazine in pork tissue by thin-layer chromatography. *J. AOAC Int.*, 76(2), 335-342.
- US FDA (2005) Federal register: August 1, 2005. US Swim Rules Regulation 70(146):44048–44049. US Food and Drug Administration, Rockville, MD Available online at: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCK ETS/98fr/05-15223.pdf>, Accessed November 2006.

USP (2000). Drug Information for the Healthcare Professional. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado, 2000.

USP (2004). Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. USP veterinary Pharmaceutical information monographs-anti-inflammatories.

CORTICOSTEROIDS Glucocorticoid-EFFECTS Veterinary-Systemic, 2004.

Available on line: <http://www.medvet.umontreal.ca/biblio/antiin.pdf>. Accessed March 2005.

Van Eeckhout, N., Perez, J. C., Van Peteghem, C. (2000). Determination of eight sulfonamides in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and sample clean-up. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 14(24), 2331-2338.

Van Den Hauwe, O., Perez, J.C., Claereboudt, J., Van Peteghem, C. (2001). Simultaneous determination of betamethasone and dexamethasone residues in bovine liver by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 15(11), 857-861.

Van Den Hauwe, O., Campbell, K., Crooks, S.R., Schilt, R., Van Peteghem, C.H. (2005). Confirmation of synthetic glucocorticoids with liquid chromatography/mass spectrometry: organization and results of an international interlaboratory comparison test. *J. AOAC Int.*, 88(1), 87-94.

Van Vyncht, G., Gaspar, P., DePauw, E., Maghuin-Rogister, G. (1994). Multi-residue screening and confirmatory analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 683(1), 67-74.

Van Vyncht G, Janosi A, Bordin G, Toussaint B, Maghuin-Rogister G, De Pauw E, Rodriguez AR. (2002). Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 952(1-2), 121-129.

Ventura, R., Gonzalez, G., Smeyers, M.T., de la Torre, R., Segura, J. (1998). Screening procedure for beta-adrenergic drugs in sports drug testing by immunological methods. *J. Anal. Toxicol.*, 22(2), 127-134.

Verheijen, R., Stouten, P., Cazemier, G., Haasnoot, W. (1998). Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues. *The Analyst*, 123 (12), 2437-2441.

Verdon, E., Couedor, P., Roudaut, B., Sanders, P. (2005). Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: single laboratory validation study. *J. AOAC Int.*, 88(4), 1179-1192.

Wang, L., Wu, X., Xie, Z. (2005). Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection. *J. Sep. Sci.*, 28(11), 1143-1148.

Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: a review. *Food Addit. Contam.*, 23(4), 362-384.

WHO (1998). Use of quinolones in foos animals and potential impact on human health. Report of a WHO meeting, WHO/EMC/ZDI/98.10. Geneva, Switzerland, 2-5 Jun, 1998. Available online at: <http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whoemczdi9810c.html>. accessed November 2006

WHO Joint FAO/OIE/WHO. (2003). Expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment, Geneva, 1-5 December, 2003. Available online at: <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/> accessed December 2005

Yorke, J.C., Froc, P. (2000). Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.*, 882(1-2), 63-77.

Zheng, N., Li, Y.Z., Wen, M.J. (2004). Sulfamethoxazole-imprinted polymer for selective determination of sulfamethoxazole in tablets. *J. Chromatogr. A.*, 1033(1), 179-182.

1.11.1 Legislación: Reglamentos, Directivas y Decisiones

Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *DO L 224 de 18.8.1990, p. 1/8*

Reglamento (CE) n° 508/1999 de la Comisión de 4 de marzo de 1999 por el que se modifican los anexos I a IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *DO L 60 de 9.3.1999, p. 16/52.*

Reglamento (CE) n° 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (Texto pertinente a efectos del EEE). *DO L 172 de 2.7.2002, p. 13/20.*

Reglamento (CE) n° 1646/2004 de la Comisión, de 20 de septiembre de 2004, que modifica el anexo I del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (Texto pertinente a efectos del EEE). *DO L 296 de 21.9.2004, p. 5/9.*

Directiva 96/22/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE. *DO L 125 de 23.5.1996, p. 3/9*

Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. *DO L 125 de 23.5.1996, p. 10/32.*

Directiva 2003/74/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, que modifica la Directiva 96/22/CE del Consejo por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado. *DO L 262 de 14.10.2003, p. 17/21.*

Decisión de la Comisión 97/747/CE, de 27 de octubre de 1997 por la que se fijan los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE del Consejo, con vistas al control de determinadas sustancias y sus residuos en determinados productos animales. *DO L 303 de 6.11.1997, p. 12/15*

Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *DO L 221 de 17.8.2002, p. 8/36*

Decisión de la Comisión 2003/181/CE, de 13 de marzo de 2003, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen animal. *DO L 71 de 15.3.2003, p. 17/18*

Decisión de la Comisión 2004/25/CE, de 22 de diciembre de 2003, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen. *DO L 6 de 10.1.2004, p*

2.Resultados y Discusión

Varias sustancias medicamentosas, a parte de los clásicos β -agonistas y agentes anabolizantes se suministran a los animales de producción fraudulentamente debido al efecto promotor del crecimiento que ejercen a bajas dosis. Entre estas sustancias se encuentran algunos antimicrobianos como las sulfonamidas (SA's) y las quinolonas (QA's) y algunos corticosteroides (CT) como la dexametasona (DEX).

La información disponible acerca del uso de estos compuestos en producción animal es más bien escasa, pero estas sustancias son detectadas frecuentemente durante los análisis rutinarios realizados en los planes nacionales de control.

Los niveles residuales de los medicamentos veterinarios pueden disminuir en los distintos tejidos animales como consecuencia de los procesos de metabolización y de eliminación. El hecho de administrar estas sustancias a bajas dosis (pocos mg/Kg) dificulta aún más la detección y el control de estas prácticas a través del análisis de residuos en las muestras convencionales (hígado, riñón, músculo). Además, la mayoría de los métodos utilizados para confirmar la presencia de residuos en las distintas matrices biológicas son lentos y laboriosos, incluyendo a veces varias etapas de purificación.

Como consecuencia, se requieren métodos específicos y rápidos para el control del suministro de estas sustancias que no presenten estos inconvenientes.

El pelo ha demostrado ser una matriz útil para detectar el empleo de algunos compuestos frente a otras matrices, debido a una amplia ventana de detección y a una elevada acumulación de residuos (Anexo I, apartado 8 y Tabla 1).

Por lo tanto, se ha considerado interesante desarrollar métodos de análisis rápidos para la detección de residuos de SMZ, ENR y DEX en pelo animal y estudiar la acumulación de estos compuestos, que no se habían detectado hasta el momento en el pelo de vacuno ni en el de porcino, para poder evaluar el pelo como muestra complementaria para el control del suministro de estos medicamentos en producción animal.

Para alcanzar los objetivos propuestos se obtuvieron, en una primera etapa, muestras de pelo, hígado y músculo de cerdos y terneros no tratados con ningún medicamento (Control) y de animales tratados con SMZ, ENR y DEX a dosis terapéuticas.

En el caso de los terneros, se realizaron dos tipos de tratamiento para cada compuesto, un grupo de animales fue tratado justo antes del sacrificio (grupo NoWP) y el otro grupo recibió el mismo tratamiento pero cuatro semanas antes del sacrificio (grupo WP), cumpliendo con un periodo de retirada de 4 semanas (**Figura 4**).

Los cerdos, por el contrario, recibieron un tratamiento con SMZ o ENR a dosis reducidas durante las cuatro semanas previas al sacrificio (**Figura 4**), para simular un tratamiento no terapéutico sin periodo de retirada.

Las dosis y las vías de administración de cada compuesto están detalladas en el apartado de materiales y métodos de los distintos trabajos publicados.

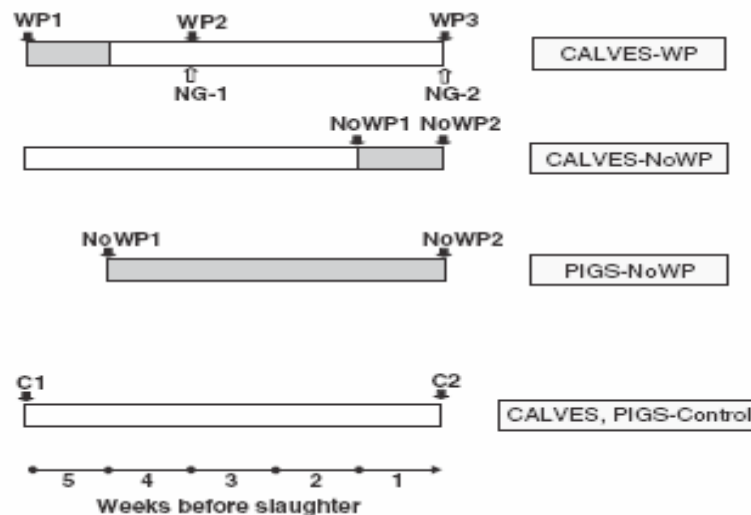


Figura 4: Esquema de los tratamientos realizados a los terneros y cerdos. Las zonas grises indican el periodo de tratamiento y las flechas los muestreos de pelo realizados en cada grupo de animales. WP (con periodo de retirada), NoWP (sin periodo de retirada), NG (nuevo crecimiento).

