



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

PRESENCIA DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN HUEVOS DE
CODORNIZ PROVENIENTES DE PEQUEÑOS PRODUCTORES DE
CUATRO DISTRITOS DE LIMA METROPOLITANA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Autora

Shirley Jahaira Rufasto Santillan

Asesora

MSc. Elsa Carolina Ponce de Leon De Lama

Coasesor

MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez

Lima-Perú

2024

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Cesar Yoshi Lopez Matayoshi

Presidente

MSc. Graciela Silvia Untiveros Bermudez

Secretaría

MSc. Maria Susana Roque Marroquin

Vocal

DEDICATORIA

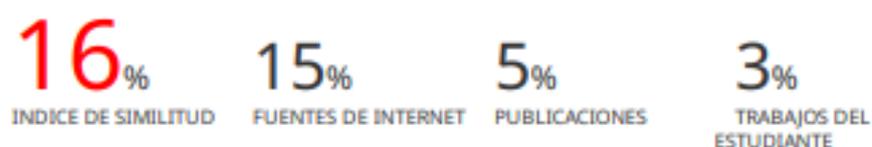
A mi madre Rosana por sus palabras y soporte para seguir continuando con mi desarrollo personal y profesional, a mi padre Javier por enseñarme a ser perseverante en alcanzar mis objetivos y a mi hermano Yadir por su apoyo durante mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, a mi asesora la MSc. Elsa Ponce de Leon y a mi co-asesor el MSc. Leon Villegas por su orientación, guía y conocimientos compartidos en cada etapa. A los revisores jurados que encaminaron esta investigación hacia una mejor calidad y a mi familia por su apoyo incondicional.

PRESENCIA DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN HUEVOS DE CODORNIZ PROVENIENTES DE PEQUEÑOS PRODUCTORES DE CUATRO DISTRITOS DE LIMA METROPOLITANA

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	extwprlegs1.fao.org Fuente de Internet	1%
5	acikerisim.uludag.edu.tr Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unbosque.edu.co Fuente de Internet	1%
7	doku.pub Fuente de Internet	<1%
8	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Bases teóricas	7
2.2.1. Coturnicultura	7
2.2.2. Huevo de codorniz	8
2.2.3. Gestión sanitaria de las codornices domesticas	8
2.2.4. Enfermedades en las codornices	8
2.2.5. Antibióticos empleados en la avicultura	11
2.2.6. Autorización de los medicamentos veterinarios	14
2.2.7. Normativa nacional	14
2.2.8. Normativa internacional	16
2.3. Planteamiento del problema	16
2.4. Justificación	17
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
IV. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos Específicos	19
V. METODOLOGÍA DE INVESTIGACION	19
5.1. Diseño de estudio	19
5.2. Muestra	19
5.2.1. Criterios de inclusión	20
5.2.2. Criterios de exclusión	20
5.3. Lugar de muestreo	20
5.4. Lugar de trabajo	20
5.5. Tamaño de la muestra	20
5.5.1. Recolección de muestras	21
5.6. Materiales, reactivos y equipos	21
5.6.1. Material de laboratorio	21

5.6.2. Reactivos	22
5.6.3. Equipos	22
5.7. Procedimientos	23
5.7.1. Preparación de la solución estándar	23
5.7.2. Preparación de las muestras de huevos	23
5.7.3. Procesamiento de las muestras de huevos	23
5.7.4. Análisis por HPLC-DAD	24
5.8. Análisis cuantitativo en huevos codorniz	25
5.9. Linealidad	25
5.10. Estabilidad	25
5.11. Precisión	26
5.12. Límite de cuantificación y detección del método	26
5.13. Recuperación	27
5.14. Cuantificación en las muestras de huevos	28
VI. RESULTADOS	28
6.1. Linealidad	28
6.2. Estabilidad	30
6.3. Precisión	32
6.4. Límite de detección y cuantificación del método	32
6.5. Recuperación	33
6.6. Cuantificación en las muestras de huevos	35
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. RECOMENDACIONES	43
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	

Lista de tablas

Tabla 1. Diferentes niveles de concentración de los estándares de Sulfadiazina (SDA) y Sulfametoxazol (SMX) y sus áreas de picos	28
Tabla 2. Estabilidad para SDA y SMX a temperatura ambiente	30
Tabla 3. Estabilidad para SDA y SMX en refrigeración	31
Tabla 4. Precisión del sistema cromatográfico para los estándares de SDA y SMX a 0.8 µg/mL	32
Tabla 5. Límites de cuantificación y detección para SDA y SMX	32
Tabla 6. Análisis de recuperación de muestras enriquecidas con SDA	33
Tabla 7. Análisis de recuperación de muestras enriquecidas con SMX	33
Tabla 8. Concentraciones promedio de los residuos de SDA y SMX en muestras de huevo de codorniz de cuatro pequeños productores de Lima Metropolitana del mes de mayo	35
Tabla 9. Concentraciones promedio de los residuos de SDA y SMX en muestras de huevo de codorniz de cuatro pequeños productores de Lima Metropolitana del mes de julio	36
Tabla 10. Datos para calcular el límite de detección y de cuantificación de SDA	60
Tabla 11. Datos para calcular el límite de detección y de cuantificación de SDA	61

Lista de figuras

Figura 1. Codornices destinadas a la producción de huevos	7
Figura 2. Estructura química del ácido fólico, ácido para-aminobenzoico (PABA) y sulfanilamida	12
Figura 3. Estructura química de la sulfadiazina	13
Figura 4. Estructura química del sulfametoxazol	13
Figura 5. Curva de calibración del análisis de SDA mediante HPLC-DAD	29
Figura 6. Curva de calibración del análisis de SMX mediante HPLC-DAD	30
Figura 7. Cromatograma obtenido de la recuperación 80 µg/Kg de SMX y SDA mediante HPLC-DAD	34
Figura 8. Cromatograma del blanco, huevo de codorniz no enriquecido, mediante HPLC-DAD	35
Figura 9. Concentración promedio de SMX en huevos de codorniz recolectados de Lima Metropolitana durante el mes de mayo y julio	37
Figura 10. Concentración promedio de SMX en huevos de codorniz recolectados de Lima Metropolitana durante el mes de mayo y julio	38
Figura 11. Cromatograma estabilidad 24H	62
Figura 12. Cromatograma estabilidad 24H RF	62
Figura 13. Cromatograma estabilidad 0H	63
Figura 14. Cromatograma de la muestra MVS1	63
Figura 15. Cromatograma de la muestra MVS2	64
Figura 16. Cromatograma de la muestra MVS3	64
Figura 17. Cromatograma de la muestra MSM1	65
Figura 18. Cromatograma de la muestra MSM2	65
Figura 19. Cromatograma de la muestra MSM3	66

Figura 20. Cromatograma de la muestra MSJL1	66
Figura 21. Cromatograma de la muestra MSJL2	67
Figura 22. Cromatograma de la muestra MSJL3	67
Figura 23. Cromatograma de la muestra MCM1	68
Figura 24. Cromatograma de la muestra MCM2	68
Figura 25. Cromatograma de la muestra MCM3	69
Figura 26. Cromatograma de la muestra MVS1R	69
Figura 27. Cromatograma de la muestra MVS2R	70
Figura 28. Cromatograma de la muestra MVS3R	70
Figura 29. Cromatograma de la muestra MSM1R	71
Figura 30. Cromatograma de la muestra MSM2R	71
Figura 31. Cromatograma de la muestra MSM3R	72
Figura 32. Cromatograma de la muestra MSJL1R	72
Figura 33. Cromatograma de la muestra MSJL2R	73
Figura 34. Cromatograma de la muestra MSJL3R	73
Figura 35. Cromatograma de la muestra MCM1R	74
Figura 36. Cromatograma de la muestra MCM2R	74
Figura 37. Cromatograma de la muestra MCM3R	75

Lista de anexos

ANEXO 1. Límites máximos de residuos (LMR) de sulfonamidas	57
ANEXO 2. Pasos del procesamiento de las muestras de huevos: Muestra 1 (M1), Muestra 2 (M2) y Muestra 3 (M3)	58
ANEXO 3. Datos utilizados en el cálculo del límite de cuantificación y límite de detección de residuos de sulfadiazina	60
ANEXO 4. Datos utilizados en el cálculo del límite de cuantificación y límite de detección de residuos de sulfametoxazol	61
ANEXO 5. Cromatogramas del estudio de estabilidad	62
ANEXO 6. Cromatogramas de las muestras del mes de mayo	63
ANEXO 7. Cromatogramas de las muestras del mes de julio	69
ANEXO 8. Certificado del estándar de sulfadiazina	76
ANEXO 9. Certificado del estándar de sulfametoxazol	77

RESUMEN

La presente investigación, cuyo título es *Presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana*. Tuvo como objetivo determinar la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz recolectados de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana. La metodología empleada tuvo un enfoque cuantitativo, con diseño no experimental; se realizaron parámetros de validación en un método analítico, como: la linealidad, recuperación, precisión, límite de cuantificación, límite de detección y estabilidad, luego se realizó la cuantificación de residuos de sulfonamidas de las muestras por medio de la cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La muestra estuvo constituida por 168 huevos de codorniz procedentes de los cuatro pequeños productores. Los resultados indican la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana. Se demostró que el método analítico fue lineal, obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0,98 y un coeficiente de determinación mayor a 0,99; fue estable, la concentración de los estándares estuvo cerca del 100%; fue preciso, obtuvo una desviación estándar relativa inferior al 2%; el límite de detección fue de 2,69 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfadiazina y de 1,30 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfametoxazol; el límite cuantificación fue de 8,97 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfadiazina y de 4,32 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfametoxazol; fue exacto, obtuvo porcentajes de recuperación dentro del criterio de aceptación de 80% a 110%. Se comprobó la presencia de residuos de sulfadiazina en el 100% de las muestras y residuos de sulfametoxazol en el 95,83% de las mismas; con una concentración media de sulfonamidas de 2,8 $\mu\text{g/Kg} \pm 4,7$ y la concentración más alta fue 57,09 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfadiazina presente en la muestra del distrito de San Juan de Lurigancho.

Palabras clave: sulfametoxazol, sulfadiazina, huevos, codorniz, HPLC.

ABSTRACT

The present investigation, whose title is *Presence of sulfonamides residues in quail eggs from small producers in four districts of Metropolitan Lima*. Its objective was to determine the presence of sulfonamide residues in quail eggs collected from small producers in four districts of Metropolitan Lima. The methodology used had a quantitative approach, with a non-experimental design; validation parameters were performed in an analytical method, such as: linearity, recovery, precision, quantification limit, detection limit and stability, then the quantification of sulfonamide residues in the samples was performed by means of high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The sample consisted of 168 quail eggs from the four small producers. The results indicate the presence of sulfonamides residues in quail eggs from small producers in four districts of Metropolitan Lima. It was demonstrated that the analytical method was linear, obtained a correlation coefficient higher than 0.98 and a determination coefficient higher than 0.99; it was stable, the concentration of the standards was close to 100%; it was precise, obtained a relative standard deviation lower than 2%; the detection limit was 2.69 µg/Kg for sulfadiazine and 1.30 µg/Kg for sulfamethoxazole; the quantification limit was 8.97 µg/Kg for sulfadiazine and 4.32 µg/Kg for sulfamethoxazole; it was accurate, obtaining recovery percentages within the acceptance criteria of 80% to 110%. The presence of sulfadiazine residues was found in 100% of the samples and sulfamethoxazole residues in 95,83% of the samples; with an average sulfonamide concentration of 2,8 µg/Kg ± 4,7 and the highest concentration was 57,09 µg/Kg for sulfadiazine present in the sample from the district of San Juan de Lurigancho.

Key words: sulfamethoxazole, sulfadiazine, eggs, quail, HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

Las sulfonamidas se encuentran dentro del grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro. Presentan eficacia sobre una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluso protozoos. Su empleo frecuente en la industria avícola se da como fin terapéutico, profiláctico y promotor de crecimiento. Asimismo, se utilizan para tratar diversos tipos de infecciones en el tracto respiratorio y digestivo [1]. Entre las enfermedades que se tratan con este medicamento, se encuentran la coriza infecciosa aviar, pulorosis aviar, coccidiosis y tifoidea aviar [2]. Además, la disponibilidad y bajo costo de este antibiótico veterinario ha contribuido a su uso generalizado [1].

En ocasiones se emplean medicamentos veterinarios de forma indiscriminada o no se mantienen los periodos de retiro lo que ocasiona que los medicamentos usados dejen residuos en los alimentos obtenidos de animales; como: carne, huevos, y leche [3]. La existencia de residuos de sulfonamida en alimentos que ingiere el humano puede ocasionar enfermedades tales como agranulocitosis y anemia aplásica, asimismo, estos residuos pueden ser potencialmente cancerígenos, producir resistencia a los antibióticos y reacciones alérgicas en el ser humano [4].

El huevo de codorniz es un alimento de origen animal que posee un alto valor proteico (13,2%) en comparación con el aporte del huevo de la gallina (11%), asimismo, es rico en lípidos (11%), además, contiene vitaminas A, E y las del complejo B; su consumo aporta minerales como el zinc, hierro y selenio. Considerando que los huevos de codorniz brindan un excelente aporte alimenticio, se puede emplear como una alternativa para mejorar los niveles nutricionales en la población peruana, principalmente en niños, ancianos, mujeres gestantes y lactantes. Por tanto, al ser accesible en precio puede ser consumido por las comunidades rurales y de escasos recursos [5,6].

Perú es considerado uno de los países con producción de codorniz bien desarrollada [7]. No obstante, la crianza de estas aves no está exenta de inconvenientes, las codornices pueden estar expuestas a enfermedades infecciosas o parasitarias, por lo que el empleo de medicamentos veterinarios sigue siendo una de las numerosas herramientas para optimizar la producción al mantener a las aves con un buen estado de salud, evitar la aparición de enfermedades y que la producción de los huevos no se vea afectada [8].

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En Indonesia, Widiasih *et al.* (2019), precisaron que el 75 % de un total de 24 huevos de gallina recolectados de 8 mercados tradicionales en la ciudad de Yogyakarta fueron positivos para la penicilina, el 12,5% fueron positivos a oxitetraciclina y otro 12,5% al grupo de aminoglucósidos. Se empleó el método de bioensayo, el cual usó microorganismos (*Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Kocuria rhizophila*) para la detección de antibióticos [9].

En Nigeria, Olatoye *et al.* (2019), detectaron mediante la técnica de ELISA la presencia de residuos de gentamicina en huevos recolectados de 3 mercados minoristas del estado de Oyo y del estado de Lagos, obteniendo un total de 270 muestras. El 60% del total de muestras analizadas en el estado de Oyo presentó residuos de gentamicina a una concentración media de $1461 \pm 74 \mu\text{g/kg}$, en cambio, en el estado de Lagos, el 80% del total de muestras obtenidas de los mercados evidenció una concentración media de $1350 \pm 92 \mu\text{g/kg}$. Según la Unión Europea, el uso de la gentamicina está prohibido en aves ponedoras, y en huevos (no existe un LMR de gentamicina en productos avícolas) [10].

En Irán, Kamali *et al.* (2020), analizaron 40 muestras de huevos procedentes de 13 centros comerciales y 6 granjas locales en la ciudad de Isfahan, el método usado para detectar residuos de antibióticos fue ELISA competitivo. Los resultados indicaron, que el 100% de las muestras dieron positivo para el residuo de tetraciclina, con un valor promedio de concentración hallada de $3,10 \text{ ng/g}$, un valor mínimo de $0,56 \text{ ng/g}$ y un valor máximo de $9,77 \text{ ng/g}$. Como el nivel regulado de tetraciclina en huevos es de 200 ng/g según la EFSA, todas las muestras se consideraron aceptables [11].

En Chile, Cornejo *et al.* (2020), indicaron que de los 83 sistemas de producción avícola de traspatio estudiados solo 61 de estos presentaron muestras con positividad a al menos uno de los cuatro antimicrobianos probados (oxitetraciclina, eritromicina, ampicilina y amikacina). Las muestras fueron recolectadas a voluntad del productor. El método de detección de residuos de antibióticos fue la prueba de las Cuatro Placas. Los resultados indicaron que el 73% de las avícolas de traspatio (de un total de 83 avícolas) presentaron huevos con al menos uno de los cuatro antibióticos analizados. Siendo la ampicilina y

amikacina, los antibióticos que presentaron la mayor positividad en las muestras analizadas [12].

En Ghana, Mingle *et al.* (2021), analizaron 45 huevos de gallina provenientes de 5 granjas productoras de huevos ubicadas en 2 capitales regionales (Accra y Kumasi) en Ghana, todas indicaron poseer al menos un residuo de antibiótico en su matriz. Mediante el método UHPLC-MS/MS se detectaron concentraciones promedio de residuos de tetraciclina (210,7 µg/kg), oxitetraciclina (217,6 µg/kg) y clortetraciclina (886,7 µg/kg) de muestras provenientes de Accra, los cuales superaron el límite de residuos máximos establecido por la Unión Europea LMR (100 µg/kg). También se detectaron concentraciones promedio de residuos de sulfametoxazol (62,03 µg/kg), sulfadoxina (171,9 µg/kg) y sulfatiazol (200,4 µg/kg) en huevos provenientes de la misma capital regional; por otro lado, en Kumasi se obtuvieron resultados de 37,09 µg/kg, 3,6 µg/kg y 10,4 µg/kg, respectivamente [13]. No obstante, el empleo de sulfonamidas en animales productores de huevos para consumo humano no está permitido.

En Italia, Saluti *et al.* (2021), publicaron un estudio, donde mostraron que el 0,5% (1 muestra) de un total de 200 huevos de gallina provenientes de 119 granjas localizadas en 45 provincias de Italia. Mediante el método cromatografía líquida con espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) se presenció residuos de doxiciclina a una concentración de 22 µg/kg [14]. A ello, se suma que la doxiciclina no debe emplearse en animales productores de huevos para consumo humano.

En el suroeste de China, Wang *et al.* (2022), detallaron que el 15,83% (19/120) de las muestras recolectadas de huevos de codorniz provenientes de 2 supermercados y 2 mercados agrícolas en cada uno de los 3 lugares de la ciudad de Kunming (el distrito de Wuhua, la ciudad de Anning y el condado de Luquan) presentaron residuos de antibióticos. Asimismo, mencionaron que los antibióticos detectados mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (UHPLC-MS/MS) fueron 7, entre ellos se encuentran, danofloxacina, difloxacina, ofloxacino, sulfadimetoxina, sulfamonometoxina, sulfametoxipiridazina y sulfametoxazol. El rango de concentración hallado en huevos de corral fue de 0,06 a 0,48 mg/g para danofloxacina, de 0,05 a 0,29 mg/g para difloxacina, de 0,01 a 0,37 mg/g para ofloxacina, 0,03 a 0,16 mg/g para sulfadimetoxina, de 0,06 a 1,00 mg/g para sulfamonometoxina, de 0,05 a 0,37 mg/g para sulfametoxipiridazina y de 0,07 a 2,48

mg/g para sulfametoxazol. Siendo el sulfametoxazol el que presentó mayor nivel de concentración detectado en huevos de pato (1,87 mg/g) y codorniz (2,48 mg/g) [15].

En Tanzania, Sineque *et al.* (2022), indicaron que el 40,8% de huevos de gallina provenientes de 44 mercados en 10 barrios seleccionados del Municipio de Morogoro fueron positivos a la presencia de residuos de antibióticos, teniendo en cuenta que 255 fue el total de muestras recolectadas. El método que se empleó para la detección de residuos de antibióticos fue la prueba de inhibición del crecimiento bacteriano que usa *Bacillus subtilis* (ATCC 3491). Asimismo, la solución de oxitetraciclina (10%) fue el control positivo [16].

En Estados Unidos, Sarkar *et al.* (2023), analizaron 36 productos “libres de antibióticos” conformado por 18 muestras de huevo comprados en 36 mercados de agricultores del este de Tennessee. El método que se empleó para la cuantificación de residuos de antibióticos en las muestras fue ELISA competitivo. En los resultados obtenidos observaron que el 100% de las muestras presentaron residuos de tetraciclina, en particular, con las muestras de huevo; obtuvieron una concentración media de 30,25 µg/kg y ninguno sobrepasó el límite máximo de residuos (LMR) de tetraciclinas recomendado por la FDA y la UE (200 µg/kg para ambos). No obstante, la presencia de residuos de sulfonamida solo se vio en el 61,1% del total de huevos analizados, con una concentración media de 1,22 µg/kg, el cual se encuentra dentro del LMR de sulfonamida establecido por la FDA (100 µg/kg), sin embargo, para la UE el LMR de sulfonamidas no aplica en huevos [17].

Por otra parte, no existen antecedentes nacionales sobre la determinación de residuos de antibióticos en huevos desde el año 2009 en adelante. Así, tenemos en Perú, Álvarez, (2009), realizó un estudio (cualitativo), donde encontró que el 46,98% (148/315) del total de huevos de gallinas obtenidos de 2 supermercados y 5 mercados minoristas de Lima Metropolitana presentaron residuos de antibióticos, posiblemente pertenecientes al grupo de las tetraciclinas. La técnica que se empleó fue de difusión en agar modificada de Katz y Fassbender, en donde usó cepas de *Bacillus subtilis* a un valor de pH de 7,2, esta prueba tiene mayor facilidad para detectar residuos del grupo de las tetraciclinas comparado a otros antibióticos, así también, no se descarta que se encuentren antibióticos como quinolonas, penicilinas y b-lactámicos, macrólidos, lincosamidas [18].

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Coturnicultura

La coturnicultura se basa en la crianza, reproducción y mejora de la producción de codornices para el posterior aprovechamiento de sus diversos productos: huevos, carne y codornaza (estiércol proveniente de la codorniz y empleado como abono orgánico) [19,20].

La especie más utilizada en la industria peruana es la *Coturnix coturnix japonica* debido a su mayor corpulencia y buen rendimiento en la producción de carne, huevos y pie de cría en contraste con otras especies de codornices [21]. El peso de las codornices oscila entre 100 a 128 g, asimismo, presenta un rápido desarrollo sexual y consume aproximadamente 20 a 30 g de alimento por día [22].



Figura 1. Codornices destinadas a la producción de huevos

Fuente: Elaboración propia

La crianza de codorniz requiere poco espacio para el proceso de producción debido al pequeño tamaño que posee el ave y su bajo costo de mantenimiento. Asimismo, para una adecuada productividad de alimentos obtenidos de estas aves para el consumo de los individuos, se requiere de un control de la alimentación, nutrición y sanidad de las codornices, de forma, que le permita ser una organización competitiva en cuanto al precio y calidad del producto [21].

2.2.2. Huevo de codorniz

El peso promedio del huevo de codorniz es de 10 g [23]. Posee un bajo nivel de colesterol y un elevado índice proteico, así como vitaminas y minerales requeridos por el ser humano. La producción diaria de las aves puede ser de más de un huevo por día [21].

Los beneficios que aporta el huevo de codorniz se encuentran en las proteínas de alto valor biológico, por su mayor contenido de aminoácidos esenciales, la casi nula presencia de carbohidratos; así como bajo contenido en colesterol [24, 25]. Además, su contenido de fósforo y calcio permiten el mantenimiento de los huesos, la presencia de vitamina A favorece la formación de tejidos blandos y mantenimiento de la piel y el complejo B contribuye al mantenimiento del sistema nervioso y formación de los eritrocitos. El alto valor proteico es indispensable para el organismo y el adecuado desarrollo de los músculos y cerebro [26].

2.2.3. Gestión sanitaria de las codornices domesticas

Las codornices son conocidas por ser resistentes a diversas enfermedades, sin embargo, de todos modos, es necesario mantener una buena higiene del ambiente donde se da la producción de alimentos provenientes de la codorniz para evitar el brote de algún parásito interno, externo o de virus. También, se sugiere aislar las aves enfermas, limpiar y desinfectar el galpón con frecuencia y con mayor énfasis previamente a la llegada de los polluelos, verificar la pureza del agua, mantener la temperatura de la criadora entre los 35 a 38 °C; luego de la cuarta semana ya no será necesario el uso del calor, excepto si se encuentra en un ambiente que posee condiciones de temperatura menores a 20 °C, por lo que se tiene que mantener entre 24 a 25 °C [27].

