

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**“DETERMINACIÓN DE LOS RESIDUOS DE TRICLABENDAZOL
EN LECHE DE VACAS PROCEDENTES DE DOS CENTROS DE
CRIANZA DE GANADO DESTINADAS A LA PRODUCCIÓN DE
DERIVADOS LÁCTEOS EN EL DEPARTAMENTO DE
CAJAMARCA, MEDIANTE HPLC-DAD”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

Nombre del autor:

María Cristina Huamán Tito

Asesor:

León Faustino Villegas Vílchez, Msc

Co-asesor:

María Angélica Terashima Iwashita, Dra

Lima, Perú

2021

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Manuela Verastegui Pimentel

PRESIDENTE

Dr. César Yoshi López Matayoshi

VOCAL

Mg. Elsa Carolina Ponce de León de Lama

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mi madre quien me enseñó a perseverar para cumplir mis metas, ella ha sido un pilar fundamental en mi vida profesional, pues sin ella no lo habría logrado.

A mis mejores amigos y todas aquellas personas que siempre estuvieron apoyándome en continuar con este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi co-asesora de tesis, Dra. María Angélica Terashima Iwashita por ser una persona que brindó todo el apoyo necesario para la realización de este proyecto, quien con su experiencia, paciencia y amplio conocimiento hizo que logre culminar mi más anhelado sueño.

Al MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez por ser mi profesor en mi etapa universitaria y mi asesor de tesis, por brindarme su apoyo incondicional, nuevas ideas y tiempo para terminar esta tesis con éxito.

Al Biólogo Marco Antonio Canales Ramos por encaminar la secuencia de pasos a seguir, su revisión crítica, enseñanza y apoyo.

A la Lic. Victoria Marisela Blas Asipali, por enseñarme y ayudarme con la técnica de TSR y Kato-Katz en las instalaciones del Laboratorio Clínico el Ingenio, ubicado en Cajamarca.

A la docente Yolanda Elizabeth Viguria Chávez, quien me ayudó y fue mi fortaleza en las primeras etapas de mi tesis.

Al técnico veterinario Alfonso Vásquez Efus, quien se encargó y apoyó en la toma de muestras.

A los médicos Luis Marcos Raymundo y Vicente Maco Flores, por haber tenido la iniciativa o idea de realizar la presente investigación, impulsar su ejecución, sugerencias sobre el plan, escogido a través de varias instancias a la candidata mejor preparada para realizarla y otras ideas al respecto.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	
II.1. CICLO BIOLÓGICO DE <i>Fasciola hepatica</i>	15
II.2. INFECCIÓN POR <i>Fasciola hepatica</i>	16
II.3. TRICLABENDAZOL (TCBZ)	18
II.4. TIEMPO DE RETIRO, LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS E INGESTA DIARIA ADMISIBLE	19
II.5. GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS PECUARIAS EN EXPLOTACIÓN LECHERA	20
II.6. CONTROL DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS	21
II.7. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA	22
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	23
IV. OBJETIVOS	
IV.1. GENERAL	23
IV.2. ESPECÍFICOS	23
V. MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y METODOLOGÍA	
V.1. MATERIALES	24
V.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS	25
V.3. METODOLOGÍA	
V.3.1. ENCUESTAS	25
V.3.1.1. CÁLCULO DE TAMAÑO MUESTRAL Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE	25
V.3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS	27
V.3.2.1. PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES Y DEL PERSONAL DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS DEL PROYECTO	27
V.3.3. PROCEDENCIA Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA	28
V.3.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	28
V.3.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	29

V.3.4.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE LECHE	29
V.3.5.	SOLUCIONES ESTÁNDAR	30
V.3.6.	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	30
V.3.7.	TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN RÁPIDA (TSR) Y - KATO-KATZ	30
V.3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	31
V.3.8.1.	ANÁLISIS CUANTITATIVO EN HECES	31
V.3.8.2.	ANÁLISIS CUANTITATIVO EN LECHE	32
V.3.8.2.1.	LINEALIDAD	32
V.3.8.2.1.1.	TEST DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE	33
V.3.8.2.1.2.	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	33
V.3.8.2.2.	ESTABILIDAD	34
V.3.8.2.3.	PRECISIÓN	34
V.3.8.2.4.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN	34
V.3.8.2.5.	RECUPERACIÓN	35
V.3.8.2.6.	CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	36
VI.	RESULTADOS	
VI.1.	ENCUESTAS	37
VI.2.	TÉCNICA DE TSR Y KATO-KATZ	38
VI.3.	LINEALIDAD	38
VI.4.	ESTABILIDAD	40
VI.5.	PRECISIÓN	42
VI.6.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN	43
VI.7.	RECUPERACIÓN	43
VI.8.	CUANTIFICACIÓN EN LAS MUESTRAS DE LECHE	45
VII.	DISCUSIÓN	48
VIII.	LIMITACIONES DEL PROYECTO	51
IX.	CONCLUSIONES	52
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados técnica TSR y Kato-Katz.

Tabla 2. Diluciones de los estándares de Triclabendazol (TCBZ), Triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) y Triclabendazol sulfona (TCBZSO₂) a partir de las soluciones madre y el promedio de las áreas de picos de estos.

Tabla 3. Evaluación de la estabilidad del TCBZ.

Tabla 4. Evaluación de la estabilidad del TCBZSO₂.

Tabla 5. Evaluación de la estabilidad TCBZSO.

Tabla 6. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZ a la concentración de 1.008 ug/mL.

Tabla 7. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZSO a la concentración de 1.14 ug/mL.

Tabla 8. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZSO₂ a la concentración de 1.02 ug/mL.

Tabla 9. Límites de cuantificación y detección del TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂

Tabla 10. Recuperación de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ de leche de tarro leche de tarro comercial enriquecida, n=2, tres inyecciones.

Tabla 11. Concentraciones promedio de los residuos de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ en muestras de leche del primer centro de crianza de ganado de Cajamarca, tiempo de retiro aproximado de 20 días.

Tabla 12. Concentraciones promedio de los residuos de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ en muestras de leche del segundo centro de crianza de ganado de Cajamarca, excepto la muestra V5C2. Tiempo de retiro de 7 días.

Tabla 13. Pregunta 4, ¿Usted consulta al veterinario para el uso de los medicamentos?

Tabla 14. Pregunta 11, ¿De dónde son adquiridos los medicamentos* para sus vacas?

Tabla 15. Pregunta 4, ¿Cuál de los siguientes antiparasitarios de uso interno es el más vendido para vacas?

Tabla 16. Pregunta 12. ¿En qué época-mes-meses del año se le da el tratamiento a sus vacas?

Tabla 17. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZ

Tabla 18. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZSO.

Tabla 19. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZSO₂.

Tabla 20. Datos usados para calcular el porcentaje de recuperación de TCBZ, TCBZSO y TCBSO₂ en leche de tarro comercial enriquecida, n=2, tres inyecciones.

Tabla 21. Concentraciones residuales de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ en muestras de leche del primer centro de crianza de ganado de Cajamarca. El tratamiento con TCBZ fue aproximadamente 20 días previos a la toma de muestra.

Tabla 22. Concentraciones residuales de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ en muestras de leche del segundo centro de crianza de ganado de Cajamarca. El tratamiento con TCBZ fue siete días previos a la toma de muestras, excepto para la vaca con código V5C2 el cual fue dos días previos.

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

Fig.2. Estructura química del TCBZ.

Fig.3. Estructura química del TCBZSO.

Fig.4. Estructura química del TCBZSO₂.

Fig.5. Estructura química del ceto-TCBZ.

Fig.6. Curva de calibración para los estándares de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO₂.

Fig.7. Cromatograma de los estándares de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂.

Fig.8. Cromatograma del blanco, leche de tarro sin enriquecer con soluciones de estándar.

Fig.9. Cromatograma de las muestras de leche de tarro enriquecidas con TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂.

Fig.10. Cromatograma de la muestra V1C1T0.

Fig.11. Cromatograma de la muestra V1C1T24.

Fig.12. Cromatograma de la muestra V2C1T0.

Fig.13. Cromatograma de la muestra V2C1T24.

Fig.14. Cromatograma de la muestra V3C1T0.

Fig.15. Cromatograma de la muestra V3C1T24.

Fig.16. Cromatograma de la muestra V4C1T0.

Fig.17. Cromatograma de la muestra V4C1T24.

Fig.18. Cromatograma de la muestra V5C1T0.

Fig.19. Cromatograma de la muestra V5C1T24.

Fig.20. Cromatograma de la muestra V1C2T0.

Fig.21. Cromatograma de la muestra V1C2T24.

Fig.22. Cromatograma de la muestra V2C2T0.

Fig.23. Cromatograma de la muestra V2C2T24.

Fig.24. Cromatograma de la muestra V3C2T0.

Fig.25. Cromatograma de la muestra V3C2T24.

Fig.26. Cromatograma de la muestra V4C2T0.

Fig.27. Cromatograma de la muestra V4C2T24.

Fig.28. Cromatograma de la muestra V5C2T0.

Fig.29. Cromatograma de la muestra V5C2T24.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Encuesta a la persona responsable del centro de crianza ganadero.

Anexo 2. encuesta anónima para las personas responsables de los establecimientos de venta de productos agroveterinarios.

Anexo 3. Resultados de las encuestas.

Anexo 4. Datos empleados para calcular el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2.

Anexo 5. Datos empleados para calcular el porcentaje de recuperación de los estándares en leche.

Anexo 6. Concentraciones de TCBZ, TCBZSO Y TCBZSO2 hallados en las muestras de leche obtenidas en los dos centros de crianza de ganado.

Anexo 7. Resultados de los cromatogramas de la Cromatografía Líquida de Alta Performance con detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).

Anexo 8. Certificado de análisis de los estándares de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2.

LISTA DE DIAGRAMAS Y GRÁFICOS

Diagrama 1. Resumen de la metodología

Gráfico 1. Pregunta 8, ¿Cuál es el tiempo de espera para poder ordeñar a sus vacas?

Gráfico2. Pregunta 2, ¿Qué estudios tiene usted?

Gráfico 3. Pregunta 7, ¿De qué empresa o laboratorio adquiere los medicamentos?

RESUMEN

Perú es un país hiperendémico para la infección por *Fasciola hepática*. Triclabendazol (TCBZ) es la droga de elección para tremátodos hepáticos; aunque, en los últimos años se ha incrementado los casos de resistencia en humanos y animales, especialmente en Cajamarca. Recientes reportes informan de la presencia de trazas de TCBZ en alimentos cárnicos y lácteos. Se evaluó mediante encuestas las prácticas y costumbres de los ganaderos productores de leche, y proveedores de TCBZ en Cajamarca, que podrían explicar la presencia de los metabolitos de TCBZ en la leche ordeñada, y su transferencia a los humanos. También, se realizó la técnica de sedimentación rápida (TSR) y Kato-Katz, se confirma la presencia de huevos de *F. hepatica* en las vacas en tratamiento con TCBZ. El TCBZ en dosis únicas y “al ojo” no fueron eficaces para el control y tratamiento en las vacas infectadas con *F. hepatica*. Además, se determinó que el triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) y triclabendazol sulfona (TCBZSO₂) a un tiempo de retiro aproximado de 20 días se encuentran en la leche cruda de vacas a nivel cuantificable mínimo de 0.006 ug/mL y 0.015 ug/mL, respectivamente; a este tiempo de retiro no se detectó el TCBZ por Cromatografía Líquida de Alta Performance con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD). Se necesitan nuevos regímenes de control por parte de la autoridad sanitaria competente, ya que en el ámbito nacional no existe un tiempo de retiro y un límite máximo de residuos (LMR) vigente para el TCBZ y sus metabolitos, que garanticen la inocuidad de los lácteos.

Palabras clave: Triclabendazol, Triclabendazol sulfóxido, Triclabendazol sulfona, leche.

ABSTRACT

Peru is a hyperendemic country for *Fasciola hepatica* infection. Triclabendazole (TCBZ) is the drug of choice for liver flukes, although in the last years the cases of drug-resistant flukes in humans and animal have increased, especially in Cajamarca. Recent reports inform of TCBZ traces in meat and dairy products. Surveys were applied to assess the practices and customs of dairy farmers and TCBZ providers in Cajamarca, which could explain the presence of TCBZ metabolites in fresh milk and how they transfer to humans. In addition, the Rapid Sedimentation Technique (RST), and Kato-Katz technique were employed, confirming the presence of *Fasciola hepatica* eggs in cows under TCBZ treatment. Single doses of TCBZ measured by guesswork were not efficient for the control and treatment of cows infected with *Fasciola hepatica*. In addition, it was also determined that Triclabendazole Sulfoxide (TCBZSO) and Triclabendazole Sulfone (TCBZSO₂), at an approximate withdrawal time of 20 days, were present in raw cow milk at a minimum quantifiable level of 0.006 ug/mL and 0.015 ug/mL, respectively; TCBZ was not detected at this withdrawal time by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD). New control systems from the competent health authorities are required since no withdrawal time and maximum residue limit (MRL) of TCBZ and its metabolites have been established at national level to guarantee the safety of dairy products.

Keywords: Triclabendazole, Triclabendazole sulfoxide, Triclabendazole sulphone, milk.

I. INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es un parásito trematodo de distribución cosmopolita (1) que causa la fasciolosis. Este trematodo tiene como hábitat las vías biliares de los hospederos definitivos como los humanos o animales rumiantes, y puede vivir durante varios años dentro de ellos (2). Ello causa exorbitantes pérdidas económicas para las empresas ganaderas, debido a la mortalidad de los animales, retraso en el crecimiento, pérdida de masa corporal, menor rendimiento de los productos derivados como la leche, queso y carne (3). Y es endémica en el 75% del territorio nacional en humanos, produce síntomas y complicaciones abdominales, hepáticas y de vías biliares principalmente, pudiendo llegar a fibrosis, cirrosis hepática (4).

A principio de los años 80 se introdujo en la medicina veterinaria el TCBZ, cuyo metabolito activo es el TCBZSO y el metabolito inactivo es el TCBZSO₂ (5). Así mismo, el TCBZSO se demostró altamente eficaz en fasciolosis, tanto en la fase aguda y crónica de la enfermedad (6). El TCBZ demostró ser más eficaz (10 mg/kg en dosis única) (7) y tener menos efectos secundarios que el albendazol (100 mg/kg en dosis única) (8), bitionol (30-50 mg/Kg/día en 3 dosis) (9) y otros, lo cual ameritó que en 1986 sea administrado por primera vez a dos humanos con fasciolosis (5). Ya en 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó que se incluyera al TCBZ en la lista de medicamentos esenciales (10), siendo hasta la fecha el único fármaco recomendado por la Organización Panamericana de Salud y la Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) contra la fasciolosis (11). El 13 de febrero del 2019 la Food Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprobó el TCBZ para uso en humanos (12).

La ganadería usa el TCBZ para tratar y/o prevenir las enfermedades producidas por *F. hepatica*. Se sabe que el uso de medicamentos en animales es un problema de salud pública, ya que existe la posibilidad de la ingesta de residuos (compuesto de origen y/o sus metabolitos que permanecen en carne y leche, cuyos efectos son nocivos para el humano) (13, 19). Por eso, es importante que los ganaderos conozcan y cumplan con el tiempo de retiro (tiempo entre la última administración del medicamento al animal y el ordeño) de TCBZ en la leche de rumiantes (13). Según las recomendaciones de la Agencia Europea de Medicamentos el tiempo de retiro del TCBZ debe ser aproximadamente 21-

28 días (14,15 ,16). Según indicaciones del fabricante el TCBZ no debe ser utilizado en animales que producen leche para consumo humano (17). Esto último debe considerarse antes que la leche sea tratada para producir derivados lácteos, así evitar la presencia de residuos de TCBZ en los lácteos y garantizar la inocuidad alimentaria (17).

Se sabe que un producto alimenticio es adecuado para el consumo humano cuando la concentración de residuos del fármaco es menor que el límite máximo de residuos (LMR). En la Norma técnica Sanitaria (NTS) que establece los LMR de medicamentos veterinarios de consumo humano no establece el LMR para el TCBZ, ni sus metabolitos (19). El LMR del TCBZ propuesto provisionalmente que expiró el 1 de enero del año 2014 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) fue de 10 µg/kg, el residuo marcador es ceto-triclabendazol (suma de los residuos extraíbles que pueden oxidarse a ceto-TCBZ) (16). Así mismo, el Codex Alimentarius en su último informe (CX/MRL-2018) no estableció los LMR del TCBZ y sus metabolitos en leche (20). Por otro lado, la ingestión diaria admisible (IDA) para TCBZ es de 0.0015 mg/kg de peso corporal, es decir 0.09 mg/persona (16).

Algunos estudios han demostrado que los residuos de TCBZ se encuentran en productos lácteos de vacas tratadas experimentalmente con TCBZ (1, 21, 22, 23). En 2013, Power *et al.* (1) hicieron estudios comparativos de la leche de origen y sus productos derivados, usaron un grupo de alta concentración y otro de baja concentración de residuos de TCBZ en la leche de origen. Hallaron concentraciones de 918 µg/kg ceto-TCBZ en leche mientras que en queso se concentró 5.372 veces más. Así como, 1.082 µg/kg ceto-TCBZ en leche mientras que 9.177 µg/kg ceto-TCBZ en mantequilla. En leche en polvo fue 7.252 veces más que los 423 µg/kg ceto-TCBZ de leche desnatada. Por otro lado, en el grupo de baja concentración al día 23 después del tratamiento se detectaron residuos de TCBZ en la mantequilla, el queso y la leche desnatada en polvo, por debajo de su límite de cuantificación excepto en la leche cruda de origen. Lo que demuestra que los ceto-TCBZ no se degradan pese a las etapas de fabricación de productos lácteos, y que el TCBZ y sus metabolitos migran a derivados lácteos incluso en concentraciones superiores a la de la leche cruda, siendo este un problema de seguridad más amplio.

En otro estudio del 2013, Power *et al.* (22) administraron TCBZ a vacas lactantes. Mediante el Cromatógrafo de líquidos de Ultra Alta Resolución-espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS) encontraron concentraciones de 244 µg/ kg de TCBZ en 5.5 días, 525 µg/ kg de TCBZSO en 15.5 días, 1710 µg/ kg de TCBZSO₂ en 20 días y 16 µg/ kg de cetot-TCBZ en 5 días. A los 17.5 días de administrado TCBZ, la concentración de cetot-TCBZ fue inferior al LMR vigente hasta dicha fecha (10 µg/kg). Concluyendo que son necesarios los largos períodos de retiro del TCBZ para garantizar que los residuos estén por debajo del LMR

Problema de investigación en el ámbito nacional

Los residuos de medicamentos veterinarios impactan negativamente en la calidad de leche y son un peligro para la salud del consumidor. La frecuente ingesta de residuos en alimentos puede causar manifestaciones tóxicas debido a los efectos acumulativos en el organismo, alergias, intoxicación, resistencia (cese o efectividad disminuida de un fármaco), entre otros (13, 32).

La ingesta de microdosis del TCBZSO en leche, puede desarrollar resistencia (en humanos) frente a *F. hepatica* (24), debido a que una de las causas de resistencia a varios fasciolicidas es la subdosificación (74). Hay vacíos de conocimiento en cuanto a lo mencionado, pero se debe tener en consideración debido a la creciente resistencia en áreas endémicas (77). Se han reportado casos de resistencia de *F. hepatica* frente a TCBZ en los Países Bajos (25), Australia (26, 79), Perú (7, 27, 28, 77), España (29), Chile (30), Argentina (31), Bolivia (32), Inglaterra (78) tanto en animales y humanos. En Perú, la reciente resistencia en humanos se reporta en zonas del norte donde por décadas el TCBZ ha sido empleado masivamente en el ganado vacuno y ovino (7), especialmente en el departamento de Cajamarca. Existe dos reportes técnicos de resistencia en los años 2006 y 2013 (33, 34). Así como, dos estudios de resistencia de *F. hepatica* frente a TCBZ en ovinos y bovinos en los años 2012 y 2013, respectivamente (35, 36).

No hay estudios sobre los efectos farmacológicos del TCBZSO y TCBZSO₂ en el organismo humano, pero sí en animales e in vitro. Los informes sobre los residuos o trazas de medicamentos de uso veterinario en alimentos publicados por el Comité de

Medicamentos Veterinarios (CVMP) y complementados con los informes del Comité Mixto de Expertos de la FAO/OMS en Aditivos Alimentarios (JECFA), distinguió que 105 sustancias de los 120 compuestos categorizados tenían efectos teratogénicos y fetotóxicos en más de una especie; los residuos de TCBZ tienen efecto fetotóxico en ratas y conejos (37).

Un estudio demostró que el TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ son potentes inhibidores in vitro e in vivo del transportador de membrana ABCG2/BCRP, usaron cultivos celulares y ratones. Dicho transportador está involucrado en la farmacocinética de medicamentos contra el cáncer, antibióticos y otros compuestos (38).

El TCBZ, TCBZSO Y TCBZSO₂ son capaces de inhibir in vitro al citocromo (CYP) P450, implicado en el metabolismo de diversos fármacos. El TCBZ y TCBZSO son capaces de inhibir al CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, entre otros y así afectar en las interacciones fármaco - fármaco (39).

En 2011, un estudio realizado por Imperiale *et al.* (21) buscó evaluar el estado de la infección por *F. hepatica* en Cajamarca. Después del tratamiento con TCBZ se encontró la presencia del TCBZSO y TCBZSO₂ en leche de vaca, hasta las 36 y 144 horas, respectivamente. Sin embargo, no se detectó presencia de TCBZ en leche. Se reportó también que el TCBZSO₂ es el principal metabolito excretado en la leche y que se encuentra en el queso fresco hasta 13 veces más que en la leche. En dicho estudio, no se determinó al ceto-TCBZ debido a la falta del estándar para realizar el estudio.

