

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD

TESIS

Determinación de residuos de triclabendazol en leche fresca y queso mantecoso que se destina a consumo humano mediante HPLC en el distrito de Cajamarca, Perú - 2013

Para optar el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:

Giussepe Martín Reyna Cotrina

Asesora

Dra. Sara Palacios Sánchez

Cajamarca, Perú

Mayo de 2014

COPYRIGHT © 2014 by
GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSTGRADO



DOCTORADO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD

TESIS APROBADA:

Determinación de residuos de triclabendazol en leche fresca y queso mantecoso que se destina a consumo humano mediante HPLC en el distrito de Cajamarca, Perú - 2013

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presentada por:

Giussepe Martín Reyna Cotrina

Comité científico:

Dra. Marina Estrada Pérez
Presidenta del Comité

Dr. Ángel Dávila Rojas
Primer Miembro Titular

Dra. Margarita Cerna Barba
Segundo Miembro Titular

Dr. Corpus Cerna Cabrera
Miembro Accesorio

Dra. Sara Palacios Sánchez
Asesora

Cajamarca, Perú

Mayo de 2014

DEDICATORIA

Gracias a todas las personas importantes en mi vida, quienes siempre estuvieron conmigo para brindarme toda su ayuda, tiempo y dedicación. Me toca retribuir un poco de todo lo que me han otorgado. Con todo mi cariño dedico esta tesis a:

DIOS

Mi madrina, Loyola Santa Cruz

Mi mamá, Elida Cotrina Bazán

Mi hijo, Martín Alexander Reyna Álvarez

Mis amigos

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar.” Thomas Chalmers

Agradecimientos

A Dios y la Virgen, por haberme guiado durante el desarrollo y la culminación de la presente tesis.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, Alma Máter, que me dio la oportunidad de seguir especializándome.

A mi Asesora de tesis, la Dra. Sara Palacios Sánchez, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, experiencia, paciencia y su motivación constante, me condujo a que culminara satisfactoriamente este trabajo de investigación.

Al Dr. Mayer Ganoza Yupanqui, por la orientación, supervisión y seguimiento continuos que ha sabido brindarme, pero, sobre todo, por su motivación y apoyo generosos.

A la Dra. Marina Estrada Pérez, por su orientación, su opinión crítica y su rectitud como profesional. Sus consejos han contribuido sustantivamente a mi formación como persona y como investigador.

Al Dr. Guido de la Quintana Giraldo, por su apoyo incondicional, sus sabias palabras y la plena disposición de su tiempo. Sus consejos invalorable me han ayudado a formarme como docente.

Un agradecimiento, desde lo más profundo, a mis amigos y familiares, por haberme animado una y otra vez a terminar exitosamente el presente trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| CAPÍTULO I | 1 |
| I-INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO II | 6 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1-BASE TEÓRICA | 6 |
| 2.1.1-CALIDAD DE LA LECHE CRUDA | 6 |
| 2.1.2-TRICLABENDAZOL (TCBZ) | 14 |
| 2.1.2.1-Generalidades de Triclabendazol (TCBZ) | 14 |
| 2.1.2.2-Mecanismo de Acción | 16 |
| 2.1.2.4-Características Farmacocinéticas | 18 |
| 2.1.2.5-Características Farmacodinámicas | 20 |
| 2.1.2.6-Estudio de residuos | 20 |
| 2.1.2.7-Conceptos y metodología para la validación del método | 23 |
| 2.1.2.8-Metodología para la detección de residuos | 25 |
| 2.1.2.9-Determinación de los límites máximos de residuos (LMR) en tejidos | 27 |
| 2.2.-BASE LEGAL | 31 |
| 2.2.1-La Norma Técnica Peruana Leche y Productos Lácteos (NTP 202.001.2010) | 31 |
| 2.2.1.1-Especificaciones de leche cruda-Requisitos | 31 |
| 2.2.1.2-Características organolépticas normales | 31 |
| 2.2.1.3-Aspectos Físico-Químicos | 31 |
| 2.2.1.4- Aspectos microbiológicos | 31 |
| 2.2.1.5-Contaminantes | 32 |
| 2.2.2.-La Ley 26842 de Salud | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3-Decreto Supremo N° 015-98-AG.Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales... | 34 |
| 2.2.4-El Codex Alimentarius | 37 |
| 2.2.5-Reglamento de Ejecución (UE) no 222/2012 | 37 |
| III-HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN | 37 |
| IV-OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN | 37 |
| V -MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 5.1-MATERIALES | 39 |
| 5.1.1- Material de vidrio | 39 |
| 5.1.2-Reactivos | 39 |
| 5.1.3-Equipo de laboratorio | 39 |
| 5.2-MÉTODO | 40 |
| 5.2.1-LOCALIZACIÓN | 40 |
| 5.2.2-UNIDAD DE ANÁLISIS, UNIVERSO Y MUESTRA | 42 |
| 5.2.2.1-Unidad de Análisis: | 42 |
| 5.2.2.2- Universo y muestra | 42 |
| 5.2.3-TIPO DE ESTUDIO | 42 |
| 5.2.4-TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS | 42 |
| 5.2.4.1-MUESTREO | 42 |
| 5.2.5-PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR | 43 |
| 5.2.5.1-Reactivos | 43 |
| 5.2.5.2-Soluciones primarias de TCBZ y TCBZSO (5 µg/µL) | 44 |
| 5.2.5.3-Soluciones secundarias de trabajo de TCBZ y TCBZSO | 44 |
| 5.2.5.4-Procedimiento de Extracción de TCBZ desde la leche y queso | 44 |
| 5.2.5.5-Procesamiento de las muestras: | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.5.6-Condiciones Cromatográficas: | 44 |
| 5.2.6-PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA..... | 45 |
| 5.2.7-VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA | 49 |
| 5.2.7.1-Linealidad | 50 |
| 5.2.7.1.1-TCBZSO | 50 |
| 5.2.7.1.2-TCBZ | 52 |
| 5.2.7.2-Precisión del sistema | 54 |
| 5.2.7.2.1-TCBZSO | 54 |
| 5.2.7.2.2-TCBZ | 55 |
| 5.2.7.3-Exactitud | 56 |
| 5.2.7.3.1-TCBZSO en leche | 56 |
| 5.2.7.3.2-TCBZ en leche | 58 |
| 5.2.7.3.3-TCBZSO en queso | 59 |
| 5.2.7.3.4-TCBZ en queso | 60 |
| 5.2.8- Ensayo Preliminar | 61 |
| 5.2.9- Análisis estadístico..... | 63 |
| VI-RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 64 |
| VIII-RECOMENDACIONES | 71 |
| IX-LISTA DE REFERENCIAS | 73 |
| ANEXOS | 85 |

Listado de Abreviaciones

INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la

Protección de la Propiedad Intelectual)

- **MINSA** (Ministerio de Salud)
- **SENASA** (Servicio Nacional de Sanidad Agraria)
- **TCBZ** (Triclabendazole)
- **TCBZSO₂** (Triclabendazol sulfóxido)
- **FAO** (Organización para la Agricultura y Alimentación)
- **FDA** (*Food and Drug Administration*)
- **EU** (Unión Europea)
- **VICH** (Armonización Internacional de la Coordinación Veterinaria)
- **NTP** (Norma Técnica Peruana)
- **BPM** (Buenas Prácticas de Manufactura)
- **BPA** (Buenas Prácticas de Agricultura)
- **BPU** (Buenas Prácticas de Utilización)
- **BPF** (Buenas Prácticas de Fabricación)
- **ABC** (Área Bajo la Curva)
- **CL** (Cromatografía de líquidos, *Liquid Chromatography*)
- **LC** (Limite de Cuantificación)
- **LD** (Límite de Detección)

- **EMEA** (Evaluación de Productos Medicinales)
- **ACN** (Acetonitrilo)
- **HPLC** (Cromatografía de líquidos de alta eficacia, cromatografía líquida de alta eficiencia, cromatografía líquida de alta resolución, *High Performance Liquid Chromatography*).
- **MS** (Espectrometría de Masas, *Mass Spectrometry*)
- **MeOH** (Metanol)
- **Ref** (Referencia)
- **SD** (Desviación Estándar, *Standar Desviation*)
- **RSD** (Desviación Estándar Relativa, *Relative Standard Desviation*)
- **FAO** (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
- **OMS** (Organización Mundial de la Salud)
- **OMC** (Organización Mundial del Comercio)
- **HACCP** (Sistema de Análisis de Riesgos y los Puntos Críticos de Control)
- **LMR** (Límite Máximo para Residuos)
- **IDA** (Ingesta Diaria Admisible)
- **Noel** (Efectos tóxicos no observables)
- **QuEChERS** (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro).
- **CC** (Límite de decisión)
- **DIGEMID** (Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas)

RESUMEN

El Triclabendazol (TCBZ) es un fasciolicida halogenado de uso extensivo en medicina Veterinaria para el tratamiento de fasciolosis que es altamente prevalente en Cajamarca, Perú, afecta a humanos y animales. La excreción de residuos de TCBZ y el riesgo de la presencia de esta droga y sus metabolitos Sulfoxido de Triclabendazol (TCBZSO) y Triclabendazol Sulfona (TCBZSO₂) en leche fresca y derivados lácteos hacen que su determinación sea necesaria debido a que su uso está prohibido en vacas en lactación. En el presente trabajo se determinaron residuos de TCBZ y TCBZSO en leche y queso mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPCL). La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de acetonitrilo-acetato de amonio, columna de Octadecilsilan (C18) (5 µm; 4,6 mm x 150 mm) y determinada por UV a 300 nm. La linealidad, precisión y exactitud dio porcentajes cercanos a 100%, los coeficientes de variación inferiores a 5% y la desviación estándar inferior a 2%. Los límites de detección y cuantificación en leche y queso para TCBZSO fueron de entre 0,3865-0,240 y 1,28837-0,799 µg./ml., respectivamente; mientras que para TCBZ, los límites de detección y cuantificación fueron 0,305-0,438 y 1,017-1,459. Una vez validado el método, se procedió a hacer las determinaciones en 29 muestras de queso y 25 muestras de leche; ninguna presentó residuos de TCBZ y TCBZSO, por lo que se consideraron libres del antiparasitario.

Palabras Clave: Triclabendazol, Metabolitos, Residuos.

ABSTRACT

Triclabendazole (TCBZ) is a halogenated flukicide used extensively in Veterinary Medicine for the treatment of fascioliasis, highly prevalent in Cajamarca, Perú, affecting humans and animals. Excretion of TCBZ residues and the risk of the presence of this drug and its metabolites triclabendazole sulfoxide (TCBZSO) and triclabendazole sulfone (TCBZSO²) in fresh milk and dairy products make its determination necessary due to their prohibition in lactating cows. In the present work and TCBZSO TCBZ residues were determined in milk and cheese by high resolution liquid chromatography (HPLC). The mobile phase consisted of acetonitrile - ammonium acetate Octadecilsilan column (C18) (5 µm, 4.6 mm x 150 mm) and determined by UV at 300 nm . The linearity , precision and accuracy gave percentages close to 100% , the coefficients of variation less than 5 % and the deviation was less than 2 % standard . The detection and quantification limits in milk and cheese were TCBZSO between 0.3865 to 0.240 and from 1.28837 to 0.799 g / mL, respectively, whereas for TCBZ limits of detection and quantification was 0.305 to 0.438 and 1.017 to 1.459. Once the method was validated 29 samples of cheese and 25 samples of milk were determined; none of the samples had residues of TCBZ and TCBZSO, so they were considered free of the flukicide.

Keywords: Triclabendazole, Metabolites Residues.

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La OMS acepta a la leche como un alimento esencial debido a sus propiedades nutricionales (Sólidos totales 11,4 %, 3,2% de grasa, etc.). Estas cualidades son sometidas a un gran número de riesgos que hacen peligrar la calidad original (1). La producción de leche de calidad e inocua resulta sumamente compleja y especial; debido a que la leche contiene tres tipos de sólidos: disueltos (minerales e hidratos de carbono), en suspensión (sustancias proteicas) y en emulsión (grasa en agua), condición que facilita la alteración y adulteración (2).

Para cuidar la inocuidad es necesario que el productor haga uso de las buenas prácticas pecuarias, éstas intervienen en todo lo relacionado con la salubridad de la producción, uso de infraestructura adecuada, lavado de porongos, respeto de la cadena de frío, respeto de los tiempos de retiro de los productos médico veterinarios, el secado y sellado de los pezones del animal, etc. Estas prácticas están normadas en el DS. 007-98, que exige que la vigilancia de la producción sea realizada por un médico veterinario, el control de la producción por el Servicio Nacional de Seguridad Agraria (SENASA) y la vigilancia en el expendio debe darse por el Ministerio de Salud (MINSA), el Instituto Nacional para la Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI) y Municipalidades. Estas entidades deben controlar la producción y el expendio de la leche, y su interacción logra que la leche sea inocua (3).

Estas exigencias de calidad de la leche se han establecido por el alto peligro de contaminación desde su propia producción (4-6), teniendo en cuenta que el animal es dosificado con antiparasitarios y antibióticos periódicamente como mecanismo de control de enfermedades que pueden afectarles (7, 8). Este hecho se presenta, especialmente, en zonas endémicas en donde la fasciolosis, brucelosis, tuberculosis, ántrax y otras enfermedades latentes. Consecuentemente, la leche va a contener sustancias adicionales en su composición como los antiparasitarios. Además, la leche y derivados por ser productos rápidamente perecibles necesitan condiciones especiales para su manipulación y comercialización o transformación en otros productos con valor agregado. Aunque, en estos procesos, la leche también puede contaminarse con otros gérmenes y sustancias químicas, convirtiéndose así en un factor de riesgo para la salud pública y, obviamente, puede afectar la economía de quienes son productores de este alimento (1, 9).

Así podemos apreciar que la Región Cajamarca, considerada la 4^{ta} Región productora de leche en el país y teniendo en cuenta que los residuos de medicamentos son un peligro para la salud humana, más del 60% de la leche producida en el departamento se vende para consumo directo como leche cruda, y la enfermedad más prevalente en el ganado vacuno es la fasciolosis.

La epidemiología de la fasciolosis en Cajamarca tiene un ciclo anual de infección en el ganado vacuno lechero (10), con prevalencias altas tanto en la población urbana como en la rural de Cajamarca (11, 12). Sobre la base de la información epidemiológica generada, se recomendó el empleo de dosificaciones estratégicas para *F. hepática*, utilizando Triclabendazol (TCBZ) (13). La eficacia del tratamiento frente

a este parásito, mediante una prueba de eficacia absoluta *in vivo* con TCBZ (Fasinex 10%) es del 25,2% (14) y se ha determinado, además, que residuos de metabolitos pueden estar presentes en la leche y en el queso elaborado a partir de leche de animales tratados con TCBZ (15). Esto constituye un potencial de riesgo para la salud humana (16), en particular por el desarrollo de reacciones alérgicas, inhibición de la flora intestinal y desarrollo de cepas resistentes de *Fasciola hepatica* (15, 17). En el entendido que la totalidad de esta producción no pasa por control de acuerdo con las normas establecidas, es necesario conocer la presencia de residuos de triclabendazol, sus metabolitos sulfóxido y sulfona en leche y queso, principalmente porque no se han realizado investigaciones en esta área. Además, se ha demostrado en diversos estudios que el TCBZ y sus residuos se concentran en el queso más que en la leche, con un factor de hasta 5 veces más que los encontrados en leche (5 372 vs 918 µg./kg. para el queso vs leche) (18), inclusive se ha demostrado que residuos de triclabendazol se pueden encontrar aumentados hasta en 13 veces más en el queso (15), dichos residuos se concentran además en mantequilla por un factor de 9 (9,177 vs 1 082 µg./kg. para la mantequilla vs leche), y en leche en polvo, 15 veces más en comparación con la leche de partida descremada (7 252 vs 423 µg./kg. para el polvo de leche descremada) y que pueden estar presentes a pesar de las altas temperaturas (185 °C) requerida para su fabricación (18).

El amplio uso del triclabendazol para el tratamiento de fasciolosis y la necesidad de asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos provenientes de animales tratados con antihelmínticos ha llevado a desarrollar técnicas y metodologías cada vez más sensibles y exactas para la determinación de estos fármacos en diferentes tejidos animales. Los nuevos métodos analíticos ponen de manifiesto la presencia de residuos

en concentraciones de 250 µg./kg.; lo que determina que sería imposible administrar medicamento alguno a un animal, sin que pueda ser detectado en la carne, leche o huevos, incluso después de respetar el tiempo de retirada establecido para cada uno de los compuestos administrados a los animales (19). De ahí la importancia de la necesidad de investigar este problema, sobre todo, por la trascendencia y el impacto en la salud de la población.