2.2.4. Enfermedades en las codornices

La carne y huevos de la codorniz han alcanzado gran popularidad en los últimos años debido a la fuente de proteínas que brinda y a los nutrientes por el que está constituido. No obstante, existen algunos desafíos y limitaciones que se presentan en la producción de codornices, uno de ellos es la susceptibilidad a enfermedades virales, bacterianas, micóticas y parasitarias, lo que pueden afectar a la industria codorniz [27].

Las enfermedades que se pueden presentar en la codorniz son la viruela aviar ocasionada por *Borrelia abortus* y la enfermedad de Newcastle producida por *Paramixovirus* [28].

En las enfermedades comunes producidas por bacterias se encuentra la pullorosis que tiene como patógeno a la *Salmonella pullorum*, y se da por lo común en pollos de codorniz, la coriza infecciosa causada por *Avibacterium paragallinarum*, el cólera aviar causada por *Pasteurella multocida*. En la enfermedad causada por protozoos está la coccidiosis cuyo agente patógeno pertenece al género *Eimeria*. Otra enfermedad común es la histomoniasis [29].

Entre las enfermedades más comunes causadas por bacterias tenemos las siguientes:

- **Salmonelosis aviar**

La salmonelosis aviar es una enfermedad infecciosa originada por varios serovares de *Salmonella spp.* que afecta a diversas especies de aves salvajes y domésticas como la codorniz provocando pérdidas económicas en la producción avícola [29]. El ciclo infeccioso principalmente se da por la vía fecal-oral pero la transmisión infecciosa también se puede dar de forma vertical. El huésped infectado elimina la bacteria por medio de sus heces y los nuevos huéspedes que se encuentran en ese ambiente contaminado son susceptibles a infectarse [30]. Para el tratamiento se recomienda emplear furazolidona, quinolonas (segunda generación y tercera generación), sulfas (sulfameracina, sulfadimetoxina y sulfametazina), sulfato de gentamicina [31]. Sin embargo, estudios han demostrado que aislamientos de *Salmonella* provenientes de codornices pueden llegar a ser multidrogo resistentes, por lo que se recomienda realizar la prueba de sensibilidad antibiótica [29].

- **Colibacilosis**

La colibacilosis septicémica tiene como agente patógeno a *Escherichia coli*, esta enfermedad infecciosa aviar ha sido registrada comúnmente en pollos, patos, pavos y codornices [29]. La transmisión es horizontal, es decir, por contacto con la materia fecal contaminada, por medio de agua, piensos y medio ambiente contaminado, además, afecta a las aves de cualquier edad [32]. El tratamiento consiste en el empleo de antibióticos como tetraciclinas, estreptomycin, ampicilina y sulfas [33]. No obstante, se deben realizar pruebas de sensibilidad para escoger el antibiótico adecuado frente al serotipo de *E. coli* [29].

- **Enteritis clostridial**

La enteritis ulcerosa tiene como agente patógeno a *Clostridium colinum*, la transmisión se da por vía fecal-oral [29]. Se ha registrado que se presenta principalmente en codorniz bobwhite, también se ha informado en codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), aves psitácidas y palomas. Esta infección puede ser introducida a través de las moscas, las cuales se alimentan de la materia fecal de aves infectadas o de aves portadoras recuperadas [33]. El tratamiento efectivo consiste en el empleo de estreptomicina y la furazolidona, como preventivo se emplea la bacitracina en el alimento [34].

- **Cólera aviar**

El cólera aviar es causada por *Pasteurella multocida*, esta enfermedad bacteriana se ha registrado en diversas especies de aves domésticas y salvajes; siendo las especies susceptibles: pollos, patos, pavos, gansos y codornices [29,35]. Además, se sugiere que la principal entrada del agente patógeno es el tracto respiratorio de las aves de corral [35]. El tratamiento que se recomienda emplear son las sulfonamidas (sulfaquinoxalina), fosfomicina y enrofloxacin [31]. Otros antimicrobianos pueden ser oxitetraciclina, norfloxacin, doxiciclina y neomicina [29].

- **Micoplasmosis aviar**

Esta enfermedad es producida por diversas bacterias del género *Mycoplasma*, en codornices se ha registrado con mayor frecuencia a las especies de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* [29]. La ruta de transmisión se da por la vía respiratoria y la conjuntiva ocular, también se puede dar por transmisión horizontal durante la eclosión de los huevos de codorniz infectados. Los antibióticos como tilosina, tiamulina y tilmicosina se emplean para reducir la carga de micoplasmas, no obstante, como la terapia con estos antibióticos no elimina completamente los micoplasmas, el ave seguirá presentando al *Mycoplasma* [36].

- **Coriza infecciosa**

La coriza infecciosa es causada por *Avibacterium paragallinarum* [29]. La transmisión es vía respiratoria. Esta infección bacteriana puede presentarse en aves de todas las edades y está acompañada de un declive en la producción de huevos por parte de las aves ponedoras [37]. Estudios han demostrado que antibiogramas de *A. paragallinarum* en codornices japonesas presentaron resistencia completa a antibióticos como ampicilina,

neomicina, estreptomicina, furazolidona, amikacina y cefalexina; 90% a gentamicina y 70% a oxitetraciclina [29]. Por lo que, se sugiere previamente realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos para proporcionar un tratamiento eficaz contra la infección [38].

- **Clamidiosis aviar**

La clamidiosis aviar es una afección zoonótica provocada por la *Chlamydophila psittaci* [29]. Esta bacteria puede afectar a aves domésticas y salvajes. Las aves jóvenes se infectan con mayor frecuencia a través del alimento regurgitado de los padres, ingestión o inhalación de material contaminado y ectoparásitos [39]. La tetraciclina, azitromicina, eritromicina y las fluoroquinolonas demostraron ser un tratamiento eficaz contra este patógeno [29].

2.2.5. Antibióticos empleados en la avicultura

Los antibióticos en la producción avícola son empleados principalmente para tres fines: fin profiláctico, es decir, para la prevención de infecciones causadas por bacterias o incluso para subsanar las prácticas de limpieza deficientes, como promotor del crecimiento para conseguir productos de aves con mayor peso y como fin terapéutico para tratar enfermedades causadas por bacterias [40,41]. Según la Asociación Peruana de Avicultura (APA) dentro del grupo farmacológico de las sulfonamidas existen dos antibióticos más usados por la medicina avícola peruana conocidos con el nombre de sulfadiazina y sulfametoxazol [42].

Si no hay un uso responsable del antibiótico se pueden generar residuos de antibióticos en alimentos de origen animal. Los residuos de antibióticos incluyen compuestos de origen y/o metabolitos, los cuales se encuentran en alimentos procedentes de animales que han sido tratados previamente con medicamento veterinario [43]. Tal y como se evidencian en estudios experimentales de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz [15].

Al respecto los antibióticos que más se utilizan son:

- **Sulfonamidas**

Consideradas compuestos antibacterianos de mayor empleo en la medicina veterinaria. Las sulfonamidas tienen un efecto bacteriostático, aunque en combinación con trimetoprim provoca la bacteriólisis. Las sulfonamidas poseen un núcleo químico, el ácido paraminosulfónico, que es análogo estructural del ácido paraminobenzoico (PABA), este último es un factor de crecimiento indispensable para diversas bacterias. Cuando las sulfonamidas se encuentran en mayor concentración desplazan al PABA, impidiendo su uso en la síntesis de ácido fólico, el cual es clave en la síntesis de nucleótidos bacterianos, lo que provoca que el crecimiento bacteriano se detenga y por ende frene el desarrollo de la infección [44]. Las diferentes sulfonamidas se distinguen entre sí, por las sustituciones en el grupo amido, originando que el efecto de la actividad antibacteriana varíe [45,46].

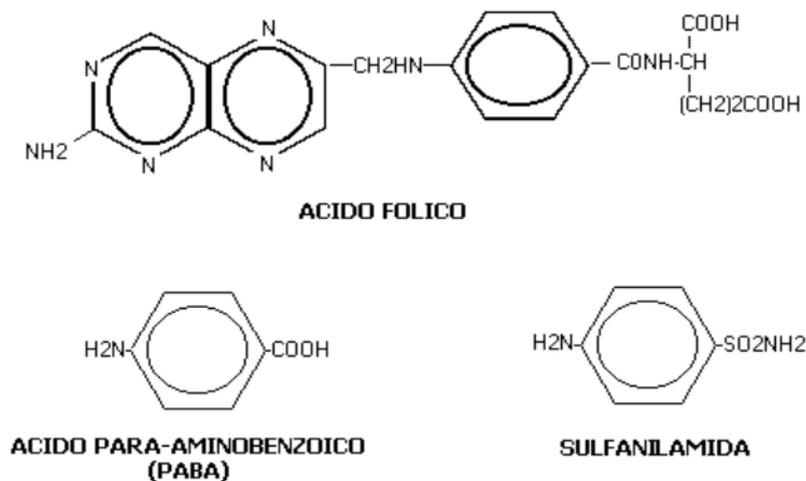


Figura 2. Estructura química del ácido fólico, ácido para-aminobenzoico (PABA) y sulfanilamida [45]

Según la farmacocinética de sulfonamidas en aves, cuando son administradas por vía oral pueden absorberse con rapidez, a nivel de intestino delgado llegando a una proporción del 70 a 90%. La sulfadiazina y sulfametoxazol se encuentran dentro de la clasificación de sulfas que poseen absorción de acción corta o intermedia. La distribución de las sulfonamidas se realiza con facilidad en el organismo, no son una excepción las articulaciones y el SNC, conocidos por su baja penetración. El metabolismo se da por acetilación en el hígado y en pulmones, como resultado genera un fármaco menos soluble en agua y que se precipita con mayor facilidad, lo que puede llegar a ser un peligro para

los túbulos renales [46]. La semivida para sulfadiazina y sulfametoxazol es de 11 a 24 horas [47]. La eliminación se da principalmente por la vía renal y las sulfonamidas que no fueron absorbidas se eliminan por las heces [46]. Cabe resaltar que durante y después de la administración de la sulfonamida, una alta fracción de este antibiótico se excreta sin metabolizarse, esta observación es base para los estudios de detección de este medicamento [48].

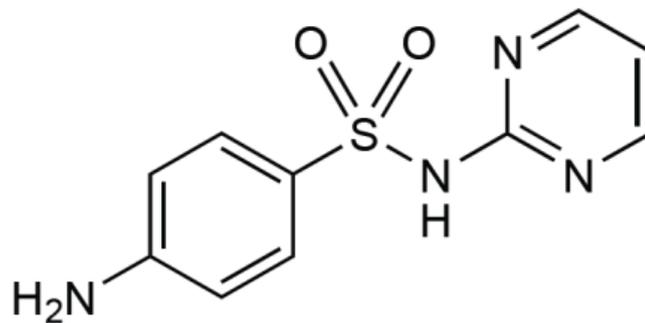


Figura 3. Estructura química de la sulfadiazina [49]

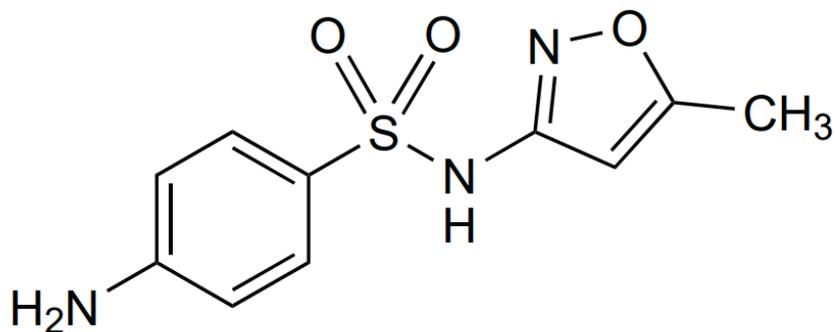


Figura 4. Estructura química del sulfametoxazol [49]

Los residuos de sulfonamidas en un inicio se depositan en el albumen, sin embargo, su concentración se declina de manera exponencial en las 24 horas posterior al tratamiento; en cambio, en la yema persisten más tiempo ya que estas se acumulan durante los diferentes estados de desarrollo de la yema [50].

Se han reportado riesgos de las sulfonamidas para salud animal como del hombre. La mayoría de estas, han ocasionado efectos antitiroideos en animales de experimentación (rata, ratón y perro), los mecanismos por el que ocurren dichos efectos se deben a la

interrupción del metabolismo habitual del yodo tiroideo (que disminuye la producción de tiroxina) y el incremento de la secreción de la hormona hipofisiaria estimulante lo origina hiperplasia en dicha glándula. También se han evidenciado efectos en la función tiroidea en el hombre, sin embargo, esto se da por un tratamiento a dosis altas [50]. Las reacciones adversas producidas en humanos se distinguen por sus efectos hematológicos, así se han presentado, aunque en pocos casos agranulocitosis y anemia aplásica [50]. Las sulfonamidas dañan el sistema hematopoyético y pueden convertir el hemocromo en metahemoglobina produciendo anemia hemolítica. Las sulfonamidas inhiben la generación de mieloplasto y generan agranulocitosis hasta anemia aplásica [51]. Los efectos adversos mayoritarios son las reacciones de hipersensibilidad caracterizadas por erupciones cutáneas (urticaria y eritema); dado que no es conocido una dosis mínima para producir dichos efectos el objetivo es reducir la aparición de las reacciones alérgicas consecuencia del consumo de alimento de origen animal que contienen residuos de sulfonamidas [50,51].

2.2.6. Autorización de los medicamentos veterinarios

Todos los medicamentos autorizados han sido sometidos previamente a una evaluación para conocer sus efectos sobre la salubridad animal, salud pública y contexto ambiental. A partir de allí, se permite su empleo en animales y se le otorga el registro a través del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Asimismo, estos medicamentos deben ser prescritos por un médico veterinario, el cual brinda información acerca del tiempo transcurrido de apartamiento para prevenir la presencia residual de medicamentos en los alimentos [52].

2.2.7. Normativa nacional

En Perú se cuenta con regulaciones establecidas por el Ministerio de Salud del Perú (MINSA), este organismo está encargado de administrar todo lo referente al área de la salud en el Perú, y que mediante la Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria (DIGESA) de conformidad con la Ley de Inocuidad de los Alimentos, cuyo objetivo es garantizar alimentos inocuos para la población humana. Asimismo, en la Norma Sanitaria se detalla el Límite Máximo de Residuos (LMR) de los fármacos de manejo veterinario, es decir, la concentración máxima de residuos de medicamentos presente en un alimento como resultado de uso en la práctica veterinaria, la cual no debe

superarse en alimentos para promocionar la seguridad y bienestar de quienes lo consumen [43,52]. Al mismo tiempo, se cuenta con el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), el cual es una entidad adscrita al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), que está encargado de hacer cumplir las regulaciones, controlar la calidad y monitoreo de alimentos para animales (pienso) y de los alimentos consumidos por humanos que proceden de la producción y del procesamiento primario, de origen animal como vegetal. El registro de autorización sanitaria de establecimientos es otorgado por SENASA, la que garantiza la obtención de productos inocuos. Es derecho del consumidor, recibir de los proveedores información acerca del alimento en cuanto a garantías y riesgos para tomar una decisión de adquirir el producto [53].

En el MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria que establece el Límite Máximo de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano”; se destaca la ausencia de un LMR para sulfonamidas en huevos, en contraste al LMR (100 µg/kg) definido para otras matrices como músculo, grasa, hígado y riñón de las especies productoras de alimentos (ANEXO 1) [52]. Este es un punto importante ya que como se menciona en el huevo no debe haber presencia de antibióticos por tanto se da a entender que los animales una vez administrados con el fármaco deben pasar por un periodo de espera, es decir, un tiempo entre la última administración del fármaco veterinario y la recolección del producto avícola, lo que garantiza que los productos no contengan residuos de antibióticos veterinarios.

El Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria es aquel documento en el que se pueden encontrar las reglas para garantizar la inocuidad de los alimentos agropecuarios primarios y de los piensos. Este reglamento se debe cumplir por toda persona natural o jurídica que posea participación directa o indirecta en las fases de la cadena de alimentos agropecuarios, así como de piensos en el Perú. Sin embargo, existen excepciones en cuanto al cumplimiento de este reglamento como es la producción doméstica de alimentos agropecuarios primarios destinados al autoconsumo, así como de la producción y procesamiento primario de piensos que tienen como objetivo ser alimento para los animales destinados al consumo propio [53].

2.2.8. Normativa internacional

A nivel internacional, el *Codex Alimentarius*, es conocido por contener normas que regulan los productos alimenticios provenientes de animales para la ingesta del ser humano. El *Codex Alimentarius* fue creado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (ONUAA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [50]. Dentro de sus objetivos se encuentra garantizar que los alimentos sean inocuos, proteger la salud del consumidor y, de igual forma, facilitar su comercio internacional. De modo que, establece el Límite Máximo de Residuos (LMR) de fármacos de aplicación veterinaria, el cual no debe ser superado, ya que puede mantenerse en los alimentos hasta el consumo final y suponer un riesgo de salud pública, por lo que debe ser controlado en el periodo inicial de la producción de alimentos [54]. En este caso, el límite máximo de residuos fijado para sulfonamidas no debe superar los 100 µg/kg en el músculo, grasa, riñón e hígado presente en especies de animales destinadas a la producción de alimentos.

2.3. Planteamiento del problema

El consumo y producción a nivel internacional de huevos de codorniz se ha incrementado por su alto valor proteico, vitamínico y en minerales; al igual que su expendio como alternativa al consumo de huevos de gallina. Así mismo, en países como Japón y China son utilizados comúnmente en sus platos [55]. La producción y comercialización informal presenta una realidad en el inadecuado control de antibióticos y condiciones sanitarias. En tal sentido, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (ONUAA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) trabajan coordinadamente para asegurar la inocuidad en alimentos procedentes de animales como el huevo.

En 2020, durante el estado de emergencia, el Ministerio de la Producción (Produce) de Perú promovió la comercialización de huevos codorniz de productores del valle de Lurín y distritos aledaños, brindó asistencia técnica a través del Programa Nacional de Tu Empresa, así mismo, espera continuar apoyando con la formalización tributaria del negocio de los avicultores y dar soporte a la producción de huevos de codorniz [56].

En el Perú el consumo y exportación de los productos provenientes de animales y sobre todo de los huevos de codorniz se han incrementado a lo largo de los años en virtud de su gran valor nutricional y su asequible precio. Como cualquier producto destinado al

consumo humano, este requiere pasar por diversos controles de calidad que garanticen su inocuidad y cumplan con las regulaciones sanitarias correspondientes para poder llegar al mercado de destino. No obstante, los antecedentes indican que los huevos de codorniz pueden presentar residuos de antibióticos como las sulfonamidas, las cuales pueden originar una prolongada retención de residuos en huevos, por lo que se justifica no hacer uso de estos antibióticos en aves ponedoras [50]. Es muy probable que los animales no pasen por un periodo de espera posterior a la administración del medicamento veterinario porque el tiempo de espera es largo (durando de días a semanas) y no podría cumplirse desde el punto de vista económico y de producción.

La presencia de estos residuos en exceso puede causar riesgos para la salud del consumidor al ocasionar agranulocitosis, anemia aplásica y reacciones alérgicas; también estos residuos pueden ser potencialmente cancerígenos e incluso generar resistencia a los antimicrobianos lo que repercute en la efectividad del antibiótico para la medicina humana, por tal razón, la infección bacteriana en humanos sea más difícil de tratar, ello supone una amenaza para la salud pública [4,57,58]. Con el fin de proteger a la salud pública, en Perú MINSA/DIGESA a través de la “Norma Sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano” y a nivel internacional FAO/OMS a través del Codex Alimentarius han establecido límites de residuos en alimentos, de modo que se consideren seguros para el consumo. Entonces, la recomendación sería mejorar la vigilancia sanitaria en los productos de origen animal destinados al consumo humano, como el huevo de codorniz. Por tanto, el presente estudio determinó si hay presencia de antibióticos de sulfonamidas en muestras de huevos de codorniz comercializados por pequeños productores de diferentes distritos de Lima Metropolitana.

2.4. Justificación

Perú es considerado uno de los países con producción desarrollada de codorniz [7]. Asimismo, en los últimos años la crianza de codornices ha sido una oportunidad de generar beneficio económico y fuente empleo para peruanos ya sea por criar, expender o vender huevos de codorniz. Cabe mencionar que hasta la fecha en Perú solo se ha contado con un estudio sobre presencia de residuos de antibióticos en huevos, en particular de gallina, sin embargo, en huevo de codorniz ocurre todo lo contrario. Esto conlleva a la

necesidad de contar en Perú con un estudio y método de detección y cuantificación de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz que contribuya con el control e inocuidad de este producto alimenticio previo a su consumo.

La presencia de residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol en huevos de codorniz destinados para el consumo de la población peruana se deben concientizar y difundir. Asimismo, la presentación de los resultados de las muestras aporta información sobre la situación actual de los productos avícolas y permite brindar las recomendaciones necesarias. En la práctica, esta investigación se lleva a cabo porque existe la necesidad de determinar la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz, en favor de la inocuidad del producto destinado al consumo humano, comparándolo con la normativa nacional e internacional sobre presencia de residuos de sulfonamidas en alimentos, el cual no está permitido en huevos. A nivel metodológico, la presente investigación empleó la técnica de HPLC-DAD para detectar y cuantificar la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz. Así también, con el estudio se pretende aportar con un método analítico y que pueda ser empleado en futuros estudios con objetivos similares y contribuir con la prevención de riesgos en la salud pública causados por la presencia de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hay presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana?

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros de validación tales como linealidad, precisión, límite de cuantificación, límite de detección y recuperación del método analítico para residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol por HPLC-DAD.
2. Identificar la presencia de residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol que se encuentran en las muestras de huevos de codorniz provenientes de 4 pequeños productores de Lima Metropolitana.
3. Cuantificar la presencia de residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol en los huevos de codorniz provenientes de 4 pequeños productores de Lima Metropolitana.

V. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

5.1. Diseño de estudio

El presente estudio tiene un enfoque cuantitativo, con diseño no experimental, en el que no se realiza la manipulación intencional con la variable independiente; es observar el contexto natural tal como se da, para analizarlo [59,60].

Se inició con la búsqueda virtual de pequeños productores de huevos de codorniz en Lima Metropolitana, luego se seleccionó al azar un pequeño productor por distrito, las cuales presentaban mayor información de su ubicación y expendio, procediéndose luego a la evaluación del registro de autorización sanitaria correspondiente y recolección de muestras de dichas instalaciones. Asimismo, se determinó los parámetros necesarios de validación para un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), tales como: la linealidad, recuperación, precisión, límite de cuantificación, límite de detección y estabilidad. A partir de lo anterior se dio paso al análisis cuantitativo de las muestras.

5.2. Muestra

Conformada por huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana.

5.2.1. Criterios de inclusión

Muestras de huevo que se encontraban cerca a los 10 g, peso promedio del huevo de codorniz, considerando un rango de 9 g a 11 g.

5.2.2. Criterios de exclusión

Muestras de huevo deterioradas con fisuras o rupturas durante su transporte al laboratorio.

5.3. Lugar de muestreo

Se visitó la página web de Infoinfo Lima, PlanetaPeru y Nicelocal, las cuales proporcionaron información sobre las ubicaciones de los productores de huevos de codorniz, ubicadas en los distintos distritos de Lima Metropolitana (San Juan de Lurigancho, San Miguel, Villa el Salvador y Comas).

5.4. Lugar de trabajo

El presente estudio fue ejecutado en el Servicio de Control de Calidad-Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5.5. Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó a partir de la fórmula de poblaciones infinitas N°1 [61]:

$$n = \frac{z^2 \times p \times q}{d^2} \dots N^{\circ}1$$

Donde:

n = tamaño muestral

z = nivel de confianza

p = prevalencia esperada. Debido a no tener trabajos o investigaciones que nos aporten una prevalencia, se estableció la prevalencia del 50%

q = proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio (1 - p)

d = nivel de precisión absoluta (margen de error)

El tamaño de la muestra se estimó asumiendo un nivel de confianza de $Z = 1,96$, con una prevalencia esperada del 50% ($p = 0,5$) por lo tanto $q = (1 - p) = 0,5$ y con un margen de error de $d = 0,08$.

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,50 \times 0,50}{0,08^2} = 151$$

El resultado por fórmula fue 151 huevos como mínimo; así mismo se consideró un redondeo a 168 huevos para distribuirlos en forma homogénea entre los cuatro pequeños productores (42 huevos/pequeño productor y 6 pool conformado por 7 huevos).