En 2013, Reyna y Giuseppe (24) realizaron una tesis doctoral en la ciudad de Cajamarca, concluyeron que las muestras de leche y queso que se expenden están libres de TCBZ y TCBZSO. Sin embargo, no usaron los estándares de ceto-TCBZ, ni de TCBZSO₂ para los análisis, por lo que no evaluaron dichos metabolitos.

Un estudio de tesis doctoral publicado en el año 2019 determinó la presencia de residuos TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂, mediante Espectrometría de masas por Cromatografía líquida (LC-MS/MS) en el 23.33 % de las muestras de leche cruda bovina (n=30) que se comercializaba en el distrito de Cajamarca. Concluyen que las muestras excedieron en

26.65 % el LMR de 10 ug/Kg. Cabe mencionar que para el año de su publicación no existía un LMR vigente para el TCBZ, ni para el TCBZSO, ni para el TCBZSO2 (23).

Se cree que la contribución de los productos manufacturados a base de leche que contengan los residuos de TCBZ podrían poner el riesgo el tratamiento de Fasciolosis en humanos; no obstante, se requieren más estudios que evalúen esta hipótesis.

El presente estudio buscó de manera exploratoria conocer si la leche contiene residuos de TCBZ, los cuales son un peligro para la salud humana e indicio de falta de control por parte de la autoridad sanitaria competente. Especialmente en Cajamarca que es el principal departamento productor de leche, hiperendémico de *F. hepatica* y el que muestra mayor índice de resistencia al triclabendazol en el Perú. Por lo que, se cuantificó los metabolitos de TCBZ en las muestras de leche de vaca destinadas a la producción de lácteos en dos centros de crianza de ganado de Cajamarca por Cromatografía Líquida de Alta Performance con Detector de Arreglo de Diodos. Además, se evaluó mediante encuestas las prácticas y costumbres de los ganaderos productores de leche, y proveedores de TCBZ igualmente en Cajamarca, para explicar la presencia o ausencia de los metabolitos de TCBZ en la leche ordeñada. También, se evaluó las heces de las vacas para determinar la presencia o ausencia de huevos de *F. hepática* luego de su tratamiento con TCBZ.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. CICLO BIOLÓGICO DE *Fasciola hepática*

F. hepatica tiene un ciclo biológico heteroxeno (diferentes hospedadores). El caracol del género *Lymnaea* es el hospedero intermediario. Los humanos y animales rumiantes, mayormente vaca, cabra y oveja son los hospederos definitivos (40).

El ciclo biológico comienza cuando el hospedero definitivo infectado hace deposiciones con huevos de *F. hepatica*. El miracidio se desarrolla después de 9 a 14 días a 22-26°C y en heces húmedas. El miracidio secreta enzimas histolíticas para penetrar a su hospedero intermediario y transformarse en esporoquiste (41).

El esporoquiste produce 5-8 redias que migran a las glándulas digestivas del caracol. Después, las redias, redias hijas y redias nietas producen de 15-20 cercarias. Cuando las cercarias maduran se localizan en la región posterior del intestino del caracol para ser expelidas al medio ambiente (41).

Posteriormente, las cercarias se enquistan (metacercarias) en plantas de tallo corto (Ejemplo: lechuga y berros) (2). Finalmente, los hospederos definitivos ingieren los vegetales con metacercarias, estos se desenquistan en el duodeno, luego perforan la pared intestinal hacia el peritoneo por 6 semanas, maduran y se localizan en los conductos biliares (41).

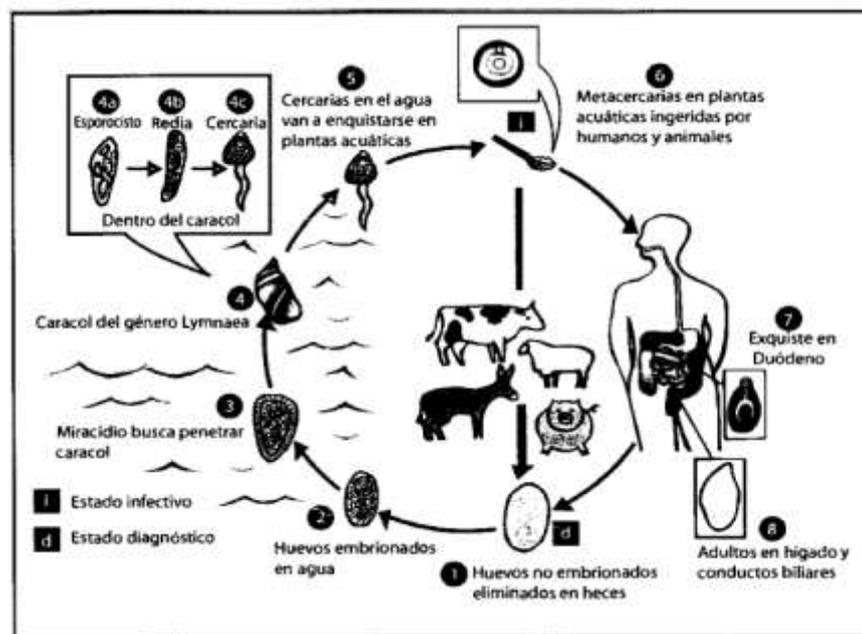


Fig. 1. Ciclo biológico de *F. hepatica* (42)

Fuente: Anexo 11. Resolución Ministerial N°266-2019/MINSA. NTS N° 148-MINSA/2019/DGIESP: Norma Técnica de Salud para la Vigilancia, Prevención y Control de la Fasciolosis Humana en el Perú.

II.2. INFECCIÓN POR *Fasciola hepatica*

La fasciolosis o fascioliasis es la infección causada por *F. hepatica* y por *F. gigantica*. Es una de las enfermedades parasitarias humanas más importantes, con gran distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal a nivel mundial. *F. hepatica* se distribuye en Oriente Medio, Latinoamérica, Europa y Asia, mientras que *F. gigantica* en Hawái, África y Asia

(2). En Perú, incidencia de fasciolosis ocurre generalmente en zonas rurales a 2000- 4000 metros sobre el nivel del mar, debido a las características ambientales óptimas para el desarrollo de *F. hepatica* (21).

La fase aguda en humanos sucede debido a la ingestión de las metacercarias hasta su recorrido hacia el hígado (4). Esta fase se caracteriza por las sintomatologías clínicas de fiebre, eosinofilia, y hepatomegalia con dolor abdominal, que pueden durar desde 2 a 5 meses (2). Las complicaciones ocurren cuando aparecen hematomas subcapsular o abscesos que pueden conllevar a cirugías y en el peor de los casos la muerte (4).

La fase crónica en humanos inicia cuando el parásito se localiza en los conductos biliares y causa hiperplasia fibrosa. Además, hay daño en la arquitectura hepática debido a las enzimas secretadas por *F. hepatica* que destruyen el parénquima hepático. Esta fase se caracteriza por la sintomatología clínica de obstrucción biliar, cirrosis y fibrosis hepática (4, 43, 44).

La fase aguda en rumiantes es poco frecuente, ello es debido a que los rumiantes no muestran síntomas evidentes. Aunque los primeros síntomas de esta fase en rumiantes es la anemia y la muerte. La necropsia de los animales muestra inflamación, perforación hepática, focos hemorrágicos y hepatitis aguda característicos de las infestaciones recientes en los animales (45).

La fase crónica en rumiantes es más común. Los animales están anémicos, caquéuticos y hay colecciones serosas en peritoneo. Además, el animal presenta engrosamiento de los conductos biliares con alteraciones cirróticas (45), la cirrosis hepática está relacionada directamente con el número de *F. hepatica* (46). La fasciolosis afecta la calidad de la leche y carne de animales.

Por otro lado, Perú es considerado un país hiperendémico de *F. hepatica*, donde la infección producida por este helminto se reporta en mayor incidencia en los departamentos de Cajamarca, Puno, Junín, Cusco y Arequipa (10). Habiéndose reportado 18 regiones endémicas de fasciolosis humana desde 1970 al 2016 (42), y fasciolosis animal en 21 de las 24 regiones del Perú (4).

II.3. TRICLABENDAZOL (TCBZ)

A inicio de los años 60 se usó el tetracloruro de carbono y hexacloroetano como antihelmíntico para la fasciolosis en animales. Estos fármacos tenían efectos tóxicos que llevaban a la muerte del animal (48). En 1983 se empezó a usar TCBZ, un derivado de bencimidazol halogenado, en animales herbívoros. TCBZ mostró tener gran especificidad para el tratamiento de fasciolosis y paragonimiasis (40) y efectividad aproximada del 90 % en sus primeros usos (49). El TCBZ posee gran actividad frente a los estados inmaduros y adultos de *F. hepatica*, asociado principalmente al TCBZSO (50).

El mecanismo de acción y la farmacodinámica hasta la fecha no está completamente claro. Se propuso que el TCBZ y sus dos metabolitos oxidados (TCBZSO y TCBZSO₂) son absorbidos a través del tegumento de *F. hepatica*, lo que ocasiona la disminución del potencial de reposo de la membrana celular, inhibición de la formación de microtúbulos y de la síntesis proteica. En el hospedero las reacciones adversas más frecuentes del TCBZ son dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza, hiperhidrosis, diarrea, vómitos, disminución del apetito, dolor musculo esquelético en el pecho y prurito (18).

Hay estudios que han reportado el uso de TCBZ en humanos en algunos países desde 1986 (5, 51, 52, 53, 54) por ser un eficaz y seguro a comparación de otras drogas (5, 53, 69). En 2016, se incorporó al TCBZ en el Petitorio Nacional de Medicamentos Esenciales, debido a las altas tasas incidencia de fasciolosis en el Perú (7). La FDA aprobó el TCBZ en febrero del 2019 como un antihelmíntico indicado para el tratamiento de la fasciolosis en humanos mayores de 6 años, pero en los últimos años se ha reportado resistencia de *F. hepatica* frente a TCBZ en humanos (7,30, 54, 28,77) y animales (7,25,26,29, 31, 55, 32).

Hay similitud en la terapia farmacológica en cuanto a la dosis tanto en humanos como animales (hospederos definitivos), la dosis recomendada en humanos según la OMS es de una dosis de 10 mg/ kg, mientras que los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan 2 dosis de 10 mg/Kg con 12 horas de intervalo vía oral (12, 77); la dosis recomendada en bovinos es 12 mg de TCBZ/Kg de peso corporal (6 mL/50 kg p.v.) en administración única por vía oral (81). La calidad del principio

activo en el producto veterinario va a depender del laboratorio que lo produzca, existen múltiples laboratorios productores de TCBZ para uso animal. Además, existe diferencia en la forma farmacéutica del TCBZ, ya que en humanos se usa tabletas (12) y en bovinos suspensión oral (81); la inocuidad de los componentes de la suspensión oral de uso veterinario no ha sido estudiado en los humanos, puede haber intoxicaciones y otros efectos desconocidos a largo plazo en humanos.

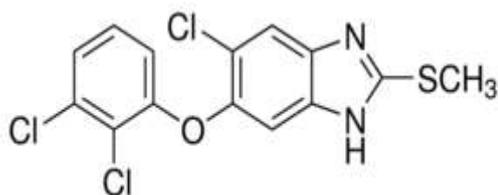


Fig. 2. Estructura química del TCBZ

Fuente: Merck

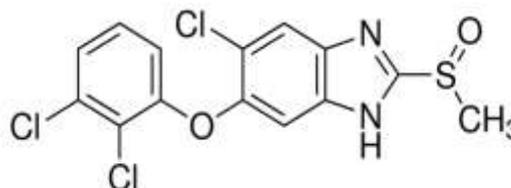


Fig. 3. Estructura química del TCBZSO

Fuente: Merck

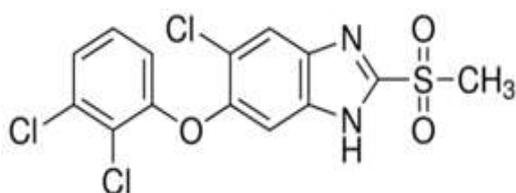


Fig. 4. Estructura química del TCBZSO₂

Fuente: Merck

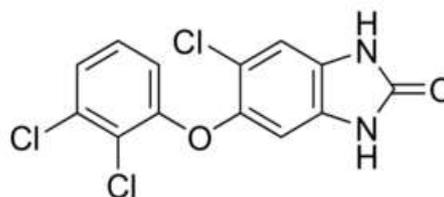


Fig. 5. Estructura química del ceto-TCBZ

Fuente: Merck

II.4. TIEMPO DE RETIRO, LIMITE MÁXIMO DE RESIDUOS E INGESTA DIARIA ADMISIBLE

El periodo o tiempo de retiro es el tiempo que se requiere para que los residuos de interés toxicológicos alcancen los niveles considerados como seguros para el humano (19). El tiempo de retiro en la leche es establecido en base a la farmacocinética y estudios toxicológicos en humanos. Además, fue establecido para que los residuos en alimentos se encuentren en concentraciones inferiores al LMR, de esta manera se garantiza la inocuidad alimentaria. El LMR es un indicio del cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas (BPA) y de ausencia de riesgo para la salud humana (13). No obstante, existen

factores que afectan el tiempo de retiro, como la enfermedad renal, hepática y la polifarmacia (13).

El LMR de medicamentos veterinarios es la concentración máxima de residuos, expresado en mg/kg o ug/Kg sobre la base del peso fresco, establecido en el Codex Alimentarius y que permite legalmente que un alimento sea destinado para consumo humano o en la superficie de este. Los LMR de la NTS MINSA/DIGESA se modifican con las actualizaciones que hace el Codex Alimentarius, Unión Europea o la OPS/OMS (19).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la OMS, establecen los LMR para garantizar concentraciones adecuadas de residuos en leche y carne, y así evitar efectos crónicos en humanos. Los LMR suelen referirse a los tejidos, en caso no se pueda recomendar el LMR a leche o huevos por razones de seguridad, se establece el uso limitado de la sustancia a los animales que no producen leche o huevos para el consumo humano (56).

El JECFA, publica la IDA para aquellos residuos de medicamentos que implican un riesgo para la salud humana. El IDA es un límite máximo ultra seguro, ya que establece concentraciones de residuos que pueden ser consumidos diariamente (13).

II.5 GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS PECUARIAS EN EXPLOTACIÓN LECHERA

Las Buenas Prácticas en Explotación lechera, establecidas por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), tienen como objetivo la producción de leche saludable y de calidad para el consumo humano. Esta guía orienta a los productores de leche y/o productos lácteos en las áreas de sanidad animal, higiene en el ordeño, nutrición, bienestar animal, medioambiente y gestión socioeconómica (76).

En el área de sanidad animal menciona que los productores de leche deben garantizar que su producto lácteo no contenga residuos químicos, toxinas u otros contaminantes, deben respetar los tiempos de retiro, nunca deben administrar productos veterinarios a animales

productores de leche para consumo humano, tienen que leer la etiqueta del medicamento ya que ahí encontrarán toda la utilización legal y segura del producto, entre otros. Por otro lado, el personal médico veterinario u otra persona que maneje a los animales lecheros deben estar informados sobre los tratamientos que administran a los animales, deben respetar los tiempos de retiro en carne y leche; y utilizar los medicamentos según las indicaciones y con la dosis correcta de prescripción (76).

Todos los medicamentos veterinarios deben mostrar en su etiqueta el periodo de retiro o espera, caso contrario no se debe utilizar el producto. Solo se debe emplear medicamentos veterinarios autorizados o registrados por el SENASA (76).

II.6. CONTROL DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS

Según el Plan de Trabajo *“Identificación y prevención de peligros microbiológicos y de residuos de medicamentos veterinarios asociados al consumo de quesos frescos artesanales -DIA/ DIGESA/2016-2017”*. El 87% de los hogares peruanos consume quesos frescos artesanales elaborados a partir de la leche de ordeño como parte de su dieta diaria. Son departamentos como Cajamarca, Arequipa y Lima, quienes constituyen el 70% de la producción total del país (57).

Los primeros responsables de garantizar la inocuidad alimentaria son quienes procesan los alimentos, los distribuidores y comerciantes de medicamentos veterinarios; por lo que son necesarias las capacitaciones para este grupo. Los segundos responsables de garantizar la inocuidad alimentaria son las autoridades competentes nacionales [Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), Instituto Tecnológico de la producción (ITP) e inspectores privados] y autoridades extranjeras, mediante sistemas de vigilancia y control. Los terceros responsables son los consumidores (58).

El TCBZ, está incluido en la lista de “Residuos de medicamentos veterinarios con riesgo de presencia en quesos frescos artesanales”, que debe ser identificado por el programa de monitoreo de SENASA. La Dirección Regional de Salud Cajamarca (DIRESA Cajamarca), es la encargada de obtener las muestras de queso fresco en las plantas de

producción y centros de expendio de lugares seleccionados. SENASA obtiene y realiza los ensayos a las muestras de leche cruda de las plantas de elaboración de quesos muestreados por DIRESA Cajamarca (57). Según lo establecido por SENASA, está prohibido la introducción al mercado de alimentos que no cumplan con el LMR, ya que constituyen un potencial riesgo para la salud humana (59).

El TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 están incluidos dentro del “Programa Nacional de Monitoreo de Contaminantes en Alimentos agropecuarios primarios y piensos (2020)”, en base a lo establecido en el Artículo 32° del Decreto Supremo N° 004-2011-AG”, el cual comprende los establecimientos de producción y procesamiento primario de alimentos agropecuarios y mercados de abastos en 10 ciudades del territorio nacional como Arequipa, Cajamarca, Ica, La Libertad, Lambayeque, Lima, Piura, Puno, San Martín, Tacna. Dicho programa tiene como objetivo reducir al máximo la presencia de los contaminantes y microorganismos descritos, para prevenir los riesgos de salud pública. Además, prohíbe la introducción de productos alimenticios cuyos residuos (contaminantes y microorganismos patógenos) sean inaceptables, ya que afectan a los alimentos desde la etapa de producción hasta su consumo final, y podrían causar un riesgo en la salud pública (60, 61).

Los alimentos agropecuarios primarios y piensos del territorio nacional no deben exceder los límites máximos permisibles establecidos en la normativa nacional como primacía, en caso de no existir en esta, se debe regir en lo establecido por el Codex Alimentarius, por la Unión Europea y/o Autoridad Sanitaria de los Estados Unidos de América, en dicho orden de preferencia. Si no existe un límite máximo permisible, es SENASA quien se debe encargar de establecer los valores de referencia para los límites máximos cuantificables (60, 61).

II.7. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA

Las técnicas cromatográficas se definen como la separación de una mezcla de solutos, se basa en las diferentes velocidades de desplazamiento de estos al ser arrastrados en una fase móvil líquida a través de una fase estacionaria sólida. La cuantificación se basa en la

comparación del área o la altura del pico cromatográfico del analito del interés con patrones (estándares), ya que son proporcionales a la cantidad del compuesto eluido (62).

Para cuantificar se realiza una serie de disoluciones estándar que se aproximen a la concentración de la muestra desconocida, la representación de estos datos debe dar una recta, llamada curva de calibración. El factor de respuesta relativa debe estar dentro del intervalo de 0.8 – 1.2 (62).

Los factores que pueden afectar el comportamiento Cromatográfico son la composición, fuerza iónica, temperatura, pH, velocidad del flujo, dimensiones de la columna, presión de la columna, la fase estacionaria, etc (62).

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible que la leche cruda de vacas destinadas a la producción de derivados lácteos contenga residuos de TCBZ?

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de los residuos de TCBZ en leche de vacas procedentes de dos centros de crianza de ganado destinadas a la producción de derivados lácteos en el departamento de Cajamarca.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar mediante encuestas las prácticas y costumbres de los responsables de diferentes centros de crianza de ganado, y dueños de los establecimientos de venta de productos agroveterinarios de TCBZ en el departamento Cajamarca, según el área de sanidad de la Guía de Buenas Prácticas Pecuarias en explotación lechera del SENASA.

- Colectar muestras de heces de las vacas estudiadas para detectar la presencia o ausencia de los huevos de *F. hepatica*, mediante la Técnica de Sedimentación Rápida (TSR) y Técnica de Kato-Katz.
- Cuantificar el TCBZ y sus metabolitos (TCBZSO y TCBZSO₂) mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance con detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).

V. MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y MÉTODOLÓGÍA

V.1. MATERIALES

Para el presente trabajo de investigación se utilizó los siguientes reactivos de grado análisis:

TCBZ (Rakshit Drugs Private Limited), TCBZSO (Sigma-Aldrich, USA), TCZSO₂ (Sigma-Aldrich, USA), acetonitrilo grado HPLC (Avantor Performance Materials, S.A., México), acetato de amonio grado HPLC (Avantor Performance Materials, S.A., México), n-hexano grado HPLC (Avantor Performance Materials, S.A., México), sulfato de sodio anhidro (Merck KGaA, Alemania), fosfato de potasio monobásico (Merck KGaA, Alemania), bicarbonato de sodio (Merck KGaA, Alemania).

Además, se utilizó los siguientes materiales:

Columna C18 UG 120, 5 µm, 150 x 4.6 mm (Merck KGaA, Alemania), cartuchos de extracción en fase sólida Bond Elut LRC-C18, 500 mg (Agilent Technologies, USA) tubos de centrifuga estériles de 50 mL (Gosselin™, Francia), envases de plástico de 75 mL de boca ancha y tapa (VITLAB, Alemania), peras de decantación de 150 mL, probetas, vasos precipitados, fioles de 5, 10, 25, 50 y 100 mL.

V.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

HPLC-DAD modelo 1260 (Agilent, USA), Microscopio óptico (ACCU-SCOPE, China), Centrífuga universal modelo PLC-012E (Carper Labs, USA), Cocina eléctrica (Thermolyne Sybron Corporation, USA), Balanza analítica electrónica XS105DU 41g/120g (Mettler Toledo, USA), purificador de agua Milli-Q (Merck KGaA, Francia), micropipetas calibradas de 1000 mL (Eppendorf®, Alemania) y 100 mL (Eppendorf®, Alemania), baño ultrasónico (Emerson Electric Co, USA).