Posteriormente, se desarrollaron y/o optimizaron protocolos de análisis para la detección de los residuos de estos compuestos (SMZ, ENR, DEX) en pelo, músculo e hígado, para poder estudiar y comparar la acumulación, distribución y eliminación de estos compuestos en los distintos tejidos.

2.1 Resultados y Discusión

2.1.1 Puesta a punto de metodologías analíticas para la detección de residuos de ENR, SMZ y DEX en distintos tejidos (pelo, hígado y músculo) de vacuno y porcino.

2.1.1.1 Métodos analíticos para la detección de SMZ, ENR y DEX en muestras de pelo de vacuno y porcino

2.1.1.1.1 Pre-tratamiento de la muestra y extracción

Los métodos para el análisis de residuos de distintos medicamentos veterinarios en el pelo animal, a parte de la etapa inicial de pre-tratamiento de la muestra y de extracción, no difieren mucho de los métodos analíticos utilizados para la detección de los mismos residuos en otros tejidos (Anexo I, apartado 5). De manera general, es necesario extraer la mayor cantidad de residuo incorporado en la matriz, evitando utilizar condiciones de extracción que pudieran degradar los analitos de interés (Nakahara, 1999).

Los muestreos se realizaron en la zona del cuello del animal, considerada una de las zonas más limpias y menos susceptible de contener restos de heces u orina (Rambaud y *col.*, 2005).

Todas las muestras de pelo utilizadas en los distintos ensayos, previamente al análisis, fueron lavadas enjuagándolas tres veces con agua para minimizar posibles contaminaciones cruzadas del pelo con heces u orina provenientes de los otros animales tratados. Se descartó el lavado con detergentes o disolventes orgánicos para evitar la extracción de compuestos incorporados en la matriz. En algunos estudios se ha observado que los disolventes orgánicos como el metanol pueden extraer los compuestos una vez incorporados en el pelo aunque sólo sea parcialmente (Panoyan y *col.*, 1995; Gaillard y Pepin, 1999; Hernandez-Carrasquilla, 2001; Anielski y *col.*, 2005; Rambaud y *col.*, 2005).

Durante la optimización del proceso de extracción de los residuos de SMZ y de ENR en el pelo, se ensayaron diferentes extracciones (metanólica, alcalina, ácida, orgánico-acuosa) y tiempos de extracción. Al no existir muestras de pelo certificadas contaminadas con estos compuestos, estas pruebas se realizaron con muestras de pelo obtenidas mezclando pelos de varios animales tratados. En estas pruebas se observó que

la duración de la extracción así como el tipo de extrayente utilizado influían significativamente en esta etapa (Anexo II, Figura 1 y Anexo V, Figura 2).

Para ambos compuestos (ENR, SMZ), se observó que el metanol únicamente conseguía extraer los residuos de forma parcial, comportamiento descrito previamente para algunos antibióticos (Dunnett y Lees, 2003; Dunnett y *col.*, 2004) y para otras sustancias como β -agonistas (Hernández-Carrasquilla, 2002), agentes anabolizantes (Rambaud y *col.*, 2005) y corticosteroides (Antignac y *col.*, 2001).

En la **Figura 5** se muestran los resultados obtenidos con muestras de pelo de vacuno tratado con SMZ que se extrajeron con metanol y con NH_4OH 0.2M. Como se puede observar, las cantidades de SMZ detectadas mediante extracción alcalina fueron superiores a aquellas obtenidas mediante extracción metanólica.

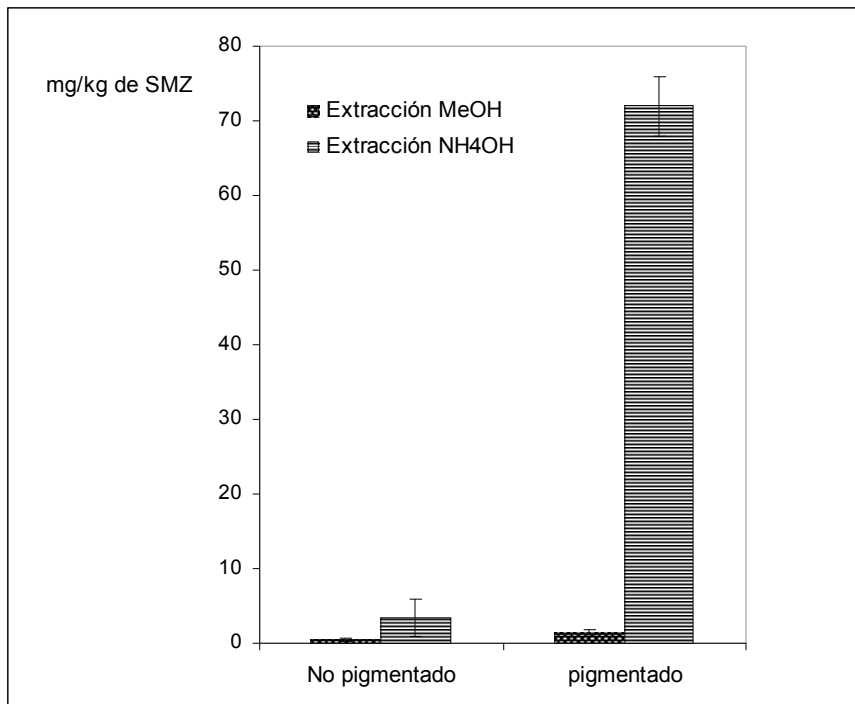


Figura 5: Niveles de SMZ mg/Kg detectados en muestras de pelo vacuno obtenidas de animales tratados.

Por otro lado, los extractos de pelo obtenidos mediante digestión alcalina (NaOH 1M, NaOH 0.1M, NH_4OH 0.2M) resultaron más coloreados y complejos que los obtenidos mediante extracción metanólica o ácida, con las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Estos resultados se explican porque la digestión alcalina junto a la digestión enzimática son las únicas que permiten la degradación total de la matriz

proteica del pelo favoreciendo la eficiencia del proceso de extracción para algunos compuestos estables en estas condiciones (Offidany y *col.*, 1993; Antignac y *col.*, 2001; Hernández-Carrasquilla, 2001).

En el caso de la SMZ, las mejores condiciones de extracción se obtuvieron mediante extracción alcalina con NH_4OH 0.2M (vacuno) y NaOH 0.1M (porcino). En el caso del pelo de porcino, además, para SMZ, la previa pulverización de las muestras mejoraba la extracción de SMZ a diferencia de lo observado en pelo de vacuno, permitiendo reducir la duración del proceso de extracción. Las diferencias observadas entre el pelo vacuno y el pelo porcino podrían ser debidas a una combinación de factores como la pigmentación y los relacionados con la especie como la estructura y la composición del pelo (Anexo I, apartado 4).

Para el ENR, en cambio, las mejores condiciones de extracción se consiguieron con metanol acidificado con trifluoroacético.

Las diferencias observadas entre ENR y SMZ en cuanto a las condiciones de extracción fueron probablemente debidas a la diferente estabilidad que presentan estos compuestos frente a condiciones alcalinas o ácidas así como a sus características químicas.

2.1.1.1.2 Purificación y detección

Un inconveniente del análisis del pelo es la limitada cantidad de muestra inicial empleada (50-500 mg) (Anexo I, apartado 5) que puede dificultar la detección de los residuos de medicamentos veterinarios en esta matriz.

La hidrólisis alcalina del pelo vacuno (NH_4OH 0,2M) y porcino (NaOH 0.1M) permitió obtener buenas recuperaciones aparentes de SMZ pero con extractos complejos que necesitaron de una etapa previa de purificación para la cuantificación correcta de los residuos de SMZ mediante LC-DAD ($\lambda=270$ nm). Con la combinación de dos cartuchos de SPE, uno de fase polimérica seguido de uno de intercambio catiónico se consiguió purificar los extractos adecuadamente, evitando la presencia de picos interferentes para la SMZ (Anexo II, Figura 2).