5.5.1. Recolección de muestras

Se seleccionaron cuatro distritos de Lima Metropolitana considerando la conformación de sus unidades territoriales registrados por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) [62]:

- Lima Este: San Juan de Lurigancho (M1)
- Lima Centro: Santa Miguel (M2)
- Lima Sur: Villa El Salvador (M3)
- Lima Norte: Comas (M4)

Luego se procedió a seleccionar al azar un pequeño productor de cada distrito. Cada grupo de huevos que se compró se rotuló indicando la fecha y la zona de procedencia. La compra se realizó en dos tiempos, la primera, en el mes de mayo del 2023 y una segunda compra en el mes de julio del mismo año para evaluar si los animales tenían un tratamiento continuo con dichos antibióticos.

Se realizó la recolección de 24 muestras provenientes de los 4 distritos seleccionados, cada muestra estuvo compuesta por una mezcla (pool) de 7 huevos, se analizaron 6 muestras por cada pequeño productor de huevos de codorniz, adquiriendo un total de 168 huevos.

5.6. Materiales, reactivos y equipos

5.6.1. Material de laboratorio

- Fiola de 25, 50 y 100 mL

- Frascos para laboratorio de 1000 mL
- Jeringas desechables de 1 mL
- Matraces volumétricos de 1000 mL
- Pipetas pasteur, probeta 25 mL y 100 mL
- Soporte de tubo de ensayo
- Tubos de ensayo para centrifuga de 50 mL
- Tubos de ensayo de vidrio de 10 mL
- Tubo de centrifuga de 1,5 mL
- Viales de 1,5 mL
- Vaso precipitado de 30 mL y 100 mL
- Columna analítica ZORBAX SB-C18 5µm, 4,6x150 mm (Agilent Technologies, USA)
- Cartucho SCX bencenosulfónico SPE - Phenomenex (Agilent Technologies, USA).

5.6.2. Reactivos

- Ácido acético glacial, 100% (Merck KGaA, Alemania)
- Cloroformo, ≥99.8% (Avantor Performance Materials, USA)
- Acetona, ≥ 99.5 % (Mercantil laboratorio SAC, USA)
- Cloruro de sodio, ≥99% (Avantor Performance Materials, USA)
- Sulfato de sodio, 99,99% (Merck peruana S.A., Alemania)
- n-hexano, ≥98.5% (Mercantil laboratorio SAC, USA)
- Amonio hidróxido, 28%-30% (Mercantil laboratorio SAC, USA)
- Acetato de amonio, ≥97% (Avantor Performance Materials, Mexico)
- Agua destilada y desionizada
- Acetonitrilo grado HPLC (Mercantil S.A., China) Metanol grado HPLC (Mercantil S.A., USA)
- Estándar de sulfametoxazol (SMX) 99,7% (Sigma–Aldrich, USA)
- Estándar de sulfadiazina (SDA) 99,8% (Sigma–Aldrich, USA)

5.6.3. Equipos

- Balanza analítica electrónica XS105DU 41g/120g (Mettler-Toledo, USA)
- pHmetro de mesa (Mettler-Toledo AG, Suiza)

- Centrífuga universal modelo PLC-012E (Carper Labs, USA)
- Sonicador/baño ultrasónico (Emerson Electric Co, USA)
- Micropipetas calibradas de 1000 μL (Eppendorf®, Alemania)
- Purificador de agua Milli-Q (Merck KGaA, Francia)
- Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) modelo 1260 (Agilent-USA).

5.7. Procedimientos

5.7.1. Preparación de la solución estándar

Se pesó, de forma independiente, 20 mg de sulfametoxazol (SMX) y 20 mg de sulfadiazina (SDA) luego cada antibiótico fue disuelto en 25 mL de metanol, obteniendo dos soluciones madre de SMX y otra de SDA, ambas de 0,8 mg/mL. A la solución madre se le realizaron diluciones con fase móvil (850 mL de acetato de amonio 0,02 M, 75 mL de metanol y 75 mL de acetonitrilo) hasta obtener las concentraciones de interés: de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 1,6 $\mu\text{g/mL}$ y 3,2 $\mu\text{g/mL}$ [63].

5.7.2. Preparación de las muestras de huevos

Una muestra estuvo compuesta por 7 huevos, cada huevo se quebró en una superficie plana, se depositó la yema y la albumina en un vaso precipitado y se homogenizó durante 1 minuto la muestra para obtener 10 g, para llevar a cabo el análisis [63].

5.7.3. Procesamiento de las muestras de huevos

Se transfirió 10 g de la muestra a un tubo de centrifuga de propileno donde se trató con 500 μL de ácido acético al 10%; se dejó en reposo por 15 minutos para obtener un valor de pH entre 5 a 6 pasado el tiempo indicado, se añadió 30 mL de cloroformo/acetona (50:50, v:v), se agitó la solución con ayuda del vortex (agitador) por un periodo de 10 minutos, a continuación, es llevado al sonicador para someterlo a un tratamiento ultrasónico por 20 minutos. Posteriormente, se adicionaron 3,0 g de NaCl y 3,0 g de Na_2SO_4 , se mezcló vigorosamente y se centrifugó (3500 RPM, 20 min, $T=10^\circ\text{C}$). Después de ello, con una pipeta pasteur se procedió a tomar 25 mL de la solución obtenida de la muestra centrifugada (se descartó el sedimento) y se transfirió a una fiola donde se añadió

2,5 mL de ácido acético glacial, esta mezcla resultante se agregó al cartucho SCX bencenosulfónico SPE (Phenomenex) previamente acondicionado [63].

El acondicionamiento de la columna cartucho SCX bencenosulfónico SPE (Phenomenex) se realizó con la finalidad de eliminar impurezas que pueda estar presentes, solvatar el soporte adsorbente del cartucho para que interactúe de manera efectiva con la sustancia de interés y equilibrar el mismo en una composición similar a la muestra [64]. Para ello, se lavó dos 2 veces con 3 mL de n-hexano y dos veces con 3 mL de 5% de ácido acético en cloroformo/acetona (50:50, v:v), asimismo, para dicho proceso se empleó un colector de vacío para extracción en fase sólida, se aplicó la mezcla resultante a la parte superior de un cartucho, el siguiente paso fue lavar la columna con 5 mL de agua y 5 mL de metanol. La solución que fluyó por medio del cartucho se descartó [63].

Se procedió luego a añadir 13 mL de metanol/amoníaco (97,5:2,5; v:v) al cartucho y el eluyente resultante contuvo las sulfonamidas aisladas. Esta solución se evaporó hasta sequedad a 45°C bajo una atmósfera suave de nitrógeno, luego el residuo se reconstituyó adicionando 1 mL de fase móvil y 0,5 mL de n-hexano y después se centrifugó a 3500 RPM durante 10 min a 20 °C. El extracto desengrasado (fase inferior) se transfirió a un vial y luego fue inyectado en el sistema de HPLC [63]. En el ANEXO 2 se esquematiza los pasos para la extracción de las muestras de huevos.

5.7.4. Análisis por HPLC-DAD

Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1260 acoplado al detector de arreglo de diodos, se utilizó una Columna analítica ZORBAX SB-C18 5µm, 4,6x150 mm para la separación de los componentes de la muestra. La inyección del volumen fue de 20 µL y la temperatura del horno de la columna se fijó en 40°C. La fase móvil empleada en la separación de las sulfonamidas contuvo la solución tampón de acetato 0,02 M a pH 4,50 ± 0,02 (A) y una mezcla de metanol/acetonitrilo 50:50 (v/v) (B) en una proporción de 85:15 (v/v), a un flujo de 1 ml/min. Además, la detección de los residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol se realizó en una longitud de onda entre 220 y 360 nm, siendo 270 nm la principal y el ancho de banda de 4 nm [63].

5.8. Análisis cuantitativo en huevos de codorniz

Previo a la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en el huevo se tomaron en cuenta parámetros de la validación de un método analítico como linealidad, estabilidad, precisión, recuperación, límite de detección y límite de cuantificación [65,66].

5.9. Linealidad

Linealidad es conocida como la curva de calibración donde se evidencia la relación lineal de concentración frente a una respuesta cromatográfica [67]. Con los resultados de las áreas de los picos y las siete diferentes concentraciones, se generó una curva de calibración que demostró la relación lineal del método analítico a partir del coeficiente de determinación (r^2) y coeficiente de correlación lineal (r) [63]. Se obtuvo la ecuación de la curva de calibración para cada uno de los dos antibióticos de sulfonamida. Según los rangos de concentración de residuos de sulfametoxazol en huevos de codorniz descritos por Wang et al. [15] fueron de 0,07 $\mu\text{g/g}$ a 2,48 $\mu\text{g/g}$. A partir de dicho dato se consideró el punto medio de la curva de calibración de 2,48 $\mu\text{g/g}$ (0,8 $\mu\text{g/mL}$). En este estudio se emplearon siete niveles de concentración teóricos 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$, 1,6 $\mu\text{g/mL}$ y 3,2 $\mu\text{g/mL}$. El análisis de los estándares se desarrolló en 3 corridas cromatográficas, con un volumen de inyección de 20 μL .

5.10. Estabilidad

La estabilidad es para corroborar si existe algún cambio o variación en la concentración del estándar en condiciones para su almacenamiento [68]. En tal sentido, se evaluó la estabilidad de la mezcla de 1,12 $\mu\text{g/mL}$ del estándar de SDA y SMX durante el tiempo que permaneció dentro del sistema de HPLC, a temperatura ambiente a las 24 h y 48 h. Así también, se realizó el estudio de estabilidad para otra condición de almacenamiento como es la refrigeración (4 °C) a las 24 h y 48 h, tiempo hasta antes de realizar el ensayo. En el análisis por HPLC se realizaron 3 inyecciones para el estándar de SDA y el estándar de SMX en ambas temperaturas; calculando el porcentaje de concentración de las sulfonamidas [63].

5.11. Precisión

La precisión nos brinda información acerca del grado de dispersión entre los datos obtenidos del área bajo la curva y del tiempo de retención (TR) [67]. Las sulfonamidas son sustancias de “tolerancia cero” en alimentos como los huevos de modo que, no se establecen límites de residuos en los mismos. Asimismo, se evaluó la precisión por medio de la repetibilidad, el cual es obtenido bajo las mismas condiciones de operación: mismo día, equipo y analista. Además, para el ensayo de precisión sobre el sistema cromatográfico se empleó la concentración de 0,8 µg/mL para los estándares de SDA y SMX y se consideraron 6 inyecciones [63]. Por otro lado, se calculó el promedio y desviación estándar relativa (DSR) del área bajo la curva de las señales cromatográficas y del tiempo de retención (TR).

$$DSR(\%) = \left(\frac{DS}{\bar{x}} \right) \times 100 \dots\dots N^{\circ}2$$

$$DS = \frac{\sqrt{(x - \bar{x})^2}}{N-2} \dots\dots N^{\circ}3$$

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

5.12. Límite de cuantificación y detección del método

El límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración de la sustancia de interés que puede ser cuantificada a un nivel de precisión y exactitud aceptable, en cambio, el límite de detección (LD) es la mínima concentración de la sustancia de interés que es posible demostrar su presencia en la muestra con certeza [69]. Por tanto, los valores de la investigación fueron calculados en base a la curva de recuperación; obteniéndose mediante la aplicación de las siguientes fórmulas [63]:

$$LC = \frac{(10 \times DS)}{\beta} \dots\dots N^{\circ}4$$

$$LD = \frac{(3 \times DS)}{\beta} \dots\dots N^{\circ}5$$

$$DS = \sqrt{S^2_{xy}} \dots\dots N^{\circ}6$$

$$S^2_{xy} = \frac{\Sigma y^2 - \alpha \Sigma y - \beta \Sigma xy}{n - 2} \dots\dots N^{\circ}7$$

Donde:

LC: límite de cuantificación

LD: límite de detección

DS: desviación estándar

β : pendiente de la curva de recuperación

α : intercepto

S^2_{xy} = Varianza

5.13. Recuperación

La recuperación nos brinda información sobre el rendimiento del método analítico, en lo que respecta al proceso de extracción y la cantidad de analito presente en la muestra [70]. Por consiguiente, para el presente análisis, se enriquecieron 2 muestras de huevo de codorniz con concentraciones conocidas de 1,6 $\mu\text{g/mL}$, 0,8 $\mu\text{g/mL}$ y 0,4 $\mu\text{g/mL}$ para SDA y SMX. Además, se realizaron 6 corridas para cada uno de los tres niveles de concentración, los cuales se encuentran dentro del rango de la curva de calibración. También, se empleó un huevo de codorniz sin fortificar. Con los datos brindados se aplicó la siguiente fórmula de recuperación:

$$\%recuperacion = \frac{C_e}{C_d} \times 100 \dots\dots N^{\circ}8$$

Donde:

Ce: Concentración encontrada

Cd: Concentración declarada o conocida

5.14. Cuantificación en las muestras de huevos

Para la cuantificación se realizaron 2 inyecciones por muestra. Asimismo, a partir de la ecuación de curva de calibración se logró calcular las concentraciones de SMX y SDA presentes en las muestras de huevos de codorniz con la presente fórmula:

$$C = m(A) \pm b \dots N^{\circ}9$$

Donde:

C: Concentración de la muestra en $\mu\text{g/mL}$

m: Pendiente de la ecuación lineal

A: Área del pico cromatográfico

b: Intercepción en el eje y

VI. RESULTADOS

6.1. Linealidad

Tabla 1. Diferentes niveles de concentración de los estándares de Sulfadiazina (SDA) y Sulfametoxazol (SMX) y sus áreas de picos

Concentración práctica ($\mu\text{g/mL}$)		Área de picos (mAU*s)	
SDA	SMX	SDA	SMX
0,051647	0,05209325	25,8272100	23,8402100
0,051647	0,05209325	25,4130400	24,5152200
0,051647	0,05209325	25,2408100	23,9356000
0,103293	0,10418650	50,8651600	47,3006400
0,103293	0,10418650	50,8569300	47,6026000
0,103293	0,10418650	50,9505300	47,3635900
0,206586	0,20837300	101,808130	94,0225100
0,206586	0,20837300	101,742870	94,0047600
0,206586	0,20837300	101,783170	94,0261000
0,413172	0,41674600	202,807370	188,295330
0,413172	0,41674600	202,730160	188,224090

0,413172	0,41674600	202,167050	188,625060
0,826344	0,83349200	404,087250	375,084440
0,826344	0,83349200	404,502810	375,347290
0,826344	0,83349200	404,007200	375,047240
1,652688	1,66698400	812,269040	749,760070
1,652688	1,66698400	811,630000	750,920470
1,652688	1,66698400	810,664790	750,708010
3,305376	3,33396800	1631,93164	1508,35840
3,305376	3,33396800	1633,05212	1511,76868
3,305376	3,33396800	1632,51404	1509,19958

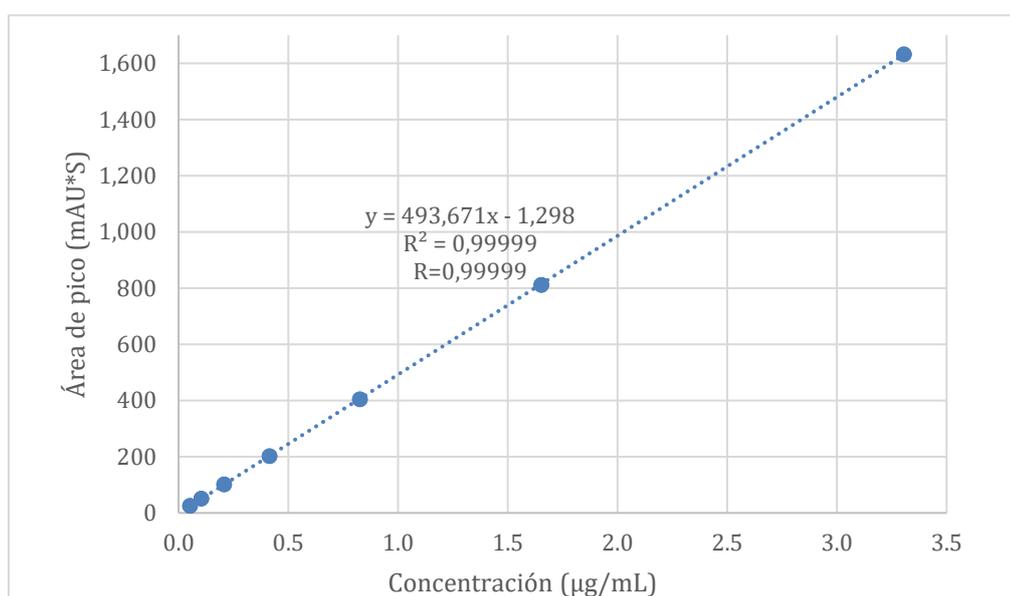


Figura 5. Curva de calibración del análisis de SDA mediante HPLC-DAD

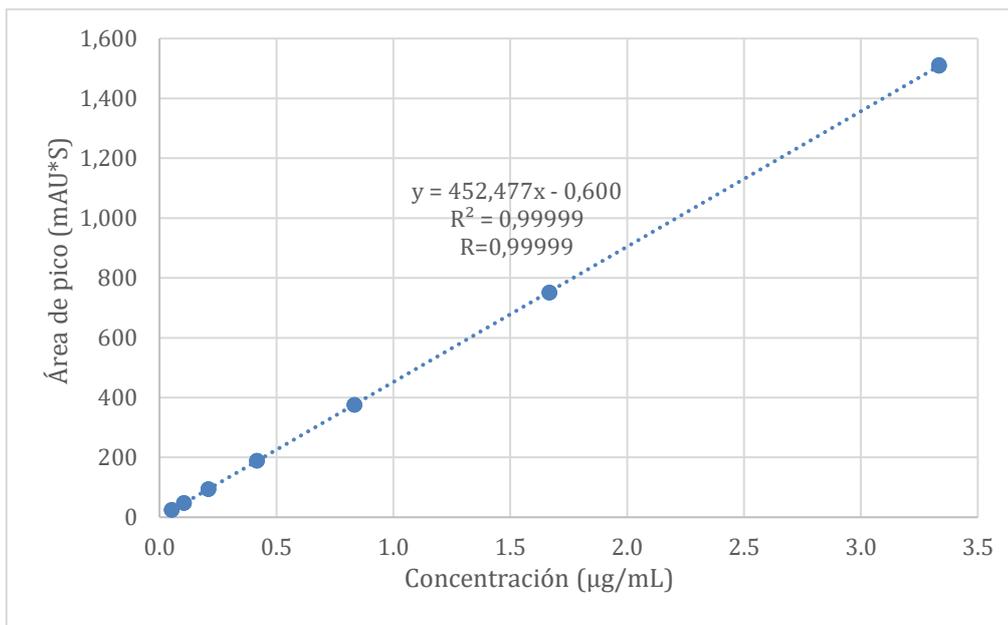


Figura 6. Curva de calibración del análisis de SMX mediante HPLC-DAD

En la investigación se evaluaron 7 niveles de concentración teóricos: 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1,6 µg/mL y 3,2 µg/mL. De lo anteriormente señalado se construyó la curva de calibración, tal y como se observa en la figura 4 y figura 5. Por lo cual, para el antibiótico de sulfadiazina la ecuación obtenida de la curva de calibración fue $y = 493,671x - 1,298$ con un coeficiente de correlación (r) de 0,99999 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99999. Por otro lado, para el sulfametoxazol, la ecuación fue $y = 452,477x - 0,600$ con un $r=0,99999$ y $r^2=0,99999$. A partir de estos resultados se puede considerar que cumplen con el criterio de aceptación para la linealidad del método analítico el cual establece un valor de coeficiente de correlación mayor a 0,98 y coeficiente de determinación mayor a 0,99 [71].

6.2. Estabilidad

Tabla 2. Estabilidad para SDA y SMX a temperatura ambiente

Estándar	Tiempo (h)	Área de pico	Concentración		DS	DS (%)
			(µg/mL)	(%)		
SDA	0	58,85860	0,12186	100,00	0,0000	0,0000
		58,51275	0,12116			
		58,65054	0,12143			
	24	58,62481	0,12138	99,75	0,0003	0,2433
		58,41894	0,12097			
	48	58,49281	0,12112	100,06	0,0006	0,5086

		58,92445	0,12199			
SMX	0	55,56913	0,12414	100,00	0,0000	0,0000
		54,57350	0,12194			
		54,40101	0,12156			
	24	55,04064	0,12297	100,67	0,0006	0,4496
		55,39552	0,12375			
	48	54,18691	0,12108	100,54	0,0030	2,4412
56,11161		0,12534				

Tabla 3. Estabilidad para SDA y SMX en refrigeración

Estándar	Tiempo (h)	Área de pico	Concentración		DS	DS (%)
			($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(%)		
SDA	0	58,85860	0,12186	100,00	0,0000	0,2903
		58,51275	0,12116			
		58,65054	0,12143			
	24	59,20894	0,12257	100,44	0,00080	0,6356
		58,66750	0,12147			
	48	58,60304	0,12134	99,61	0,00050	0,3792
58,28265		0,12069				
SMX	0	55,56913	0,12414	100,00	0,0000	1,1372
		54,57350	0,12194			
		54,40101	0,12156			
	24	55,08935	0,12308	99,53	0,0016	1,2857
		54,08593	0,12086			
	48	54,05657	0,12079	99,91	0,0023	1,8864
55,53444		0,12406				

Los resultados del estudio de estabilidad mostraron que a temperatura ambiente y en refrigeración la concentración de los estándares permaneció cerca del 100% como se muestra en la Tabla 2, lo que asegura que continuaron estables durante el periodo de tiempo estimado (24 h y 48 h).

6.3. Precisión

Tabla 4. Precisión del sistema cromatográfico para los estándares de SDA y SMX a 0,8 µg/mL

Inyecciones o Réplicas	Tiempo de retención SDA	Tiempo de retención SMX	Áreas de picos SDA	Áreas de picos SMX
1	4,363000	11,573000	404,08725	375,08444
2	4,363000	11,580000	404,50281	375,34729
3	4,363000	11,568000	404,00720	375,04724
4	4,360000	11,572000	404,14496	373,74442
5	4,358000	11,571000	404,37051	375,37732
6	4,361000	11,569000	404,23062	376,47815
Promedio	4,361330	11,572167	404,22389	375,17981
DS	0,002066	0,0042620	0,1850370	0,8763290
RSD %	0,047361	0,0368320	0,0457760	0,2335760

Los resultados sugieren que el método es preciso ya que se obtuvieron porcentajes de Desviación Estándar Relativa (%DSR) inferiores al 2% como se aprecia en la Tabla 4 [70].

6.4. Límite de detección y cuantificación del método

Tabla 5. Límites de cuantificación y detección para SDA y SMX

Estándar	LD (µg/Kg)	LC (µg/Kg)
SDA	2,69	8,97
SMX	1,30	4,32

La SDA presentó un límite de detección calculado de 2,69 µg/Kg y un límite de cuantificación de 8,97 µg/Kg. Mientras que los resultados del LD y LC para el SMX fueron 1,30 µg/Kg y 4,32 µg/Kg, respectivamente, como se indica en la Tabla 5. Los datos utilizados en el cálculo del límite de cuantificación y límite de detección se muestran en el ANEXO 3 y ANEXO 4.

