

Transferencia de furazolidona de cera a miel

Furazolidone transfer from bees wax to honey

Soria¹, M.E., Malacalza, N.H., Mouteira, M.C.,
Silva, R. y D'Alessandro, L.

Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Ares.
Laboratorio Central de Productos de la colmena

Resumen

La furazolidona es un antibiótico perteneciente al grupo de los nitrofuranos, se ha demostrado que estas sustancias tienen la potencialidad de ser carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. En Argentina se prohibió su utilización en cualquier organismo o derivados de los mismos a partir de los cuales se produzcan alimentos. Por este motivo hemos realizado un trabajo experimental de laboratorio sobre la contaminación de miel cuando está en contacto con cera contaminada con furazolidona, cuantificándose por Elisa. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica para la extracción de furazolidona de la matriz cera y mediante la cuantificación de la misma evaluar la transferencia de este antibiótico de la cera a la miel. La furazolidona se cuantifica por medio del 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), para determinar el grado de recuperación durante la extracción se trabajó con concentraciones teóricas de 0,6 y 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ. Para evaluar la transferencia se utilizaron tres niveles de contaminación en cera: 52,91; 70,95 y 138,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ; las ceras fueron incubadas con miel durante 30, 60 y 100 días, a 37°C y 66% de humedad relativa. El porcentaje de recuperación promedio de furazolidona en cera fue de 90,25%. La miel incubada entre 30 y 100 días presentó niveles de contaminación de 0,625 a 2,342 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ. Se cuantificó furazolidona de cuatro ceras estampadas de distintas marcas comerciales y ninguna presentó valores que permita asociarlas a la contaminación de la miel.

Palabras clave: furazolidona, transferencia, cera, miel.

Summary

The antibiotic furazolidone is a nitrofuran. It is a proven fact that these substances are potentially carcinogenic, teratogenic, and mutagenic. Argentina has banned its use on any organism or its derivatives meant for the manufacture of food. For this reason we have run this laboratory test on the pollution of honey when in presence of furazolidone polluted wax, quantified by Elisa. This test intends to develop techniques for the extraction of furazolidone from the wax matrix. Once furazolidone is quantified, we can evaluate its transfer from bees wax to honey. Furazolidone is quantified using 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ). We used a theoretical concentration of 0.6 and 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ in order to determine the degree of recovery during the extraction process. We used three levels of wax pollution, 52.91, 70.95,

Recibido: febrero de 2007

Aceptado: junio de 2007

1. Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Ares. Laboratorio Central de Productos de la colmena. Calle N° 13 y 532 (1900) La Plata. calidadmiel@maa.gba.gov.ar

and 138.79 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ. The wax batches were hatched at 37° C and 66% relative humidity for periods of 30, 60 and 100 days. The average recovery rate for furazolidone was 90.25%. Honey hatched for 30 and 100 days showed pollution levels varying from 0.625 to 2.342 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ. Furazolidone was quantified on all four combs from different trademarks. None showed values relating them with the pollution of honey.

Key words: furazolidone, transfer, bees wax, honey.

Introducción

La furazolidona es un antibiótico, utilizado en medicina humana y veterinaria, perteneciente al grupo de los nitrofuranos. A partir de ésta molécula se genera el 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), que se fija con facilidad a proteínas y aminoácidos (Hoogenboom et al., 1991; Gottschall and Wang, 1995; Leitner, 2001; NLM, 2005). La identificación y cuantificación de la furazolidona se realiza a través del AOZ.

Estudios realizados en animales de laboratorios y en cepas celulares, han demostrado que los nitrofuranos tienen la potencialidad de producir: carcinogenicidad (transformación de células sanas en tumorales), teratogenicidad (alteraciones en el desarrollo embrionario), y mutagenicidad (capacidad de alterar el ADN de las células) (SENASA, 1995; Leitner, 2001; NLM, 2006; SENASA, 2006). Por este motivo se ha prohibido su utilización en animales, piensos o derivados de animales a partir de los cuales se producen alimentos. En Argentina la exigencia que debe cumplir este grupo de antibióticos en miel y otros alimentos, es de "no detectable" (CEE, 1990; SENASA, 1995; SAGyP, 2005). Sin embargo en los controles realizados por la Unión Europea durante el año 2004 hasta diciembre del 2006 se reportaron mieles contaminadas con este grupo de antibióticos (APITRACK®, 2006).

