

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Trabajo de titulación previo a
la obtención del título de
Médica Veterinaria Zootecnista.*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS
EN LA LECHE CRUDA COMERCIALIZADA”**

AUTORA:

EULALIA NOEMI CARACUNDO GUAMÁN

TUTOR:

DR. FROILÁN PATRICIO GARNICA MARQUINA

CUENCA-ECUADOR

2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Eulalia Noemi Caracundo Guamán con documento de identificación N° 0105637300 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud que soy la autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS EN LA LECHE CRUDA COMERCIALIZADA”**, mismo que ha sido desarrollado para aportar por el título de: *Médica Veterinaria Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad Facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, mayo de 2019



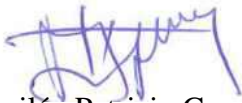
Eulalia Noemi Caracundo Guamán

C.I. 0105637300

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
**“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS
EN LA LECHE CRUDA COMERCIALIZADA”**, realizado por Eulalia Noemi Caracundo
Guamán, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados
por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, mayo del 2019



Dr. Froilán Patricio Garnica Marquina

C.I. 0101650299

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Eulalia Noemi Caracundo Guamán con documento de identificación N° 0105637300 autora del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS Y TETRACICLINAS EN LA LECHE CRUDA COMERCIALIZADA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, mayo de 2019



Eulalia Noemi Caracundo Guamán

C.I. 0105637300

DEDICATORIA

Este trabajo experimental lo dedico principalmente a DIOS por darme la fuerza e inspiración para concluir una de mis metas más deseadas.

A mi madre Carmen Guamán por su amor, paciencia y sacrificio durante todos estos años con su apoyo incondicional me permitió llegar a cumplir este sueño, a mi esposo Fernando Luis, quien estuvo a mi lado durante toda esta etapa académica acompañándome en mi sueño, apoyándome cuando más lo necesitaba, por extenderme su mano en los momentos difíciles.

Finalmente dedico esta tesis a mis hermanos que me brindaron su apoyo moral en esta etapa académica.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad por ser mi guía a lo largo de mi vida, a mi madre, a mi esposo y a mis hermanos por creer y confiar en mí, por sus consejos y apoyo incondicional.

Agradezco a mis profesores por sus enseñanzas por compartirme sus conocimientos dentro y fuera de las aulas de la Universidad Politécnica Salesiana, por sus consejos de experiencia profesional.

Mi profundo agradecimiento a la Universidad Politécnica Salesiana, a la carrera de Medicina Veterinaria y ZOOTECNIA por abrirme sus puertas, y permitirme formarme profesionalmente enriqueciéndome en conocimientos.

RESUMEN

El presente trabajo investigativo se realizó en el cantón Cuenca de la provincia del Azuay-Ecuador, cuyo objetivo fue determinar la presencia de antibióticos de la familia de betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda comercializada en esta ciudad, mediante un muestreo probalístico sistemático se tomó muestras de leche cruda de vaca comercializada en seis principales mercados de la ciudad, incluido vehículos transportadores de leche que se encontraron en dichos lugares; en esta investigación fueron analizadas 150 muestras en un laboratorio de alimentos para determinar la presencia de los fármacos antes mencionados mediante una interpretación visual con el kit 2in1 Bet-Lactams + Tetracyclines test de la marca Bioeasy® que es una prueba rápida de detección. Un 26% de las muestras estudiadas fueron positivas para la presencia de residuos de antibióticos es decir 39 muestras, de las cuales hubo 22.8% de presencia de residuos de antibióticos betalactámicos siendo los antibacterianos más presentes en las muestras estudiadas, un 2.6% de presencia de residuos de antibióticos tetraciclinas y un 0.6% de presencia de residuos de antibióticos de ambas familias es decir betalactámicos y tetraciclinas encontradas en la misma muestra de leche cruda, esto indica que existe un alto nivel de leche contaminada con residuos de antibióticos que es comercializada fácilmente a la población de esta ciudad.

ABSTRACT

The present investigative work was done in the canton Cuenca of the province of Azuay-Ecuador, whose objective was to determine the presence of antibiotics of the family of beta-lactams and tetracyclines in raw milk marketed in this city, through systematic probalistic sampling samples of raw cow's milk marketed in six main markets of the city were taken, including milk transport vehicles that were found in those places; In this research 150 samples were analyzed in a food laboratory to determine the presence of the aforementioned drugs through a visual interpretation with the kit 2in1 Bet-Lactams + Tetracyclines test of the Bioeasy® brand; which is a rapid detection test. 26% of the samples studied were positive for the presence of antibiotic residues, that is, 39 samples, of which there was 22.8% presence of residues of beta-lactam antibiotics being the antibacterials more present in the samples studied, 2.6% presence of tetracycline antibiotic residues and 0.6% presence of residues of antibiotic from both families, that is of beta-lactam antibiotics and tetracyclines found in the same sample of raw milk, this indicates that there is a high level of milk contaminated with antibiotic residues that is easily marketed to the population of this city .

ÍNDICE GENERAL

1.	CUERPO DEL TRABAJO ACADEMICO	14
1.1	INTRODUCCIÓN	14
1.3	DELIMITACIÓN.....	16
1.3.1	Temporal.....	16
1.3.2	Espacial.....	16
1.3.3	Ubicación	17
1.3.4	Académica.....	17
1.4	EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.5	OBJETIVOS.....	18
1.5.1	Objetivo General.....	18
1.5.2	Objetivos Específicos.....	18
1.6	HIPOTESIS	18
1.6.1	Hipótesis alternativa.....	18
1.6.2	Hipótesis nula.....	18
1.7	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	19
2.	REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL.....	20
2.1	Generalidades de la leche de vaca.....	20
2.1.1	Características sensoriales de la leche	20
2.1.2	Composición de la leche de vaca	21
2.1.3	Leche contaminada	21
2.1.4	Clasificación de la leche	22
2.1.5	Produccion de leche de vacunos	22
2.2	Antibióticos	23
2.2.1	Betalactámicos	26
2.2.2	Tetraciclina	28
2.3	Tiempo de retiro	29
2.4	Residuos de antibióticos en la leche.....	30
2.5	Uso correcto de los antibióticos	32
2.6	Métodos de detección de residuos de antibiótico en le leche.....	33
2.6.1	Métodos de cribado.....	33
2.6.2	Métodos de confirmación	34

2.7	Kit 2in1 Bet-Lactams + Tetracyclines test®.....	34
2.7.1	Componentes del kit	35
2.7.2	Sensibilidad: límites de detección (ng/ml-ppb) del kit 2IN1	35
2.7.3	Interpretación de prueba	35
2.8	RESUMEN DEL ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA	36
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1	Materiales	37
3.2	Métodos	39
3.3	Diseño estadístico.....	39
3.4	Población y muestra	40
3.4.1	Selección y tamaño de la muestra.....	40
3.4.2	Obtención de muestras	40
3.5	Preparación de la prueba	40
3.6	Procedimiento a realizar para detectar residuos de antibióticos en la leche cruda.	40
3.7	Interpretación de resultados	41
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1	Conclusiones	48
5.2	Recomendaciones.....	48
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	49
7.	ANEXOS O APENDICES	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos Meteorológicos	16
Tabla 2. Material Experimental	16
Tabla 3. Composición de la leche de vaca.....	21
Tabla 4. Principales productores de leche.....	23
Tabla 5. Tipos de antimicrobianos usados en animales productores de alimentos.....	25
Tabla 6. Mecanismo de acción de los antibióticos	26
Tabla 7. Antibióticos pertenecientes a las familias de betalactámicos.	27
Tabla 8. Antibióticos pertenecientes a las tetraciclinas	28
Tabla 9. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en la leche de vaca. (betalactámicos y tetraciclinas).....	30
Tabla 10. Sensibilidad: límites de detección (ng/ml-ppb)	35
Tabla 11. Materiales de oficina.....	37
Tabla 12. Materiales para la toma y transporte de muestras.....	38
Tabla 13. Materiales biológicos.....	38
Tabla 14. Materiales de laboratorio	38
Tabla 15. Materiales de laboratorio	39
Tabla 16. Recursos Humanos	39
Tabla 17. Resultados de la investigación.....	42
Tabla 18. Resultados de muestras de cada mercado	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de interpretación.	41
Figura 2. Número de muestras de leche cruda analizadas de los mercados de la ciudad de Cuenca.....	43
Figura 3. Porcentajes de muestras obtenidas por mercado.	43
Figura 4. Representación grafica del resultado de cada muestra de los mercados estudiados. ...	44
Figura 5. Resultados de las muestras analizadas	45
Figura 6. Porcentajes de las muestras analizadas.....	45
Figura 7. Resultados de positivos de las muestras analizadas	46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μL : microlitros

μm : microgramos

ng: nanogramo

ml: miligramo

ppb: partes por billón

β : beta

1. CUERPO DEL TRABAJO ACADEMICO

1.1 INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son muy utilizados en la ganadería especialmente los antibacterianos para el tratamiento o prevención de enfermedades así como promotores de crecimiento, en muchas ocasiones sin la supervisión de un médico Veterinario ya que son de fácil acceso y de venta libre al público, esto lleva al uso inadecuado de los mismos ocasionando consecuencias en la salud pública como reacciones alérgicas, resistencia bacteriana tanto en los animales que son tratados de forma irresponsable con estos medicamentos como en las personas que consumen los productos de origen animal sin que sea haya respetado el tiempo de retiro del fármaco, otro problema que ocasionan son en la industria láctea por ejemplo: “la penicilina interfiere en la transformación de la leche en otros derivados, su acción inhibitoria sobre bacterias coagulantes de la leche impide la elaboración de quesos” (Sumano y Ocampo, 2007, p. 175).

En nuestro medio los antibióticos más usados en animales mayores, en la ganadería lechera son la familia de betalactámicos especialmente las penicilinas y la familia de tetraciclinas, una de las formas de eliminación de los fármacos mencionados es por la glándula mamaria por lo cual se pueden encontrar residuos de estos en la leche, por el escaso control que existe esta es comercializada libremente.