V.3. METODOLOGÍA

V.3.1. ENCUESTA

Se realizó dos encuestas diferentes a 30 participantes mayores de edad en el departamento de Cajamarca. Se dividió en dos grupos, un modelo de encuesta para 15 personas responsables (dueño, jefe, etc.) de los centros de crianzas de ganado y otro modelo de encuesta para 15 personas responsables de los establecimientos de venta de productos agroveterinarios (Anexo 1 y 2).

V.3.1.1. CÁLCULO DE TAMAÑO MUESTRAL Y JUSTIFICACIÓN DE ESTE

La población de centros de crianza de ganado (ganaderías) en Cajamarca son 16 (63). A partir de ello se calculó el tamaño muestral usando la formula N°1, dando como resultado 15.

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{e^2(N - 1) + Z^2 * p * q} \quad \dots \text{N}^\circ 1 \text{ (64).}$$

Donde:

N: Población=16

n: muestra =15.3987=15

p: probabilidad a favor = 50%

q: probabilidad en contra = 50%

Z: nivel de confianza= 95% = 1.96

e: error de muestra=5%

La población de establecimientos de venta de productos agroveterinarios son 15 (65). A partir de ello se calculó el tamaño muestral usando la formula N°1, dando como resultado 15.

Donde:

N: Población=15

n: muestra =14.66=15

p: probabilidad a favor = 50%

q: probabilidad en contra = 50%

z: nivel de confianza= 95% = 1.96

e: error de muestra=5%

Grupo 1: Personas responsables de los centros de crianzas de ganado:

La encuesta de este grupo sirvió para establecer los criterios de inclusión y exclusión de las muestras de leche y heces de las vacas lecheras, así como evaluar las prácticas y costumbres. Se invitó a participar en el estudio mencionando que el presente trabajo es un proyecto de tesis. De estar el participante interesado, se le otorgó un consentimiento informado y una encuesta aprobados por el comité de ética.

1. Se le realizó una encuesta de 12 preguntas, donde se le preguntó sobre diversos aspectos que conciernen a las vacas del participante.
2. Con los datos obtenidos se seleccionaron a 2 participantes. Luego, se comunicó si su centro de crianza de ganado (ganadería) fue seleccionado para el estudio. Previamente se solicitó permiso expreso para contactar a los participantes a través del consentimiento informado.
3. La participación culminó cuando el responsable del centro de crianza de ganado entregó las 2 muestras de leche por vaca (10 muestras de 5 vacas, aproximadamente 15-20 mL de leche por muestra). La fecha de la toma de muestra fue comunicada 2 semanas previas.

Grupo 2: Personas responsables de los establecimientos de venta de productos agroveterinarios:

Se invitó a participar en el estudio mencionando que el presente trabajo es un proyecto de tesis. De estar el participante interesado, se le otorgó una hoja informativa y una encuesta anónima.

1. Se realizó una encuesta de 8 preguntas, donde se le preguntó sobre algunos aspectos de los medicamentos antiparasitarios de uso interno que vende.
2. No se publicará en el estudio el nombre del establecimiento. Esta será mencionada en el estudio como “establecimiento de venta de productos agroveterinarios”.
3. La participación culminó cuando el participante entregó la encuesta completada

V.3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto fue revisado por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) y fue ejecutado luego de su aprobación (SIDISI 104363).

La información obtenida está en documentos Word cifrados con contraseña que solo saben los investigadores del estudio. Se guardó la información con códigos. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas, ni de los establecimientos que participaron en este estudio.

V.3.2.1. PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES Y DEL PERSONAL DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS DEL PROYECTO

El personal que manejó a los animales usó guantes obstétricos, mascarillas y mandil de laboratorio.

No se previó riesgos para los animales por participar en esta fase del estudio |, ya que la toma de muestra de heces fue realizada por el veterinario de la zona de toma de muestra,

y en caso del ordeño no existe peligro ya que es una técnica sencilla que será realizado por el responsable a cargo de la ganadería.

V.3.3. PROCEDENCIA Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Al ser la investigación exploratoria, el tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia tanto para las muestras de heces y leche. El tamaño de las muestras fue de 20 unidades según la metodología descrita por Takeba *et al.* (66). Las muestras de leche y heces fueron tomadas de vacas de 3-6 años de dos centros de crianza de ganado localizados en el departamento de Cajamarca.

Se obtuvieron 20 muestras de leche de 10 vacas (2 muestras por vaca, 15-20 mL de leche por muestra) mediante las técnicas de ordeño que se emplean en los centros de crianza de ganado del estudio. Se obtuvieron dichas muestras en dos momentos y con 24 horas de diferencia (0 horas y 24 horas). Las muestras de leche fueron congeladas a -18 °C hasta la fecha de su análisis en el Laboratorio de servicio de control de calidad-LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La toma de muestra de heces se obtuvo dentro de las 48 horas de la recolección de las muestras de leche (1 muestra por vaca). La toma de muestras de heces fue obtenida por un veterinario de la zona, estas se extrajeron directamente del recto de las vacas para evitar contaminación con el ambiente, para realizar la colección de las muestras se usó guantes para estudios obstétricos. Luego, fueron colocadas en envases de plástico de 75 mL de boca ancha y tapa rosca, hasta su procesamiento y estudio en el Laboratorio Clínico el Ingenio – Cajamarca.

V.3.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Centro de crianza de ganado con sistema de alimentación al pastoreo.
- Los responsables de los centros de crianza de ganado habían autorizado el estudio.

V.3.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Vacas no tratadas con TCBZ
- Aquellas vacas cuya leche no sea destinada para la producción de derivados lácteos.
- Vacas procedentes de centros de crianza de ganado cuyos responsables no hubiesen autorizado el estudio.

V.3.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE LECHE

Se usó la metodología publicada por Takeba *et al.* (66), con las siguientes modificaciones: no se empleó un concentrador al vacío, en su reemplazo se evaporó en una campana extractora a 82-90°C y se inyectó nitrógeno con una jeringa para disminuir el tiempo de la evaporación; no se usó la columna Capcell Pak C UG 120, 5 µm, 150 x 4.6 mm I.D. column (Shiseido, Tokyo, Japan) empleada por el autor, en su lugar se usó una columna igual, pero de la marca Merck KGaA de Alemania.

Se pesó 5.0 g de muestra de leche de vacas en tubos de centrifuga de 50 mL, se añadió 5 g de sulfato de sodio anhidro y 20 mL de acetonitrilo grado HPLC, y se homogenizó. Luego se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm y se transfirió el sobrenadante a una pera de decantación de 150 mL (66).

Se repitió la etapa de extracción con 10 ml de acetonitrilo y luego el sobrenadante se combinó en la pera de decantación de 150 mL. Se procedió a enjuagar los extractos de acetonitrilo usando 20 mL de n-hexano grado HPLC saturado con acetonitrilo. Seguidamente, se transfirió la capa inferior a tubos de centrifuga de 50 mL y se evaporó (66) empleando calor a 82 -90°C y nitrógeno dentro de una campana extractora (66).

A los residuos en los tubos de centrifuga se añadió 1 mL de fosfato de potasio monobásico 0.1 M y se sonicó durante 1 minuto en un baño de ultrasonidos. Luego se agregó 5 mL de bicarbonato de sodio 0.1 M, y se volvió a sonicar durante 1 minuto (66).

Por último, se aplicó la solución del extracto a los cartuchos de extracción en fase sólida C18. Luego, se enjuagó los cartuchos con 2 mL de agua destilada y se secó dejando pasar aire a vacío durante 3 minutos (66).

El TCBZ y sus metabolitos fueron eluidos con 2 mL de acetonitrilo grado HPLC. Finalmente, 20 µL de alícuotas de las soluciones del eluato y soluciones estándar se inyectaron en el HPLC-DAD para su análisis (66).

V.3.5. SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se usó la metodología descrita por Takeba *et al.* (66) la concentración de las soluciones madre de los estándares de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ fueron de 1 mg/mL. Se empleó acetonitrilo grado HPLC como disolvente (66).

V.3.6. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se usó metodología descrita por Takeba *et al.* (66), se inyectaron 20 µL de las soluciones del eluato y estándar a través de un inyector automático en un sistema HPLC-DAD. La separación se realizó en una columna Capcell pack C₁₈UG 120, 5 µm, 150 x 4.6 mm. La fase móvil isocrática consistió en acetonitrilo/acetato de amonio 0.05 M (50:50, v/v). La temperatura del horno de la columna estuvo a 40 °C y el flujo fue de 0.8 mL/min. La detección de los metabolitos de TCBZ se realizó a 295 nanómetros (nm).

V.3.7. TÉCNICA DE SEDIMENTACIÓN RÁPIDA (TSR) Y KATO-KATZ

Técnica de TSR: Se usó la técnica original de Lumbreras.

Se homogenizó 4-8 g de heces con 10-20 mL de agua corriente filtrada en un tubo cónico de 50 mL. Luego, se trasvasó la mezcla a un recipiente de 200-300 mL de capacidad, antes se tamizó con un colador. Se completó el volumen con agua corriente y se dejó reposar por 20 minutos. Luego, se decantó los 2/3 del sobrenadante y se completó con más agua corriente. Se repitió el mismo procedimiento a intervalos de 5 minutos, hasta

que el sobrenadante quede limpio. El último sedimento se vertió a una placa petri y se observó al microscopio a 100X. Esta técnica tiene una sensibilidad de 98.5 % y especificidad de 100% (80).

Técnica de Kato-Katz: Se usó la técnica descrita en la Norma Técnica de Salud para la vigilancia, prevención y control de la fasciolosis humana en el Perú, NTS N°148-MINSA

Con una bajalengua se transfirió la muestra de heces (0.5-1 g) sobre papel absorbente y se colocó en una malla de 2 x 3 cm. Con el aplicador del Kit se comprimió la malla para tamizar la muestra. Luego, se colocó el molde de plástico (con perforación central de 6 mm de diámetro) sobre una lámina portaobjeto y se rellenó la perforación con la muestra tamizada. Seguido, se levantó el molde dejando el cilindro de la muestra de heces en la lámina portaobjeto. Para finalizar, se colocará una laminilla glicerizada con verde malaquita sobre la muestra y con ayuda de un tapón de jebe se presionó sobre la laminilla para extender la muestra, se dejó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos y se observó al microscopio a 100 X, 400 X (42).

V.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Posterior a la obtención de los resultados por el software del registrador incorporado al HPLC, se usó Excel versión Microsoft® Office 365 ProPlus ® para los análisis estadísticos de las muestras.

V.3.8.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN HECES

El resultado se expresó en número de huevos por gramo de heces (hph). Donde el número de huevos encontrados se multiplicará por $k=24$. Si las heces son líquidas o pastosas, se usará el factor de corrección que se incluye en el kit: $k/2$ para heces sueltas o blandas y $k/3$ para heces diarreicas (42).

V.3.8.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN LECHE

Las curvas de calibración fueron hechas por la medición de las áreas de picos, a partir de ello se calculó las concentraciones de TCBZ, TCBZSO₂ y TCBZSO en las muestras de leche (66).

$$C \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{Am}{Ast} \times Cstx Fd \times p \times H \dots\dots\dots N^{\circ} 2$$

$$C \left(\frac{ug}{Kg \text{ de leche}} \right) = \frac{ug}{mL} \times \frac{mL \text{ de leche}}{g \text{ de leche}} \frac{1000 g \text{ de leche}}{1 kg \text{ de leche}} \dots\dots\dots N^{\circ} 3$$

Donde:

C = concentración de la muestra

Am: área de la muestra

Ast: área del estándar

Cst: concentración del estándar

Fd: inversa del factor de dilución

p: potencia

H: humedad (en caso aplique)

1 ml de leche equivale a 1.04 g de leche (67).

V.3.8.2.1. LINEALIDAD

Se usó metodología original descrita por Takeba *et al.* (66), se modificó las concentraciones de las diluciones a conveniencia. A partir de la solución madre se realizaron diluciones teóricas con fase móvil a 0.0626 ug/mL, 0.125 ug/mL, 0.25 ug/mL, 0.5 ug/mL, 1 ug/mL y 2 ug/mL, y fueron almacenadas a 4 °C. Se hizo 2 mezclas (n=2), y 3 inyecciones (réplicas) de 20 µL de las mezclas de las soluciones estándares de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ al sistema HPLC-DAD.

V.3.8.2.1. 1. TEST DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE

Se usó el test de regresión lineal simple para explicar la relación entre la respuesta (eje y) y una variable explicativa (eje x), mediante la siguiente fórmula descrita en el libro de sistema de análisis estadístico de Discovskyi y Pedroza (68).

$$y = \alpha \pm \beta X \dots\dots\dots N^{\circ} 4$$

Donde:

γ : respuesta

α : Intercepto

β : pendiente de la recta

X: variable explicativa

V.3.8.2.1.2. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

Para medir la dependencia lineal que existe entre la respuesta y la variable explicativa, se usó la siguiente fórmula descrita en el libro de sistema de análisis estadístico de Discovskyi y Pedroza (68).

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y} \dots\dots\dots N^{\circ} 5$$

Donde:

r: coeficiente de correlación muestral

S_{xy} : es la covarianza muestral entre el eje x y eje y

S_x : covarianza muestral del eje x

S_y : Covarianza muestral del eje y

El coeficiente de determinación (R^2) es el cuadrado del coeficiente de correlación muestral (68).

V.3.8.2.2. ESTABILIDAD

Se evaluó la estabilidad a temperatura ambiente de los estándares TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 a 1 ug/mL durante los días 1, 2 y 4. Se hizo dos mezclas de los 3 estándares y se realizó 3 inyecciones a cada mezcla, el método fue propio.

V.3.8.2.3. PRECISIÓN

Se usó la desviación estándar relativa (DSR) para evaluar la precisión del sistema cromatográfico a las áreas bajo la curva y tiempo de retención (TR), mediante 6 inyecciones a 1 ug/mL de soluciones estándar de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO2, esta debe ser menor del 2 %, según lo mencionado en los trabajos de investigación de Guissepe y Bor *et al.* (24, 71).

$$DSR (\%) = \left(\frac{DS}{\bar{x}} \right) \times 100 \dots\dots\dots N^{\circ} 6$$

$$DS = \frac{\sqrt{(x-\bar{x})^2}}{N-2} \dots\dots\dots N^{\circ} 7$$

Donde:

DSR: desviación estándar relativa o coeficiente de variación

DS: Desviación estándar

\bar{x} : promedio del área bajo la curva o tiempo de retención

N: número de datos

x: valores obtenidos

V.3.8.2.4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Se determinó a partir de los datos de seis diluciones cuyas concentraciones teóricas fueron 0.0626 ug/mL, 0.125 ug/mL, 0.25 ug/mL, 0.5 ug/mL, 1 ug/mL y 2 ug/mL, se realizó 3 inyecciones a cada dilucion. Se aplicó la ecuación obtenida en la regresión lineal para

obtener las concentraciones experimentales; el límite de cuantificación y detección se calculó mediante las siguientes fórmulas planteadas en el artículo de Herrera *et al.* (70).

$$LC = \frac{10 \times DS}{\beta} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 8$$

$$LD = \frac{3 \times DS}{\beta} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 9$$

$$DS = \sqrt{S^2_{xy}} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 10$$

$$S^2_{xy} = \frac{\sum y^2 - \alpha \sum y - \beta \cdot \sum xy}{n - 2} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 11$$

Donde:

LC: límite de cuantificación

LD: límite de detección

DS: desviación estándar

β : pendiente de la curva de calibración

α : intercepto

S^2_{xy} = Varianza

V.3.8.2.5. RECUPERACIÓN

Se usó metodología descrita por Takeba *et al.* (66) y la fórmula planteada en el artículo de Bor *et al.* (71). Se añadió una cantidad conocida de 1 ug/mL de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 a leche de tarro comercial, y se procedió de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección VI.3.4. Se hizo dos mezclas de los estándares y 3 inyecciones a cada muestra.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{C_e}{C_d} \times 100 \dots\dots\dots \text{N}^\circ 12 (71).$$

Donde:

Ce: Concentración encontrada

Cd: Concentración declarada o conocida

V.3.8.2.6. CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de leche y heces de ambos centros de crianza de ganado fueron codificadas de la siguiente manera:

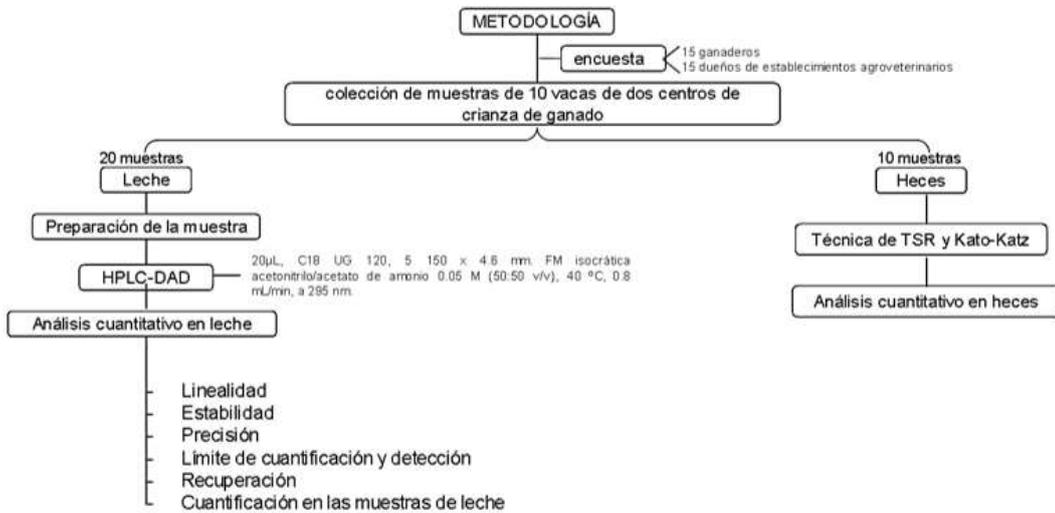
V1C1: vaca 1 del primer centro de crianza de ganado

V3C2: vaca 3 del segundo centro de crianza de ganado

V2C2T0: vaca 2 del segundo centro de crianza de ganado, muestra de leche tomada a las 0 horas.

V2C2T24: vaca 2 del segundo centro de crianza de ganado, muestra de leche tomada a las 24 horas.

Diagrama 1. Resumen de la metodología



Fuente: elaboración propia

VI. RESULTADOS

V.I.1. ENCUESTAS

Se realizó las encuestas a los responsables de los de los centros de crianza de ganado y dueños de los establecimientos de venta de productos agroveterinarios, en tres caseríos y una ciudad del departamento de Cajamarca, los resultados se muestran en el ANEXO 3.

En este estudio, mediante las encuestas realizadas se conoció las prácticas y costumbres de los ganaderos y proveedores de TCBZ en el departamento de Cajamarca, con respecto al grado de conocimiento sobre el tiempo de retiro, nivel de educación, tratamiento para *F. hepatica*, lugar de adquisición de los medicamentos según la Guía de Buenas Prácticas de Explotación lechera. También, con los resultados de la encuesta nos permitió establecer la temporada de toma muestras que fue en mayo en la época de lluvia de Jaén-Cajamarca, periodo que comprende los meses de octubre a abril (72). Por otro lado, en base a las encuestas se escogió por conveniencia a dos centros de crianza de ganado de la misma zona que hayan administrado el TCBZ de acuerdo con su realidad ganadera (como suelen hacerlo) y en distintos momentos.

Todos los ganaderos encuestados (n=15) tenían un total de 90 vacas. De ellos, 12 (80,0%) suelen consultar a un veterinario para el uso de medicamentos. Con respecto al TCBZ, el tiempo de espera para ordeñar es de 1-2 días (36,36%) y 2-8 días (63,64%). El 72,7% de ganaderos adquieren el TCBZ de veterinarias y 3 de otros establecimientos (27,3%). Los responsables que expenden productos agro-veterinarios encuestados (n=15) tienen nivel educativo técnico (46,67%), secundario (33,33%) o universitario (20,0%). El antiparasitario más vendido es el TCBZ (41,667%), ivermectina (29,167%), albendazol (25,0 %) y otros (4,167%). La mayoría (86,67%) adquiere los medicamentos con marca registrada de algún laboratorio. El 10.53 % de ganaderos dan tratamiento con TCBZ a sus vacas en las épocas de lluvia, y 42.09 % que incluye los meses de enero, marzo, octubre y diciembre (también época de lluvia en la zona).

VI.2. TÉCNICA DE TSR Y KATO-KATZ

Mediante la técnica de TSR todas las muestras de heces (n=5) del primer centro de crianza de ganado dieron negativos para huevos de *F. hepatica*, mientras que todas las muestras del segundo centro de crianza de ganado (n=5) dieron positivos para huevos de *F. hepatica*.

Para la técnica de Kato-Katz todas las muestras (n=10) de heces fueron blandas, por lo que se usó el factor de corrección de k=2 para hallar el número de huevos por gramo de heces (hph). Primer centro de crianza de ganado, no se observó ningún huevo de *F. hepatica* en las muestras de heces (n=5). Segundo centro de crianza de ganado, se observó huevos de *F. hepatica* en todas las muestras (n=5) en lámina, el resultado de las muestras V1C2, V2C2, V4C2 y V5C2 fue de 12 hph para cada uno, la muestra V3C2 fue de 24 hph. Los resultados se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados técnica TSR y Kato-Katz

Código	TSR (+ o -)	Kato-Katz (hph)
V1C1	-	0
V2C1	-	0
V3C1	-	0
V4C1	-	0
V5C1	-	0
V1C2	+	12
V2C2	+	12
V3C2	+	24
V4C2	+	12
V5C2	+	12

VI.3. LINEALIDAD

Se realizó una curva de calibración con 6 niveles de concentración teóricos a 0.063 ug/mL, 0.125 ug/mL, 0.25 ug/mL, 0.5 ug/mL, 1 ug/mL y 2 ug/mL a partir de las

soluciones madre de 1.008 ug/mL de TCBZ, 1.14 ug/mL de TCBZO y 1.02 ug/mL de TCBZSO2.