6.5. Recuperación

Tabla 6. Análisis de recuperación de muestras enriquecidas con SDA

Concentración declarada (µg/Kg)	Área de pico (mAU*min)	Concentración encontrada (µg/Kg)	Recuperación (%)	Promedio de recuperación (%)	DSR (%)
80,6384	260,1259	79,4328	98,50500	99,1114	0,4216
80,6384	261,0987	79,7284	98,87150		
80,6384	261,1054	79,7304	98,87410		
80,6384	262,6581	80,2022	99,45910		
80,6384	262,7036	80,2160	99,47630		
80,6384	262,7189	80,2207	99,48210		
40,3192	135,7536	41,6427	103,2827	101,7641	1,6716
40,3192	135,8808	41,6814	103,3785		
40,3192	135,7548	41,6431	103,2835		
40,3192	131,8508	40,4569	100,3415		
40,3192	131,6724	40,4027	100,2071		
40,3192	131,5186	40,3559	100,0911		
20,1596	63,24430	19,6110	97,27880	95,6108	1,1768
20,1596	61,22390	18,9971	94,23360		
20,1596	62,33610	19,3351	95,91000		
20,1596	61,35960	19,0384	94,43830		
20,1596	62,27020	19,3151	95,81070		
20,1596	62,39130	19,3518	95,99310		

Tabla 7. Análisis de recuperación de muestras enriquecidas con SMX

Concentración declarada (µg/Kg)	Área de pico (mAU*min)	Concentración encontrada (µg/Kg)	Recuperación (%)	Promedio de recuperación (%)	DSR (%)
82,9504	238,8916	79,3931	95,75940	96,3489	0,4216
82,9504	239,3693	79,5515	96,11580		
82,9504	239,3693	79,5515	96,11820		
82,9504	240,0490	79,7768	96,68700		
82,9504	239,9193	79,7338	96,70370		
82,9504	240,2601	79,8468	96,70930		
41,4752	117,2415	39,0653	100,4040	98,9277	1,6716
41,4752	117,0398	38,9984	100,4972		
41,4752	116,9655	38,9738	100,4048		
41,4752	118,4238	39,4572	97,54480		

41,4752	117,8378	39,2630	97,41410		
41,4752	118,5049	39,4841	97,30140		
20,7376	60,84390	20,3691	94,56750	92,9459	1,1768
20,7376	60,54450	20,2699	91,60710		
20,7376	60,41750	20,2278	93,23680		
20,7376	57,77080	19,3504	91,80610		
20,7376	58,17350	19,4839	93,14030		
20,7376	58,67060	19,6487	93,31760		

Los valores de recuperación (% media \pm DS) obtenidos para 80 $\mu\text{g/Kg}$, 40 $\mu\text{g/Kg}$ y 20 $\mu\text{g/Kg}$ SDA fueron 99,1% \pm 0,4; 101,8% \pm 1,7 y 95,6% \pm 1,1, respectivamente. Así como, los valores de recuperación para SMX fueron 96,3% \pm 0,4; 98,9% \pm 1,7 y 92,9% \pm 1,1. El criterio de aceptación para la recuperación cuando las concentraciones son mayores de 10 $\mu\text{g/kg}$ es de 80-110% [67,72]. Por lo cual, los resultados siguen con satisfacción el criterio de aceptación antes señalado (Tabla 6 y Tabla 7).

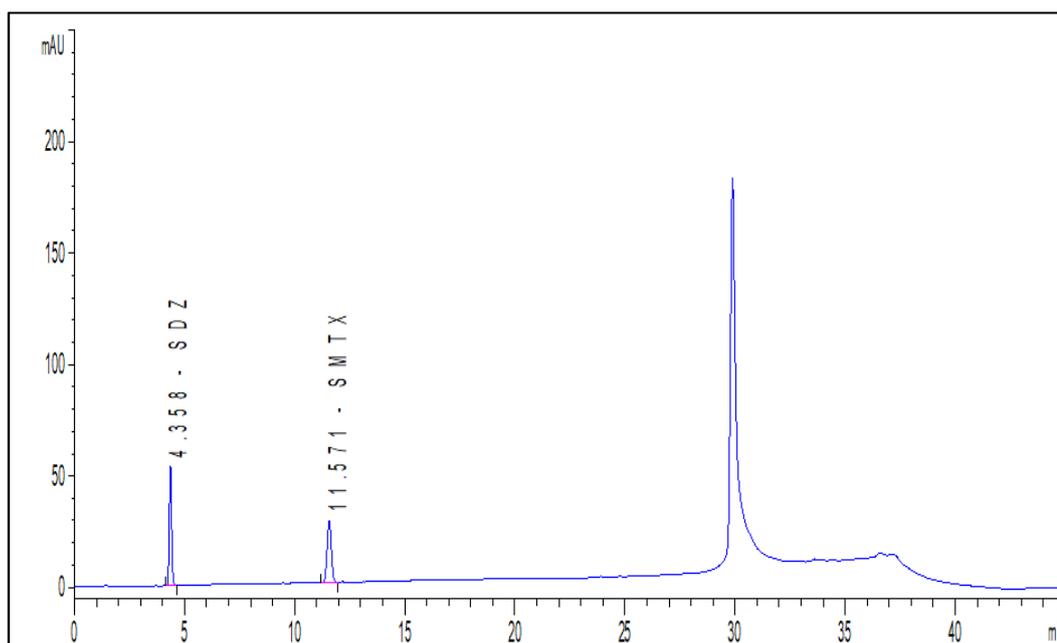


Figura 7. Cromatograma obtenido de la recuperación 80 $\mu\text{g/Kg}$ de SMX y SDA mediante HPLC-DAD

Así también, en el cromatograma para el huevo fortificado se obtuvo la presencia de picos correspondiente a la concentración 80 $\mu\text{g/Kg}$ para el antibiótico de sulfadiazina y sulfametoxazol (Figura 6).

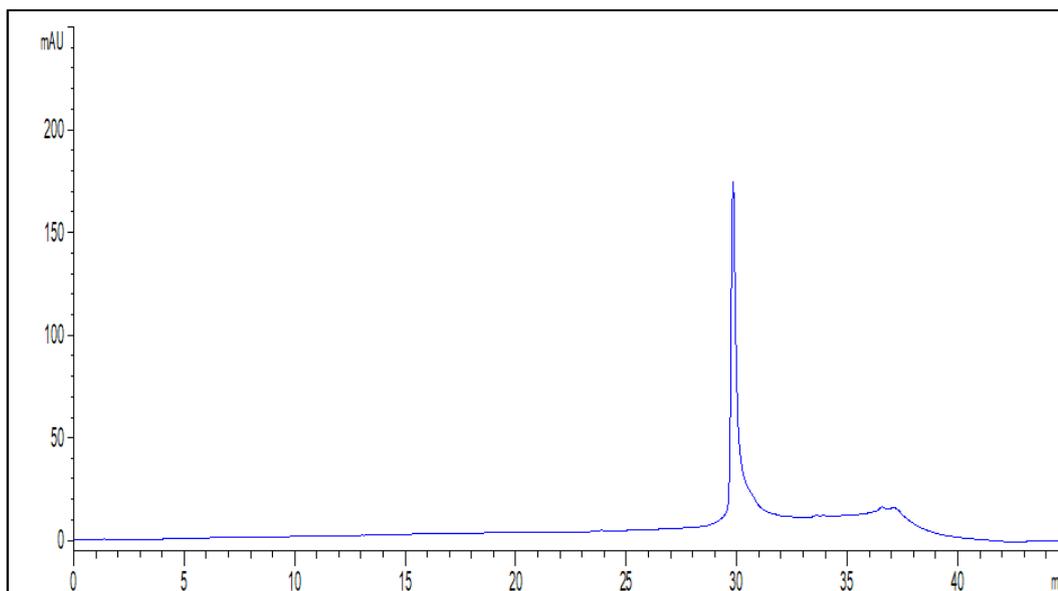


Figura 8. Cromatograma del blanco, huevo de codorniz no enriquecido, mediante HPLC-DAD

Asimismo, en el cromatograma del huevo sin fortificar, es decir, libre de antibióticos, no se apreciaron picos correspondientes a sulfadiazina y sulfametoxazol (Figura 7).

6.6. Cuantificación en las muestras de huevos

Tabla 8. Concentraciones promedio de los residuos de SDA y SMX en muestras de huevo de codorniz de cuatro pequeños productores de Lima Metropolitana del mes de mayo

Muestra	N°	Concentración (µg/Kg)		Concentración promedio (µg/Kg)		DS		Rango (µg/Kg)	
		SDA	SMX	SDA	SMX	SDA	SMX	SDA	SMX
MVS	1	1,18336	1,95377	0,97	1,33	0,19	0,42	0,75	0,67
	1	0,76163	1,51737						
	2	1,17179	0,67369						
	2	0,74939	1,17844						
	3	0,91298	1,28588						
	3	1,02917	1,39560						
MSM	1	1,02122	4,07943	0,82	2,18	0,14	0,57	0,64	0,90
	1	0,84515	4,27906						
	2	0,87420	1,24064						
	2	0,68761	1,56575						
	3	0,83826	0,89868						

	3	0,64464	1,02192						
MSJL	1	1,01426	1,92448	0,98	1,53	0,20	0,40	0,80 -	1,15 -
	1	1,10727	2,08912						
	2	0,84198	1,14698						
	2	0,80788	1,33531						
	3	1,28445	1,52618						
	3	0,80083	1,16729						
MCOM	1	1,01117	0,00000	0,83	0,72	0,29	0,79	0,51 -	0,00 -
	1	1,30495	1,28467						
	2	0,69935	0,00000						
	2	0,85524	0,00000						
	3	0,50880	1,52527						
	3	0,61936	1,50327						

Tabla 9. Concentraciones promedio de los residuos de SDA y SMX en muestras de huevo de codorniz de cuatro pequeños productores de Lima Metropolitana del mes de julio

Muestra	N°	Concentración (µg/Kg)		Concentración promedio (µg/Kg)		DS		Rango (µg/Kg)	
		SDA	SMX	SDA	SMX	SDA	SMX	SDA	SMX
MVS	1	1,67902	1,86389	2,26	1,80	0,45	0,35	1,68 -	1,38 -
	1	1,71897	1,62709						
	2	2,75850	1,37632						
	2	2,53612	1,55149						
	3	2,44084	2,22219						
	3	2,43489	2,18355						
MSM	1	1,36807	1,54001	2,11	1,47	1,02	0,10	1,37 -	1,32 -
	1	1,41138	1,60698						
	2	1,53556	1,50638						
	2	1,51152	1,45385						
	3	3,39635	1,42358						
	3	3,46353	1,31723						
MSJL	1	1,25873	3,02845	20,09	2,20	28,64	0,55	1,23 -	1,08 -
	1	1,23298	3,03212						
	2	1,93073	2,43583						
	2	1,99858	2,07117						
	3	57,03585	1,53547						
	3	57,08903	1,08191						
MCOM	1	1,66236	2,30222	3,43	2,08	1,41	0,31		
	1	1,61063	2,42645						

2	4,31989	2,14490							
2	4,72640	2,20518						1,61	1,69
3	4,22905	1,69072						-	-
3	4,04954	1,71968						4,73	2,43

Se analizaron 6 muestras por pequeño productor procedentes de Villa el Salvador (MVS), San Miguel (MSM), San Juan de Lurigancho (MJSL) y Comas (MCOM), asimismo, ejecutándose 2 inyecciones para cada uno, los resultados se muestran en la Tabla 8 y Tabla 9. Así también, en la recolección de muestra del mes de mayo entre los cuatro pequeños productores se obtuvieron concentraciones de SDA de $0,82 \mu\text{g/Kg} \pm 0,14$ hasta $0,98 \mu\text{g/Kg} \pm 0,20$ y para SMX se obtuvieron concentraciones de $0,72 \mu\text{g/Kg} \pm 0,79$ hasta $2,18 \mu\text{g/Kg} \pm 0,57$. Por otro lado, en el mes de julio se encontraron concentraciones de SDA de $2,11 \mu\text{g/Kg} \pm 1,02$ hasta $20,09 \mu\text{g/Kg} \pm 28,64$ y para SMX $1,47 \mu\text{g/Kg} \pm 0,10$ hasta $2,20 \mu\text{g/Kg} \pm 0,55$. Los cromatogramas de las muestras se aprecian en el ANEXO 5.

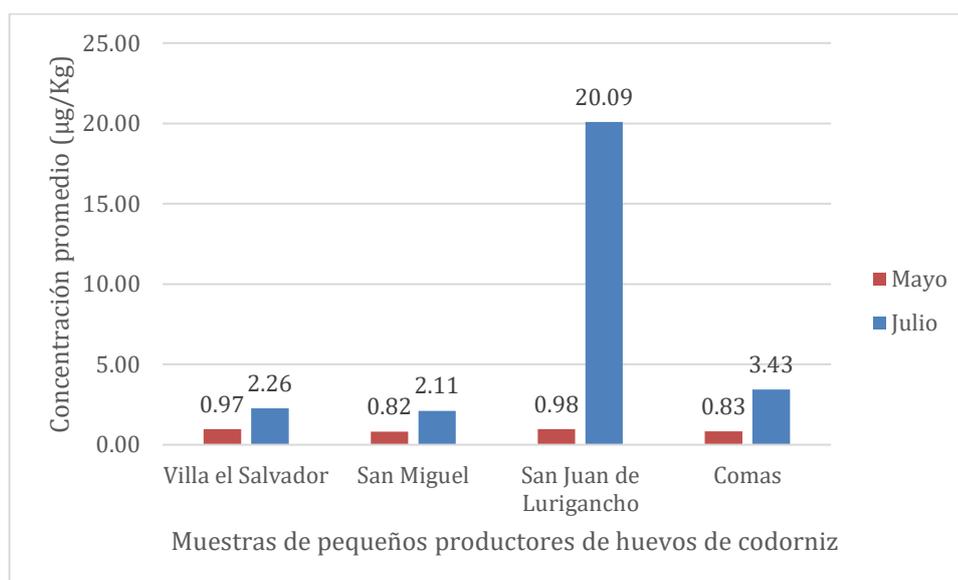


Figura 9. Concentración promedio de SDA en huevos de codorniz recolectados de Lima Metropolitana en el mes de mayo y julio

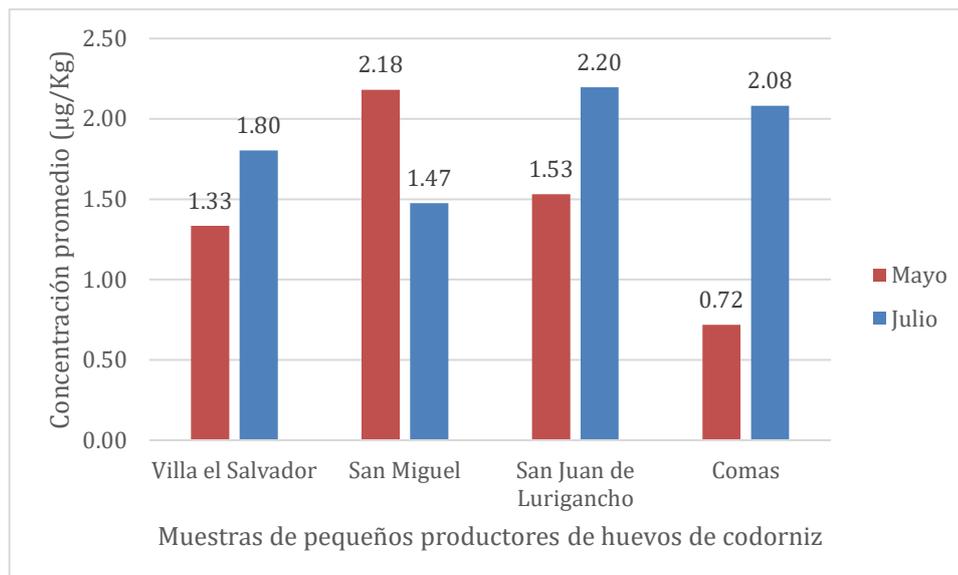


Figura 10. Concentración promedio de SMX en huevos de codorniz recolectados de Lima Metropolitana durante el mes de mayo y julio

Las concentraciones promedio de residuos de sulfadiazina y sulfametoxazol presentaron un incremento para el mes de julio (Figura 8 y Figura 9). Así también, las muestras compradas de San Juan de Lurigancho obtuvieron una concentración promedio de sulfadiazina de 20,09 µg/Kg, siendo la más elevada en comparación con los tres distritos.

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como propósito determinar si hay presencia de residuos de sulfonamidas en el huevo de codorniz provenientes pequeños productores de Lima Metropolitana, lo que supone un riesgo en la salud pública debido a las posibles consecuencias que trae consigo como es la generación de resistencia bacteriana, reacciones alérgicas o toxicidad.

El presente estudio empleó el HPLC-DAD, en donde el equipo de HPLC acoplado a diferentes tipos de detección es una técnica considerada más empleada para la cuantificación y confirmación de residuos de sulfonamidas [73]. En contraste con el estudio de Sarkar *et al.*, que emplearon el kit ELISA competitivo, técnica de fácil operación y bajo costo, sin embargo, esta última no es tan sensible como el método de HPLC [17]; y como el estudio de Sineque *et al.*, que emplearon el método de bioensayo para determinar la presencia o ausencia de antibióticos o clase de antibióticos [16], así

como su aplicación a gran escala, no obstante, su sensibilidad y especificadas son bajas comparada con la técnica cromatográfica, por lo que es necesario que los resultados positivos se confirmen con técnicas analíticas más sofisticadas como la cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos, cromatografía en capa fina, entre otros [74].

Se determinaron parámetros de validación como: linealidad, estabilidad, recuperación, precisión, límite de cuantificación y límite de detección para el método analítico. Es decir, el método fue lineal en el rango de concentración evaluado ya que los coeficientes de determinación para ambos antibióticos fueron de 0,99999; por lo cual, estuvieron dentro de los criterios de aceptación. Estos resultados, son similares al estudio publicado por Summa *et al.*, para determinar residuos de sulfonamidas en huevos, cuyos valores de coeficiente de determinación fue mayor a 0,9990 para ambas sulfonamidas [63].

Se evidenció la estabilidad, porque la concentración de los estándares de sulfadiazina y sulfametoxazol permanecieron cerca del 100 % (concentración inicial), a condiciones de temperatura ambiente se obtuvieron resultados de 99,75 % y 100,06 % a las 24 y 48 horas para sulfadiazina y 100,67 % y 100,54 % para sulfametoxazol, respectivamente. De forma similar con el estudio realizado por Huamán, la estabilidad a temperatura ambiente en el día 1 y 2, obtuvo concentraciones de 100 % y 100,33 %, respectivamente [68].

Se demostró que el método analítico fue preciso, porque proporcionó coeficientes de variación inferiores al 2 %, los cuales fueron 0,047361 % y 0,045776 % para el tiempo de retención y el área de pico de sulfadiazina, respectivamente, por otro lado, para el sulfametoxazol se obtuvieron resultados de 0,036832 % y 0,233576 % para el tiempo de retención y el área de pico. En comparación con el parámetro de precisión realizado por Huamán, para el estándar de triclabendazol a la concentración de 1,14 µg/mL se obtuvieron valores similares de DSR (%) 0,6198 para el tiempo de retención y de 0,063 para el área de pico [68].

El límite de detección (LD) calculado fue de 2,69 µg/Kg y 1,30 µg/Kg para sulfadiazina y sulfametoxazol, respectivamente; el límite de cuantificación (LC) fue de 8,97 µg/Kg y de 4,32 µg/Kg para el primer y segundo antibióticos previamente mencionado. Los resultados de límite de detección para los dos antibióticos fueron similares a los obtenidos por Summa *et al.*, donde obtuvieron valores de 3,92 µg/kg para sulfadiazina y de 0,92

$\mu\text{g}/\text{kg}$ para sulfametoxazol. Los resultados de límite de cuantificación obtenidos en el estudio de Summa *et al.*, fueron de $1,29 \mu\text{g}/\text{kg}$ para sulfadiazina y $0,30 \mu\text{g}/\text{kg}$ para sulfametoxazol, los cuales fueron inferiores comparados con el presente estudio, debido a que Summa *et al.* trabajaron con un rango de concentración más bajo [63].

Se constato que el método analítico fue exacto, porque se obtuvieron porcentajes de recuperación con un rango de $95,6 \% \pm 1,1$ a $101,8 \% \pm 1,7$ para sulfadiazina, así como, $98,9 \% \pm 1,7$ a $92,9 \% \pm 1,1$ para sulfametoxazol, por tanto, se encontraron dentro del intervalo de 80% a 110% [72]. En contraste con el estudio realizado por Summa *et al.*, donde describió recuperaciones de $72,9 \%$, $76,9 \%$ y $82,3 \%$ para las concentraciones de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ para sulfadiazina y para sulfametoxazol de $61,4 \%$, $65,6 \%$ y $61,3 \%$ para dichas concentraciones respectivamente [63]. Sin embargo, no son mejores a los obtenidos en el estudio, los cuales presentan porcentajes de recuperación cercanos al 100% .

El presente estudio demostró la existencia de al menos una de las dos sulfonamidas analizadas en el 100% de los huevos de codorniz recolectados de los pequeños productores de San Juan de Lurigancho, San Miguel, Villa el Salvador y Comas. Un total del 100% de las muestras (24 muestras) dieron positivo a sulfadiazina y $95,83 \%$ de las muestras (23 muestras) dieron positivo a sulfametoxazol. Los resultados muestran similitud con el estudio publicado por Mingle *et al.*, donde hubo presencia de residuos de antibióticos en el que se incluyó sulfametoxazol en huevos, concluyendo que en el 100% de las muestras evaluadas contenían al menos un residuo de antibiótico [13].

En la investigación se encontró que la concentración media de residuos de sulfonamidas fue de $2,80 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 4,7$ en el 100% de las muestras, al compararlo con estudios, como el realizado por Sarkar *et al.*, quienes hallaron una concentración media de residuos de sulfonamida de $1,22 \mu\text{g}/\text{kg}$ en el $61,1 \%$ (11/18) de los huevos analizados, el cual fue un valor menor comparado con el presente estudio [17]. Por otro lado, los resultados indican que la sulfonamida con la concentración más alta en las muestras compradas fue la sulfadiazina con $57,09 \mu\text{g}/\text{Kg}$; este resultado se asemeja a lo publicado por Mingle *et al.*, quienes reportaron que la muestra con la concentración más alta de sulfonamida fue el sulfametoxazol, alcanzando los $103,98 \mu\text{g}/\text{kg}$ [13].

Asimismo, se contempló un incremento de las concentraciones promedio en los pequeños productores en el mes de julio. Tal y como se menciona en el trabajo realizado por Ampuero-Riega y Morales-Cauti, la presencia de residuos de antibióticos en huevos, probablemente se deba a las malas prácticas de manejo de medicamentos veterinarios (dosis, incumplimiento del periodo de espera e inadecuada selección del fármaco) en la intención de emplearlas para el control o prevención de enfermedades infecciosas [75]. En el Informe del Comité Científico de la AECOSAN se señala que otra posible causa es por la contaminación cruzada en la fabricación de piensos [50].

Se registró en la segunda toma de muestra de San Juan de Lurigancho un valor elevado de sulfadiazina (57,09 µg/Kg) comparado a las muestras de los otros 3 distritos. Para evitar la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos, es necesario, respetar el periodo de espera posterior a la administración del antibiótico ya que, dependiendo de la dosis, vía de administración y duración del tratamiento, los residuos de antibióticos en huevos se eliminan lentamente del producto avícola (llegando a tomar días a semanas) [50]. Se han realizado estudios en gallinas para ver la eliminación del antibiótico en huevos fue así como en la publicación realizada por Atta *et al.*, posterior al retiro del tratamiento con sulfadiazina por 5 días consecutivos, estimaron un tiempo de espera no menor a 3 días para un tratamiento de 0,2 g/L de agua potable y de 4 días para 0,4 g/L de agua potable [76]. Otro estudio realizado por Oikawa *et al.*, estudiaron el tratamiento de sulfametoxazol, en dos vías, adición de alimento al 0,2 o 0,4 % y vía intramuscular 100 mg/kg, dos veces al día por 5 días consecutivos, y sugirieron un periodo de espera de 4 a 10 días, correspondiente a dicho tratamiento [77].

Según Ramírez-Villamizar *et al.*, la presencia de estos residuos de antibióticos en alimentos destinados al consumo humano genera efectos tóxicos, los cuales no se hacen visibles de forma aguda, todo lo contrario, las manifestaciones se presentan a largo plazo, debido a la ingesta continua y prolongada de pequeñas cantidades del antibiótico [78]. Publicaciones realizadas por de Widiasih *et al.* y Pérez registran que el empleo generalizado e inapropiado de antibióticos en aves incrementa el potencial de presencia de residuos de antibióticos en huevos y el desencadenamiento de resistencia al mismo [79,80]. Por lo antes mencionado es probable que los residuos de sulfonamidas causen resistencia en humanos por su ingesta en huevos a causa de la exposición prolongada a bajas dosis del antibiótico.

Los estudios para evaluar la degradación de residuos de antibióticos en huevos como el realizado por Zhao et al., trabajaron con huevos que contenían residuos de sulfonamidas, entre ellos se encontraban la sulfadiazina y el sulfametoxazol, los huevos fueron sometidos a temperaturas de cocción simuladas, y encontraron que hubo una reducción de los residuos, pero no una eliminación completa [81].