El ENR, al igual que otras quinolonas, presenta fluorescencia nativa, permitiendo su detección mediante LC-FLD ($\lambda_{\text{EXC}}=280$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=444$ nm) con una elevada sensibilidad y especificidad (Hernández-Arteseros y *col.*, 2002). Utilizando la combinación de la extracción metanólica ácida y detección por LC-FLD, se pudieron concentrar los extractos sin necesidad de purificarlos, simplificando el análisis y reduciendo el tiempo de análisis (capítulo 2.5, Figura 1 y Anexo V, Figuras 3 y 4).

Utilizando como método de detección la LC-DAD ($\lambda=240$ nm), no fue posible detectar residuos de DEX en el pelo de animales tratados debido al insuficiente LOD 155 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Como consecuencia, se optó por utilizar como método de extracción el descrito por Antignac y *col.* (2001), combinado con una etapa de purificación utilizando únicamente un cartucho de fase reversa (SPE-RP). Los extractos resultantes fueron analizados mediante EIA y LC-MS/MS (capítulo 2.7, Figuras 2 y 4). Los análisis mediante LC-MS/MS fueron realizado por la Unidad de Residuos Zoonosanitarios (A.E.S.A), según el método multimatriz y multianalito descrito en Muñoz y *col.* (2005).

Los métodos que se han desarrollado y publicado (capítulos 2.2-2.7 y Anexos I-V) representan una aportación original debido a la optimización de métodos analíticos para una matriz específica como el pelo o bien porque mejoran la rapidez de análisis para ENR y DEX y la sensibilidad para SMZ, ENR y DEX de metodologías previamente publicadas por otros autores.

Con el método desarrollado para el análisis de residuos de SMZ en el pelo (Anexo II) se ha conseguido detectar residuos de este compuesto a niveles de 46 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, inferiores a los obtenidos por Dunnett y Lees (2004) (70-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) que utilizaron un cartucho SPE-MM y detección mediante LC-DAD (Dunnett y Lees, 2004) para el análisis de muestras de pelo obtenidas de caballos tratados con sulfonamidas.

En el caso de ENR, el LOD del método propuesto (4-5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (Anexo V) mejora los resultados descritos por Dunnett y *col.* (2004), (60-120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) y simplifica el protocolo al no incluir la etapa de purificación previa a la detección mediante LC-FLD (Dunnett y *col.*, 2004).

De manera similar, Antignac y *col.* (2001) obtuvieron LOD variables entre 2,3 y 93 $\mu\text{g/Kg}$ para el análisis de residuos de corticosteroides en pelo de vacuno, LOD superiores a los obtenidos mediante LC-MS/MS (0,2 $\mu\text{g/Kg}$). En este caso, el protocolo propuesto (capítulo 2.7), a parte de tener en común la etapa inicial de extracción y detección mediante LC-MS/MS (Antignac y *col.*, 2001), incluye una etapa de purificación simplificada con un único cartucho SPE.

2.1.1.2 Métodos de Análisis para la detección de residuos de SMZ y ENR en las muestras de tejido

Para el análisis de residuos de SMZ en músculo e hígado de vacuno y porcino, se desarrolló un método rápido para el análisis de tres sulfonamidas (SDZ, SMR y SMZ) que no incluyese ninguna etapa de purificación y con sensibilidad suficiente para detectar los residuos de estos tres compuestos a niveles del LMR (100 $\mu\text{g/Kg}$) (Anexo III). Este método de criba, a diferencia de otros métodos de análisis descritos en la bibliografía consultada permite el análisis simultáneo de tres sulfonamidas en músculo e hígado.

En el caso de las quinolonas, para la detección de ENR y CPR, se utilizó un método de análisis adaptado de Hernández-Arteseros y *col.*, 2004.

2.1.2 Detección de residuos de SMZ, ENR y DEX en el pelo y otros tejidos obtenidos de animales tratados

Los distintos métodos de análisis propuestos se utilizaron para el análisis de las muestras de tejido obtenidas de los animales tratados con estos medicamentos veterinarios.

2.1.2.1 Acumulación de residuos de SMZ, ENR y DEX en el pelo animal

Por primera vez, se ha detectado y comprobado la acumulación de DEX en pelo vacuno y de SMZ y ENR en pelo vacuno y porcino después del suministro de estos compuestos a dosis terapéuticas.

En todas las muestras obtenidas de los animales una vez tratados, los niveles de residuos fueron superiores a los LOD de los métodos analíticos propuestos, mientras que en las muestras obtenidas de los animales control, no se detectaron residuos.

Los niveles de residuos tan elevados (del orden de varios mg/Kg) (Anexo IV, Tabla 1; Anexo V, Tabla 2) encontrados para SMZ y ENR concuerdan con aquellos previamente detectados por Dunnett y *col.* (2004) y Dunnett y Lees (2004) en el pelo de caballos de carrera después de un suministro de los mismos compuestos a dosis terapéuticas. Estos autores detectaron niveles de sulfonamidas entre 0,2-25 mg/Kg (Dunnett y Lees, 2004) y de quinolonas entre 19 y 452 mg/Kg (Dunnett y *col.*, 2004).

Se intentó detectar la DEX en pelo vacuno sin éxito (O' Van den Hauwe y *col.*, 2005), aunque otros CT sintéticos se habían detectado en pelo humano y vacuno a niveles de pocos $\mu\text{g/Kg}$ (O' Van den Hauwe y *col.*, 2005; Cirimele y *col.*, 2000; Bévalot y *col.*, 2000). El hecho de obtener resultados positivos en las muestras de los animales control mediante EIA, se explican por la presencia de compuestos interferentes en los extractos que no se habrían eliminado durante el proceso de purificación. Estos interferentes podrían ser compuestos endógenos de naturaleza esteroidal que presentan reactividad cruzada con los anticuerpos incluidos en el kit utilizado. Varios de estos posibles interferentes han sido detectados en el pelo de terneros y de monos de forma natural, sin una administración exógena previa (Marcos y *col.*, 2004; Davenport y *col.*, 2006). Al no poder correlacionar los niveles de residuos de DEX mediante EIA y LC-MS/MS, se concluyó que el mejor método de detección para este protocolo de análisis era la LC-MS/MS y que para evaluar la posibilidad de utilizar el enzaimmunoensayo como método criba deberían realizarse más estudios para establecer valores "cut-off" a partir de los cuales una muestra podría considerarse positiva (Offidany *col.*, 2003).

2.1.2.1.1 Cinética de deposición de los residuos de DEX, SMZ Y ENR en el pelo

Además de confirmar la acumulación de DEX, SMZ y ENR en el pelo porcino y vacuno, el tipo de muestreo que se realizó permitió obtener información útil para avanzar hipótesis sobre el tipo y las vías de acumulación de estos compuestos en la matriz objeto de estudio.

De los terneros tratados se obtuvieron muestras de pelo pigmentado y no pigmentado en distintos momentos después del inicio del tratamiento, a los 7 días en los animales sin retirada (NoWP) y a los 14 días y 36 días en los animales con retirada (WP) (**Figura 4**).

Las cantidades de ENR y SMZ detectadas en el pelo de los animales tratados resultaron influenciadas por el tiempo transcurrido entre el tratamiento y el muestreo y por la pigmentación (Anexo IV, Tabla 1; Anexo V, Tabla 2).

En las muestras de pelo de los terneros tratados con SMZ, ENR y DEX, los residuos de los tres compuestos fueron detectados a partir del séptimo día del inicio del tratamiento y hasta cuatro semanas después de su retirada. Además, se observó un aumento de residuos de SMZ y ENR con el transcurso del tiempo post-suministro en el pelo pigmentado, mientras que en el pelo no pigmentado este comportamiento no fue tan evidente.

Estas observaciones parecen indicar que el mecanismo principal de incorporación de estas sustancias en el pelo es la vía endógena, es decir, a través del sistema sanguíneo, hecho que conlleva a un retraso de la detección de los residuos en el pelo (Durant y *col.*, 2002^{a,b}) si las muestras de pelo no incluyen el folículo, es decir, si se trata de muestras cortadas. Por otro lado, las pequeñas cantidades de residuos detectadas a los 7 días después del inicio del tratamiento, podrían explicarse a través de otros mecanismos de incorporación minoritarios como la vía exógena o mixta (Henderson, 1993).

En los mismos muestreos se obtuvieron muestras adicionales de nuevo crecimiento (NG), correspondientes a aquellas muestras obtenidas de la misma zona dónde se había

realizado un muestreo anterior. En las muestras NG1 pigmentadas, los niveles residuales de ENR y SMZ fueron superiores a los niveles detectados en las muestras obtenidas durante el mismo muestreo (**Figura 4**, WP2), apoyando, una vez más, la vía interna como posible mecanismo principal de incorporación de ambas drogas.