En la figura 6 se muestra las curvas de calibración obtenidas en función del promedio de las áreas cromatográficas frente a la concentración de la mezcla de los estándares de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO2, los resultados del promedio de las 6 inyecciones (n=2, 3 inyecciones para cada mezcla) se muestran en la tabla 2.

La curva de calibración para el TCBZ corresponde a una línea recta cuya ecuación es $y=793,72x$ con un $R^2= 0.9973$, ello indica que existe una relación lineal entre el área y su concentración; de igual manera para el TCBZSO y TCBZSO2 cuya ecuación es $y=775x$ con un $R^2= 0.9964$, así como de $y= 491,46x$ con una $R^2=0.996$, respectivamente.

Tabla 2. Diluciones de los estándares de Triclabendazol (TCBZ), Triclabendazol sulfóxido (TCBZSO) y Triclabendazol sulfona (TCBZSO2) a partir de las soluciones madre y el promedio de las áreas de picos de estos.

Concentración práctica (ug/mL)			Promedio área de picos (mAU*s)		
TCBZ	TCBZSO	TCBZSO2	TCBZ	TCBZSO	TCBZSO2
0.063	0.072	0.064	99.760	79.989	45.811
0.126	0.143	0.128	149.667	133.923	74.461
0.252	0.285	0.255	322.650	339.718	196.351
0.504	0.570	0.510	501.950	539.396	303.555
1.008	1.140	1.020	845.267	926.176	522.379
2.016	2.280	2.040	1682.867	1823.550	1035.860

Fig.6. Curva de calibración para los estándares de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO2.

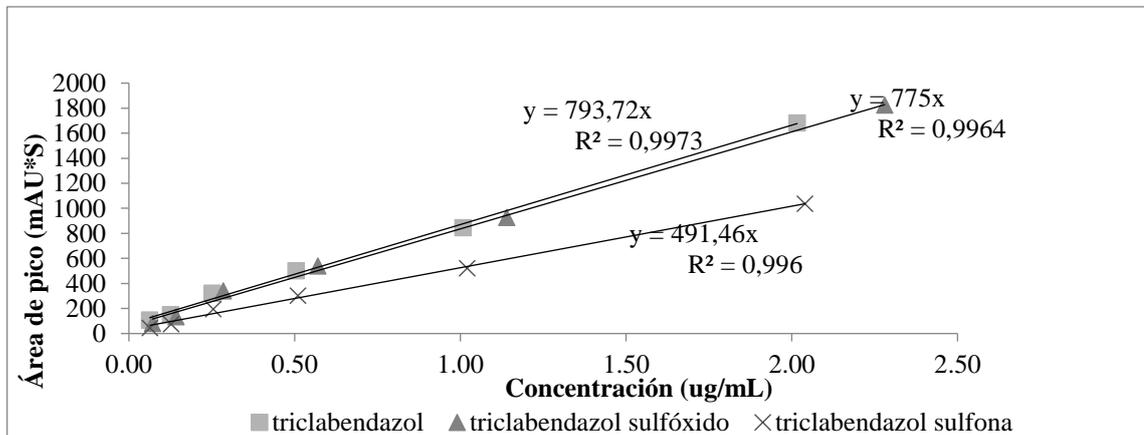
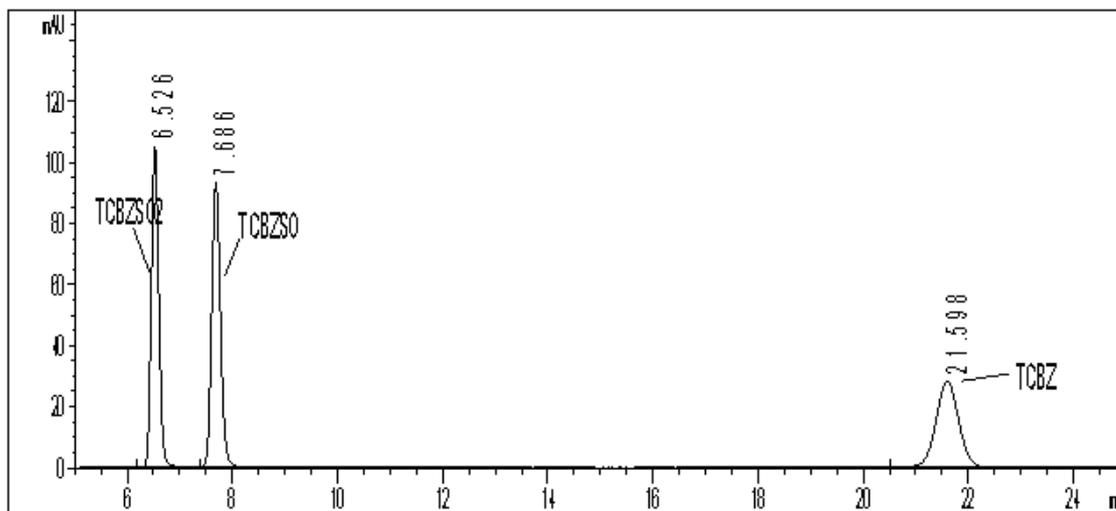


Fig.7. Cromatograma de los estándares de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2.



VI.4. ESTABILIDAD

Se hizo dos mezclas (A y B) de las soluciones estándar de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2. Se obtuvo las concentraciones a partir de la ecuación de la recta (Tabla 3, 4 y 5). Se evaluó la estabilidad a los días 1, 2 y 4 de los estándares para corroborar si existe algún cambio del TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 durante el tiempo que permaneció dentro del sistema HPLC, las concentraciones de los estándares se mantuvieron cerca al 100 % (concentración inicial - día 1), es decir estos fueron estables.

Tabla 3. Evaluación de la estabilidad del TCBZ

Mezcla	Día	Área de pico	Concentración (ug/mL)	Concentración (%)	DSR (%)	DS
A	1	893.3	1.1257	100.00	0.130	1.159
		892.4				
		894.7				
	2	897.7	1.129	100.33	0.140	1.250
		896.4				
		895.2				
4	891.4	1.123	99.79	0.209	1.861	
	893.6					
	889.9					
B	1	705.4	0.889	100.00	0.036	0.252
		705.7				
		705.2				
	2	709.2	0.894	100.55	0.022	0.153
		709.3				

		709.5				
		707.9				
4		709.7	0.894	100.57	0.411	1.465
		710.8				

Tabla 4. Evaluación de la estabilidad del TCBZSO2

Mezcla	Día	Área de pico	Concentración (ug/mL)	Concentración (%)	DSR (%)	DS
A	1	644.1	1.310	100.00	0.054	0.346
		643.5				
		644.1				
	2	648.8	1.320	100.73	0.053	0.346
		648.8				
		648.2				
4	646.1	1.318	100.57	0.232	1.500	
	647.6					
	649.1					
B	1	674.4	1.373	100.00	0.060	0.404
		674.4				
		675.1				
	2	678.1	1.380	100.52	0.148	1.002
		677.2				
		679.2				
4	667.3	1.359	99.01	0.835	1.607	
	666.8					
	669.8					

Tabla 5. Evaluación de la estabilidad TCBZSO

Mezcla	Día	Área de picos	Concentración (ug/mL)	Concentración (%)	DSR (%)	DS
A	1	943.5	1.217	100.00	0.067	0.635
		942.4				
		942.4				
	2	947.1	1.222	100.45	0.012	0.116
		947.1				
		946.9				
4	944.3	1.219	100.18	0.228	2.155	
	942.4					
	946.7					
B	1	655.3	0.846	100.00	0.075	0.493
		656.2				
		656.1				

	660.5				
2	660.2	0.852	100.68	0.023	0.153
	660.3				
	666.4				
4	667.6	0.860	101.67	0.074	0.666
	666.5				

VI.5. PRECISIÓN

Para el estudio de precisión se realizó 6 inyecciones a una concentración teórica de 1 ug/mL de las soluciones estándar de TCBZ, TCBZSO, TCBZSO2. Las %DSR para las áreas y tiempo de retención son menores al 2 % (Tablas 6, 7 y 8), es decir el método analítico es preciso.

Tabla 6. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZ a la concentración de 1.008 ug/mL

Inyección o réplicas	Tiempo de retención	Áreas de picos
1	21.753	863.4342
2	21.686	864.7100
3	21.448	863.7271
4	21.634	866.8024
5	21.624	865.2539
6	21.626	865.1337
\bar{x}	21.629	864.8436
DS	0.1014	1.212
DSR (%)	0.4690	0.140

Tabla 7. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZSO a la concentración de 1.14 ug/mL

Inyección o réplicas	Tiempo de retención	Área de picos
1	7.763	932.1652
2	7.666	931.2021
3	7.762	931.1740
4	7.674	931.2040
5	7.767	932.1656
6	7.758	932.4023
\bar{x}	7.732	931.7189
DS	0.0479	0.582
DSR (%)	0.6198	0.063

Tabla 8. Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de TCBZSO₂ a la concentración de 1.02 ug/mL

Inyección o réplicas	Tiempo de retención	Área de picos
1	6.607	517.6437
2	6.511	517.0529
3	6.605	517.7648
4	6.517	517.0433
5	6.610	517.0528
6	6.604	517.6326
\bar{x}	6.576	517.3650
DS	0.0478	0.349
DSR (%)	0.7277	0.068

VI.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Se aplicó la ecuación de la recta y se determinó las concentraciones experimentales de las seis diluciones de 0.063 ug/mL, 0.125 ug/mL, 0.25 ug/mL, 0.5 ug/mL, 1 ug/mL y 2 ug/mL. Los resultados de los LD y LC fueron 0.142 ug/mL y 0.475 ug/mL para el TCBZ; 0.135 ug/mL y 0.450 ug/mL para el TCBZSO; y 0.174 ug/mL y 0.579 para el TCBZSO₂ (Tabla 9). Los datos empleados en los cálculos se muestran en el ANEXO 4- Tablas 16, 17 y 18.

Tabla 9. Límites de cuantificación y detección del TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂

Compuesto	LD (ug/mL)	LC (ug/mL)
TCBZ	0.142	0.475
TCBZSO	0.135	0.450
TCBZSO ₂	0.174	0.579

VI.7. RECUPERACIÓN

Se enriqueció 2 muestras de leche de tarro comercial con cantidades conocidas de 1.02 ug/mL, 1.14 ug/mL, 1.008 ug/mL de TCBZSO₂, TCBZSO y TCBZ, respectivamente, se hizo tres inyecciones a cada mezcla.

Se obtuvo las concentraciones mediante la ecuación N°2, la potencia de los estándares de TCBZ, TCBZSO₂ y TCBZSO fue 99.88, 99.3 y 99.9%, respectivamente (ANEXO 8). No se usó la humedad para el cálculo y la inversa del factor de dilución fue 2, los datos empleados para los cálculos se muestran en el Anexo 5- tabla 19.

Las recuperaciones obtenidas para TCBZSO₂, TCBZSO, TCBZ fueron 97.6 % ± 1.0, 99.1 % ± 1.1, 98.3 % ± 1.3, respectivamente y desviación estándar de relativa (DSR) fueron de 0.3, 0.2, 0.3 %, respectivamente (Tabla 10), las cuales están dentro del rango de 98-102 % que valida la exactitud del método (24).

Tabla 10. Recuperación de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ de leche de tarro comercial enriquecida, n=2, tres inyecciones.

Compuesto	Concentración declarada(ug/mL)	Concentración encontrada (ug/mL)	Recuperación (% media ± DS)	DSR (%)
TCBZSO ₂	1.02	1.0	97.6 ± 1.0	0.3
TCBZSO	1.14	1.1	99.1 ± 1.1	0.2
TCBZ	1.008	1.0	98.3 ± 1.3	0.3

Fig.8. Cromatograma del blanco, leche de tarro sin enriquecer con soluciones de estándar.

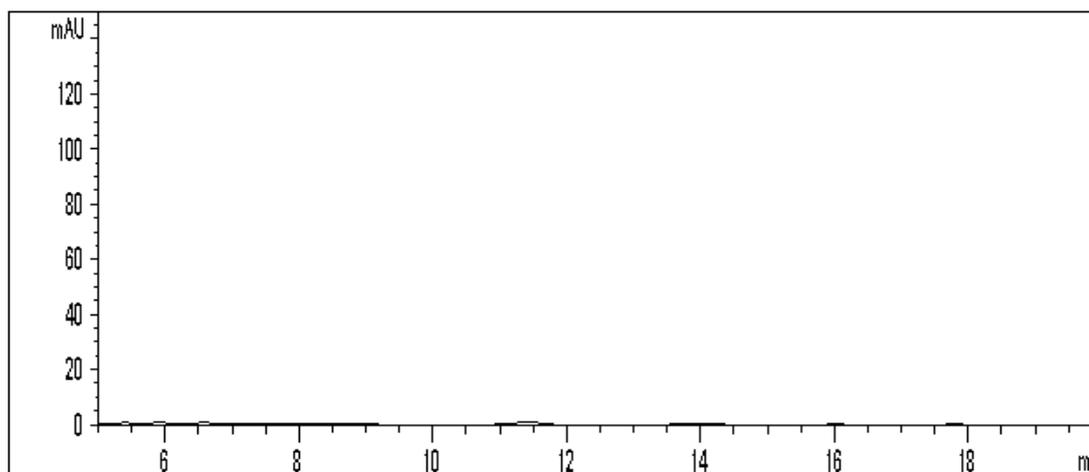
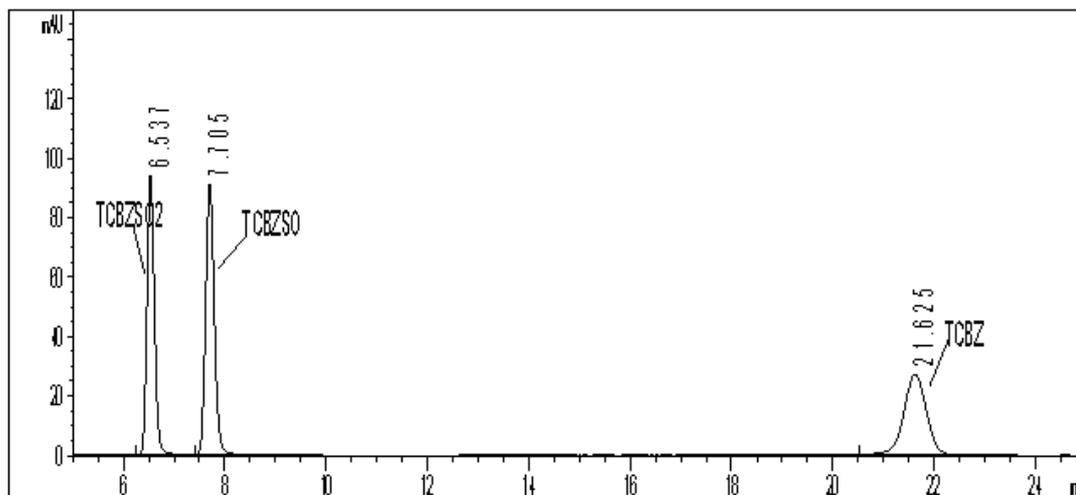


Fig.9. Cromatograma de las muestras de leche de tarro enriquecidas con TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2.



VI.8. CUANTIFICACIÓN EN LAS MUESTRAS DE LECHE

Se analizó 20 muestras de leche (10 vacas) de dos centros de crianza de ganado ubicados en un caserío de Jaén- Cajamarca ubicado a 2623 metros sobre el nivel del mar, el ordeño se realizó con 24 horas de diferencia. Los cromatogramas se muestran en el ANEXO 7.

Según lo consultado al participante del primer centro de crianza de ganado nos comentó que el veterinario administró a sus vacas sin pesarlas o “al ojo” el TCBZ (Distofin® 15%, 2 mL/25 kg peso vivo) como tratamiento para la fasciolosis, y fue aproximadamente 20 días previos a primera la toma (tiempo de retiro 20 días) de las siguientes muestras de leche, V1C1, V2C1, V3C1, V4C1, V5C1; durante toda la etapa de lluvia ya había administrado con TCBZ a sus vacas meses previos a la primera toma de muestras, esto lo hace cada vez que las observa con pérdida de peso.

El segundo centro de crianza de ganado administró también “al ojo” Distofin® a los 7 días previos a la primera toma (tiempo de retiro 7 días) de las siguientes muestras V1C2, V2C2, V3C2, V4C2, y 2 días previos (tiempo de retiro 2 días) para la muestra V5C2; durante toda la etapa de lluvia fue la única vez que este último medicó a sus vacas con TCBZ.

En el primer centro de crianza de ganado se determinó el TCBZSO en el 40% de muestras del primer centro de crianza de ganado a las 0 horas, mientras que el TCBZSO₂ en el 80% de muestras (a las 0 y 24 horas). Las concentraciones promedio de TCBZSO₂ a las 0 horas fue 0.076 ug/mL (78.791 ug/Kg de leche), y a las 24 horas fue 0.035 ug/mL (36.433 ug/Kg de leche). Las concentraciones del TCBZ estuvieron por debajo del LD. Todas las concentraciones del TCBZSO estuvieron por debajo del LC, el promedio de estas fueron 0.015 ug/mL (15.074 ug/Kg) las 0 horas, y a las 24 horas estuvieron por debajo del LD (Tabla 11 y 21).

En el segundo centro de crianza de ganado se determinó la presencia de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ en el 100% de las muestras del segundo centro de crianza de ganado. Las concentraciones promedio de las muestras V1C2, V2C2, V3C2 y V4C2 de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂, a las 0 horas fueron 0.268 ug/mL (279.135 ug/Kg de leche), 0.448 ug/mL (466.367 ug/Kg de leche) y 1.128 ug/mL (1172.590 ug/Kg de leche), respectivamente. A las 24 horas fueron 0.149 ug/mL (154.810 ug/Kg de leche), 0.272 ug/mL (282.746 ug/Kg de leche) y 0.756 ug/mL (785.759 ug/Kg de leche), respectivamente (Tabla 12 y 22).

En la muestra V5C2 las concentraciones promedio del TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂ a las 0 horas fueron, 0.846 ug/mL (879.464 ug/Kg de leche), 1.268 ug/mL (1318.854 ug/Kg de leche), 1.268 ug/mL (2152.683 ug/Kg de leche), respectivamente. A 24 horas las concentraciones de la muestra V5C2 fue 0.275 ug/mL (285.817 ug/Kg de leche), 0.599 ug/mL (623.016 ug/Kg de leche) y 1.838 ug/mL (1911.160 ug/Kg de leche), para el TCBZ, TCBZSO y TCBZSO₂, respectivamente (Tabla 22).

Tabla 11. Concentraciones promedio de los residuos de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 en muestras de leche del primer centro de crianza de ganado de Cajamarca, tiempo de retiro aproximado de 20 días.

Compuesto	Tiempo de toma de muestras (horas)	% de Muestras con TCBZ, TCBZSO y/o TCBZSO2	Concentración promedio		Rango	
			(ug/mL)	(ug/Kg de leche)	(ug/mL)	(ug/Kg de leche)
TCBZ	0	0	-	-	-	-
	24	0	-	-	-	-
TCBZSO	0	40	0.015	15.074	0.006 – 0.023	6.531 – 23.618
	24	0	-	-	-	-
TCBZSO2	0	80	0.076	78.791	0.016– 0.157	16.929 –163.084
	24	80	0.035	36.433	0.015 – 0.085	15.942 – 87.891

Tabla 12. Concentraciones promedio de los residuos de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 en muestras de leche del segundo centro de crianza de ganado de Cajamarca, excepto la muestra V5C2. Tiempo de retiro aproximado de 7 días.

Compuesto	Tiempo de toma de muestras (horas)	% de Muestras con TCBZ, TCBZSO y/o TCBZSO2	Concentración promedio		Rango	
			(ug/mL)	(ug/Kg de leche)	(ug/mL)	(ug/Kg de leche)
TCBZ	0	100	0.268	279.135	0.196 - 0.367	203.2690– 382.079
	24	100	0.149	154.810	0.111 - 0.262	115.219 – 271.928
TCBZSO	0	100	0.448	466.367	0.339 - 0.575	352.840 – 598.145
	24	100	0.272	282.746	0.168 - 0.330	175.167 – 342.909
TCBZSO2	0	100	1.128	1172.591	0.847 – 1.275	880.880 – 1325.976
	24	100	0.756	785.760	0.379 - 0.991	393.744- 1030.139

VII. DISCUSIÓN

Este trabajo buscó conocer si la leche contiene residuos de TCBZ, los cuales son un peligro para la salud pública y para el tratamiento para *F. hepatica*, esto último debido a su transferencia involuntaria en humanos como una posible causa de resistencia.

Rescatamos que el 100% de los ganaderos encuestados no sabían después de cuánto tiempo podían ordeñar a sus vacas y vender su leche, esta mala praxis es la causa principal que se encuentren en la leche cruda residuos de TCBZ. Cabe mencionar que según las contraindicaciones descritas en el envase primario de los medicamentos de TCBZ menciona que no se debe administrar en animales productores de leche para el consumo humano, esta indicación es muy ambigua, y no se ajusta a la realidad de Cajamarca que es hiperendémico de *F. hepatica*, productor de leche y donde se ha usado el TCBZ de manera irracional durante muchos años en los rumiantes (73, 77). Por ello, la autoridad sanitaria competente debe indicar después de cuantos días se puede ordeñar a las vacas lecheras en tratamiento con TCBZ, y no solo limitar o prohibir su uso como lo menciona en la Guía de Buenas Prácticas de Explotación lechera.