Una de las técnicas más confiable y de alta precisión para determinar la presencia de residuos de TCBZ en la leche y/o sus derivados es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que representa una técnica analítica confiable y de alta precisión. Mediante esta técnica es posible determinar la presencia de residuos de TCBZ que pueden estar siendo ingeridos en la leche y queso que se expende en los mercados de la ciudad de Cajamarca, sin tener en cuenta las precauciones de uso del fármaco y sin respetar el tiempo de retiro (20).

Las razones antes descritas hacen que la presente investigación tenga por finalidad crear conocimiento sobre la problemática local de residuos de medicamentos en leche (8), para que, además, sirva como referente para tomar decisiones en los niveles y mecanismos de intervención que se ajusten a la realidad de Cajamarca, principalmente, en la ejecución de los programas de control adecuado en el uso de Triclabendazol en fasciolosis, el uso racional de antiparasitarios, sustancias químicas y, sobre todo, evitar ofrecer a los humanos microdosis del metabolito activo triclabendazol a través de la leche, lo cual va a generar, tarde o temprano, resistencia en fasciolosis humana (21).

Otra contribución de esta investigación en el ámbito técnico es la posibilidad de generar un conocimiento en la utilización, validación y estandarización de la determinación de residuos de triclabendazol mediante HPLC; lo que a su vez creará conocimiento teórico acerca de los residuos de medicamentos de uso veterinario presentes en la leche y quesos que se producen y expenden en la ciudad de Cajamarca.

Finalmente, se espera que la investigación sienta las bases iniciales de comparación para posteriores estudios relacionados con el tema.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. BASE TEÓRICA

2.1.1. Calidad de la leche cruda

Cuando se habla sobre la calidad de la leche, son varios los conceptos que se referencian; aunque no siempre se atiende al significado completo y al concepto verdadero de este término, porque no se aclara o explica que para lograr estándares de la leche, se hace necesario revisar desde la producción en los fundos hasta que llega a manos del consumidor, a todo esto se le denomina “Cadena Productiva”, para así lograr un producto que sea Inocuo, es decir, que no cause daño a las personas que consumen leche y derivados lácteos que se producen en el departamento (22).

En el **productor** primario se integran componentes biofísicos, recursos financieros y el recurso humano, que interactúan entre sí. La leche debe ofrecer los niveles de estándares de calidad mínimos para que en la continuación de la cadena de comercialización esta no se altere.

El **acopio** le continúa a la producción primaria y desempeña un papel importante en la inocuidad y la calidad del producto final. Posteriormente, sigue la **transformación**, que hace referencia al conjunto de actividades desarrolladas en un establecimiento,

técnicamente diseñado y bajo estándares de higiene, con el objeto de elaborar, producir, procesar y envasar leche y productos derivados aptos para el consumo humano. La **distribución** es la entrega del producto que llega a manos del **consumidor**, quien adquiere, utiliza, disfruta, o se decepciona de los bienes o servicios de cualquier naturaleza.

Los **insumos** son los recursos físicos que intervienen en la creación de un bien o un servicio; el **transporte** hace referencia al conjunto de actividades que posibilitan la movilidad de los bienes y/o las personas, y el **recurso humano** con los conocimientos, habilidades y aptitudes determinadas, dispuestos a resolver una necesidad o llevar a cabo cualquier actividad en una empresa.

La norma UNÍ ISO 8402 define la calidad de un producto como el conjunto de las propiedades y características de un producto o servicio que le confieren la aptitud de satisfacer las necesidades expresas o implícitas del cliente (23).

La calidad de la leche comercial es uno de los pilares fundamentales en la industria láctea, que depende directamente de las características del producto original; por lo tanto, en un alto porcentaje la calidad del producto que llega al consumidor se debe al pobre control sobre la leche cruda (24).

Se entiende por leche de calidad a la proveniente del ordeño de vacas sanas bien alimentadas, libre de olores, sedimentos, sustancias extrañas y con características como: cantidad y calidad apropiadas de componentes sólidos (grasa, proteína, lactosa y minerales), con un mínimo de carga microbiana, libre de bacterias causantes de

enfermedad (brucelosis, tuberculosis, patógenos de mastitis y toxinas); asimismo, libre de residuos químicos e inhibidores y con un mínimo de células somáticas. Alcanzar estos niveles óptimos en el análisis de la calidad de la leche depende directamente de las zonas de producción, del operador de la máquina de ordeño, del ordeñador y de las condiciones de transporte y de la manipulación en la finca (2). Evitando que se alteren las características físico-químicas y microbiológico, los cuales también afectan la inocuidad de la leche debido a que este producto es un excelente medio de conservación y crecimiento para una gran variedad de microorganismos (25).

Se puede lograr una buena calidad de la leche por medio de un análisis agrupado en dos factores: el primero está determinado por la calidad composicional que hace referencia a la materia grasa y sólidos no grasos, y el segundo, por la calidad higiénica que contempla los microorganismos patógenos, toxinas, residuos químicos, microorganismos saprófitos, células somáticas, materias extrañas y condiciones organolépticas (26, 27).

La necesidad de una mayor eficiencia en el proceso industrial de la leche y la creciente demanda del mercado por productos de mayor calidad, traen como consecuencia un incremento en las exigencias de los estándares de la materia prima, lo que afecta económicamente al productor. El principal problema de los pequeños productores es la descomposición de la leche en el ordeño y transporte por las deficientes condiciones higiénicas y sanitarias, lo que genera problemas de zoonosis e incrementa el desafío logístico en el control de la calidad de la leche dentro de los mercados (28).

En el primer eslabón de la cadena, la calidad de la leche cruda es recompensada a través del mercado donde el énfasis es producir leche de alta inocuidad para el consumidor (26). Se establece a partir de tablas de costos por litro de leche cruda de acuerdo con un análisis microbiológico previo, que permite determinar si es apta para su comercialización y consumo humano.

La principal fuente de residuos de TCBZ en leche es originada por el manejo inadecuado para controlar la fasciolosis. La Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO), la Unión Europea (EU) y la Food and Drug Administration (FDA) son las organizaciones que han establecido niveles máximos permisibles en los alimentos, en especial el triclabendazol. Los límites máximos de residuos (LMR) se establecieron con el objetivo de asegurar y proteger la salud del consumidor y son definidos por la Unión Europea como "el contenido máximo de residuos resultantes de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg./kg. sobre la base del peso en fresco), autorizada en la comunidad o reconocida como admisible en un producto alimentario" (29). Al respecto, en abril de 1996, en París, en una reunión realizada por el VICH (Armonización Internacional de la Coordinación Veterinaria) se abordó el tema del uso de medicamentos entre Estados Unidos de América, Unión Europea y Japón. Dentro de los puntos importantes señalan la necesidad de establecer una uniformidad en los LMR, para asegurar una mayor confianza al consumidor y eliminando barreras comerciales relacionadas con este aspecto (30). Contrariamente a lo que sucede con los LMR, los cuales son específicos

para cada droga, el período de resguardo no constituye una constante de un principio activo determinado, sino un elemento específico de cada fórmula farmacéutica, que varía según diversos parámetros tales como la naturaleza del excipiente y la vía de administración para el caso del TCBZ el período de retiro es superior a 28 días (31).

En el Perú recientemente a partir de julio del año 1998, el Ministerio de Agricultura aprobó el Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales. Según decreto supremo D. N° 015-98AG (32), hace obligatorio que, en el Registro de Productos, las industrias farmacéuticas indiquen en el etiquetado las dosis, vías de administración y especies de destino. Se agrega, además, el período de resguardo que deben tener estos fármacos en leche y carne destinadas a consumo humano, con énfasis en que estos deben ir avalados por sus estudios correspondientes. En este Reglamento se indica, asimismo, que los productos registrados en el Instituto de Salud Pública, antes de esta fecha, tendrán un plazo de cinco años para actualizar sus registros.

En el Perú, como ya se había señalado, el Código Sanitario de Alimentos menciona, que los alimentos o bebidas sean de tal naturaleza o agregado en tales condiciones o cantidades, que el producto resultante pueda ser perjudicial para la salud o impropio para el consumo humano (33).

A pesar de que en el Perú se han realizado estudios con la finalidad de detectar la presencia de residuos o contaminantes en leche, los antibióticos han sido los más estudiados por métodos cualitativos. En Cajamarca existen organismos encargados de realizar el control de alimentos. El más importante es el Laboratorio de Análisis

Bromatológico de la Municipalidad Provincial de Cajamarca, el cual realiza la inspección de mercados y demás centros de abasto de nuestra ciudad. El inconveniente radica en que no se hace control físico químico, antibióticos, análisis bacteriológico y tampoco de antiparasitarios. Pese a que la NTP 202.001 (Norma Técnica Peruana) establece los niveles sanitarios adecuados para que la leche sea consumible e inocua para la salud de las personas, no establece LMR para triclabendazol en leche ni quesos (3). La cromatografía líquida en fase reversa es el método analítico de elección para la detección de ambos analitos. De ello se obtiene una alta selectividad en la separación de los metabolitos a través de detección ultravioleta (34).

En el Cuadro 1 se detallan los estudios internacionales elaborados; pero, tal como se mencionó en el contexto nacional, hasta el momento no se han realizado estudios de investigación exploratorios por el que se analice la concentración asociada con buenas prácticas de utilización (BPU y BPA) de TCBZ en la fasciolosis.

La excreción de TCBZ y sus dos metabolitos principales se han medido en vacas, a las cuales se les administró una dosis de aproximadamente 12 mg./kg. Con ello se demostró que los metabolitos Sulfóxido y Sulfona pueden ser detectados en la leche (36 y 144 horas respectivamente), mientras que en plasma hasta por un período de diez días (15). Solo el 1,5% (máximo) del triclabendazol administrada se eliminó como triclabendazol sulfona a través de la leche (17). Se ha evaluado el tiempo de permanencia del TCBZ en vacas luego de 60 días post dosificación en las cuales no se encontraron residuos mientras que los niveles más altos de residuos determinados de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO₂ y residuos ceto- triclabendazol fueron 244, 525, 1

710 y 16 µg./kg., respectivamente. Los residuos de Triclabendazol, Sulfóxido Triclabendazol, Sulfona Triclabendazol y ceto triclabendazol fueron detectables en la leche durante un máximo de 5,5, 15,5, 20 y 25 días después del tratamiento, respectivamente. El triclabendazol sulfona fue el residuo encontrado más importante, lo que representa > 87% de los residuos marcadores a los 3,5 días post dosificación de la droga. Al mismo tiempo, los metabolitos sulfóxido y sulfona pueden ser encontrados en la leche hasta el día 23 a 36 post dosificación, mientras que el TCBZ no pudo ser determinado ya que su persistencia es corta después de la administración oral de TCBZ (18).

Cuadro 1. Presencia de antiparasitarios en leche - Estudios Internacionales

| Principio activo | Título de la investigación/hallazgos | País | Fuente |
|--|---|------------------------------|--------|
| Bencimidazoles, lactonas macrocíclicas, y fasciolicidas | Nuevo método para el análisis de fasciolicidas y otros residuos de antihelmínticos en la leche bovina y el hígado utilizando cromatografía líquidaespectrometría de masas tándem | Irlanda- 2013 | (35) |
| Bencimidazoles, avermectinas fasciolicidas. | Determinación de residuos de medicamentos antihelmínticos en la leche y mediante ultra alta cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem con el cambio rápido de polaridad | Irlanda- 2010 | (36) |
| Metronidazol, abamectina, tiabendazol, clorsulon. | Prueba y validación de un método analítico práctico para > 100 residuos de medicamentos veterinarios en los músculos de los bovinos mediante HPLC y cromatografía espectrometría de masas en tándem | Uruguay- Irlanda- 2012 | (37) |

| | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------|------|
| Triclabendazol | Validación del nivel Máximo de residuos de residuos marcadores triclabendazol en matrices bovinas hígado, músculo y la leche por ultra alta presión cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem | Irlanda- | (38) |
| Abamectina Triclabendazol | Cinética plasmática y niveles de residuos en tejidos de bovinos tratados con la asociación antihelmíntica de Abamectina Triclabendazol. | Chile- 2005 | (39) |
| Triclabendazol | Concentraciones residuales del fasciolicida triclabendazol en leche y queso. Los objetivos experimentales fueron evaluar la cinética de disposiciones comparativas de TCBZ y sus metabolitos en plasma sulfóxido y sulfona en leche de ganado lechero lactante después de la administración oral (12 mg/kg de TCBZ, en leche y queso de vacas tratadas. Ambos metabolitos sulfóxido y sulfona de TCBZ pero no TCBZ fueron detectados sino hasta 144 h después de la administración oral de TCBZ tanto en plasma y leche. En el queso elaborado con la leche de los animales tratados se encontró 13 veces más los residuos concentrados. | Perú- Argentina | (40) |

Se han desarrollado técnicas para cuantificar y confirmar la presencia de residuos de TCBZ para medir el LMR (Límite Máximo de Residuos), en el rango dinámico de 1 a 100 y 5 a 1000 µg./kg., para la leche y tejido, respectivamente. Esto se logró usando una fase móvil que contiene ácido trifluoroacético (pK_a de 0,3), lo que resultó en la formación de los iones pseudomoleculares protonadas, [M + H]⁺, de triclabendazole metabolitos. Ionización insuficiente de los aditivos de fase móvil común debido a los bajos valores de pK_a (< 2) fue identificado como la causa de la pobre linealidad. Las nuevas condiciones de fase móvil permiten el análisis de residuos de TCBZ en el hígado, el músculo y la leche que abarca los niveles máximos de residuos (LMR) de la UE (250, 225 y 10 µg./kg., respectivamente). Residuos de TCBZ fueron extraídos utilizando un método QuEChERS modificado y analizadas por espectrometría de masas de ionización por electro spray positivo con todos los analitos eluidos por 2,23 min. El método fue validado en el MRL, de acuerdo con la decisión de la Comisión (CD) 2002/657/CE criterios. El límite de decisión (CC) del método estaba en el intervalo de 250,8 a 287,2 µg./kg. para el hígado, de 2 554,9 a 290,8 µg./kg. el músculo y 10,9 – 12,1 µg./kg. para la leche. El rendimiento del método fue verificado con éxito para TCBZ en el músculo mediante la participación en un estudio de competencia. El método se aplicó también a hígado, músculo y muestras de leche (35).

2.1.2. Triclabendazol (TCBZ)

2.1.2.1. Generalidades de Triclabendazol (TCBZ)

El triclabendazol (5-cloro-6- [2,3-diclorofenoxi]-2-metil-tiobencimidazol) es un bencimidazol halogenado que posee elevada actividad frente a estados

inmaduros y adultos de *Fasciola hepatica*, su eficacia ha sido probada en ovinos, caprinos y bovinos (41). Además, de su actividad sobre *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, se ha descrito y confirmado su eficacia sobre *Fascioloides magna* y *paragonimus* (28). Sin embargo, no presenta actividad contra otros vermes planos o redondos.

Como la mayoría de los bencimidazoles el TCBZ es escasamente soluble en agua, por lo cual se administra por vía oral como suspensión, pasta o polvo, generalmente al 5 y al 10% (28).

A modo general, el TCBZ posee las siguientes características (42):

- Se logra una mayor eficacia fasciolicida cuando se administra por vía oral.
- Es más eficaz en rumiantes y caballos cuando se administra por vía oral, en los que su tasa de pasaje a través del aparato digestivo es más lenta debido a la influencia del rumen y del ciego, respectivamente.
- Las dosis divididas son más eficaces que una dosis única debido a que la naturaleza de su acción fasciolicida depende de un contacto prolongado con el parásito.
- Presenta una baja toxicidad y amplio margen terapéutico.

La fasciolosis bovina y ovina, además de ser una importante causa de decomiso en mataderos, es una enfermedad parasitaria que, aunque no ocasiona alta mortalidad de los animales, provoca debilitamiento y atraso en el desarrollo; lo que se expresa en una baja productividad en muchos predios ganaderos (43). Este parasitismo hace que el uso de este antihelmíntico sea frecuente en programas de desparasitación en masa.

2.1.2.2. Mecanismo de Acción

Los carbamatos benzimidazólicos (albendazol, mebendazol y triclabendazol), y sus metabolitos como el albendazol sulfóxido, se desarrollaron en la década de 1970. El mecanismo de acción del TCBZ no está bien explicado aún. Se describe que actúa dañando la integridad y funciones de transporte de energía en las células del parásito (44). Un mecanismo de acción alternativo aún en estudio, basado en la determinación de genes de α -tubulina en *Fasciola hepatica*, señala que TCBZ, por ser del grupo de los benzimidazoles, actuaría alterando el estado dinámico constante de ensamblamiento y desensamblamiento de los microtúbulos en el parásito (45), es decir, TCBZ funciona bloqueando la polimerización de la tubulina en los microtúbulos (46). De forma particular se ve alterada la incorporación de glucosa y la secreción de acetilcolinesterasa. Pero, si esto fuera así, TCBZ debería tener acción también sobre nematodos; sin embargo, estos autores señalan que esto no ocurre debido a que la α -tubulina de *Fasciola hepatica* sería diferente de la que poseen los parásitos nemátodos.

