

01/08/14 - Detección de monensina en piensos para ganado vacuno.

Vet. Arg. ? Vol. XXXI ? N° 316? Agosto 2014.

Berner, M.J (1,2); Miranda, A .O (1); Frances, O (3); Mastrantonio, G.E (2,4)

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*. Este trabajo reporta un método de cuantificación de MN en pienso utilizando equipamiento de baja complejidad, disponibles en laboratorios veterinarios de análisis rutinarios, que permite la implementación de un seguimiento más estricto de la formulación de las dietas y sus componentes, evitando pérdidas tanto clínicas como subclínicas que afecten la rentabilidad del sistema ganadero. 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.

Detection of Monensin in animal feed**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

1. Área de Salud Pública Veterinaria. EEA INTA Anguil. Ruta Nacional N° 5 KM 580 CP (6326) Tel: (02954) 495057 int. 419. La Pampa. miranda.ariel@inta.gob.ar

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

UNLPam. Av. Uruguay 151- CP (6300) Santa Rosa-La Pampa, Tel/Fax: (02954) 425166/432535. bernerijimena@gmail.com

3. Cat. Clínica de Grandes Animales. Fac. de Cs. Vet. Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116. General Pico. La Pampa. Tel. (02302) 422617. oscar.frances@speedy.com.ar

4. Área de Toxicología, Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas UNLP ? LaSeiSiC-PlaPiMu, Fac. Cs Exactas CIC/UNLP. Calle 115 y 47 ? CP (1900) La Plata ? Buenos Aires, Tel/Fax: (0221) 4714527/4846173. mastra@biol.unlp.edu.ar

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 sintetizado por un hongo, el *Streptomyces cinnamonensis*. Este antibiótico es ampliamente utilizado para el engorde del ganado vacuno. Desafortunadamente, no es infrecuente la presentación de casos de intoxicación de animales debido fundamentalmente a: un consumo de altas cantidades en el alimento como consecuencia de una inadecuada formulación y/o distribución en el comedero y a una incorrecta preparación de la mezcla y/o mal mezclado en el mixer (Odriozola, 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 considerando la categoría y tipo de animal respectivamente.

Si bien la 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, favorecido por sus efectos benéficos en cuanto a la mejora de la conversión alimenticia, así como en 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 y las frecuencias de ingesta. La DL50 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 (Radositis *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% (Odriozola, 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 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.

El 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 la adaptación de 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 de 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 termostatzado y espectrofotómetro.

Reactivos requeridos (calidad *pro análisis*): etanol anhidro, H₂SO₄, 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

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

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 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

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 1 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.

Límite de detección (LOD)	3 mg MN/Kg de alimento
Límite de cuantificación (LOQ)	8 mg MN/Kg de alimento
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 de alimento

Como ya fue mencionado, es necesario tomar en cuenta que es frecuente encontrarnos con piensos deficientemente mezclados, de manera que el muestreo es 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).

Conclusiones

La técnica es apropiada para medir MN en piensos en dosis normales de trabajo y en sobredosificaciones. Aunque requiera cierta laboriosidad, es un método con un bajo costo de insumos y equipamiento, comparado con otros métodos descritos 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