Se detectaron y cuantificaron los huevos de *F. hepatica* en todas las muestras del segundo centro de crianza de ganado (n=5), mediante las técnicas de TSR y Kato-Katz. Este resultado indica que el TCBZ en dosis únicas y a criterio personal, sin tomar en cuenta la dosis establecida por el fabricante, no fue eficaz para el control y tratamiento en las vacas que estaban infectadas con *F. hepatica* en este estudio y/o una posible resistencia al TCBZ. Esto probablemente a su uso irracional y falta de alternancia del medicamento durante muchos años que guarda relación con la creciente resistencia al TCBZ en animales (73, 74, 77). Lo expuesto es coherente con un estudio de investigación realizado en un fundo de Cajamarca que concluyó que el TCBZ tiene una insuficiente eficacia en el control de *F. hepatica* de la zona

Por otro lado, no se detectó la presencia de huevos de *F. hepatica* en todas muestras del primer centro de crianza de ganado (n=5), quien había tratado a sus vacas también a criterio personal (“al ojo”) aproximadamente 20 días previos a su toma de muestras y en meses previos durante la última época de lluvia en la zona. Esto tal vez se debe a que este

grupo se encuentra en la etapa prepatente de la enfermedad donde todavía no hay excreción de huevos, por ende, los exámenes coproparasitológicos son negativos, según lo publicado en el año 2005 por Leguia *et al.* (82).

Por otra parte, la muestra V5C2 cuyo tiempo de retiro fue de 2 días tuvo la mayor concentración de TCBZ y sus metabolitos en la leche cruda, seguido de las muestras cuyo tiempo de retiro fue a los 7 días y 20 días aproximadamente, en ese orden. El impacto de elegir a dos centros de crianza de ganado fue que nos permitió conocer que, a mayor tiempo de retiro en leche las concentraciones de los residuos de TCBZ disminuyen e incluso son indetectables aproximadamente a los 20 días. El TCBZSO y TCBZSO₂ a un tiempo de retiro aproximado de 20 días se encuentran en la leche cruda de vacas a nivel cuantificable mínimo de 0.006 ug/mL y 0.015 ug/mL. Nuestros resultados son coherentes con un estudio publicado en el año 2013 por Power *et al.* (22), donde investigaron la persistencia de los residuos de TCBZ en leche bovina y concluyeron que son necesarios los largos periodos de retiro para que los residuos de TCBZ estén por debajo del LMR vigente en ese entonces (10 ug/kg en leche).

En todas las muestras se encontró mayor concentración del TCBZSO₂ comparado con el TCBZSO y TCBZ. La concentración máxima del metabolito inactivo (TCBZSO₂) en leche a un tiempo de retiro de 20 días fue 163.084 ug/Kg. Lo mencionado es congruente con lo publicado en el año 2013 por Power *et al.* (22), quienes concluyeron que el TCBZSO₂ es el residuo más importante y de mayor concentración en leche. Además, encontraron 1710 ug/Kg de TCBZSO₂ hasta 20 días después del tratamiento con TCBZ (22), esto último difiere de nuestro resultado, ya que ellos trataron experimentalmente a sus vacas a una dosis correcta y conocida, en cambio nosotros muestreamos de acuerdo con la realidad ganadera de la zona donde los ganaderos usaron dosis a criterio personal (“al ojo”).

Los resultados de nuestro estudio indican que las concentraciones del TCBZSO y TCBZSO₂ halladas en el primer centro de crianza de ganado (tiempo de retiro aproximado de 20 días) fueron superiores al LMR provisional expirado. A este tiempo de retiro no se detectó el TCBZ debido a que su eliminación es casi por completo a los 10 días de la administración, según lo mencionado por la Agencia Española de

Medicamentos y Productos sanitarios (81). En cambio, en las muestras de leche del segundo centro de crianza de ganado (cuyo tiempo de retiro fue de 7 días) se halló una concentración máxima de 382.079 ug/kg de TCBZ, este resultado guarda relación con lo publicado en el año 2013 por Power *et al.* (22), quienes encontraron 244 ug/Kg de TCBZ en leche hasta 5.5 días post tratamiento. Se sugiere que el tiempo de retiro en leche sea superior a los 20 días, como lo indica la Agencia Europea de Medicamentos, lo cual no está en el envase primario del producto de los fabricantes de TCBZ.

No existen estudios aún demostrados sobre la resistencia parasitaria en humanos causada por la ingesta de residuos de medicamentos veterinarios a través de la leche u otros alimentos, pero sí en antimicrobianos. En 2018, Okocha *et al.* (84) comentaron que la presencia de residuos de antibióticos en los productos de la acuicultura puede causar resistencia bacteriana en los consumidores. Asimismo, en 2020, Bamidele y Festus (85) relacionaron el consumo involuntario de residuos de antibióticos en productos animales con el desarrollo de bacterias resistentes en humanos. En el 2018, el servicio Nacional de Salud Animal de Costa Rica indicó que se debe respetar los periodos de retiro para que estos no superen los límites permitidos y causen resistencia a los tratamientos contra infecciones (86). En 2013, Salas *et al.* (47) opinaron que se debe controlar la presencia de residuos de antibióticos en leche para evitar la aparición de resistencia en el ser humano.

Por lo expuesto, existe la posibilidad que los residuos de TCBZ puedan causar resistencia en humanos por un consumo involuntario de leche o lácteos, incluso en carne, esto debido a las prolongadas bajas dosis de exposición del medicamento.

Hasta la fecha no existe un LMR vigente para el TCBZ y sus metabolitos en leche cruda. En la norma vigente NTS N°120- MINS/DIGESA V.01-2016 que establece los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano, no contempla el LMR para los residuos de TCBZ (19). La Norma Técnica Peruana (NTP) que establece los requisitos de la leche cruda y productos lácteos (NTP 202.001.2016) indica que “la leche cruda deberá cumplir con los límites máximos permisibles de contaminantes indicados en la legislación nacional vigente, o en su defecto al Codex Alimentarius” (75). En el Codex tampoco se establece el LMR para el TCBZ, entonces

el encargado de definir el LMR para el TCBZ es SENASA (60, 61), ya que el único LMR provisional establecido por la EMA expiró el 1 de enero del año 2014 (16). Esto es alarmante ya que el TCBZ y sus metabolitos pueden ser detectados y cuantificados en la leche y lácteos (1, 21, 24 y 23), como muestran los resultados de nuestro estudio. Además, son fetotóxicos, están involucrados en la farmacocinética de otros medicamentos y pueden constituir un riesgo para la salud de las personas (37, 38, 39).

Por otra parte, en el Programa Nacional de Monitoreo de Contaminantes en Alimentos agropecuarios primarios y piensos (2020), solo contempla en su plan de monitoreo a 10 ciudades de gran abasto, entre ellos la ciudad de Cajamarca (60), pero no incluye a los proveedores de leche cruda alejados de la ciudad de Cajamarca o ubicados en caseríos donde las condiciones climáticas y hospederos de *F. hepatica* están presentes y donde usan el TCBZ para su tratamiento. La falta y/o poco control por parte de la autoridad sanitaria competente se refleja en los resultados de nuestras encuestas, y explica también la presencia del TCBZ y sus metabolitos (TCBZSO y TCBZSO₂) en las muestras de leche cruda analizadas en el presente estudio.

VIII. LÍMITACIONES DEL PROYECTO

En el desarrollo de la investigación se presentaron las siguientes limitaciones:

- La población exacta y real de centros de crianza de ganado (ganaderías) en Cajamarca y establecimientos de venta de productos agroveterinarios no se encuentran disponibles en la internet, quizás porque estos se encuentran en zonas rurales y sin acceso a internet. Por eso, para el cálculo del tamaño de las encuestas se usó los datos disponibles en el directorio de empresas de Páginas Amarillas (63, 65).
- No se analizó al ceto-TCBZ, ya que el estándar, que tuvo que ser importado para el estudio venció antes de iniciar la parte experimental del estudio, debido a la pandemia del covid 19 con la consecuente cuarentena prolongada y medidas restrictivas para los viajes no pudiéndose realizar lo planificado antes de la fecha de expiración del estándar.

IX. CONCLUSIONES

- Se podría explicar la presencia del TCBZ y sus metabolitos en la leche ordeñada y así, su transferencia a los humanos, debido a que todos los ganaderos encuestados no sabían cuál era el tiempo de retiro en leche. Esto evidencia deficiencias de capacitación por la autoridad sanitaria competente.
- Se confirma la presencia de huevos de *F. hepatica* pese a que las vacas han recibido tratamiento con TCBZ. Se concluye que el TCBZ en dosis únicas y “al ojo” no fueron eficaces para el control y tratamiento en las vacas infectadas con *F. hepatica* del estudio.
- Se determinó que el TCBZSO y TCBZSO2 a un tiempo de retiro aproximado de 20 días se encuentran en la leche cruda de vacas a nivel cuantificable mínimo de 0.006 ug/mL y 0.015 ug/mL, respectivamente; a este tiempo de retiro no se detectó el TCBZ.
- Se necesitan nuevos regímenes de control por parte de la autoridad sanitaria competente, ya que en el ámbito nacional no existe un tiempo de retiro y LMR vigente para el TCBZ y sus metabolitos, que garanticen la inocuidad de los lácteos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Power C, Danaher M, Sayers R, Clancy C, Jordan K, Furey A. Investigation of the migration of triclabendazole residues to milk products manufactured from bovine milk, and stability therein, following lactating cow treatment. *ScienceDirect*. 2013; 96: 6223-6232.
2. Marcos LA, Terashima A. Fascioliasis hepática en el Perú: una enfermedad emergente y desatendida. *Rev Peruana de Parasitología*. 2010; 18(1), 1-8.
3. Mildrey S, Patricia G, Onel L, Argemiro S, Sánchez T. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en vacas en pastoreo durante el período poco lluvioso. *Pastos y Forrajes*, 39(4), 281-285.
4. Espinoza J., Terashima A, Herrera P, Marcos LA. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev. perú. med. exp. salud pública*. 2010; 27(4): 604-612.
5. Keizer J, Engels D, Büscher G, Utzinger J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. 2005;14(12):1513-26.
6. Wolff K, Eckert J, Schneiter G, Lutz H. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goats. *Vet Parasitol*. 1983;13(2):145-50.
7. Terashima A, Marcos LA. Fracaso de dosis única de triclabendazole para el tratamiento de fasciolosis humana. *Acta méd. Peru*. 2016; 33(3): 228-231.
8. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica (resumen de características del producto). 2014. [Consultado el 22 de octubre del 2019]. Disponible en: https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/441+ESP/FT_441+ESP.pdf
9. Pérez J, Díaz M, Pérez A, Ferrere F, Monje B, Norman F, López R. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010; 28(1), 44-59.
10. Chang W, Pinto E, Guzman R, Terashima A Samalvides C. Caracterización clínica y epidemiológica de la infección por *fasciola hepática* entre los años 2003-2010 en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú. *Rev. gastroenterol. Perú*. 2016; 36(1): 23-28.

11. Novartis. Novartis renews drug donation of Egaten® (triclabendazole) until 2022, reaffirming its commitment to the fight against liver fluke. 2018. [Internet]. Disponible en <https://www.novartis.com/>
12. U.S. Food & Drug administration. Novel Drug Approvals for 2019. 2019. [Internet]. [Consultado el 05 de octubre del 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm629491.htm>
13. Corporación Colombina de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Los residuos de medicamentos en la leche, problemática y estrategias para su control. Bogotá: El Poirá S.A. 2003. [Internet]. [Consultado el 19 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19488>
14. Vademecum. Sofomax. MSD Animal Health. 2009-2019. [Internet]. [Consultado el 06 de octubre del 2019]. Disponible en: https://www.msd-animal-health.com.pe/products/sofomax/020_detalle_del_producto.aspx
15. Vademecum. FASIOMAX® 10%- Fasciolicida oral para ganado bovino y ovino. Asvet animal health. 2017. [Internet]. Disponible en: [http://www.peruvet-vademecum.com/detalleproducto.php?prod=FASIOMAX%C2%AE%2010%](http://www.peruvet-vademecum.com/detalleproducto.php?prod=FASIOMAX%C2%AE%2010%20)
16. European Medicines Agency (EMA). European public MRL assessment report (EPMAR)-Triclabendazole (all ruminants milk) – after the provisional maximum residue limit (MRL). 2014. [Consultado el 05 de octubre del 2019]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/triclabendazole-all-ruminants-milk-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-epmar_en.pdf
17. Comisión Europea. Reglamento de aplicación de la Comisión UE. N° 37/2010, de 22 de diciembre de 2009, sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación con respecto a los límites máximos de residuos en alimentos de origen animal. Comisión Europea, Bruselas, Bélgica. 2010. 68.
18. EGATEN. EGATEN™ (triclabendazole) tablets, for oral use Initial U.S. Approval.2019. [Internet]. [Consultado el 10 de octubre del 2019] Disponible en

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/208711s0001bl.pdf

19. Norma Técnica Sanitaria. Norma sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano. República del Perú, (3 de junio del 2016). Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/11/RM-372-2016-MINSA-con-NTS-120-MINSA-DIGESA-v01-LMR-Medicamentos.pdf>
20. Codex Alimentarius. Límites Máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. CX/MRL 2-2018. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXM%2B2%252FMRL2s.pdf>
21. Imperiale F, Ortiz P, Cabrera M, Farias C, Sallovitz J, Lanusse C. Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2011; 28(4), 438–445.
22. Power C, Whelan M, Danaher M, Bloemhoff Y, Sayers R, O'Brien B, Jordan K. Investigation of the persistence of triclabendazole residues in bovine milk following lactating-cow and dry-cow treatments. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2013; 30(6), 1080–1086.
23. Cabrera M. Determinación de niveles de metabolito de triclabendazol y albendazol en leche y sus potenciales efectos inmunotóxicos por exposición crónica en ovinos. [Tesis doctoral]. Perú: Universidad Nacional de Cajamarca. 2019. Disponible en: <https://1library.co/document/zkw4nkez-determinacion-metabolitos-triclabendazol-albendazol-potenciales-inmunotoxicospor-exposicion-cronica.html>
24. Reyna C, Giuseppe M. 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. [Tesis doctoral]. Perú: Universidad Nacional de Cajamarca. 2014. Disponible en: <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/1947>.

25. Moll L, Gaasenbeek CP, Vellema P, Borgsteede F. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2000. 91(1-2):153–158.
26. Brockwell Y., Elliott T, Anderson G, Stanton R, Spithill T, Sangster N. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2014; 4(1): 48–54.
27. Cabada MM, Lopez M, Cruz M, Delgado JR, Hill V, White AC Jr. Treatment Failure after Multiple Courses of Triclabendazole among Patients with Fascioliasis in Cusco, Peru: A Case Series. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1): e0004361.
28. Terashima A, Canales M, Maco V, Marcos LA. Observational study on the effectiveness and safety of multiple regimens of triclabendazole in human fascioliasis after failure to standard-of-care regimens. *J Glob Antimicrob Resist*. 202; 25:264-267.
29. Alvarez S, Mainar J, Pérez G, Rojo V. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary Record*. 2006; 159(13), 424–425.
30. Luis C, Diaz A, Rueda C, Martíneza C, Douglas C. Fascioliasis hepática humana: resistencia al tratamiento con triclabendazol. *Rev Med Chile*.2014; 142: 1330-1333.
31. Olaechea F, Lovera V, Larroza M, Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol*. 2011; 178: 364-6.
32. Mamani L, René C. Determinación de resistencia antihelmíntica (*Fasciola hepatica*) en ovinos frente a Albendazol y Triclabendazol, La Paz - Bolivia. *Rev de investigaciones veterinarias del Perú*. 2009;20(2):254-262
33. Moncada J. Efectividad y Resistencia Antihelmíntica de *Fasciola hepatica* a Triclabendazol en el fundo “El Cortijo”, distrito Baños del Inca- Cajamarca, Perú-2006. Perú: Universidad Nacional de Cajamarca. 2007. [Internet]. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/efectividad-resistencia-antihelmintica-fasciola-t27019.htm>

34. Marcelo R. Resistencia de la Fasciola hepatica a los fármacos: Caso Perú y Alternativa de Control. 2013. [Internet]. Disponible en <http://mrojas.perulactea.com/http://mrojas.perulactea.com/wp-content/uploads/2013/05/Perulactea-Fasciola-RESISTENCIA-PDF3.pdf>
35. Ortiz P, Cerna C, Rosales L, Carlos C, Fiel C, Guzman M, Scarcella S, Lamenza P & Solana H. Resistencia al Triclabendazole en ovinos infectados artificialmente con una cepa cajamarquina de Fasciola hepatica. 2012; 1-5. [Consultado el 08, octubre, 2019]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/84700664.pdf>
36. Ortiz P, Scarcella S, Cerna C, Rosales C, Cabrera M, Guzmán M, Solana H. Resistance of Fasciola hepatica against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2013; 195(1-2), 118–121.
37. ME Hurtt; GD Cappon; A. Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animals. 2003; 41 (5), 0–619.
38. Barrera B, Otero J, Egido E, Prieto J, Seelig A., Álvarez A, Merino G. The Anthelmintic Triclabendazole and Its Metabolites Inhibit the Membrane Transporter ABCG2/BCRP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012; 56(7), 3535–3543.
39. Giri P, Gupta L, Naidu S, Joshi V, Patel N, Giri S, & Srinivas N. In Vitro Drug-Drug Interaction Potential of Sulfoxide and/or Sulfone Metabolites of Albendazole, Triclabendazole, Aldicarb, Methiocarb, Montelukast and Ziprasidone. *Drug Metabolism Letters*. 2018; 12.
40. Keiser J, Engels D, Büscher G, Utzinger J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2015; 14(12), 1513–1526.
41. Alcaíno C & Werner A. Algunos antecedentes sobre la fascioliasis animal y humana. *Monografías de Medicina Veterinaria*. 1989; 11(1).
42. Norma Técnica Sanitaria. NTS N° 148-MINSA/2019/DGIESP: Norma Técnica de Salud para la Vigilancia, Prevención y Control de las Fasciolosis Humana en el Perú. Resolución Ministerial N°266-2019/MINSA, (19 de marzo del 2019). Disponible en:

https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/299908/Resoluci%C3%B3n_Ministerial_N__266-2019-MINSA.PDF

43. Machicado C, Machicado JD, Maco V, Terashima A, Marcos LA. Association of Fasciola hepatica Infection with Liver Fibrosis, Cirrhosis, and Cancer: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2016. 10(9): e0004962
44. Marcos L, Bussalleu A, Terashima A & Espinoza J. Detection of antibodies against Fasciola hepatica in cirrhotic patients from Peru. Journal of Helminthology, 2008; 83(01): 23.
45. Suárez V, Olaechea F, Rossanigo C & Romero J. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA. 2007; cap2.1:161-164.
46. Marcos L, Pedro Y, Terashima A Samalvides F, Machido A, Guitiérrez E, Sánchez J. Infección por Fasciola hepatica y cirrosis en ganado ovino y bovino. MV Rev.de Cien. Vet. Vol. 21 N°3. 2005.
47. Salas P, Calle S, Falcón N, Pinto C, Esponzoza J. Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche vacas tratadas contramastitis. Rev Inv Vet Perú 2013; 24(2): 252-255.
48. Boray J, Pearson I. Anthelmintic Efficiency of Tetrachloro difluoroethane against Fasciola hepatica in Sheep. Nature. 1960; 186(4720), 252–253.
49. López V, Artieda R, Mera A, Muñoz E, Rivera G, Cuadrado G Guevara A. Fasciola hepatica: aspectos relevantes en la salud animal. J.Selva Andina Anim. 2017; 4(2): 137-146.
50. Palma C, Godoy C, Arboix M & Pérez R. Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. Archivos de Medicina Veterinaria. 2006; 38(3).
51. Jave J, Alban M, Segastegui C, Soriano S. Tratamiento de la Fasciolosis Hepática Humana con Triclabendazole.Rev Perú Gastroenterol.1999; 19 (3): 216-20.
52. El-Karakasy H. Human fascioliasis in Egyptian children: successful treatment with triclabendazole. Journal of Tropical Pediatrics. 1999; 45(3): 135–138.
53. Villegas F, Angles R, Barrientos R, Barrios G, Valero MA, Hamed K, Grueninger H, Ault SK, Montresor A, Engels D, Mas-Coma S, Gabrielli AF. Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling

- fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8): e1720.
54. Winkelhagen A, Mank T, Soetekouw R. Apparent Triclabendazole-Resistant Human *Fasciola hepatica* Infection, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(6),1028–1029.
55. Rojas J. Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en Bovinos de la Campiña de Cajamarca – Perú. *Perulactea*.2012. Disponible desde: <http://www.perulactea.com/2012/04/10/resistencia-de-fasciola-hepatica-al-triclabendazol-en-bovinos-de-la-campina-de-cajamarca-peru/>
56. Reglamento (UE) 2018/782 de la Comisión de 29 de mayo del 2018 por el que se establecen los principios metodológicos aplicables a la evaluación de los riesgos y a las recomendaciones para la gestión de los riesgos a que se refiere el Reglamento (CE) nº 470/2009. Comisión Europea. (29 de mayo del 2018). Disponible en <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0782&from=EN>
57. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA)-MINSA. Plan de Trabajo “Identificación y prevención de peligros microbiológicos y de residuos de medicamentos veterinarios asociados al consumo de quesos frescos artesanales”- DIA/DIGESA/2016-2017. Disponible en: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/Plan-trabajo.pdf>
58. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Guía Práctica dirigida a productores emprendedores-Reglamento de inocuidad agroalimentaria. 2013. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/11/Guia-Inocuidad.pdf>
59. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Programa Nacional de Monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos- Resolución N° 035/13/AG/SENASA/DIAIA. 2013. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2019/07/PROGRAMA-NACIONAL-DE-MONITOREO.pdf>
60. Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA). Plan Anual de Monitoreo de Residuos Químicos y otros Contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos para el año 2020. Informe. 4 de enero del

2021. [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/senasa/informes-publicaciones/1456659-plan-anual-de-monitoreo-de-residuos-quimicos-y-otros-contaminantes-en-alimentos-agropecuarios-primarios-y-piensos-para-el-ano-2020>
61. Proyecto de Ley. Proyecto de ley que incorpora el artículo 288 ° - D al código penal, y tipifica el delito de uso de contaminantes para la producción agrícola. Proyecto de Ley N° 6078/2020-CR. Congreso de la República del Perú, (31 de agosto del 2020). Disponible en: https://leyes.congreso.gob.pe/Documentos/2016_2021/Proyectos_de_Ley_y_de_Resoluciones_Legislativas/PL06087-20200831.pdf
62. Douglas A. Skoog. Fundamentos de química analítica. Cuarta edición. Bogotá. Reverté. 2020.
63. Páginas Amarillas. Ganaderías en Departamento Cajamarca, Perú. [Página principal en Internet]. [Consultado el 20 de junio del 2019]. Disponible en <https://www.paginasamarillas.com.pe/departamento-cajamarca/servicios/ganaderias>
64. Martínez A. Tamaño de muestra y precisión estadística. Universidad Almería, edición III. 2004.
65. Páginas Amarrillas. Veterinarios en Departamento Cajamarca, Perú. [Página principal en Internet]. [Consultado el 20 de junio del 2019] Disponible en <https://www.paginasamarillas.com.pe/departamento-cajamarca/servicios/veterinarios>
66. Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Miyazaki T, Oka H, Itoh Y, & Nakazawa H. Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000; 882(1-2), 99–107.
67. Vallejo C, Díaz R, Morales W, Godoy V, Calderon N, Cegido J. Calidad Físicoquímica e Higiénico sanitaria de la leche en sistemas de producción doble propósito, Manabí-Ecuador. *Revista De Investigación Talentos*. 2018; 5(1), 35-44.
68. Pedroza H, Discovsky L. Sistema de análisis estadístico con SPSS. Managua, Nicaragua. LITONIC. 2006.