El control realizado por organismos oficiales para la detección y cuantificación de AOZ, se realiza por un método de confirmación o método primario, HPLC/MS/MS. La determinación de este analito, puede también realizarse por un método secundario, Elisa (R-BIOPHARM AG. 2003; SENASA, 2004; SPRRE y SAGyP, 2005; SAGyP y

SENASA, 2005).

Utilizando el último método se han realizado estudios en apiarios tratando de comprender la dinámica de la furazolidona y de otro nitrofurano, furaltadona, el cual se cuantifica por medio del 3-amino-5-morpholinometil-2-oxazolidinona (AMTZ), dentro de la colmena (Lanzelotti, 2005; 2006; Domínguez, 2006). De estos trabajos surge que la contaminación, de miel y cera, esta asociada a la utilización de medicamentos contaminados con estas sustancias y al manejo inadecuado, por parte del productor, de los materiales de la colmena. Una de las vías de contaminación de la miel sería entonces, la difusión de AOZ desde la cera durante el periodo de maduración y el grado de contaminación dependería de condiciones tales como: concentración de AOZ en cera, tiempo de contacto, temperatura y características de la miel.

Dada la importancia que tiene la apicultura en la provincia de Buenos Aires, se realizó un trabajo experimental de laboratorio con el objetivo de analizar el grado de transferencia de la furazolidona desde la cera a la miel, utilizando el método Elisa para su detección.

Materiales y Métodos

Se llevo a cabo la cuantificación de AOZ (R-BIOPHARM AG., 2003) sobre cuatro tipos de cera estampada, correspondientes a distintas marcas comerciales, una de estas fue elegida para la realización del ensayo.

En la realización de estos estudios se utilizó cera estampada de uso común en apicultura, de la misma marca y número de lote.

Extracción de AOZ de la matriz cera

Se desarrolló un método para la extracción del residuo de furazolidona (AOZ) de la matriz cera.

Para evaluar la eficacia de la extracción se contaminó cera con furazolidona (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) disuelta en alcohol metílico, utilizándose una solución madre de 10 mg /100 ml. Se pesaron ocho porciones de 0,5 g de cera en vaso de precipitado y se fundieron en un baño de agua a ebullición. Una vez fundida la cera, a cuatro de ellas se le adicionó una solución de furazolidona para lograr concentraciones de 0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (cera A) y a las cuatro restantes una cantidad necesaria para obtener una concentración de 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (cera B) de AOZ. Se agitó suavemente hasta lograr su homogeneización, se las retiró del baño y se las dejó enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente se retiró la capa de cera y se lavó con agua bidestilada. Cada una de las ceras tratadas fue colocada en vasos de precipitado para llevar a cabo la extracción de AOZ. Se les agregó 5 ml de HCl 0,1 N y se llevó a ebullición en baño de agua, con agitación suave, durante aproximadamente 7 minutos, luego se enfrió rápidamente en un baño de agua y hielo. Se retiraron las fases acuosas correspondientes a las ceras A y B trasvasándose a sendos tubos de polipropileno. El procedimiento de lavado de la cera contaminada se repitió tres veces, juntándose las fases acuosas correspondientes a cada concentración y de cada lavado. Simultáneamente se realizó un blanco de cera. Sobre todas las soluciones acuosas obtenidas durante la extracción se cuantificó AOZ. Para dicho ensayo se utilizó un equipo Biorad Mod.550 Microplate Reader (USA) y Kit Ridascreen® Nitrofurán (AOZ) (Darmstadt, Germany). El rango de cuantificación del kit es de 0,3 a 8,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. La cuantificación de furazolidona por este método fue realizada en el rango de 0,6 a 1,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ.