Su actividad fasciolicida está asociada principalmente con el metabolito sulfóxido, ya que el fármaco original Triclabendazol es rápidamente metabolizado en el hígado hacia su metabolito activo Triclabendazol Sulfóxido (TCBZSO), responsable de la actividad fasciolicida y a Triclabendazol Sulfona (TCBZSO₂), el metabolito inactivo (47, 48).

El TCBZ se administra en solución acuosa por vía oral, intrarruminal o intraabomasal. Existen varias formulaciones que incluyen suspensiones al 5% para ovinos y caprinos, al 10% y 12% para bovinos y búfalos y tabletas de 250 mg. de TCBZ para ovinos y caprinos y de 900 mg. de TCBZ para bovino y búfalo. Además, está disponible como suspensión en combinación con Levamisol para el control de las parasitosis por nemátodos y tremátodos en las especies mencionadas (28).

En bovino y en ovino, el TCBZ a dosis de 10 mg./kg., por vía oral, es muy eficaz contra infecciones por *Fasciola hepatica* inmadura en el parénquima hepático y contra las formas maduras de los conductos biliares (49).

El TCBZ en ovinos se administra en dosis de 10 mg/kg por vía oral, con lo que se logra un 90% de efectividad sobre estados inmaduros de *fasciola* de una semana, y de 98 a 100% sobre estados larvarios y adultos. En bovinos se requieren dosis de 12mg/kg para lograr una eficacia antiparasitaria de 80 a 95% contra fasciolas de 1 a 3 y de 5 a 8 semanas. En estos casos se puede advertir una disminución de la eficacia entre las 3 y 5 semanas a valores de

73-80%, lo cual no ha sido aún bien aclarado (50, 51).

2.1.2.4. Características Farmacocinéticas

Presenta buena absorción a nivel digestivo, principalmente en el intestino. Debido a la ausencia o a que se detectan en el plasma cantidades muy pequeñas del fármaco original posterior a la administración oral, se asume que este fármaco experimenta metabolismo oxidativo de primer paso en el hígado (50). Sus metabolitos sulfóxidos (TCBZSO), principalmente activos, son inactivados en gran parte por oxidación a sulfona antes de la excreción (Figura 1).



Figura 1. Estructura química de triclabendazol (TCBZ) y sus metabolitos sulfóxido y sulfona.

Fuente : Alvinerie y Galtier, 1986 (52).

El metabolismo de TCBZ ocurre a través de dos vías; una rápida oxidación del grupo metiltiol del sulfóxido seguido por una oxidación relativamente lenta del sulfóxido a sulfona, con secreción directa a la bilis (53). El TCBZ es eliminado en un 95% por las heces, 2% por la orina y menos de 1% por la leche. Esta última es la menor ruta de eliminación. Asimismo, se destaca que después de siete días post-administración, la leche de animales lactantes tratados ya no constituye riesgo para la salud humana (50).

Se ha evaluado el comportamiento farmacocinético de TCBZ y los parámetros de concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva (ABC) y tiempo de vida media plasmática para el metabolito sulfóxido de TCBZ, de donde se concluyó que fueron mayores en rumiantes que en monogástricos (Cuadro 3) (42, 48).

Cuadro 2. Variables farmacocinéticas para triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) en diferentes especies.

| Especie | Nº | Dosis | C_{máx} * (µg/mL) | T_{máx} * Rango (horas) | T1/2 * (horas) |
|----------------|-----------|--------------|--------------------------------------|--|---------------------------|
| Bovina | 9 | 12 | 14,3 | 12-32 | 22,7 |
| Bubalina | ND | 12 | 1,5 | 23,8 | 24,13 |
| Ovina | 6 | 10 | 13,1 | 24-36 | 42,8 |
| Ovina b | 1 | 10 | 16 | 24 | 30 |
| Caprina | 5 | 12 | 14,9 | 8-16 | 22,4 |
| Porcina | 6 | 10 | 17,5 | 4-8 | 6,8 |
| Equina | 3 | 12 | 4,6 | 8 | 9,7 |

Fuente: Fernández, R.1992 (42).

C_{máx}: Concentración máxima, T_{máx}: Tiempo en que se alcanza la concentración máxima, t_{1/2} : Tiempo medio de eliminación, ABC: Área bajo la curva de concentración plasmática en el tiempo, ND: No determinado a: vía intrarruminal; b: vía oral.

2.1.2.5. Características Farmacodinámicas

El Triclabendazol posee escasa toxicidad. En bovinos no presenta alguna sintomatología; en humanos, en la mayor parte de los casos, de aparecer, los efectos secundarios son gastrointestinales (p.ej., náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea) y/o alteración de las pruebas hepáticas. Estos efectos secundarios son más frecuentes cuando se emplean en dosis prolongadas y/o períodos prolongados de tiempo (54).

La dosis máxima tolerable es de 200 mg./kg., con la cual en algunos animales se observa incoordinación del tren posterior durante un período de tres a seis días, incluso ciertos animales bajan de peso. En general, este fármaco se caracteriza por una baja toxicidad en mamíferos, por lo que no se describen limitaciones para su administración, incluso en individuos jóvenes, enfermos o débiles (43). Otros bencimidazoles, como oxfendazol y albendazol, son teratogénicos y están contraindicados en animales con preñez temprana ya que pueden provocar malformaciones en fetos, así como embriotoxicosis (48). El período de retirada para TCBZ oscila entre 20-28 días en carnes (28).

2.1.2.6. Estudio de residuos

La determinación de los residuos de fármacos de uso veterinario en alimentos de origen animal (leche, carne, huevos y pescado) es importante, ya que garantiza la calidad y la seguridad del suministro de alimentos. Debido también a que los fármacos veterinarios constituyen una parte integral del manejo en la

producción agrícola, existe un riesgo potencial de encontrar residuos de ellos en los alimentos (9, 55).

Las estrategias para la detección de residuos de fármacos de uso veterinario se caracterizan por los siguientes aspectos (55, 56).

- Regulación en la detección de residuos según su importancia, desde el punto de vista toxicológico.
- Permisi3n de la regularizaci3n del manejo de la formulaci3n y dosificaci3n de fármacos antiparasitarios, con el fin de garantizar la seguridad de los alimentos, con la menor interferencia en el manejo de la producci3n ganadera.
- Utilizaci3n de métodos y sistemas analíticos, confiables y suficientemente sensibles.

En toda evaluaci3n de residuos en los alimentos es importante la determinaci3n del principio activo y los metabolitos trazadores. Para TCBZ lo son TCBZ y la suma de sus metabolitos sulfóxidos y sulfonas. Debido a la rápida metabolizaci3n hepática, el TCBZ es transformado a metabolito Sulfóxido y este último hacia Triclabendazol Sulfona.

El desarrollo de métodos para la detección de residuos en alimentos de origen animal se basa en determinar las concentraciones máximas tolerables en conformidad con los límites máximos de residuos permitidos, establecidos mediante estudios farmacocinéticos y toxicológicos de los diversos

medicamentos empleados como profilácticos y terapéuticos en animales de producción (57).

La adecuada validación de una metodología analítica para la detección de residuos debe ser capaz de obtener resultados confiables, identificando correctamente el analito de interés, de modo que permita adoptar medidas regulatorias que apoyen la implementación de programas de aseguramiento de calidad y control de residuos (55).

El análisis de residuos está regulado por las reglamentaciones establecidas por las diversas agencias de medicamentos estatales sobre fármacos veterinarios. En el caso de fármacos “no autorizados” en animales productores de alimento, se requiere del desarrollo de métodos analíticos con los límites de detección lo más bajos posibles. En cambio, para las sustancias “autorizadas”, para las que se ha establecido el límite máximo de residuo (LMR), la preocupación del análisis se relaciona con el desarrollo de métodos rápidos y definitivos con una adecuada sensibilidad para detectar el analito en concentraciones iguales o inferiores al LMR y su relación con el IDA (Ingesta diaria admisible). En el grupo de sustancias no autorizadas, el desarrollo de métodos con límites de detección siempre más bajos es, a menudo, utilizados con propósitos reguladores más que para establecer requisito de seguridad del alimento (28).

Las estrategias para el análisis de residuos de fármacos de uso veterinario se deben encausar a cubrir un amplio rango de compuestos que se pueden

constituir en residuos potenciales en el alimento, puesto que su aparición en ellos, además de ser un atributo negativo de la calidad, puede afectar el comercio internacional del producto (58). Normalmente, el análisis de residuos implica el desarrollo de un proceso netamente experimental, efectuado mediante estudios de laboratorio, que permiten medir, determinar y evaluar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, antes de implementar su uso rutinario. Esto involucra el desarrollo de un protocolo, que incluye la estimación de las medidas de precisión y exactitud aplicables a cualquier método analítico (55, 57). Los métodos analíticos deberían caracterizarse por ser rápidos, con alto rendimiento de procesamiento, rigurosos, baratos y sensibles (59).

2.1.2.7. Conceptos y metodología para la validación del método

La validación de un método analítico incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método en particular, sea confiable y reproducible por otros investigadores para la determinación cuantitativa de concentraciones de un analito en una matriz biológica determinada (60, 61).

Las características que debe cumplir todo método analítico para ser considerado adecuadamente válido, son las siguientes:

Especificidad: capacidad del método para reconocer inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que puedan estar presentes en la matriz que se va analizar. En el caso del método de extracción y determinación de fármacos en muestras biológicas mediante técnicas de HPLC, la especificidad se

determina comparando los resultados del análisis de muestras blancos que no contienen el analito y/o sus metabolitos, con los resultados de la muestra que solo contiene el analito en estudio y/o sus metabolitos. El procedimiento debe demostrar que no existen interferencias entre las posibles impurezas de la muestra y el analito (59).

Recuperación: se determina estableciendo la relación entre las áreas de los picos cromatográficos, existentes en las muestras de tejido sobrecargadas con concentraciones conocidas del analito en estudio, con las obtenidas de la inyección directa del estándar puro disuelto en un solvente apropiado. Los resultados se expresan en porcentajes (%).

Exactitud: es la diferencia entre el valor obtenido y el valor teórico, expresado como el error relativo o error medio (EM, %) para las distintas concentraciones del analito. La exactitud deberá establecerse dentro del rango especificado para el método. Los valores del error relativo aceptados suelen ser de un 15%, excepto para el límite de cuantificación donde se acepta hasta de un 20% (59).

Precisión: es la estimación de la variabilidad de las mediciones obtenidas de un muestreo múltiple, y se expresa como el coeficiente de variación (CV, %) de los resultados del análisis de varias muestras realizadas en diferentes días, “precisión intradía” y en distintos análisis hechos en un mismo día, “precisión intradía”.

Límite de detección (L.D): se define como la cantidad más pequeña de analito presente en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con

suficiente precisión y exactitud. Se determinó a partir de 10 veces su desviación estándar y dividido por el valor promedio de la pendiente (a) de las mismas rectas de calibración (62, 63).

Límite de cuantificación (L.C.): se define como la cantidad más pequeña de analito presente en una muestra que puede ser determinada con un método, aunque no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Se determinó a partir de la respuesta del blanco y constituye tres veces su desviación estándar y dividida por el valor promedio de la pendiente de las mismas rectas de calibración (62, 63).

Linealidad: es la capacidad del método, dentro de un rango determinado, para obtener valores que son directamente proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra.

Rango: es el intervalo entre la concentración o cantidad más alta y la más baja del analito, con lo cual se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene suficiente precisión, exactitud y linealidad.

2.1.2.8. Metodología para la detección de residuos

Varios métodos analíticos se han desarrollado para obtener los antecedentes anteriormente descritos. La cuantificación de residuos en el plasma y/o tejidos se ha basado en el uso de cromatografía líquida/ espectrometría de masa (CL/ MS) con uso de ionización química (64, 65).

La metodología utilizada para la detección de TCBZ, tanto en plasma como en tejidos y en heces, involucra pasos de purificación, extracción, limpieza cromatográfica, derivatización, y, finalmente, la fase de cromatografía líquida (CL) (66, 67). Estos métodos monitorean residuos y tienen un laborioso trabajo e inversión de tiempo; puesto que se requiere de grandes cantidades de solventes orgánicos y procedimientos de derivatización (68).

Varios de los métodos confirmatorios para la detección de residuos de fármacos de uso veterinario, tales como antibióticos y antiparasitarios, se realizan aún basados en el análisis HPLC, que a menudo usa procedimientos de identificación adicionales y más específicos. Sin embargo, las exigencias en relación con la detección de niveles de fármacos cada vez más bajos, ha contribuido al desarrollo de técnicas de cromatografía de gas (CG) sumadas a las de espectrometría de masa (MS), que sustentan aún más las técnicas confirmatorias y que asegurarán que estas tecnologías se conviertan en parte de los procedimientos habituales de confirmatoriedad para la detección de residuos de fármacos (69).

Muchos esfuerzos se han utilizado para el desarrollo de pruebas analíticas destinadas a la identificación rápida del potencial de residuo en animales positivos, que permitan a los inspectores identificar estos animales. Un método ideal para el análisis de un residuo, es que se debe desarrollar una técnica rápida de screening y otro método confirmatorio (58). Con el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, ésta meta se ha vuelto más cercana. Por ejemplo, el

aumento en la automatización, reforzó la sensibilidad, desarrolló la espectrometría de masa (MS), además, el uso de una mejor tecnología permite que el análisis, a través, de cualquier método y su procedimiento ya no sea tan complejo como lo fue anteriormente (68).

2.1.2.9. Determinación de los límites máximos de residuos (LMR) en tejidos

El Codex Alimentarius establece que el límite máximo de residuos (LMR) 250 µg./kg. hígado, 150 µg./kg. en riñón y 10 µg./kg. en leche, el riñón se debe considerar como un adecuado tejido blanco para la detección de residuos de TCBZ en bovinos. Tal LMR sirve como base para el cálculo de los períodos de resguardo en carne y tejidos comestibles, los que varían de acuerdo con la especie animal de que se trate y el tejido blanco analizado. En los casos en que el hígado no esté disponible, se debe considerar la grasa para el análisis de los metabolitos marcadores (70, 71).

Estudios de toxicidad en ratones han demostrado que la Dosis Letal 50 (DL50) de Triclabendazol es >5000 mg/kg de peso vivo, mientras que en conejos es de 206 mg./kg. Tales estudios toxicológicos permiten establecer la ingesta diaria admisible (IDA), la que corresponde a un valor estimado de la concentración de una sustancia química determinada, presente en un alimento, que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida, sin presentar efectos nocivos apreciables en la salud humana. El concepto de ADI ha sido desarrollado principalmente por la Organización Mundial de la Salud

(OMS) y FAO y deriva de estudios de toxicidad en animales de laboratorio. Este es de gran interés para productos químicos, tales como aditivos alimentarios, residuos de pesticidas y de fármacos veterinarios en alimentos (55).

Sobre la base de los efectos tóxicos no observados (NOEL)*, que para TCBZ no tiene efectos observables. Para el TCBZ, la ADI llega hasta 3 $\mu\text{g./kg./peso-vivo/día}$ (72).

El cálculo de la dosis diaria admisible (IDA) para los diferentes fármacos varía según las características farmacocinéticas de los mismos, con el fin de establecer los diferentes LMR (Cuadro 4) (19, 70, 72).

Cuadro 3. Límite máximo de residuos (LMR) establecido en tejidos blancos para el metabolito marcador de TCBZ

| Sustancia | Residuo Marcador | Especie Animal | LMR | Tejido Blanco |
|----------------|----------------------------|----------------|------------------------|---------------|
| Triclabendazol | La suma de sus metabolitos | Bovino | 300 $\mu\text{g./kg}$ | hígado |
| | | | 300 $\mu\text{g./kg}$ | riñón |
| | | | 100 $\mu\text{g./kg.}$ | grasa |

EMEA, 2004 (73); *FAO, 1993 (74).

Experimentos realizados en ganado bovino y ovino toleran dosis de hasta 100 mg./kg. , sin síntomas tóxicos. En ovinos, dosis orales únicas de $>100 \text{ mg./kg.}$ resultaron en pérdida de apetito y ligeros aumentos sanguíneos de úrea y alfa globulinas (75). Una sola dosis de 200 mg./kg. produjo inapetencia, pérdida transitoria de peso y ligeros disturbios motores. En todas las dosis investigadas (50, 100 y 200 mg./kg.) se observó un ligero aumento de peso del hígado. En general, el ganado tolera muy bien el Triclabendazol (76).

En general son muy raros los casos de intoxicaciones con Triclabendazol, debido sobre todo a su baja toxicidad, al amplio margen de seguridad y a la buena tolerancia en la mayoría de las especies. En caso de sobredosis masivas puede darse inapetencia, pérdida de peso y disturbios motores.

