



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIETAS CON DIFERENTES  
NIVELES DE ETOXIQUINA SOBRE SU CONCENTRACIÓN EN EL  
MÚSCULO DEL SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).  
ESTUDIO PRELIMINAR**

**RODRIGO EDUARDO GAMBRA MIDDLETON**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias Clínicas.

**Financiamiento: EWOS Innovation Chile S.A.**

**PROFESOR GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ**

**SANTIAGO - CHILE  
2008**



Esta obra está publicada bajo una licencia Creative Commons Atribución 3.0 Chile. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/cl/>



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DE LAS DOSIS DE ETOXIQUINA SOBRE SU  
CONCENTRACIÓN EN EL MÚSCULO DEL SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar*), EN DIETAS COMERCIALES**

**RODRIGO EDUARDO GAMBRA MIDDLETON**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias Clínicas.

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	DRA. BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DRA. DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	DR. PEDRO SMITH SCHUSTER	_____	_____

**SANTIAGO - CHILE  
2008**

***A mis padres, mi hermano y mis mascotas.***

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mis padres Raúl Alfonso Gamba Órdenes y María Cecilia Middleton Torres, los pilares fundamentales de mi vida, por su amor y esfuerzos de toda una vida para hacer de sus hijos personas de valor, motivándonos a ser mejores cada día. A mi hermano Javier Alfonso Gamba Middleton, mi compañero y amigo de toda la vida por tener siempre la mejor disposición para ayudarme cuando lo he necesitado y hacer posible que yo pudiese disponer del tiempo necesario para escribir esta tesis. A nuestra amiga Fabiola Maureira Cornejo, quien ha llegado ser parte importante de nuestra familia, con su preocupación y su inagotable energía. Parte fundamental de mi familia son y han sido, también, mis mascotas Morfito, Chispa, Mora, Eöwyn, Dryas, Caspian, Bessie, Beruna, Nonny, Mancha, Negrita, Patán, Nona, Luciano, Choco, Berilio, Mota, Nico, Scrat, Doña Flor, Moisés, Carlitos y todas mis gallinas y gallos sin nombre. El amor incondicional que he recibido de ellos a lo largo de mi vida es lo que me ha motivado a escoger esta vocación e insistir en ella. Por su parte, ha sido absolutamente invaluable el apoyo y cariño que me han brindado mis amigos y amigas Dr. Luis Alberto Vera Kellet, Dra. Katherine Andrea Tapia Castro, Dra. Susan Marjorie Miranda Vicencio, Dr. Janilson Alex Carvajal Navarrete y Dra. Mirna Leonora Vargas Osses quienes han estado siempre conmigo en las buenas y las malas, aconsejándome, orientándome en la dirección correcta y, además, me han dado valiosas sugerencias para la elaboración de este documento.

A continuación, quiero agradecer la imprescindible participación de las personas directamente involucradas en el desarrollo de esta memoria de título. A mi profesora guía, la

Dra. Betty San Martín N., por haberme acogido como su tesista y dedicarme parte de su precioso tiempo para enseñarme a pensar y expresarme con rigor científico y, además, poner a mi disposición los recursos de laboratorio necesarios para el procesamiento de las muestras. Agradezco, asimismo, a mis profesores consejeros: la Dra. Daniela Iragüen Contreras y el Dr. Pedro Smith Schuster por su diligencia, celeridad, valiosos y certeros consejos conducentes a lograr la máxima perfección de este documento. También agradezco al Dr. Javier González, de la empresa EWOS Innovation Chile S.A. por haberme incluido en el desarrollo de este proyecto, permitiendo utilizar los resultados para elaborar esta memoria. A la Dra. Valeria Rojas Escudero por su excelente disposición y aportes fundamentales en el procesamiento de los datos y estructuración del documento. Por otra parte, agradezco a: Dra. Javiera Cornejo, Francesco, Peter, Majolie, Rossana, Sra. Antonieta, Patty, Odette, Sra. Oriana, Nancy y todo el personal del Laboratorio Farmacológico Veterinario por su cooperación, amistad y buena disposición. También a Lorena Ruiz, Martín Hevia, Fanny, Mónica Ojeda, Fredy, Don Manuel y todo el personal de Fundación Chile en Quillaipe por su cooperación, amistad y buena disposición. A la familia Rubio Cárdenas por recibirme en su casa durante la etapa de terreno y hacerme sentir en familia.

Además agradezco, especialmente, al fallecido Dr. Nelson Barría Pérez quien siempre tuvo fe en mi capacidad, aún cuando yo mismo no lo creía.

Y por último, pero en ningún caso menos importante, agradezco de todo corazón a los 505 peces que, inconscientes de ello, rindieron su vida durante este experimento para que yo pueda ser un profesional y marcar la diferencia en las vidas de otros animales.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Descripción general y principales aplicaciones.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Distribución, metabolismo y eliminación en los organismos animales.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Posibles efectos benéficos sobre la salud animal y humana.....</b>	<b>7</b>
<b>4. Efectos adversos en la salud animal y humana .....</b>	<b>11</b>
<b>5. Reglamentos internacionales respecto al uso de etoxiquina.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Métodos analíticos .....</b>	<b>19</b>
6.1 Cromatografía de gases.....	20
6.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento .....	21

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
1. Objetivo general.....	25
2. Objetivos específicos .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
1. Animales de experimentación.....	26
2. Alimentación.....	26
3. Diseño experimental .....	27
4. Obtención de las muestras .....	29
5. Método analítico utilizado en el filete.....	29
6. Evaluación de la concentración de etoxiquina.....	30
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
1. Primera etapa: administración de etoxiquina .....	31
2. Segunda etapa: retiro del alimento con etoxiquina.....	32
2.1 Declinación en los peces con dieta libre de etoxiquina.....	32
2.2 Declinación en los peces sometidos a ayuno.....	38
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

<b>ANEXO A: FOTOGRAFÍAS DE LAS INSTALACIONES, PROCEDIMIENTOS DE TERRENO Y DE LABORATORIO.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO B: CUADROS COMPLEMENTARIOS.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

FIGURA N° 1: Distribución de los peces en la primera y segunda etapas.....	28
CUADRO N° 1: Rango de concentraciones de etoxiquina (ppb) en filetes de salmón del Atlántico observados a los 30 días de alimentación, según dieta.....	31
CUADRO N° 2: Rangos de concentraciones mínima y máxima de etoxiquina (ppb) por día de muestreo, según dieta, durante la segunda etapa. ....	32
FIGURA N° 2: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo b, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa. ....	33
FIGURA N° 3: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo c, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.....	34
FIGURA N° 4: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo d, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa. ....	35
FIGURA N° 5: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo e, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa. ....	36
FIGURA N° 6: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo f, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa. ....	37
CUADRO N° 3: Rangos de concentraciones mínima y máxima de etoxiquina (ppb) por día de muestreo, según dieta, durante la segunda etapa. ....	38
FIGURA N° 7: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo b, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa. ....	39
FIGURA N° 8: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo c, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa. ....	40
FIGURA N° 9: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo d, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa. ....	41

FIGURA N° 10: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo e, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa. ....	42
FIGURA N° 11: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo f, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa. ....	43

## RESUMEN

Con el objetivo de estudiar la presencia de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico y su concentración, obtenida después de alimentar peces con dietas que incorporan este antioxidante en diferentes concentraciones, se diseñó un experimento que contempló condiciones propias del manejo en terreno en el sur de Chile. Para ello, en este estudio preliminar se utilizó quinientos cinco salmones, los cuales fueron alimentados durante sesenta días con cinco dietas experimentales que contenían 11, 21, 107, 221 y 398 partes por millón de etoxiquina y una dieta control libre de ella. A continuación, algunos fueron sometidos a ayuno y otros continuaron siendo alimentados con la dieta libre de etoxiquina, durante 28 días, y fueron muestreados en los días 0, 3, 7, 14, 21 y 28 de esta etapa. Las muestras fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con detección de fluorescencia y las concentraciones detectadas fueron comparadas con los Límites Máximos Residuales de 10, 500 y 1.000 partes por billón correspondientes a las legislaciones de Alemania, los Estados Unidos de Norteamérica y Japón, respectivamente.

La dispersión de los resultados obtenidos indicó una gran variabilidad individual de los peces. Además, se detectó la presencia de etoxiquina en filetes del grupo control hasta el día 21 del período post-administración de etoxiquina. En los peces que recibieron 21 y 398 partes por millón de etoxiquina, esta superó el LMR 10 partes por billón hasta el día 28 en aquellos peces que continuaron consumiendo la dieta control. Esto también ocurrió en los peces que recibieron 221 y 398 partes por millón de etoxiquina y luego fueron sometidos a ayuno. En los peces ayunados que recibieron 398 partes por millón de etoxiquina, los LMR

1.000 y 500 partes por billón fueron superados hasta el día 3.

