

# RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN MÚSCULO DE PORCINOS SACRIFICADOS EN LA REGION NOROESTE DE MÉXICO

## Sulfonamide Residues in Muscle of Porcine Slaughtered at the Northwestern of Mexico

*María del Carmen Bermúdez-Almada, Leticia Miranda-Vásquez, Angélica Espinosa-Plascencia, Ana Isabel Valenzuela-Quintanar y Luz Vázquez-Moreno*

*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carr. a la Victoria Km. 0.6, Apartado 1735. Hermosillo, Sonora, México C.P.83000 E-mail: cbermudez@cascabel.ciad.mx*

### RESUMEN

Los residuos de antibióticos en las canales de animales sacrificados han sido el foco de atención de las autoridades de salud por algún tiempo. Las sulfonamidas representan una clase de compuestos ampliamente utilizados en la producción animal como agentes antimicrobianos y suministrados vía el alimento. Los residuos de estos antimicrobianos en los alimentos derivados de animales tratados representan un riesgo para la salud de los consumidores de carne. Los métodos tradicionales de detección de sulfonamidas han mostrado ser poco confiables. En este estudio, se planteó monitorear los niveles de residuos de sulfonamidas mediante un ensayo microbiológico rápido (Charm II), y su confirmación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en músculos de porcino colectados en plantas Tipo Inspección Federal de la Región Noroeste de México. Se analizaron 1635 muestras de músculo de porcino, durante 1993-1999. Los resultados obtenidos mediante la prueba Charm II mostraron que el 6,1% de las muestras estuvieron contaminadas con sulfonamidas, las concentraciones detectadas variaron en el rango de 0,01-0,24 µg/g. Del total de muestras analizadas, 21 (1,3%) presentaron niveles violatorios de sulfonamidas de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, que establece un Límite Máximo de Residuos (LMR) permitidos para sulfonamidas de 0,1 µg/g. Estos datos revelan que la incidencia de residuos violatorios de sulfonamidas es baja, aunque los problemas aún persisten.

Palabras clave: Sulfonamidas, tejido, porcinos, Charm II, HPLC.

### ABSTRACT

Antimicrobial residues in carcasses of slaughtered animals have been the focus of attention by health authorities for some

time. Sulfonamides represent a class of compounds widely used as antibacterial agents in animal production as antibacterial agents and are commonly administered via medicated feeds. Residues of these drugs in food derived from treated animals could pose a health threat to consumers of meat. Traditional detection methods of sulfonamides have been shown to be unreliable. In this study, sulfonamide residue levels were monitored by a microbiological receptor assay (Charm II) and confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC), in porcine muscles collected at federally-inspected packing plants of Northwestern Mexico. The number of analyzed pork samples was 1635 during 1993-1999. Results obtained by the Charm II test of the meat extracts showed that 6.1% of the samples were contaminated with sulfonamides. The concentrations varied in the range from 0.01-0.24 µg/g, 21 samples (1.3%) had violative levels of sulfonamides based on the Mexican tolerances (0.1 µg/g). These data revealed that the incidence of violative sulfonamide residues is low, although problems still persist.

Key words: Sulfonamides, tissue, pigs, Charm II, HPLC

### INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y uso de los antibióticos y sulfonamidas ha tenido un profundo impacto tanto en la vida y la salud de los humanos, como en la de los animales, en particular mediante el control de las enfermedades infecciosas [5, 16]. Las sulfonamidas son derivados de sulfanilamida, las cuales constan de un anillo benceno al que se le ha unido un grupo sulfonamida ( $\text{SO}_2 \text{NH}_2$ ) opuesto al grupo amino substituido. Los efectos adversos causados por las sulfonamidas son las reacciones toxicológicas o de hipersensibilidad. Además, a finales de los años sesenta empezó a preocupar su posible efecto sobre la salud pública, puesto que el empleo de antibióticos pue-

de dar lugar a la aparición de poblaciones de bacterias resistentes a los medicamentos en el tracto gastrointestinal de dichos animales. Esta preocupación se basa en el conocimiento de que en determinados casos una bacteria patógena o no patógena resistente a un antibiótico, puede transferir las propiedades de resistencia a otra, en ocasiones patógenas, y que estos patógenos resistentes pueden infectar al hombre [5]. Por otro lado, existen evidencias que implican a la sulfametazina como un posible carcinógeno [2, 9].