En producción ganadera, existe una fuerte necesidad de uso de antihelmínticos para el control efectivo del parasitismo. Sin embargo, la introducción en el mercado de nuevas formulaciones comerciales como la que contiene la asociación TCBZ para administración por vía oral y destinada al tratamiento del parasitismo gastrointestinal y hepático de los rumiantes, han llevado a considerar que el uso frecuente de estos fármacos, sumado a las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de ellos, posibilita la presencia de residuos en alimentos destinados al consumo humano (17).

Por ello y debido a que no existen antecedentes previos que permitan conocer la farmacocinética y el perfil de residuos de estos fármacos cuando se administran asociados en rumiantes, surge la necesidad de desarrollar estudios y métodos analíticos sensibles y confiables que entreguen información acerca de la biodisponibilidad y persistencia de las concentraciones sanguíneas de estos, así como también conocer el perfil de residuos en tejidos comestibles que permitan aportar antecedentes que orienten el establecimiento de los períodos de resguardo para esta formulación.

Sumado a lo anterior, no existe, por parte de los ganaderos y productores, una conciencia clara acerca del respeto adecuado de los períodos de resguardo establecidos para los fármacos antiparasitarios. Además, la imposibilidad de una regulación médico veterinaria continua, y la inexistencia de una reglamentación clara por parte de las autoridades relativo al control de residuos antiparasitarios en los alimentos, determinan que exista una alta probabilidad de que se puedan detectar residuos de estos antihelmínticos en los tejidos comestibles (77). Esto podría repercutir en la salud de los consumidores, especialmente para grupos de riesgo; entre ellos, los recién nacidos, lactantes, ancianos y deprimidos inmunológicamente, así como también personas especialmente intolerantes al fármaco.

2.2. BASE LEGAL

2.2.1. La Norma Técnica Peruana Leche y Productos Lácteos (NTP 202.001.2010)

2.2.1.1. Especificaciones de leche cruda. Requisitos

- La leche cruda que se tenga en depósito o se expendá deberá responder a las siguientes condiciones:

2.2.1.2. Características organolépticas normales

- Color, olor, sabor, consistencia. Debe estar exenta de características organolépticas extrañas a su naturaleza.

2.2.1.3-Aspectos físico-químicos

- Sólidos Totales mínimo de 11,4%.
- Grasa 3,2%.
- Sólidos no grasos (SNG) 8,2%.
- Debe poseer una acidez mínima de 0,13%, un máximo de 0,2%.
- Densidad a 15 °C mínima de 1,0296 g./ml., un máximo de 1,0340 g./ml.
- Prueba del alcohol (74° v./v.) no coagulable.
- Debe poseer un índice crioscópico máximo de -0,540 °C.
- Ceniza total de 0,7%.
- Células somáticas 500 000 células somáticas/ml.
- Prueba de la reductasa (azul de metileno), mínimo 4 horas.

2.2.1.4. Aspectos microbiológicos

- Un número máximo de 1 000 000 de unidades formadoras de colonia/ml. (ufc./ml.) gérmenes aerobios mesófilos y facultativos.
Coliformes 1000 ufc./ml.

2.2.1.5. Contaminantes

- Reacción negativa al Copan Test (CMT) y/o Snap.
- Ausencia de conservantes.
- Ausencia de pesticidas.
- Ausencia de aflatoxinas.

- Ausencia de antiparasitarios (78).

2.2.2. La Ley 26842 de Salud

- I.** La salud es una condición indispensable para el desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo.
- II.** La protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla.
- III.** Toda persona tiene derecho a la protección de su salud en los términos y condiciones que establece la ley. El derecho a la protección de la salud es irrenunciable.
- IV.** La salud pública es responsabilidad primaria del Estado. La responsabilidad en materia de salud individual es compartida por el individuo, la sociedad y el Estado.
- V.** El financiamiento del Estado se orienta preferentemente a las acciones de salud pública y a subsidiar total o parcialmente la atención médica a las poblaciones de menores recursos, que no gocen de la cobertura de otro régimen de prestaciones de salud, ya sea público o privado.

- VI.** La norma de salud es de orden público y esta regula por la materia sanitaria, así como la protección del ambiente para la salud y la asistencia médica para la recuperación y rehabilitación de la salud de las personas.
- VII.** El Estado promueve la investigación científica y tecnológica en el campo de la salud, así como la formación, capacitación y entrenamiento de recursos humanos para el cuidado de la salud.
- VIII.** El Estado promueve la educación en salud en todos los niveles y modalidades.

Art. 5°.- Toda persona tiene derecho a ser debida y oportunamente informada por la Autoridad de Salud sobre las medidas y prácticas de higiene, dieta adecuada, salud mental, salud reproductiva, enfermedades transmisibles, enfermedades crónicas degenerativas, diagnóstico precoz de enfermedades y demás acciones conducentes a la promoción de estilos de vida saludable. Tiene derecho a recibir información sobre los riesgos que ocasiona el tabaquismo, el alcoholismo, la drogadicción, la violencia y los accidentes.

Art. 18°.- Toda persona es responsable frente a terceros por el incumplimiento de las prácticas sanitarias y de higiene, destinadas a prevenir la aparición y propagación de enfermedades transmisibles, así como por los actos o hechos que originen contaminación del ambiente.

Art. 106°.- Cuando la contaminación del ambiente signifique riesgo o daño a la salud de las personas, la Autoridad de Salud de nivel nacional dictará las medidas de prevención y control indispensables para que cesen los actos o hechos que ocasionan dichos riesgos y daños (79).

2.2.3. Decreto Supremo N° 015-98-AG. Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales

Capítulo III Especificaciones Técnicas para el Registro de Productos Veterinarios y Alimentos.

Art. 18°.- El expediente para registro de productos farmacológicos deberá contener los siguientes datos:

- a) Nombre comercial de producto.
- b) Establecimiento solicitante.
- c) Establecimiento elaborador.
- d) Forma farmacéutica.
- e) Fórmula cualicuantitativa de principio activo y componentes del excipiente.

- f) Proceso de fabricación del producto: resumen del modo de elaboración, indicar según el caso pH, viscosidad, peso específico, controles de estabilidad y otros.
- g) Presentación del envase y sistema de inviolabilidad.
- h) Método de Control y Evaluación: Biológico, Microbiológico, Químico, Físico, Físico-químico.
- i) Indicaciones de uso: especies a las que se destina. Indicar a su vez si se usa antibacterianos, indicar los agentes susceptibles.
- j) Duración máxima: cuando es un producto que se reconstituye.
- k) Dosificación preventiva y terapéutica, intervalo entre dosis, duración mínima de los tratamientos, margen seguridad.
- l) Farmacocinética y farmacodinamia del producto.
- m) Efectos colaterales, incompatibilidad y antagonismo farmacológico.
Especificar las precauciones para su uso.
- n) Intoxicación, sobredosis y antídoto.
- o) Efectos biológicos no deseados: Teratógeno, mutagénico u otros efectos (deberá adjuntarse la literatura al respecto).
- p) Controles sobre residuos: límite máximo de residuos (LMR), ingesta diaria admisible (IDA), período de retiro (si se trata de una asociación la suspensión será al principio o cuyo período sea mayor)
- q) Conservación correcta del producto.
- r) Vencimiento: fecha de expiración.
- s) Etiquetas y prospectos.
- t) Ensayos experimentales.

Asimismo, en el Título III, De la Producción de Alimentos y Bebidas, Capítulo I, De los alimentos de origen animal, en cuyos artículos 16 y 17 se menciona:

Art. 17°.- Producción de leche. La producción de leche en establos deberá efectuarse cumpliendo las normas de sanidad animal que dicta el Ministerio de Agricultura.

Art. 18°.- Calidad sanitaria e inocuidad de la leche. Los parámetros de calidad sanitaria e inocuidad de la leche se establecen en la norma sanitaria que el Ministerio de Salud expide para cada tipo de producto lácteo (32) .

2.2.4. El Codex Alimentarius

En su base de datos en línea del Codex sobre los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos para el triclabendazol establece los siguientes parámetros (71).

- | | | | |
|---|---------------|---------|-------------|
| - | Vacuno / Vaca | Músculo | 250 µg./kg. |
| - | Vacuno / Vaca | Hígado | 850 µg./kg. |
| - | Vacuno / Vaca | Riñón | 400 µg./kg. |
| - | Vacuno / Vaca | Grasa | 100 µg./kg. |

2.2.5.Reglamento de Ejecución (UE) no 222/2012

Triclabendazol (80).

- 100 µg./kg. Grasa
- 250 µg./kg. Hígado
- 150 µg./kg. Riñón

- 10 µg./kg. Leche

III-HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

H- La leche fresca y el queso mantecoso que se expenden para el consumo humano en el distrito de Cajamarca presentan residuos de Triclabendazol y Sulfóxido de Triclabendazol.

HO- La leche fresca y el queso mantecoso que se expenden para el consumo humano en el distrito de Cajamarca no presentan residuos de Triclabendazol y Sulfóxido de Triclabendazol.

IV. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

- Determinar la presencia de residuos de Triclabendazol y su Metabolito Sulfóxido de Triclabendazol en leche y queso mantecoso que se expenden para el consumo humano mediante HPLC en el distrito de Cajamarca
- Estandarizar y validar la metodología analítica para la cuantificación de Triclabendazol y su Metabolito Sulfóxido en leche fresca y queso mantecoso que se expenden para el consumo humano mediante HPLC en el distrito de Cajamarca.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Material de vidrio

- Vasos de precipitación
- Tubos de ensayo
- Probetas
- Pipetas aforadas
- Pipetas volumétricas
- Buretas
- Matraces de Erlen Meyer
- Matraces aforados

5.1.2. Reactivos

- Buffer fosfato 0,025 M; pH=3; calidad HPLC.
- Metanol calidad HPLC (MeOH).
- Acetato de amonio.
- Aceto nitrilo (ACN).
- aMilli-Q-agua (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) a grado HPLC.
- Estándar de Triclabendazol y Triclabendazol Sulfóxido.

5.1.3. Equipo de laboratorio

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia: HPLC Agilent 1100 con detector UV e inyector automático.
- PU-2080 plus HPLC pump, Desgasys Populaire.

- Detector: UV/Vis – 2075 plus (Fotomultiplicador) Jeringa: Tipo Hamilton, apreciación: 2 μ l.
- Columna de acero inoxidable (C18). Longitud: 150 mm. Diámetro interno: 4,6 mm. y tamaño de partícula: 5 (μ m.).
- Ultracentrífuga refrigerada Beckman Coulter Optima L-90K.
- Centrífuga angular CENCOM para 6 tubos de 15 ml. Velocidad máxima 4 000 rpm.
- La balanza Ohaus Scout Pro SPU2001 tiene un rango de pesaje de 2 000 a 0,1 g.
- Agitador magnético termostatzado JENWAY 1 200 con placa calefactora y agitador magnético que alcanza hasta 300 °C y 12 000 rpm.
- Agitador *vórtex velp scientifica*. Una pipeta rotulada P-20 mide entre 2 l. y 20 l. μ l.
- Pipeta de precisión P-200 (20 μ l y 200 l.) μ l.
- Pipeta de precisión P-1000 mide entre 200 μ l y 1.000 l. μ l 0,2 y 1,0 ml.

5.2. Método

5.2.1. Localización

La presente investigación se ejecutó en la ciudad de Cajamarca, en el distrito del mismo nombre, perteneciente al departamento de Cajamarca. Está ubicado en la zona norandina del Perú. Su relieve es bastante accidentado. Está constituido por zonas de costa, sierra y selva. Cuenta con una extensión territorial de 33 317,54 km².

La base productiva del distrito de Cajamarca es principalmente agropecuaria, la principal actividad económica de la Región es la Agricultura (en la que se encuentra inmersa la actividad agropecuaria); sin embargo, su participación en el PBI regional ha disminuido en los últimos años ante el crecimiento de la actividad minera, principalmente.

De acuerdo con los datos disponibles del Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI - III Censo Nacional Agropecuario 1994, la región Cajamarca posee la mayor población de ganado bovino de todo el Perú, con 604 699 cabezas; asimismo, existen 355 749 ovinos, 500 205 cabezas de ganado equino, 183 616 porcinos y 89 196 caprinos. Sobre todo ello, la crianza de ganado bovino es la de mayor repercusión económica. Esta se encuentra distribuida en 128 175 unidades agropecuarias, lo que representa el 63,71 % de las unidades existentes. El promedio de bovinos por productor es de 5 cabezas; existiendo un 36,73 % de vacas, 11,09 % vaquillonas, 23,02 % terneros y terneras, 20,62 % toros, 5,74 % toretes y un 2,80 % bueyes, correspondiendo a razas puras el 17,62 % y un 82,38 % a bovinos de tipo criollo. Las características meteorológicas y climáticas promedio en el distrito de Cajamarca son: Clima templado a seco, Altitud: 2 750 m.s.n.m. Precipitación pluvial: 801 mm. (promedio anual) y Humedad relativa: 68, 92% (promedio anual) (81).

5.2.2. Unidad de análisis, universo y muestra

5.2.2.1. Unidad de Análisis:

Las muestras de leche y queso mantecoso fueron obtenidas de cada uno de los puntos de expendio de venta de leche, fijos, distribuidos en los diferentes barrios de la ciudad de Cajamarca (Anexo 2).

5.2.2.2. Universo y muestra

La totalidad de los puntos de expendio de leche fresca que son 25 (Anexo 2), y de 29 puntos de expendio de queso mantecoso (Anexo 3), todos localizados en el radio de zona urbana del distrito de Cajamarca. El número de muestras fue igual al número de puestos de expendio de leche y queso.

5.2.3. Tipo de estudio

Es un estudio descriptivo explicativo y analítico, porque se identificarán, describirán explicarán las características sanitarias de cada muestra mediante el análisis de HPLC.

5.2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

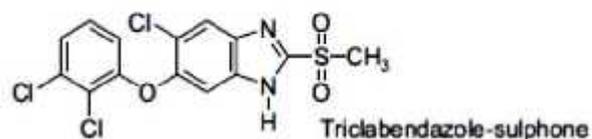
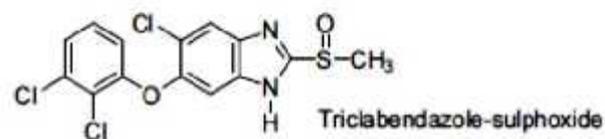
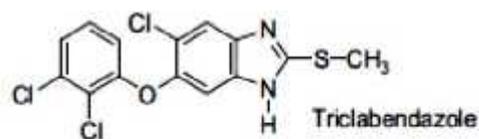
5.2.4.1. Muestreo

La recolección de la muestra se realizó entre febrero y abril de 2013. Se obtuvo 200 ml. de leche fresca (Anexo 2) y 200 g. de queso mantecoso de cada punto de expendio (Anexo 3). Las muestras fueron colectadas en recipientes estériles, es decir, se ha tenido en cuenta que las medidas de higiene sean las adecuadas, las muestras rotuladas con el nombre de la persona que expende, dirección de donde se expende y el lugar de procedencia. Luego fueron depositadas en una heladera portátil con gel congelado y trasladadas al laboratorio para su análisis respectivo de acuerdo con la técnica de cada determinación. Las muestras luego se procesaron en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

5.2.5. Preparación de soluciones estándar

5.2.5.1. Reactivos

Los patrones de TCBZ y TCBZSO fueron proporcionados por BAYOMED HEALTH PERU S.A. provenientes de analytical standard VETRANAL™.



La
de
principales

figura. 2. Las
estructuras químicas
TCB, sus metabolitos

5.2.5.2. Soluciones primarias de TCBZ y TCBZSO (5 µg/µL)

Las soluciones fueron preparadas mediante el pesaje de 50 mg. de TCBZ y TCBZSO en balanza analítica. Posteriormente el fármaco fue transferido a un matraz volumétrico de 10 ml., completando el volumen con metanol.

5.2.5.3. Soluciones secundarias de trabajo de TCBZ y TCBZSO

Estas soluciones de trabajo se prepararon a partir de la solución primaria de cada analito, para obtener las soluciones secundarias a las concentraciones de 0,5, 1,0, 5,0, 10, 15, 25 y 50 µg./ml. en metanol.

5.2.5.4. Procedimiento de extracción de Triclabendazol desde la leche y queso

Rectas de calibración: Cada recta de calibración se elaboró con muestras libres de fármaco leche y queso (1 ml. y 1 g., respectivamente), sobrecargadas con Triclabendazol y Sulfóxido de Triclabendazol para

obtener concentraciones de 0,5, 1,0, 5,0, 10, 15, 25 y 50 µg./ml., (Anexo, Cuadro 1).

5.2.5.5-Procesamiento de las muestras:

Se tomó 1 ml. de muestras problema (1 ml. de leche o un 1 g. de queso) y 1 ml. de Acetonitrilo (ACN) (1g. / 1 ml.), se agitó la muestra en vórtex durante 10 segundos. Luego la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 14 000 rpm.; después se extrajo el sobrenadante y se agregó 2,5 ml. de H₂O grado HPLC.