Los resultados obtenidos permiten recomendar la utilización de un número poblacional más elevado cuando se trabaja con peces en condiciones de terreno, así como también el análisis de los alimentos con métodos de alta sensibilidad, entre otras medidas.

**Palabras clave:** etoxiquina, salmón del Atlántico, HPLC, Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, LMR, Límite Máximo Residual, Alemania, Estados Unidos, Japón.

## ABSTRACT

With the aim to study the presence of ethoxyquin in Atlantic salmon fillets and its concentration, achieved after feeding fish with diets incorporating this antioxidant in different concentrations, an experiment was designed considering typical field conditions from southern Chile. Consequently, in this preliminary study 505 Atlantic salmon were used and fed during 60 days with five diets containing 11, 21, 107, 221 and 398 parts per million of ethoxyquin and one diet ethoxyquin-free. Afterward, some of them were fasted whilst others were kept on feeding with ethoxyquin-free diet, during 28 days, and sampled on days 0, 3, 7, 14, 21 and 28 of this phase. Samples were analysed through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection and detected concentrations compared with Maximum Residue Limits of 10, 500 and 1,000 parts per billion, corresponding to Germany, the United States of America and Japan, respectively.

The results dispersion indicated great individual fish variability. Besides, ethoxyquin was detected in control group fillets until day 21 of the post-administration phase of ethoxyquin in food. In fish that received 21 and 398 parts per million of ethoxyquin in food, it went beyond LMR 10 parts per billion up to day 28, when kept feeding control diet. This also happened in fish receiving 221 and 398 parts per million of ethoxyquin in food and subsequently fasted. Fasted fish receiving 398 parts per million of ethoxyquin in food overcame the LMR 1,000 and 500 parts per billion up to day 3.

The achieved results do allow recommending using a bigger population if working with

fish on field conditions, as well as analysing foods with high sensibility methods also, among other measures.

**Keywords:** ethoxyquin, Atlantic salmon, HPLC, High Performance Liquid Chromatography, MRL, Maximum Residue Level, Germany, United States, Japan.

## INTRODUCCIÓN

La etoxiquina es un compuesto químico de origen sintético con capacidad antioxidante, de amplio uso en la industria de los alimentos destinados al consumo animal, debido a sus grandes ventajas comparativas respecto a otros compuestos, tales como el butil-hidroxi-anisol (BHA) o el butil-hidroxi-tolueno (BHT). Esta capacidad antioxidante lo hace especialmente valioso, por ejemplo, para la preservación de las harinas y aceites de pescado utilizadas en la formulación dietas para salmones. Adicionalmente, le confiere un notable interés desde el punto de vista logístico para el almacenamiento de grandes volúmenes de estas harinas.

Sin embargo, este producto enfrenta serios cuestionamientos por su toxicidad, la cual ha sido demostrada en múltiples estudios que abordan este riesgo en modelos *in vitro* e *in vivo*. Esto ha conducido a su proscripción en alimentos destinados al consumo humano en varios países del mundo.

Ante este escenario, surge la interrogante sobre la posibilidad de que la población humana ingiera este compuesto químico en forma indirecta y desintencionada al ser incorporado en la dieta de los salmones, lo cual pudiera constituir un riesgo para la salud pública. Debido a lo expuesto, el objetivo de este estudio fue determinar la concentración de etoxiquina en filete de salmón a través del tiempo, como un indicador de períodos de retiro en los peces que sean suficientes para permitir que los consumidores reciban un producto seguro, acorde con las normativas internacionales. Para ello se utilizó como referencia las legislaciones de Alemania, Estados Unidos de Norteamérica y Japón.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Descripción general y principales aplicaciones

La etoxiquina (EQ, 1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetilquinolina; N° CAS 91-53-2) es un compuesto químico de origen sintético preparado originalmente por Knoevenagel (1921) y fue concebido inicialmente como un estabilizador de caucho, al evitar su agrietamiento por oxidación del isopreno. Su fórmula molecular es  $C_{14}H_{19}NO$  y su peso molecular es 217,34. Físicamente, es un líquido incoloro, fluorescente y viscoso; se torna café en contacto con el aire y presenta un punto de ebullición de 123 °C (De Koning, 2002).

Ha sido utilizada eficazmente como pesticida para la agricultura de frutales, controlando hongos e insectos en los cultivos y productos cosechados; también ha sido empleada como regulador del crecimiento vegetal y como preservante del color en paprika y ají en polvo (Blaszczyk *et al.*, 2003). En peras "D'Anjou" se ha aplicado en baños con dosis de 1.000, 1.750 y 2.750 ppm en combinación con diferentes regímenes de atmósfera controlada (Mielke y Drake, 2004). También se ha informado que posee propiedades antimicrobiales y antiozonantes (Taimr y Prusikova, 1991).

También es utilizada durante el almacenamiento y transporte de grandes volúmenes de las harinas de pescado, ya que son altamente susceptibles a la combustión espontánea a causa de reacciones oxidativas descontroladas, cuando la temperatura se eleva por sobre los 55 °C (De Koning, 2005; IMO, 2004).

Actualmente se utiliza como antioxidante en las premezclas vitamínicas lipofílicas (Bailey *et al.*, 1996) y alimentos que van a consumo animal (Błaszczyk y Skolimowski, 2005). En las dietas para salmones se utiliza para evitar la rancidez de los ácidos grasos polinsaturados presentes en las harinas y aceites de pescado debido a su importancia nutricional. Además, el alimento oxidado es uno de los principales factores inductores del estrés oxidativo que enfrentan los peces cultivados (Hamre *et al.* 2003), siendo este proceso el causante de la reducción del rendimiento productivo en algunos peces (Hamre *et al.*, 2004).

Como productos de su oxidación en las harinas y aceites de pescado se obtienen diversos compuestos reducidos que también poseen capacidad antioxidante. Aquellos de mayor relevancia son una quinolona o quinona imina (QI, 2,6-dihidro-2,2,4-trimetil-6-quinolona) y un dímero de etoxiquina (DM, 1,8'-bis(1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetilquinolina)) (De Koning, 2002). En un estudio realizado por De Koning (1998), la QI mantuvo un 80% de la eficacia propia de la etoxiquina en la harina de pescado, en tanto que el DM un 69% de eficacia.

Esta capacidad antioxidante estaría mediada por la posición C-8 de su estructura, según reportaron Gunstone *et al.* (1991), y sería más activa frente a temperaturas ambientales o relativamente bajas. Sanhueza *et al.* (2000) evaluaron la estabilidad térmica de la etoxiquina frente a un rango de temperaturas y períodos de tiempo habitualmente utilizados en la cocción de subproductos de la industria avícola, encontrando que a 150°C se inactiva el 60% de la etoxiquina, y que a 175°C se inactiva hasta el 70% de esta.

En el caso de los alimentos extruidos para perros, Gross *et al.* (1994) compararon la efectividad sobre el nivel de peróxidos de una mezcla de etoxiquina y butil-hidroxi-anisol

(BHA), respecto de otros preservantes. Los alimentos fueron almacenados a  $22,2 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$  durante 12 meses ó  $48,8 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$  durante 16 semanas. Los resultados indicaron que el consumo de alimento de los perros estuvo estrechamente asociado al nivel de peróxidos presente en los alimentos, prefiriendo los animales aquellos con menores niveles de estos. Además, se observó que la combinación etoxiquina/butil-hidroxi-anisol no presentó un incremento significativo del valor de peróxidos en ninguno de los regímenes térmicos. Por otra parte, en los alimentos frescos hubo predilección por aquellos alimentos adicionados con los otros preservantes evaluados, pero luego del período de almacenamiento, los menores niveles de peróxidos correspondieron al grupo de alimentos tratados con etoxiquina y butil-hidroxi-anisol.

También se ha empleado la etoxiquina como suplemento en los piensos de ganado de carne, con el fin de mejorar características organolépticas como el color y la concentración de malondialdehído (proveniente de la oxidación lipídica) en la carne, extendiendo así la fecha de vencimiento del producto final. Al respecto, es posible citar un estudio realizado por Maddock *et al.* (2003) en el cual se alimentó animales con piensos tratados con una mezcla de diferentes dosis de vitamina E con etoxiquina (en una dosis fija de 150 ppm). Los resultados indicaron una mejora en prolongar la fecha de vencimiento por medio de la preservación del color de la carne, sin embargo, aparentemente no hubo interacción entre etoxiquina y vitamina E, por lo cual no se pudo establecer efectivamente si la etoxiquina tuvo efecto alguno.