La variabilidad de los niveles de residuos detectados en el pelo de los animales que habían recibido un mismo tratamiento resultó ser elevada, posiblemente debido a la multitud de factores que pueden afectar a la deposición de residuos en el pelo (metabolismo del animal, la tasa de crecimiento del pelo, la composición, la ingesta de alimentos y el peso del animal)(Henderson, 1993; Anexo I, apartados 3 y 5).

La amplia ventana de detección de los residuos en esta matriz (Anexo I, apartado 8), permite una detección retrospectiva de un tratamiento realizado varios días e incluso un mes antes de la obtención de la muestra.

2.1.2.1.2 Efecto del grado de pigmentación

En las muestras de pelo vacuno se pudo comprobar un efecto significativo del grado de pigmentación en la acumulación de residuos de ENR y SMZ (Anexo IV, Tabla 1; Anexo V, Tabla 2).

En todas las muestras de pelo pigmentado, los niveles detectados de ENR y SMZ fueron superiores a los detectados en las muestras no pigmentadas obtenidas en un mismo muestreo y animal, a excepción de aquellas muestras obtenidas justo después del tratamiento (**Figura 4**, NoWP2). Estos resultados coinciden con los de Wilkins y *col.* (2003) en pelo humano y con los de Dunnett y Lees (2004) y Dunnett y *col.*, (2004) en equino relacionándose con la presencia de melanina en las muestras pigmentadas. Dunnett y *col.*, 2004 demostraron *in-vitro* la elevada afinidad de las quinolonas por la melanina, un compuesto de naturaleza polimérica responsable de la pigmentación del pelo.

La melanina, al igual que en el caso de otros compuestos (Henderson, 1993; Anexo I, apartado 4), parece ejercer un efecto positivo en la acumulación de residuos de SMZ y ENR en pelo, facilitando la detección de estos compuestos en este tipo de muestras.

En el caso de la DEX, por el contrario, no se pudo observar un efecto significativo del grado de pigmentación (capítulo 2.7, Figura 4) en la acumulación de residuos. En el caso de otras sustancias esteroidales, los resultados bibliográficos son contradictorios, algunos autores han observado una mayor acumulación de residuos en pelo pigmentado (Rambaud y *col.*, 2005) mientras que otros han observado niveles de residuos similares en ambos tipos de pelo (Gleixner y Meyer, 1996). La elevada variabilidad de los niveles de residuos detectados entre animales así como la baja cantidad detectada, podrían ser las causas de estos resultados.

En el caso de los cerdos, no se pudo estudiar el efecto de la pigmentación, porque los animales utilizados en este estudio, de raza Landrace, no tenían distintas zonas de pigmentación.

2.1.2.1.3 Acumulación de metabolitos de SMZ, ENR y DEX en el pelo animal

Además de los residuos de los principios activos suministrados a los animales (SMZ y ENR), en las muestras de pelo de los animales tratados se detectaron otros compuestos ausentes en las muestras control (Anexo II, Figura 4; Anexo V, Figuras 3-4).

En los extractos de pelo obtenidos de cerdos tratados con SMZ, también se detectó un pico con t_R superior al de SMZ, cuya identidad no se pudo confirmar mediante LC-DAD ($\lambda=270$ nm), al no disponer de los patrones comerciales de los principales metabolitos de SMZ (Anexo II, Figura 4).

En el caso de los animales tratados con ENR, además de la acumulación en pelo de ENR se detectó su metabolito principal CPR, aunque también se apreciaron otros picos con respuesta fluorimétrica similar en el pelo de cerdo y de vacuno pero en este caso con t_R inferiores al del compuesto administrado a los animales (Anexo V, Figuras 3-4).

Todos estos resultados deberían estudiarse con más profundidad, utilizando otras técnicas de detección como la LC-MS/MS para conocer su identidad y evaluar posibles metabolitos o ratios de metabolitos *versus* droga madre como indicativos de una vía de administración (enteral/parenteral) o de una administración exógena.

Estos conocimientos podrían contribuir a descartar falsos positivos como consecuencia de contaminaciones del pelo con heces u orina de animales tratados y apoyarían el empleo del análisis del pelo como herramienta legal para el control de residuos.

2.1.2.2 Acumulación de residuos de SMZ y ENR en músculo e hígado de vacuno y porcino

Los niveles de residuos de SMZ y ENR detectados en tejido muscular e hígado (Anexo IV, Figura 3; Anexo V, Tabla 2) se ajustan a los valores encontrados en la bibliografía.

Durante los años ochenta, aparecieron varios trabajos que estudiaban la distribución, metabolismo y eliminación de SMZ en distintos tejidos (sangre, hígado, riñones, músculo) después de suministrar este compuesto a cerdos por vía oral, mayoritariamente a través del pienso. En estos estudios, la SMZ era adicionada al pienso a niveles de 2-500 mg/kg pienso durante períodos de tiempo variables (7-98 días) (Samuelson y *col.*, 1979; Saschenbrecker y Fish, 1980; Whipple y *col.*, 1980; Biehl y *col.*, 1982; Ashworth y *col.*, 1986; Korsrud y *col.*, 1996). En algunos de estos trabajos, los niveles residuales de SMZ en los distintos tejidos descendieron por debajo de 100 µg/Kg (LMR) después de 4-14 días de retirada del tratamiento, en función del tejido y la dosis suministrada (Samuelson y *col.*, 1979; Saschenbrecker y Fish, 1980; Whipple y *col.*, 1980; Mitchell y Paulson, 1986; Korsrud y *col.*, 1996).

En el caso de las quinolonas, existen varios trabajos referentes a la eliminación y disminución de residuos de ENR en distintos tejidos animales. La mayoría de estos estudios están realizados en aves de corral (Schneider y Donoghue, 2002, 2004; Samanidou y *col.*, 2005), y en todos ellos se observa que la disminución de residuos de quinolonas durante los primeros días post-suministro es muy pronunciada, manteniéndose durante varios días a niveles muy bajos, incluso por debajo del LMR (CVMP, 1998; García y *col.*, 2005). García y *col.* 2005 después de suministrar a cerdos por vía oral 5 mg/Kg durante 5 días obtuvieron valores de ENR y CPR superiores a 100 µg/Kg un día después del suministro mientras que a los 5 días ya no eran detectables en ningún tejido.

Por lo que se refiere a los metabolitos, según García y *col.* (2005), los niveles de CPR en tejido correspondieron aproximadamente al 10% de los de ENR en muestras de porcino, mientras que en otro estudio realizado en muestras de vacuno, las cantidades residuales de CPR fueron superiores (CVMP,1998).

Según nuestro estudio, la disminución de residuos de SMZ y de ENR+CPR a niveles no detectables (inferiores a los LOD de los métodos y por lo tanto, inferiores a los LMR) cuatro semanas después del tratamiento veterinario en vacuno, indica que los períodos de retirada establecidos por el fabricante de los medicamentos veterinarios a las dosis recomendadas, necesarios para evitar la presencia de residuos por encima de los LMRs, se habían cumplido, siendo de 28 días en carne para SMZ y de 12 días en carne para ENR.

2.1.2.3 Comparación de los niveles de residuos de SMZ, ENR y DEX en pelo, músculo e hígado de vacuno y porcino

Los niveles de SMZ y ENR encontrados en pelo fueron muy superiores a los encontrados en músculo e hígado (Anexo IV, Figura 3; Anexo V, Tabla 2). Además, en los terneros tratados con retirada (WP), no fueron detectables (<LOD) residuos de SMZ ni de ENR en hígado y músculo, mientras que en el pelo se detectaron y a elevadas concentraciones.

Este hecho confirma que el pelo, en el caso del vacuno, presenta una mayor ventana de detección que otros de los tejidos (músculo, hígado) utilizados normalmente para el control de residuos y una mayor acumulación, facilitando la detección de un suministro previo con ENR y/o SMZ y reduciendo o minimizando el inconveniente de partir de una baja cantidad de muestra inicial.

Con estos resultados se evidencian las ventajas del pelo como matriz analítica complementaria; aunque para ser utilizada en el control rutinario de prácticas irregulares y prohibidas o con fines disusorios, se deberían estudiar en poblaciones más elevadas y con distintas razas y especies animales.

Los artículos publicados a partir de los trabajos realizados así como los principales resultados obtenidos se exponen a continuación:

2.2 Detection of sulphamethazine residues in cattle and pig hair by HPLC-DAD.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, García-Regueiro JA. (2006). *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 832(1), 121-126.

2.3 A simplified LC-DAD method with an RP-C₁₂ column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. (2006). *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(7), 1218-1224.

2.4 Novel approach to control sulfamethazine misuse in food-producing animals by hair analysis.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, Díaz I, García-Regueiro JA. (2006). *Food Addit. Contam.*, 23(10), 981-987.