Estudio de la difusión de furazolidona de cera a miel

Para la fabricación de las celdas, se fraccionaron las hojas de cera estampada, se las colocó en un vaso de precipitado y se llevó a baño de agua a ebullición. Esta cera se dividió en tres porciones, se la contaminó con furazolidona en tres niveles distintos de 52,91; 70,95 y 138,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$ los cuales se denominaron cera 1, cera 2 y cera 3. Con éstas ceras se construyeron celdas cilíndricas huecas de 1,7 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro (Dadant e Hijos, 1979), utilizándose una matriz de madera como molde. Los pasos seguidos fueron los que comúnmente se realizan en la construcción de cúpulas utilizadas en la crianza de abejas reinas. La matriz fue sumergida en cera contaminada, fundida en baño de agua a 70°C y a continuación se enfriaron en agua bidestilada a temperatura ambiente. Esta operación se repitió tres veces, retirándose por último la celda de la matriz. Se realizó la extracción y cuantificación de furazolidona sobre los tres grupos de celdas (Maroto Sánchez, 2002). Para ello se tomaron 20 celdas al azar de cada grupo, se cortaron en trozos pequeños y sobre una porción se realizó la extracción y cuantificación de AOZ.

Las celdas contaminadas con cada concentración de AOZ se agruparon en unidades experimentales de 30 celdas cada uno, simulando un panal, para la unión de éstas se utilizó cera contaminada con la misma concentración. Se armaron tres unidades experimentales para cada concentración, es decir nueve unidades experimentales en total (sin repeticiones).

Durante el estudio de la difusión de furazolidona de cera a miel se utilizó una miel típica de Pradera de la provincia de Buenos Aires, a la cual se le realizaron las siguientes determinaciones: análisis melisopalinológico (Louveaux et al, 1978; Basilio y Romero, 1996), humedad (IRAM, 1994); HMF (IRAM, 1995), acidez libre (IRAM,

1994) y AOZ por Elisa. (R-BIOPHARM AG., 2003).

Utilizando jeringas se llenaron las celdas con miel, previamente fundida en un baño de agua a 50°C y enfriada a temperatura ambiente. Por último, estas celdas fueron cubiertas con una lámina de cera contaminada con la misma concentración. Las nueve unidades experimentales fueron incubados durante 30, 60 y 100 días, en una estufa de cultivo a una temperatura promedio de 37°C. El registro de la temperatura se realizó con un equipo Hired-Hand Data Shtth (Bremen, Alemania). Para mantener las condiciones de humedad, se incorporó una cápsula de petri con agua bidestilada, manteniéndose llena durante todo el ensayo.

La humedad relativa porcentual promedio, en la estufa de incubación fue de 66% (Dadant e Hijos, 1979), controlándose a lo largo del ensayo con un termómetro de bulbo húmedo y seco (Bacharach Inc. PGH PA).

A los distintos tiempos se retiró de la estufa de incubación una unidad experimental por cada concentración, en todos los casos se retiró la tapa superior de cera y se separaron las celdas. Estas fueron comprimidas manualmente para extraer la miel (extracción en frío). Sobre la miel obtenida de cada unidad experimental se cuantificó AOZ.

Resultados y Discusión

La miel utilizada presentaron valores de 17,5% de humedad (DE = 0,14 y Cv = 0,8%); 4,58 mg kg⁻¹ de HMF (DE = 0,28 y Cv = 6,11%), 19,42 mEq kg⁻¹ de acidez libre (DE=0,6 y Cv= 3%) y AOZ no detectable. Los valores de estos parámetros están acorde con los establecidos en el Código Alimentario Argentino. Los contenidos polínicos

caracterizaron a la miel como multiflora o pluriflora, encontrándose los pólenes pertenecen a las siguientes familias: Fabaceae, representada por los géneros Lotus sp, Trifolium sp y Vicia sp; Asteraceae representada por los géneros Carduus sp, Taraxacum sp y Baccharis sp; Mirtaceae por el género Eucalyptus sp, Borraginaceae por Echium plantagineum, y trazas de la familia Lamiaceae.