69. Maco V, Marcos L, Delgado J, Herrera J, Nestares J, Terashima A, Gotuzzo E. Efficacy and tolerability of two single-day regimens of triclabendazole for fascioliasis in Peruvian children. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48(4): 445–453
70. Herrera V, Ticona J, Udaeta E, Chuqui R, Giménez A. Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolónicos del extracto de *Galipea longiflora* Krause Kallunki. *BIOFARBO*. 2008; (1):47-53.
71. Bor, M, Guilarte A, Guzmán L, Macías K, Mendoza W. Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas. *Afinidad -Barcelona-*. 2007; 75. 32-38.
72. Marcelo-Peña José Luis. Vegetación leñosa, endemismos y estado de conservación en los bosques estacionalmente secos de Jaén, Perú. *Rev. peru biol*. 2008; 15(1): 43-52.
73. Rojas M, Palomino L, Calderón S, Terán Saucedo. Diagnóstico de resistencia antihelmíntica de *Fasciola hepática* a los antiparasitarios de uso más común en bovinos de cuatro distritos de Cajamarca, Perú. 2013. [Internet]. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/74-Resistencia_Antihelmintica_de_Fasciola.pdf
74. Chávez V Amanda, Sánchez R Lilian, Arana D Carlos, Suárez A Francisco. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Rev. investig. vet. Perú*. 2012; 23(1): 90-97.
75. Norma Técnica Peruana. Leche y productos lácteos. Leche cruda. Requisitos. NTP 2020.001. Sexta edición. Perú. 2016. Pp 6.
76. Servicio de Sanidad Agraria del Perú. Guía de Buenas Prácticas en Explotación Lecheras. Perú, (30 de julio de 2020). [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/senasa/informes-publicaciones/992144-guia-de-buenas-practicas-pecuarias-en-explotacion-de-lechera>
77. Luis A. Marcos, Vicente Maco & Angelica Terashima. Triclabendazole for the treatment of human fascioliasis and the threat of treatment failures. *Expert Review of Ant-Infective Therapy*. 2020. 1-7.
78. Kamaludeen J, Graham-Brown J, Stephens N, Miller J, Howell A, Beesley NJ, Hodgkinson J, Learmount J, Williams D. Lack of efficacy of

- triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. *Vet Rec.* 2019; 184:502.
79. Elliott TP, Kelley JM, Rawlin G, Spithill TW. High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet. Parasitol.* 2015;209: 117-24.
80. Lumbreras H, Cantella R, Burga R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, su evaluación y uso en el campo. *Revista Médica Peruana.* 1962; 31 (332): 167-174.
81. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica (Resumen de características del producto)- Fasinex 100mg/mL Bovino. [Internet]. Disponible en: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/lista.html>.
82. Li O, Leguía G, Espino A, Duménigo R, Díaz E, Otero O. Detección de anticuerpos y antígenos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en alpacas naturalmente infectadas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 16. 2005; 143-153.
83. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica (resumen de características del producto)-Fasinex. Madrid. (22 de julio de 2013). [Internet]. Disponible en: <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/lista.html>.
84. Okocha R, Olatoye I y Adedeji O. Impactos en la seguridad alimentaria del uso de antimicrobianos y sus residuos en la acuicultura. *Salud Pública Rev* 2018. 39, 21.
85. Bamidele F, Festus A. Residuos de medicamentos veterinarios en la carne y los productos cárnicos: presencia, detección e implicaciones. *Medicina veterinaria y farmacéutica.* 2020.
86. SENASA Costa Rica. Guía de uso responsable de medicamentos veterinarios en bovinos. 2018.

ANEXOS

ANEXO 1. ENCUESTA A LA PERSONA RESPONSABLE DEL CENTRO DE CRIANZA GANADERO

1. **¿Cuántas cabezas de ganado vacuno (vacas) tiene?**
.....
2. **La leche de sus vacas es destinada a la fabricación de productos lácteos**
a. Sí b. No c. A veces
3. **¿Qué medicamento veterinario le aplica o administra a sus vacas?**
.....
4. **Usted consulta al veterinario para el uso de los medicamentos veterinarios utilizados en sus animales**
a. Sí b. No c. A veces
5. **Utiliza usted medicamentos veterinarios para tratar enfermedades parasitarias**
a. Sí b. No c. A veces
6. **¿Si utiliza medicamento veterinario para la parasitosis, mencione el más usado?**
.....
A partir de la pregunta 7 las respuestas serán en base al medicamento veterinario para la parasitosis más usado
7. **¿Cada cuánto tiempo sus vacas son tratadas con el medicamento mencionado?**
.....
8. **¿Cuál es el tiempo de espera para poder ordeñar a sus vacas?**
.....
9. **¿Cómo dosifica el medicamento veterinario que usa en sus vacas?**
.....
10. **Considera usted un tiempo prudente desde la administración del medicamento y el tiempo de ordeño de sus vacas**
.....
11. **¿De dónde son adquiridos los medicamentos para sus vacas?**
.....
12. **¿En qué época-mes-meses del año se le da el tratamiento a sus vacas?**
.....

**ANEXO 2. ENCUESTA ANÓNIMA PARA LAS PERSONAS RESPONSABLES
DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE VENTA DE PRODUCTOS
AGROVETERINARIOS.**

Fecha:

1. **Es usted el dueño del establecimiento de venta de productos agroveterinarios.**
a. Sí b. No
2. **¿Qué estudios tiene usted?**
a. Primario b. Secundario c. Técnico d. Universitario
3. **En caso usted tenga una profesión, ¿Qué profesión estudió?**
.....
4. **¿Cuál de los siguientes antiparasitarios de uso interno es el más vendido para vacas?**
a. Albendazol b. Triclabendazol c. Ivermectina d. Otros (especifique) :
5. **Usted apoya a los ganaderos en la administración de los medicamentos, ¿En qué casos?**
.....
6. **¿Cómo contacta a sus compradores o clientes?**
.....
7. **¿De qué empresa o laboratorio adquiere los medicamentos?**
.....
8. **¿Usted hace alguna recomendación sobre la época-mes-meses del tratamiento de los animales?**
.....

ANEXO 3. RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS.

Tabla 13. Pregunta 4, ¿Usted consulta al veterinario para el uso de los medicamentos?

Respuesta	Frecuencia	%
Sí	12	80.00
No	1	6.67
A veces	2	13.33
Total	15	100.00

Tabla 14. Pregunta 11, ¿De dónde son adquiridos los medicamentos* para sus vacas?

Respuesta	Frecuencia	%
Veterinarias	8	72.73
Otros	3	27.27
Total	11	100.00

*Nota: Las respuestas fueron en base al TCBZ.

Tabla 15. Pregunta 4, ¿Cuál de los siguientes antiparasitarios de uso interno es el más vendido para vacas?

Respuesta	Frecuencia	%
Albendazol	6	25.00
Triclabendazole	10	41.67
Ivermectina	7	29.17
otros	1	4.17
Total	24	100.00

Gráfico 1. Pregunta 8, ¿Cuál es el tiempo de espera para poder ordeñar a sus vacas?

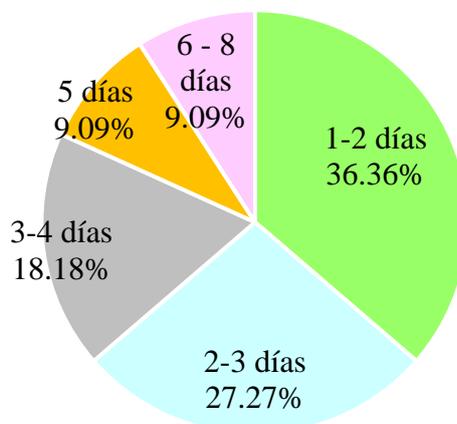


Gráfico2. Pregunta 2, ¿Qué estudios tiene usted?

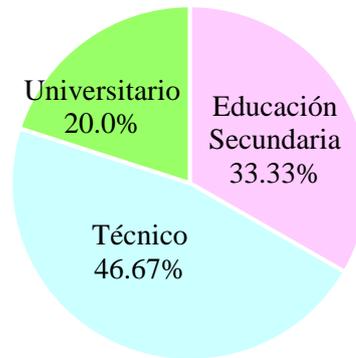


Gráfico 3. Pregunta 7, ¿De qué empresa o laboratorio adquiere los medicamentos?

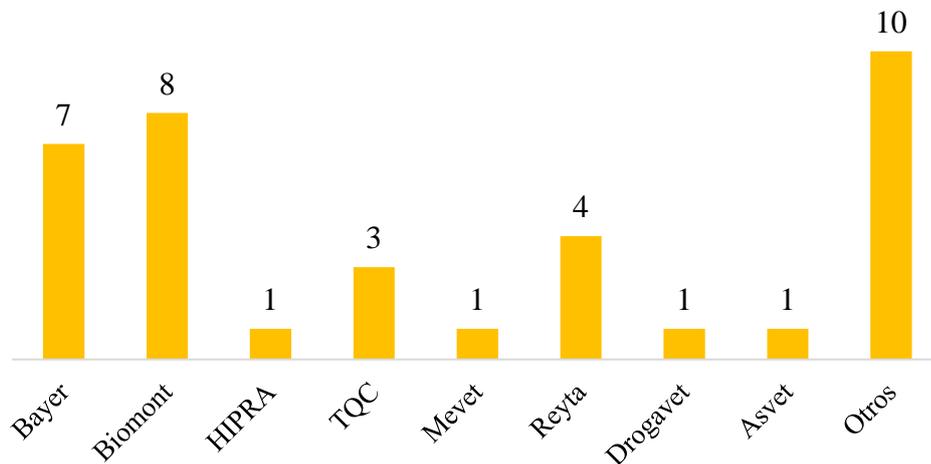


Tabla 16. Pregunta 12. ¿En qué época-mes-meses del año se le da el tratamiento a sus vacas?

Respuesta	%
Enero	5.26
Marzo	5.26
Junio	10.53
Julio	15.79
Octubre	5.26
Diciembre	26.32
Época de lluvia	10.53
Otros	21.05
Total	100.00

Nota: La tabla es en base al TCBZ

**ANEXO 4. DATOS EMPLEADOS PARA CALCULAR EL LÍMITE DE
DETECCIÓN (LD) Y EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC) DEL TCBZ,
TCBZSO Y TCBZSO2.**

Tabla 17. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZ

n=18	x	y	x.y	y²	y/x	Varianza
1	0.0639	93.1000	5.9491	8667.6100	1456.9640	
2	0.0629	93.9000	5.9063	8817.2100	1492.8458	1044.4167
3	0.0629	95.7000	6.0195	9158.4900	1521.4626	
1	0.1258	128.7000	16.1905	16563.6900	1023.0525	
2	0.1258	131.2000	16.5050	17213.4400	1042.9253	102.9974
3	0.1258	129.5000	16.2911	16770.2500	1029.4118	
1	0.2550	324.0000	82.6200	104976.0000	1270.5882	
2	0.2550	322.8000	82.3140	104199.8400	1265.8824	28.1430
3	0.2550	325.5000	83.0025	105950.2500	1276.4706	
1	0.5040	509.0000	256.5360	259081.0000	1009.9206	
2	0.5040	508.0000	256.0320	258064.0000	1007.9365	3.9368
3	0.5040	507.0000	255.5280	257049.0000	1005.9524	
1	1.0080	866.8000	873.7344	751342.2400	859.9206	
2	1.0080	865.2000	872.1216	748571.0400	858.3333	74.4441
3	1.0080	851.0000	857.8080	724201.0000	844.2460	
1	2.0160	1687.0000	3400.9920	2845969.0000	836.8056	
2	2.0160	1688.0000	3403.0080	2849344.0000	837.3016	0.5741
3	2.0160	1690.0000	3407.0400	2856100.0000	838.2937	
SUMA	11.9161	10816.4000	13897.5980	11942038.0600	19478.3134	1254.5121
α=	67.9958					
β=	805.0013					
S²xy=	1186.518					
DS=	34.446					
LD=	0.142					
LC=	0.475					

Tabla 18. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZSO

n=18	x	y	x.y	y²	y/x	Varianza
1	0.0639	78.51811	5.0173	6165.0936	1228.7654	
2	0.0639	78.61543	5.0235	6180.3858	1230.2884	12.3953
3	0.0639	78.18633	4.9961	6113.1022	1223.5732	
1	0.1275	119.57547	15.2459	14298.2930	937.8468	
2	0.1275	119.40107	15.2236	14256.6155	936.4790	0.4990
3	0.1275	119.52728	15.2397	14286.7707	937.4689	
1	0.2550	331.75046	84.5964	110058.3677	1300.9822	
2	0.2550	332.46808	84.7794	110535.0242	1303.7964	1.9926
3	0.2550	332.15897	84.7005	110329.5814	1302.5842	
1	0.5100	534.84937	272.7732	286063.8486	1048.7243	
2	0.5100	535.10040	272.9012	286332.4381	1049.2165	0.2229
3	0.5100	534.61902	272.6557	285817.4965	1048.2726	
1	1.0200	931.20398	949.8281	867140.8524	912.9451	
2	1.0200	932.16559	950.8089	868932.6872	913.8878	0.3872
3	1.0200	932.40234	951.0504	869374.1236	914.1199	
1	2.0400	1804.25403	3680.6782	3255332.6048	884.4383	
2	2.0400	1805.39258	3683.0009	3259442.3679	884.9964	0.2270
3	2.0400	1803.45874	3679.0558	3252463.4269	884.0484	
SUMA	12.0492	11403.6473	15027.5748	13623123.0801	18942.4337	15.7239
α=	56.4434					
β=	862.1042					
S²xy=	1507.9584					
DS=	38.832					
LD=	0.135					
LC=	0.450					

Tabla 19. Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación del TCBZSO2

n=18	x	y	x.y	y²	y/x	Varianza
1	0.0714	43.65358	3.1169	1905.6350	611.3947	
2	0.0714	44.36514	3.1677	1968.2656	621.3605	47.4723
3	0.0714	43.42089	3.1003	1885.3737	608.1357	
1	0.1425	68.93663	9.8235	4752.2590	483.7658	
2	0.1425	69.62814	9.9220	4848.0779	488.6185	10.5145
3	0.1425	69.81332	9.9484	4873.8996	489.9180	
1	0.2850	194.09700	55.3176	37673.6454	681.0421	
2	0.2850	195.34013	55.6719	38157.7664	685.4040	4.9418
3	0.2850	194.50606	55.4342	37832.6074	682.4774	
1	0.5700	294.16940	167.6766	86535.6359	516.0867	
2	0.5700	294.26141	167.7290	86589.7774	516.2481	0.0251
3	0.5700	294.08087	167.6261	86483.5581	515.9314	
1	1.1400	516.64368	588.9738	266920.6921	453.1962	
2	1.1400	517.05286	589.4403	267343.6600	453.5551	0.2477
3	1.1400	517.76483	590.2519	268080.4192	454.1797	
1	2.2800	1026.12598	2339.5672	1052934.5268	450.0553	
2	2.2800	1026.25659	2339.8650	1053202.5885	450.1125	0.2310
3	2.2800	1028.08582	2344.0357	1056960.4533	450.9148	
SUMA	13.4667	6438.2023	9500.6680	4358948.8414	9612.3965	63.4323
α=	30.5871					
β=	437.1996					
S²xy=	520.9580					
DS=	22.825					
LD=	0.174					
LC=	0.579					

ANEXO 5. DATOS EMPLEADOS PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LOS ESTÁNDARES EN LECHE.

Tabla 20. Datos usados para calcular el porcentaje de recuperación de TCBZ, TCBZSO y TCBSO2 en leche de tarro comercial enriquecida, n=2, tres inyecciones

	Compuesto	Área de pico	Concentración encontrada (ug/mL)	Recuperación (%)	DSR (%)	DS
SPIKED MEZCLA A	TCBZSO2	323.3	1.0	97.6	0.3	1.0
		323.6				
		323.0				
SPIKED MEZCLA B	TCBZSO2	325.2	1.1	99.1	0.2	1.1
		325.4				
		324.7				
SPIKED MEZCLA A	TCBZSO	542.7	1.0	98.3	0.3	1.3
		542.8				
		542.4				
SPIKED MEZCLA B	TCBZSO	544.9	1.0	98.3	0.3	1.3
		544.3				
		544.5				
SPIKED MEZCLA A	TCBZ	413.2	1.0	98.3	0.3	1.3
		413.3				
		413.1				
SPIKED MEZCLA B	TCBZ	411.2	1.0	98.3	0.3	1.3
		410.4				
		411.6				
ESTÁNDAR	TCBZSO2	660.3	1.0	98.3	0.3	1.3
		659.4				
		659.1				
ESTÁNDAR	TCBZSO	1095.8	1.0	98.3	0.3	1.3
		1095.0				
		1095.9				
ESTÁNDAR	TCBZ	836.6	1.0	98.3	0.3	1.3
		837.3				
		837.6				

**ANEXO 6. CONCENTRACIONES DE TCBZ, TCBZSO Y TCBZSO2 HALLADOS EN LAS MUESTRAS DE LECHE OBTENIDAS
EN LOS DOS CENTROS DE CRIANZA DE GANADO.**

Tabla 21. Concentraciones residuales de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 en muestras de leche del primer centro de crianza de ganado de Cajamarca. El tratamiento con TCBZ fue aproximadamente 20 días previos a la toma de muestra.

Código	Peso de muestra de leche (g)	Área (mAU*s)			Concentración encontrada (ug/mL)			Concentración encontrada (ug/Kg de leche)		
		CBZSO2	TCBZSO	TCBZ	TCBZSO2	TCBZSO	TCBZ	TCBZSO2	TCBZSO	TCBZ
V1C1T0		< LC	< LC	< LC						
V1C1T0	5.09	< LC	< LC	< LC	-	-	-	-	-	-
V1C1T0		< LC	< LC	< LC						
V1C1T24		< LC	< LC	< LC						
V1C1T24	5.10	< LC	< LC	< LC	-	-	-	-	-	-
V1C1T24		< LC	< LC	< LC						
V2C1T0		38.4	8.3	< LC						
V2C1T0	5.02	38.3	8.6	< LC	0.157*	0.023*	-	125.487	23.618	-
V2C1T0		38.9	9.5	< LC						
V2C1T24		24.5	< LC	< LC						
V2C1T24	5.22	24.5	< LC	< LC	0.085*	-	-	72.302	-	-
V2C1T24		13.3	< LC	< LC						
V3C1T0		13.7	< LC	< LC						
V3C1T0	5.03	13	< LC	< LC	0.055*	-	-	40.842	-	-
V3C1T0		13.5	< LC	< LC						
V3C1T24		5.6	< LC	< LC						
V3C1T24	5.05	5.9	< LC	< LC	0.024*	-	-	51.704	-	-
V3C1T24		6.2	< LC	< LC						

V4C1T0		17.9	< LC	< LC						
V4C1T0	5.11	18.3	< LC	< LC	0.075*	-	-	48.178	-	-
V4C1T0		19.4	< LC	< LC						
V4C1T24		3.9	< LC	< LC						
V4C1T24	5.02	4.3	< LC	< LC	0.017*	-	-	17.423	-	-
V4C1T24		4.5	< LC	< LC						
V5C1T0		4.2	2.3	< LC						
V5C1T0	5.07	4.1	2.5	< LC	0.016*	0.006*	-	16.435	6.531	-
V5C1T0		3.7	2.5	< LC						
V5C1T24		3.9	< LC	< LC						
V5C1T24	5.04	3.6	< LC	< LC	0.015*	-	-	15.942	-	-
V5C1T24		3.8	< LC	< LC						

Nota: * valor inferior al LC

Tabla 22. Concentraciones residuales de TCBZ, TCBZSO y TCBZSO2 en muestras de leche del segundo centro de crianza de ganado de Cajamarca. El tratamiento con TCBZ fue siete días previos a la toma de muestras, excepto para la vaca con código V5C2 el cual fue dos días previos.