2.5 A rapid HPLC-FLD method for the detection of quinolones residues in livestock hair.

Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro JA, Castellari M.. (2006). *Luminescence*, 21(6), 320-386.

2.6 Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection.

Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro JA, Castellari M. (2007). *Anal. Bioanal. Chem*, 387, 1991-1998.

2.7 Hair analysis for the retrospective detection of dexamethasone administration in calves. M. Gratacós-Cubarsí, P. Muñoz, J. Blanca, M. Bartolomé, M. Castellari, H. Hooghuis, J.A. García-Regueiro, R. Díaz. *Abstracts of the XIth International Symposium on Hormones and Veterinary Drugs* (2006).

2.2 Detection of sulphamethazine residues in cattle and pig hair by HPLC-DAD.

En este artículo se propone un método para el análisis de SMZ en muestras de pelo de vacuno y porcino mediante HPLC-DAD. Las muestras de pelo fueron extraídas en medio alcalino, utilizando NH_4OH 0,2M (vacuno) o NaOH 0,1M (porcino). Los extractos alcalinos fueron purificados mediante un sistema de doble cartucho SPE (RP/SCX). Las recuperaciones de SMZ, calculadas mediante la fortificación de muestras de pelo obtenidas de los animales control variaron entre el 70% y el 85% con un límite de cuantificación (LOQ) de 0,155 mg/Kg. Los residuos de SMZ (7,2-59,2 mg/kg) se detectaron en las muestras de pelo vacuno y porcino después de un tratamiento terapéutico con SMZ, mientras que no se observaron picos interferentes en aquellas muestras obtenidas de los animales no tratados (control).

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, García-Regueiro JA. (2006). Detection of sulphamethazine residues in cattle and pig hair by HPLC-DAD. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 832(1), 121-126. Ver anexo II.

2.3 A simplified LC-DAD method with an RP-C₁₂ column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue.

En este artículo se propone un método rápido para el “screening” de tres sulfonamidas (SA´s) sulfadiacina (SDZ), sulfameracina (SMR) y sulfametacina (SMZ) en músculo e hígado de cerdos y terneros a niveles del LMR (100 µg/Kg), no incluyendo ninguna etapa de purificación.

Las muestras de tejido se extrajeron con acetonitrilo, fueron centrifugadas, evaporadas a sequedad e inyectadas directamente en el sistema LC-DAD. La utilización de una columna cromatográfica de fase reversa RP-C₁₂ permitió una excelente separación y cuantificación de las tres sulfonamidas en ambos tejidos de vacuno y porcino.

Las condiciones de análisis propuestas permiten la detección de residuos de SDZ, SMR y SMZ en hígado y músculo de vacuno y porcino a niveles de 27-55 µg/Kg. La presencia e identidad de algunos posibles metabolitos necesita de más estudios para ser confirmada.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. (2006). A simplified LC-DAD method with an RP-C₁₂ column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(7), 1218-1224. Ver anexo III.

2.4 Novel approach to control sulfamethazine misuse in food-producing animals by hair analysis.

Se han comparado los niveles residuales de SMZ en pelo y otros tejidos (músculo e hígado) de vacuno y porcino después de la administración de SMZ a dosis terapéuticas. Los niveles de SMZ en las muestras de pelo vacuno alcanzaron los 84,7 mg/Kg, con un efecto significativo de la pigmentación de las muestras. Asimismo, los residuos de SMZ en el pelo de vacuno fueron claramente detectables 4 semanas después del suministro, mientras que en el músculo e hígado ya no lo fueron.

De manera similar, en las muestras de pelo de cerdo, se detectaron niveles de SMZ (40,5 mg/Kg) muy superiores a los detectados en músculo e hígado de los mismos animales.

Estos resultados confirman que el análisis del pelo es una herramienta útil para mejorar la eficacia de los planes de control.

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, Díaz I, García-Regueiro JA. (2006). Novel approach to control sulfamethazine misuse in food-producing animals by hair analysis. *Food Addit. Contam.*, 23(10), 981-987. Ver anexo IV.

2.5 A rapid HPLC-FLD method for the detection of quinolones residues in livestock hair.

Un método rápido y sensible basado en la HPLC-FLD se desarrolló para detectar residuos de ENR y CPR (metabolito principal de ENR) en muestras de pelo vacuno. Los residuos de ambos compuestos CPR y ENR fueron detectables en las muestras de pelo de los animales tratados con ENR después de respetar un período de retirada del tratamiento de cuatro semanas, confirmando la posibilidad de utilizar el análisis del pelo para el análisis retrospectivo de la administración de ENR.

Este trabajo se presentó como abstract en el XIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry. Detection Techniques in Biomedical, Environmental and Food Analysis (ISLS 2006).

En este trabajo se recogen los resultados preliminares obtenidos durante la optimización de un método analítico para detectar residuos de ENR y CPR en pelo vacuno.

Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro JA, Castellari M.. (2006) Extended Abstract: A rapid HPLC-FLD method for the detection of quinolones residues in livestock hair. *Luminescence*, 21(6), 320-386.

A rapid HPLC–FLD method for the detection of quinolone residues in livestock hair

Marta Gratacós-Cubarsí, José-Antonio García-Regueiro and Massimo Castellari*

Institute for Food and Agricultural Research and Technology,
Meat Technology Centre, Granja Camps i Armet, 17121
Monells, Girona, Spain. *E-mail: massimo.castellari@irta.es

ABSTRACT

A rapid and sensitive high-pressure liquid chromatography– fluorimetric detection (HPLC–FLD) method was developed to extract and detect residues of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIPR) in calf hair samples. Residues of both ENR and CIPR were detected in hair samples of treated animals complying with the withdrawal period, confirming the possibility of using hair analysis for the retrospective detection of ENR administration.

INTRODUCTION

Fluoroquinolones are an important group of synthetic anti- bacterials used to treat and prevent respiratory, urinary and enteric diseases and/or illegally administered as promoters to enhance livestock growth. The accumulation of several quinolones has been described in human (1–3) and racehorse hair (4). Hair is a tissue with a reduced metabolic activity which can be easily sampled in vivo. Drug residues, once accumulated in the hair shaft, are protected from degradation and can be detected within a large time window. Hair analysis could therefore be an interesting complementary technique to detect the illegal use of quinolones in veterinary practices.

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive method to extract and detect residues of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIPR) in calf hair samples by HPLC and fluorimetric detection.

MATERIALS AND METHODS

Four Friesian calves were reared to 8 months, receiving no medication. At 5 weeks before slaughter they were divided into two groups and kept in separate stalls during the

last growing phase. The first group (control) did not receive any veterinary drug. The second group, complying with a withdrawal period of 28 days, was given a daily intramuscular dose of 20mL Hipralona ENRO-I (Hipra, Girona-Spain) per animal for 3 days (corresponding to 7.5mg enrofloxacin/kg live weight). Pigmented and non-pigmented hair samples were taken (2.0–3.0g approx. each) from both treated and control animals before slaughter, using a hair clipper ARCO 1854 (Moser, Germany) with a cut height of 1mm. The hair samples were washed three times using ultra-pure water, dried in an oven at 37°C for 1h and then finely cut with scissors.

Aliquots of 100mg were extracted with 4mL TFA 0.2mol/L in MeOH at 70°C for 24h. Methanolic extracts were filtered, evaporated under nitrogen, reconstituted with 500µL mobile phase A, membrana filtered and injected.

HPLC analyses were carried out on a 1100 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a quaternary pump and a 1046A fluorescence detector ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$, $\lambda_{em} = 444\text{nm}$) and a Luna® RP-C8 (250mm × 4.6mm i.d.) analytical column (Phenomenex®, Torrance, CA). A binary gradient elution (flow rate 1.0mL/min) was realized, varying the composition of the mobile phase linearly from 88% A (oxalic acid 0.01mol/L solution) and 12% B (acetonitrile) to 80% A and 20% B at 18min.

RESULTS

Preliminary assays showed that the use of MeOH–TFA improved the apparent extraction efficiency of ENR and CIPR from the hair of treated calves, compared to other extracting solutions, such as MeOH or TFA alone, and NH₄OH. Under our analytical conditions the mean recovery (using blank hair samples spiked with pure standard) were in the ranges 85–91% for ENR and 66–84% for CIPR, with a LOD of 28 and 34ng/g for ENR and CIPR, respectively. Residues of both ENR and CIPR were detected (0.07–2.06µg/g ENR, 0.04–0.16µg/g CIPR) in hair samples of treated animals complying with the withdrawal period, while no detectable residues were found in control samples. These results confirm that hair analysis is a useful technique for the retrospective detection of ENR administration.