La leche de vaca es considerada uno de los alimentos de mayor riesgo en la salud pública tanto por ser un alimento básico de amplio consumo, como por su susceptibilidad para transmitir enfermedades debido a la presencia de microorganismos y contaminantes como medicamentos veterinarios, hormonas, plaguicidas y antibióticos. (Mattar, Calderón , Sotelo, Sierra, y Tordecilla , 2008)

La excreción de los medicamentos dependerá de las propiedades hemodinámicas del individuo, así mismo las características de excreción serán diferentes en los animales enfermos, e incluso entre individuos sanos de la misma especie. En orden de importancia las vías de excreción de los medicamentos son: renal, biliar, pulmonar, mamaria, salival, a través de la piel, a través de las secreciones gastrointestinales y genital. La persistencia de antibióticos, antiparasitarios y otros fármacos en la leche del ganado bovino ha suscitado muchas preocupaciones por lo que pudiera significar en términos de salud pública. De manera ideal se procura detectar actividad antibiótica en la leche y decomisar ésta si excede cierto valor. (Sumano y Ocampo, 2007, pp. 92-96)

El presente trabajo se realizó para determinar la presencia de residuos de antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en la leche cruda de vaca comercializada.

1.2 PROBLEMA

Según la FAO se calcula que cerca de 150 millones de familias es decir 750 millones de personas en todo el mundo se dedica a la producción de leche. En la mayoría de los países en desarrollo la leche es producida por pequeños agricultores (Torsten y Joachim, 2010, p.6). Los antibióticos son muy utilizados en esta producción para el tratamiento de enfermedades que presente los animales y como métodos profilácticos, la compra y la venta de éstos se hace sin ningún control, el consumo de leche contaminada con residuos de antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial, de ahí la importancia del control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche ya que producen una resistencia a estos antibióticos en las personas y animales y afectan la producción de derivados de la leche. Los antibióticos más utilizados en la ganadería son los betalactámicos y las tetraciclinas que son muy conocidos por los ganaderos, en nuestro medio existe un limitado control para determinar la presencia de residuos de antibióticos

en la leche cruda comercializada en los mercados ya que los métodos de detección rápidos son costosos, por lo cual este producto es expandido libremente en toda la ciudad.

1.3 DELIMITACIÓN

1.3.1 Temporal

El proceso investigativo tuvo una duración de 400 horas distribuidas en el proceso experimental y escrito.

1.3.2 Espacial

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio GaiaLabs en el cantón Cuenca, Provincia del Azuay-ECUADOR

Tabla 1. *Datos Meteorológicos*

Descripción	Denominación
Ubicación	Cuenca
Altitud	2.560 msnm
Longitud	67.71 km ²
Latitud	-2.9005500
Temperatura	14.7°
Humedad	75%

Tabla 2. *Material Experimental*

Denominación	Descripción
Producto	Leche
Procedencia	Principales mercados de Cuenca
Número de muestras	150

1.3.3 Ubicación

Esta investigación se realizó con muestras de leche provenientes de los principales mercados de la ciudad de Cuenca: mercado 10 de Agosto, mercado 9 de Octubre, mercado El Arenal (feria libre), mercado 27 de Febrero, mercado 3 de Noviembre, mercado 12 de Abril. El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de alimentos, calidad ambiental y afines GaiaLabs en el cantón Cuenca de la provincia del Azuay.

1.3.4 Académica

La investigación ayudo a poner en práctica los conocimientos adquiridos en las cátedras Calidad de la Leche y Farmacología.

1.4 EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA

La leche cruda pertenece al sector alimentario, representa una materia prima cuyo consumo puede ser directo o a partir de la cual se elaboran una gran cantidad de derivados.

La comercialización de leche cruda a pequeña escala sin un control previo se ha convertido en un problema de salud pública, ya que ésta es expandida directamente al consumidor pudiendo contener residuos de antibióticos y otros fármacos que afectan la salud de las personas o el procesamiento de subproductos como el queso, el yogurt, etc. La falta de información a ganaderos sobre el uso correcto de los antibióticos, lo perjudicial que puede ser la venta de leche sin respetar el tiempo de retiro del medicamento y la ausencia de conocimiento sobre las pruebas utilizadas para la detección de antibióticos en este producto contribuye a su expendio irresponsable.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

Determinar la presencia de antibióticos de la familia de betalactámicos y tetraciclinas de la leche cruda comercializada en los principales mercados de la ciudad Cuenca-Ecuador.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Recolectar muestras de leche cruda comercializada en los principales mercados de Cuenca.
- Identificar que antibiótico es el más frecuente entre tetraciclinas y betalactámicos en la leche cruda expendida en los mercados de Cuenca.
- Observar de forma cualitativa la presencia de residuos de antibiótico en la leche.

1.6 HIPOTESIS

1.6.1 Hipótesis alternativa

Ha: Las muestras de leche cruda analizadas presentan residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas.

1.6.2 Hipótesis nula

Ho: Las muestras de leche cruda analizadas no presentan residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas.

1.7 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La realización del trabajo experimental está enfocada en presentar resultados confiables sobre la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en la leche cruda que se comercializa en la ciudad de Cuenca- Ecuador.

Estos antibióticos son ampliamente utilizados en la ganadería lechera para tratar distintas enfermedades que afecta la producción, la mayoría de estos se excretan por la leche, contaminándola fácilmente, dificultando la elaboración de subproductos lácteos, disminuyendo su calidad y hasta convirtiéndose en un problema de salud pública.

En países del continente americano ya se han realizado investigaciones de detección de antibióticos en la leche dando positivo a muchas muestras estudiadas, en el continente europeo no solo se han realizado detección de antibióticos en la leche de vaca, sino que también en la leche de cabra y oveja

Además, esta investigación proporciona información científica para consultas destinadas al área de la Calidad de la Leche.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1 Generalidades de la leche de vaca

La leche nutriente que ingerimos (natural o artificialmente) desde el nacimiento; pero se hace insuficiente, al tener nuestro organismo otras necesidades; no obstante, sigue siendo uno de los alimentos básicos. La composición de la leche de vaca puede variar dependiendo de la raza, aditivos y reducciones durante el proceso industrial hasta su llegada al consumidor. (García, Martín, y Villaroya, 2010, p.1). La utilización de la leche como alimento de los humanos se remonta a las primeras edades de la civilización, caracterizada por la domesticación de los animales, esta es uno de los alimentos más económicos para el hombre. Por ejemplo, la leche suministra proteínas de alto valor biológico que son más baratas que las de la carne, huevos y pescado. (Charles, 1998, pp.563-564). “La vaca produce leche después del parto para la alimentación de sus crías, la cantidad producida depende de varios factores como la raza, alimentación, salud y el buen manejo” (Buendía, 2016, p.23). La leche de vaca es un alimento básico para la alimentación humana de todas las edades. Su procesamiento industrial ha permitido el acceso generalizado a su consumo por parte de la población, desde el punto de vista de su composición, la leche es un alimento completo y equilibrado, que proporciona un elevado contenido de nutrientes en relación con su contenido calórico. (Fernandez, et al, 2015, p.92)

2.1.1 Características sensoriales de la leche

Las características organolépticas de la leche constituyen un atributo de calidad fundamental en cualquier producto alimenticio. La presencia de sabores, olores, colores o texturas atípicas en la leche limitan seriamente su adecuación al uso. La leche es un líquido blanco opaco, este aspecto característico se manifiesta cuando toda la caseína se encuentra en forma micelar cuando disminuye la proporción de caseína la leche toma un aspecto grisáceo como el caso del calostro de

los primeros días, cuando la leche es rica en grasa su tonalidad es más amarillenta debido al caroteno que contiene la grasa, la leche pobre en grasa o descremada tiene un tono blanco-azulado. El olor característico de la leche es puro y fresco debido a la presencia de grasa la leche conserva con gran facilidad los olores del ambiente o del recipiente en el que se guarda. El sabor característico es puro, fresco, ligeramente dulce por la lactosa que contiene, rico y agradable principalmente debido a la materia grasa. (Calvet, et al, 2016)

2.1.2 Composición de la leche de vaca

Tabla 3. *Composición de la leche de vaca*

Componentes Mayoritarios	Composición aprox.
Grasa	3.75%
Líquidos	0.05
Proteínas	3.38%
Lactosa	5.00%
Sales (minerales)	0.90%
Agua	87.00%

Fuente: (Buendía, 2016)

2.1.3 Leche contaminada

La leche contaminada es aquella que contiene microorganismos patógenos y otros, en cantidades inapceptables, cuerpos extraños, hormonas, así como plaguicidas, metales pesados, bacteriostáticos, bacteriocidas, o cualquier sustancia tóxica en cantidad que rebase los límites máximos establecidos por las organizaciones de salud, la leche es un alimento que requiere de estricto control higiénico-sanitario durante el proceso de producción animal, almacenamiento, elaboración, distribución y consumo del mismo. (Avila y Gutiérrez, 2010, p.148)

2.1.4 Clasificación de la leche

Según el contenido de grasa la leche se clasifica en: leche entera aquella que presenta el mayor contenido de grasa láctea, con un mínimo de 3.2% su contenido calorico es mayor en relación al de la leche semidescremada o desnatada, leche semidesnatada es a la cual se le ha extraído parcialmente el contenido de grasa, por tanto su sabor y valor nutritivo disminuyen por la pérdida de vitaminas liposolubles como las vitaminas A y D, la leche desnatada o descremada contiene todos los nutrientes de la leche entera pero sin contenido de grasa. Según el proceso de conservación la leche puede ser leche condensada que esta es evaporada y se añade azúcar en proporción al 50% de su peso es la leche de mayor tiempo de conservación, leche esterilizada se produce mediante el aumento de la temperatura hasta los 110° C, por un periodo de 20 minutos, leche evaporada esta se obtiene al evaporar el contenido de agua de la leche que queda reducida al 50% del volumen original, leche fermentada es el resultado de una fermentación no tóxica la cual tiene diferentes sabores y colores dependiendo de la bacteria responsable de la fermentación, leche pasteurizada es tipo de leche ha sido sometida a pasteurización este proceso se realiza con diferentes tiempos y temperaturas como 63°C durante 30 minutos, entre 72 y 75°C durante 15 segundos o bien instantánea a 95°C y finalmente la leche UHT esta es sometida a 140°C durante 2 segundos y enfriada rápidamente. (Buendía, 2016, pp. 35-37)

2.1.5 Producción de leche de vacunos

A nivel mundial sobresalen aquellos países que le dan gran importancia a la producción de leche y que por tanto incentivan esta producción. En países en desarrollo casi el 80% de la producción lechera se origina en sistemas agrícolas a pequeña escala, esta producción se basa en un nivel bajo de insumos por lo cual es muy reducida la producción por animal lechero. (Koeslag, 2015, p.12)

Tabla 4. *Principales productores de leche*

Paises	Producción
Estados Unidos	91,3 mil millones de kg
India	60.6 mil millones de kg
China	39,7 mil millones de kg
Brasil	34,3 mil millones de kg
Alemania	31,1 mil millones de kg
Rusia	30,3 mil millones de kg
Francia	23,7 mil millones de kg
Nueva Zelanda	18,9 mil millones de kg
Turquia	16,7 mil millones de kg
Reino Unido	13,9 mil millones de kg

Fuente: (Eurovacas, 2017)

2.2 Antibióticos

“Un antibiótico se define como una sustancia producida por diferentes microorganismos que suprimen la proliferación o destruyen otros gérmenes. Un quimioterápico es una sustancia sintética que suprime o destruye los gérmenes” (Restrepo, 2011, p.51).

“Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva” (Seiga y Vignoli, 2006, p.631).

“Estos fármacos son esenciales para combatir enfermedades infecciosas esto ha permitido bajar los porcentajes de morbilidad asociada a estas patologías en forma significativa, la resistencia a antibióticos plantea una grave amenaza para la salud mundial, existen varios mecanismos para que las bacterias puedan crear resistencia y también transmitirla” (Alvo, Téllez, Sedano, y Fica, 2015, p.137).

Estamos usando los antibióticos de manera frívola. A los antibióticos se les está usando para enfermedades que no son bacterianas en lo absoluto, se usa con los animales domésticos y las plantas, se usa para rociar nuestros árboles de manzana y controlar las enfermedades bacterianas esto supone un desastre inminente, en la actualidad el uso de antibióticos se ha masificado llegando al exceso, esto trae consecuencias catastróficas en los individuos y en las sociedades, dificulta el manejo de procesos infecciosos que hasta hace pocos años respondían a antibióticos de primera línea, incrementando la mortalidad y los costos sanitarios de un país. (Quizpe, et al, 2014, pp. 21-22)

Los antibióticos se clasifican según su actividad antiinfecciosa en bactericidas aquellos que producen la muerte del agente infeccioso y bacteriostático aquellos que inhiben el crecimiento y desarrollo del agente infeccioso, también se clasifican según estructura química y su mecanismo de acción.

Tabla 5. *Tipos de antimicrobianos usados en animales productores de alimentos*

Tipo de uso	Objetivo	Vía de administración	Administración	Animales enfermos
Terapéutico	Terapia	Inyección parenteral, alimentos, agua	Individual, grupos	Individuos enfermos, a grupos pueden incluirse algunos animales que no están enfermos o están en estado subclínico
Metafiláctico	Profilaxis enfermedad terapia	Inyección parenteral, alimentos, agua	Grupos	Algunos
Profiláctico	Prevención enfermedad	Alimento	Grupo	Ninguno evidente, aunque algunos animales pueden estar en estado subclínico
Subterapéutico	Promoción de crecimiento	Alimento	Grupo	Ninguno
	Eficacia alimentaria	Alimento	Grupo	Ninguno
	Profilaxis enfermedad	Alimento	Grupo	Ninguno

Fuente: (Anadón y Tamargo, 2007)

Tabla 6. *Mecanismo de acción de los antibióticos*

Mecanismo de acción	Antibióticos
Inhibición de la síntesis de la pared celular	β -lactámicos Vancomicina Fosfomicina Bacitracina
Inhibición de la síntesis proteica	Amino glucósidos Tetraciclinas Macrólidos Fenicoles, anfenicoles Lincosamidas Espectinomicina
Alteración de la pared celular	Polipeptídicos
Inhibición de la síntesis o funcionalidad de los ácidos nucleicos.	Interfiriendo en la replicación: fluoroquinolonas Impidiendo la transcripción: rifamicinas Inhibiendo la síntesis o funcionalidad de los ácidos nucleicos: sulfamidas, trimetropim.

Fuente: (Larrea y Boggio, 2007)

2.2.1 Betalactámicos

Como antibióticos β -lactámicos se conoce al grupo de antimicrobianos que contienen un anillo β -lactámicos en su estructura básica como las penicilinas y cefalosporinas. A ellos se agregan el ácido clavulánico, y el sulbactam, de pobre acción antibacteriana propia, pero con capacidad para potenciar la actividad de las penicilinas y cefalosporinas al inhibir competitivamente las enzimas bacterianas β -lactamasas. Todos los antibióticos betalactámicos interfieren con la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Después de la interacción con los puntos de unión en la bacteria, denominadas proteínas ligantes de penicilina, inhiben la enzima de transpeptidación, impidiendo el enlazamiento de los péptidos con las cadenas de polisacáridos adyacentes,

necesarios para la formación de la pared microbiana. La importancia de la pared en los gérmenes reside en la necesidad de proteger la integridad microbiana frente a las diferencias de osmolaridad que existen entre el medio externo y el interior de la bacteria. Las penicilinas al interferir con la formación de la pared, facilitan la lisis del microorganismo. El efecto bactericida final es la inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas en la pared celular, esto conduce a lisis de la bacteria. Las diferencias observadas respecto de los gérmenes gramnegativos se relacionan con el hecho de que estas bacterias tienen una mayor capacidad de síntesis de productos, lo que las hace altamente adaptables y no dependientes de una fuerte pared protectora como las grampositivas. (Perez R. , 2010)

Tabla 7. *Antibióticos pertenecientes a las familias de betalactámicos.*

Penicilinas	Cefalosporinas
Amoxicilina	Cafacetrilo
Ampicilina	Cefapirina
Bencilpenicilina	Cefalexina
Cloxacilina	Cefalonium
Dicloxacilina	Cefalozina
Oxacilina	Cefoperazona
Nafcilina	Cefoxazol
	Ceftiofur
	Cefquinoma

Fuente: (Calvet, et al. 2016)

2.2.2 Tetraciclina

“Las tetraciclinas son sustancias anfotéricas cristalinas ligeramente solubles en agua a pH 7. Están disponibles para el empleo, principalmente como clorhidrato, en una amplia variedad de formas posológicas para vía oral y parenteral. Las tetraciclinas alcanzan concentraciones en leche aproximadas a las de la sangre” (Prescott, Baggot, y Walker, 2002, pp. 243-251). “Las tetraciclinas, naturales o semisintéticas, actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas. Son bacteriostáticas, con amplio espectro de actividad. Estigmatizadas tiempo atrás por la frecuencia de microorganismos resistentes, actualmente han renacido al recuperar sensibilidad e incorporarse nuevos y más activos componentes” (Perez E. , 2010, p.122)

“Por lo general las tetraciclinas actúan como antibióticos dependientes del tiempo. Inhiben la síntesis proteica. Son considerados antibióticos bacteriostáticos, pero este término tiene mayor importancia histórica que valor descriptivo de sus acciones antibacterianas” (Plumb, 2017, p.1191) Inhiben la subunidad ribosomal 50s, la resistencia es por la salida del antibiótico del medio intracelular a través de bombas de flujo, su espectro incluye bacterias Gram positivas y Gram negativas, algunos anaerobios y bacterias productoras de enfermedades poco comunes, Bruselas, Rickettsias, Borrelias, Clamidas, etc. (Quizpe, et al, 2014, p.39)

Tabla 8. *Antibióticos pertenecientes a las tetraciclinas*

Tetraciclinas
Clortetraciclina
Doxiclina
Oxitetraciclina
Tetraciclina
Minociclina

Fuente: (Sumano y Ocampo, 2007)

2.3 Tiempo de retiro

El periodo de retiro es necesario para darle tiempo que el animal elimine el medicamento y sus metabolitos del organismo. Cuando no los elimina, los residuos pueden causar un efecto perjudicial en los consumidores de varias maneras, como, por ejemplo: efectos adversos toxicológicos crónicos; efectos farmacológicos agudos, efectos adversos en la microflora del tubo digestivo, reacciones alérgicas, resistencia a los antimicrobianos entre otros. Los residuos de medicamentos, además del riesgo que representan para la salud de los consumidores, también pueden afectar las exportaciones de productos, el comercio internacional, la imagen del país y la competitividad. (SENASA, 2013)

En condiciones habituales los tiempos de retiro se establecen con base en tres criterios: peligro que genera el residuo para la salud del ser humano, consideraciones químico analíticas, órgano que ha de analizarse y vía de administración. A pesar de que la vida media se postula como un elemento de gran utilidad para estimar el tiempo de retiro de un fármaco, es importante señalar que existen notables variaciones individuales en la farmacocinética de un medicamento. Los tiempos de retiro para el consumo de la leche de vaca en betalactámicos y tetraciclinas son para la penicilina G sódica y potásica se requiere 24 horas de retiro para dar a los becerros y de cinco a siete días si la leche es para consumo humano, para la oxacilina y nafcilina el tiempo de retiro es de cuatro ordeñas, para la cloxacilina y dicloxacilina el tiempo e retiro es de 48 horas, para la ampicilina en el caso de ser un preparado intramamario es de 48 horas para la leche, la amoxicilina en el caso de la presentación inyectable tiene un periodo de retiro de 96 horas para el consumo de la leche, la infusión intramamaria es de 60 hora para la leche. Las cefalosporinas se distribuyen hasta la leche, pero cuando se utilizan las dosis recomendadas no se encuentran residuos o son tan bajos que no rebasan la concentración máxima permitida el ceftiofur tiene cero días de retiro otras

cefalosporinas de tercera generación tiene un periodo de retiro de una o dos ordeñas. En el caso de las tetraciclinas el tiempo de retiro va de cinco a diez días, de la oxitetraciclina el retiro de la ordeña debe ser por lo menos dos días. (Sumano y Ocampo, 2007, pp 101-247)

2.4 Residuos de antibióticos en la leche

Según la resolución N° 0217 en el artículo 27 de la utilización de los productos de uso veterinario de Agrocalidad la leche cruda no debe contener residuos de medicina veterinaria por sobre los niveles permitidos del Codex Alimentarius. (Agrocalidad, 2012)

Tabla 9. *Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en la leche de vaca.*
(betalactámicos y tetraciclinas)

Antimicrobiano	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) / ($\mu\text{g}/\text{l}$) en la leche
Amoxicilina	4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Bencilpenicilina/ Bencilpenicilina procaínica	4 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Ceftiofur	100 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Clortetraciclina Oxitetraciclina Tetraciclina	100 ($\mu\text{g}/\text{l}$)

Fuente: (Codex Alimentarius, 2012)

En encuestas realizadas por la FDA (Food and Drug Administration) que la fuente principal de residuos es el mal uso de los antibióticos en el tratamiento de la mastitis. (como se cita en Castillo y Ortega, 2015).