Las sulfonamidas son ampliamente usadas en la industria ganadera y en los últimos años se han convertido en parte integral de dicha industria [5, 14]. Por lo general, las sulfonamidas se incorporan en el alimento de los animales para propósitos profilácticos y terapéuticos, en concentraciones de 100 mg/kg de alimento. Son con facilidad absorbidas del tracto gastrointestinal, penetran a todos los tejidos y son excretadas como metabolitos, principalmente en orina. Sin embargo, pueden ser retenidas en los tejidos animales por períodos prolongados después de su administración, por lo que se requiere de un período de retiro antes del sacrificio [19]. Por esta razón, se han establecido reglamentaciones para sulfonamidas en los distintos países, para el caso de México, la Norma Oficial Mexicana (NOM) indica un nivel máximo permitido de 0,1 µg/g, para hígado, riñón y músculo de todas las especies animales [13].

La combinación del uso rutinario y la relativa baja excreción o alto poder residual de estos compuestos, ha provocado la presencia de residuos no aceptables en los tejidos animales comestibles después del sacrificio. En los últimos 10 años, las sulfonamidas han sido la causa más común de niveles de residuos violatorios reportados por el Food Safety and Inspection Service (FSIS) de los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), y la prevalencia de contaminación ha sido mayor en porcinos. Se menciona que del 6-10% de los cerdos sacrificados para abasto en los EEUU, han presentado concentraciones tisulares de sulfas por arriba de los Límites Máximos de Residuos (LMR) permitidos (0,1 µg/g), siendo la mayoría de los residuos violatorios debido a sulfametazina. En la actualidad, en dicho país ha bajado el índice de violaciones por sulfonamidas a menos de 5% [4, 17].

En México, es nulo el control oficial del uso de medicamentos en la producción animal, lo que favorece su uso indiscriminado. Asimismo, la magnitud del problema de los residuos de sulfonamidas en alimentos se desconoce por la falta de estudios sobre el tema. Existe una investigación realizada en México, Distrito Federal, donde el 40% de las muestras de carne bovina analizadas mediante un método espectrofotométrico, contenían residuos de sulfonamidas y los niveles encontrados fluctuaron desde 10 hasta 18,5 ppm [15], niveles que están muy por encima de los establecidos en la NOM actual [13].

El uso de sulfonamidas en la producción de ganado ha cobrado especial atención, con el propósito de proteger al consumidor, así como para asegurar la comercialización de la carne de cerdo, hacia mercados extranjeros, que en algunos ca-

sos tienen reglamentaciones más estrictas. Por lo tanto, se requiere de métodos analíticos sensibles y confiables para llevar a cabo el monitoreo de residuos de sulfonamidas en los tejidos animales comestibles.

Entre los métodos para la determinación de las sulfonamidas en tejidos animales se incluyen los microbiológicos, biológicos, cromatografía de capa fina, líquida y gas-líquido con espectrometría de masas, entre otros [7, 10, 12]. Sin embargo, los métodos microbiológicos pierden especificidad, la cromatografía de capa fina pierde sensibilidad. Los análisis de cromatografía de gases están limitados, debido a la inestabilidad térmica de algunos antimicrobianos. Por lo que, los ensayos biológicos como es el método Charm II son una buena alternativa por su especificidad, alta sensibilidad y rapidez; complementándose con la posterior confirmación mediante un método químico como lo es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizada en la determinación de antibióticos.

Por otro lado, el estado de Sonora, está involucrado en la dinámica de exportación de carne de cerdo al mercado japonés. Durante el año 2000, se exportaron alrededor de 30 mil toneladas de carne, lo que representó una captación de divisas por más de 100 millones de dólares, esto hace importante a la industria porcina para la economía de dicho estado. El requisito de calidad sanitaria que exigen las autoridades japonesas es la ausencia de residuos de antimicrobianos, con especial énfasis en las sulfonamidas, en la carne de cerdo. De ahí la importancia de la calidad que deben tener estos productos cárnicos para mantener su comercialización en el mercado japonés.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Los reactivos utilizados para el ensayo biológico Charm II, se obtuvieron de la compañía Charm Science (Malden, MA.). Los estándares de sulfonamidas se adquirieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO.). Todos los solventes y reactivos químicos empleados eran grado analítico y cromatográfico.

### Muestra

Se analizaron 1635 muestras de músculo del diafragma de porcinos, durante el periodo de 1993 a 1999. Las muestras fueron obtenidas de plantas Tipo Inspección Federal (TIF), de la Región Noroeste de México, tomando 500 g de tejido muscular de cada animal seleccionado al azar. Una vez obtenidas las muestras, fueron colocadas en bolsas de polietileno identificadas y se transportaron congeladas al laboratorio, almacenándose a -20°C, hasta su análisis.