Esta mezcla fue sometida a extracción en fase sólida mediante columnas ODS LC18 previamente acondicionadas con 500 ml. de metanol y 500 ml. de H₂O (HPLC). Después de agregar la muestra, esta fue lavada con 1 ml. de H₂O; se dejó secar el cartucho por 5 minutos y se eluyó la molécula con 2 ml. de metanol. Luego el eluido se evaporó y se reconstituyó con 300 ml. de fase móvil y se inyectaron 100 ml. directamente al sistema cromatográfico.

5.2.5.6. Condiciones Cromatográficas:

La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de acetonitrilo - acetato de amonio 0,025 M pH: 6,6 (60:40 v/v) siendo bombeada a un flujo de 1,2 ml./min. A través de una columna Octadecilsilan (C18) (5 µm; 4,6 mm. x 150 mm.). Se empleó un sistema de detección por luz ultravioleta (UV) a longitud de onda de 300 nm.

5.2.6-Parámetros de validación de la metodología Analítica

La validación de los métodos analíticos se realizó según las recomendaciones de EMEA (72) y Shah et al. (59), en muestras por triplicado, en las que se determinó la especificidad, la linealidad y la precisión.

La **especificidad** se define como la capacidad del método para reconocer inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que puedan estar presentes en la muestra, como, por ejemplo, impurezas y productos de degradación, y se determinó comparando cromatogramas de muestras de leche y queso libres de fármaco con cromatogramas de muestras TCBZ y TCBZO.

La recuperación del fármaco se calculó estableciendo la relación entre las áreas de los picos cromatográficos existentes en las muestras de leche y queso sobrecargadas con concentraciones conocidas del analito en estudio, con las obtenidas de la inyección directa del estándar puro disuelto en un solvente apropiado. Los resultados se expresan en porcentajes (%).

La **linealidad** se determinó mediante la inyección de muestras de tejido sobrecargadas con concentraciones crecientes del analito en estudio y en quintuplicado. Las rectas de calibración fueron determinadas mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados, representando las

concentraciones de fármaco en el eje de las abscisas y el área de los picos cromatográficos en el de las ordenadas. La linealidad se expresa mejor a través de la ecuación de la recta:

$$y = ax + b$$

Donde:

y = es la respuesta del detector expresada en área o relación de área a = es la pendiente de la curva de calibración.

x = es la concentración de analito en la muestra b = es el intercepto de la curva de calibración.

La **precisión** se refiere más bien a la imprecisión que corresponde, aproximadamente, a los términos **dispersión** y **variabilidad** analítica. La imprecisión se determina haciendo ensayos repetitivos de una misma muestra analítica, o de cada conjunto de muestras analíticas, y, luego, se calcula la desviación estándar. En este caso es muy importante la homogeneidad del sustrato.

La precisión tiene la desventaja que requiere que los valores se distribuyan normalmente, que se enfaticen los valores extremos de una serie de mediciones y que en muchos métodos aumenta la desviación estándar cuando aumenta la concentración. Para evaluar datos de un amplio rango de concentración es más útil calcular la desviación estándar relativa (RSD) o bien el coeficiente de variación por ciento (CV%). La precisión está relacionada con la disposición de las medidas alrededor de su valor medio o

central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La **exactitud** es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real. La inexactitud es la diferencia numérica entre el valor promedio de un conjunto de repeticiones y el valor verdadero. En la práctica, la cercanía a un estándar de algún tipo se toma como medida de exactitud. En la presente tesis se consideró la exactitud de muestras de leche y queso, libres de Triclabendazol, a los cuales se les añadió el analito marcador.

El límite de cuantificación (L.C.), se define como la cantidad más pequeña de analito presente en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con suficiente precisión y exactitud. Se determinó a partir de 10 veces su desviación estándar y dividido por el valor promedio de la pendiente (a) de las mismas rectas de calibración (62, 63).

| |
|-----------------------------|
| Límite de cuantificación |
| $L.C. = 10*(D.S) / a$ |

El límite de detección (L.D) se define como la cantidad más pequeña de analito presente en una muestra que puede ser determinada con un método, aunque no necesariamente cuantificada como un valor exacto. Se determinó

a partir de la respuesta del blanco, y constituye tres veces su desviación estándar y dividido por el valor promedio de la pendiente de las mismas rectas de calibración (62, 63).

| |
|------------------------|
| Límite de detección |
| $L.D. = 3*(D.E.b) / a$ |

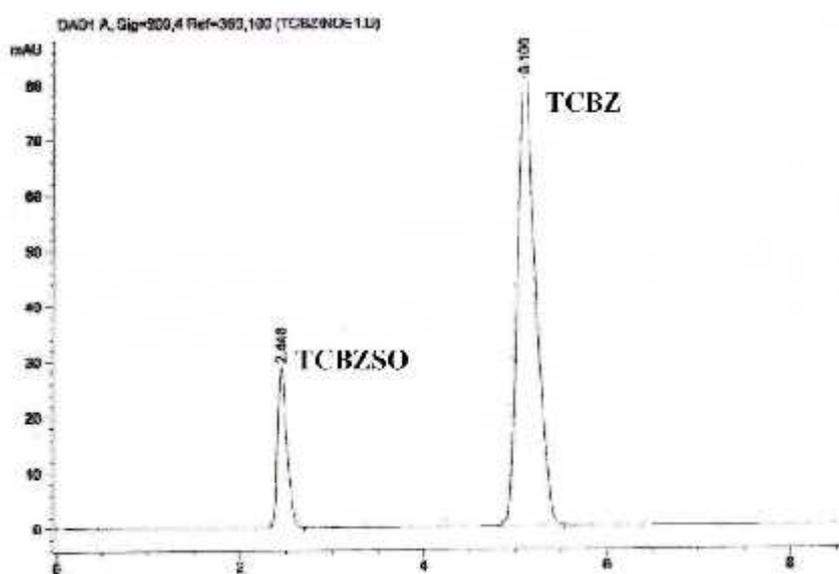
5.2.7. Validación de la Metodología Analítica

En este trabajo, la validación de los métodos analíticos se llevó a efecto siguiendo las recomendaciones descritas por la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA, 1998). Los valores de coeficiente de correlación (R^2), Desviación estándar (DS), Desviación estándar relativa (DSR) y error medio (EM) de las variables analizadas estuvieron dentro de los límites aceptado para la adecuada validación de una técnica analítica (Hasta 15%, excepto en el límite de cuantificación donde se aceptan valores de hasta $\pm 20\%$).

La validación de una metodología analítica es un proceso netamente experimental, y efectuada mediante estudios de laboratorio, que permiten medir, determinar y evaluar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, antes de implementar su uso rutinario. Esto involucra el desarrollo de un protocolo que incluye la estimación de las medidas de linealidad, precisión y exactitud, aplicables a cualquier método analítico (82).

La fase móvil resolvió los residuos de Triclabendazol y Triclabendazol Sulfóxido con gran eficiencia, con un tiempo de retención inferior a 10 minutos. Los cromatogramas típicos de la preparación estándar y de la preparación de muestra se muestran en la Figura 2.

Figura 2. Cromatograma típico de Triclabendazol Sulfóxido y Triclabendazol



5.2.7.1. Linealidad

5.2.7.1.1. TCBZSO

Se determinó preparando soluciones con un contenido de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de Triclabendazol Sulfóxido e inyectando cada una de ellas por triplicado en un sistema HPLC.

Las áreas pico se indican en el Cuadro 4. A partir de la pendiente de resultados se calcularon los coeficientes de interceptación y de correlación (R^2). Al aplicar el método propuesto, se siguió la linealidad en el rango de concentración de 0,5 $\mu\text{g./ml.}$ – 25 $\mu\text{g./ml.}$, y el coeficiente de correlación 0,9998 indica una buena linealidad entre la concentración y el área pico. El valor de la pendiente 12,156 indica la sensibilidad del método HPLC.

Cuadro 4. Niveles de concentración de TCBZSO y promedios de áreas pico

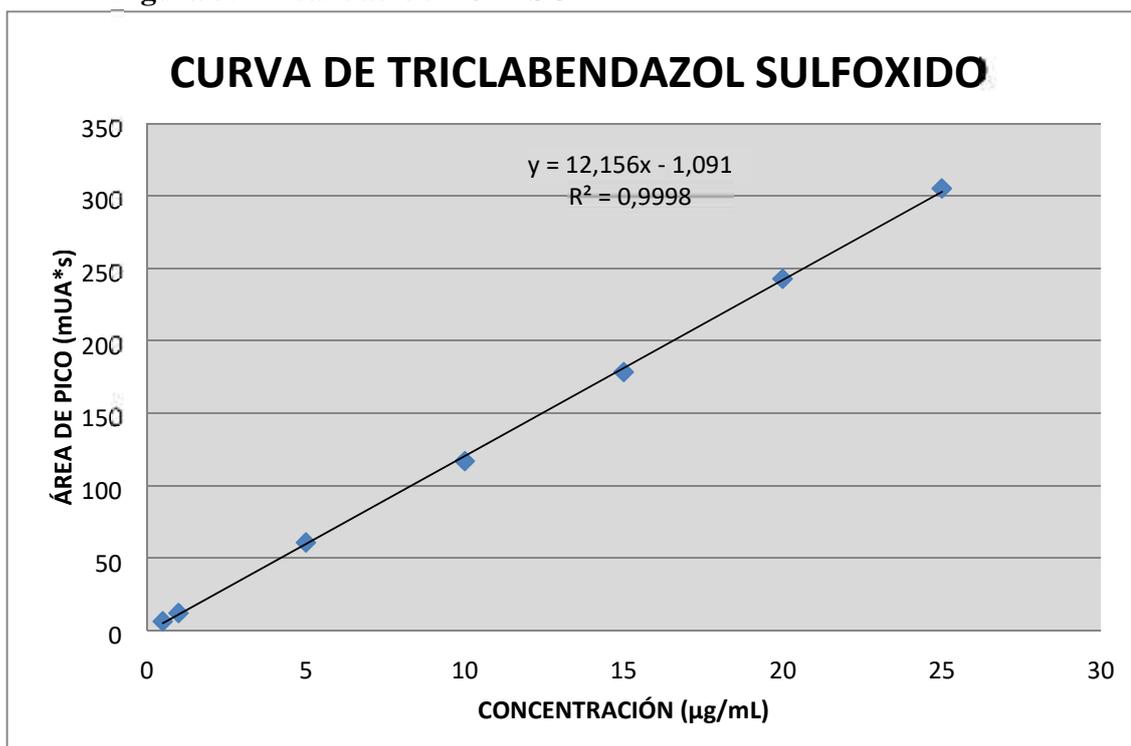
| NIVEL | CONCENTRACIÓN $\mu\text{g./ml.}$ | ÀREA PICO (mUA*s) |
|-------|----------------------------------|-------------------|
| 1 | 0,5 | 6,30993 |
| 2 | 1 | 12,02362 |
| 3 | 5 | 60,79297 |
| 4 | 10 | 116,95686 |
| 5 | 15 | 178,39948 |
| 6 | 20 | 242,76341 |
| 7 | 25 | 305,05001 |
| 8 | 50 | 615,45720 |

Coefficiente de correlación: 0,9998.

Pendiente: 12,156.

Intersección: -1,091

Figura 3. Linealidad de TCBZSO.



5.2.7.1.2. TCBZ

La linealidad de Triclabendazol se determinó preparando soluciones con un contenido de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 µg./ml. de Triclabendazol e inyectando cada una de ellas por triplicado en un sistema HPLC.

Las áreas pico se indican en el Cuadro 5. A partir de la pendiente de resultados se calcularon los coeficientes de interceptación y de correlación (R^2). Al aplicar el método propuesto, se siguió la linealidad en el rango de concentración de 0,5 µg./ml. – 50 µg./ml., y el coeficiente de correlación 0,9998 indica una buena linealidad entre la concentración y el área pico. El valor de la pendiente 13,775 indica la sensibilidad del método HPLC.

Cuadro 5. Concentración de TCBZ y promedio de áreas pico.

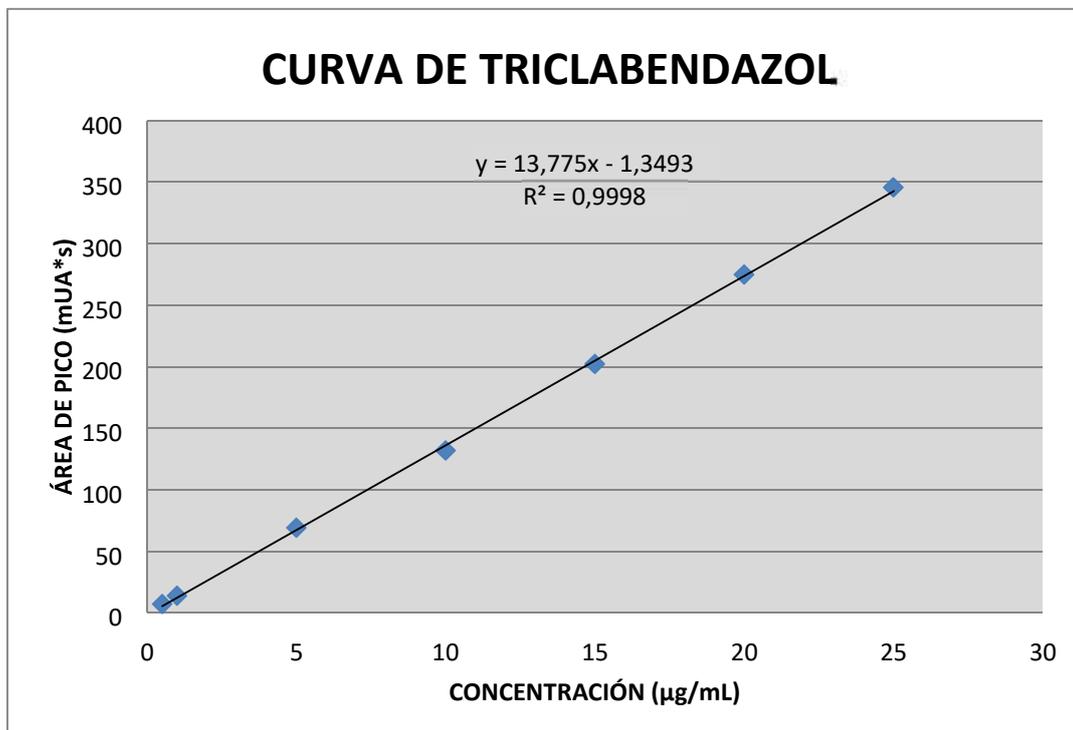
| NIVEL | CONCENTRACIÓN $\mu\text{g./ml.}$ | ÁREA PICO (mUA*s) |
|--------------|--|--------------------------|
| 1 | 0,5 | 6,92329 |
| 2 | 1 | 13,71604 |
| 3 | 5 | 69,00175 |
| 4 | 10 | 131,89573 |
| 5 | 15 | 202,23515 |
| 6 | 20 | 274,85584 |
| 7 | 25 | 345,71049 |
| 8 | 50 | 786,83362 |

Coefficiente de correlación: 0,9998

Pendiente: 13,775

Intersección: -1,3493

Figura 4. Linealidad de TCBZ.



5.2.7.2. Precisión del sistema

5.2.7.2.1. TCBZSO

Se realizaron inyecciones repetidas de preparación estándar única en el sistema HPLC. Se determinaron las áreas y el tiempo de retención de la inyección de TCBZO. Los resultados se indican en el Cuadro 6, los valores de la desviación estándar relativa (DSR) son inferiores al 2%, lo que confirma la precisión del sistema analítico.

Cuadro 6. Resultados del estudio de precisión del sistema para TCBZSO.

| Ensayo | Concentración (µg./ml.) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada (µg./ml.) | Cantidad recuperada | | Desviación estándar | Desviación relativa (%) |
|--------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| | | | | Promedio | Desviación estándar | | |
| 1 | 5 (50%) | 60,7931 | 5,0748 | 101,497 | 101,496 | 0,0065 | 0,0064 |
| | | 60,7891 | 5,0745 | 101,489 | | | |
| | | 60,7967 | 5,0751 | 101,503 | | | |
| | | 116,7532 | 9,8331 | 98,331 | | | |
| 2 | 10 (100%) | 117,4577 | 9,8930 | 98,929 | 98,504 | 0,3709 | 0,3765 |
| | | 116,6597 | 9,8251 | 98,251 | | | |
| | | 178,2350 | 15,0608 | 100,406 | | | |
| 3 | 15 (150%) | 178,3509 | 15,0707 | 100,471 | 100,499 | 0,1096 | 0,1091 |
| | | 178,6126 | 15,0929 | 100,619 | | | |
| | | Promedio | | 100,166 | | | |
| | | DS | | 1,334 | | | |
| | | DSR | | 1,331 | | | |

5.2.7.2.2. TCBZ

Se realizaron inyecciones repetidas de preparación estándar única en el sistema

HPLC. Se determinaron las áreas y el tiempo de retención de la inyección de Triclabendazol los resultados se indican en el Cuadro 7. Los valores de la desviación estándar relativa (DSR) son inferiores al 2%, lo que confirma la precisión del sistema analítico.