La incidencia de enfermedades en las vacas lecheras requiere la utilización de antibióticos para su tratamiento, son muchos los antibióticos que se usan y que están ampliamente difundidos en la

ganadería lechera, constituyéndose en los principales contaminantes de la leche, a la vez que la hace inapto para el consumo humano. (Llanos , 2012, p.36). La cantidad de antibióticos que llegan a la leche va a depender de la composición y vehículo del medicamento, así como de la dosis, forma de aplicación de este, la producción de leche del animal, tipo y grado de afección mamaria, y tiempo que media entre el tratamiento y el ordeño. (Magariños, 2001)

Se identifican por varios métodos la presencia de restos de antibióticos o de sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano en la leche producida, este valor es excluyente en la producción de leche en la hacienda es decir si el resultado es positivo el producto no es apto para su comercialización y venta. (Calvet, et al, 2016, p. 54). Los antibióticos no se destruyen por el calor por lo que se puede encontrar en la leche y en la leche en polvo, estos compuestos hacen que la leche no pueda utilizarse para algunas fabricaciones pues impide el desarrollo de microbios útiles. (Luquet , Keilling, y Wilde, 1991, p. 211). Un problema grave con los residuos de antibióticos en la leche cruda consiste en la inhibición de la microbiota láctica natural o sembrada (inoculada) en forma de cultivo láctico en la leche de proceso para la obtención de derivados lácticos fermentados. (Villegas y Santos, 2013, p. 72). La administración ya sea oral, intramuscular o intravenosa, de antibióticos tiene menos importancia, desde el punto de vista de higiene de leche, que la aplicación por vía intramamaria. Esta última es la más usada para el tratamiento de la mastitis, dependiendo la cantidad de antibióticos eliminada por la leche del tipo de preparado, dosis, intervalos entre tratamiento y ordeño, número de ordeños, producción de leche y factores individuales. Cuando se introduce un antibiótico en la ubre, éste se distribuye en el tejido mamario por los conductos galactóforos y es transferido al torrente sanguíneo por un mecanismo fisicoquímico que depende del valor de pKa (valor de disociación) del preparado, valor de pH del plasma sanguíneo, proteína ligada al antibiótico y valor de pH de la leche. Debido a esto, la

reabsorción del producto es muy variable de acuerdo al preparado y al animal. Existe una correlación negativa entre el tiempo de eliminación del antibiótico y el volumen de leche producido por el animal. Los animales de baja producción demoran en excretar el preparado, principalmente por la mala absorción y secreción de los cuartos afectados. El ordeño frecuente aumenta el efecto de dilución y por lo tanto acorta el tiempo de eliminación del antibiótico. (Magariños, 2000, p. 54-56). Se debe considerar que el fármaco llega a la leche no solo desde la sangre tras su administración enteral o parenteral, sino que también en el caso de la mastitis se puede aplicar tópicamente, debido a que los antibióticos por vía intramamaria son de fácil aplicación, generalmente baratos y en muchas ocasiones se aplican sin consultar al veterinario se han hecho populares en las explotaciones lecheras. (Larrea y Boggio, 2007, p.40).

2.5 Uso correcto de los antibióticos

Desde los años sesenta, los antibióticos han sido utilizados en la ganadería como promotores del crecimiento, en profilaxis y para el tratamiento de infecciones. El uso indiscriminado de antimicrobianos en la ganadería, con cifras de consumo que doblan las de uso humano, ha dado lugar a la emergencia de patógenos resistentes a antibióticos en la producción alimentaria. Debido a la exposición subinhibitoria, que lleva a una presión selectiva, las bacterias pueden desarrollar resistencias por mutaciones cromosómicas y se puede dar la diseminación mediante transferencia horizontal. (Casana, 2017, p.2). “Los microorganismos resistentes han aumentado dramática y exponencialmente en las últimas décadas como consecuencia del uso y abuso de antibióticos. La resistencia antimicrobiana ya no es solamente un dilema médico, sino una amenaza global que requiere, para su control, una acción coordinada de muchos y diferentes actores e instituciones”. (Camou, Zunino, y Hortal, 2017, p 278)

Para una terapia racional con antibacterianos, es importante tener un buen diagnóstico, conocer sobre la resistencia o susceptibilidad del microorganismo, sobre las reacciones adversas y toxicidad del medicamento y los costos del mismo. Los antibacterianos solo se deben utilizar como profilácticos en cirugías con riesgos de contaminación, para evitar infecciones conocidas, para evitar infecciones secundarias o cuando se trasladan animales a zonas endémicas. (Restrepo, 2011, p. 53)

El uso no racional e incorrecto de medicamentos, y concretamente de antimicrobianos, conlleva unas consecuencias que son, en la mayoría de los casos previsibles y por tanto evitables. Las consecuencias negativas son: disminución de la eficacia terapéutica, aparición de resistencias bacterianas, aumento de la incidencia de reacciones adversas, aparición de residuos en productos de origen animal, sobreinfecciones, mantenimiento de portadores inaparentes con procesos subclínicos, encarecimiento de los tratamientos. (Larrea y Boggio, 2007, pp. 14-15)

2.6 Métodos de detección de residuos de antibiótico en la leche

La presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en la leche se puede detectar por métodos de cribado que detectan la presencia de una sustancia o tipo de sustancia y por métodos de confirmación que permiten identificar y en su caso cuantificar de manera inequívoca la sustancia. (Calvet, et al; 2016, p.441).

2.6.1 Métodos de cribado

Existen muchos kits comerciales para la detección de residuos de antibióticos y de otros inhibidores de la leche, los métodos rápidos de cribado son test inmuno enzimáticos o basados en receptores proteicos y proporcionan resultados en minutos, las ventajas son: fáciles de usar, más específicos, detectan familias de compuestos, rápidos (máximo 10 minutos) el inconveniente es su costo elevado. Los métodos lentos de cribado son los primeros métodos de detección de residuos

de antibióticos desarrollados para alimentos fueron de tipo microbiológico y siguen siendo ampliamente utilizados, las ventajas de los métodos de cribado microbiológico son: espectro razonablemente amplio, sencillez de uso requiere poca cantidad de muestra, no necesita equipamiento sofisticado, adaptables para analizar un gran número de muestras, bajo costo, resultados relativamente rápidos. Algunos inconvenientes son simplemente cualitativos, no son muy específicos necesita tiempos largos de incubación mayores a 2 horas, los resultados positivos necesitan confirmación. (Calvet, et al, 2016, p.p 441-445)

2.6.2 Métodos de confirmación

Son métodos físicos químicos que permiten identificar y cuantificar de manera inequívoca la sustancia los más utilizados son técnicas de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), las ventajas de estos métodos son: la identificación precisa e inequívoca, cuantificación hasta niveles muy bajos, y buena sensibilidad. Los inconvenientes que presentan son que exige técnicas complejas y lentas para la preparación de muestras, análisis de bajo número de muestras, costo elevado, requiere equipos complejos, requiere personal de laboratorio calificado. (Calvet, et al, 2016, p.p 445-446).

2.7 Kit 2in1 Bet-Lactams + Tetracyclines test®

Este kit se utiliza para la detección y discriminación de β -lactámicos y Tetraciclinas en la leche basada en la tecnología de inmunocromatografía de oro coloidal es una prueba rápida que tarda alrededor de 8 minutos. Tiene una vida útil de 12 meses.

Se puede aplicar en leche cruda, leche pasteurizada, y leche entera en polvo de vaca, búfalo, oveja, cabra y yegua.

2.7.1 Componentes del kit

- 12 tubos de ensayo, y cada tubo con una tira de 8 micropocillos de reactivo y 8 tiras de prueba.
- Una pipeta de 200 μ L, 100 piezas de punta de pipeta.
- Estándar positivo y estándar negativo.
- Un manual de instrucciones.

2.7.2 Sensibilidad: límites de detección (ng/ml-ppb) del kit 2IN1

Tabla 10. *Sensibilidad: límites de detección (ng/ml-ppb)*

Familia	Nombre del antibiótico	Límites de detección	Nombre del antibiótico	Límites de detección
Betalactámicos	Penicilina G	1.5-2	Cefapirina	15-18
	Ampicilina	3-4	Cefalotina	6-8
	Amoxicilina	3-4	Cefalozina	40-50
	Oxacilina	5-7	Cefaperazona	4-6
	Cloxacilina	6-8	Cefquinoma	12-18
	Dicloxacilina	10-20	Ceftiofur	80-100
	Nafcilina	20-30	Cefacetil	25-30
	-	-	cefalexina	500-600
Tetraciclinas	Doxiciclina	30-50	Oxitetraciclina	30-50
	Clortetraciclina	30-50	Tetraciclina	30-50

2.7.3 Interpretación de prueba

Los resultados de este kit se pueden realizar por medio de un lector o por simple visualización con la ayuda de un diagrama (fig. 1) verificando la línea de control.

2.8 RESUMEN DEL ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA

La detección de antibióticos en la leche va tomando más seriedad en los últimos tiempos ya que en la actualidad no solo se realiza la detección de antibióticos en la leche cruda también se analizan en la leche en polvo, pasteurizada, en derivados de la leche como el queso, yogurt, etc. Además, en continentes como Europa no solo detectan antibióticos en la leche de vaca sino también la de las ovejas y cabras.

En nuestro país a parte de estudios de detección de antibióticos se ha realizado también la validación de un método artesanal propuesto por José Dubach para la detección de diferentes antibióticos teniendo como resultado que este método es aceptable para detectar antibióticos (Penicilinas, Cefalosporina, Aminoglucósidos, Oxitetraciclinas) suministrados vía intramuscular hasta el séptimo día luego de finalizado el tratamiento. (León, 2013)

A nivel local se han realizado investigaciones en la detección de antibióticos en la leche cruda dando como resultados que los betalactámicos son los antibióticos más presentes en la leche como es en el caso de un estudio realizado en el cantón Biblián de la provincia del Cañar de 88 muestras de leche cruda tomadas de 22 fincas se obtuvieron 17 resultados positivos a residuos de antibióticos lo que equivale a un 19% del total de las muestras de leche cruda de las cuales 11 muestras presentaron trazas de betalactámicos. (Cazar y Ortiz, 2014). En el cantón Naranjal de la provincia del Guayas se en una investigación de detección de antibióticos de la leche cruda en diferentes expendios se obtuvo un 19,4% de muestras totales positivas a residuos de antibiótico de las cuales un 78,6% fueron positivas únicamente a betalactámicos, 21,4% positivas a Betalactámicos y Sulfonamidas y un 0% a Tetraciclinas. (Aroca , 2016). En países vecinos como Perú se analizaron 40 muestras de leche cruda comercializada en mercados del distrito Callao, entre enero y marzo del 2009 empleando el método presuntivo para antibióticos betalactámicos y tetraciclinas de IDEX

Laboratories, como resultado se detectaron residuos de antibiótico betalactámicos en 16 de las 40 muestras estudiadas, lo que equivale al 40% del total de las muestras de leche cruda, y no se detectó residuos de tetraciclinas. (Guerrero, et al, 2009).