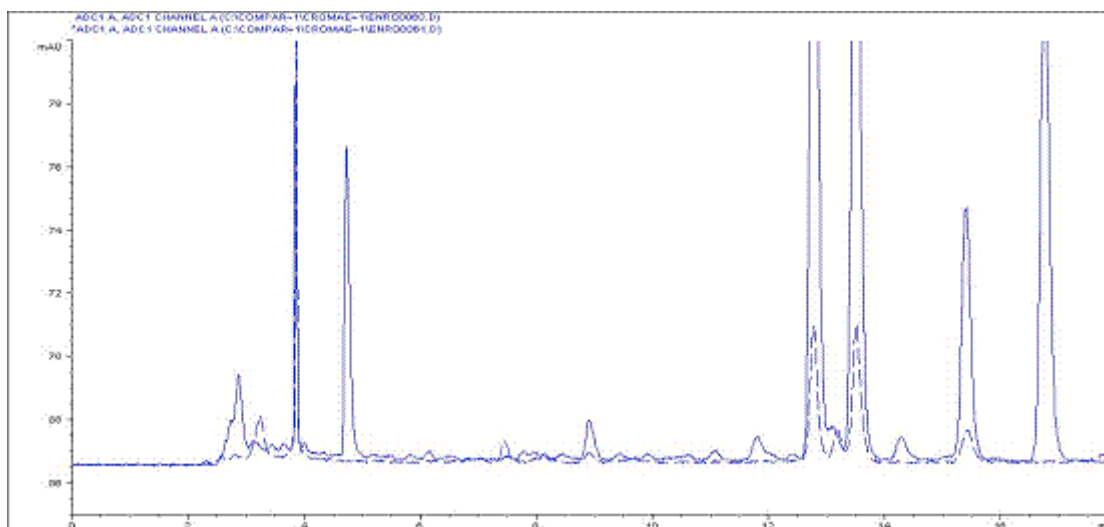


Figure 1. Chromatographic separations of pigmented calf hair extracts. Treated animal sample (—); control animal sample (---).

Acknowledgements

We would like to thank the Spanish MEC for financial support (AGL2005-07700-C06-03).

References

1. Mizuno A, Uematsu T, Nakashima M. *J. Chrom. B* 1994; 653: 187–193.
2. Kosuge K, Uematsu T, Araki SI, Matsuno H, Ohashi K, Nakashima M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(5): 1298–1302.
3. Uematsu T, Kosuge A, Araki S, Ishiye M, Asai Y, Nakashima M. *Ther. Drug Monit.* 1995; 17: 101–103.
4. Dunnett M, Lees P. *Res. Vet. Sci.* 2004; 77: 143–151.

2.6 Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection.

En esta publicación se propone un método para la extracción y cuantificación de ENR y de su metabolito principal ciprofloxacino (CPR) en pelo vacuno y porcino mediante HPLC-FLD. Ambos compuestos se extrajeron con metanol acidificado con ácido trifluoroacético durante 24 h a 70 °C. Los extractos se evaporaron a sequedad y se redisolviaron en fase móvil antes de ser inyectados al sistema HPLC-FLD. Este método simplificado de análisis permite la detección de ENR y CPR con un LOD de 4-5 µg/Kg. Aplicando este método de análisis se detectaron residuos de CPR y ENR en muestras obtenidas de los animales tratados con ENR. Las concentraciones de ENR y CPR encontradas variaron entre 0,02 y 2,52 mg/Kg en vacuno y 0,15 y 1,14 mg/Kg en porcino. La pigmentación de las muestras influyó significativamente en la acumulación de ambas quinolonas en el pelo de vacuno.

El análisis de las muestras de hígado y músculo procedentes de los mismos animales (terneros) tratados con ENR ha confirmado que el pelo presenta una ventana de detección más amplia que otros tejidos comestibles, permitiendo la detección retrospectiva de una administración de ENR.

Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro JA, Castellari M. (2007). Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1991-1998. Ver anexo V.

2.7 Hair Analysis for the Retrospective Detection of Dexamethasone Administration in Calves.

En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de emplear el análisis del pelo para la detección retrospectiva del suministro de dexametasona (DEX) en vacunos. Las muestras de pelo se obtuvieron de animales tratados por vía subcutánea con DEX respetando o no un período de retirada de cuatro semanas previas al sacrificio. Las muestras de pelo analizadas (pigmentado y no pigmentado) se obtuvieron previamente al tratamiento, durante el tratamiento y el día previo al sacrificio. Los residuos de DEX se extrajeron con metanol acidificado, los extractos se purificaron mediante SPE-RP y los residuos de DEX finalmente se analizaron mediante un método de confirmación LC-MS/MS y un enzima inmunoensayo (método semi-cuantitativo). Los residuos de DEX (0,5-26,1 µg/Kg) fueron detectados en las muestras de pelo de los animales tratados a partir de los 7 días y hasta los 36 días después del primer suministro, confirmando la idoneidad del análisis del pelo para la detección retrospectiva de este compuesto. La posibilidad de utilizar el enzima inmunoensayo como método de criba debería ser estudiada con más profundidad debido a la elevada respuesta de compuestos interferentes presentes en los extractos.

Este trabajo se presentó como póster en el XIth International Symposium on Hormones and Veterinary Drugs (Antwerpen, 2006). En este trabajo, la Unidad de Residuos Zoonosológicos de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria fue quien analizó las muestras de pelo mediante LC-MS/MS (Muñoz *y col.*, 2005), al no disponer del equipamiento necesario en aquel momento.

Abstracts of the XIth International Symposium on Hormones and Veterinary Drugs (2006). Short Communication: Hair Analysis for the Retrospective Detection of Dexamethasone Administration in Calves.

Hair Analysis for the Retrospective Detection of Dexamethasone Administration in Calves

M. Gratacós-Cubarsí^a, P. Muñoz^b, J. Blanca^b, M. Bartolomé^b, M. Castellari^{a*}, H. Hooghuis^b, J.A. García-Regueiro^a, R. Díaz^b

a) IRTA-CTC Food Chemistry Unit. Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona, Spain) - * massimo.castellari@irta.es

b) Unidad de Residuos Zoonos, Centro Nacional de Alimentación. A.E.S.A.

Abstract

The detection of dexamethasone misuse represents an analytical challenge, due to the low doses which are generally dispensed and the rapid bio-transformation of dexamethasone in tissues and biological fluids. Recent studies showed that hair accumulates Dexamethasone and could offer an enlarged window of detection for this compound with the advantage of a non-invasive sampling.

In this study we evaluate the suitability of hair analysis for the retrospective detection of dexamethasone administration in calves. Two calves were treated 100 mg dexamethasone subcutaneously complying the withdrawal period of 5 days, while two calves received the same treatment just 5 days before the slaughter. Pigmented and non-pigmented hair samples were taken before the pharmacological treatment, during the withdrawal period and the day before the slaughter. Samples were washed with water, extracted with acidified methanol, purified by SPE and analysed with a commercial ELISA corticosteroid kit (semi-quantitative) and by a confirmative LC-MS/MS method. Dexamethasone was detected in hair samples from 7 days up to 36 days after the drug administration, confirming the suitability of hair analysis in the retrospective detection. The results obtained with the two methods are compared and their suitability evaluated.

Introduction

Hair analysis has been proposed to screen the administration of β -agonists, corticosteroids and other veterinary drugs used in livestock farming [1]. Hair sampling is not invasive, can be performed *in vivo* and does not cause any pain to animals. Hair may provide wider time window of detection if compared to other conventional samples

(urine, muscle, liver) due to the lower metabolic activity of this tissue, where drugs, once incorporated, are protected from degradation factors.

Objectives

This work was carried out to study the accumulation of Dexamethasone (DEX) in calf hair after two different pharmacological treatments, as well as the possibility to use hair analysis to enlarge the time window to detect an illegal DEX administration.

Results obtained with a commercial ELISA corticosteroid kit (semi-quantitative) and by a confirmative LC-MS-MS method [2] were also compared and discussed.