La cera utilizada para el ensayo presenta un valor promedio de 0,3 µg kg⁻¹ AOZ (DE=0,036 y Cv= 12%). Ninguna de las otras tres ceras estampadas presentaron valores mayores o iguales al límite de cuantificación de 0,3 µg kg⁻¹ de AOZ. Por los valores observados en las ceras estampadas analizadas, podemos sugerir que ésta no ha sido la causa de la presencia del AOZ en la miel y que deberíamos de investigar otras posibles fuentes de contaminación.

Extracción y cuantificación de AOZ de la matriz cera

Se cuantificó AOZ en la cera contaminada en concentraciones teóricas de 0,6 y 1,0 µg kg⁻¹. Las determinaciones se realizaron al menos por cuadruplicado. El porcentaje de recuperación promedio de AOZ fue de 90,25% (DE= 11,40 y Cv%= 16,63%) (Maroto Sánchez, 2002).

Se cuantificó AOZ en las ceras contaminadas (1, 2 y 3) por triplicado con las cuales se fabricaron las celdas (Cuadro 1).

Cuantificación de AOZ en miel

Las concentraciones de AOZ, en µg kg⁻¹, para las mieles incubadas se presentan en el Cuadro 2.

Desde el comienzo de la incubación hasta los 60 días se observa el mayor incremento de contaminación de la miel, para los tres niveles de cera contaminada (Figura 1).

Cuadro 1: Cuantificación de las ceras contaminadas con furazolidona.

Table 1: Quantification for furazolidone Polluted Wax.

	X [$\mu\text{g kg}^{-1}$] AOZ	DE	Cv%
cera 1	52,91	3,34	6,31
cera 2	70,95	1,33	1,88
cera 3	138,79	8,06	5,81

Cuadro 2: Concentraciones promedios para las distintas ceras y tiempos de incubación.

Table 2: Average concentration for different waxes and hatching periods.

		30 días	60 días	100 días
Cera 1	X \pm DE	0,629 \pm 0,076	1,182 \pm 0,069	1,217 \pm 0,099
	Cv % ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	12,083	5,838	8,135
	n	5	6	5
Cera 2	X \pm DE ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1,413 \pm 0,215	1,573 \pm 0,068	2,044 \pm 0,194
	Cv %	15,216	4,323	9,491
	n	6	4	6
Cera 3	X \pm DE ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1,726 \pm 0,093	2,251 \pm 0,149	2,342 \pm 0,291
	Cv %	5,388	6,619	12,425
	n	6	2	5

A partir de los 60 días los valores presentan pequeños incrementos, ésta situación puede deberse a: una situación próxima al equilibrio de la interfase cera-miel, a que todas las moléculas disponibles en la pared de la capsula hallan migrado u otro fenómeno que podría esclarecerse llevándose a cabo un estudio cinético más profundo. Se realizó la regresión lineal de la concentración promedio de AOZ en cera en función de la hallada en miel para 60 días de incubación:

$$[\text{AOZ}]_m = 0,0179 [\text{AOZ}]_c \quad (R^2 = 0,9245)$$

[AOZ]_m: concentración AOZ en miel en $\mu\text{g kg}^{-1}$
 [AOZ]_c: concentración AOZ en cera en $\mu\text{g kg}^{-1}$

De acuerdo a estos resultados podemos estimar que la concentración de AOZ necesaria en las celdas de cera, para generar una

contaminación de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ AOZ en miel, debería ser de aproximadamente $17 \mu\text{g kg}^{-1}$, en las condiciones de trabajo establecida.