### Preparación de la muestra

El músculo descongelado fue cortado en trozos pequeños, eliminando el tejido conectivo y adiposo visible, se homo-

geneizó y colocó en recipientes de plástico etiquetados. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis.

### Métodos

Para asegurar la calidad de los resultados, fueron calculados los límites mínimos de detección y la recuperación de sulfonamidas, mediante el ensayo biológico y por el método de HPLC [3, 11]. La recuperación se obtuvo mediante la adición de estándares del antimicrobiano en concentraciones conocidas, a muestras libres de sulfonamidas, analizadas de acuerdo a cada una de las metodologías (ensayo biológico y cromatografía de líquidos de alta resolución).

### Análisis de las muestras

Para el ensayo biológico fue utilizada la metodología reportada por Charm y Lawton [3], modificada por Vázquez-Moreno y col. [18]. Este método de análisis Charm II, es un ensayo basado en una reacción de unión entre el grupo funcional de las sulfonamidas y el sitio receptor inmovilizado en células de *Bacillus stearothermophilus*, específico para las sulfonamidas. El extracto de la muestra es mezclado con las células microbianas y con una sulfonamida marcada con  $^3\text{H}$ , la que compete bajo condiciones controladas con el antibiótico presente en la muestra, para unirse a los sitios receptores de la célula, de tal modo que la concentración es expresada como una relación inversa de las emisiones radiactivas medidas en un contador de centelleo.

Para realizar la cuantificación de las sulfonamidas presentes en las muestras se elaboraron curvas de calibración mediante la adición de concentraciones conocidas de estos antimicrobianos a tejidos de porcino libres de sulfonamidas. El método es rápido y sensible, sin embargo, cuantifica sulfonamidas totales.

Los resultados obtenidos por la prueba Charm II se confirmaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta, empleando un cromatógrafo de líquidos Varian 9010 (Varian Instruments Inc., Palo Alto, CA., USA) y un detector Varian 9050 (Varian Instruments Inc. Palo Alto, CA., USA), a una longitud de onda de 270 nm. Ambos equipos conectados a una computadora Acer Power 333 S con una impresora Epson LX-810L y un paquete computacional Word Station LC 4.0 Varian (Varian Instruments Inc., Palo Alto, CA., USA). Fue utilizada una columna nucleosil ODS de  $3\ \mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$  fase reversa (Varian Instruments Inc, Palo Alto, CA., USA), con una longitud de 15 cm y un diámetro interno de 4,6 mm, un volumen de inyección de 200  $\mu\text{l}$  y un flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió de ácido fosfórico 0,017M:acetonitrilo (95:5, v/v) grado cromatográfico.

La extracción de las sulfonamidas fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Long y col. [10]. En este método se emplea el principio de la dispersión de matriz en fase sólida, que consiste en romper las membranas celulares

por medio de fuerzas hidrofóbicas y mecánicas para dejar al descubierto los componentes hidrofílicos, tales como los residuos de sulfonamidas. Esto se logra poniendo en contacto la muestra con el adsorbente  $\text{C}_{18}$  (sílica octadecil-silil derivatizada), que se asocia a los lípidos de la membrana celular. Posteriormente se eliminan los compuestos cromóforos y otros que puedan causar interferencia, mediante lavados con hexano. El antibiótico puede eluirse entonces con un solvente polar.

Se obtuvieron curvas de calibración, elaboradas a partir de soluciones patrón de sulfonamidas, que dieron como resultado concentraciones de 0, 0,25; 0,050; 0,10; 0,15 y 0,20  $\mu\text{g/mL}$ .

El análisis se hizo por duplicado y en todos los casos cada muestra fue trabajada junto con un tejido libre de sulfonamidas (control negativo) y otro adicionado del antibiótico de interés (control positivo).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Validación de los métodos de análisis

En el establecimiento de los Límites Mínimos de Detección (LMD), tanto en el método Charm II, como para HPLC, se pudo observar que ambos fueron capaces de detectar los residuos de sulfonamidas en concentraciones muy por debajo con respecto a los límites máximos de residuos establecidos en la NOM [13]. El LMD obtenido en la prueba Charm II, para sulfonamidas fue de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que por el método de HPLC los límites fueron de 0,000875  $\mu\text{g/mL}$  para sulfanilamida, sulfadiazina y sulfametazina; y de 0,00125  $\mu\text{g/mL}$ , para sulfatiazol, sulfametoxipiridazina, sulfaclopiridazina, sulfametoazol y sulfisoxazol.