Por otra parte, como consecuencia de su utilización en la industria de los alimentos para animales, se ha informado que una fracción de la etoxiquina es arrastrada en las aguas residuales de las plantas procesadoras, causando alteraciones en los sistemas de tratamiento de los desechos líquidos (Shah *et al.*, 2005). Estos problemas incluyen

miscibilidad, mayor carga orgánica, color y olor. Estos autores emplearon un cultivo bacteriano mixto de tipo mesofílico y metanogénico, comprobando una inhibición severa de la producción de metano en los grupos sometidos a concentraciones de etoxiquina superiores a 150 mg/L. No se observó adaptación de los cultivos a concentraciones gradualmente incrementales de etoxiquina durante un período de 90 días; así como tampoco se observó degradación ni transformación de la etoxiquina por los cultivos bacterianos al cabo de 100 días de incubación.

Otro uso derivado de su capacidad antioxidante ha sido como preservante en ensilajes basados en productos animales. Así, Middleton *et al.* (2001) investigaron el efecto de la adición de etoxiquina a sistemas preservantes (por fermentación láctica y ácido ortofosfórico) de carcasas molidas de pollos. Sus resultados indicaron que la degradación proteica bacteriana fue significativamente superior luego de 45 días de almacenamiento cuando se empleo etoxiquina, posiblemente debido a que la integridad de la membrana bacteriana no fue alterada, permitiendo una mayor supervivencia de ellas. La combinación de etoxiquina y fermentación láctica probó ser el método de preservación con mayor índice de estabilidad oxidativa en los aceites extraídos del ensilaje. Sin embargo, la adición de etoxiquina incrementó significativamente los niveles de ácidos grasos libres en los lípidos, debido probablemente a la degradación proteica causada por las bacterias. Además, la etoxiquina incrementó en forma significativa los niveles de ácido esteárico y araquidónico tras 45 días de almacenamiento.

## **2. Distribución, metabolismo y eliminación en los organismos animales**

En el ratón, tanto en líneas silvestres como transgénicas, se ha descrito la existencia de tres vías metabólicas principales (Sanders *et al.*, 2001):

- O-desetilación a través de una enzima CYP desconocida del citocromo P450. En este caso los principales metabolitos marcadores son 1,2-dihidro-6-hidroxi-2,2,4-trimetilquinolina glucurónico (DHTG) y 1,2-dihidro-6-hidroxi-2,2,4-trimetilquinolina sulfato (DHTS).
- Conjugación mediada por glucuronosiltransferasa (GST). En este caso el principal metabolito marcador es el DHTG.
- Conjugación mediada por sulfotransferasa (ST). En este caso el principal metabolito marcador es el DHTS.

De estas vías metabólicas la conjugación mediada por GST es bastante activa, según se evidencia por la gran cantidad de conjugados GSH presentes en la bilis de ratas (Burka *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha caracterizado ninguno de estos productos en la orina de ratones o ratas, señalando que son excretados principalmente en las heces. También es posible que su excreción urinaria sea como compuestos conjugados no derivados de GSH (Sanders *et al.*, 2001)

Se ha informado que la absorción gastrointestinal en ratas y ratones es rápida, observándose concentraciones sanguíneas máximas dentro de una hora desde la ingestión. En los tejidos, las mayores concentraciones se encuentran en hígado, riñón y tejido adiposo. En cuanto a la excreción, esta es rápida y consiste principalmente en metabolitos a través de la orina, habiéndose reportado la eliminación de más de un 85% de dosis de hasta 25 mg/kg de peso vivo dentro de las siguientes 24 horas (JMPR, 2005).

Otra arista del comportamiento de la etoxiquina en los mamíferos dice relación con su capacidad de inducir la síntesis de enzimas involucradas en la fase II del metabolismo de otras drogas o xenobióticos, lo cual podría en algunos casos presentar efectos benéficos. Un

estudio realizado con ratones (Hayes *et al.*, 2000) comparó una línea silvestre con una línea mutante carente de la secuencia que codifica el factor 2 relativo al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, según su sigla en inglés). Este factor de transcripción génica regula la expresión de Glutación S-transferasa, que es una enzima involucrada en la fase II del metabolismo de drogas. Según los resultados obtenidos por estos autores, la administración en la dieta de los ratones de 0,5% p/p de etoxiquina, indujo niveles significativamente inferiores de las diferentes subunidades de Glutación S-transferasa en los animales mutantes respecto de sus pares silvestres. No obstante, su síntesis no fue abolida lo cual indicó la existencia de un mecanismo alternativo de activación génica.

### **3. Posibles efectos benéficos sobre la salud animal y humana**

El compuesto hexaclorofeno es un agente bacteriostático de amplio uso como desinfectante tópico y en detergentes líquidos. No obstante, la intoxicación con este compuesto provoca graves alteraciones en el sistema nervioso central que pueden, incluso, desencadenar la muerte. (Van Gemert y Killeen, 1998). Como método de protección, Hanig *et al.* (1984) pre-trataron ratas con etoxiquina y BHT e informaron que ambos compuestos fueron capaces de evitar los efectos letales del hexaclorofeno. Sin embargo, respecto del edema cerebral observado no fue posible dilucidar la existencia de potenciales efectos por parte de la etoxiquina y el BHT.

En un intento por establecer las propiedades carcinogénicas de varios antioxidantes comunes y los efectos modificadores de la carcinogénesis química de otros compuestos, Ito *et al.* (1986) diseñaron un experimento con ratas y hámsteres sirios, encontrando que la etoxiquina inhibió significativamente la carcinogénesis de adenomas y fibroadenomas mamarios iniciada por 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno en ratas hembra Sprague-Dawley.

Spaethe *et al.* (1989) llevaron a cabo un estudio con el fin de esclarecer el rol de diversos mediadores inflamatorios asociados con la hidronefrosis en un modelo cunícola, para lo cual emplearon etoxiquina, entre otros agentes farmacológicos, como inhibidor de ciclooxigenasa y lipoxigenasa. Sus resultados indicaron que la etoxiquina previno un aumento en la liberación de metabolitos de ácido araquidónico desde el riñón hidronefrótico perfusionado *ex vivo*. Histológicamente, se pudo apreciar una marcada reducción del 60% en la infiltración monocítica asociada a la obstrucción ureteral. Esta reducción se asoció a una marcada disminución de la producción de eicosanoides.

Por otra parte, Ohshima *et al.* (1996) estudiaron el efecto de la administración de diferentes dosis de etoxiquina sobre los niveles plasmáticos de colesterol y la concentración de carotenoides en pollos parrilleros. Los datos sugirieron que la inclusión de 50 ppm en la dieta era suficiente para promover el desarrollo de los pollos con una baja disminución en el depósito de carotenoides.

La etoxiquina también ha sido estudiada por su capacidad como agente quimioprotector frente a la hepatocarcinogénesis inducida por la Aflatoxina B<sub>1</sub>. Este compuesto es un metabolito producido por mohos comunes pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que son contaminantes habituales en las cosechas de cereales y otros alimentos en regiones con climas húmedos y cálidos (Eaton y Gallagher, 1994). En un estudio en ratas (Ellis *et al.*, 1993) se observó que una enzima involucrada en la detoxificación de la aflatoxina B<sub>1</sub>, denominada aflatoxina B<sub>1</sub> aldehído reductasa (AFAR), incrementó sus niveles. La detoxificación de la aflatoxina B<sub>1</sub> consistió en la reducción del citotóxico AFB<sub>1</sub>-8,9-dialdehído a la forma AFB<sub>1</sub>-8,9-dihidrodiol, la cual no tiene capacidad ligante a proteínas. En un estudio posterior (Ellis *et al.*, 1996) se determinó que la etoxiquina produjo un incremento de 15 veces en los niveles de aflatoxina aldehído

reductasa en el hígado de ratas, siendo esto el resultado de un incremento en la transcripción del RNA<sub>m</sub> correspondiente. Al mismo tiempo los autores sugieren que la etoxiquina induce otras enzimas reductoras de grupos carbonilo ya que observaron un incremento de 1,6 veces en la actividad reductora del compuesto 4-hidroxinonanal, el cual es un pobre sustrato para la AFAR.