En México mediante un muestreo probalístico, se analizaron 129 muestras con el kit comercial Delvotest SP para detectar residuos de antibióticos en la leche comercializada en la región de Tierra Caliente del Estado de Guerrero, de las muestras analizadas 24 resultaron positivas a la presencia de antibióticos lo que representa el 18.60% del total de pruebas analizadas. (Camacho, et al, 2010)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Tabla 11. *Materiales de oficina*

Descripción	Unidad	Cantidad
Hojas de papel bond	Resma	1
Esferos	Unidad	2
Marcadores permanente punta fina	Unidad	2
Carpeta	Unidad	1
Grapadora	Unidad	1
Grapas	Caja	1
Laptop	Unidad	1
Cámara digital	Unidad	1

Tabla 12. *Materiales para la toma y transporte de muestras*

Descripción	Unidad	Cantidad
Guantes de látex	Caja	1
Envases de plástico	Unidad	30
Cooler	Unidad	1
Hielo	Bolsas	15

Tabla 13. *Materiales biológicos*

Descripción	Cantidad
Leche cruda	150 muestras

Tabla 14. *Materiales de laboratorio*

Descripción	Unidad	Cantidad
Test 2 in 1 Beta-Lactams + Tetracyclines	Kit	2
Incubadora	Unidad	1
Guantes de látex	Caja	1
Mascarillas	Caja	1
Gorros quirúrgicos descartables	Caja	1
Mandil	Unidad	1
Refrigerador	Unidad	1

Tabla 15. *Materiales de laboratorio*

Descripción	Unidad	Cantidad
Agua destilada	Litro	1/2
Alcohol	500ml	1

Tabla 16. *Recursos Humanos*

Nombre	Descripción
Dr. Patricio Garnica Marquina	Tutor de la investigación
Eulalia Noemi Caracundo Guamán	Investigadora responsable

3.2 Métodos

El enfoque metodológico de este trabajo investigativo fue investigación deductiva. El estudio experimental se realizó con 150 muestras de leche cruda comercializadas en los mercados de la ciudad de Cuenca.

3.3 Diseño estadístico

Para el análisis estadístico de esta investigación se utilizó el programa Microsoft Excel 2016. Se aplicó la estadística Descriptiva o inductiva que trata de la ordenación y clasificación de datos obtenidos de las observaciones mediante la construcción de tablas y gráficos.

Las representaciones graficas son la primera forma de describir los datos de una muestra, en esta investigación se ha realizado mediante diagramas de barras que es la forma intuitiva de realizar una representación gráfica que consiste en un gráfico X, Y en el que para cada valor observado X, se indica mediante Y con que frecuencia o porcentaje se representa Y. (Martín, Horna, Nedel, y

Navarro, 2010). También se realizó gráficos circulares o llamados “gráfico de pastel” o “gráfica de 360°” que también es un recurso estadístico para representaciones en porcentajes y proporciones y tablas estadísticas en donde se han colocado los datos obtenidos, ordenados y clasificados.

3.4 Población y muestra

3.4.1 Selección y tamaño de la muestra

En este trabajo el muestreo fue de tipo probabilístico muestro sistemático ya que tiene la ventaja de extender la muestra a toda la población se tomó 150 muestras cada una de 10 a 30 ml.

3.4.2 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de cada balde, cantarilla o botella de los comerciantes de leche cruda que estuvieran en los mercados incluyendo a los carros transportadores de leche cruda en estos lugares, entre el mes de marzo y abril del 2019 de los cuales se extrajo de 10 a 30ml en envases plásticos estériles para ser transportados en coolers hasta el laboratorio para su análisis.

3.5 Preparación de la prueba

Primero se obtuvieron muestras de leche cruda comercializadas de los principales mercados de la ciudad de Cuenca de estas muestras obtenidas se extrajo de 10 a 30 ml en recipientes estériles plásticos para ser transportados al laboratorio en un cooler. Antes de iniciar el análisis de la leche se conecta la incubadora y se estabiliza la temperatura hasta $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se coloca un número de micropocillos en el incubador igual al número de muestras a ser analizadas.

3.6 Procedimiento a realizar para detectar residuos de antibióticos en la leche cruda.

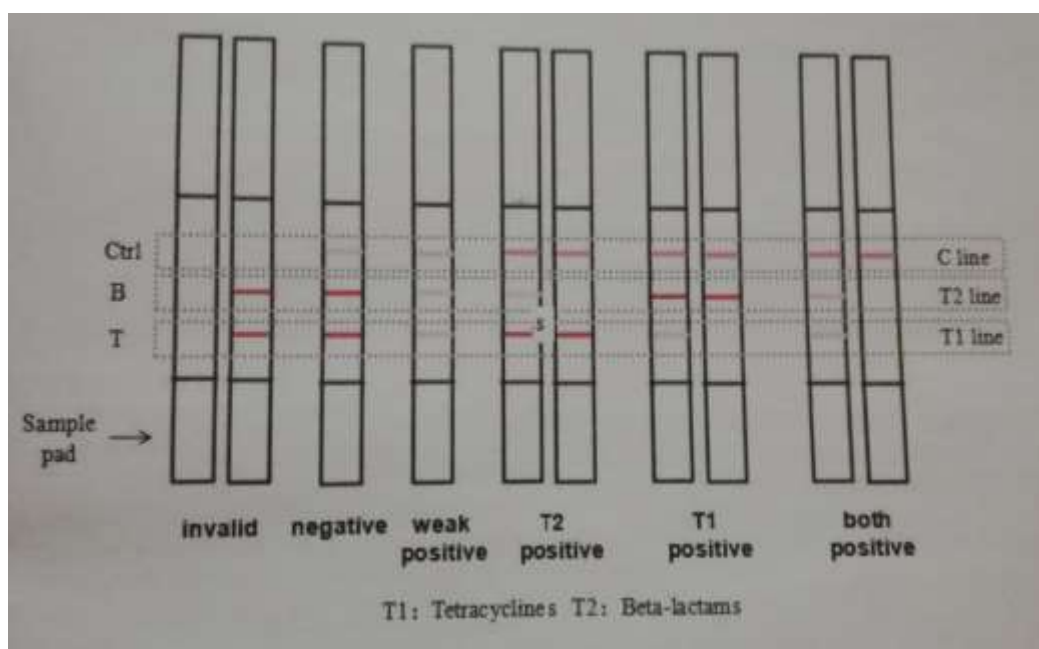
En el laboratorio se procedió al análisis de las muestras con el kit 2en1 de Bioeasy®, con la pipeta del kit y las puntas de pipeta se añadió 200µL de cada muestra de leche en los micropocillos de reactivo bien homogenizadas, se incubó por 3 minutos a 40°C, transcurrido ese tiempo se

sumergió las tiras del kit en cada micropocillos se incubó por 5 minutos más a 40°C luego de ese tiempo se procedió a interpretar los resultados visualmente.

3.7 Interpretación de resultados

Se realizó por medio de la interpretación visual con la ayuda del diagrama de interpretación que viene en el manual de instrucciones del kit. (Figura 1). Primero se verifica si la línea de control superior (línea C) esté presente. Si hay una línea C normal, se compara la intensidad del color de la línea Test (línea T) y la línea C y se interpretó la prueba. Si no hay una línea C visible la prueba se considera inválida.

Figura 1. Diagrama de interpretación.



4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados totales de esta investigación se hallan en la tabla 17, el número obtenido de muestras de cada mercado está en la figura 5 y en la tabla 18, el 33,3% de las muestras analizadas pertenecen al mercado mayorista de la ciudad El Arenal o también conocido como la Feria Libre.

Tabla 17. *Resultados de la investigación.*

Número de muestras	Día	Fecha	Negativos	Positivos Betalactámicos	Positivos Tetraciclinas	Positivos betalactámicos y tetraciclinas
18	1	19/marzo/2029	13	5	0	0
15	2	20/marzo/2019	12	3	0	0
9	3	21/marzo/2019	7	2	0	0
8	4	26/marzo/2019	6	1	1	0
12	5	27/marzo/2019	8	3	1	0
17	6	28/marzo/2019	10	6	0	1
16	7	29/marzo/2019	9	7	0	0
25	8	5/abril/2019	21	3	1	0
25	9	6/abril/2019	20	5	0	0
5	10	8 abril/2019	5	0	0	0

Figura 2. Número de muestras de leche cruda analizadas de los mercados de la ciudad de Cuenca

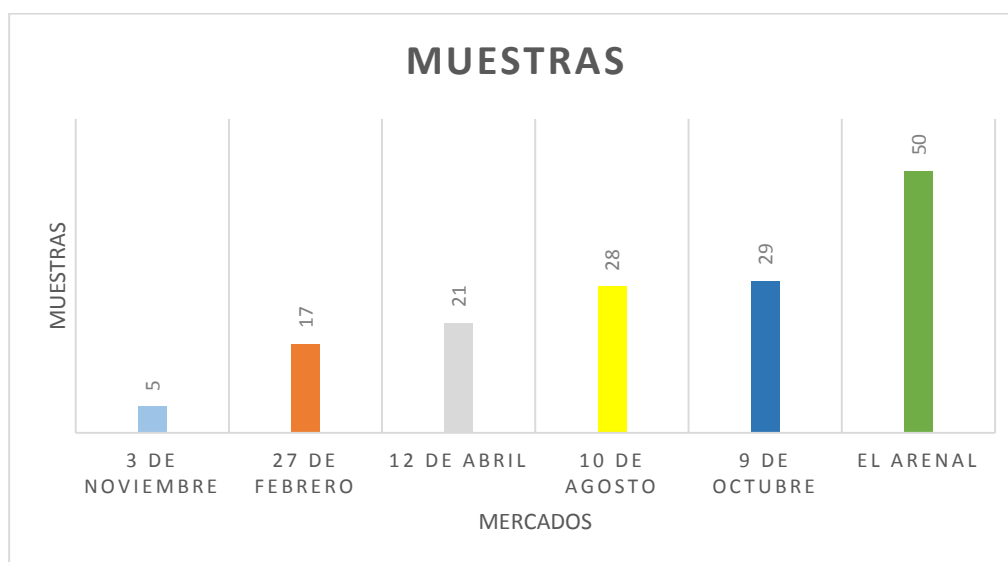
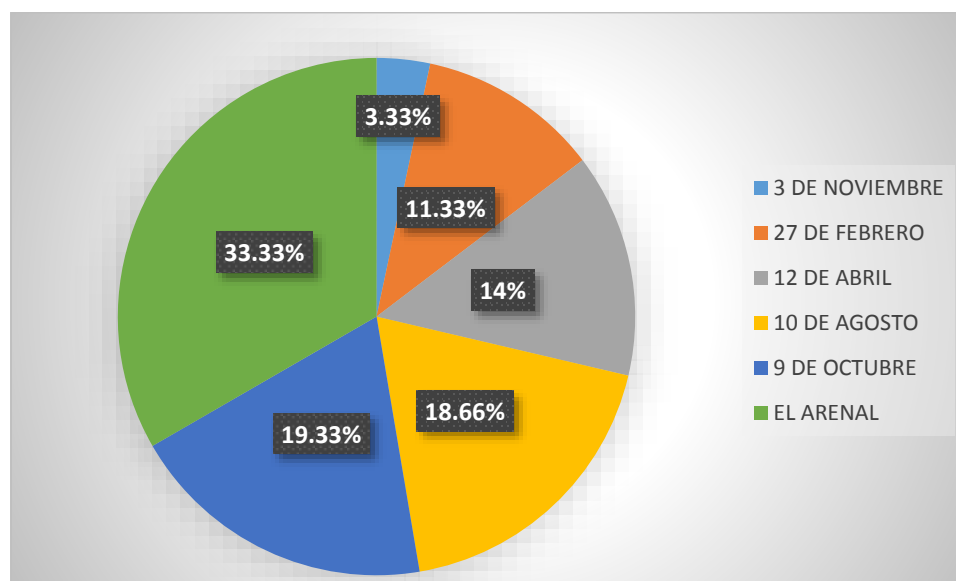