Los resultados en el mes de mayo y julio sugieren que las aves tuvieron un tratamiento continuo con las sulfonamidas, sulfadiazina y sulfametoxazol. Se observó que la sulfadiazina, fue una de las sulfonamidas más empleadas, de manera continua, por los cuatro pequeños productores. Asimismo, los pequeños productores de San Juan de Lurigancho, Villa el Salvador y Comas también emplearon sulfametoxazol de forma continua a excepción del pequeño productor de San Miguel donde hubo una disminución en su uso para el mes de julio. Los hallazgos del presente estudio en huevos de codorniz sugieren la importancia de un control de forma continua de residuos de antibióticos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz provenientes de pequeños productores de cuatro distritos de Lima Metropolitana.
- El método analítico demostró ser lineal con un $r > 0,98$ y $r^2 > 0,99$; fue estable, la concentración de los estándares estuvo cerca del 100%; fue preciso, con un DSR < 2%; el límite de detección fue de 2,69 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfadiazina y de 1,30 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfametoxazol; el límite cuantificación fue de 8,97 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfadiazina y de 4,32 $\mu\text{g/Kg}$ para sulfametoxazol; fue exacto, los porcentajes de recuperación estuvieron dentro 80% a 110%.
- Se identificó la presencia de residuos de sulfadiazina en el 100% de muestras y de residuos de sulfametoxazol en el 95,83% de huevos de codorniz destinados al consumo humano provenientes de los cuatro pequeños productores de Lima Metropolitana.
- La concentración media de sulfonamidas obtenida por HPLC-DAD fue de 2,8 $\mu\text{g/Kg} \pm 4,7$ y la concentración de sulfonamida más alta fue de sulfadiazina con 57,09 $\mu\text{g/Kg}$ proveniente del distrito de San Juan de Lurigancho.

IX. RECOMENDACIONES

- Continuar con el proceso de formalización de los productores de huevos de codorniz por parte del Ministerio de la Producción con la asistencia técnica de la municipalidad distrital e impulsar a los avicultores a la obtención del registro de autorización sanitaria.
- Realizar campañas de concientización lideradas por el Ministerio de Salud en conjunto con autoridades municipales acerca del uso adecuado de antibióticos veterinarios en aves que producen huevos para consumo humano.
- Realizar este tipo de análisis en distintas localidades de la nación en coordinación con las autoridades a nivel local por medio de las Direcciones Ejecutivas del SENASA, de forma que se contribuya con la inocuidad del producto avícola.
- Realizar estudios de la cinética de degradación de sulfonamidas en huevos de codorniz y exhortar a las universidades a apoyar a la Dirección Ejecutiva del SENASA en dichas investigaciones.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cheong CK, Hajeb P, Jinap S, Ismail-Fitry, MR. Sulfonamides determination in chicken meat products from Malaysia. J Agric Food Chem [Internet]. 2010 [citado 10 de marzo de 2023]; 17: 885-892. Disponible de: <https://core.ac.uk/download/pdf/153800835.pdf>
2. Mehtabuddin A, Ahmad AMT, Nadeem S, Tanveer ZI, Arshad J. Sulfonamide residues determination in commercial poultry meat and eggs. J Indian Chem Soc [Internet]. 2012 [citado 10 de marzo de 2023]; 22: 473-478. Disponible de: <https://thejaps.org.pk/docs/v-22-2/39.pdf>
3. Chowdhury S, Hassan M, Alam M, Sattar S, Bari M, Saifuddin A et al. Antibiotic residues in milk and eggs of commercial and local farms at Chittagong, Bangladesh. Veterinary World [Internet]. 2015 [citado 10 de noviembre de 2023]; 8(4):467-471. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774793/>
4. Dai T, Duan J, Li X, et al. Determination of sulfonamide residues in food by capillary zone electrophoresis with on-line chemiluminescence detection based on an Ag(III) complex. Int J Mol Sci [Internet]. 2017 [citado 10 de noviembre de 2023]; 18(6): 1286-1296. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486108/>
5. Actualidad Avipecuaria. Huevos de codorniz, alternativa de alto valor nutricional y bajo costo de producción en nuestro país - Actualidad Avipecuaria [Internet]. Actualidad Avipecuaria; 2020 [citado 10 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://actualidadavipecuaria.com/huevos-de-codorniz-alternativa-de-alto-valor-nutricional-y-bajo-costo-de-produccion-en-nuestro-pais/>
6. Tolik D, Poławska E, Charuta A, et al. Characteristics of egg parts, chemical composition and nutritive value of Japanese quail eggs--a review. Folia Biol (Krakow) [Internet]. 2014 [citado 10 de noviembre de 2023]; 62: 287-292. Disponible de: [http://www.isez.pan.krakow.pl/journals/fovia/pdf/62\(4\)/62\(4\)_01.pdf](http://www.isez.pan.krakow.pl/journals/fovia/pdf/62(4)/62(4)_01.pdf)
7. Lukanov H. Domestic quail (*Coturnix japonica domestica*), is there such farm animal? Worlds Poult Sci J [Internet]. 2019 [citado 10 de noviembre de 2023]; 75: 547-558. Disponible de: <https://doi.org/10.1017/S0043933919000631>

8. Fundación Vet+i-Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal. Guía de Uso Responsable de Medicamentos Veterinarios: Avicultura [Internet]. Madrid: Editorial Agrícola Española, S.A; 2017. [citado 10 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.recetaveterinaria.com/guias/guiaAvicultura19.pdf>
9. Widiasih DA, Drastini Y, Yudhabuntara D, R. Daru Maya FL, Sivalingham PL, Susetya H, et al. Detection of antibiotic residues in chicken meat and eggs from traditional markets at Yogyakarta City using bioassay method. Acta Vet Indones [Internet]. 2019 [citado 10 de noviembre de 2023];1-6. Disponible de: <https://doi.org/10.29244/avi.0.0.1-6>
10. Olatoye OI, Ojomo TO, Adeseko YJ. Antibiotics use and gentamicin residues in commercial poultry and chicken eggs from Oyo and Lagos States, Nigeria. Rev Elev Med Vet Pays Trop [Internet]. 2019 [citado 10 de noviembre de 2023]; 72(4):161-165. Disponible de: <https://www.semanticscholar.org/paper/Antibiotics-use-and-gentamicin-residues-in-poultry-Olatoye-Ojomo/1333aef95e39f2c3e1c6ae7fca35c4b6f05fd3f8>
11. Kamali A, Mirlohi M, Etebari M, Sepahi S. Occurrence of tetracycline residue in table eggs and genotoxic effects of raw and heated contaminated egg yolks on hepatic cells. Iran J Public Health [Internet]. 2020 [citado 10 de noviembre de 2023];49(7):1355-1363. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7548491/>
12. Cornejo J, Pokrant E, Figueroa F, Riquelme R, Galdames P, Di Pillo F, et al. Assessing antibiotic residues in poultry eggs from backyard production systems in Chile, first approach to a non-addressed issue in farm animals. Animals (Basel) [Internet]. 2020 [citado 10 de noviembre de 2023];10(6):1056-1066. Disponible de: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/6/1056>
13. Mingle CL, Darko G, Borquaye LS, Asare-Donkor NK, Woode E, Koranteng F. Veterinary drug residues in beef, chicken, and egg from Ghana. Chem Afr [Internet]. 2021 [citado 10 de noviembre de 2023];4(2):339-348. Disponible de: <https://doi.org/10.1007/s42250-020-00225-5>

14. Saluti G, Colagrande M, Castellani F, Ricci M, Diletti G, Scortichini G. Survey on antibiotic residues in egg samples in Italy. *Separations* [Internet]. 2021 [citado 10 de noviembre de 2023];8(9):148-157. Disponible de: <https://www.mdpi.com/2297-8739/8/9/148>
15. Wang R, Zhang C, Li Z, Zheng Z, Xiang Y, Liu Y et al. Detection of fluoroquinolone and sulfonamide residues in poultry eggs in Kunming city, southwest China. *Poultry Science* [Internet]. 2022 [citado 11 de noviembre de 2023];100(1):1-23. Disponible de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579122001882>
16. Sineque CIIIM, Machado ADC, Macuamule CJ, Ngowi HA. High levels of bacterial and antimicrobial drug residues contamination in chicken eggs for human consumption in Morogoro municipality, Tanzania. *Food Res* [Internet]. 2022 [citado 10 de noviembre de 2023];6(6):124-135. Disponible de: https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/15_fr-2021-725_sineque.pdf
17. Sarkar S, Souza MJ, Martin-Jimenez T, Abouelkhair MA, Kania SA, Okafor CC. Tetracycline, Sulfonamide, and Erythromycin Residues in Beef, Eggs, and Honey Sold as “Antibiotic-Free” Products in East Tennessee (USA) Farmers’ Markets. *Veterinary Sciences* [Internet]. 2023 [citado 15 de noviembre de 2023];10(4):243-255. Disponible de: <https://www.mdpi.com/2306-7381/10/4/243>
18. Álvarez K. Presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallinas destinados al consumo humano en Lima Metropolitana [tesis licenciatura en Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009 [citado 15 de noviembre de 2023]. 107 p. Disponible de: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7213/Alvarez_mk.pdf?sequence=1&isAllowed=y
19. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. Estudio sobre codorniz Baja California [Internet]. Baja California: OEIDRUS; 2009 [citado 15 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.nacionmulticultural.unam.mx/empresasindigenas/docs/1925.pdf>

20. Salazar-Rojas T, Porras-Acosta M, Vaquerano-Pineda N, Quirós-Rojas A. Estimación del potencial metanogénico de la codornaza considerando las variables de dilución, adición de nutrientes y codigestión. Rev Tecnol Marcha [Internet]. 2017 [citado 15 de noviembre de 2023]; 29(4):102-110. Disponible de: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822016000400102&script=sci_abstract&tlng=es
21. García G. Densidad de población en jaula y niveles de la batería, en la producción de huevos de las codornices (*Cotornix coturnix japónica*) [tesis licenciatura en Internet]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, 2018. 150 p. Disponible de: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/2708>
22. Zamora R, Hacón A. Consumo y venta del huevo de codorniz en Costa Rica. Nutrición Animal Tropical [Internet]. 2021 [citado 15 de noviembre de 2023]; 2(15):162-182. Disponible de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/nutrianimal/article/view/49418/49330>
23. Werner S. Evaluación técnica - económica de la producción de la codorniz a pequeña escala [tesis licenciatura en Internet]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2014. 40 p. Disponible de: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2369>
24. Vásquez R, Ballesteros H. La cria de codornices (Coturnicultura) [Internet]. Bogota: Produmedios; 2009 [citado 16 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://docplayer.es/39161714-La-cria-de-codornices.html>
25. Ali MA, Abd El-Aziz AA. A comparative study on nutritional value of quail and chicken eggs. Journal of research in the field of specific education [Internet]. 2019 [citado 08 marzo de 2024];5(22):39-56. Disponible de: https://jedu.journals.ekb.eg/article_73533_83d169768de3a836ec32eebafb3cc44.pdf
26. Escalante J. Huevos de Codorniz: propiedades, beneficios y valor nutricional [Internet]. Barcelona: La Vanguardia; 2018 [citado 16 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.lavanguardia.com/comer/materia-prima/20181220/453640451105/huevos-codorniz-propiedades-beneficios-valor-nutricional-alimentos.html>
27. Macedo E. Uso de un probiótico a base de *Saccharomyces cerevisiae* en la engorda de Codorniz japónica [tesis licenciatura en Internet]. Temascaltepec:

Universidad Autónoma del Estado de México; 2017 [citado 16 de noviembre de 2023]. 72p. Disponible de: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/68849>

28. Flamenco CA, Rivas N, Guerrero SE. Comportamiento productivo de la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) bajo diferentes niveles proteicos en la dieta alimenticia en la estación experimental de Santiago Nonualco [tesis licenciatura en Internet]. San Vicente: Universidad de El Salvador; 2008 [citado 16 de noviembre de 2023]. 75p. Disponible de: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3725/1/coturnix..zzz.pdf>
29. Abd El-Ghany W. A Comprehensive Review on the Common Emerging Diseases in Quails. J World's Poult Res [Internet]. 2019 [citado 18 de noviembre de 2023]; 9(4):160-174. Disponible de: [https://jwpr.science-line.com/attachments/article/51/JWPR%209\(4\)%20160-174,%202019%20Common%20Emerging%20Diseases%20in%20Quails.pdf](https://jwpr.science-line.com/attachments/article/51/JWPR%209(4)%20160-174,%202019%20Common%20Emerging%20Diseases%20in%20Quails.pdf)
30. Castro RF. Epizootiología de las salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. Ciencia Veterinaria [Internet]. 1981 [citado 18 de noviembre de 2023]; 3:148-174. Disponible de: <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c05.pdf>
31. Houriet JL. Guía práctica de enfermedades más comunes en aves de corral (ponedoras y pollos) [Internet]. Cerro Azul: Sitio Argentino de Producción Animal; 2007. [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/90-enfermedades.pdf
32. Cabrera O. Colibacilosis en aves [Internet]. AgriNews; 2016 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://avinews.com/colibacilosis-en-aves/>
33. Lorenzoni G. Colibacilosis aviar [Internet]. Psu.edu; 2021 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://extension.psu.edu/colibacilosis-aviar>
34. Otarola R. Ulcerative Enteritis in Poultry - Poultry - MSD Veterinary Manual [Internet]. MSD Veterinary Manual; 2020 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.msdsvetmanual.com/poultry/ulcerative-enteritis/ulcerative-enteritis-in-poultry>

35. Ministerio de Agricultura: Ficha técnica. Cólera aviar [Internet]. Santiago de Chile: Gobierno de Chile; 2016 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/f_tecnica_colera_aviar_v2-2016.pdf
36. Lorenzoni G. Micoplasmosis Aviar [Internet]. Penn State Extension; 2021 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://extension.psu.edu/micoplasmosis-aviar>
37. Lorenzoni G. Coriza infecciosa aviar [Internet]. Psu.edu; 2021 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://extension.psu.edu/coriza-infecciosa-aviar>
38. Wahyuni AETH, Tabbu CR, Artanto S, Setiawan DCB, Rajaguguk SI. Isolation, identification, and serotyping of Avibacterium paragallinarum from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. Vet World [Internet]. 2018 [citado 20 de noviembre de 2023]; 11(4):519-524. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960793/>
39. The Center for Food Security and Public Health. Clamidiosis Aviar [Internet]. Clamidiosis aviar. 2009. [citado 20 de noviembre de 2023]; 1-7. Disponible de: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/clamidiosis_aviar.pdf
40. Bernal JF, del Pilar Donado M. Guía de uso prudente de antimicrobianos en la producción avícola [Internet]. Mosquera: Agrosavia ;2020 [citado 20 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/102/88/865-1?inline=1>
41. Elian VJ. Determinación de resistencia antibiótica de Salmonella spp. a partir de carne de pollos comercializados informalmente en el cantón Latacunga [tesis licenciatura en Internet]. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; 2022 [citado 20 de noviembre de 2023]. 54 p. Disponible de: <https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9624/1/PC-002540.pdf>
42. Azañero G, Chiroque M. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado [tesis de licenciatura en Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos;

- 2010 [citado 22 de noviembre de 2023]. 55 p. Disponible de: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1633/Aza%C3%BAero_rg.pdf?sequence=1&isAllowed=y
43. Comisión del Codex Alimentarius. Glosario de términos y definiciones (para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos) [Internet]. Oregon: Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF); 2003 [citado 22 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXA%2B5-1993%252FCXA_005s.pdf
44. Paredes V. Farmacología Veterinaria II [Internet]. 1 a ed. Managua: Universidad Nacional Agraria; 2010 [citado 22 de noviembre de 2023]. 195p. Disponible de: <https://repositorio.una.edu.ni/2460/1/n170p227fa.pdf>
45. Baroni E. Influencia de la edad y estado sanitario sobre el comportamiento farmacocinético de la sulfametazina en bovinos (bos taurus) y su comparación con bubalinos (bubalus bubalis) [tesis doctoral en Internet]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2004 [citado 22 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://docta.ucm.es/entities/publication/23ce1740-c447-4634-9f69-ba97584592ff>
46. Gutiérrez H, Lilia S. Farmacología clínica en aves comerciales [Internet]. 4 ed. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2010 [citado 22 de noviembre de 2023]. 703p. Disponible de: https://www.academia.edu/42665443/Farmacologia_Clinica_en_Aves_Comerciales_H%C3%A9ctor_Sumano_y_Lilia_Guti%C3%A9rrez
47. Lopardo H. Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia [Internet]. 1 ed. Buenos Aires: Editorial de la UNLP; 2020 [citado 24 de noviembre de 2023]. 190p. Disponible de: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/103061/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
48. Oving A, Bhattacharyya J. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. Biophys Rev [Internet]. 2021 [citado 24 de

- noviembre de 2023];13(2):259-272. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8046889/>
49. Sweetman SC. The Complete Drug Reference [Internet]. 33^a ed. London: Pharmaceutical Press; 2004 [citad 24 de noviembre de 2023]. 336 p. Disponible de: https://vnras.com/wp-content/uploads/2018/04/Martindale-The-Complete-Drug-Reference_-36th-Edition.pdf
 50. Martínez MA, Ros G. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación al riesgo de la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos como resultado de una contaminación cruzada en la producción de piensos [Internet]. 2017 [citado 24 de noviembre de 2023] 25:23-40. Disponible de: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/SULFONAMIDAS.pdf
 51. Jiang J, Wang G. Hazard of sulfonamides and detection technology research progress. IOP Conf Ser Earth Environ Sci [Internet]. 2017 [citado el 11 de marzo de 2023]; 100(1): 012040. Disponible de: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/100/1/012040/pdf>
 52. Ministerio de Salud. Norma Sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano. Resolución Ministerial N°372- 2016/MINSA [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 2016 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM_372-2016-MINSA.pdf
 53. Ministerio de Agricultura y Riego. Guía Práctica Dirigida a Productores Emprendedores [Internet]. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2013 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/11/Guia-Inocuidad.pdf>
 54. Codex Alimentarius. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios [Internet]. Oregón: Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos

- Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF); 2023 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
55. Gonzales M. Influence of age on physical traits of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Anim Res* [Internet]. 1995 [citado 24 de noviembre de 2023] 44:307-312. Disponible de: https://animres.edpsciences.org/articles/animres/pdf/1995/03/Ann.Zootech.0003-424X_1995_44_3_ART0009.pdf
 56. Andina. Productores de huevos de codorniz siguen vendiendo en distintos puntos de Lima [Internet]. Andina;2020 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://andina.pe/agencia/noticia-productores-huevos-codorniz-siguen-vendiendo-distintos-puntos-lima-792195.aspx#:~:text=A%20trav%C3%A9s%20de%20la%20actividad,500%20unidades%20a%2035%20soles>
 57. Darwish WS, Eldaly EA, El-Abbasy MT, Ikenaka Y, Nakayama S, Ishizuka M. Antibiotic residues in food: the African scenario. *Jpn J Vet Res* [Internet]. 2013 [citado 24 de noviembre de 2023];61:13-22. Disponible de: https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/52350/1/JJVR61-S_REVIEW_02.pdf
 58. Gonzáles Mendoza J, Maguiña Vargas C, Gonzáles Ponce F de M. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta médica peru* [Internet] 2019 [citado 24 de noviembre de 2023];36(2):145-151. Disponible de: <https://doi.org/10.35663/amp.2019.362.816>
 59. Hernández Sampieri R. Metodología de La Investigación [Internet]. México D.F.: McGraw-Hill Companies; 2006 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://apiperiodico.jalisco.gob.mx/api/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf
 60. Gallardo EE. Metodología de la Investigación [Internet]. Huancayo: Universidad Continental; 2017 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/4278/1/DO_UC_EG_MAI_UC0584_2018.pdf
 61. Peliza JM. Dotación real de agua potable para complejos recreacionales en el sector del valle de los chillos [tesis licenciatura en Internet]. Quito: Escuela

- Politécnica Nacional; 2010 [citado 27 de noviembre de 2023]. 54p. Disponible de: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1898/1/CD-2804.pdf>
62. Municipalidad Metropolitana de Lima – MML. Acuerdo de Concejo N° 307-2020-MML – Aprueba la iniciativa legislativa “Proyecto de Ley que modifica la Ley Orgánica de Municipalidades en cuanto al Régimen de la Municipalidad Metropolitana de Lima”. Proyecto de Ley N° 6475/2020- GL; 2020 [citado 18 de noviembre de 2023]. Disponible de: 59. https://leyes.congreso.gob.pe/Documentos/2016_2021/Proyectos_de_Ley_y_de_Resoluciones_Legislativas/PL06475-20201015.pdf
63. Summa S, Lo Magro S, Armentano A, Muscarella M. Development and validation of an HPLC/DAD method for the determination of 13 sulphonamides in eggs. Food Chem [Internet]. 2015 [citado 27 de noviembre de 2023];187:477-484. Disponible de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25977053/>
64. Phenomenex. SPE .Reference Manual & User Guide [Internet].California: Phenomenex; 2022 [citado 28 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.phenomenex.com/documents/2022/07/18/20/53/sample-preparation-reference-manual--users-guide>
65. FDA. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program [Internet]. 3rd ed; 2019 [citado 28 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/b-Chemical-Methods-Validation-Guidelines_3rd-ed_RSSC-508_final_12_06_19.pdf
66. Oficina Nacional de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos [Internet]. New York: Naciones Unidas; 2010 [citado 28 de noviembre de 2023]. Disponible de: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf
67. Fundación Prosaia. Guía para la validación de los métodos analíticos para la determinación de residuos en matrices biológicas de origen animal [Internet]. Buenos Aires: Fundación Prosaia; 2013 [citado 28 de noviembre de 2023]. Disponible de: <https://www.prosaia.org/wp-content/uploads/2021/04/Prosaia-2->

GF-Gui%CC%81a-para-la-validacio%CC%81n-de-me%CC%81todos-anali%CC%81ticos-2013-05-17.pdf

68. Huamán MC. 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 licenciatura en Internet]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021 [citado 11 de diciembre 2023]. 86p. Disponible de: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/STV/article/view/4237>
69. Rendón J, Orozco L. Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por Cromatografía de gases-FID. Risaralda: Universidad Tecnológica de Pereira; 2010 [citado 11 de diciembre 2023]. 145p. Disponible de: <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/672164f7-e80e-4ea0-8e6c-48dc19d522d6/content>
70. Instituto de Salud Pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Santiago: Instituto de Salud Pública; 2010 [citado 11 de diciembre 2023]. Disponible de: https://www.academia.edu/7849711/Guia_de_validaci%C3%B3n_de_m%C3%A9todos_instituto_salud_publica_chile
71. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Vienna: UNODC; 2010 [citado 11 de diciembre 2023]. 67p. Disponible de: https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Book_S.pdf
72. Ríos AM. Validación de un método analítico para detección de residuos de sulfonamidas en alimentos de origen animal [tesis licenciatura en Internet]. Santiago: Universidad de Chile, 2009 [citado 15 de diciembre 2023]. Disponible de: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131231/Validaci%C3%B3n-de-un-m%C3%A9todo-anal%C3%ADtico-para-la-detecci%C3%B3n-de-residuos-de-sulfonamidas-%20en-alimentos-de-origen-animal.pdf?sequence=1>

73. Talero YV, Medina OJ, Rozo W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. Univ Sci [Internet]. 2013 [citado 15 de diciembre 2023];19(1):11-28. Disponible de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832014000100001
74. Aguilar DA. validación del “fast” como método de “screening” microbiológico para la pesquisa de residuos de antimicrobianos en productos de origen animal o [tesis de licenciatura en Internet]. Santiago: Universidad de Chile; 2006 [citado 20 de noviembre de 2023]. 54 p. Disponible de: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/133788/Validaci%C3%B3n-del-fast-como-m%C3%A9todo-de-screening-microbiol%C3%B3gico-para-la-pesquisa-de-residuos-de-antimicrobianos-en-productos-de-origen-animal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
75. Ampuero-Riega J, Morales-Cauti S. Determinación de residuos de antibióticos en músculo, hígado y riñón de cuyes comercializados en cuatro ciudades del Perú. Rev Investig Vet Perú [Internet]. 2021 [citado 15 de diciembre 2023];32(1):1-10. Disponible de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172021000100024
76. Atta AH, El-zeini SA. Depletion of trimethoprim and sulphadiazine from eggs of laying hens receiving trimethoprim/sulphadiazine combination. Food Control [Internet]. 2001 [citado 15 de diciembre 2023];12(5):269-274. Disponible de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713501000056#:~:text=They%20found%20that%20residues%20of,wide%20range%20of%20dose%20ratios.>
77. Oikawa H, Nakamoto K, Hirota K, Katagiri K. Clearance of sulfamethoxazole in eggs and tissues of chickens. Poult Sci [Internet]. 1977 [citado 15 de diciembre 2023]; 56(3):813-821. Disponible de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/605057/#:~:text=SMX%20levels%20in%20most%20tissues,of%20time%20after%20drug%20withdrawal.>
78. Ramírez-Villamizar LH, Barragán-Díaz CA, Cárdenas E, Niño-Bayona JV, Jaimes-Dueñez J. Revisión: residuos de antibióticos en la carne, un problema de salud pública en Colombia. Spei Domus [Internet]. 2022 [citado 15 de diciembre

2023];18(1):1-26.