Adicionalmente, se ha establecido la existencia de una segunda vía metabólica involucrada en la detoxificación de la aflatoxina B<sub>1</sub>. Esta corresponde a la enzima Glutatión S-transferasa, la cual también puede ser inducida por la etoxiquina. Esto ha sido sugerido por Hayes *et al.* (1996) quienes informaron de incrementos, atribuibles al uso de etoxiquina, de hasta 10 veces en los niveles de Glutatión S-transferasa y de hasta 15 veces en los de AFAR, en ratas macho de la línea Fischer.

En pollos parrilleros, se informó del efecto de la etoxiquina sobre el nivel de glutatión reducido (GSH) en hígado, duodeno e íleo intestinal. Los resultados indicaron niveles más elevados de GSH duodenal luego de 3 y 7 semanas de iniciada la alimentación con etoxiquina (125 ppm), así como también de GSH ileal luego de 3 semanas respecto de las aves que no recibieron etoxiquina en la dieta. Considerando que la glutatión peroxidasa reduce los peróxidos a alcoholes acuosos o lipídicos al catalizar la liberación de hidrógeno desde la fracción cisteinil del GSH, esto podría ser de particular importancia en la protección de las células del estrés oxidativo mediado por altos niveles de peróxidos en los alimentos (Wang *et al.*, 1997).

Por su parte, Bammler *et al.*, (2000) estudiaron el efecto quimioprotector de etoxiquina y otros compuestos sobre la hepatocarcinogenicidad inducida en primates no humanos. Sus datos sugirieron que la etoxiquina induce aumentos moderados de la

actividad conjugante de glutatión a aflatoxina B<sub>1</sub> mediada por Glutatión S-transferasa en el hígado de algunos de los monos titís (*Callithrix spp.*) empleados.

Posteriormente, en un estudio realizado en peces gato americano (*Ameiurus nebulosus*) se administró etoxiquina en la dieta en una concentración de 0,5% p/p y se determinó la actividad catalítica de la Glutatión S-transferasa frente a varios substratos diferentes. Los resultados indicaron un incremento significativo de 1,6 veces en la actividad contra 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB). Este incremento sería atribuible a una mayor síntesis de esta enzima y sugiere, en conjunto con otros estudios, que la inducción génica sería conservada entre distintas especies de peces (Henson *et al.*, 2001).

En otro ámbito, la etoxiquina ha sido evaluada en su efecto productivo al ser incorporada en dietas de consumo animal. Kestemont *et al.* (2001) diseñaron un experimento para comparar la ingestión de alimento, tasa de crecimiento y estado nutricional de la perca común (*Perca fluviatilis*) frente a dietas con y sin etoxiquina. Los resultados indicaron un rápido incremento de la ingestión de alimento en los grupos alimentados con dietas que incorporaron etoxiquina, independientemente del contenido lipídico de estas. La tasa de crecimiento indicó un significativo efecto favorable de la presencia de etoxiquina y el nivel lipídico. Respecto al estado nutricional, la adición de etoxiquina incrementó significativamente la proporción de ácidos grasos polinsaturados totales en el hígado y músculo esquelético.

En novillos, Han *et al.* (2002) diseñaron un experimento para investigar el rol de etoxiquina en el rumen, replicando las condiciones naturales en fermentadores artificiales de cultivo continuo con doble flujo. Sus resultados indicaron que no hubo alteraciones en la mayoría de los parámetros de interés, con excepción de un incremento de la digestibilidad

verdadera de materia orgánica (desde un 38% hasta un 45%) así como una disminución de la concentración de propionato (desde 51,1 mM hasta 42,4 mM) y un aumento de la concentración de butirato (desde 18,4 mM hasta 22,9 mM). No obstante, esto no alteró la concentración total de ácidos grasos volátiles ni de acetato.

#### **4. Efectos adversos en la salud animal y humana**

Ito *et al.* (1986) en su experimento con ratas F344 y hámsteres sirios informaron de inducción de adenomas renales iniciados por *N*-etil-*N*-hidroxietilnitrosamina en ratas. Además, subsecuentemente a la administración de 1,2-dimetilhidracina observaron que la etoxiquina aumento significativamente el número de tumores en el colon distal de ratas macho. También, la administración de etoxiquina incrementó significativamente la incidencia y número de papilomas e hiperplasias papilares y nodulares en la vejiga urinaria de ratas macho, previa inducción con *N*-butil-*N*-(4-hidroxibutil)nitrosamina.

Meydani *et al.* (1991) evaluaron la influencia de la etoxiquina, entre otros compuestos, en la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> en las regiones cerebrales del ratón. Los datos obtenidos indicaron que redujo significativamente los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol en un 42% y, al mismo tiempo, incrementó significativamente la concentración de vitamina E en el tallo cerebral.

Manson *et al.* (1992) informaron una significativa disminución del peso corporal en ratas Fischer F344, en hembras adultas y en machos destetados y adultos, así como también de un aumento del peso renal relativo al peso corporal. Esto último fue evidente en los machos, no así en las hembras. Además, observaron lesiones renales en los machos que variaron en función de la edad en que comenzaron a ser alimentados con la dieta experimental. En el caso de los machos adultos las lesiones se ubicaron en la corteza renal y

en los machos destetados observaron extensas necrosis de las papilas renales, así como también observaron mayores niveles de excreción de albúmina en la orina.

También se ha informado la inhibición del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, en homogeneizados de hígado y riñón de ratas y de corazón bovino (Reyes *et al.*, 1995). Estos investigadores concluyeron que: la etoxiquina inhibió el consumo de oxígeno en forma proporcional a su concentración en homogeneizados de riñón cuando se empleó glucosa como sustrato metabólico; inhibió el consumo de oxígeno en mitocondrias intactas de hígado de rata cuando se utilizó glutamato más malato; también inhibió el transporte de electrones en partículas sub-mitocondriales de corazón bovino y corteza renal de rata cuando se utilizó NADH como sustrato; y la etoxiquina, además, afectó la reducción del NADH en presencia de ferrocianida — un aceptor artificial de electrones — en partículas sub-mitocondriales de corazón bovino.

Por otra parte, Bailey *et al.* (1996) evaluaron la etoxiquina en pollos Leghorn y concluyeron que la etoxiquina, aún cuando previno la peroxidación tisular potencialmente excesiva, no fue efectiva en mejorar la respuesta inmune de las aves ante un desafío con vacuna contra la enfermedad de Newcastle. Así mismo, también observaron un aumento relativo del peso hepático entre los pollos alimentados con dosis de 1.000 ppm respecto de aquellos que recibieron 0, 125 ó 500 ppm, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, lo cual sugiere una potencial toxicidad. Al mismo tiempo, Ohshima *et al.* (1996) informaron de efectos adversos en pollos parrilleros enfrentados a altas dosis de etoxiquina en la dieta. Estos investigadores encontraron detrimentos en la ganancia de peso corporal y eficiencia de conversión alimenticia en los grupos expuestos a dosis superiores a 125 ppm. Además, el depósito de pigmentos carotenoides se redujo en forma lineal respecto al aumento en las dosis de etoxiquina recibida en la dieta. También detectaron que la

concentración de etoxiquina en el tejido graso de la piel de la pechuga se incrementó en forma lineal con la concentración de etoxiquina recibida.

En un estudio realizado en ratones, Dorey *et al.* (2000) compararon varios efectos entre la etoxiquina y otros compuestos quinolínicos derivados de esta, observando que esta produjo una significativa hipotermia. Los autores estimaron que probablemente el fenómeno se asociaba a la inhibición del transporte de electrones en la cadena mitocondrial reportado previamente por Reyes *et al.* (1995).

Neal *et al.* (2003) condujeron un estudio de dosis-respuesta en ratas Fischer F344, observando fuertes diferencias intersexo en la nefrotoxicidad causada por etoxiquina, siendo los machos afectados en forma mucho más severa que las hembras. Los autores concluyeron que la causa de este fenómeno no podía ser precisada, pero sugieren la posibilidad de que la albuminuria observada, podría potenciar la nefrotoxicidad o carcinogenicidad de otros compuestos xenobióticos.