Cuadro 7. Resultados del estudio de precisión del sistema para TCBZ.

| Ensayo | Concentración (µg./ml.) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada (µg./ml.) | Cantidad recuperada (%) | Promedio (%) | Desviación estándar | Desviación estándar relativa (%) |
|----------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------|---|
| | | | | (98,0%102,0%) | | | (2,0%) |
| 1 | 5 | 68,9205 | 5,0870 | 101,741 | 101,8628 | 0,229 | 0,225 |
| | (50%) | 68,9066 | 5,0860 | 101,719 | | | |
| | | 69,1781 | 5,1064 | 102,128 | | | |
| 2 | 10 | 131,7018 | 9,7992 | 97,991 | 98,1372 | 0,232 | 0,236 |
| | (100%) | 132,2516 | 9,8404 | 98,404 | | | |
| | | 131,7339 | 9,8016 | 98,016 | | | |
| 3 | 15 | 201,7380 | 15,0558 | 100,372 | 100,6209 | 0,231 | 0,229 |
| | (150%) | 202,6497 | 15,1243 | 100,828 | | | |
| | | 202,3178 | 15,0993 | 100,662 | | | |
| | | | Promedio | 100,207 | | | |
| | | | DS | 1,655 | | | |
| | | | DSR | 1,651 | | | |

5.2.7.3. Exactitud

5.2.7.3.1. TCBZSO en leche

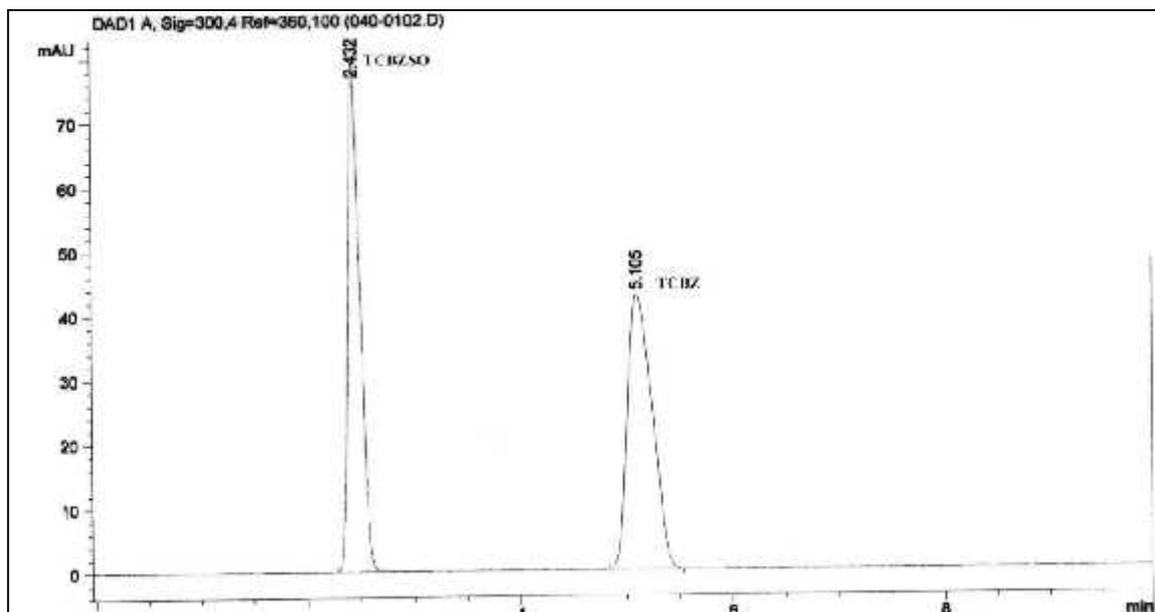
La exactitud se midió con tres niveles de concentración (0,8-1 y 1,2 µg./ml.). Se añadieron a muestras de leche libre de medicamentos cantidades conocidas de Triclabendazol (TCBZO), en un rango de 0,8 a 1,2 µg./ml. y se sometieron al procedimiento de extracción descrito para estos analitos.

Los porcentajes de recuperación fluctuaron entre el 98 y el 102 %, lo que confirma la exactitud del sistema analítico.

Cuadro 8. Resultados del análisis de recuperación para TCBZSO en leche.

| Ensayo | Concentración (µg./ml.) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada (µg./ml.) | Cantidad recuperada | | Desviación estándar | Desviación estándar relativa (%) (2,0%) |
|--------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------|------------------------|--|
| | | | | (%) (98,0%- 102,0%) | (%) | | |
| 1 | 0,8 (80%) | 9,413 | 0,814 | 101,711 | | | |
| | | 9,165 | 0,792 | 99,010 | 99,909 | 1,561 | 1,562 |
| | | 9,165 | 0,792 | 99,004 | | | |
| 2 | 1 (100%) | 11,406 | 0,987 | 98,739 | | | |
| | | 11,762 | 1,018 | 101,845 | 100,146 | 1,573 | 1,571 |
| | | 11,534 | 0,999 | 99,856 | | | |
| 3 | 1,2 (120%) | 13,643 | 1,182 | 98,533 | | | |
| | | 13,725 | 1,189 | 99,127 | 99,939 | 1,944 | 1,945 |
| | | 14,142 | 1,22588 | 102,157 | | | |
| | | | Promedio | 99,998 | | | |
| | | | DS | 1,478 | | | |
| | | | DSR | 1,478 | | | |

Figura 5. Figura 1. Cromatograma típico de triclabendazol Sulfóxido y triclabendazol.



5.2.7.3.2. TCBZ en leche

La exactitud de TCBZ en leche se midió con tres niveles de concentración (0,8-1 y 1,2 $\mu\text{g./ml.}$). Se añadieron a muestras de leche libre de medicamentos cantidades conocidas de Triclabendazol (TCBZ), en un rango de 0,8 a 1,2 $\mu\text{g./ml.}$, y se sometieron al procedimiento de extracción descrito para estos analitos.

Los porcentajes de recuperación fluctuaron entre el 98 y el 102 %, tal como se muestran en el Cuadro 9, además de tener una desviación estándar menor al 2% y una desviación estándar relativa menor al 2%.

Cuadro 9. Resultados del análisis de recuperación para TCBZ en leche.

| Ensayo | Concentración ($\mu\text{g./ml.}$) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada ($\mu\text{g./ml.}$) | Cantidad recuperada (%) (98,0%102,0%) | Promedio (%) | Desviación estándar | Desviación estándar relativa (%) (2,0%) |
|----------|---|-------------------------|--|--|-----------------|------------------------|---|
| 1 | 0,8 | 10,2076 | 0,7996 | 99,955 | 99,209 | 0,706 | 0,711 |
| | 80%) | 10,1153 | 0,7930 | 99,119 | | | |
| | | 10,0526 | 0,7884 | 98,552 | | | |
| 2 | 1 | 13,2618 | 1,0208 | 102,083 | 101,266 | 1,140 | 1,126 |
| | (100%) | 13,2164 | 1,0175 | 101,753 | | | |
| | | 12,9691 | 0,9996 | 99,963 | | | |
| 3 | 1,2 | 15,9137 | 1,2129 | 101,073 | 99,472 | 1,528 | 1,536 |
| | (120%) | 15,4092 | 1,1763 | 98,028 | | | |
| | | 15,6226 | 1,1918 | 99,316 | | | |
| Promedio | | | | 99,982 | | | |
| DS | | | | 1,405 | | | |
| DSR | | | | 1,405 | | | |
| Cv | | | | 0,014 | | | |

5.2.7.3.3. TCBZSO en queso

La exactitud se midió con tres niveles de concentración (0,8-1 y 1,2 $\mu\text{g./ml.}$). Cada una se realizó por triplicado. Se añadieron a muestras de queso libre de medicamentos cantidades conocidas de TCBZSO, en un rango de 0,8 a 1,2 $\mu\text{g./ml.}$, y se sometieron al procedimiento de extracción descrito para estos analitos. Los valores obtenidos se encuentran dentro del límite de estándar de entre 98-102%, lo que valida la exactitud del método propuesto.

Cuadro 10. Resultados del análisis de recuperación para TCBZSO en queso mantecoso.

| Ensayo | Concentración (µg./ml.) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada | | | Desviación estándar relativa (%) (2,0%) | |
|---------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|--|-------|
| | | | Cantidad recuperada (µg./ml.) | Promedio (%) | Desviación estándar (%) | | |
| 1 | 0,8 (80%) | 7,9839 | 0,812 | 101,451 | 100,099 | 1,172 | 1,171 |
| | | 7,8116 | 0,795 | 99,356 | | | |
| | | 7,8228 | 0,796 | 99,492 | | | |
| 1 2 (100%) | | 9,9454 | 1,003 | 100,246 | 99,842 | 0,659 | 0,661 |
| | | 9,9406 | 1,002 | 100,194 | | | |
| | | 9,8256 | 0,991 | 99,081 | | | |
| 3 | 1,2 (120%) | 11,866 | 1,189 | 99,115 | 100,066 | 0,909 | 0,909 |
| | | 11,995 | 1,202 | 100,158 | | | |
| | | 12,089 | 1,211 | 100,927 | | | |
| Promedio | | | 100,003 | | | | |
| DS | | | 0,821 | | | | |
| DSR | | | 0,821 | | | | |

5.2.7.3.4. TCBZ en queso

La exactitud se midió con tres niveles de concentración (0,8-1 y 1,2 µg./ml.). Se añadieron a muestras de queso libre de medicamentos cantidades conocidas de TCBZ, en un rango de 0,8 a 1,2 µg./ml., y se sometieron al procedimiento de extracción descrito para estos analitos. Los valores obtenidos se encuentran dentro del límite de estándar de entre 98-102%, lo que valida la exactitud del método propuesto.

Cuadro 11. Resultados del análisis de recuperación para TCBZ en queso mantecoso.

| Ensayo | Concentración (µg./ml.) | Área pico (mua*s) | Cantidad recuperada (µg./ml.) | Cantidad recuperada (%) (98,0%102,0%) | Promedio Desviación (%) | Desviación estándar | Desviación estándar relativa (%) (2,0%) |
|----------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|--|-------------------------|---------------------|---|
| 1 | 0,8 (80%) | 8,6904 | 0,8029 | 100,359 | 98,979 | 1,302 | 1,315 |
| | | 8,4303 | 0,7822 | 97,775 | | | |
| | | 8,5337 | 0,7904 | 98,802 | | | |
| 2 | 1 (100%) | 11,167 | 0,9998 | 99,981 | 101,634 | 1,511 | 1,487 |
| | | 11,419 | 1,0198 | 101,977 | | | |
| | | 11,540 | 1,0294 | 102,944 | | | |
| 3 | 1,2 (120%) | 13,814 | 1,2102 | 100,852 | 99,319 | 1,797 | 1,809 |
| | | 13,649 | 1,1972 | 99,763 | | | |
| | | 13,284 | 1,1681 | 97,342 | | | |
| Promedio | | | | 99,977 | | | |
| DS | | | | 1,835 | | | |
| DSR | | | | 1,835 | | | |
| Cv | | | | 0,018 | | | |

5.2.8. Ensayo Preliminar

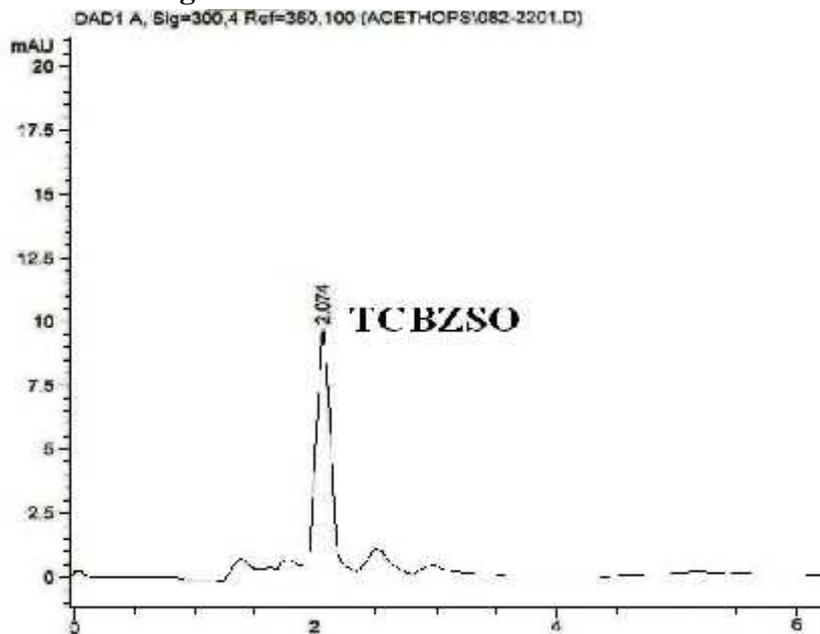
Se inyectaron dosis de 10 mg./kg. de peso vivo a tres vacas en período de lactación para el control de fasciolosis previamente diagnosticadas con análisis coproscópico y además con síntomas de enteritis. El ensayo preliminar se elaboró para la determinación de metabolitos de Triclabendazol Sulfóxido y Triclabendazol a los 8 días postdosificación. Como se puede observar, el tiempo de retención difiere del encontrado en linealidad y precisión (2,44 minutos); sin embargo, el pico corresponde al

metabolito TCBZO; la cantidad recuperada es de 6,55 µg./ml. En este ensayo no se encontraron residuos de Triclabendazol. En el ensayo no se encontró Triclabendazol. La ausencia de TCBZ en leche indica que este fue completamente metabolizado a sus metabolitos Sulfóxido y Sulfona (83).

Cuadro 12. Muestras de leche analizadas procedentes de vacas tratadas con Triclabendazol (Fasinex ®)

| Muestra de Leche | Área Pico | Cantidad Recuperada (µg/mL) |
|------------------|-----------|-----------------------------|
| L1 | 78,56888 | 6,553141291 |
| L2 | 49,98486 | 4,201706319 |
| L3 | 10,5759 | 0,959768805 |

Figura 6. Cromatograma de TCBZO en leche.



5.2.9. Análisis estadístico

El cálculo de los parámetros estadísticos: Promedio, Desviación Estándar (DS), Desviación Estándar Relativa (DSR) y coeficiente de correlación (R^2) fueron realizados mediante el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de linealidad, de precisión y exactitud nos proporciona datos próximos al valor verdadero con porcentajes de recuperación iguales a 100%. En términos de **precisión** el método es preciso en 3 niveles de concentración diferentes necesarios para la determinación de estos parámetros, además de precisar coeficientes de variación inferiores a 5% y una desviación estándar inferior a 2% aceptable para métodos espectrofotométricos. **La linealidad** del método evaluado comprendió concentraciones entre 0,5-50 µg./ml., y con un coeficiente de correlación (R^2) de superior a 0,999 para TCBZ y para TCBZSO (cerca de la unidad).

En **exactitud** se observa que los límites de detección y cuantificación en leche (Cuadros 8-11) para TCBZSO son de 0,3865 y 1,28837 µg./ml. respectivamente; mientras que para TCBZ los límites de detección y cuantificación son 0,305 µg./ml. y 1,017 µg./ml., respectivamente. Para queso, los límites de cuantificación y detección de TCBZSO fueron 0,799 y 0,240 µg./ml., y para TCBZ en queso los límites de cuantificación y detección fueron 1,459 y 0,438, respectivamente. Los resultados demuestran la factibilidad del método (84, 85).

Cuadro 13. Parámetros de validación de la metodología analítica para la determinación de concentraciones de TCBZ y su metabolito TCBZSO (Elaborado sobre la base de la Exactitud).

| Parámetros de validación | LECHE | | QUESO | |
|--|--------|--------|--------|--------|
| | TCBZSO | TCBZ | TCBZSO | TCBZ |
| Porcentaje de recuperación (%) | 99,99 | 100,04 | 100,00 | 99,98 |
| Coefficiente de correlación (%) | 0,9999 | 0,9999 | 1,0000 | 0,9975 |
| Límite de cuantificación | 1,288 | 1,017 | 0,799 | 1,459 |
| Límite de detección | 0,387 | 0,305 | 0,240 | 0,438 |

Para el análisis de TCBZ y TCBZSO en leche y queso en la ciudad de Cajamarca se debe explicar primeramente que existen cadenas productivas dentro de los sistemas de comercialización: están, en principio los productores de materia prima: leche y quesillo, dentro de los que se ubican los abastecedores de leche fresca (la leche es utilizada para la fabricación de queso fresco, mantecoso, andino, tipo suizo, mantequilla, manjarblanco, mozzarella y otros quesos más elaborados). De otro lado están los abastecedores de queso y quesillo, localizados principalmente en Chota, Bambamarca y la Encañada, Chanta, Yanacancha y Combayo, con más de 10 000 productores. Finalmente están los agroganaderos, que se ubican en diferentes pisos altitudinales y que poseen entre 8-15 vacas lecheras en promedio; la leche que producen estos últimos, generalmente, es acopiada por dos empresas: NESTLE y GLORIA, lo que representa el 60% del total de leche producida en la región Cajamarca y el excedente se destina a producción de derivados lácteos y venta al público.

