

Bernerí, M.J.^{1,2}; Miranda, A .O.¹; Frances, O.³; Mastrantonio, G.^{2,4}

1. Área de Salud Pública Veterinaria. EEA INTA Anguil

2. Área de Toxicología, Departamento de Química, Fac. Cs. Exactas y Naturales UNLPam

3. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa

4. Área de Toxicología, Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas UNLP

Detección de monensina por espectrofotometría en piensos para la alimentación del ganado vacuno

RESUMEN

La incesante presión de la agricultura, así como la búsqueda de una mayor eficiencia en los sistemas ganaderos, ha conducido a un mayor uso de herramientas farmacológicas como estrategia para mejorar la rentabilidad de la ganadería.

La Monensina (MN) es un antibiótico poliéter (PEs) del grupo de los ionóforos elaborado por un hongo, el *Streptomyces cinnamonensi*. El objetivo de este trabajo es contar con un método de cuantificación de MN en pienso utilizando equipamiento de baja complejidad, disponibles en laboratorios veterinarios de análisis rutinarios, y que además permita realizar un mayor seguimiento en cuanto a la formulación de las dietas y sus componentes, evitando pérdidas tanto clínicas como subclínicas que afecten la rentabilidad del sistema ganadero.

Se obtuvo un límite de detección (LOD) de 3 mg MN/Kg de alimento y un límite de cuantificación (LOQ) de 8 mg MN/Kg de alimento. La técnica es apropiada para medir MN en piensos en dosis normales de trabajo y en sobredosificaciones con un bajo costo de insumos y equipamiento.

Palabras clave: monensina, piensos, toxicología veterinaria, análisis de alimentos.

SUMMARY

The incessant pressure of agriculture and the search for greater efficiency in livestock systems, has led to increased use of pharmacological tools as a strategy to improve the profitability of livestock. The monensin (MN) is a polyether antibiotic (PEs) from the group of ionophores compounds produced by a fungus, *Streptomyces cinnamonensi*. This work is a communication of a simple and reliable method of quantifying MN in animal feed, using low complexity equipment available in routine veterinary laboratories. Thus, a better monitoring of the formulation of diets and their components will be possible, avoiding both clinical and subclinical losses which in the end affect the profitability of the farming. The technique resulted suitable for measuring MN in feed in normal doses and overdoses working with low cost supplies and equipment.

Keywords: monensin, animal feed, veterinary toxicology, food analysis

INTRODUCCIÓN

La creciente presión de la agricultura, así como la búsqueda de una mayor eficiencia en los sistemas ganaderos, ha conducido a un mayor uso de herramientas farmacológicas como estrategia para incrementar la rentabilidad en la ganadería.

En ese contexto, el uso de antibióticos ha generado una mejora sustancial de la eficiencia en los sistemas de engorde hasta alcanzar un uso casi masivo a lo largo de estos últimos años (Bretschneider, G. 2009).

La monensina (MN) es un antibiótico poliéter (PEs) del grupo de los ionóforos elaborado por un hongo, el *Streptomyces cinnamonensi*, y es de uso cada vez más intensivo en la cría de ganado vacuno. Desafortunadamente, no es infrecuente la presentación de casos de intoxicación, debidos al consumo de altas cantidades en el alimento como consecuencia de una inadecuada formulación, de una incorrecta preparación de la premezcla y/o mal mezclado en el mixer o a una deficiente distribución en el comedero (Odrizola, 2004). La dosis terapéutica estándar establecida para la MN es de 1 a 3 mg MN/Kg de peso vivo (PV). En la práctica veterinaria, que incluye consideraciones del manejo de la hacienda, estas dosis se traducen en el uso de 5 a 40 mg MN/Kg de alimento.

Si bien MN presenta un amplio margen de seguridad, en los últimos años se ha detectado un número importante de casos de intoxicación. Esto se debe a que ha aumentado el uso del producto, en la medida que se han verificado en terreno los efectos benéficos sobre la cría vacuna, por un lado, por otro lado en la optimización de la conversión de alimento, y por otro, por la prevención de ciertas patologías como el meteorismo, la acidosis y la coccidiosis bovina.