Por otra parte, las dioxinas o dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) y los dibenzofuranos policlorados (PCDFs) son compuestos contaminantes lipofílicos muy persistentes que están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y son potencialmente bioacumulables (Cañedo y Macías, 2007). Al respecto, Baron *et al.* (2005), estudiaron la relación entre el contenido de dioxinas en las harinas de pescado y su exposición a diferentes regímenes de radiación ultravioleta B (UVB), en harinas adicionadas con 500, 1000 ó 3000 ppm de etoxiquina. Sus resultados indicaron que la etoxiquina en sus dos dosis mayores previno completamente el desarrollo de hidroperóxidos a partir de los lípidos durante la exposición a radiación UVB. Sin embargo, la concentración de dioxinas en la harina con 3000 ppm de etoxiquina – expresada como Cantidad de Equivalencia Tóxica

(TEQ, según su sigla en inglés) – fue mayor (1,72 nG TEQ/kg) que en la harina libre de etoxiquina (1,15 nG TEQ/kg). Los autores estimaron que esto indicaría que la degradación de las dioxinas y la oxidación lipídica pudieran ser procesos acoplados y, por lo tanto, la adición de etoxiquina a los alimentos representa un riesgo.

Diversos estudios han abordado, también, la toxicidad de la etoxiquina en modelos *in vitro* realizados con linfocitos humanos. Błaszczyk *et al.* (2003) evaluaron la actividad genotóxica en el ensayo de aberración cromosomal sobre cultivos de linfocitos humanos, tanto en presencia del factor de activación metabólica S9 como en su ausencia. Estos investigadores concluyeron que la etoxiquina produjo aberraciones cromosómicas en las dosis empleadas, siendo los cortes y fenestraciones de la cromátida las alteraciones más frecuentes. Estas y otras alteraciones acarrearían serias consecuencias biológicas. Estos hallazgos se condicen con un estudio posterior de Błaszczyk (2006), quien encontró *in vitro* evidencias de otro tipo de daño en el ADN de linfocitos humanos conjuntamente con citotoxicidad. Estos efectos también presentaron una marcada relación lineal de dosis-respuesta.

Adicionalmente, Błaszczyk y Skolimowski (2005) comprobaron la inducción de apoptosis en linfocitos humanos tras exponer cultivos durante 72 horas a diferentes concentraciones de etoxiquina entre 0,025 y 0,5 mM, obteniendo un valor de índice de citotoxicidad 50 (IC<sub>50</sub>) igual a 0,09 mM. Según los autores este efecto apoptótico pudiera deberse al fenómeno pro-oxidativo que presentan muchos antioxidantes en altas concentraciones.

Al respecto, otros investigadores han señalado que la etoxiquina y algunos metabolitos, mencionados más adelante, no representan un riesgo de genotoxicidad *in vivo*

(JMPR, 2005).

Estudios en humanos sólo han reportado casos de dermatitis alérgicas en trabajadores expuestos a la manipulación de alimentos animales formulados con etoxiquina (Alanko *et al.*, 1998; Rubel y Freeman, 1998, Rodríguez-Trabado *et al.*, 2007), sin embargo, esto sería el resultado de una sensibilización más que una reacción espontánea.

En un informe de la Reunión Conjunta de Expertos de la OMS y FAO sobre Residuos de Pesticidas (JMPR, 2005) se indicó la toxicidad aguda de la etoxiquina al ser administrada a ratas en forma oral ( $LD_{50}=1700$  mg/kg p.v), por vía cutánea ( $LD_{50}>2000$  mg/kg p.v) o por inhalación ( $LC_{50}>2$  mg/L). También se informó respecto a la evaluación de los efectos tóxicos de la administración de etoxiquina en una única dosis oral en perros. Al respecto, se administró dosis únicas orales desde 50 hasta 200 mg/kg de etoxiquina y los metabolitos demetiletoxiquina (DMEQ), metiletoxiquina (MEQ), deshidrometiletoxiquina (DHMEQ) y dihidroetoxiquina (DHEQ). Los resultados indicaron que la etoxiquina, MEQ y DHEQ provocaron incrementos de las concentraciones séricas y urinarias de bilirrubina en todas las concentraciones empleadas. Además, la etoxiquina y MEQ produjeron cambios en el hígado, indicativos de estasis biliar y/o acumulación de pigmento biliar. También fue evidente la instauración de signos clínicos post-administración, tales como emesis. Luego de un período de recuperación de dos semanas, se pudo apreciar un incremento de los niveles séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa y alanino aminotransferasa, indicativas de la función hepática. Los expertos establecieron en perros un Nivel sin Efectos Tóxicos Observables (NOAEL) de 50 mg/kg p.v.

El mismo comité de expertos estableció que el nivel mínimo necesario para la instauración de efectos clínicos y toxicidad hepática en perros es de 100 ppm (equivalente a

2,5 mg/kg por día). Para esto se basaron en un estudio de toxicidad reproductiva bi-generacional en perras alimentadas con dietas que contenían etoxiquina en concentraciones de 0, 100 ó 225 ppm. Si bien no hubo efecto sobre los parámetros reproductivos, incluso con la dosis más alta, sí hubo evidencia de signos clínicos (deshidratación y epífora) y toxicidad hepática, principalmente en las hembras.

En vista de los antecedentes de toxicidad observados en los animales alimentados con dietas que la incorporan en su formulación, es que actualmente se desarrollan investigaciones conducentes a preparar análogos u otros compuestos que la reemplacen (De Koning, 2002). En un estudio realizado por Thorisson *et al.* (1993) se sintetizó el compuesto 8-metiletoxiquina, un derivado de la etoxiquina, con el fin de favorecer la obtención de quinona imina como producto de degradación principal. Sin embargo, los autores concluyeron que al ser aplicado en harina y aceite de pescado la actividad antioxidante observada fue menos efectiva que la de la etoxiquina propiamente tal. Esto se podría atribuir a que la sustitución del hidrógeno de la posición 8 reduciría la efectividad de la 6-quinona imina. Por otra parte, De Koning (2002) evaluó diez compuestos derivados de la etoxiquina en cuanto a su eficacia antioxidante en harinas y aceites de anchoveta y sardina, concluyendo que la Hidroquina (1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) podría competir con la etoxiquina sobre la base de su costo y eficacia. A su vez, Błaszczuk *et al.* (2006) sintetizaron sales de etoxiquina combinándola con otros compuestos del grupo de los antioxidantes naturales con el fin de obtener compuestos cuyo poder antioxidantes fuese sinérgico. A continuación, fueron evaluadas en su potencial citotóxico, genotóxico y antioxidante y comparadas respecto a la etoxiquina. Los resultados permitieron concluir que todas las sales fueron menos genotóxicas y su actividad protectora fue tan alta como la de la etoxiquina, siendo el *n*-hexanoato de etoxiquina el compuesto más prometedor de ellos. En un estudio asociado, Błaszczuk *et al.* (2007a) observaron que todas estas sales fueron citotóxicas con

una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . No obstante la citotoxicidad de la etoxiquina fue mayor que la de estas sales, así como también fue un inductor más potente de fragmentación del ADN. En otro estudio, Błaszczuk *et al.* (2007b) sintetizaron y evaluaron otras dos sales de etoxiquina: un clorhidrato y un fosfato. Estas sales resultaron ser menos citotóxicas y genotóxicas que la propia etoxiquina, pero al mismo tiempo su actividad antioxidante también disminuyó, es especial el fosfato. Posteriormente, Kumar *et al.* (2007) prepararon una serie de análogos más pesados de etoxiquina mediante la inserción grupos etil-tio, etil-selenio y etil-teluro en la posición 6. Estos fueron comparados con la etoxiquina en cuanto a su capacidad catalítica y antioxidante (interrupción de la reacción en cadena y descomposición del peróxido de hidrógeno). Entre todos los compuestos evaluados sólo aquel que portaba el grupo etil-teluro cumplió a cabalidad con dichos objetivos.

## **5. Reglamentos internacionales respecto al uso de etoxiquina**

A nivel internacional existen reglamentaciones concernientes al uso de este antioxidante para la elaboración de alimentos destinados al consumo humano, así como también de insumos para la fabricación de alimentos de consumo animal tales como la harina y el aceite de pescado. A nivel nacional no existen reglamentos al respecto.

Mundialmente, rige con carácter de mandatorio el Reglamento de la Organización Marítima Internacional para el transporte de cargas peligrosas. Este considera, especialmente, a la harina de pescado como un producto inflamable, exigiendo que sean estabilizadas con dosis de 400 a 1.000 ppm de etoxiquina en un plazo no mayor a 12 meses previo al embarque. No obstante, la concentración remanente al momento del embarque no debe ser inferior a 100 ppm (IMO, 2004).