Código	Peso de muestra de leche (g)	Área (mAU*s)			Concentración encontrada (ug/mL)			Concentración encontrada (ug/Kg de leche)		
		TCBZSO2	TCBZSO	TCBZ	TCBZSO2	TCBZSO	TCBZ	TCBZSO2	TCBZSO	TCBZ
V1C2T0		313.1	131.1	113.6						
V1C2T0	5.19	313.4	132	114	1.275	0.339*	0.285*	1325.97	352.840	296.387
V1C2T0		313.4	131.3	111.7						
V1C2T24	5.08	92.9	127.7	42.8	0.379	0.330*	0.111*	393.744	342.909	115.218
V1C2T24		93.1	127.5	43.7						

V1C2T24		93.1	128.1	45.4						
V2C2T0		303.8	187.9	89.8						
V2C2T0	5.11	304.2	189.3	89.5	1.238	0.486	0.226*	1287.321	505.820	234.803
V2C2T0		304.5	188.2	89.5						
V2C2T24		213	64.9	44.6						
V2C2T24	5.06	213.9	65.4	44.8	0.868	0.168*	0.112*	902.606	175.167	116.004
V2C2T24		212.9	65.5	43.4						
V3C2T0		207.9	153.5	75.3						
V3C2T0	5.08	208.2	151	80.9	0.847	0.393*	0.196*	880.880	408.664	203.269
V3C2T0		208.3	152.3	76.5						
V3C2T24		192.9	125.6	44.1						
V3C2T24	5.17	192.8	125.9	44.1	0.785	0.325*	0.112*	816.549	337.542	116.091
V3C2T24		193.1	125.8	44.7						
V4C2T0		282.7	222.8	146.4						
V4C2T0	5.02	282.6	222.9	145.7	1.150	0.575	0.367*	1196.186	598.145	382.079
V4C2T0		282.6	222.9	145.3						
V4C2T24		243.5	103.1	103.3						
V4C2T24	5.14	243.2	102.7	103.8	0.991	0.265*	0.262*	1030.139	275.365	271.928
V4C2T24		243.5	102	104.2						
V5C2T0		508	497.4	342.3						
V5C2T0	5.09	508.2	492.4	330.6	2.070	1.268	0.846	2152.683	1318.854	879.464
V5C2T0		509.7	484.4	333.9						
V5C2T24		459	231.8	110.2						
V5C2T24	5.18	451.6	231.9	109.1	1.839	0.599	0.275*	1911.160	623.016	285.817
V5C2T24		444.1	232.7	107.9						

Nota: <LD: menor que el límite de detección, * valor inferior al LC

**ANEXO 7. RESULTADOS DE LOS CROMATOGRAMAS DE LA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE CON DETECTOR
DE ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD).**