Es esta última modalidad presenta una serie de peligros asociados a higiene y cultura sanitaria en el ordeño que, generalmente, se realiza en campo, donde caen yerbas, polvo, no hay agua corriente para lavarse las manos, y si en que se lo hace es con agua proveniente de manantiales o acequias; se emplean recipientes mal limpiados o solamente enjuagados con agua del río, quebrada o manantial, y, en los mejores casos con agua del caño; el producto es manipulado sin la debida protección, y, en estas condiciones, se expende la leche fresca al público sin el debido control sanitario, sin mantener la cadena de frío y en condiciones de higiene totalmente inadecuadas. De otro lado, no se elimina la leche contaminada por mastitis, o la que proviene de animales tratados con antibióticos; se utiliza el calostro para el quesillo, por ello, hay dos coloraciones y calidad del quesillo, el amarillento y blanquecino. La presencia de residuos tóxicos por antibióticos, antiparasitarios y hormonas es creciente, debido a que gran número de ganaderos aplican estos productos sin la vigilancia de un especialista. Esto se debe a que el crecimiento de la oferta de productos químicos ha aumentado considerablemente (86).

A esta preocupante realidad expuesta se suma la prevalencia del 98% de *fasciolosis* bovina en la región Cajamarca, y el uso de productos como el Triclabendazol, Albendazol y Clorsulon que los ganaderos hacen para tratar a sus animales con *fasciolosis*, a fin de controlar de alguna manera la enfermedad y evitar pérdidas económicas que se han venido dando y que llegan, aproximadamente, a 50 millones de dólares por año (87).

En Cajamarca, los ganaderos tienden a dosificar sus animales generalmente en los meses de lluvia, es decir, en enero, febrero y marzo. Además del TCBZ, dos de sus

metabolitos pueden salir a través de la leche: el TZCBSO y TCBZSO₂ y ser consumidos por la población. El uso indiscriminado del TCBZ ha traído como consecuencia cepas resistentes en humanos y animales. Por esta razón, se analizaron 25 muestras de leche fresca y 29 muestras de queso mantecoso colectadas en diferentes puntos de la ciudad de Cajamarca (Anexo 2).

Cuadro 14 Presencia de residuos de TCBZ y TCBZSO en muestras de leche fresca y queso para consumo humano, detección mediante HPLC, Cajamarca, 2013.

| Muestra | Resultados | ANALITO | |
|--------------------------|-----------------|----------|----------|
| | | TCBZ | TCBZSO |
| | | N (%) | |
| LECHE n=25 | Negativo | 25 (100) | 25 (100) |
| | Positivo | 0 (0) | 0 (0) |
| QUESO n=29 | Negativo | 29 (100) | 29 (100) |
| | Positivo | 0 (0) | 0 (0) |
| Total de muestras | | 54 | |

De las 25 muestras de leche y 29 de queso analizadas, colectadas en distintos puntos de la Ciudad de Cajamarca, ninguna presentó residuos de TCBZ y su metabolito TCBZSO tal como lo demuestran los cromatogramas (Anexo 3 y 4). Probablemente, debido a que, producto de la resistencia de *Fasciola hepatica* al TCBZ, los propietarios estarían utilizando otros tipos de antiparasitario, como el Nitroxinil y

Clorsulon (88, 89).

Otro serio problema se presenta porque en el Perú no existe un control de calidad adecuado de medicamentos por parte de la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) o el SENASA. Los medicamentos no pasan por un control de calidad, sino que solo presentan un certificado de buenas prácticas de manufactura realizadas en su país de origen. La mayoría de medicamentos que ingresa

al país procede de países asiáticos e incluso africanos, en donde existen laboratorios de dudosa procedencia. Se estima que el 35% de las importaciones de medicamentos provienen de países de América Latina, alrededor de 5% de la India y cerca de un 5% de Chile (90). Por ello, al indicar tratamientos a los animales, estos reciben dosis inferiores del medicamento; por tanto, el efecto es menor del esperado, es decir, a una menor dosis terapéutica, una menor disponibilidad del fármaco en el organismo.

Las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción de TCBZ han sido estudiadas previamente y son cuantitativamente similares en bovinos y ovinos (53). Posterior a la administración oral, una porción de TCBZ es absorbida desde el tracto gastrointestinal (74). Estos resultados concuerdan con otros autores, quienes describen que el TCBZ al experimentar metabolismo de primer paso, es rápidamente biotransformado a metabolito sulfóxido, por lo que no es detectado en la leche (48). El TCBZSO es el metabolito activo del TCBZ y es el principal responsable de la actividad antiparasitaria sobre los estados adultos e inmaduros de *Fasciola hepatica* (91). Concentraciones detectables de TCBZSO se mantienen desde las dos horas (0,1 +/- 0,1 µg./ml.) hasta las 144 horas (0,06 ± 0,03 µg./ml.) post-tratamiento (92). En el presente estudio no se realizó la determinación del metabolito sulfona; sin embargo, este se puede detectar a partir de las cuatro horas post-tratamiento (0,13 +/- 0,12 µg./ml.) (93), manteniendo niveles detectables hasta las 480 horas (20 días) postadministración (0,05 +/- 0,02 µg./ml.) (18); Empero, hay que considerar que el TCBZ es una sustancia que puede estar presente en el músculo, la grasa, el hígado y el riñón de los rumiantes, con excepción de los que producen leche para el consumo humano (20).

Los bencimidazoles, además de sufrir metabolismo de primer paso, tienen un corto período de persistencia en tejidos. El TCBZ, por efecto del metabolismo de primer paso a nivel hepático, es transformado en sus metabolitos sulfóxido y sulfona siendo el metabolito sulfona el que se puede determinar en tejido renal y con las mayores concentraciones y persistencia en el tiempo (hasta los 60 días post-tratamiento, con niveles sobre el LMR) (15, 18, 38, 94). La persistencia de TCBZO en riñón indica que la excreción renal representa una vía importante de eliminación del TCBZ y sus metabolitos. El TCBZ no absorbido es excretado en las heces como fármaco inalterado o como metabolitos no identificados (53). Se ha demostrado, además, que los metabolitos de TCBZ son metabolizados rápidamente por el hígado, y sus concentraciones en plasma van disminuyendo y permanecen en plasma hasta los 12 días post-tratamiento (83) en tanto que el Triclabendazol solo puede aparecer en leche la primera semana postdosificación (18).

La FAO establece los niveles de residuos mínimos de trazas de medicamentos. Estas recomendaciones permiten sugerir que el tiempo de retiro del Triclabendazol, que dependería del tipo de tejido, lo establece en un tiempo promedio no menor que 30 días; en este caso, de acuerdo con esta norma patrón, el hígado y el tejido renal son los que poseen o concentran una mayor cantidad de residuos: 850 y 400 µg., respectivamente (20).

VII-CONCLUSIONES

- La metodología analítica para la detección de TCBZ en leche y queso de bovinos se validó adecuadamente. En consecuencia, se han entregado los valores de recuperación; la linealidad del método evaluado comprendió concentraciones entre 0,5-50 µg./ml. y con un coeficiente de correlación (r^2) de 0,999 y un coeficiente de determinación superior a 0,999 para TCBZ y para TCBZSO. La precisión y exactitud son confiables para la cuantificación de ambos analitos.
- No se detectaron residuos de TCBZ ni su metabolito TCBZSO en las muestras de leche y queso que se expenden en la ciudad de Cajamarca; por lo tanto, se considera que las muestras están libres del fasciolicida, aun cuando no se encontraron residuos del fasciolicida. Esto no le resta importancia al trabajo, debido a que la sensibilidad de la técnica es cercana al 100%. Probablemente, la estacionalidad del uso del TCBZ o el uso de otro fasciolicida estén llevándose a efecto.

VIII-RECOMENDACIONES

A la Universidad Nacional de Cajamarca

- Realizar estudios de farmacocinética de TCBZ en diferentes especies de animales tratados.

- Establecer estudios epidemiológicos para verificar la resistencia del TCBZ en *Fasciola hepatica*.
- Realizar análisis de otro derivado lácteo como el queso.
- Hacer estudios de determinación de TCBZ en carcaza de los animales.

Al Gobierno Regional de Cajamarca

- Promover investigaciones en las que se analice la situación de la presencia de residuos de contaminantes en alimentos.
- Difundir el presente trabajo de investigación a través de charlas orientadas no solamente al programa de control de fasciolosis, sino también a la DIRESA.
- Implementar laboratorios especializados para establecer la situación real de contaminantes presentes en alimentos, aire y agua.

A la Municipalidad Provincial de Cajamarca

- Realizar un control más efectivo de la sanidad e inocuidad alimentaria relacionada con los alimentos de origen animal (leche, carne y huevos).

A otros investigadores

- Ampliar el ámbito de estudio y realizar estudios comparativos en el ámbito de otras regiones del país.
- Determinar otros fasciolicidas.

IX-LISTA DE REFERENCIAS

1. Román S, Guerrero.L, Pacheco L. Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. *FCV-LUZ*. 2003;12(2):146-52.
2. Larrañaga I, Carballo M, Rodríguez M, Fernández A. Control e higiene de los alimentos. México: McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A; 1998. p. 544
3. INDECOPI. Norma técnica Peruana 202.001.2010. Leche y Productos Lácteos. Leche. Cruda. Requisitos. 2010. p. 7.
4. Nero LA, Mattos M, Beloti V, Barros MA, Franco B. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):391-3.
5. Amoros C. Determinación de antibióticos en leche y derivados lácteos [Tesis para optar el grado académico de Maestro en Ciencias]. Cajamarca. Perú: Universidad Nacional de Cajamarca; 2004.
6. Benzunce L. Determinación de antibióticos en la Campiña de Cajamarca. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 1988.
7. Vásquez R. Análisis fisicoquímico y presencia de betalactámicos y tetraciclinas en la leche del programa vaso de leche, en el distrito de Cajamarca. Cajamarca, Perú: Universidad Nacional de Cajamarca; 2011.
8. Reyna G, Palacios S. Antibióticos en leche [Para optar el grado de magister]. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2007.
9. FAO. Sistemas de Calidad e Inocuidad de los Alimentos.Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de

Puntos Críticos de Control (APPCC): Dirección de Información de la FAO; 2002.
232 p.

10. Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Amorós C, Delgado E, Escurra E, et al. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitology International*. 1997;46 (4):281-8.
11. González LC, Esteban JG, Bargues MD, Valero MA, Ortiz P, Náquira C, et al. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Perú. *Acta Tropica*. 2011;120 (1–2):119-29.
12. Ortiz P, Cabrera M, Jave J, Claxton J, Williams D. Human fascioliasis: prevalence and treatment in a rural area of Perú. *Infectious Diseases Review*. 2000a;2:42-6.
13. Claxton J, Zambrano H, Ortiz P, Delgado E, Escurra E, Clarckson M. The strategic control of *Fasciola hepatica* in the inter andean valley of Cajamarca, Peru. *Veterinary Record*. 1998;143:42-5.
14. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Vet Parasitol*. 2013;195 (1-2):118-21.
15. Imperiale F, Ortiz P, Cabrera M, Farias C, Sallovitz JM, Iezzi S, et al. Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2011;28 (4):438-45.
16. Kabir J, Umoh V, Audu-okoh E, Umoh J, Kwaga J. Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, Nigeria. *Food Control*. 2004;15(2):99-105.

17. Oka H, Counotte GH, Reimink A, Redder B, Hasselt H. Triclabendazole (Fasinex) residue in milk: determination and excretion kinetics. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*. 1990;115 (19):875-81.
18. Power C, Danaher M, Sayers R, O'Brien B, Clancy C, Furey A, et al. Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. *Journal of dairy science*. 2013;96 (10):6223-32.
19. Codex alimentarius. Establecimiento de Programas Reglamentarios. Parte IV. Glosario de términos y definiciones. 1995c;3(3):60-76.
20. FAO. Base de datos en línea del Codex sobre los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y alimentación; 2014 [cited 2014 9 febrero]. Available from: <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lmr-de-medicamentosveterinarios/es/>.
21. Scarcella S, Lamenza P, Guzmán M, Fernández V, Malandrini B, Ortiz P. Random amplification of polymorphic DNA, a simple tool for the detection of triclabendazole resistant strains in *Fasciola hepatica*. XXIII World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. XXIII World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2011.
22. Keating P, Gaona H. Introducción a la lactología. Primera edición 1986.
23. Sistemas de gestión de la calidad fundamentos y vocabulario, 2000.
24. Soler D. Mecanismos endógenos para mantener para mantener la calidad de la leche: Sistema Lactoperoxidasa 1997 [cited 2012 21 diciembre]. Available from: <http://www.censa.edu.cu/Default.aspx?PageContentID=153&tabid=92>

25. Moreno C, Fausto C, Rodríguez M, Méndez M, Viviana R, Osuna Á, et al. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*. 2007;14:61-83.
26. Bennett R. Incentivos para mejorar calidad de leche: Universidad de California; 2000 [cited 2012 22 diciembre]. Available from: <http://www.cnr.berkeley.edu/ucce50/agro-laboral/7dairy/7leche05.htm>.
27. Cabrera M, Villa J, Murillo G, Suárez L. Cómo obtener leche de buena calidad Colombia: Agronet; 2003 [cited 2012 25 diciembre]. Available from: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005113012633_C%C3%93MO_OBTENER_LECHE_DE_BUENA_CALIDAD.pdf.
28. FAO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods Rome2004. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/2004-10-15_fnp41-16final_4.pdf.
29. Unión Europea. Reglamento: Relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. 2009.
30. San Martín B, Rojas V, Martínez C, Puga J. Evaluación de los períodos de resguardo de diferentes antibióticos de aplicación intramamaria en vacas con mastitis clínica. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 1998;13 (2).
31. Palma C, Godoy C, Arboix M, Pérez X. Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*. 2006;38 (3).
32. Decreto Supremo 015-98-AG. Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales. Diario: El Peruano. 1998.

33. Decreto Ley N° 17505. Código Sanitario. Compendio de Legislación. 1969:107-18.
34. FAO. Código de principios referentes a la leche y productos lácteos.: Departamento de Agricultura de la FAO; 1995 [cited 2012 22 agosto]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w2198s/W2198S11.htm>.
35. Kinsella B, Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Furey A, Danaher M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2009;637 (1-2):196-207.
36. Whelan M, Kinsella B, Furey A, Moloney M, Cantwell H, Lehotay SJ, et al. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(27):4612.
37. Geis-Asteggiante L, Lehotay SJ, Lightfield AR, Dutko T, Ng C, Bluhm L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012;1258 (0):43-54.
38. Whelan M, O’Mahony J, Moloney M, Cooper KM, Furey A, Kennedy DG. Maximum residue level validation of triclabendazole marker residues in bovine liver, muscle and milk matrices by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013;1275:41-7.
39. Palma C, Godoy C, Arboix M, Pérez R. Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*. 2006;38:265-71.

40. Imperiale F, Ortiz P, Cabrera M, Farias C, Sallovitz JM, Iezzi S, et al. Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2011;28 (4):438-45.
41. Wolff K J, Eckert G, Schneiter G, Lutz H. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepática* in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*. 1983;13 (2):145-50.
42. Fernández RP. Farmacología de antihelmínticos de uso en medicina veterinaria: Universidad de Concepción. Facultad de Medicina Veterinaria; 1992.
43. Taylor M. Use of anthelmintics in cattle. In Practice. 6. 2000.
44. Martin R. Modes of action of anthelmintic. *The Veterinary Journal*. 1997;154 (1):11-34.
45. Robinson M, Hoey E, Fairweather I, Dalton JP, McGonigle S, Trudgett A. Characterisation of a β -tubulin gene from liver fluke, *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*. 2001;31 (11):1264-8.
46. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Veterinary Journal*. 1999;158(81-112).
47. Alvinerie M, Galtier P. Assay of triclabendazole and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1986, 374 (2):409-14.
48. Hennessy DR, Lacey E, Steel JW, Prichard RK. The kinetic of triclabendazole disposition in sheep. *Vet Pharmacol Therap*. 1987;3(10):64-72.
49. Misra SC, Swain G, Panda MR, Panda DN, Mohapatra NB. Efficacy of Fasinx CIBA-GEIGY against fascioliasis in cattle, buffaloes and goats. *Indian Veterinary Journal*. 1987;64 (8):701-4.