Respecto de los alimentos destinados al consumo de los animales domésticos y de

compañía, el reglamento (CE) N° 2316/1998 de la Comisión de las Comunidades Europeas, establece un límite máximo de 150 ppm para etoxiquina, sola o en conjunto con BHA y/o BHT, en todas las especies animales excepto el perro, en cuyo caso el límite es de 100 ppm específicamente para la etoxiquina (Comunidad Europea, 1998).

En los Estados Unidos de Norteamérica, el organismo encargado de la normativa es la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, 2006b). Este ha permitido su uso en los alimentos para consumo animal sujeto a las siguientes condiciones:

- Que su uso tenga el fin de retardar la oxidación del caroteno, xantofilas, vitaminas A y E, y como prevención del desarrollo de peróxidos orgánicos en la comida enlatada de perros.
- Que su dosis máxima remanente no exceda las 150 ppm.
- Esto debe ir acompañado, además, del correcto etiquetado de los envases de aditivo, premezclas y alimentos que contengan el compuesto.

Adicionalmente, la FDA solicitó a los fabricantes de etoxiquina y alimentos para mascotas la disminución voluntaria de los niveles máximos de incorporación a 75 ppm (CVM, 1997).

En alimentos de consumo humano, la Organización de las Naciones Unidas ha establecido recomendaciones a través de la Organización para los Alimentos y la Agricultura (FAO). Basándose en un estudio multigeneracional de toxicidad reproductiva en perros (mencionado previamente) se estableció un factor de seguridad de 500 veces para la Ingestión Diaria Permitida (ADI), lo cual significa un rango entre 0 y 0,005 mg/kg de peso corporal (Dewhurst, 1998). Este valor fue confirmado recientemente y extendido para incluir

también los metabolitos Metoxiquina, DHMetoxiquina y DHetoxiquina. Adicionalmente, utilizando un factor de seguridad de 100 veces respecto al NOAEL de 50 mg/kg p.v, se ha establecido que la Dosis Aguda de Referencia (ARfD) es de 0,5 mg/kg p.v (JMPPR, 2005).

Sin embargo, los efectos deletéreos han conducido a su proscripción en países como Bélgica, Dinamarca, España, Grecia, Holanda, Italia y Luxemburgo (De Koning, 2005). En el caso de los países que permiten su uso, existen regulaciones sobre las concentraciones máximas permitidas en los alimentos de origen animal destinados a ser consumidos por la población humana. Así, en los Estados Unidos de Norteamérica, la FDA (2006a) ha establecido un nivel de tolerancia de 500 ppb en carne cruda. En Japón, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW, 2005) ha establecido un Límite Máximo Residual (LMR) de 1000 ppb para la carne de salmónidos. En Alemania, la Oficina Federal para la Protección del Consumidor y Seguridad Alimentaria (BMELV, 2007), ha establecido un LMR de 10 ppb.

## **6. Métodos analíticos**

La disponibilidad de métodos analíticos efectivos y prácticos, para la determinación del cumplimiento con los Límites Máximos Residuales de drogas de uso veterinario, que sean capaces de detectar, cuantificar e identificar todos los residuos presentes en los alimentos representa una situación ideal que los gobiernos debieran impulsar. Esto permite a las autoridades reguladoras usarlos rutinariamente en sus programas de control de residuos asegurando el cumplimiento de los requerimientos de seguridad alimentaria (Codex Alimentarius, 1993).

Los principales atributos de los métodos analíticos en los programas de control de residuos son especificidad, precisión, exactitud (medida como error sistemático y recuperación) y sensibilidad (Codex Alimentarius, 1993).

Los programas de control de residuos de fármacos y contaminantes han abordado el tema de los métodos analíticos en muchas publicaciones, detectando etoxiquina en frutas, especias e insumos alimenticios. Dichas técnicas incluyen un abanico de posibilidades tales como: espectrometría, cromatografía de capa fina, cromatografía de capa fina de alta presión, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alto rendimiento; siendo estas dos últimas las más frecuentes (He y Ackman, 2000a).

La cromatografía de gases con un detector de ionización de llama posee la ventaja de una muy alta sensibilidad y la desventaja de una posible descomposición de la etoxiquina debido a la alta temperatura de la columna. Por el contrario, la cromatografía líquida de alto rendimiento evita esta descomposición, pero el costo es una menor sensibilidad del método (He y Ackman, 2000a).

La utilización de técnicas cromatográficas, ya sea de gases o líquida de alto rendimiento, requiere de la existencia de estándares de alta pureza como un elemento crítico en el establecimiento de líneas de calibración para la determinación cuantitativa (He y Ackman, 2000b). Actualmente, es posible encontrarlos disponibles comercialmente para etoxiquina, dímero de etoxiquina y etoxiquina des-etilada. Respecto a la quinona imina, He y Ackman, (2000b) describen su purificación utilizando HPLC de fase reversa.

## **6.1 Cromatografía de gases**

Skaare y Dahle (1975) compararon la estabilidad de etoxiquina a través del tiempo en dos soluciones, *n*-hexano y cloroformo, utilizando cromatografía de gases (GC) combinada con espectrometría de masas (MS). Los autores informaron de una extrema labilidad de la

etoxiquina al ser expuesta a la luz y en las soluciones con cloroformo se observó un incremento en la intensidad del color y entre 35-70% de pérdida de la etoxiquina detectable, en soluciones de concentración decreciente. En cambio, las soluciones en *n*-hexano permanecieron inalteradas luego de un mes de almacenamiento. En consecuencia, recomendaron este solvente para la extracción de etoxiquina desde sistemas biológicos y el trabajo analítico.

En una variación del método anterior, Dahle y Skaare (1975) detectaron etoxiquina en harina de pescado, carne de trucha arco iris y carne de pollo. Utilizando un sistema de separación por GC con detector de ionización de llama obtuvieron un límite de detección de 10 nanogramos y un promedio de 30% de recuperación de la etoxiquina adicionada en estas matrices.

Posteriormente, en un experimento con peras de la variedad Blanquilla tratadas con un producto comercial que contiene etoxiquina, López y Riba (1999) desarrollaron un método de cromatografía de gases con un detector de ionización de flama alcalina (detector de nitrógeno y fósforo). Este método fue más barato y rápido que la utilización de HPLC en esta matriz. Los límites de detección obtenidos fueron de 0,4 ppm de etoxiquina en cáscara fresca y de 0,15 ppm en pulpa fresca, siendo los rangos de recuperación 77-97% y 77-82%, respectivamente.

## **6.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento**

Varias publicaciones han abordado la detección de etoxiquina con HPLC en la harina de pescado y los alimentos para salmones y/o en los tejidos del salmón, especialmente en el músculo. Así, en el primer caso es posible citar el trabajo de Schreier y Greene (1997) cuyo

método analítico fue adoptado como estándar oficial de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC). El procedimiento contempla:

- preparación de soluciones estándares de calibración
- extracción con acetonitrilo (ACN)
- el análisis con HPLC isocrático y detección de fluorescencia

Posteriormente, He y Ackman (2000a), diseñaron un método para detección simultánea de etoxiquina, quinona imina, y dímero de etoxiquina mediante HPLC de fase reversa y fluorescencia. Este consiste en:

- extracción desde la muestra con hexano
- secado bajo flujo de nitrógeno
- extracción desde el extracto oleoso con ACN
- Separación en columna C<sub>18</sub> y elusión con una fase móvil de una solución de ACN-acetato de amonio 0,01M (80:20 v/v)
- Detección de fluorescencia con una longitud de onda de 280 nanómetros.

El promedio de recuperación fue de 95% para etoxiquina, 98% para dímero de etoxiquina y 83% para quinona imina. Los límites de detección fueron 5ppm para etoxiquina y dímero de etoxiquina y 0,5 ppm para quinona imina.

Por su parte, Brannegan *et al.* (2001) desarrollaron un método de detección de etoxiquina utilizando un sistema de HPLC acoplado a un detector de nitrógeno por quimioluminiscencia (CLND). Este detector se caracteriza por permitir cuantificar cualquier compuesto que contenga nitrógeno en su estructura en tanto se conozca el número de estos. Además, no se requiere de la utilización de un estándar. En este método, los autores separaron etoxiquina y sus productos de oxidación tanto en fase normal como reversa. En

fase reversa utilizaron una fase móvil binaria de 75% metanol y 25% isopropanol (solvente A) y 100% agua (solvente B) en una gradiente de 55% A – 45% B hasta 95% A – 5% B durante 20 minutos. De este modo, lograron sobre un 90% de resolución de *N*-óxido quinona imina, quinona imina, dimetil-etoxiquinolina, etoxiquina y dímero de etoxiquina (en orden de secuencia). El sistema exhibió, en resumen, una respuesta independiente del tipo de nitrógeno, linealidad desde 50 hasta 6.400 picomoles y una sensibilidad de 25 picomoles de nitrógeno (0,35 nanogramos).