Disponible

de:

<https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/4188/3398>

- 79.** Widadasih DA, Drastini Y, Yudhabuntara D, R. Daru Maya FL, Sivalingham PL, Susetya H, et al. Detection of antibiotic residues in chicken meat and eggs from traditional markets at Yogyakarta City using bioassay method. *Acta Vet Indones* [Internet]. 2020 [citado 15 de diciembre 2023];1-6. Disponible de: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones/article/view/28150>
- 80.** Pérez FC. Identificación y cuantificación de concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers [tesis licenciatura en Internet]. Santiago: Universidad de Chile; 2019. [citado 15 de diciembre 2023]. Disponible de: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/171054>
- 81.** Zhao X-H, Wu P, Zhang Y-H. Degradation kinetics of six sulfonamides in hen eggs under simulated cooking temperatures. *J Serb Chem Soc* [Internet]. 2011 [citado 15 de diciembre 2023];76(8):1093-1101. Disponible de: <https://doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2011/0352-51391100093Z.pdf>

ANEXOS

ANEXO 1. Límites máximos de residuos (LMR) de sulfonamidas

PROYECTO DE NTS N° 120 -Minsa/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR) DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS
EN ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO

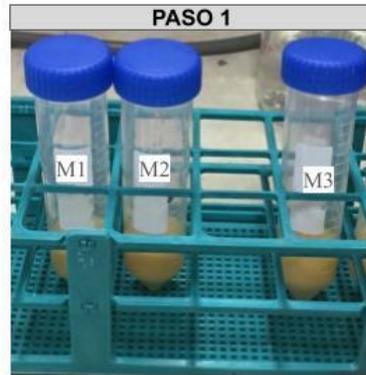
PRINCIPIO ACTIVO	RESIDUO MARCADOR	ESPECIE ANIMAL	MATRIZ	LMR (µg/kg)
TILMICOSIN	TILMICOSIN	Porcino	Hígado	1500
			Riñón	1000
			Músculo	100
			Grasa	100
		Ovino	Músculo	50
			Hígado	1000
			Grasa	100
		Peces	Riñón	300
Músculo/Piel(*)	50			
AVILAMYCIN	AVILAMYCIN	Porcinos Aves	Músculo	200
			Hígado	300
			Grasa/Piel	200
			Riñón	200
SULFONAMIDAS				
SULFADIMIDINE	SULFADIMIDINE	todas las especies productoras de alimentos	Músculo	100
			Grasa	100
			Hígado	100
			Riñón	100
		Bovinos	Leche (/L)	25
SULFONAMIDES (todas las sustancias que pertenecen al grupo de las Sulfonamidas)	SULFONAMIDES	Peces	Músculo/Piel(*)	100
TETRACICLINAS				
CHLORTETRACYCLINE/ OXYTETRACYCLINE/ TETRACYCLINE	CHLORTETRACYCLINE/ OXYTETRACYCLINE/ TETRACYCLINE	Bovino	Leche (/L)	100
			Músculo	200
			Hígado	800
			Riñón	1200
		Cerdo	Hígado	600
			Riñón	1200
		Oveja	Músculo	200
			Músculo	200
			Leche (/L)	100
			Hígado	600
Riñón	1200			



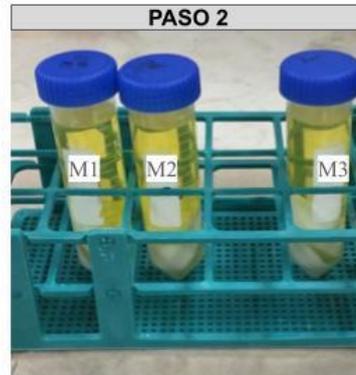
15

Fuente: http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM_372-2016-MINSA.pdf

ANEXO 2. Pasos del procesamiento de las muestras de huevos: Muestra 1 (M1), Muestra 2 (M2) y Muestra 3 (M3)



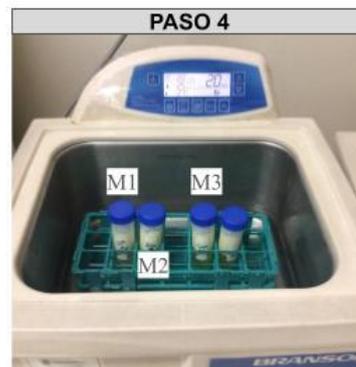
Se pesó 10 g de la muestra y se colocó en el tubo de centrifuga



Se agregó 500 μ L de ácido acético al 10%; se dejó en reposo por 15 minutos y se añadió 30 mL de cloroformo/acetona (50:50, v:v)



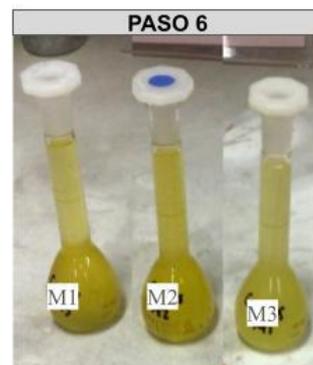
Se agitó la solución con ayuda del vortex por 10 minutos



Se sometió a un tratamiento ultrasónico por 20 minutos

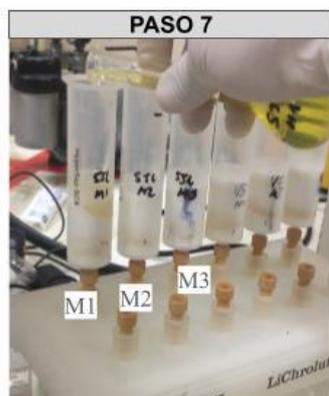


Se adicionó 3,0 g de NaCl y 3,0 g de Na_2SO_4 , se mezcló vigorosamente y se centrifugó (3500 RPM, 20 min, $T=10^\circ\text{C}$)

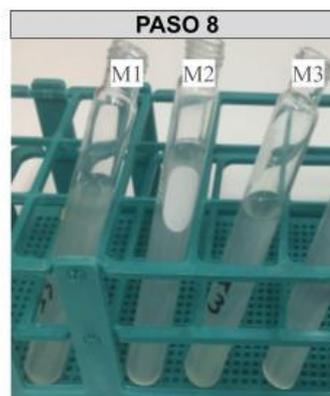


Se tomó 25 mL de la solución obtenida (se descartó el sedimento), se transfirió a una fiola donde se añadió 2,5 mL de ácido acético glacial

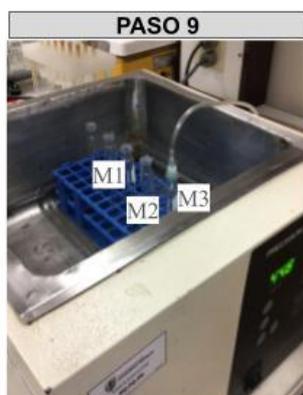
Fuente: Elaboración propia



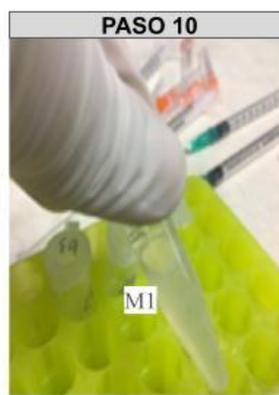
PASO 7
La mezcla resultante se agregó al cartucho SCX bencenosulfónico SPE (Phenomenex) previamente acondicionado



PASO 8
Se añadió 13 mL de metanol/amoniaco (97,5:2,5; v:v) al cartucho y el eluyente resultante contuvo las sulfonamidas aisladas



PASO 9
La solución se evaporó hasta sequedad a 45°C bajo una atmósfera suave de nitrógeno



PASO 10
Se reconstituyó adicionando 1 mL de fase móvil y 0,5 mL de n-hexano y se centrifugó a 3500 RPM durante 10 min a 20 °C n-hexano



PASO 11
El extracto desengrasado (fase inferior) se transfirió a un vial y se inyectó en el sistema de HPLC

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 3. Datos utilizados en el cálculo del límite de cuantificación y límite de detección de residuos de sulfadiazina

Tabla 10. Datos para calcular el límite de detección y de cuantificación de SDA

n=18	X	Y	y²	x.y
1	80,6384	260,12588	67665,47345	20976,13476
2	80,6384	261,09865	68172,50503	21054,57738
3	80,6384	261,1054	68176,02991	21055,12169
4	80,6384	262,65805	68989,25123	21180,3249
5	80,6384	262,70362	69013,19196	21183,99959
6	80,6384	262,71893	69021,23618	21185,23416
1	40,3192	135,75361	18429,04263	5473,476952
2	40,3192	135,88084	18463,60268	5478,606764
3	40,3192	135,75473	18429,34672	5473,52211
4	40,3192	131,85082	17384,63873	5316,119582
5	40,3192	131,67243	17337,62882	5308,92704
6	40,3192	131,51856	17297,13162	5302,723124
1	20,1596	63,24429	3999,840218	1274,979589
2	20,1596	61,22385	3748,359809	1234,248326
3	20,1596	62,33612	3885,791857	1256,671245
4	20,1596	61,35963	3765,004194	1236,985597
5	20,1596	62,27024	3877,58279	1255,34313
6	20,1596	62,39126	3892,669324	1257,782845
SUMA	846,703200	2745,66691	541548,3272	166504,7788
A	-1,860700			
B	3,282300			
S²xy	8,659635			
DS	2,942726			
LD	2,689632			
LC	8,965438			

ANEXO 4. Datos utilizados en el cálculo del límite de cuantificación y límite de detección de residuos de sulfametoxazol

Tabla 11. Datos para calcular el límite de detección y de cuantificación de SMX

n=18	x	Y	y²	x.y
1	82.9504	238.89162	57069.20611	19816.15544
2	82.9504	239.36933	57297.67614	19855.78167
3	82.9504	239.36932	57297.67136	19855.78084
4	82.9504	240.04898	57623.5128	19912.15891
5	82.9504	239.91925	57561.24652	19901.39776
6	82.9504	240.26014	57724.93487	19929.67472
1	41.4752	117.24146	13745.55994	4862.613002
2	41.4752	117.03976	13698.30542	4854.247454
3	41.4752	116.96552	13680.93287	4851.168335
4	41.4752	118.42377	14024.1893	4911.649546
5	41.4752	117.83777	13885.74004	4887.345078
6	41.4752	118.50490	14043.41132	4915.014428
1	20.7376	60.84391	3701.981384	1261.756668
2	20.7376	60.54446	3665.631637	1255.546794
3	20.7376	60.41753	3650.277931	1252.91457
4	20.7376	57.77077	3337.461866	1198.02712
5	20.7376	58.17351	3384.157266	1206.378981
6	20.7376	58.67057	3442.235784	1216.686812
SUMA	870.9792	2,500.29257	448834.1326	155944.2981
α	-1.5837			
β	2.9034			
S²xy	1.573172			
DS	1.254261			
LD	1.295992			
LC	4.319975			