La forma de validar los métodos utilizados fue mediante el análisis de muestras previamente detectadas como libres de sulfonamidas y adicionadas de estándares en concentraciones conocidas, de donde se obtuvieron los porcentajes de recuperación, o determinación de la exactitud. Los resultados para el ensayo biológico mostrados en la TABLA I, indican que los valores de recuperación estuvieron en el rango de 89-103 %, para diferentes niveles de concentración, de acuerdo al método Charm II y de 80,8 a 99,6% para HPLC, TABLA II. Al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos en la validación de los métodos de análisis, con los parámetros establecidos como aceptables, que son de 70-110% de recuperación [6], se observó que los valores obtenidos en todos los casos quedaron dentro de dichos parámetros, por lo que esto aseguró la confiabilidad de los resultados generados.

### Análisis de las muestras

La TABLA III presenta el número total de muestras analizadas por año, así como aquellas en las que se detectó presencia de sulfonamidas. El rango de muestras positivas varió de 1,6-12,5% con respecto al año, y en promedio el porcentaje

**TABLA I**  
PORCENTAJES DE **RECUPERACIÓN** DE **SULFONAMIDAS**  
OBTENIDOS EN **MÚSCULO** DE PORCINO  
POR EL **MÉTODO** CHARM II

Sulfametazina adicionada ( $\mu\text{g/g}$ )	% Resuperación ( $X \pm \text{DE}$ )
0,01	103,0 $\pm$ 11,31
0,05	97,0 $\pm$ 2,86
0,10	94,0 $\pm$ 3,05
0,20	89,0 $\pm$ 9,36

n = 10, para cada concentración.

**TABLA II**  
PORCENTAJES DE **RECUPERACIÓN** DE **SULFONAMIDAS**  
OBTENIDOS EN **MÚSCULO** DE PORCINO  
POR EL **MÉTODO** DE **CROMATOGRAFÍA** DE **LÍQUIDOS**

Estándar de Sulfonamida	% Recuperación ( $X \pm \text{DE}$ )
Sulfanilamida	80,8 $\pm$ 14,50
Sulfadiazina	93,7 $\pm$ 14,92
Sulfatiazol	89,7 $\pm$ 4,40
Sulfametazina	99,6 $\pm$ 16,80
Sulfametoxipiridazina	85,9 $\pm$ 13,99
Sulfacoloropiridazina	82,3 $\pm$ 11,44
Sulfametoxazol	85,0 $\pm$ 8,55
Sulfisoxazol	97,1 $\pm$ 14,11

n = 6 para cada estándar. Concentración de sulfonamidas: 3,2  $\mu\text{g/g}$ .

**TABLA III**  
**PORCIENTO** DE MUESTRAS POSITIVAS RESPECTO  
AL TOTAL ANALIZADAS EN **MÚSCULO** DE **PORCINOS**

Año	% Muestras positivas1 Muestras analizadas	Muestras violatorias (%)
1993	12,5/ 64	0
1994	7,0/ 71	0
1995	4,5/ 224	0
1996	8,6/ 291	3,4
1997	7,8/ 422	1,9
1998	1,6/ 246	0
1999	4,7/ 317	0,9
Total	6,1/1635	1,3

El porcentaje de muestras violatorias está en base al total de muestras analizadas.

de muestras con residuos de sulfonamidas en el período de 1993-1999, fue de 6,1. Es notorio que en el año de 1993 el porcentaje de muestras positivas en relación al número de muestras analizadas fue el más alto y en los años siguientes el porcentaje disminuyó con relación a 1993, hasta llegar a 1,6%

**TABLA IV**  
NIVELES PROMEDIO DE **SULFONAMIDAS** DETECTADAS  
EN **MÚSCULO** DE PORCINO COLECTADO  
EN ESTABLECIMIENTOS TIPO **INSPECCIÓN** FEDERAL

Año	$\bar{X} \pm \text{D.E.}$ ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup>
1993	0,016 $\pm$ 0,005
1994	0,014 $\pm$ 0,003
1995	0,017 $\pm$ 0,004
1996	0,100 $\pm$ 0,090
1997	0,056 $\pm$ 0,070
1998	0,021 $\pm$ 0,011
1999	0,051 $\pm$ 0,055

<sup>1</sup> Base húmeda.

en 1998, sin embargo, en 1999 nuevamente aumenta a 4,7%. Esto muestra que el problema de la presencia de sulfonamidas en el músculo de cerdos sacrificados en el estado de Sonora es variable pero permanente. Dentro del total de muestras estudiadas, 1,3% se encontraron como violatorias, es decir, que presentaron niveles de sulfonamidas por arriba de los establecidos en la Normatividad [13]. En la actualidad, la industria porcina norteamericana reporta un índice de violaciones por debajo del 5% [1] y el Reino Unido indica que es menor del 0,5% [4].