Recientemente, Bohne *et al.* (2007) diseñaron un método de HPLC de fase reversa con detección por fluorescencia que permite la detección cuantitativa y simultánea de etoxiquina y dímero de etoxiquina en los tejidos del salmón del Atlántico. Este consiste en:

- extracción con etanol, pirogalol, ácido ascórbico, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), hidróxido de sodio, cloruro de sodio y hexano
- Secado bajo flujo de nitrógeno
- Reconstitución en ácido acético y ACN
- Separación en dos columnas acopladas en tandem (C18 y fenil-hexil) y elusión con una fase móvil binaria en una secuencia cíclica de dos gradientes, por 23,5 minutos. El solvente 1 consiste en una mezcla de 20% buffer y 80% de una solución de ácido ascórbico en ACN al 0,1% p/v. El solvente 2 consiste en 100% de la última solución.
- Detección de fluorescencia con longitudes de onda de 358 y 433 nanómetros para excitación y emisión, respectivamente.

El límite de detección reportado es de 0,02 y 0,06 µg/L para etoxiquina y dímero, respectivamente. El límite de cuantificación es 0,07 y 0,21 µg/L para etoxiquina y dímero, respectivamente. La repetibilidad y la precisión entre ensayos estuvieron en el rango entre 2,3-10,6% y 10,4-20,9%, respectivamente. La exactitud obtenida fue 96-99%.

Adicionalmente, este método es capaz de detectar también otros metabolitos presentes en el tejido muscular tales como quinona imina, etoxiquina des-etilada y un metabolito desconocido.

En consecuencia, las características de los métodos analíticos de cromatografía líquida de alto rendimiento de que se dispone en la actualidad los hacen adecuados para los objetivos propuestos en este ensayo.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Evaluar, en el filete de salmón del Atlántico, las concentraciones de etoxiquina que se obtienen después de alimentar con dietas con diferentes concentraciones de etoxiquina.

### **2. Objetivos específicos**

- Controlar el rango de concentraciones de etoxiquina alcanzado en filetes de salmónes alimentados con dietas suplementadas con diferentes niveles de etoxiquina, durante el período de administración de sesenta días.
  
- Determinar el rango de concentraciones de etoxiquina en filetes de salmónes alimentados con dietas suplementadas con diferentes niveles de etoxiquina, durante el período de retiro de la alimentación de veintiocho días.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación

El estudio *in vivo* fue realizado en las instalaciones de la estación experimental Quillaipe de Fundación Chile (Anexo A.4 – A.6) en la décima región de Chile. Se utilizaron 505 salmones del Atlántico (*Salmo salar*) de aproximadamente 1 kg. de peso. Estos fueron marcados mediante una pistola de inyección de tinta, dispuestos en dieciocho estanques de 1 m<sup>3</sup> y dotados de un sistema de reutilización de agua de mar, con un flujo aproximado de 50 litros por minuto. Los peces fueron mantenidos entre 13,4 y 17,4 °C. El oxígeno disuelto en el agua osciló entre 7,1 y 10 ppm y fue suplido artificialmente.

Previo al inicio del estudio, los peces fueron alimentados con una dieta libre de etoxiquina durante dos semanas.

### 2. Alimentación

Las dietas fueron elaboradas por la planta de alimentos de EWOS CHILE S.A. Los ingredientes utilizados en la formulación (Anexo B.1) fueron harina de jurel, astaxantina (AquAsta<sup>®</sup>), gluten de maíz, concentrado de soya, trigo molido, premezclas de vitaminas y minerales, y una mezcla de aceites vegetales y de pescado (OilMIX<sup>®</sup>). El tamaño del pellet fue entre 7 y 8 mm (Anexo A.1 – A.3).

La etoxiquina fue dosificada en la harina de jurel, obteniéndose una concentración final de 1813 ppm. La harina de jurel y la etoxiquina (Anexo B.2) fueron provistas por SOUTH PACIFIC KORP (SPK).

Se empleó cinco grupos experimentales a los cuales se les administró diferentes concentraciones de etoxiquina en la dieta (B, C, D, E, F). El grupo A recibió una dieta control libre de etoxiquina. Los restantes grupos recibieron dietas con concentraciones de 11, 21, 107, 221 y 398 partes por millón (ppm) de etoxiquina, respectivamente.

Las concentraciones de etoxiquina obtenidas en la harina de pescado y en cada una de las dietas elaboradas fueron certificadas por el laboratorio Bioquality (Puerto Montt) y determinadas mediante una técnica de extracción por solvente (el límite de detección informado por el laboratorio fue de 1,9 ppm). Además, los alimentos fueron evaluados por el mismo laboratorio con el fin de monitorear la rancidez, según el método de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1997).

Durante la etapa de administración de etoxiquina los peces fueron alimentados a saciedad, mediante alimentadores automáticos, cuatro veces al día (Anexo A.7). Durante la etapa de retiro del alimento con etoxiquina se continuó alimentando con la dieta libre de etoxiquina a la mitad de los peces. Estos fueron alimentados a saciedad, en forma manual y tres veces al día.

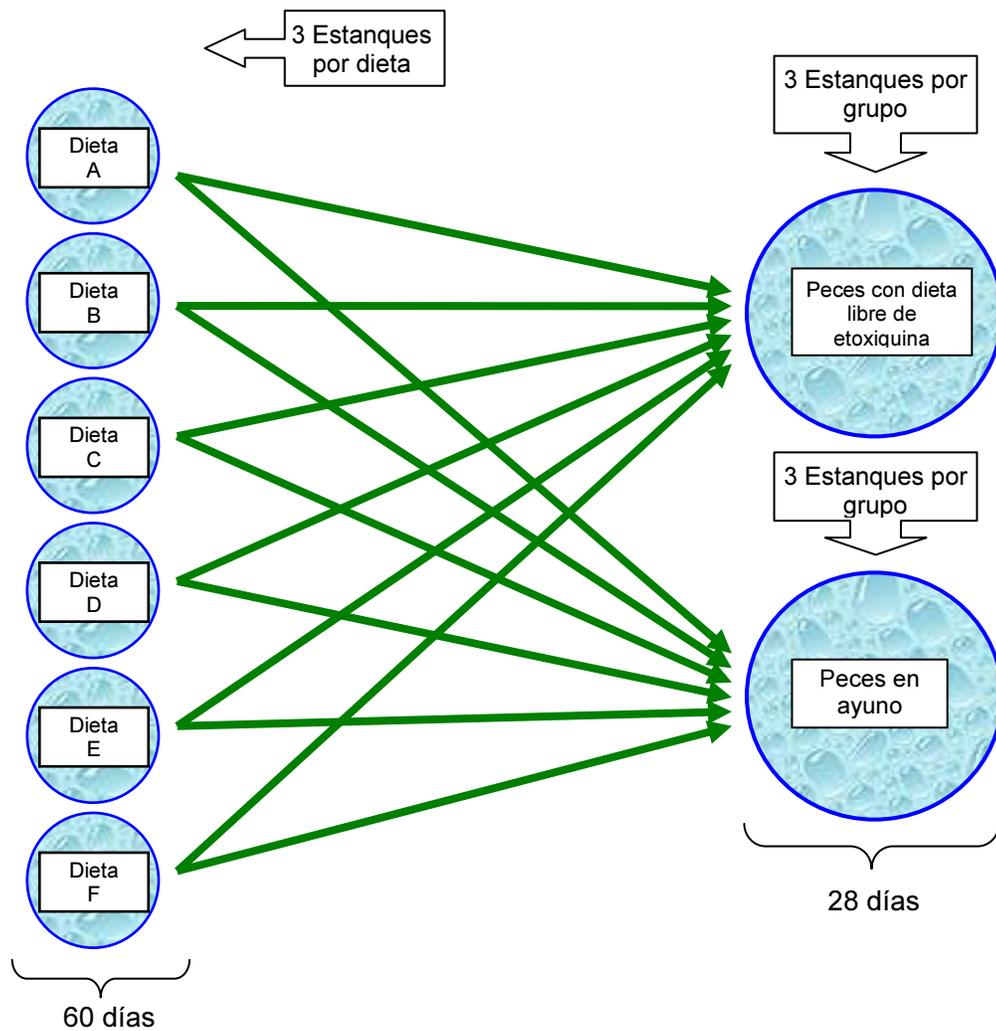
### **3. Diseño experimental**

El experimento tuvo una duración total de 88 días, divididos en dos etapas:

- Primera Etapa: tuvo una duración de sesenta días y consistió en la administración de cinco dietas que contenían diferentes concentraciones de etoxiquina a cinco grupos de peces y una dieta libre de etoxiquina a un grupo control. En esta etapa a cada grupo se le asignó, al azar, 3 estanques con 28 peces en cada uno, inicialmente.