50. Kinabo LD, Bogan JA. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *Vet Pharmacol Therap.* 1988;11(3):254-9.
51. Sanyal PK. Pharmacokinetics of fenbendazole and triclabendazole in sheep and goat through simultaneous determination of their metabolites in plasma by high performance liquid chromatography. *Indian Veterinary Journal.* 1996;73(2):146-9.
52. Alvinerie M, Galtier P. Assay of triclabendazole and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *Chromatogr Biomed.* 1986;374:409 - 14.
53. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Diseases of domestic animals caused by flukes: epidemiology, diagnosis and control of Fasciola, Paramphistome, Dicrocoelium, Eurytrema and Schistosoma infections of ruminants in developing countries (English) FAO, Rome (Italy). Animal Production and Health Div. 1994:53.
54. Mas-Coma S, Bargues MD. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica.* 2009;110(2-3):112-36.
55. Comisión Mixta FAO/OMS del Codex Alimentarius. Establecimiento de Programas Reglamentarios. Parte II. Consideraciones generales sobre los métodos de análisis para el control de residuos: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 1995a.
56. García T, Hernández PE, Sanz B, Martín R. Revisión : Los residuos en la inspección de la carne. *Food Science and Technology International.* 1997; 3:391-403.

57. Lindholm J, Johansson M, Fornste T. Guidelines for analytical method development and validation of biotechnological synthesis of drugs: Production of a hidroxiprogesterone as mode. *Chromatogr Biomed.* 2003;791:323-36.
58. García T, Hernández PE, Sanz B, Martin R. Revisión : Los residuos en la inspección de la carne. *Food Science and Technology International* 1997;3:391403.
59. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1991;16(4):249-55.
60. Furman WB, Layloff TP. Validation of computarized liquid chromatography system. *AOAC.* 1994;77:1314-8.
61. Hill ARC, Reynolds SL. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. *Analyst.* 1999;124:953-95.
62. Prieto JG, Merino G, Pulido M, Estévez E, Molina AJ, Vila L, et al. Improved LC method to determine ivermectin in plasma. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2003;31:639-45.
63. Herrera V, Ticona J, Udaeta E, Chuqui R, Giménez A. Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de Galipea longiflora Krause Kallunki. *BIOFARBO.* 2008; (1):47-53.
64. Schenck FJ. Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection. *AOAC.* 1999;82 (6):1340-4.

65. Ali MS, Sun T, McLeroy GE, Phillippo ET. Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *AOAC*. 2000b;83 (1):39 - 52.
66. Payne LD, Hicks B, Wehner TA. Determination of abamectin and/or Ivermectin in cattle feces at low parts per billion levels using HPLC with fluorescence detection. *Agric Food Chem*. 1995;43:1233-7.
67. Scarano G, Esposito M, Grasso L, Soprano V, Oliviero G. Use of automated solid-phase extraction equipment for the determination of ivermectin residues in animal liver. *Analyst*. 1998;123:2551-3.
68. Danaher M, O'Keeffe M, Glennon JD, Howells L. Development and optimisation of an improved derivatisation procedure for the determination of avermectins and milbemycins in bovine liver. *Analyst*. 2001;126 (5):576-80.
69. Alvinerie M, Sutra JF, Capela D, Galtier P, Fernández-Suarez A, Horne E, et al. Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of moxidectin in bovine tissues. *Analyst*. 1996;121:1469-72.
70. EMEA. Abamectin. Summary Repor. Committee for Veterinary y Medicinal Products. ; 2002.
71. FAO. Base de datos en línea del Codex sobre los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos: Comisión del Codex Alimentarius 2012. Available from: <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lmr-de-medicamentos-veterinarios/es/>.
72. EMEA. TRICLABENDAZOLE. Summary Report. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS; 1997.

73. EMEA. IVERMECTIN. Summary Report The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. 2004, 4.
74. FAO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Food and Nutrition, Paper 41/5, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy. 1993.
75. Junquera P. TRICLABENDAZOL: Ficha Toxicológica: <http://parasitipedia.net/>; 2014 [cited 2014 09 de Marzo]. Available from: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2242&Itemid=2504.
76. Bargues MD, Fuentes MV, Mansoorian AB, Moghaddam AS, Ashrafi K, Savioli L. Determination específica de los parásitos implicados en la Fascioliasis humana y animal en la provincia de Gilan, Iran, mediante secuenciación del ADN ribosomal nuclear. In: HI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional, Libro de Resúmenes, Cuenca, Spain. 2002:165.
77. Salisbury CDC. Modified method for the determination of ivermectin residues in animal tissues. *AOAC*. 1993;76 (5):1149-51.
78. INDECOPI. Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos. 2010.
79. MINSA. La Ley General de Salud. Perú: Diario: El Peruano; 1997.
80. Unión Europea. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) N° 222/2012 DE LA COMISIÓN. Diario Oficial de la Unión Europea. 2012.
81. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI). Información hidrometeorológica Perú: SENAMHI; 2013 [cited 2013 24 de Enero]. Available from: <http://www.senamhi.gob.pe/?p=0602>.

82. Lindholm J, Johansson M, Fornstedt T. Guidelines for analytical method development and validation of biotechnological synthesis of drugs: Production of a hidroxiprogesterone as model. *Journal of Chromatography B*. 2003;791:323-36.
83. Mas-Coma SJ. Human fascioliasis: Epidemiological patterns in human endemic areas of South America, Africa and Asia. Southeast Asian. *Journal of Tropical Medical Public Health*. 2004;35, suplemento 1.
84. Martínez-Villalba A, Moyano E, Galceran MT. Ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. *Journal of Chromatography A*. 2013;1313:119-31.
85. Chen D, Tao Y, Liu Z, Huang L, Wang Y, Pan Y, et al. Development of a highperformance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2010;878(28):2928-32.
86. Cruz V, Sánchez D, Pezo S. Análisis de la cadena productiva de lácteos Cajamarca. CODELAC. 2006;1:109.
87. Espinoza J, Terashima A, Herrera-Velit P, Marcos L. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2010;27(4):604-12.
88. Gutiérrez A, Yong M, Fernández-Calienes A, Fraga J, Sánchez J, Wong L.
Diferenciación fenotípica y molecular entre cepas resistentes y susceptibles de *Pseudosuccinea columella* a *Fasciola hepatica*. *Biotecnología Aplicada*. 2003;20(3):179.
89. Rojas J, Palomino G, Calderón T, Terán J. Diagnóstico de resistencia antihelmíntica de *Fasciola hepatica* a los antiparasitarios de uso más común en

bovinos de cuatro distritos de Cajamarca Perú: <http://www.engormix.com/>; 2013 [cited 2014 28-01]. Available from: <http://www.engormix.com/MAGanaderiacarne/sanidad/articulos/diagnostico-resistencia-antihelmintica-fasciolat4879/165-p0.htm>.

90. Quispe M. El Perú debe contar con medicamentos de calidad. La Republica. 2012.
91. Soulsby E. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. London: Bailliere tindall; 1982. p. 809.
92. Álvarez M, Mainar R, Pérez J, Rojo F. Resistance of *Fasciola hepatica* to 182 triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*. 2006;159:424-5.
93. Backeljau T, De Bruyn L, De Wolf H, Jordaens K, Van Dongen S, Verhagen R, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*. 1995;11(2):119-30.
94. Power C, Whelan M, Danaher M, Bloemhoff Y, Sayers R, O'Brien B, et al. Investigation of the persistence of triclabendazole residues in bovine milk following lactating-cow and dry-cow treatments. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2013;30 (6):1080-6.

ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 15. Protocolo de elaboración de curvas de calibración para la determinación de Triclabendazol (TCBZ), Triclabendazol Sulfóxido (TCBZSO) en leche fresca y queso mantecoso.

| Soluciones de trabajo ($\mu\text{g/mL}$), para Linealidad y Precisión. | | | | | | | | |
|--|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| * | 0,5 | 1 $\mu\text{g./ml.}$ | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 50 |
| | $\mu\text{g./ml.}$ | | $\mu\text{g./ml.}$ | $\mu\text{g./ml.}$ | $\mu\text{g./ml.}$ | $\mu\text{g./ml.}$ | $\mu\text{g./ml.}$ | $\mu\text{g./ml.}$ |

| Soluciones de trabajo ($\mu\text{g/mL}$), para Exactitud. Se adicionó 10 mL de cada solución de trabajo a 1 gramo o 1 mL de leche fresca y queso mantecoso libre de fármaco | | | |
|---|------------------------|----------------------|------------------------|
| ** | 0,8 $\mu\text{g./ml.}$ | 1 $\mu\text{g./ml.}$ | 1,2 $\mu\text{g./ml.}$ |

*: Para Triclabendazol (TCBZ), Triclabendazol Sulfóxido (TCBZSO).

** : Muestra de tejido blanco libre de fármaco.

ANEXO 2

Cuadro 16. Lugares de expendio de queso mantecoso en la ciudad de Cajamarca

| N° Ord. | Calle, Jirón o Avenida |
|----------------|--------------------------------|
| 1 | Av. Atahualpa 311 V*-1 |
| 2 | Av. Atahualpa 311 V*-2 |
| 3 | Av. Independencia 200 |
| 4 | Av. Independencia Cuadra 1 V-1 |
| 5 | Av. Independencia Cuadra 1 V-2 |
| 6 | Jr. Amazonas 1066 V-1 |
| 7 | Jr. Amazonas 1066 V-2 |
| 8 | Jr. Amazonas 343 |
| 9 | Jr. Amazonas 455 V-1 |
| 10 | Jr. Amazonas 455 V-2 |
| 11 | Jr. Amazonas 527 V-1 |
| 12 | Jr. Amazonas 527 V-2 |
| 13 | Jr. Amazonas 527 V-3 |
| 14 | Jr. Amazonas 668 V-1 |
| 15 | Jr. Amazonas 668 V-2 |
| 16 | Jr. Amazonas 705 V-1 |
| 17 | Jr. Amazonas 705 V-2 |
| 18 | Jr. Amazonas Tongod V-1 |
| 19 | Jr. Amazonas Tongod V-2 |
| 20 | Jr. Manuel Seoane 511 V-1 |
| 21 | Jr. Manuel Seoane 511 V-2 |
| 22 | Jr. Manuel Seoane 511 V-3 |
| 23 | Jr. Manuel Seoane 511 V-4 |
| 24 | Mercado San Sebastián V-1 |
| 25 | Mercado San Sebastián V-2 |

*V-1=Expendedor 1; V-2= Expendedor 2 etc.

Cuadro 17. Lugares de expendio de leche fresca en la ciudad de Cajamarca

| N° Ord. | Calle, Jirón o Avenida |
|----------------|-------------------------------|
| 1 | Av. San Martín 757 |
| 2 | Av. San Martín 1005 |
| 3 | Av. San Martín 112 |
| 4 | Av. San Martín 112 |
| 5 | Av. San Martín 1349 |
| 6 | Av. San Martín 1349 V*-1 |
| 7 | Av. San Martín 1349 V-2 |
| 8 | Av. San Martín Cuadra 8 V-1 |
| 9 | Av. San Martín Cuadra 8 V-2 |
| 10 | Av. San Martín Cuadra 8 V-3 |
| 11 | Av. San Martín Cuadra 8 V-4 |
| 12 | Jr. Amazonas 112 |
| 13 | Jr. Dos de Mayo 576 |
| 14 | Jr. Dos de Mayo 615 |
| 15 | Jr. La Mar V-1 |
| 16 | Jr. la Mar V-2 |
| 17 | Jr. la Mar V-3 |
| 18 | Jr. la Mar V-4 |
| 19 | Jr. la Mar V-5 |
| 20 | Jr. Once de febrero V-1 |
| 21 | Jr. Once de Febrero V-2 |
| 22 | Jr. Once de Febrero V-3 |
| 23 | Jr. Once de Febrero V-4 |
| 24 | Jr. Revilla Pérez 134 V-1 |
| 25 | Jr. Revilla Pérez 134 V-2 |
| 26 | Jr. Revilla Pérez 139 V-1 |
| 27 | Jr. Revilla Pérez 139 V-2 |
| 28 | Mercado San Sebastián V-1 |
| 29 | Mercado San Sebastián V-2 |

*V-1=Expendedor 1; V-2= Expendedor 2 etc.

ANEXO 3

Cuadro 18. Resultados de análisis de TCBZ y TCBZSO en muestras de leche y queso en la ciudad de Cajamarca.

| Muestra N° | Analito y cantidad encontrada (µg./ml.) | | Promedio (µg./ml.) |
|------------|---|--------|--------------------|
| | TCBZ | TCBZSO | |
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 |

LECHE

| Muestra N° | Analito y Cantidad encontrada (µg./ml.) | | |
|------------|--|--------|-----------------------|
| | TCBZ | TCBZSO | Promedio (µg./ml.) |
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | 0 | 0 | 0 |

QUESO

ANEXO 4



Figura 6. Componentes de un equipo HPLC: 1. Fase Móvil, 2. Volumen de Inyección, 3. Columna y bloque térmico, 4. Detector UV, 5. Integrador.

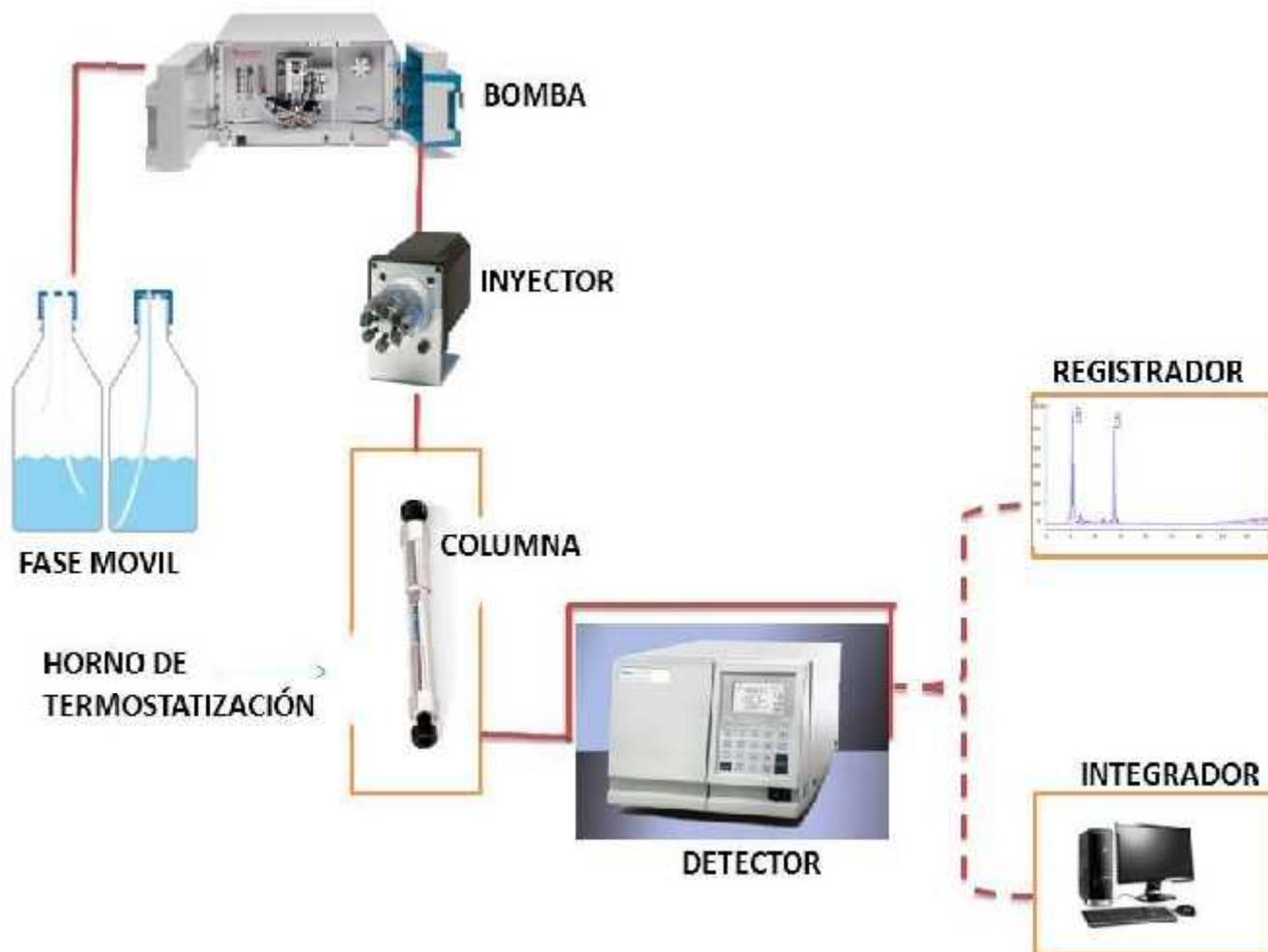


Figura 7. Partes fundamentales de las que se compone un HPLC, G. Reyna, 2014