El área de cera estampada que origina la base de la celda posee una superficie aproximadamente quince veces menor que el área total de la celda. Según esto se supondría que la concentración de AOZ en las ceras estampadas debería ser quince veces mayor a $17 \mu\text{g kg}^{-1}$, ósea de aproximadamente $255 \mu\text{g kg}^{-1}$, para generar contaminación en la miel. Dicha concentración no se observó en las ceras estampadas analizadas. Por este motivo se podría suponer que no existe contaminación a través de la cera estampada y que la misma proviene de la aplicación de medicamentos "artesanales" comúnmente utilizados por el productor apícola.

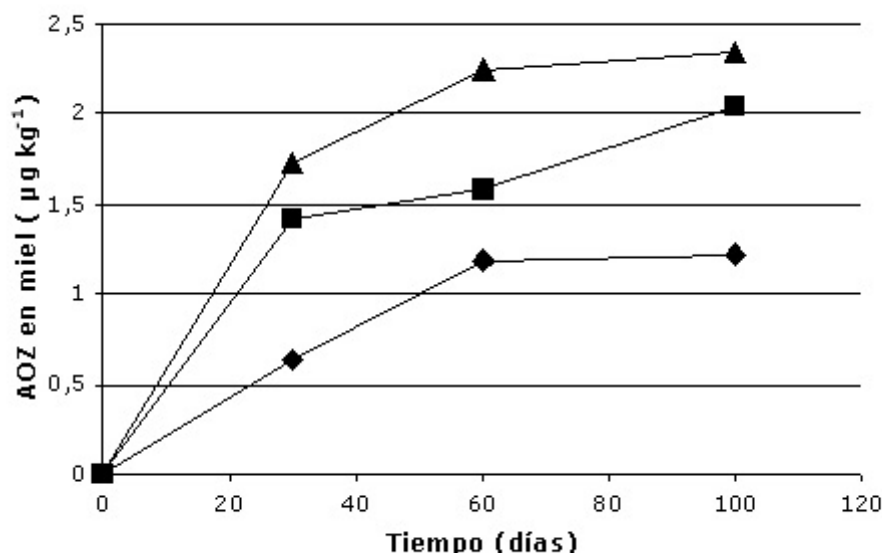


Figura 1: Contaminación en función del tiempo de incubación correspondiente a mieles en contacto con ceras con distintas concentraciones de furazolidona (◆) 52,91 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (■) 70,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y (▲) 138,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Figure 1: Pollution as a function of hatching periods for honey in contact with wax with different concentrations of furazolidone. (◆) 52,91 $\mu\text{g kg}^{-1}$; (■) 70,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y (▲) 138,79 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Conclusión

Los residuos de furazolidona pueden ser extraídos con eficacia de la cera realizando lavados con agua acidificada.

En las condiciones de trabajo establecidas se observa una transferencia de furazolidona desde la cera hacia la miel, dependiendo de la concentración inicial de AOZ en cera y del tiempo de contacto. De acuerdo al trabajo realizado no encontramos evidencia de que las contaminaciones de miel producidas a partir del año 2003 se debieron a la cera estampada.

Se debería centrar entonces la atención en los medicamentos preparados artesanalmente, de los cuales se desconoce el principio activo, formulación y dosis terapéutica. Respecto de los principios activos autorizados se deben utilizar únicamente los medicamentos aprobados por SENASA.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de Ing.Agr. María Teresa Aguiar en la identificación del origen botánico de la miel, y a la Dra. Cristina Ferrero (CIDCA-CONICET-UNLP) por su lectura crítica y sugerencias.

Bibliografía

- Apitrack, Ò. 2006. Alertas y notificaciones rápidas por contaminaciones. Información aplicada. Disponible en <http://www.apitrack.com/noticias/cealertas2006>
- Basilio, A. y Romero, E. 1996. Contenido polínico en las mieles de la región del Delta del Paraná (Argentina). Darwiniana (Buenos Aires, Argentina). 34(1-4):113-120.
- Basualdo, M., Lanzelotti, P., Maldonado, M., Poffer, D., Torres, J. y Bedascarrasbure, E. 2006. Contaminación con nitrofuranos en miel y cera en colmenas de Apis mellifera.