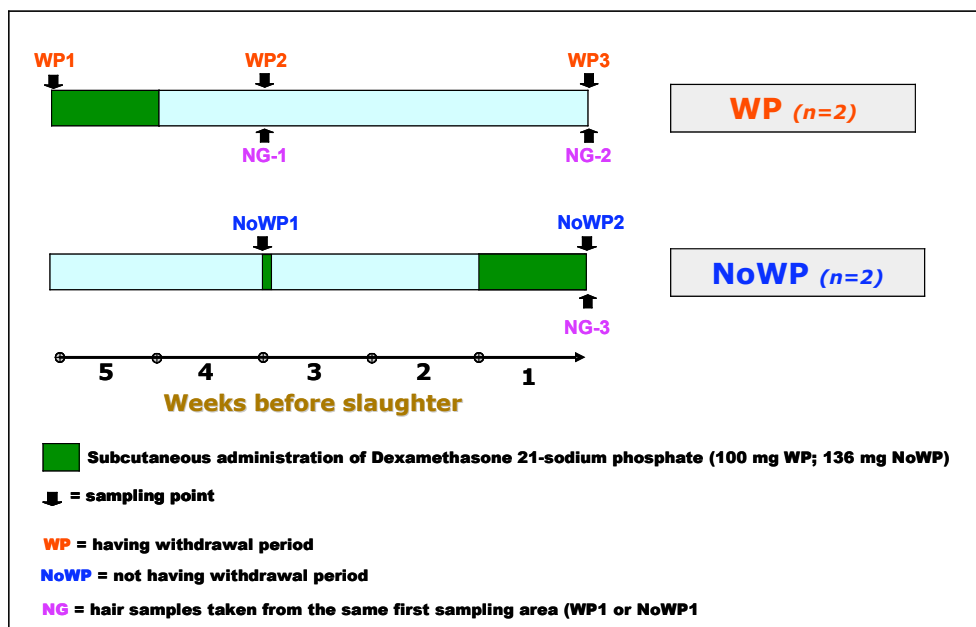


Figure 1: Calves treatment and sampling scheme

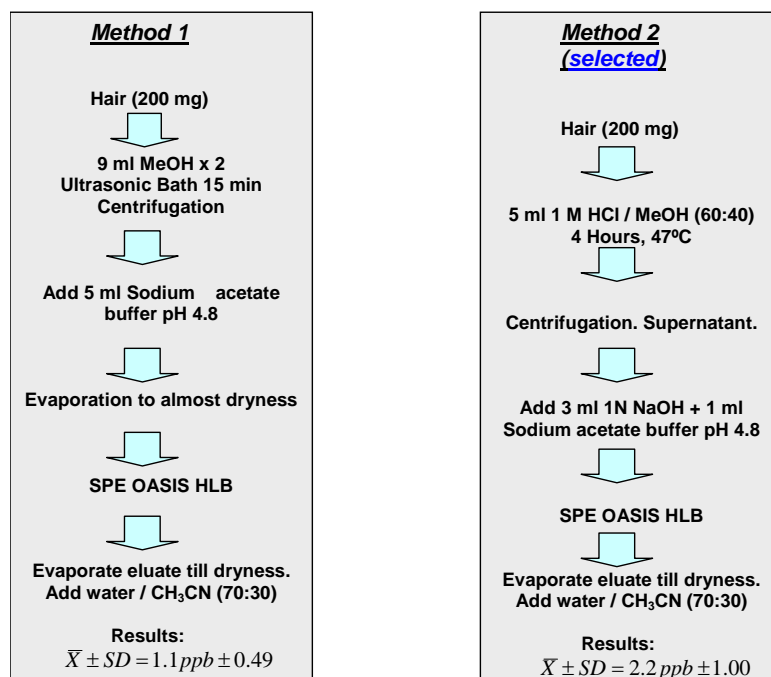


Figure 2: Extraction/Clean-up

LC Conditions

Flow: 0.4 mLmin⁻¹
 Column oven temp: 40 ° C.
 Samples temp.: 15 ° C.
 Run time: 30 min.
 Gradient:

Time	A%	B%	Curve
0	70	30	1
6	70	30	1
13	50	50	7
21	5	95	1
30	70	30	1

A: 0.1 % acetic acid in water.
 B: 0.1 % acetic acid in ACN/water 95:5.

MS Conditions

ESI - MRM

Channel	Dwell	CV	Coll	Compound
437 > 347	0.3	20	15	FPLN (I.S.)
451 > 361	0.3	20	20	DEX
361 > 307	0.3	40	20	DEX

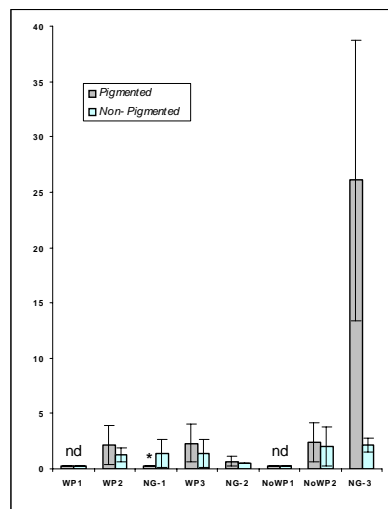
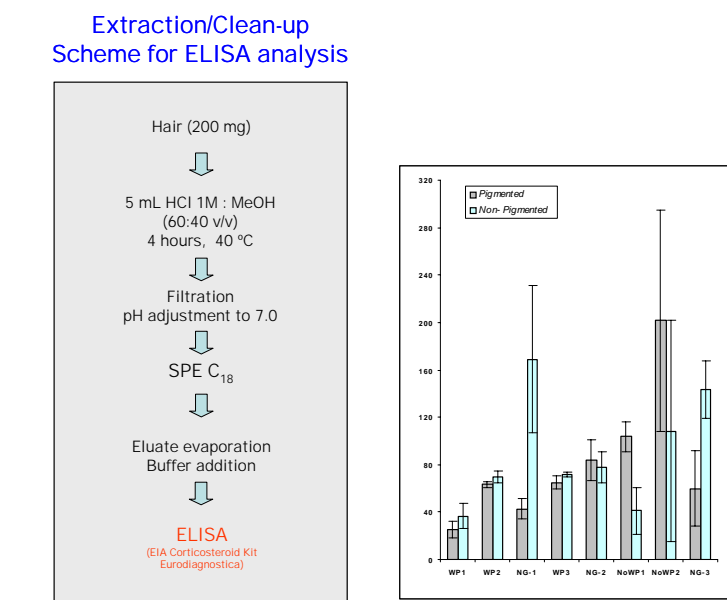


Figure 3: LC-MS/MS conditions and results obtained by LC-MS/MS analyses

Conclusions.

DEX residues were detected by LC-MS/MS in both pigmented and non-pigmented hair samples of treated calves in concentrations ranging between 0.5-26.1 ppb. The DEX residues were detected in hair samples up to 4 weeks after the first pharmacological administration, showing a larger time window than in edible tissues and urine. Results obtained with a commercial EIA Kit indicated that hair sample extracts contained high levels of cross-reacting compounds, probably endogenous steroids, which made difficult the definition of negative samples as well as the interpretation of ELISA results in a screening procedure. On the contrary the LC-MS/MS results may be useful for official monitoring programs.



References

- [1] M. Gratacós-Cubarsí *et al.* *J. Chromatogr. B.* 834:14 (2006).
- [2] Muñoz, P. *et al.* *Analytica Chimica Acta*, 527:137 (2005).
- [3] Antignac J.P. *et al.* *J. Chromatogr. B.* 757:11 (2001).
- [4] O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, C. Elliott, C. Van Peteghem, *J. Chromatogr. B.* 817: 215 (2005).

Acknowledgements: We would like to thank the Spanish MEC (Ministerio de Educación y Ciencia) for the financial support to the AGL-2002-04635 project.

2.8 Bibliografía

2.8.1 Referencias bibliográficas

Anielski, P., Thieme, D., Schlupp, A., Grosse, J., Ellendorff, F., Mueller, R.K. (2005). Detection of testosterone, nandrolone and precursors in horse hair *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 903-908.

Antignac, J.P., Bizet B. L., Monteau F, Poulain F, Andre F. (2001). Multi-residue extraction-purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production. *J. Chromatogr. B.*, 757, 11-19.

Ashworth RB, Epstein RL, Thomas MH, Frobish LT.(1986). Sulfamethazine blood/tissue correlation study in swine. *Am. J.Vet. Res.*, 47(12), 2596-2603.

Bévalot, F., Gaillard, Y., Lhermitte, M.A., Pepin, G. (2000). Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.Biomed. Sci. Appl.*, 740(2), 227-36.

Biehl, L.G., Bevill, R.F., Limpoka, M., Koritz, G.D. (1981). Sulfamethazine residues in swine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 4(4), 285-290.

Cirimele, V., Kintz, P., Dumestre, V., Gouille, J.P., Ludes, B. (2000). Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 107(1-3), 381-388.

CVMP. (1998). Enrofloxacin Summary report (2). EMEA/MRL/388/98-FINAL July 1998. Available at:<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/019597en.pdf> Accessed: November 2006.

CVMP. (2002)^b. Enrofloxacin Summary report (5). EMEA/MRL/820/02-FINAL January 2002 Available at: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/038898en.pdf> Accessed: November 2006.

Davenport, M.D., Tiefenbacher, S., Lutz, C.K., Novak, MA., Meyer, J.S.(2006). Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 147(3), 255-261.

Dunnett, M., Lees, P. (2003). Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. *Res. Vet. Sci.*, 75, 89-101.