Figura 3. Porcentajes de muestras obtenidas por mercado.



Como se observa en la figura 3 el mayor porcentaje de las muestras provienen del mercado mayorista de la ciudad de Cuenca El Arenal (Feria Libre), y el menor porcentaje del mercado 3 de noviembre que es un mercado pequeño más enfocado a la venta de cereales.

Tabla 18. *Resultados de muestras de cada mercado*

Mercado	Negativos	Positivo β -lactámicos	Positivo tetraciclinas	Positivo β -lactámicos y tetraciclinas
3 de noviembre	4	1		
27 de febrero	14	3		
12 de abril	14	6		1
10 de agosto	25	2	1	
9 de octubre	18	10	1	
El Arenal	36	13	1	

Figura 4. Representación gráfica del resultado de cada muestra de los mercados estudiados.

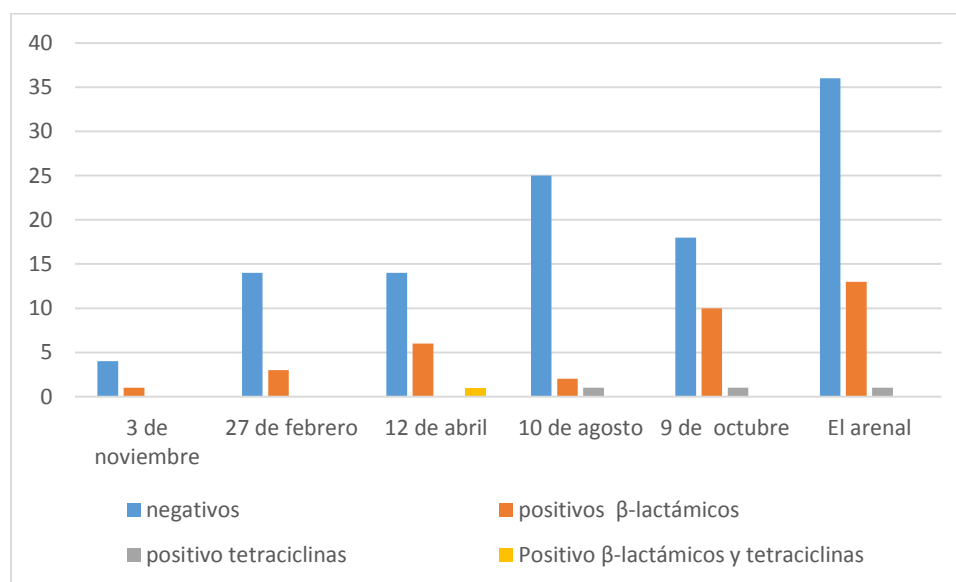


Figura 5. Resultados de las muestras analizadas.

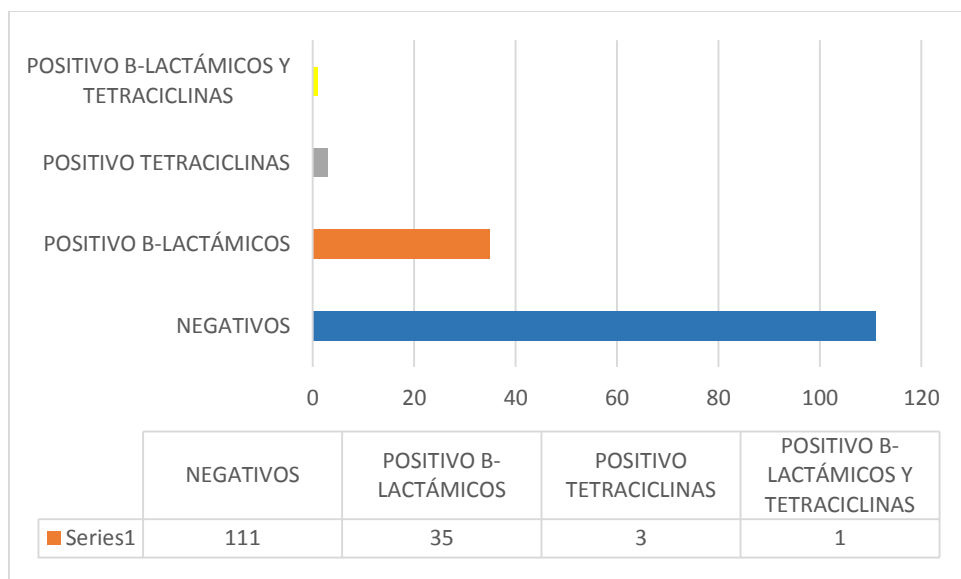
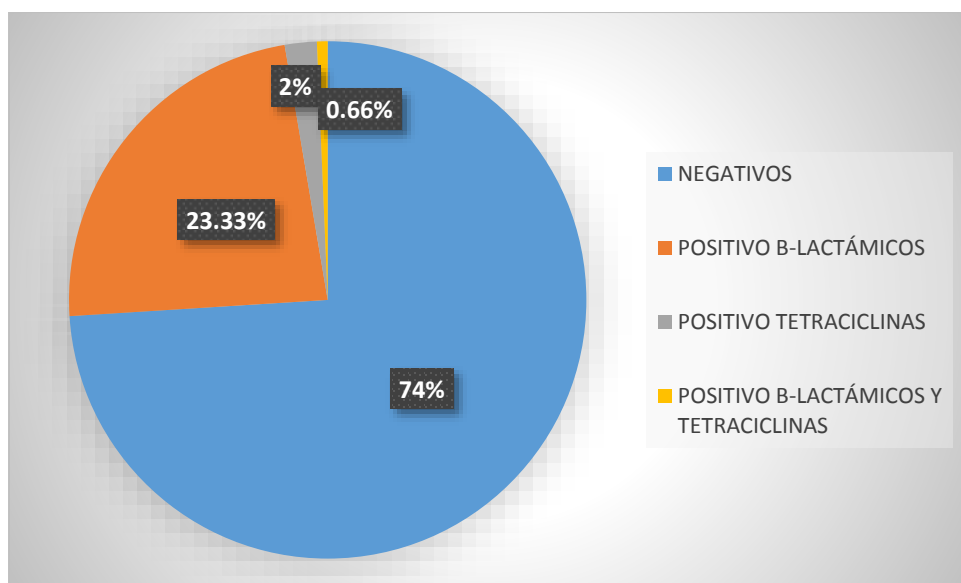


Figura 6. Porcentajes de las muestras analizadas.

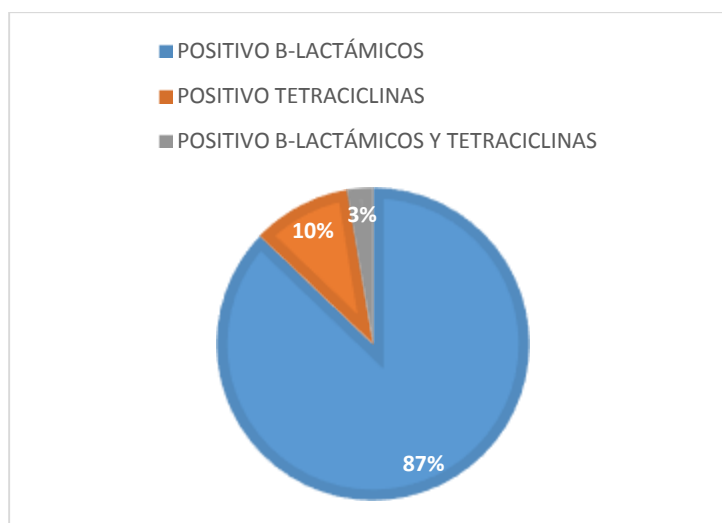


Como se puede observar en la figura 5 y 6 de las 150 muestras analizadas 39 muestras fueron positivas a la presencia de residuos de antibióticos betalactámicos o tetraciclinas es decir un 26%

de las muestras que presentaban residuos de antibióticos de las cuales 34 muestras fueron positivas para betalactámicos (23.33%), 4 fueron positivos para tetraciclinas (2%) y una muestra fue positiva para ambas familias de antibióticos analizadas (0.66%) esto puede deberse al incumplimiento de los días de retiro de los fármacos antes mencionados.

En la presente investigación existe un porcentaje alto de muestras positivas a presencia de residuos de antibióticos (26%), comparada a otras investigaciones realizadas en nuestro país. En la detección de antibióticos en la leche cruda comercializada en el cantón Naranjal de la provincia del Guayas en el 2016 un 19,4% fue positivo a residuos de antibióticos. (Aroca , 2016). En la determinación de adulterantes en la leche cruda de vaca en centros de acopio, medios de transporte y ganaderías de la provincia del Cañar Ecuador se observó una presencia de antibióticos del 3,7% en las fincas y un 0.9% en los medios de transporte de leche (Andrade, et al, 2017).