Las concentraciones promedio de sulfonamidas detectadas en el período del estudio variaron de 0,014-0,10  $\mu\text{g/g}$ , TABLA IV. Es importante señalar que en los años 1996 y 1997 se detectaron las muestras con los niveles más altos de sulfonamidas. Lo anterior fue debido a que durante esos años se analizaron muestras procedentes de una zona en particular de la Región Noroeste de México, la cual por su localización geográfica tiene características climatológicas un tanto diferentes al resto de la región, y por lo tanto, tiene prácticas de administración de antibióticos distintas.

Al realizar la confirmación mediante el método de HPLC, de las muestras que resultaron con presencia de sulfonamidas utilizando el método biológico, las sulfonamidas identificadas fueron sulfatiazol y sulfametazina. Estos datos generados concuerdan con los reportes recientes que indican que tanto sulfatiazol como sulfametazina, están dentro de las sulfonamidas más utilizadas en la producción de cerdos [4]. Por otro lado, en algunos países se ha restringido el uso de sulfametazina por considerarse no segura desde el punto de vista de salud pública [1].

La presencia de residuos de sulfonamidas en los tejidos es indicativo de que muchos de los animales que llegan al sacrificio han sido previamente medicados, y no se espera a que pasen los límites de tiempo recomendados para que los niveles de antibióticos lleguen a la concentración permitida o bien sean eliminados, para después proceder al sacrificio. De ahí que sea muy importante establecer los tiempos de retiro adecuados de las sulfonamidas antes del sacrificio, para que los

tejidos comestibles no excedan el nivel de tolerancia, puesto que es bien sabido que cerca del 100% de los alimentos de iniciación para cerdos y alrededor del 75% de crecimiento son medicados, ya que esta práctica se ha tornado indispensable en dicha industria para el control de ciertos estados patológicos.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados por Sánchez [15] en un estudio realizado sobre presencia de sulfonamidas en músculo y vísceras de bovinos sacrificados en el Distrito Federal, México, se tiene que el porcentaje de contaminación, así como los niveles de sulfonamidas detectados por medio de un método espectrofotométrico, con un límite mínimo de detección de 10 µg/g, fueron mayores en este último. Sin embargo, estos datos corresponden a bovino, ya que no se encontraron reportes realizados en México sobre la especie porcina.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que un 6,1% de las muestras de músculo de porcino analizadas, contenían residuos de sulfonamidas y de ellos un 1,3% presentó niveles superiores al límite máximo de residuos permitido, de acuerdo a la NOM. Esto puede ser indicativo de que muchos de los cerdos que llegan al sacrificio fueron medicados y en algunos casos se presentan abusos en dicha medicación, o bien, no se espera a que transcurra el tiempo de retiro recomendado para que los niveles del antibiótico lleguen a las concentraciones permitidas, para después proceder al sacrificio, por lo tanto, puede ser posible que los residuos de sulfonamidas lleguen al consumidor a través de los alimentos de origen animal.

Otro aspecto a señalar, es la importancia de contar con métodos sensibles y confiables que permitan llevar a cabo el monitoreo de antibióticos en los alimentos, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor. Actualmente no se conoce la magnitud del problema de los residuos de antimicrobianos en alimentos, por los escasos estudios válidos sobre el tema.