ANEXO 5. Cromatogramas del estudio de estabilidad

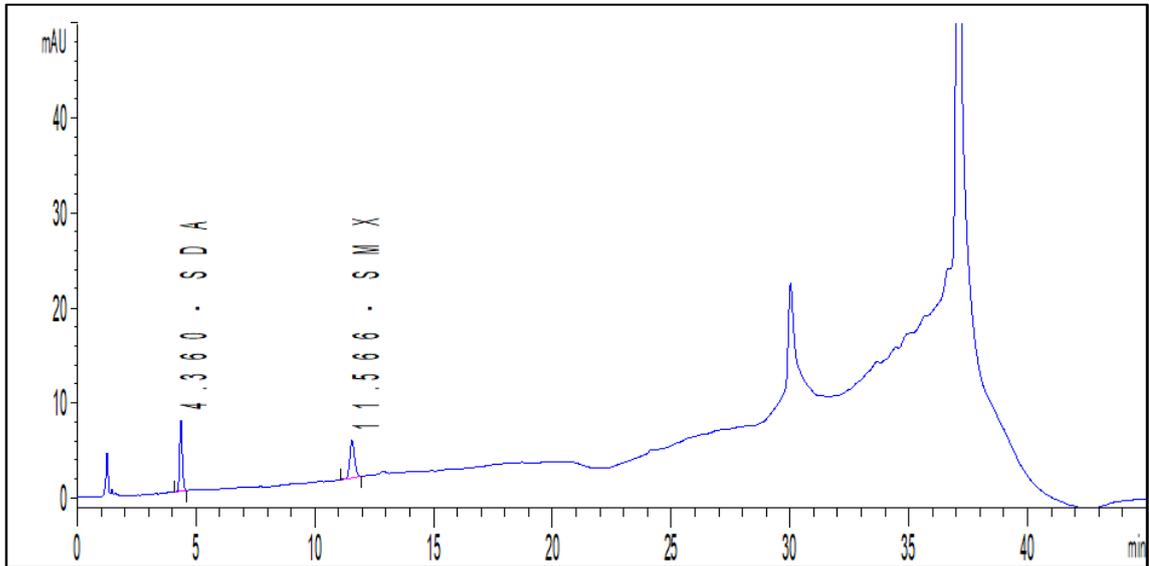


Figura 11. Cromatograma estabilidad 24H

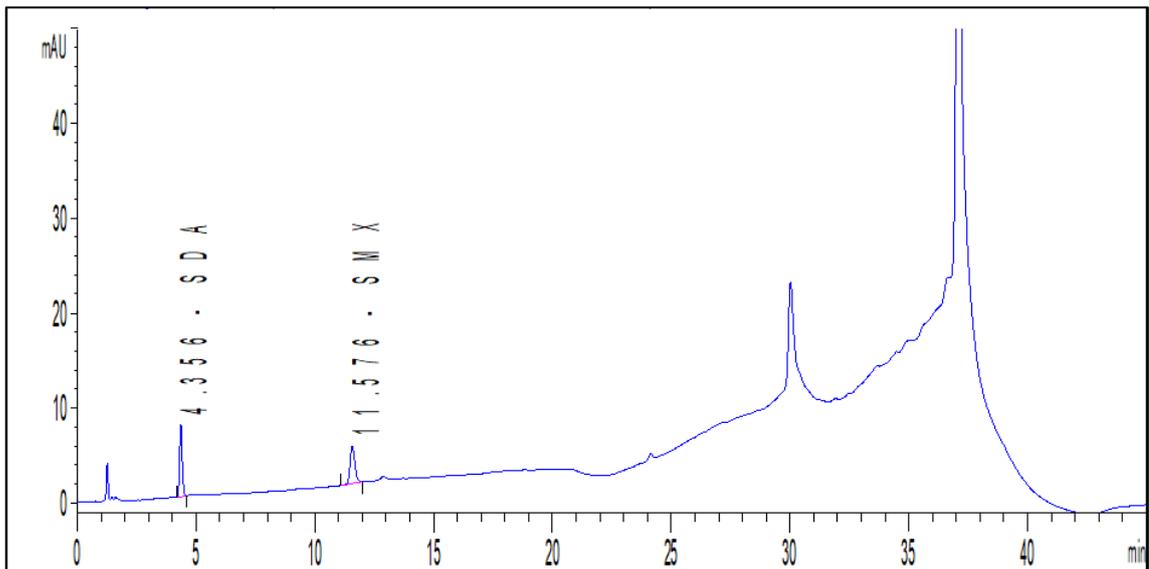


Figura 12. Cromatograma estabilidad 24H RF

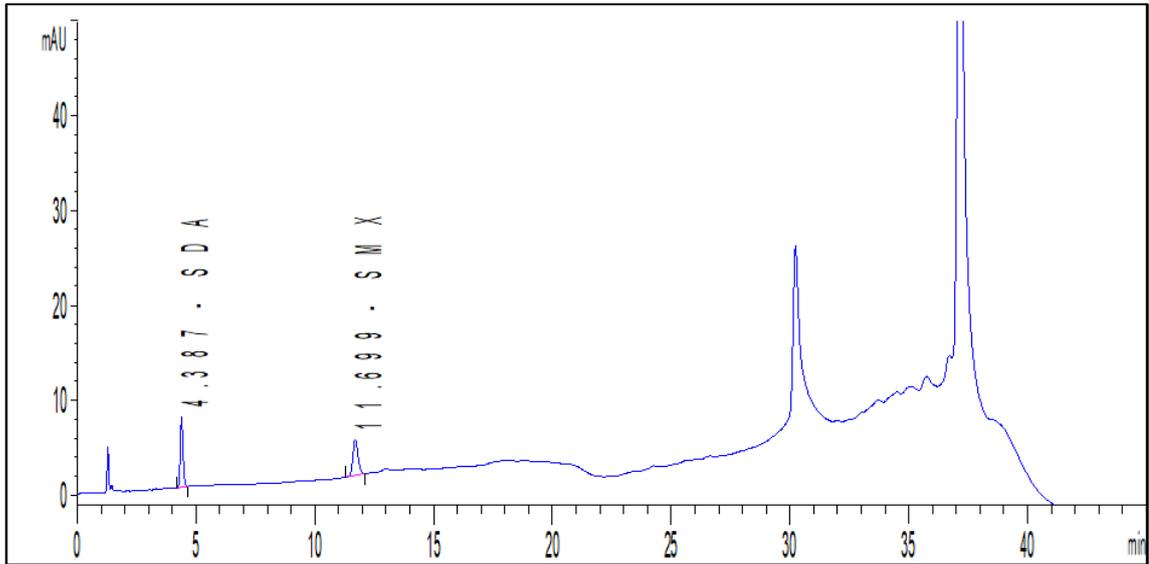


Figura 13. Cromatograma estabilidad OH

ANEXO 6. Cromatogramas de las muestras del mes de mayo

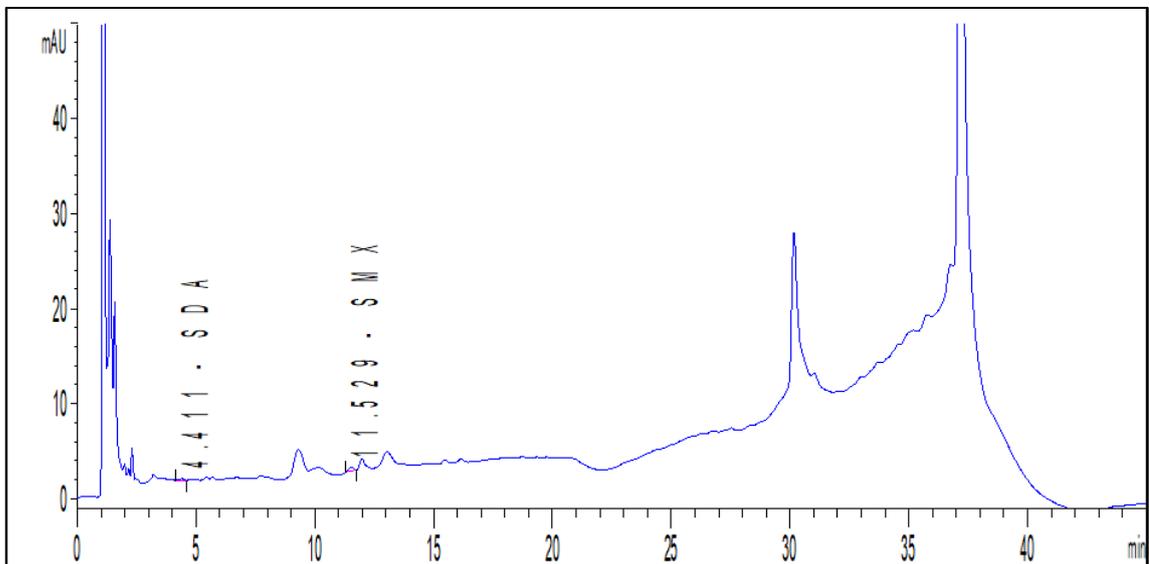


Figura 14. Cromatograma de la muestra MVS1

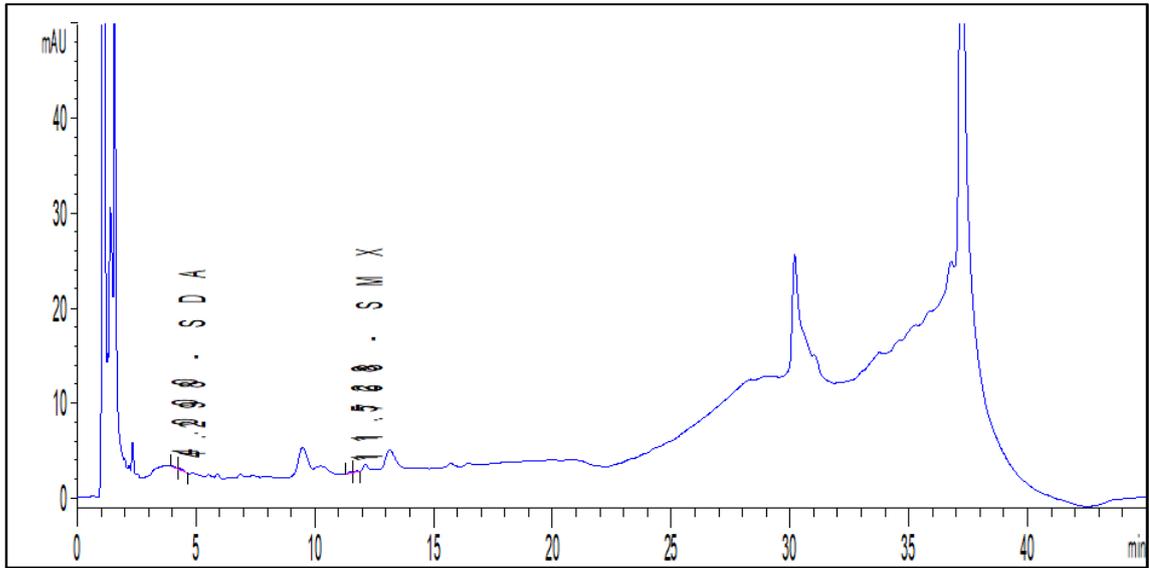


Figura 15. Cromatograma de la muestra MVS2

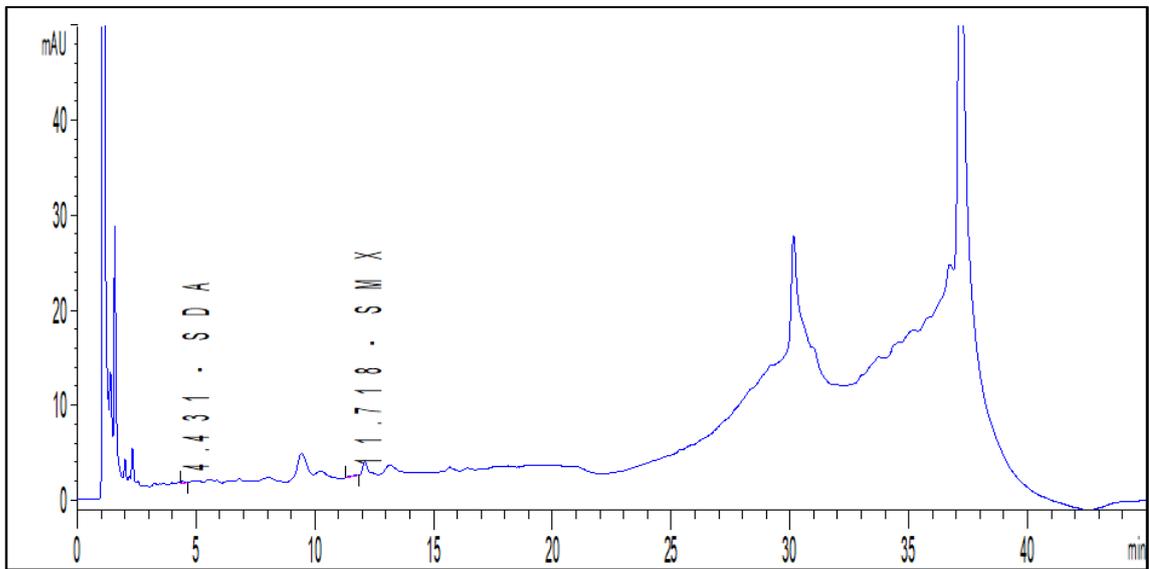


Figura 16. Cromatograma de la muestra MVS3

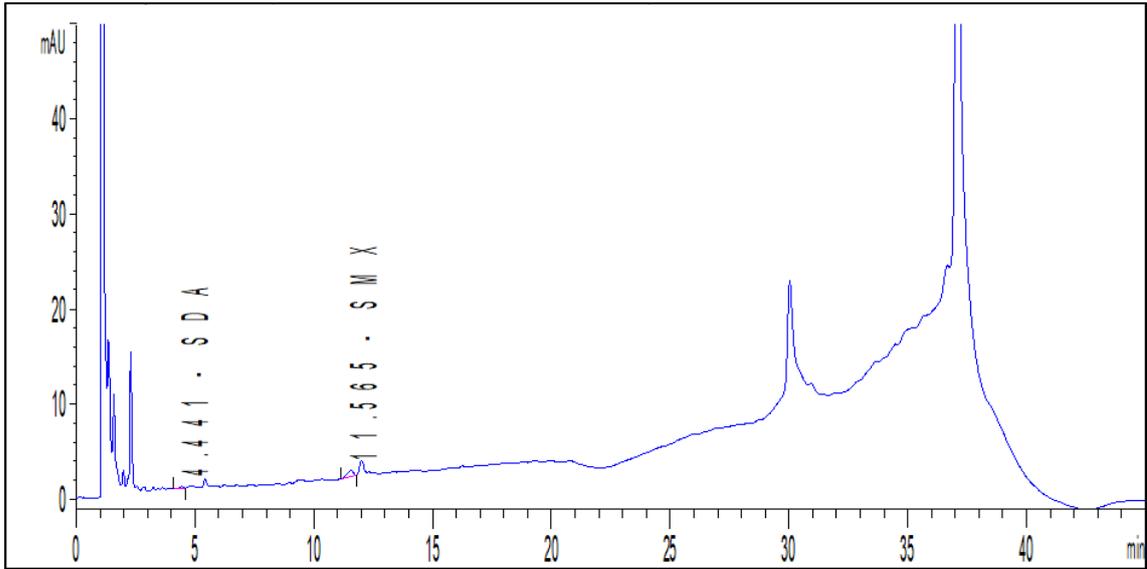


Figura 17. Cromatograma de la muestra MSM1

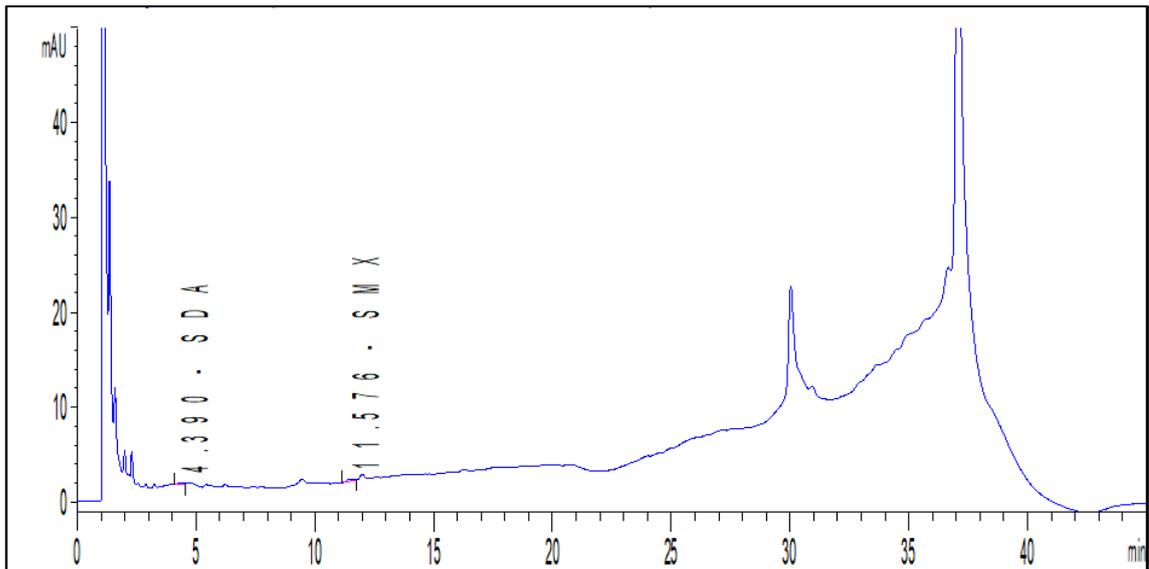


Figura 18. Cromatograma de la muestra MSM2

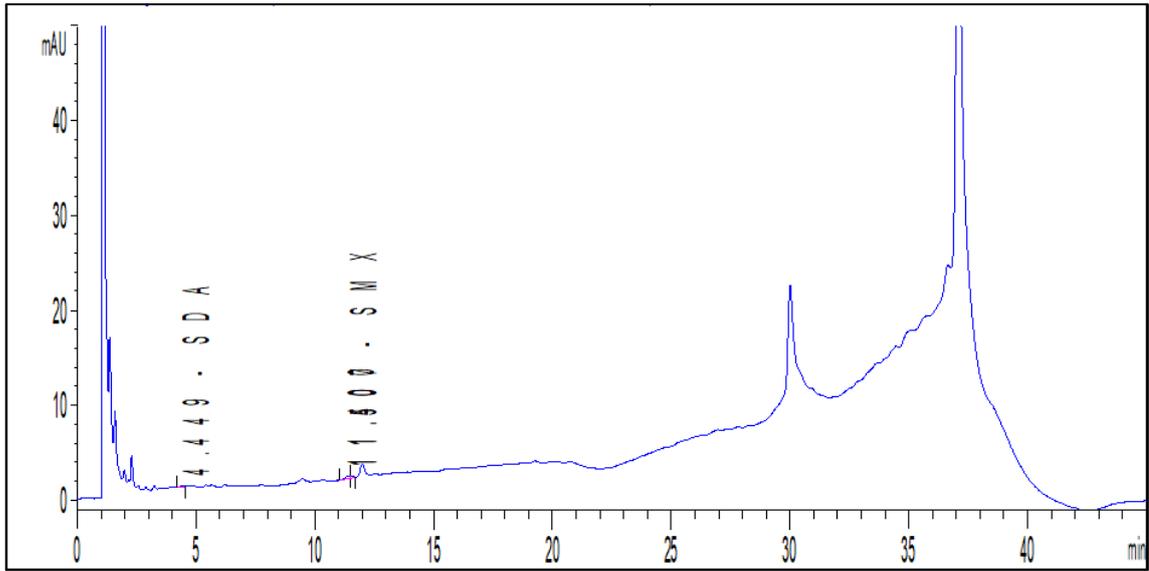


Figura 19. Cromatograma de la muestra MSM3

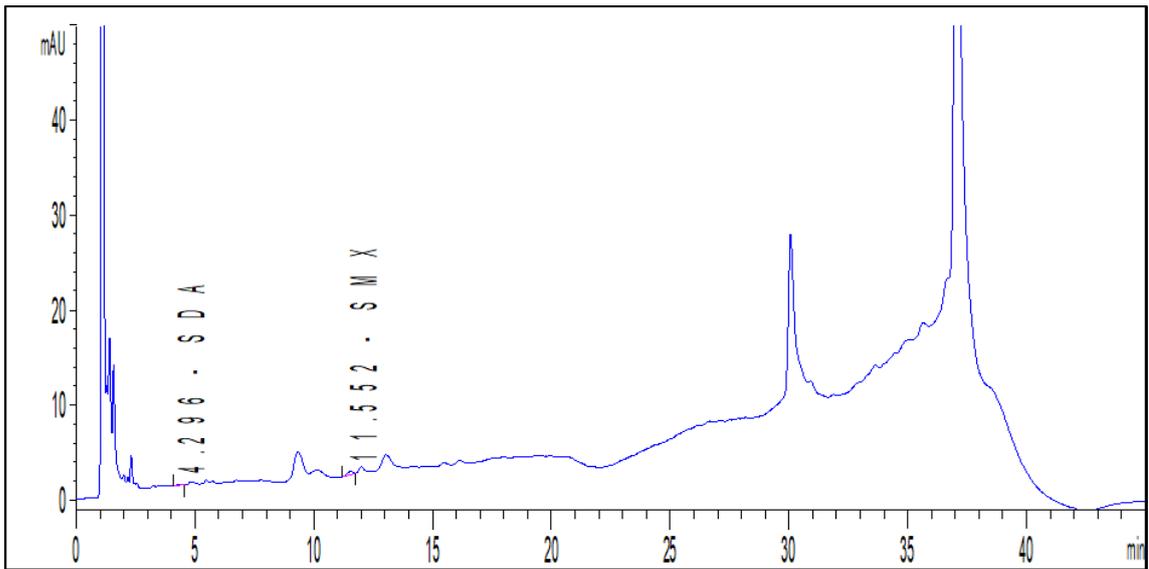


Figura 20. Cromatograma de la muestra MSJL1

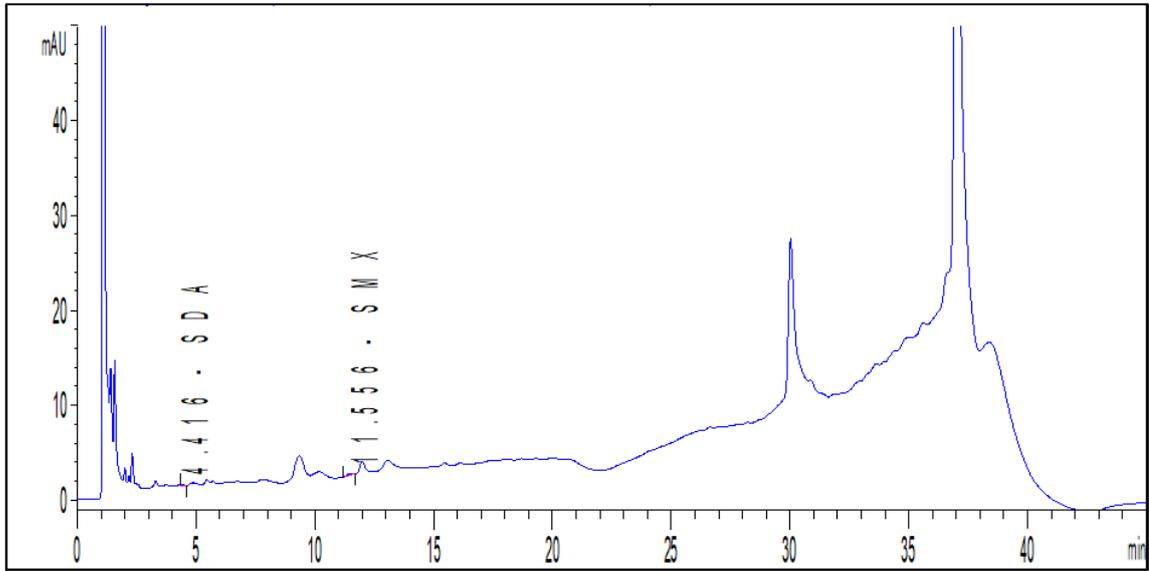


Figura 21. Cromatograma de la muestra MSJL2

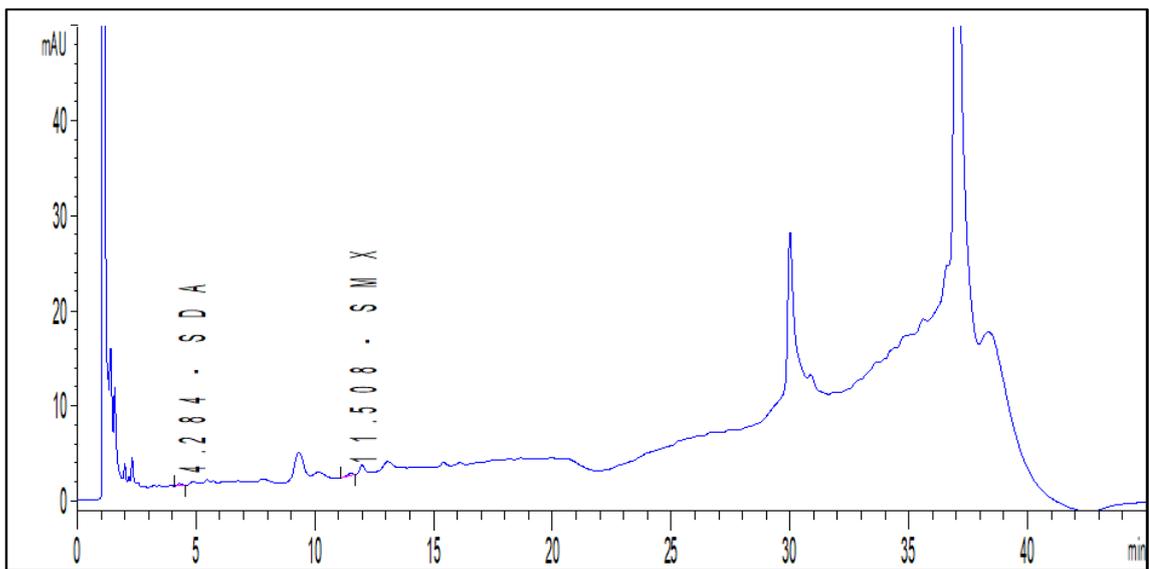


Figura 22. Cromatograma de la muestra MSJL3

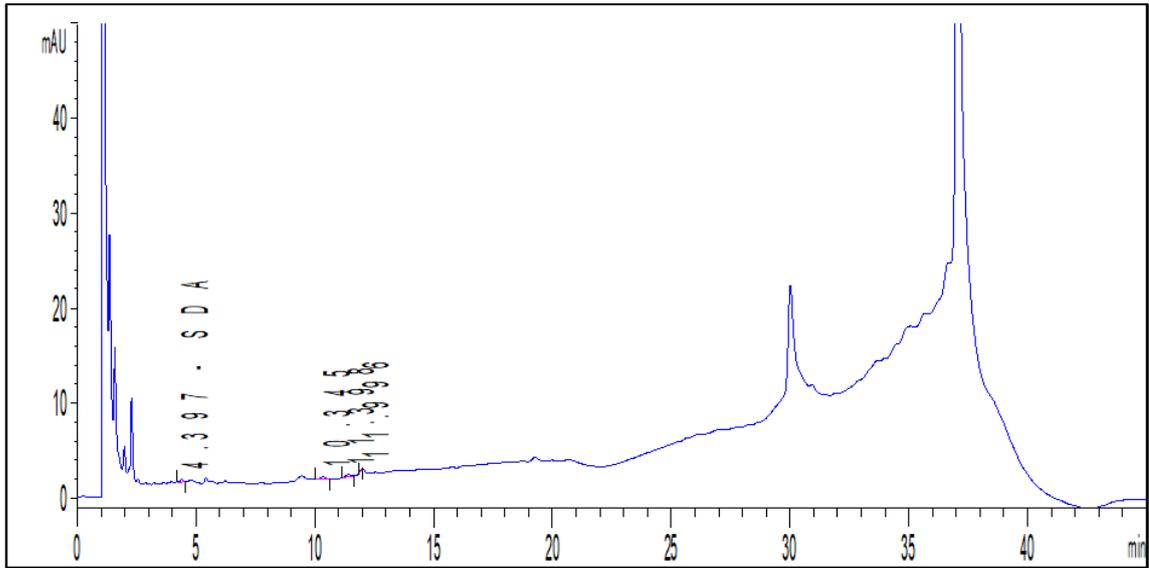


Figura 23. Cromatograma de la muestra MCM1

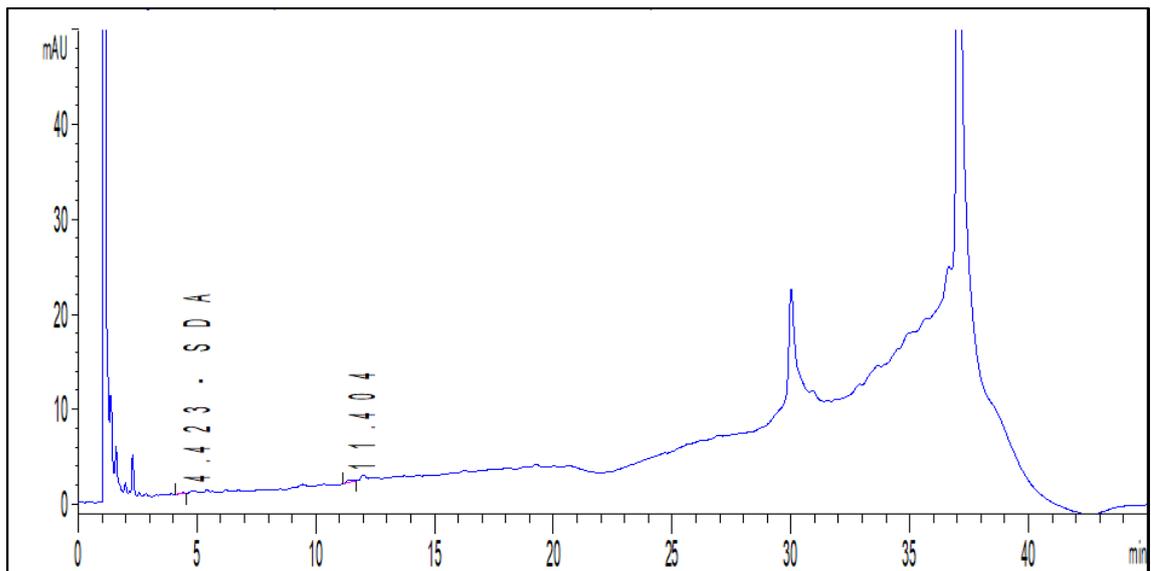


Figura 24. Cromatograma de la muestra MCM2

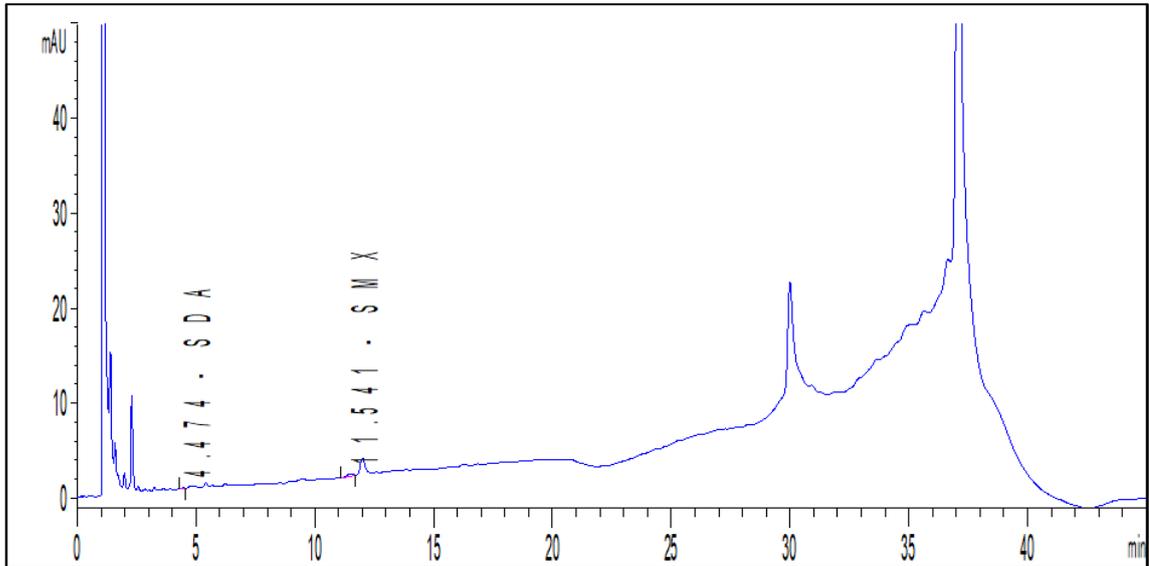


Figura 25. Cromatograma de la muestra MCM3

ANEXO 7. Cromatogramas de las muestras del mes de julio

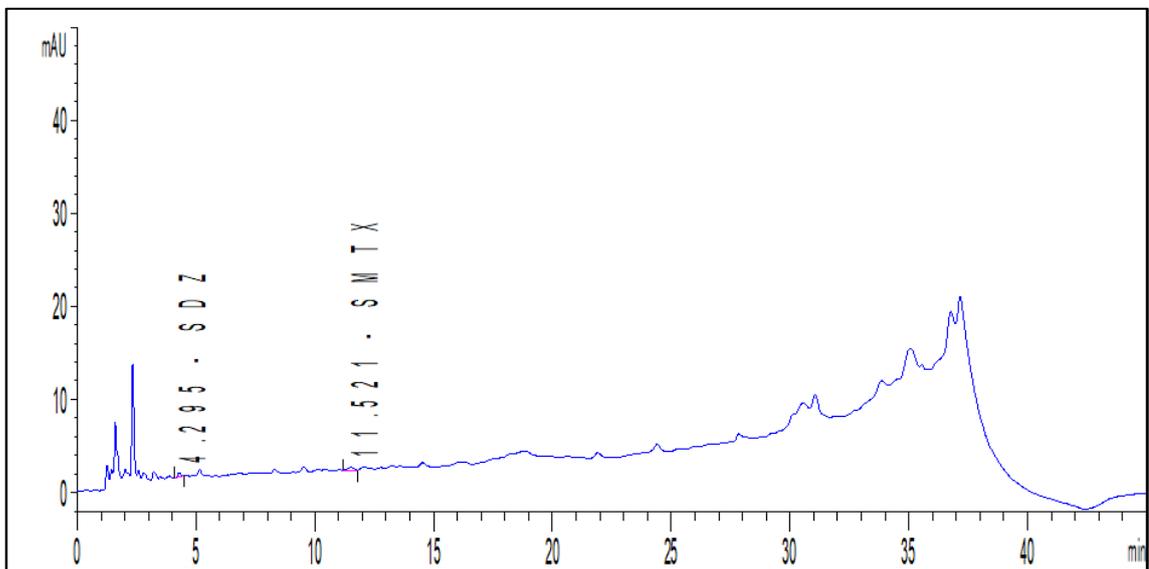


Figura 26. Cromatograma de la muestra MVS1R

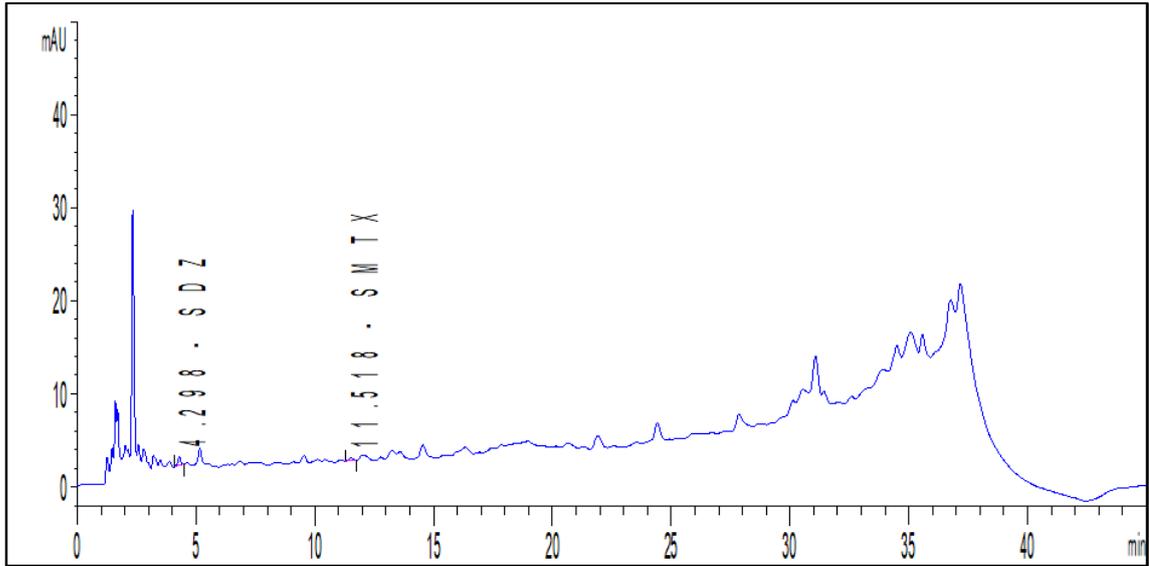


Figura 27. Cromatograma de la muestra MVS2R

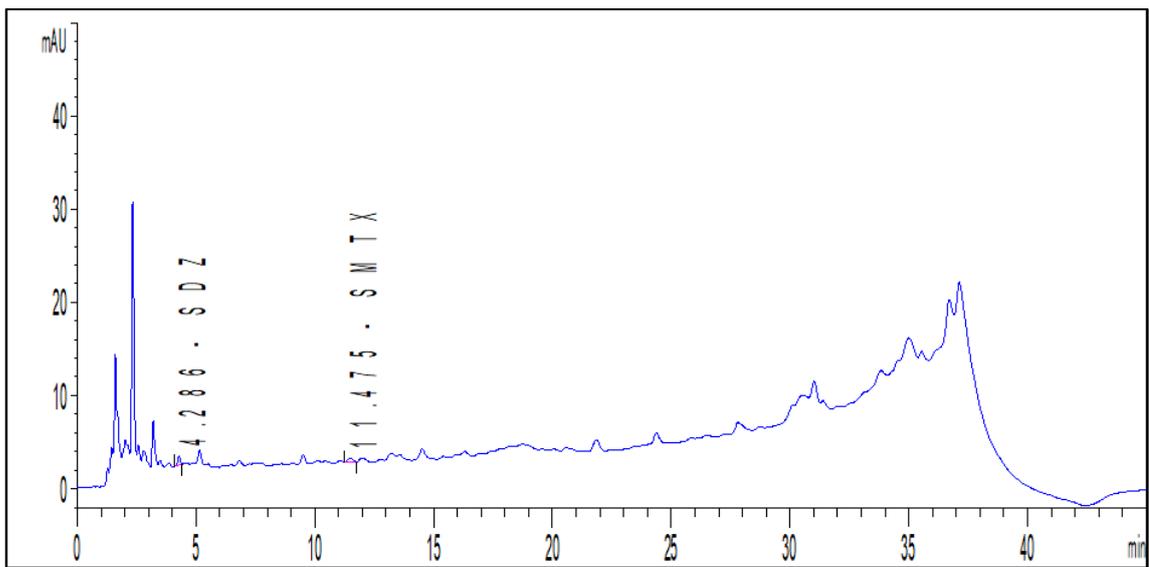


Figura 28. Cromatograma de la muestra MVS3R

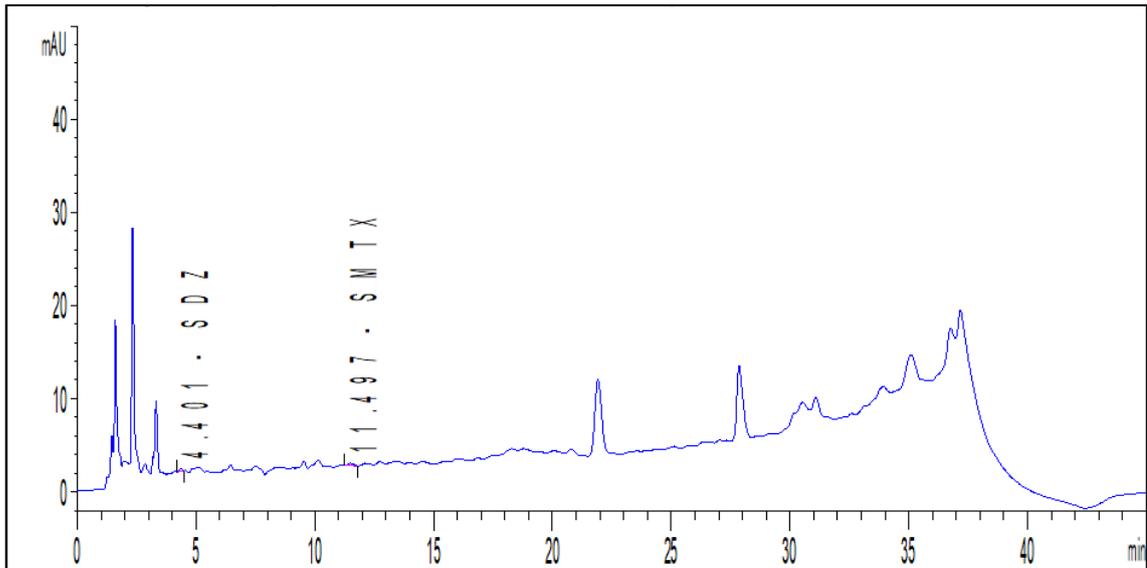


Figura 29. Cromatograma de la muestra MSM1R

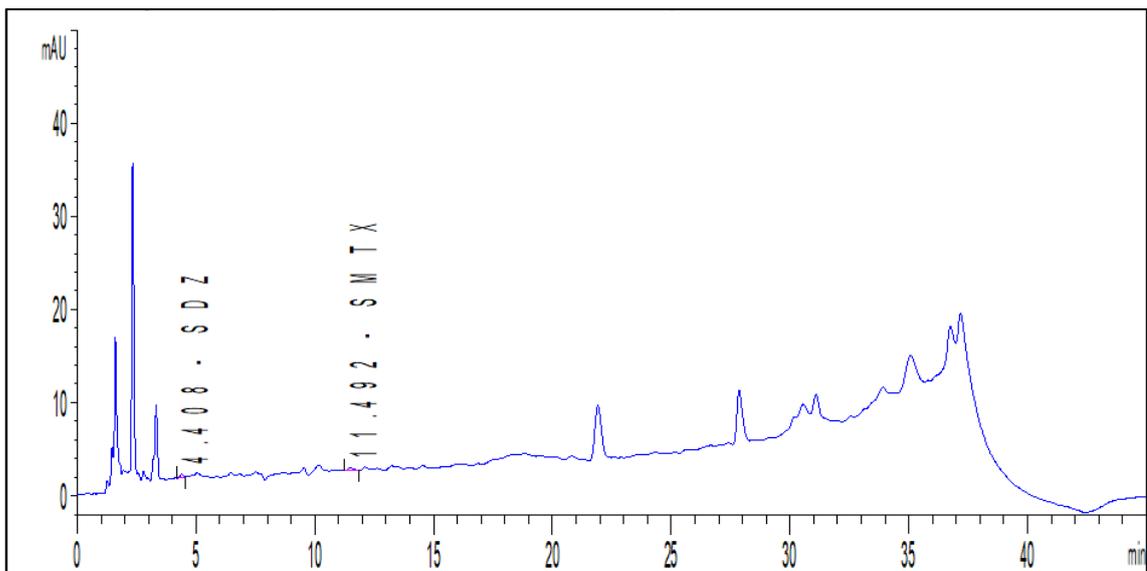


Figura 30. Cromatograma de la muestra MSM2R

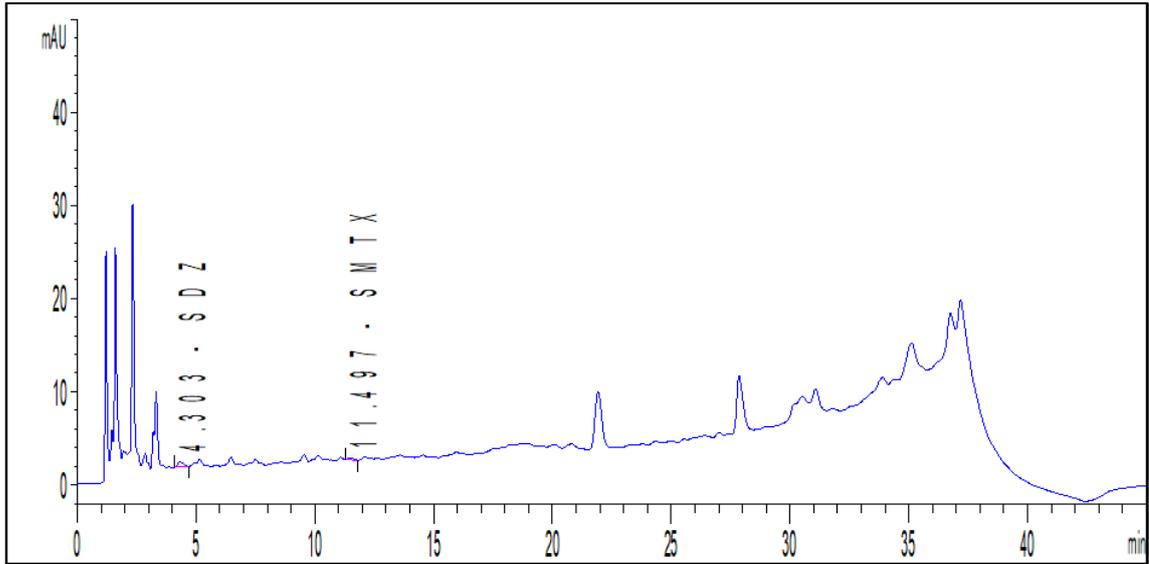


Figura 31. Cromatograma de la muestra MSM3R

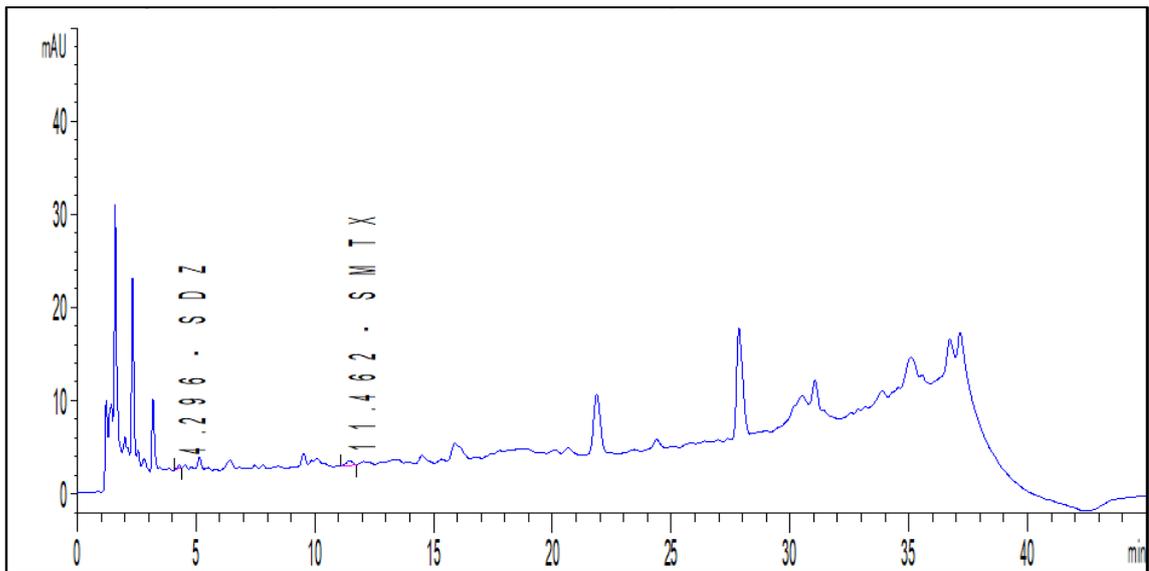


Figura 32. Cromatograma de la muestra MSJL1R

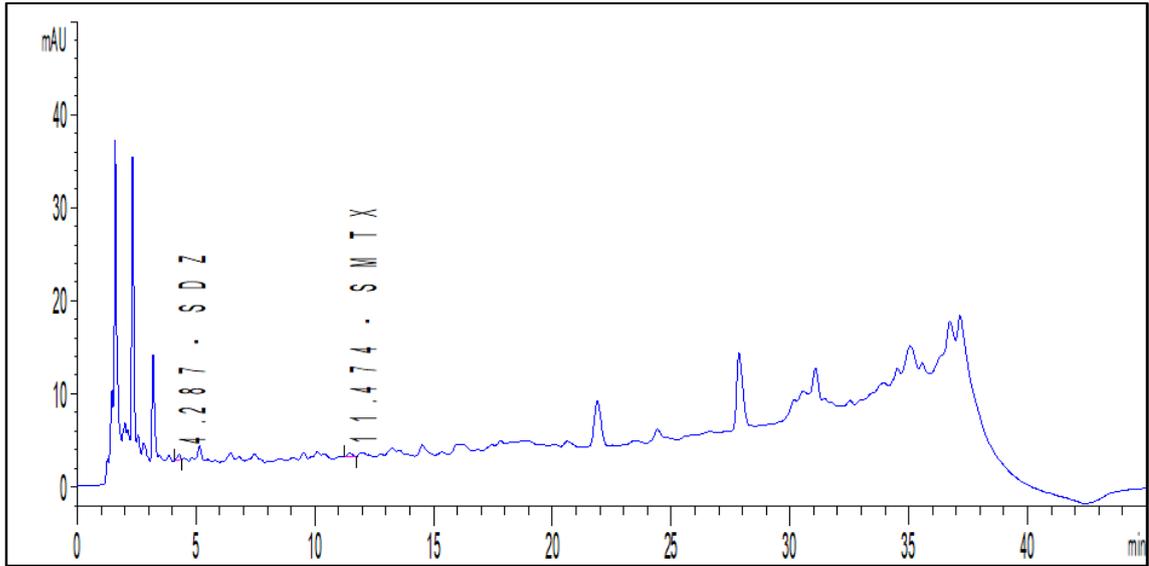


Figura 33. Cromatograma de la muestra MSJL2R

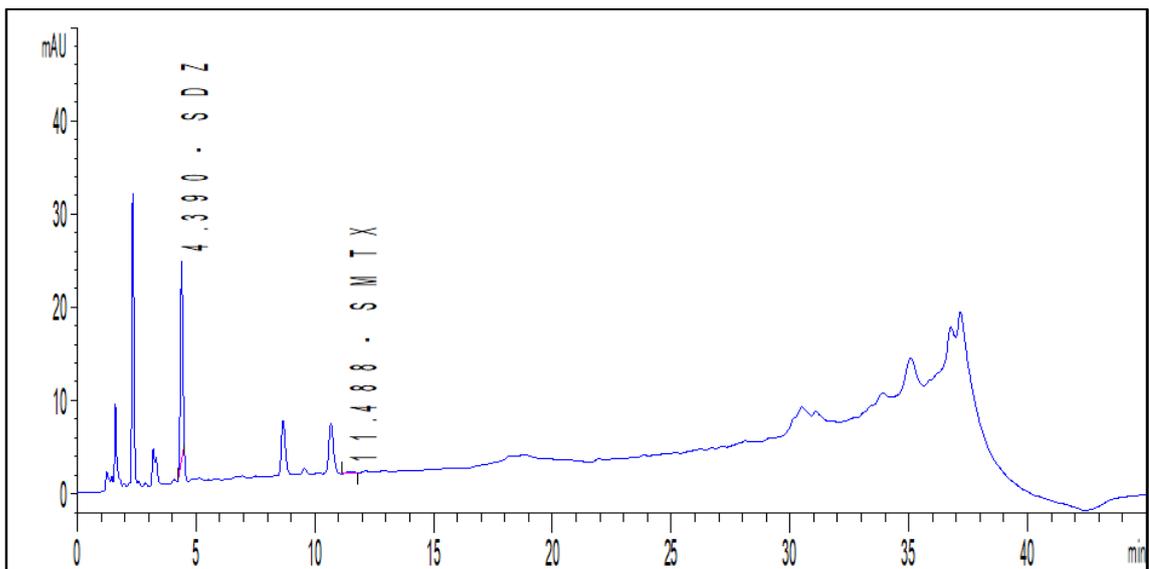


Figura 34. Cromatograma de la muestra MSJL3R

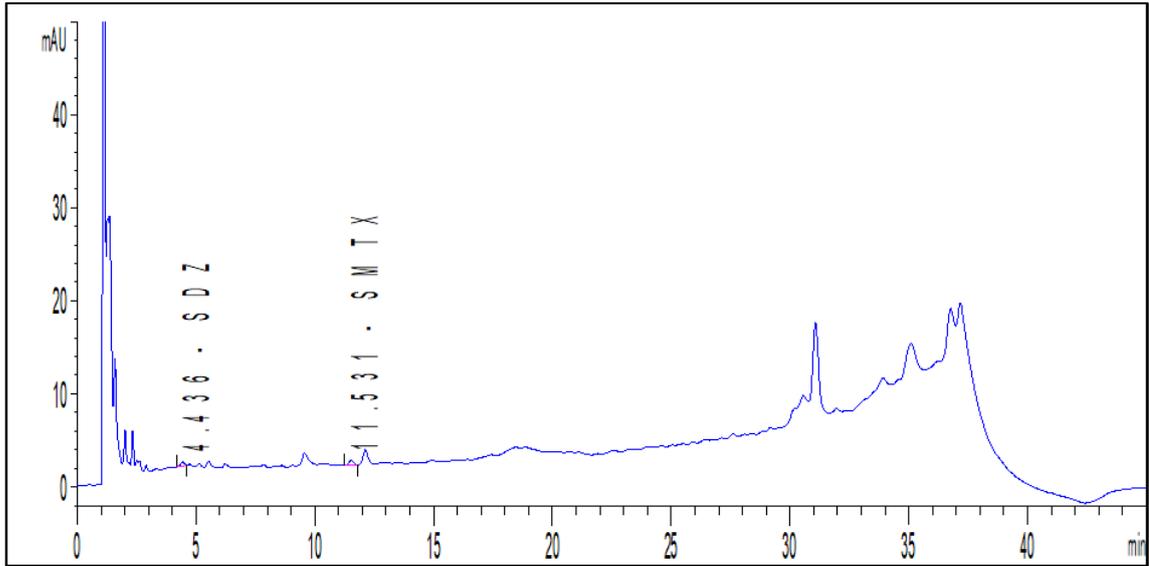


Figura 35. Cromatograma de la muestra MCM1R

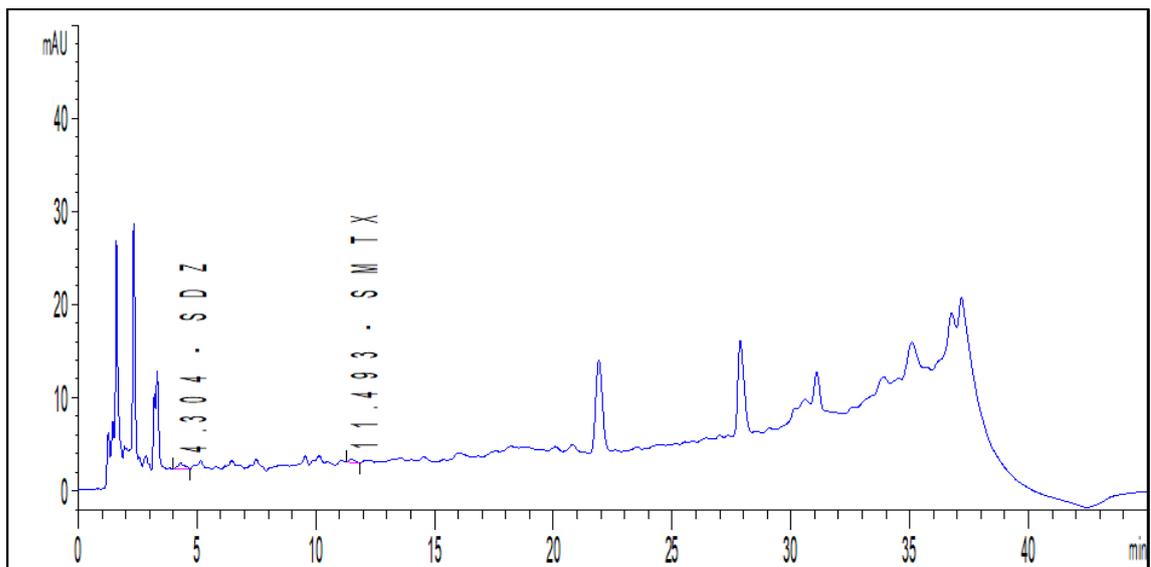


Figura 36. Cromatograma de la muestra MCM2R

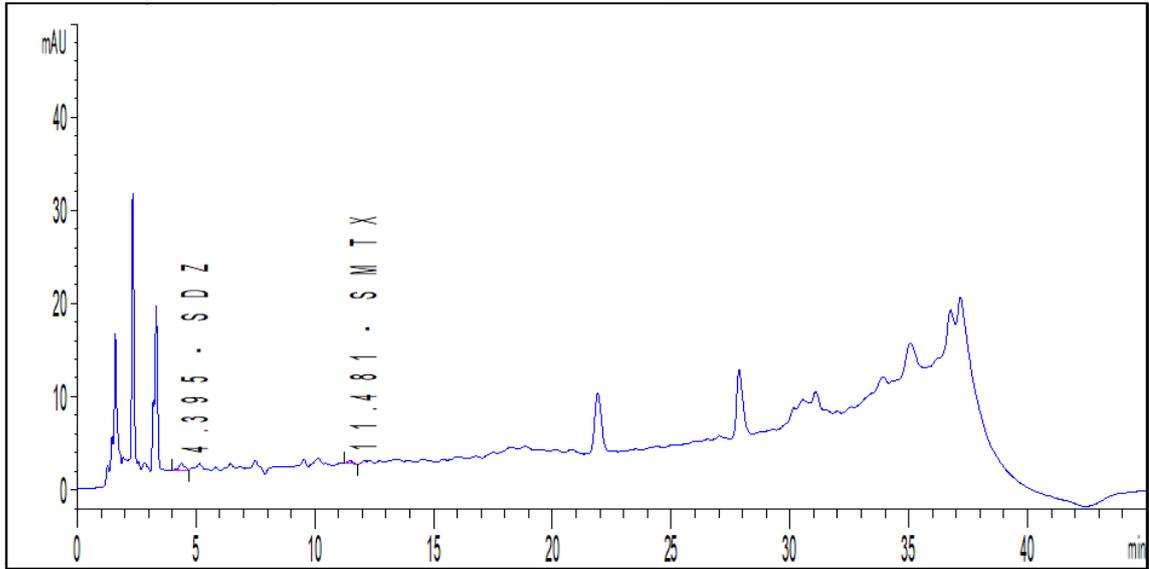
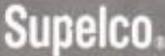


Figura 37. Cromatograma de la muestra MCM3R