Figura 7. Resultados de positivos de las muestras analizadas



En la figura 7 se puede observar que la familia de betalactámicos fue la más presente en la investigación con un 87% de las muestras positivas, al igual que en investigaciones anteriores en las cuales los betalactámicos son los principales antibióticos en la leche cruda como es el caso de

la detección de la presencia de Aflatoxina M1 y antibióticos en la leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblián en donde se obtuvo un 65 % positivos a betalactámicos de todas las muestras con presencia de antibióticos. (Ortiz y Cazar, 2014). En un análisis de cuarenta muestras de leche cruda comercializada en mercados del distrito del Callao en el 2009 el 40% de las muestras fueron positivas para residuos de betalactámicos. (Guerrero, et al, 2009). Por lo tanto, existe una concordancia con este estudio sobre cuál es la familia de antibióticos con más presencia en la leche cruda.

Existen varios métodos que se han usado en diferentes estudios realizados para la detección de residuos de antibióticos en este alimento, dando resultados positivos evidenciando el uso irresponsable de estos medicamentos y el poco control que se realiza.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se concluye que un 26% de la leche cruda de vaca comercializada en los principales mercados de la ciudad de Cuenca incluido vehículos transportadores de leche cruda tiene presencia de residuos de antibióticos por lo que existe un incumplimiento a los días de retiro del medicamento.

La familia de antibióticos con más presencia en las muestras de la investigación fueron los betalactámicos con un 23% de positivos.

La leche cruda que es comercializada “al balde” en los mercados carece de controles de calidad y es vendida libremente al consumidor por lo que existe la posibilidad de que esta leche contenga un grado de adulteraciones alto.

5.2 Recomendaciones

Capacitar a productores de leche sobre el uso correcto de antibióticos y los problemas de salud pública que crean estos al no respetar los días de retiro.

Para garantizar la calidad de la leche comercializada en los mercados de la ciudad de Cuenca se recomienda a las entidades pertinentes hacer controles de residuos de antibióticos en estos lugares.

Realizar investigaciones similares de la leche cruda incluyendo la detección de otras familias de antibióticos no investigadas en este estudio como sulfamidas, aminoglucósidos, que también son usados en la ganadería lechera.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. (2012). *Buenas prácticas de producción de leche*. Ecuador: Agrocalidad. Recuperado de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/inocuidad/guia-leche-agrocalidad.pdf>
- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C., y Fica, A. (2015). Conceptos basicos para el uso de antibióticos en otorrinolarinología. *Scielo*, 137. doi: 10.4067/S0718-48162016000100019
- Anadón, R., y Tamargo, J. (2007). *Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública*. Madrid, España: Realigraf. Recuperado de <http://racve.es/files/2013/03/2007-02-10-Discurso-ingreso-D.-Arturo-Ram%C3%B3n-Anad%C3%B3n-Navarro.pdf>
- Andrade, O., Ayala, L., Nieto, P., Pesantez, J., Rodas, E., Vásquez, J., . . . Palacios, M. (2017). Determinación de adulterantes en leche cruda de vaca en centros de acopio, medios de transporte y ganaderías de la provincia del Cañar-Ecuador. *Maskada*, 134. Recuperado de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwjZ97POxPDhAhUNuVkKHRZmC_UQFjABegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fpublicaciones.ucuenca.edu.ec%2Fojs%2Findex.php%2Fmaskana%2Farticle%2Fdownload%2F1507%2F1192%2F&usg=AOvVaw0l0EHLfSyqpb31f31I
- Aroca, N. (2016). *Detección Cualitativa de residuos de antibioticos en la leche cruda comercializada en el cantón Naranjal de la provincia Guayas*. (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Machala, Machala. Recuperado de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/7695>

- Avila, S., y Gutiérrez, A. (2010). *Producción de leche con ganado bovino*. México: El manual moderno.
- Buendía, M. (2016). *Elaboración, producción y comercialización de derivados lácteos*. Lima, Perú: Macro.
- Calvet, E., Cerviño, M., Echeveria, J., Jiménez, L., Jubert, A., Ortega, R., y Bazaga, A. (2016). *Guía del asesor de leche alcanzando objetivos*. Barcelona, España: Servet.
- Camacho, L., Cipriano, M., Cruz, B., Guitiérrez, I., Hernadéz, P., Peñaloza, I., y Nambo, O. (2010). Residuos de antibióticos en la leche cruda comercializada en la región Tierra Caliente de Guerrero, México. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6. Recuperado de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020210/021009.pdf&ved=2ahUKEwiYqfqnrfXaAhXGuVvKkHVSdDfEQFjAIegQIBBAB&usg=AOvVaw0he0RvY8C3wOa1KJqBWuYC>
- Camou, T., Zunino, P., y Hortal, M. (2017). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Med Urug*, 278. Recuperado de <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v33n4/1688-0390-rmu-33-04-00104.pdf>
- Casana, C. (2017). *El uso de antibióticos en la industria alimentaria y su contribución al desarrollo de resistencias determinantes de la diseminación de la resistencia a la colistina*. (Trabajo de grado). Universidad Complutense, Madrid, España. Recuperado de 147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CLARA%20CASANA%20RICO.pdf
- Castillo, P., y Ortega, R. (2015). *Determinación de la alteración-adulteración de la leche cruda mediante análisis físico-químicos en medios de transporte legalizados provenientes de la*

- parroquia Tarqui , Cantón Cuenca.* (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/23505>
- Cazar, M., y Ortiz, M. (2014). *Detección de la presencia de Aflotoxina M1 y de antibióticos en la leche cruda de las fincas de mayor producción del Cantón Biblián.* (Tesis de pregrado). Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/3341>
- Codex Alimentarius. (12 de Enero de 2012). *Fao.* de http://www.fao.org/tempref/codex/Weblinks/MRL2_s_2012.pdf
- Eurovacas. (4 de Abril de 2017). *Eurovacas mercado de ganado bovino online.* Eurovacas. Recuperado de <https://www.eurovacas.com/blog/192-productores-de-leche.html>
- Torsten, H., y Joachim O. (2010). *Status and prospects for smallholder milk production a global perspective.* Fao. Roma- Italia. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/i1522e/i1522e.pdf>
- Fernandez, E., Martínez, J., Martín, V., Moreno, J., Collado, L., Hernández, M., y Morán, F. (2015). Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición Hospitalaria*, 92. Recuperado de <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/09revision09.pdf>
- García, E., Martín, M., y Villaroya, T. (4 de Noviembre de 2010) *¿Qué contiene la leche?.* Cursomotivar. Recuperado de <https://www.cac.es/cursomotivar/resources/document/2010/11.pdf>
- Guerrero, D., Motta, G., Gamarra , G., Benavides , R., Roque, M., y Salazar, M. (2009). *Detección de residuos de antibióticos Betalactamicos y tetraciclinasen leche cruda comercializada*

- en el Callao*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
Recuperado de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/3401/4497&ved=2ahUKEwiYqfqrn fXaAhXGuVkKHVSdDfEQFjAEegQIBRAB&usg=AOvVaw3WQvPqEWUTKfPcVIY CVnSd>
- Koeslag, J. (2015). *Bovinos de Leche*. México: Trillas.
- Larrea, M., y Boggio, J. (2007). *Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- León, V. (2013). *Validación del método artesanal propuesto por Ducbach, para la detección de diferentes tipos de antibióticos en la leche de fincas ganaderas de los Cantones Cayambe y Pedro Moncayo*. (Tesis de pregrado). Universidad Politecnica Salesiana, Quito, Ecuador.
Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4062>
- Llanos, G. (2012). Determinación de residuos de antibióticos en la leche fresca que consume la población de Cajamarca. *Revista Amazonica de Investigación*, 1. Recuperado de <https://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol3/4.pdf>
- Luquet, F., Keilling, J., y Wilde, R. (1991). *Leche y productos lácteos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Magariños, H. (2000). *Producción higienica de la leche cruda*. Valdivia, Chile: Producción y servicios incorporados S.A. Recuperado de www.innocua.net/web/download-795/leche-all.pdf

- Martín, M., Horna, O., Nedel, F., y Navarro, A. (2010). *Fundamentos de estadística en ciencias de la salud*. Bellaterra: Servei de publicacions. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/reader.action?docID=3228218&query=Estadística+descriptiva+e+inferencial>
- Mattar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., y Tordecilla, G. (2008). Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Revista de Salud Pública*, 1. Recuperado de <https://scielosp.org/article/rsap/2009.v11n4/579-590/>
- Ortiz, M., y Cazar, M. (2014). *Detección de la Presencia de Aflotoxina M1 y antibióticos en leche cruda de las fincas de mayor producción del cantón Biblián*. (Trabajo postgrado) Magíster en gestión de la calidad y seguridad alimentaria. Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/3341>
- Perez, R. (2010). *Farmacología Veterinaria*. Concepción, Chile: Talleres Dirección de docenciai. Recuperado de http://www.sibudec.cl/ebook/UDEC_Farmacologia_Veterinaria.pdf
- Perez, E. (2010). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Elsevier*, 28, 124. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-S0213005X09005187>
- Plumb, D. (2017). *Manual Farmacología Veterinaria*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Prescott, J., Baggot, D., y Walker, R. (2002). *Terapéutica antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Quizpe, A., Encalada, L., Sacoto, A., Andrade, D., Muñoz, G., Calvo, D., y Lara, M. (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. Cuenca, Ecuador: Graficas del Austro.

Recuperado de <https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/10/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>

Restrepo, J. (2011). *Terapeutica Veterinaria 2011-2012*. Medellin, Colombia: Legis.

Seiga , V., y Vignoli, R. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>

SENASA. (9 de Agosto de 2013). *Servicio Nacional de Salud Animal Costa Rica*. Obtenido de <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/081014083017.pdf>

Sumano, H., y Ocampo, L. (2007). *Farmacología Veterinaria*. México, D.F, México: McGraw-Hill Interamericana.

Villegas, A., y Santos, A. (2013). *Calidad de leche cruda*. México D.F, México: Trillas.