## RECOMENDACIONES

La industria porcina representa una actividad importante para la economía de la región y del país, por lo que en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se hace necesario sugerir la realización de un muestreo continuo de la carne y productos cárnicos, tanto por razones de salud pública, como económicas. Así mismo, con el fin de evitar estos residuos, la legislación vigente en los diferentes países debe exigir que en los productos farmacéuticos veterinarios destinados a animales que proveen alimentos para el hombre, deba indicarse el período de restricción o de retiro necesario para que el animal elimine el medicamento hasta un nivel en el que no ten-

ga efectos nocivos. O bien, el no permitir el tratamiento terapéutico con estos productos los últimos dos meses de la etapa de engorda del ganado porcino, ya que la contaminación química de los alimentos de origen animal además de comprometer su calidad perjudica su comercialización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AUGSBURG, J.K. Sulfa Residues in Pork: An Update. *J. Anlm. Sci.* **67**:2817-2821. 1989.
- [2] BOISON, O.K.; KENG, J.Y. Determination of Sulfamethazine in Bovine and Porcine Tissues by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **77**:558-564. 1994.
- [3] CHARM, S.E.; LAWTON, J.H. Preliminary Results in Detection of Antibiotic Residues in Meat Using The Charm II Receptor Assay. Paper Delivered AOAC. Spring Training Workshop. Ottawa, Ontario, Canada. 1-10. 1987.
- [4] FODEY, T.L.; CROOKS, R.H.; ELLIOTT, C.T.; MCCAUGHEY, W.J. Comparison of Porcine Urine and Bile as Matrices to Screen for the Residues Of Two Sulfonamides. Using a Semi-automated Enzyme Immunoassay. *Analyst.* **122**:165-168. 1997.
- [5] FRANCO, D.A.; WEBB, J.; TAYLOR, C.E. Antibiotic and Sulfonamide Residues in Meat: Implications for Human Health. *J. Food Prot.* **53**:178-185. 1990.
- [6] FSIS-USDA. Food Safety and Inspection Service. Determining Acceptability of Methods for Regulatory Purposes (2.2.3). **Chemistry** Laboratory Quality Assurance Handbook. Vol. II. United State Department of Agriculture, Beltsville, MD. USA. 6. 1987.
- [7] HORWITZ, W. Analytical Methods for Sulfonamides in Foods and Feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**:104-130. 1981.
- [8] JENKE, R.D. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **19**:737-757. 1996.
- [9] LITTLEFIELD, N.A.; GAYLOR, D.W.; BLACKWELL, B.N.; ALLEN, R.R. Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies of Sulfamethazine in B6C3F<sub>1</sub> Mice. *Food Chem. Toxicology.* **27**:455-463. 1989.
- [10] LONG, A.R.; HSIEH, L.C.; MALBROUGH, M.S.; SHORT, C.R.; BARKER, S.A. Matrix Solid Phase Dispersion Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Sulfadimethoxine in Catfish (*Ictalurus punctatus*) Muscle Tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**:868-871. 1990.
- [11] LONG, A.R.; HSIEH, L.C.; MALBROUGH, M.S.; SHORT, C.R.; BARKER, S.A. Multiresidue Method for the Deter-

- mination of Sulfonamides in Pork Tissue. *J. Agric. Food Chem.* **38**:423-426. **1990**.
- [12] MOATS, W.A. Advances in Determination of Antibiotic Residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **80**:1-4. **1997**.
- [13] Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO. Control de Residuos Tóxicos en Carne, Grasa, Hígado y Riñón de Bovinos, Equinos, Porcinos y Ovinos. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 10-24. **1994**.
- [14] PORTER, S. Confirmation of Sulfonamide Residues in Kidney Tissue by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analyst.* **119**:2753-2756. **1994**.
- [15] SÁNCHEZ, R.L.; FUENTES, H.V.; SUMANO, L.H. Detección de Residuos de Sulfonamidas en Carne y Vísceras de Bovinos Sacrificados. *Cebú* **14**:72-78. **1988**.
- [16] STEELE J.H.; BERAN, G.W. Perspectives in the Uses of Antibiotics and Sulfonamides. En: Handbook Series in **Zoonoses**. Antibiotics, Sulfonamides and Public Health. CRC Press, Boca Raton, Florida. **3-8**. **1984**.
- [17] SWEENEY, R.W. Pharmacokinetic Model for Predicting Sulfamethazine Disposition in Pigs. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 750-754. **1993**.
- [18] VÁZQUEZ-MORENO, L.; BERMÚDEZ, M.C.; LANGURÉ, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; DÍAZ DE AGUAYO, M.; FLORES, E. Antibiotic Residues and Drug Resistant Bacteria in Beef and Chicken Tissues. *J. Food Sci.* **55**: 632-634, **657**. **1990**.
- [19] WHIPPLE, D.M.; SAMUELSON, G.; HEATH, G.E.; SHOWALTER, D. H. Tissue Residue Depletion and Recycling of Sulfamethazine in Swine. *J. AVMA.* **176**:1348-1352. **1980**