- Gaceta del Colmenar (Buenos Aires, Argentina). 596:20-21.
- Consejo de la Comunidad Europea, CEE. 1990. Fijación de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. Reglamento CEE N° 2377/90, Diario Oficial N° L 224.
- Dadant e Hijos. 1975. La Colmena y la Abeja Melífera. Traducción por Hanneore, S de Marx. Montevideo, Uruguay; Hemisferio Sur. 936 p.
- Domínguez, M.C., García, E.N., Pastre, M.N., Videla, M.P. y Barrendeguy, J. 2006. Nitrofuranos en el apiario: estudio de la dinámica y su permanencia en miel. Disponible en <http://www.dominguezlab.com.ar>
- Gottschall, D.W. and Wang, R. 1995. Depletion and bioavailability of [¹⁴C] Furazolidone residues in swine tissues. *J. Agric. Food Chem (EEUU)*. 43, 2520-2525
- Hoogenboom, L.A.P., Van Kammen, M., Berghmans, M.C.J., Koeman, J.H. and Kuiper, H.A. 1991. The use of pig hepatocytes to study the nature of protein-bound metabolites of furazolidona: a new analytical method for their detection. *Food and Chemical Toxicology (EEUU)*. 29-5:321-328
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, IRAM. 1994. Miel: determinación de la humedad. Norma 15931. 1-7
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, IRAM. 1994. Miel: determinación de la acidez libre. Norma 15933. 1-6
- Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, IRAM. 1995. Miel: determinación de hidroximetilfurfural: método de White. Norma 15937-2. 1-11
- Lanzelotti, P. 2005. Nitrofuranos en Cera: Dinámica de la Contaminación Generalizada con Nitrofuranos. Buenos Aires, Argentina. Laboratorio Melacrom. Disponible en <http://www.melacrom.com.ar>
- Lanzelotti, P. 2006. Movimiento y estabilidad de residuos de nitrofuranos dentro de la colmena. Buenos Aires, Argentina. Laboratorio Melacrom. Disponible en <http://www.melacrom.com.ar>
- Leitner, A., Zollner, P. y Lindner, W. 2001. Determination of the metabolites of nitrofurant antibiotics in animal tissue by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J. of Chromatography A (EEUU)*. 939:49-58.
- Louveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl, G. 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World (EEUU)*. 59:139-157.
- Maroto Sánchez, A. 2002. Tesis Doctoral "Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina. Tesis doctoral. Tarragona, España; Universitat Rovira I Virgili. 286 p.
- R-BIOPHARM AG. 2003. Sensitive and quantitative determination of nitrofurant (AOZ) fast and easy extraction. Darmstadt, Germany. Ridascreem nitrofurant (AOZ). Art N° R 3701:1-34.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, SAGyP; y Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA. 2005. Plan nacional de control de residuos e higiene en alimentos, CREHA. Buenos Aires, Argentina. Resolución 215/95. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>
- Secretaría de Política, Regulación y Relaciones Sanitarias, SPRRE; y Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación, SAGyP. 2005. Código Alimentario Argentino, artículo 155 bis. Buenos Aires, Argentina. Boletín Oficial de la República Argentina, N°30618. 3P.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA. 1995. Limitaciones del uso de nitrofuranos. Buenos Aires, Argentina. Resolución ex SENASA N° 248/95. 2p.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA. 2004. Nitrofuranos. Buenos Aires, Argentina. Coordinación de residuos químicos del laboratorio animal. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>
- Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA. 2006. Nitrofuranos en miel. Buenos Aires, Argentina. Informe de la comisión de emergencias sanitarias apícola. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar>
- United States National Library of Medicine, National Institutes of Health; NLM. 2005. Furazolidone: characteristic physical-chemical (EEUU). Toxnet. RN 67-45-8. Disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- United States National Library of Medicine, National Institutes of Health; NLM. 2006. Furazolidone: effects about the human health (EEUU). HSDB. RN 67-45-8. Disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov>.