7. ANEXOS O APENDICES

7.1 Datos obtenidos en campo

FECHA	Nº MUESTRA	MERCADO	OBSERVACIONES
19 de marzo 2019	1	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	2	9 de Octubre	Negativo
	3	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	4	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	5	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	6	9 de Octubre	Negativo
	7	9 de Octubre	Negativo
	8	9 de Octubre	Negativo
	9	9 de Octubre	Negativo
	10	10 de Agosto	Negativo
	11	10 de Agosto	Negativo
	12	10 de Agosto	Positivo β -lactámicos
	13	10 de Agosto	Negativo
	14	10 de Agosto	Negativo
	15	10 de Agosto	Negativo
	16	10 de Agosto	Negativo
	17	10 de Agosto	Negativo
	20 de marzo del 2019	18	10 de Agosto
19		El Arenal	Negativo
20		El Arenal	Negativo
21		El Arenal	Positivo β -lactámicos
22		El Arenal	Negativo
23		El Arenal	Negativo
24		El Arenal	Negativo
25		El Arenal	Negativo
26		El Arenal	Positivo β -lactámicos
27		El Arenal	Positivo β -lactámicos
28		El Arenal	Negativo
29		El Arenal	Negativo
30		El Arenal	Negativo
31		El Arenal	Negativo
32		El Arenal	Negativo
33		El Arenal	Negativo
21 de marzo del 2019	34	27 de Febrero	Negativo
	35	27 de Febrero	Positivo β -lactámicos
	36	27 de Febrero	Negativo
	37	27 de Febrero	Negativo
	38	27 de Febrero	Negativo
	39	27 de Febrero	Negativo
	40	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	41	12 de Abril	Negativo
26 de marzo del 2019	42	12 de Abril	Negativo
	43	9 de Octubre	Negativo
	44	9 de Octubre	Negativo
	45	9 de Octubre	Negativo
	46	9 de Octubre	Negativo
	47	9 de Octubre	Positivo Tetraciclinas
	48	9 de Octubre	Negativo
27 de marzo del 2019	49	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	50	9 de Octubre	Negativo
	51	10 de Agosto	Negativo
	52	10 de Agosto	Positivo β -lactámicos
	53	10 de Agosto	Negativo
	54	10 de Agosto	Negativo
	55	10 de Agosto	Negativo
	56	10 de Agosto	Negativo

	57	10 de Agosto	Positivo Tetraciclinas
	58	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	59	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	60	9 de Octubre	Negativo
	61	9 de Octubre	Negativo
	62	9 de Octubre	Negativo
28 de marzo del 2019	63	27 de Febrero	Positivo β -lactámicos
	64	27 de Febrero	Negativo
	65	27 de Febrero	Negativo
	66	27 de Febrero	Positivo β -lactámicos
	67	27 de Febrero	Negativo
	68	3 de Noviembre	Negativo
	69	3 de Noviembre	Negativo
	70	3 de Noviembre	Positivo β -lactámicos
	71	12 de Abril	Negativo
	72	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	73	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	74	12 de Abril	Negativo
	75	12 de abril	Positivo β -lactámicos y Tetraciclinas
	76	12 de Abril	Negativo
	77	12 de Abril	Negativo
	78	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	79	12 de Abril	Negativo
29 de marzo del 2019	80	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	81	El Arenal	Negativo
	82	El Arenal	Negativo
	83	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	84	El Arenal	Negativo
	85	El Arenal	Negativo
	86	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	87	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	88	El Arenal	Negativo
	89	El Arenal	Negativo
	90	El Arenal	Negativo
	91	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	92	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	93	El Arenal	Negativo
	94	El Arenal	Negativo
	95	El Arenal	Positivo β -lactámicos
5 de abril del 2019	96	El Arenal	Negativo
	97	El Arenal	Negativo
	98	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	99	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	100	El Arenal	Negativo
	101	El Arenal	Negativo
	102	El Arenal	Negativo
	103	El Arenal	Negativo
	104	El Arenal	Negativo
	105	El Arenal	Positivo β -lactámicos
	106	El Arenal	Negativo
	107	El Arenal	Negativo
	108	El Arenal	Negativo
	109	El Arenal	Negativo
	110	El Arenal	Negativo
	111	El Arenal	Positivo tetraciclinas
	112	El Arenal	Negativo
	113	El Arenal	Negativo
	114	El Arenal	Negativo
	115	10 de Agosto	Negativo
	116	10 de Agosto	Negativo

	117	10 de Agosto	Negativo
	118	10 de Agosto	Negativo
	119	10 de Agosto	Negativo
	120	10 de Agosto	Negativo
6 de abril del 2019	121	27 de Febrero	Negativo
	122	27 de Febrero	Negativo
	123	27 de Febrero	Negativo
	124	27 de Febrero	Negativo
	125	27 de Febrero	Negativo
	126	27 de Febrero	Negativo
	127	3 de Noviembre	Negativo
	128	3 de Noviembre	Negativo
	129	12 de Abril	Negativo
	130	12 de Abril	Negativo
	131	12 de Abril	Negativo
	132	12 de Abril	Negativo
	133	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	134	12 de Abril	Negativo
	135	12 de Abril	Negativo
	136	12 de Abril	Positivo β -lactámicos
	137	12 de Abril	Negativo
	138	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	139	9 de Octubre	Negativo
	140	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	141	9 de Octubre	Negativo
	142	9 de Octubre	Negativo
	143	9 de Octubre	Positivo β -lactámicos
	144	9 de Octubre	Negativo
	145	10 de Agosto	Negativo
8 de abril del 2019	146	10 de Agosto	Negativo
	147	10 de Agosto	Negativo
	148	10 de Agosto	Negativo
	149	10 de Agosto	Negativo
	150	10 de Agosto	Negativo

7.2 Fotos



Foto 1. Comercio de leche cruda



Foto 2. Muestras de leche obtenidas en los mercados.



Foto 3. Transporte de muestras al laboratorio



Foto 4. Muestras de leche en el laboratorio



Foto 5. Kit 2in1 Bet-Lactams + Tetracyclines test®



Foto 6. Preparación de prueba



Foto 6. Preparación de las muestras



Foto 7. Incubación de las muestras



Foto 8. Colocación de tiras.

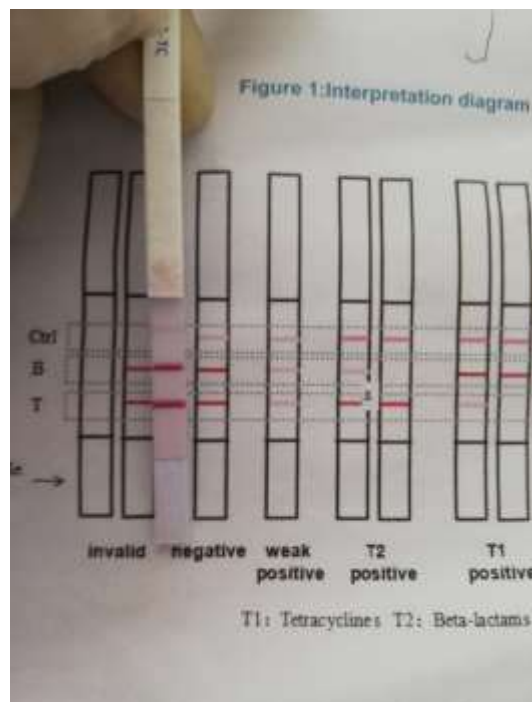


Foto 9. Interpretación de resultados.

FECHA	N° MUESTRA	MERCADO	OBSERVACIONES	TOTAL
22/04/2023	1	Al. de España	Presencia	
	2	Al. de España	Presencia	
	3	Al. de España	Presencia	
	4	Al. de España	Presencia	
	5	Al. de España	Presencia	
	6	Al. de España	Presencia	
	7	Al. de España	Presencia	
	8	Al. de España	Presencia	
	9	Al. de España	Presencia	
	10	Al. de España	Presencia	
	11	Al. de España	Presencia	
	12	Al. de España	Presencia	
	13	Al. de España	Presencia	
	14	Al. de España	Presencia	
	15	Al. de España	Presencia	
	16	Al. de España	Presencia	
	17	Al. de España	Presencia	
	18	Al. de España	Presencia	
	19	Al. de España	Presencia	
	20	Al. de España	Presencia	
	21	Al. de España	Presencia	
	22	Al. de España	Presencia	
	23	Al. de España	Presencia	
	24	Al. de España	Presencia	
	25	Al. de España	Presencia	
	26	Al. de España	Presencia	
	27	Al. de España	Presencia	
	28	Al. de España	Presencia	
	29	Al. de España	Presencia	
	30	Al. de España	Presencia	
	31	Al. de España	Presencia	
	32	Al. de España	Presencia	
	33	Al. de España	Presencia	
	34	Al. de España	Presencia	
	35	Al. de España	Presencia	
	36	Al. de España	Presencia	
	37	Al. de España	Presencia	
	38	Al. de España	Presencia	
	39	Al. de España	Presencia	
	40	Al. de España	Presencia	
	41	Al. de España	Presencia	
	42	Al. de España	Presencia	
	43	Al. de España	Presencia	
	44	Al. de España	Presencia	
	45	Al. de España	Presencia	
	46	Al. de España	Presencia	
	47	Al. de España	Presencia	
	48	Al. de España	Presencia	
	49	Al. de España	Presencia	
	50	Al. de España	Presencia	
	51	Al. de España	Presencia	
	52	Al. de España	Presencia	
	53	Al. de España	Presencia	
	54	Al. de España	Presencia	
	55	Al. de España	Presencia	
	56	Al. de España	Presencia	
	57	Al. de España	Presencia	
	58	Al. de España	Presencia	
	59	Al. de España	Presencia	
	60	Al. de España	Presencia	
	61	Al. de España	Presencia	
	62	Al. de España	Presencia	
	63	Al. de España	Presencia	
	64	Al. de España	Presencia	
	65	Al. de España	Presencia	
	66	Al. de España	Presencia	
	67	Al. de España	Presencia	
	68	Al. de España	Presencia	
	69	Al. de España	Presencia	
	70	Al. de España	Presencia	
	71	Al. de España	Presencia	
	72	Al. de España	Presencia	
	73	Al. de España	Presencia	
	74	Al. de España	Presencia	
	75	Al. de España	Presencia	
	76	Al. de España	Presencia	
	77	Al. de España	Presencia	
	78	Al. de España	Presencia	
	79	Al. de España	Presencia	
	80	Al. de España	Presencia	
	81	Al. de España	Presencia	
	82	Al. de España	Presencia	
	83	Al. de España	Presencia	
	84	Al. de España	Presencia	
	85	Al. de España	Presencia	
	86	Al. de España	Presencia	
	87	Al. de España	Presencia	
	88	Al. de España	Presencia	
	89	Al. de España	Presencia	
	90	Al. de España	Presencia	
	91	Al. de España	Presencia	
	92	Al. de España	Presencia	
	93	Al. de España	Presencia	
	94	Al. de España	Presencia	
	95	Al. de España	Presencia	
	96	Al. de España	Presencia	
	97	Al. de España	Presencia	
	98	Al. de España	Presencia	
	99	Al. de España	Presencia	
	100	Al. de España	Presencia	

Foto 10. Toma de datos.