Fig.10. Cromatograma de la muestra VIC1T0

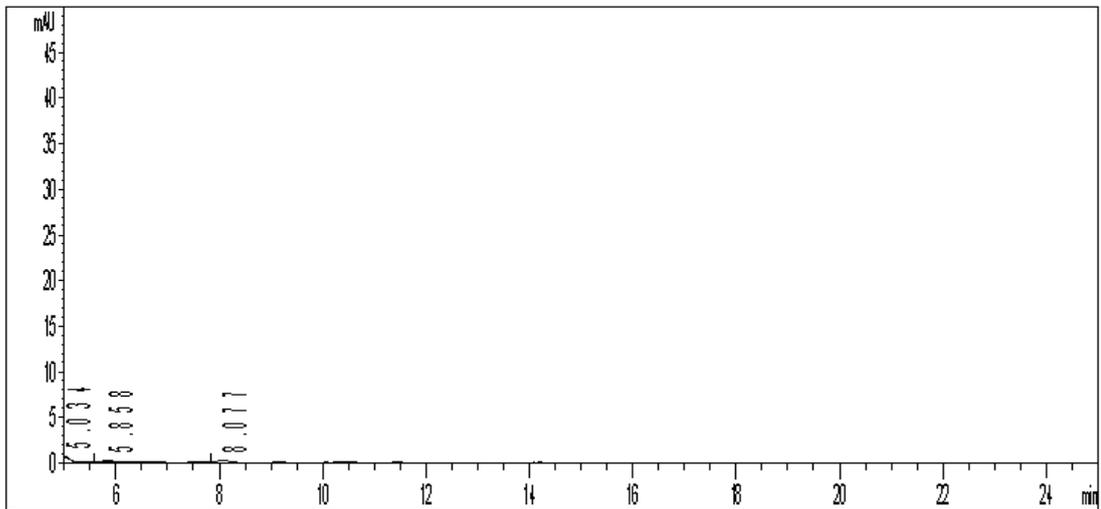


Fig.11. Cromatograma de la muestra VIC1T24

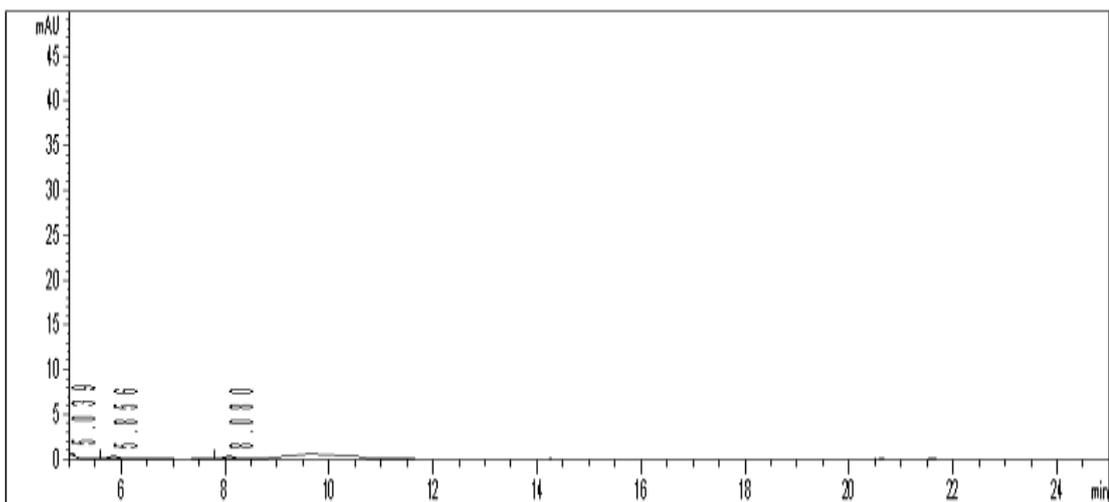


Fig.12. Cromatograma de la muestra V2C1T0

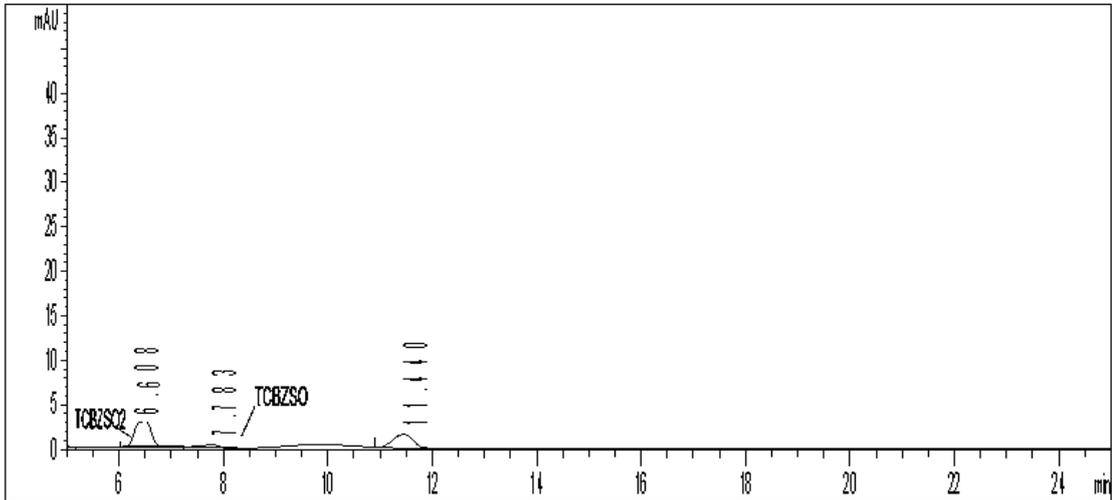


Fig.13. Cromatograma de la muestra V2C1T24

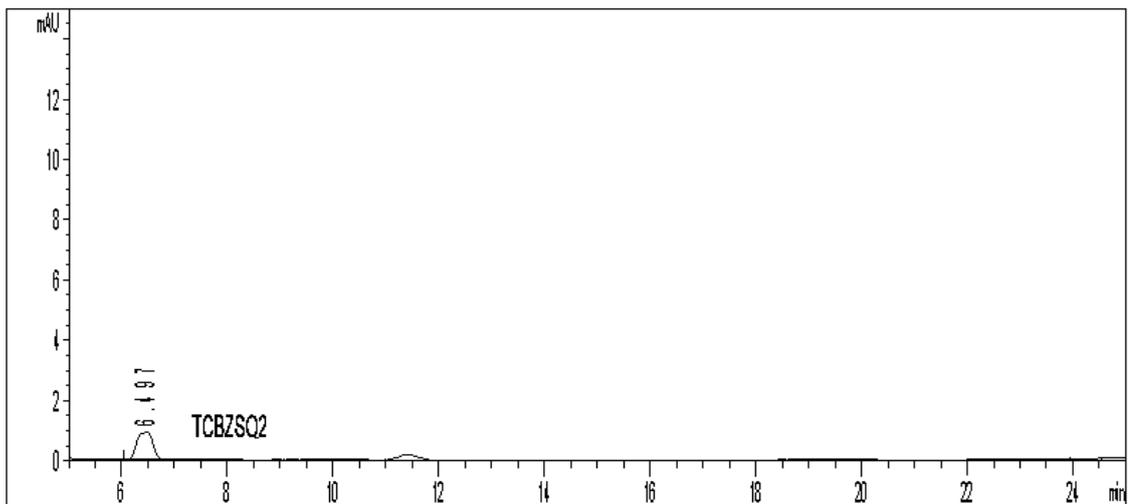


Fig.14. Cromatograma de la muestra V3C1T0

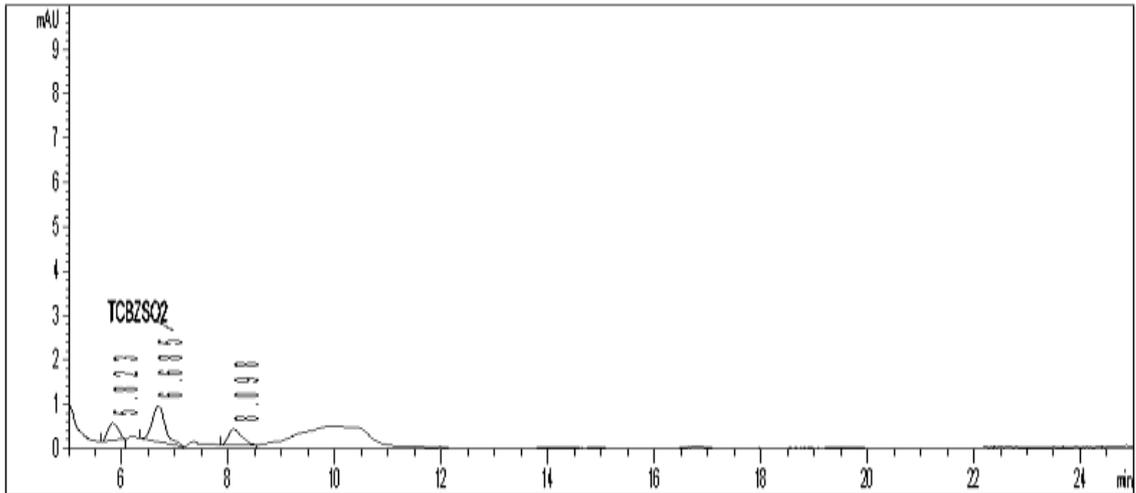


Fig.15. Cromatograma de la muestra V3C1T24

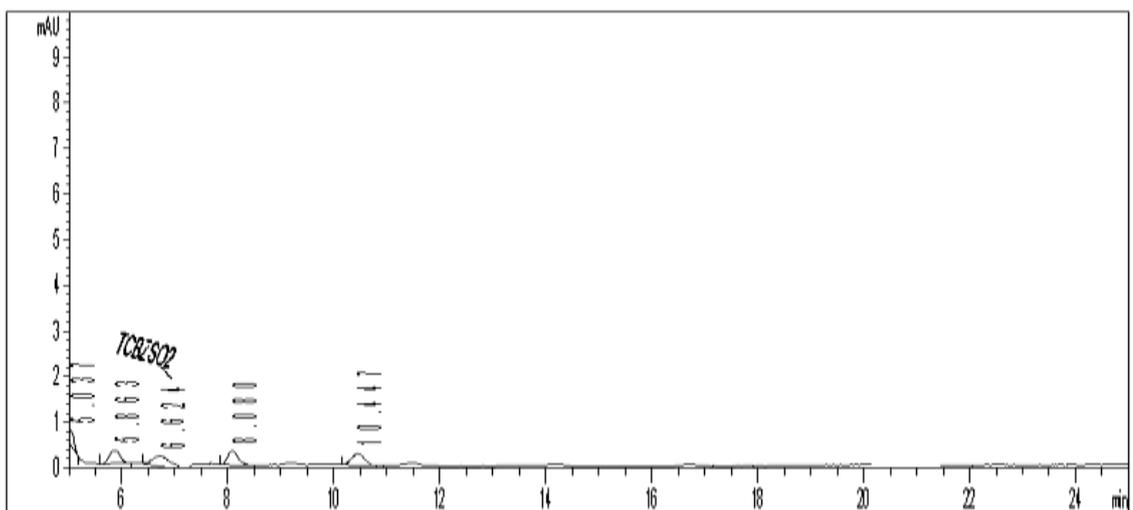


Fig.16. Cromatograma de la muestra V4C1T0

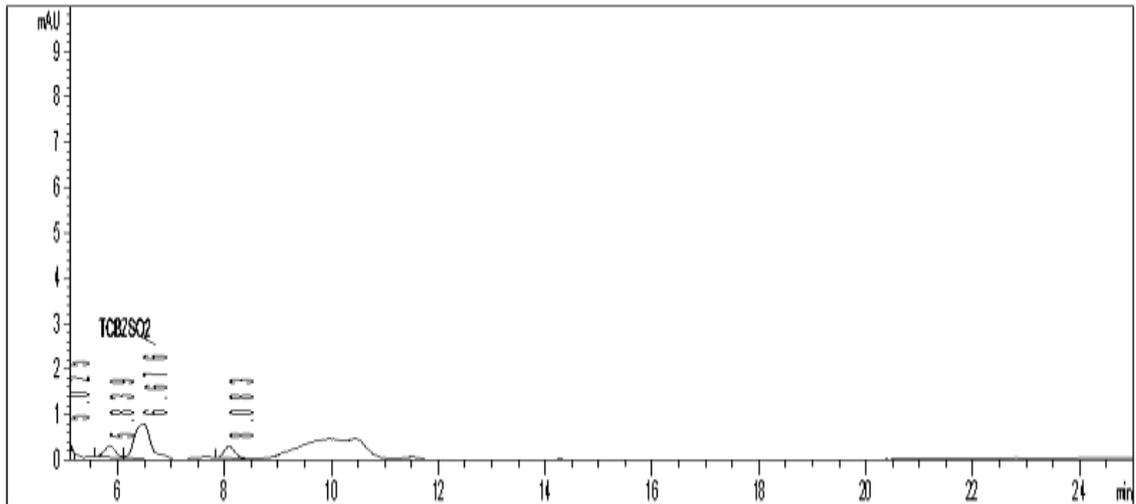


Fig.17. Cromatograma de la muestra V4C1T24

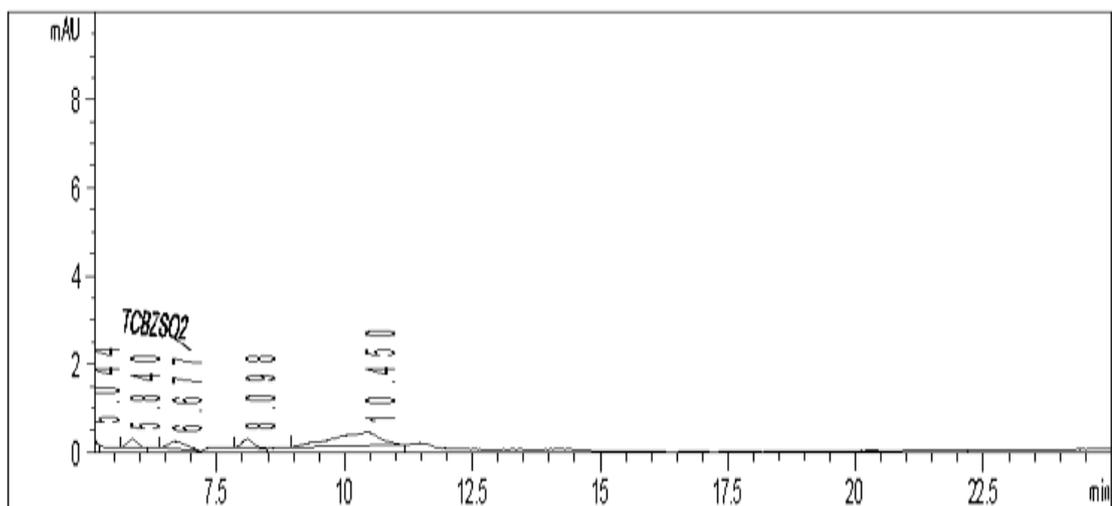


Fig.18. Cromatograma de la muestra V5C1T0

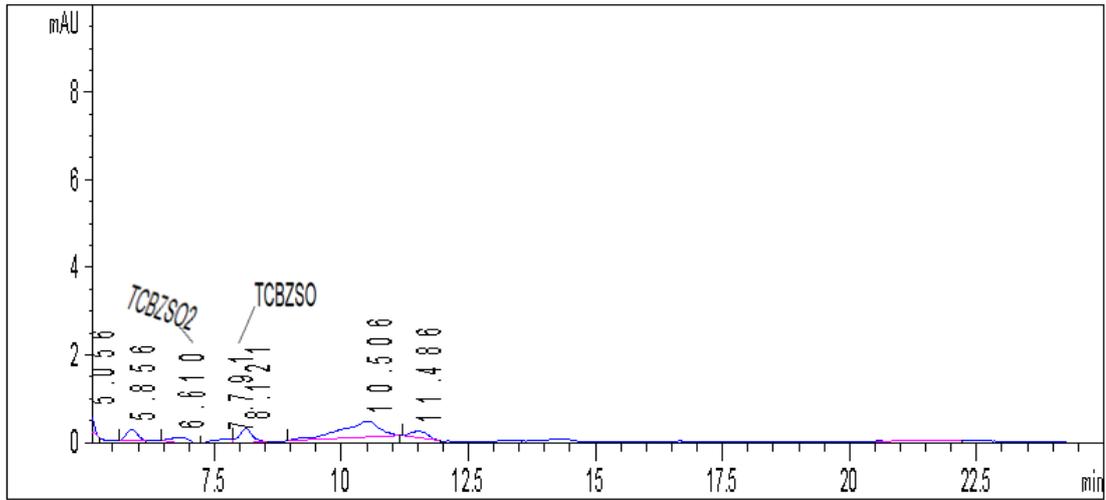


Fig.19. Cromatograma de la muestra V5C1T24

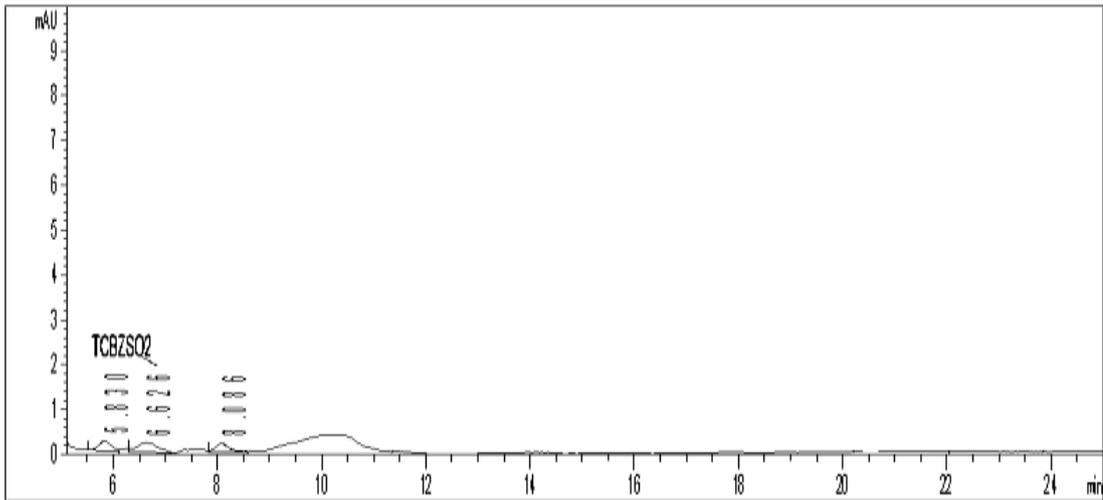


Fig.20. Cromatograma de la muestra V1C2T0

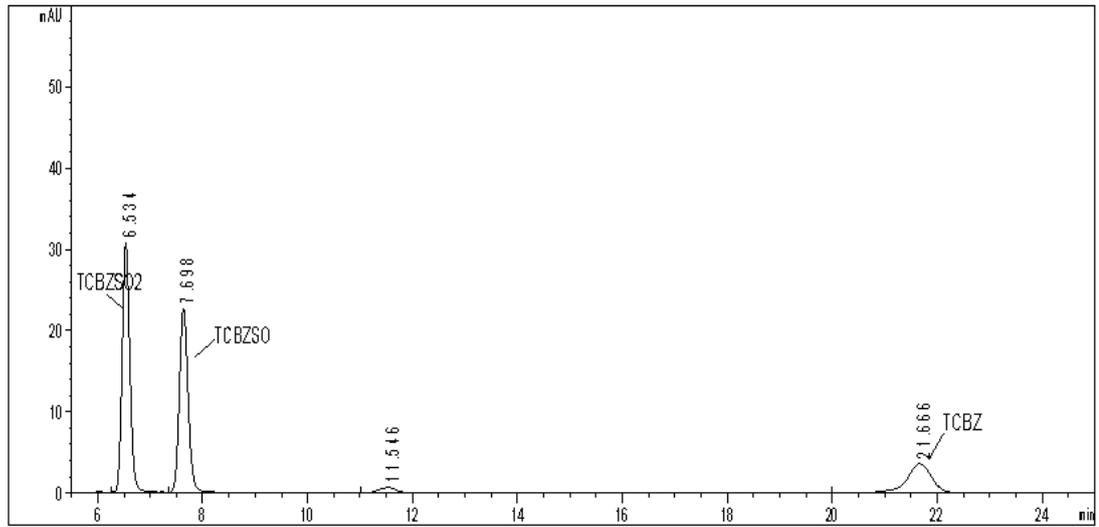


Fig.21. Cromatograma de la muestra V1C2T24

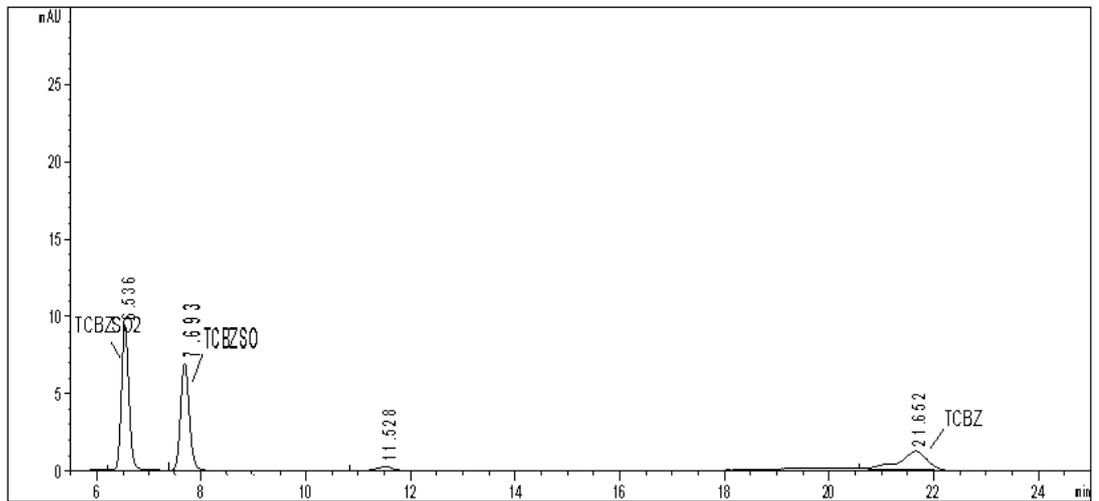


Fig.22. Cromatograma de la muestra V2C2T0

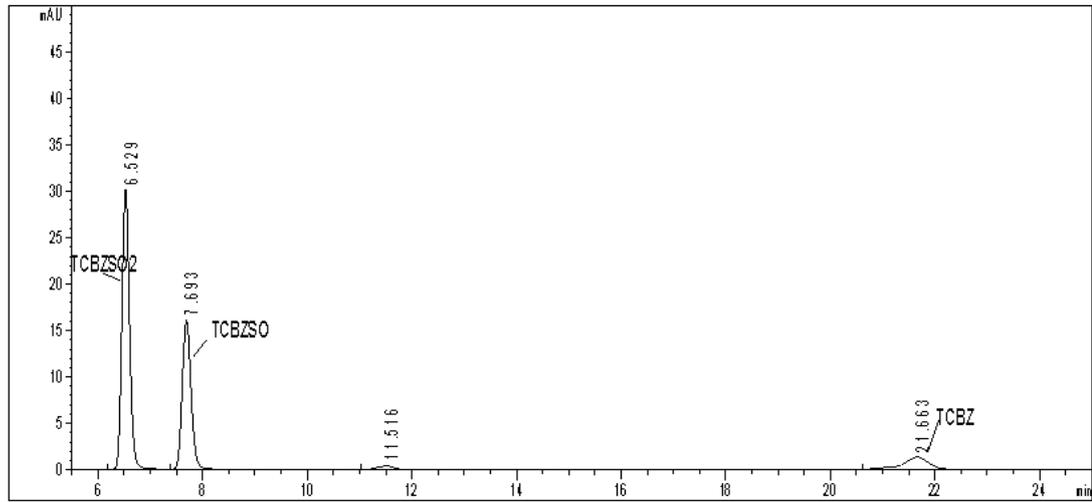


Fig.23. Cromatograma de la muestra V2C2T24

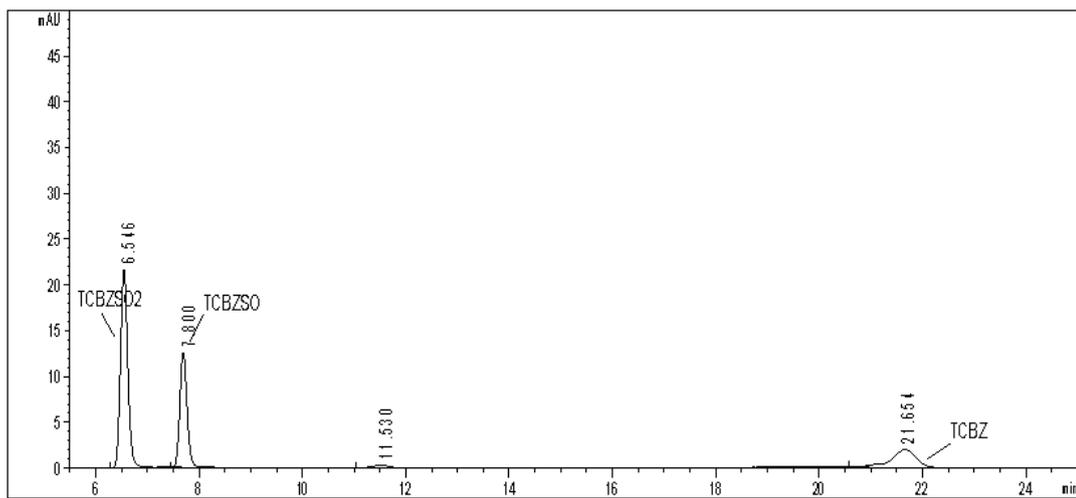


Fig.24. Cromatograma de la muestra V3C2T0

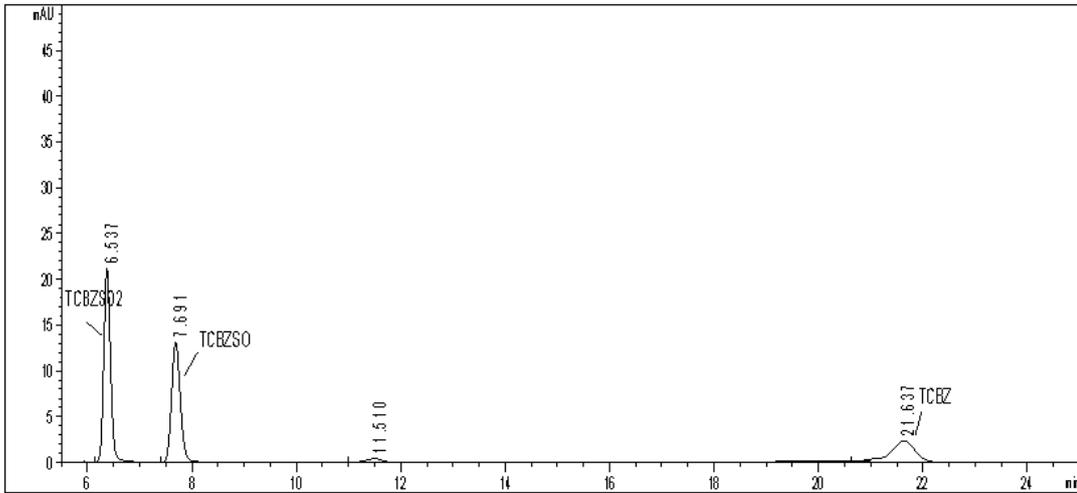


Fig.25. Cromatograma de la muestra V3C2T24

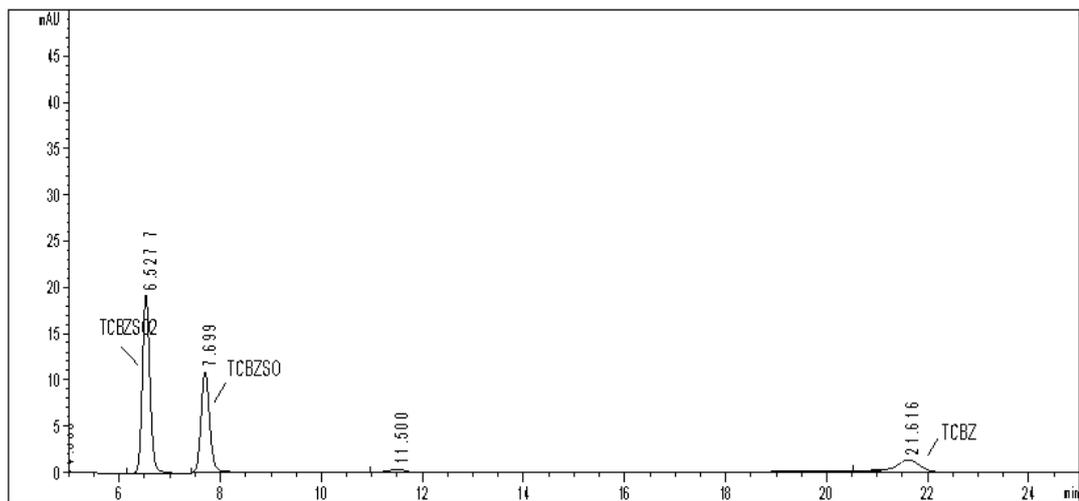


Fig.26. Cromatograma de la muestra V4C2T0

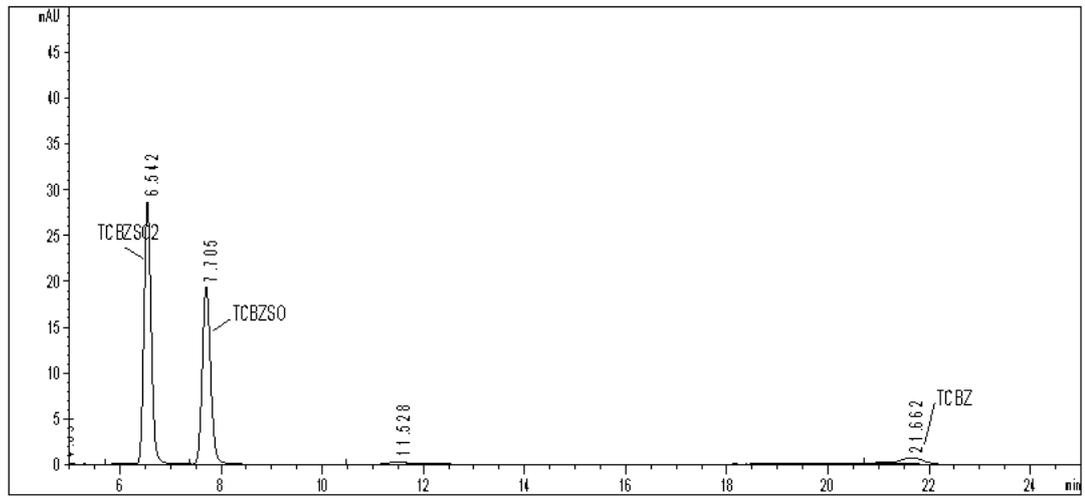


Fig.27. Cromatograma de la muestra V4C2T24

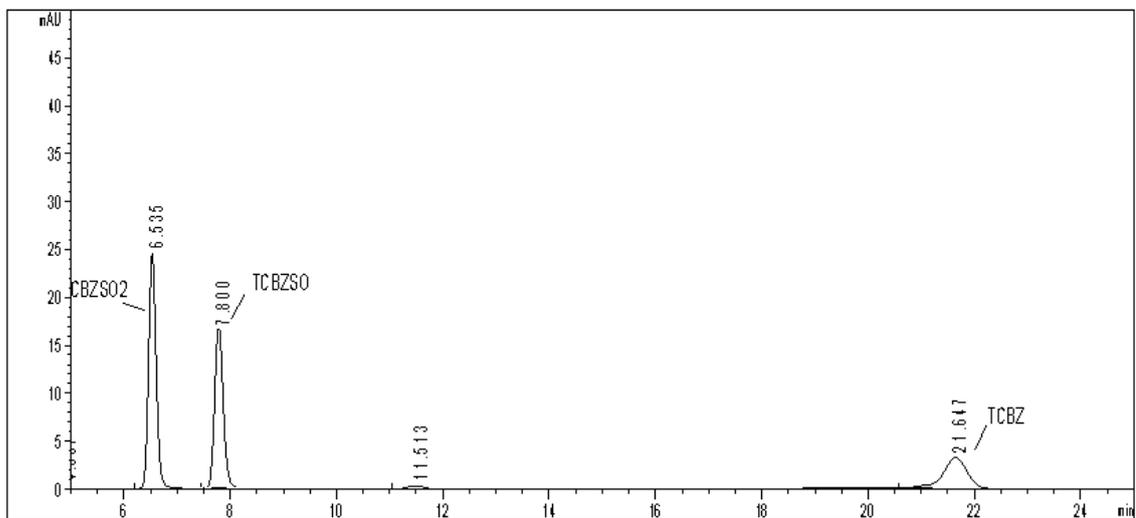


Fig.28. Cromatograma de la muestra V5C2T0

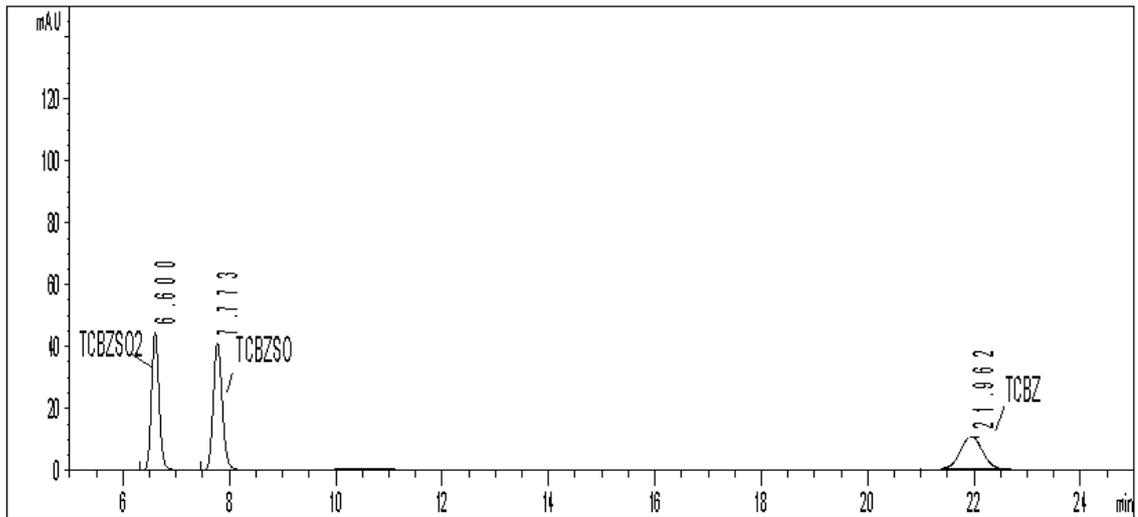
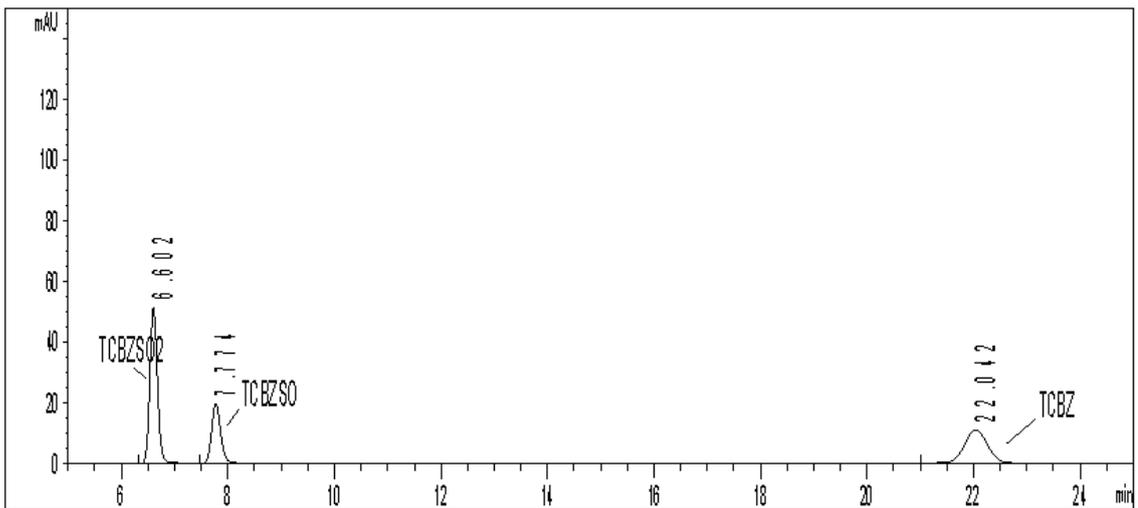


Fig.29. Cromatograma de la muestra V5C2T24



**ANEXO 8. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LOS ESTÁNDARES DE TCBZ,
TCBZSO Y TCBZSO2.**

	RAKSHIT DRUGS PRIVATE LIMITED	
	Office: 425/3RT, D.No.: 7-1-621/328, S.R. NAGAR, HYDERABAD-500 038, T.S, INDIA.	
	Phone: +91-40-23810385/23705066, Fax: +91-40-23812709	
	E-mail: sales@rakshitdrugsprivltd.com	

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT: TRICLABENDAZOLE – EP			
BATCH No. : KK2009485			
DISPATCH QUANTITY : 350.0 Kg		MFG. DATE : SEP' 2020	
BATCH QUANTITY : 352.2 Kg		EXP. DATE : AUG' 2025	
DATE OF SAMPLING.: 25.09.2020		DATE OF ANALYSIS.: 29.09.2020	
QC.Ref.No.: AR/KKP/274/0920			
S.No.	TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
01.	Appearance	White or almost white crystalline powder	Almost white crystalline powder.
02.	Solubility	Practically insoluble in water, soluble in Acetone, sparingly soluble in ethanol (96 per cent)	Complies
03.	Identification by IR.	The IR spectrum of sample is concordant with working standard spectrum.	Complies
04.	Loss on drying at 105°C	Maximum 0.5%w/w	0.40%
05.	Sulfated ash	Maximum 0.1%w/w	0.05%
Related substance by HPLC			
06.	a) Impurity –A	Not more than 0.30 %	Not detected
	b) Impurity –D	Not more than 0.30 %	0.05%
	c) Unspecified Impurities	Not more than 0.20 %	0.04%
	d) Total Impurities	Not more than 1.0 %	0.13%
07.	Chemical Assay by Potentiometry.	99.0 % w/w to 101.0 % w/w (dried substance)	99.88% w/w
Residual solvents			
08.	Methanol	NMT 3000 ppm	288 ppm
	Acetone	NMT 5000 ppm	8 ppm
	Toulene	NMT 890 ppm	16 ppm
	Dimethyl formamide	NMT 880	Not detected
Remarks: The product complies as per the above specifications.			
Prepared by: <i>R.D.</i>		Checked by: <i>S.S.</i>	Approved by: <i>F.A.</i>
Date : 29/09/2020		Date : 29/09/2020	Date : 29/09/2020

RAKSHIT STANDS FOR ASSURED QUALITY

FACTORY: SY NO. 10 / B , GADDAPOTHARAM VILLAGE, JINNARAM MANDAL, SANGAREDDY DISTRICT. T.S , INDIA. Ph: 91-08458-277026, Fax : 91-08458-277094

Certificate of Analysis

Product Name: TRICLABENDAZOLE SULFONE
VETRANAL™, analytical standard
Product Number: 35389
Batch Number: BCBZ8157
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 106791-37-1
Formula: C₁₄H₉Cl₃N₂O₃S
Formula Weight: 391.66
Expiration Date: NOV 2023
Quality Release Date: 04 DEC 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	COLORLESS/WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	CRYSTALS
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 99.0 %	99.3%
MELTING POINT	189 - 202 C	200C
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
RESIDUAL SOLVENTS	≤ 1.0 %	0.2% ACETONITRILE



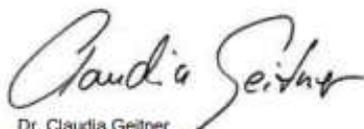
Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

Product Name: TRICLABENDAZOLE SULFOXIDE
VETRANAL™, analytical standard
Product Number: 35391
Batch Number: BCCB5255
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 100648-13-3
Formula: C₁₄H₉Cl₃N₂O₂S
Formula Weight: 375.66
Expiration Date: MAR 2024
Quality Release Date: 02 MAY 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 99.0 %	99.9%
MELTING POINT	195 - 201 C	200C
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
RESIDUAL SOLVENTS	≤ 1.5 %	0.1% ETHANOL



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.