La MN presenta gran afinidad por los cationes como el sodio, alterando la permeabilidad de la membrana celular. Esta acción afecta las células musculares del corazón y musculo esquelético, generando una miopatía cardíaca con éxtasis sanguíneo y edema intersticial pulmonar consecuente (Pascuet et al, 2005). La Toxicidad puede presentarse tanto en forma aguda como crónica dependiendo de la dosis ingerida. La DL_{50} se ha establecido entre 50 y 80 mg MN/Kg PV en tanto que las primeras manifestaciones clínicas de intoxicación aparecen frecuentemente con dosis de 10 mg MN/Kg PV (Radosititis et al, 2002). Esto significa un estrecho margen entre una sobredosis y una dosis mortal, lo que implicaría un riesgo alto de muerte para un animal intoxicado. Sin embargo, las tasas de mortalidad reportadas han sido muy variables con valores que oscilan entre el 1 % y 20% (Odrizola, 2004; Rodríguez Armesto et al,

2004; Suárez, V. H. y Miranda, O. A. 2008; Burla, 2007).

Desde comienzo de la década de los 70', varios métodos de detección y análisis de confirmación se han reportado para la determinación de uno o más PEs en alimentos. La mayoría de estos métodos utilizan cromatografía líquida (HPLC) como método de elección, lo que requiere de equipamiento de laboratorio de alta complejidad y en consecuencia de alto costo. Por otro lado y dado que varios de estos PEs no poseen respuesta al ultravioleta (UV) y a la fluorescencia, en general los procedimientos analíticos implican pasos previos de derivatización, con variaciones según método (pre y post columna) (Dusi, G. y Gamba, V. 1999; FAMIC, 2013) lo que complejiza aún más las mediciones. Por estas razones, la búsqueda de un método de cuantificación de MN en piensos, utilizando equipamiento de baja complejidad, constituye un objetivo fundamental de aplicación en medicina veterinaria. Contar con una metodología al alcance de laboratorios de pequeña escala, permitiría realizar un mejor seguimiento de la formulación de las dietas y sus componentes, evitando pérdidas tanto clínicas como subclínicas que afecten la rentabilidad del sistema ganadero. En este trabajo se reporta un método sencillo, rápido y confiable que permite el dosaje de MN en muestras de alimentos destinadas al consumo del ganado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método consiste en dos etapas, una pre-analítica y otra analítica. La etapa pre-analítica incluye la preparación de la muestra, la obtención de un extracto y la derivatización por copulación con el cromóforo p-dimetilaminobenzaldehído (PDB). La fase analítica del método incluye la determinación espectrofotométrica del compuesto de color azul producto de la copulación, que presenta máxima absorbancia a 578 nm.

Material de vidrio requerido: tubos de ensayo de 10 ml (con tapa o tapón), matraces de 10 y 100 ml, pipetas de 5 y 10 ml.

Equipamiento requerido: molinillo de cuchillas de acero, baño termostático y espectrofotómetro.

Reactivos requeridos (calidad pro analisis): Etanol anhidro, H_2SO_4 , PDB y MN.

Muestreo

Para la evaluación de un pienso a granel, se obtiene una muestra primaria a partir de la combinación de al menos cinco alícuotas obtenidas desde distintas porciones del contenedor del material, procurando un total de, al menos, 500 gr finales.

Preparación y extracción

Desde la muestra primaria se obtiene, por cuarteo, una alícuota de 100 gr de la muestra. Mediante molinillo, se realiza la molienda de dicha alícuota procurando la obtención de un polvo fino.

Se toman 10 gr del material triturado y se le agregan 100 ml de etanol anhidro.

Se agita durante 10 minutos para favorecer la mezcla completa y se filtra para obtener un extracto etanólico.

Para establecer la curva de calibración, se dispone de un pienso preparado con 84 % de grano de maíz entero, 1 % de grano de avena, 4.2 % de pellet de soja, 1% de carbonato de calcio, 1,1% de urea y un 8.7% de fibra efectiva en forma de rollo, que se utiliza como matriz de referencia. A partir de ella se prepara una muestra de referencia de concentración 120 mg MN/Kg, por incorporación de cantidades apropiadas de MN calidad analítica. Se preparan entonces dos extractos etanólicos, uno desde la matriz de referencia (extracto A) y otro desde la muestra de referencia (extracto B). A partir de estos dos extractos se prepara una serie de diluciones en el rango de 0 a 120 mg MN/Kg de alimento, con cinco niveles, por duplicado.

Reacción de copulación

Dado que el agua interfiere en la reacción, todo el proceso previo debe llevarse a cabo utilizando etanol anhidro y evitando la contaminación con agua (material de vidrio, operaciones de trasvase, etc.). La reacción de derivatización se da en

medio ácido garantizado por la adición de H₂SO₄. El PDB es el reactivo derivatizante de la MN, generando un producto azul, con un máximo de absorción a 578 nm.

Se prepara PDB en etanol anhidro, (2,5 g/L), con un contenido final H₂SO₄ 98% (1/100). Esta solución debe prepararse el mismo día de trabajo. No puede almacenarse.