ANEXO 8. Certificado del estándar de sulfadiazina



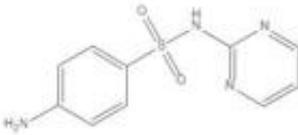
6452

www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

SULFADIAZINE

Product no.:	PHR1343-500MG
Lot no.:	LRAC3953
Description of CRM:	White Powder
Expiry date:	30 September 2023
Storage:	Room Temperature/Protect from Light
Certificate version:	LRAC3953.2 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigmaaldrich.com for the most current version.)
Chemical formula:	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Molecular mass:	250.3
CAS No.:	68-35-9



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty U, U=k · u (k=) (Mass Balance/basis)
SULFADIAZINE	99.8% U _{CRM} = ±0.1%, k = 2 (Assay Value/as is basis)

Metrological traceability:	Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.
Measurement method:	Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.
Intended use:	Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses
Minimum sample size:	50 mg
Instructions for handling and correct use:	Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.
Health and safety information:	All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Accreditation:	Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034,
Certificate issue date:	03 September 2021



ISO 17034
AR-1470

24 OCT 2022

[Andy Ommen; Quality Control]

[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; www.sigmaaldrich.com
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 7
Certificate version 02

ANEXO 9. Certificado del estándar de sulfametoxazol

Supelco. 6453
www.sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name:	Sulfamethoxazole analytical standard
Product Number:	S7507
Batch Number:	BCCH3594
CAS Number:	723-46-6
Formula:	$C_{15}H_{11}N_3O_3S$
Formula Weight:	253.28
Quality Release Date:	18 MAR 2022
Recommended Retest Date:	FEB 2025

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	OFF WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	99.7 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO FAINT YELLOW	ALMOST COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50MG/ML ACETONE	50MG/ML ACETONE
CARBON CONTENT	46.3 - 48.6 %	46.7 %
NITROGEN CONTENT	18.3 - 16.9 %	16.4 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS

Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

24 OCT 2022

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.

The vibrant M and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.
© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.



Page 1 of 1