Dunnett, M., Lees, P. (2004). Retrospective Detection and Deposition Profiles of Potentiated Sulphonamides in Equine Hair by Liquid Chromatography. *Chromatographia Supplement* 59, S69-S78.

Dunnet, M., Richardson, D. W., Lees, P. (2004). Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair. *Res. Vet. Sci.*, 77, 143-151.

Durant, A.A., Fente, C.A., Franco, C.M., Vázquez, B.I., Mayo, S., Cepeda, A (2002)^a. Development of a diphasic dialysis method for the extraction/purification of residues of ethinylestradiol in hair of cattle, and determination by ags chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 766, 251-256.

- Durant, A.A., Fente, C.A., Franco, C.M., Vázquez, B.I., Cepeda, A. (2002)^b. Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination of 17 α -Ethinylestradiol Residue in the Hair of cattle. Application to treated Animals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 436-440.
- Gaillard, Y., Pépin, G. (1999). Testing hair for pharmaceuticals. *J. Chromatogr. B.*, 733, 231-246.
- Garcia, M.A., Solans, C., Calvo, A., Hernandez, E., Rey, R., Bregante, M.A., Puig, M. (2005). Determination of enrofloxacin and its primary metabolite, ciprofloxacin, in pig tissues. Application to residue studies. *Biomed. Chromatogr.*, 19(1), 27-31.
- Gleixner, A., Meyer, H.H.D. (1996). Hair analysis to monitor the use of growth promoters in meat production. *Fleischwirtschaft*, 76(4), 407-409.
- Henderson, G.L (1993). Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.*, 63, 109-119.
- Hernandez-Arteseros, J.A., Barbosa, J., Compañó, R., Prat, M.D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A.*, 945(1-2), 1-24.
- Hernández-Carrasquilla, M. (2001). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of anabolic compounds in bovine hair: evaluation of hair extraction procedures. *Anal. Chim. Acta.* 434, 59-66.
- Hernández-Carrasquilla. (2002). External contamination of bovine hair with B2-agonist compounds: evaluation of decontamination strategies. *J. Chromatogr. B.*, 767, 235-243.
- Korsrud, G.O., Papich, M.G., Fesser, A.C., Salisbury, C.D., MacNeil, J.D. (1996). Residue depletion in tissues and fluids from swine fed sulfamethazine, chlortetracycline and penicillin G in combination. *Food Addit. Contam.*, 13(3), 287-292.
- Marcos, V., Perogordo, E., Espinosa, P., Martín de Pozuelo, M., Hooghuis, H. (2004) Multiresidue analysis of anabolic compounds in bovine hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 507 (2), 223-231.
- Mitchell, A.D., Paulson, G.D. (1986). Depletion kinetics of ¹⁴C-sulfamethazine [4-amino-N-(4, 6-dimethyl-2-pyrimidinyl)benzene[U-¹⁴C]sulfonamide] metabolism in swine. *Drug Metab. Dispos.*, 14(2), 161-165.
- Muñoz, P., Blanca, J., Ramos, M., Bartolomé, M., García, E., Méndez, N., Gomez, J., Martín de Pozuelo, M. (2005). A versatile liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs. *Anal. Chim. Acta*, 529, 137-144.
- Nakahara, Y. (1999). Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B.*, 733, 161-180.
- Offidani, C., Strano Rossi, S., Chiarotti, M. (1993). Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forensic Sci. Int.*, 63, 171-174.
- Panoyan, A., Delahaut, P., Ayotte, Ch., Lamothe, P., Ong, H., Adam, A. (1995). Immunodetection of clenbuterol in the hair of calves. *J. Agric. Food Chem.* 43 (10), 2716-2718.

- Rambaud, L., Bichon, E., Cesbron, N., André, F., Le Bizec, B. (2005). Study of 17β -estradiol-3-benzoate, 17α -methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair *Anal. Chim. Acta*, 532, 165-176.
- Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N. (2005). Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *J. Sep. Sci.*, 28(6), 555-565.
- Samuelson, G, Whipple, D.M., Showalter, D.H., Jacobson, W.C., Heath, G.E. (1979). Elimination of sulfamethazine residues from swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175(5), 449-452.
- Saschenbrecker, P.W., Fish, N.A. (1980). Sulfamethazine residues in uncooked edible tissues of port following recommended oral administration and withdrawal. *Can. J. Comp. Med.*, 44(3), 338-345.
- Schneider, M.J., Donoghue, D.J. (2002). Multiresidue analysis of fluoroquinolone antibiotics in chicken tissue using liquid chromatography-fluorescence-multiple mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 780(1), 83-92.
- Schneider, M.J., Donoghue, D.J. (2004). Comparison of a bioassay and a liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry(n) method for the detection of incurred enrofloxacin residues in chicken tissues. *Poult. Sci.* 83(5), 830-834.
- Van Den Hauwe O, Dumoulin F, Elliott C, Van Peteghem C. (2005). Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a single dose administration using LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 817(2), 215-223.
- Whipple DM, Samuelson G, Heath GE, Showalter DH (1980). Tissue residue depletion and recycling of sulfamethazine in swine. *J Am Vet Med Assoc.* 176(12), 1348-1352.
- Wilkins DG, Mizuno A, Borges CR, Slawson MH, Rollins DE (2003). Technical note: Ofloxacin as Reference Marker of various colours. *J. Anal. Toxicol.*, 27(3), 149-155.

3. Conclusiones

Las conclusiones principales de estos trabajos se pueden dividir en dos grandes bloques. En un primer bloque se incluyen aquellas referentes a la puesta a punto y desarrollo de metodología analítica para la detección de residuos de SMZ, ENR y DEX en pelo y otros tejidos de origen animal, y en un segundo bloque, las referentes a la evaluación del pelo como matriz analítica para la detección de residuos.

Puesta a punto de metodología analítica para la detección de residuos de ENR, SMZ y DEX en distintos tejidos (pelo, hígado y músculo) de vacuno y porcino.

1. Se ha desarrollado un protocolo de análisis para la detección de residuos de SMZ en pelo vacuno y porcino mediante extracción alcalina, doble purificación SPE y detección por LC-DAD, con un LOD de 46 µg/Kg.
2. Se ha puesto a punto un método rápido para el análisis de 3 SA's (SDZ, SMR, SMZ) en tejido muscular e hígado de vacuno y porcino mediante LC-DAD y sin purificación de los extractos. La sensibilidad resulta adecuada para el análisis de muestras contaminadas con los tres compuestos a niveles del LMR (100 µg/Kg).
3. Se ha conseguido un método de análisis rápido para la detección de residuos de ENR y CPR (metabolito principal de ENR) en pelo vacuno y porcino mediante extracción ácida y detección por LC-FLD, con un LOD de 4-5 µg/Kg.

Evaluación del pelo como matriz analítica para la detección de residuos.

4. Se ha confirmado la deposición de SMZ, ENR y DEX en pelo vacuno pigmentado y no pigmentado después del suministro de estos compuestos a

dosis terapéuticas por vía parenteral. También se ha confirmado la deposición de SMZ y ENR en pelo porcino después de un suministro oral a dosis terapéuticas.

5. Los residuos de SMZ, DEX y ENR son detectables en pelo vacuno a partir de siete días después del inicio del tratamiento y hasta cuatro semanas después del último suministro.
6. En el pelo pigmentado de vacuno se acumula una mayor cantidad de residuos de SMZ y ENR que en el no pigmentado. En el caso de la DEX, las diferencias entre ambos tipos de pelo, no fueron significativas.
7. El pelo presenta una mayor acumulación de residuos de SMZ y ENR que el músculo e hígado.
8. En vacuno, el pelo presenta una mayor ventana de detección para SMZ y ENR que el músculo y el hígado.
9. Además de los compuestos suministrados, en el pelo de los animales tratados con SMZ y ENR aparecen otros compuestos. Se requiere de más estudios para conocer su identidad, para posteriormente evaluar posibles metabolitos o ratios de metabolitos, indicativos de vías de administración y probablemente útiles para descartar contaminaciones externas.

ANEXOS

Anexo I

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. (2006). Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 834(1-2), 14-25.

Anexo II

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, García-Regueiro JA. (2006). Detection of sulphamethazine residues in cattle and pig hair by HPLC-DAD. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 832(1), 121-126.

Anexo III

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. (2006). A simplified LC-DAD method with an RP-C₁₂ column for routine monitoring of three sulfonamides in edible calf and pig tissue. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385(7), 1218-1224.

Anexo IV

Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, Díaz I, García-Regueiro JA. (2006). Novel approach to control sulfamethazine misuse in food-producing animals by hair analysis. *Food Addit. Contam.*, 23(10), 981-987.

Anexo V

Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro JA, Castellari M. (2007). Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1991-1998.