Se prepara una batería de tubos de ensayos por duplicado, en donde se adiciona 3 ml de cada punto de la curva, mas 3 ml de la solución de PDB.

Todos los tubos se tapan e incuban a 70°C en baño termostático durante 20 minutos para que se lleve a cabo la reacción.

Espectrofotometría

Una vez frías, las soluciones obtenidas se leen en el espectrofotómetro a 578 nm. Se prepara un blanco de reactivo utilizado para establecer el 0,0 del equipo, con una solución de etanol / H₂SO₄ 98% (99/1). Las muestras que arrojen concentraciones por encima del rango establecido por la curva de calibración, deben diluirse 1/5 con el extracto A y luego repetir la medida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos correspondientes a la curva de calibración de MN ajustada por regresión lineal se presentan en la tabla 1.

Es necesario tomar en cuenta, como ya fue mencionado, que es frecuente encontrarnos con piensos deficientemente mezclados, de manera que el muestreo se constituye en una etapa crítica y debe tomarse especial cuidado en su desarrollo. El tiempo total de análisis, desde el procesamiento de la muestra, hasta la obtención del resultado por espectrofotometría es de aproximadamente 4 hs. El método propuesto aplicado a la rutina, permite valorar el dosaje de MN en piensos, hasta dos veces el valor superior de riesgo veterinario (600 mg/Kg).

Límite de detección (LOD)	3 mg MN/Kg
Límite de cuantificación (LOQ)	8 mg MN/Kg
Rango lineal	8 a 120 mg MN/Kg de alimento
Rango normal	5 – 40 mg MN/Kg de alimento
Valor de riesgo veterinario	200 – 300 mg MN/Kg

Tabla 1.

CONCLUSIONES

La técnica es apropiada para medir MN en piensos en dosis normales de trabajo y en sobredosificaciones. Es un método con un bajo costo de insumos y equipamiento comparado con otros métodos descriptos en la literatura.

De los insumos requeridos por la técnica propuesta, el que tiene mayores restricciones para su adquisición, corresponde a la MN como droga de calidad analítica. Nuestro laboratorio dispone de material de referencia analítica, el que puede ser solicitado haciendo referencia a la temática de este artículo.

En la medida que un mayor número de productores accedan a la capacidad de evaluar las dosis efectivas que se administran a los animales a través de los piensos, se podrá acumular una mayor casuística, tanto respecto de la eficacia del producto como de las situaciones de riesgo de intoxicación, aportando en la mejora de los protocolos de aplicación de MN en la producción pecuaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Bretschneider, G. 2009. Beneficios del uso de monensina en la alimentación del ganado para carne, leche y cría. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN: 1695-7504, Vol. 10, N° 10.
- Burla, E. R. 2004. Descripción de un caso de intoxicación crónica con monensina en bovinos. Monografía

Facultad de Cs. Veterinarias UNCPBA. Tandil, Bs. As. 45p.

- Dusi, G., Gamba, V. 1999. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1999, 835 243–246
- Odriozola, N. 2004. Intoxicación por monensina. E.E.A INTA Balcarce.
- Pascuet, M. L.; Moore D. P.; Iraguen Pagate, I.; Cosentino I. A.; Odriozola, E. 2005. Cambios enzimáticos, lesiones macroscópicas y microscópicas producidas por la intoxicación con monensina en bovinos. *Rev. de Med. Vet.* Vol. 86, 2, Pág. 47-51.
- FAMIC. 2013. Manual sobre métodos de determinación de monensina sódica del FAMIC (Food and Agricultural Materials Inspection center). [www.famic.go.jp/ffis/oie/obj/a27_mn.pdf] consulta 20-04-2013.
- Redostitis, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C.; Hinchcliff, K. W. 2002. Intoxicación por ionóforos. *Medicina Veterinaria*. Ed. Mc Graw-Hill. Novena Edición Español. Pág. 1931.
- Rodríguez Armesto, R.; Peralta, C.; Ochoteco, M.; Picco, E.; Litterio, N.; Boggio, J. C. 2004. Posible intoxicación accidental con monensina en terneros destetados. *Vet. Arg.* Vol. XXI. N°201. Pág. 13-20.
- Suárez, V. H.; Miranda, O. A. 2008. Intoxicación por monensina, caso de diagnóstico de la Unidad Regional de Sanidad Animal. Encuesta a productores y Registro de Enfermedades. *Boletín N° 3*. Proyecto Federal de Innovación Productiva, Pág. 12 ,13.