- Segunda Etapa: tuvo una duración de veintiocho días y consistió en el retiro del alimento con etoxiquina. En esta etapa los peces fueron redistribuidos en 6 estanques de 3 M<sup>3</sup> con 54 peces en cada uno, tal como se ilustra en la figura N° 1. En 3 de estos estanques los peces fueron sometidos a ayuno y en los otros 3 fueron alimentados con dieta libre de etoxiquina.

Figura N° 1: Distribución de los peces en la primera y segunda etapas.



#### **4. Obtención de las muestras**

El sacrificio de los peces se realizó por exanguinación mediante la disección de los arcos branquiales. Este procedimiento fue precedido de una sedación con Etil-p-aminobenzoato (BZ-20®) diluido al 0,004% en el estanque (Anexo A.8 y A.9).

Los días de sacrificio durante la primera etapa fueron: 0 y 30. Los días de sacrificio durante la segunda etapa fueron: 0, 3, 7, 14, 21 y 28. En cada oportunidad se muestreó un mínimo de 4 peces de cada grupo experimental.

La muestra correspondió al filete izquierdo de cada pez, con piel y espinas. Esta fue envuelta en papel aluminio, identificada, embolsada en polietileno, congelada por 48 horas a -20°C y enviada al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Laboratorio acreditado por el Instituto Nacional de Normalización (INN) de Chile bajo la norma ISO 17025 Of.2005) para su análisis.

#### **5. Método analítico utilizado en el filete**

En el laboratorio, los filetes de salmón fueron molidos y homogeneizados individualmente, separando una muestra y una contramuestra que fueron identificadas y congeladas hasta el momento de ser procesadas.

Las muestras fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con detección de fluorescencia (Anexo A.10 – A.14), utilizando como referencia el método descrito por He y Ackman (2000b) y previamente validado por el Laboratorio según la Directiva 2002/657/CE de la Unión Europea. El límite de detección informado es de 5 ppb y el límite de cuantificación de 10 ppb.

## **6. Evaluación de la concentración de etoxiquina**

Las concentraciones de etoxiquina en músculo durante la segunda etapa fueron representadas en un gráfico de dispersión de puntos y estos fueron comparados con los Límites Máximos Residuales de las legislaciones de Japón, EE.UU. y Alemania (1.000 ppb, 500 ppb y 10 ppb respectivamente).

Para efectos de graficar la dispersión de los datos, los valores no detectables (ND) según la metodología empleada fueron substituidos por cero.

## RESULTADOS

### 1. Primera etapa: administración de etoxiquina

El resumen de los datos de concentración de etoxiquina en el filete de salmón del Atlántico durante la primera etapa se presenta en la Cuadro N° 1.

**Cuadro N° 1: Rango de concentraciones de etoxiquina (ppb) en filetes de salmón del Atlántico observados a los 30 días de alimentación, según dieta.**

Dieta	n	Rango
A	9	ND – 30
B	9	ND – 57
C	9	ND – 221
D	9	7 – 939
E	9	16 – 517
F	9	ND – 3.559

n: Número de observaciones.  
ND: No detectada.

En el día 0, antes de asignar las diferentes dietas experimentales, fueron analizados 36 pescados y se detectó etoxiquina en 4 de ellos. Además, se puede apreciar que el grupo A presenta concentraciones detectables en el día 30 a pesar de haber recibido una dieta supuestamente libre de etoxiquina.

La amplitud y dispersión de las concentraciones de cada grupo experimental fue bastante elevada dando cuenta de la amplia variabilidad individual de los peces.

## 2. Segunda etapa: retiro del alimento con etoxiquina

### 2.1 Declinación en los peces con dieta libre de etoxiquina

El resumen de los datos de concentración de etoxiquina en el filete de salmón del Atlántico obtenidos en los días de muestreo, durante la segunda etapa en el grupo alimentado con dieta libre de etoxiquina, se presenta en la Cuadro N° 2.

**Cuadro N° 2: Rangos de concentraciones mínima y máxima de etoxiquina (ppb) por día de muestreo, según dieta, durante la segunda etapa.**

Dieta		Día de muestreo											
		0		3		7		14		21		28	
		n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango
A	9	ND – 17	7	ND – 10	6	ND – 5	7	ND – 5	6	ND – 15	4	ND	
B	9	ND – 24	6	ND – 13	6	ND – 5	7	ND – 80	6	ND – 7	5	ND – 5	
C	9	5 – 59	6	ND – 15	6	ND	6	ND – 5	5	ND – 43	4	ND – 14	
D	9	16 – 358	6	ND – 35	6	ND – 8	8	ND – 26	6	ND – 26	5	ND – 5	
E	9	15 – 382	6	ND – 118	6	ND – 27	6	ND – 30	6	5 – 10	4	ND – 8	
F	9	7 – 964	6	5 – 450	6	5 – 34	7	ND – 113	6	ND – 33	5	ND – 28	

n: Número de observaciones.

ND: No detectada.

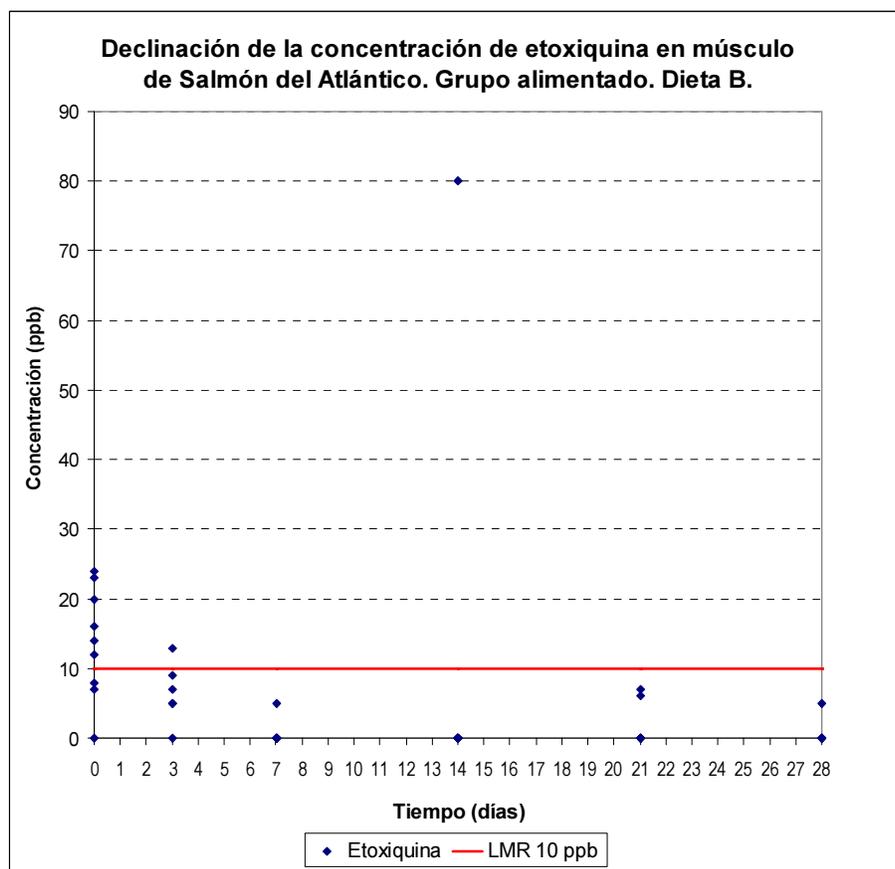
En esta etapa también se observó que la dispersión de los datos para cada uno de los grupos experimentales fue bastante elevada, dando cuenta de la amplia variabilidad individual de los peces.

También se puede apreciar que el grupo A presenta concentraciones detectables hasta el día 21 a pesar de haber recibido una dieta supuestamente libre de etoxiquina.

La mayor concentración detectada fue de 964 ppb para el grupo F en el día 0. En cambio, el grupo C en el día 7 y el grupo A en el día 28 no presentaron concentraciones detectables de etoxiquina en ninguno de los peces muestreados.

Debido a la gran variabilidad de los datos, las concentraciones de etoxiquina en el

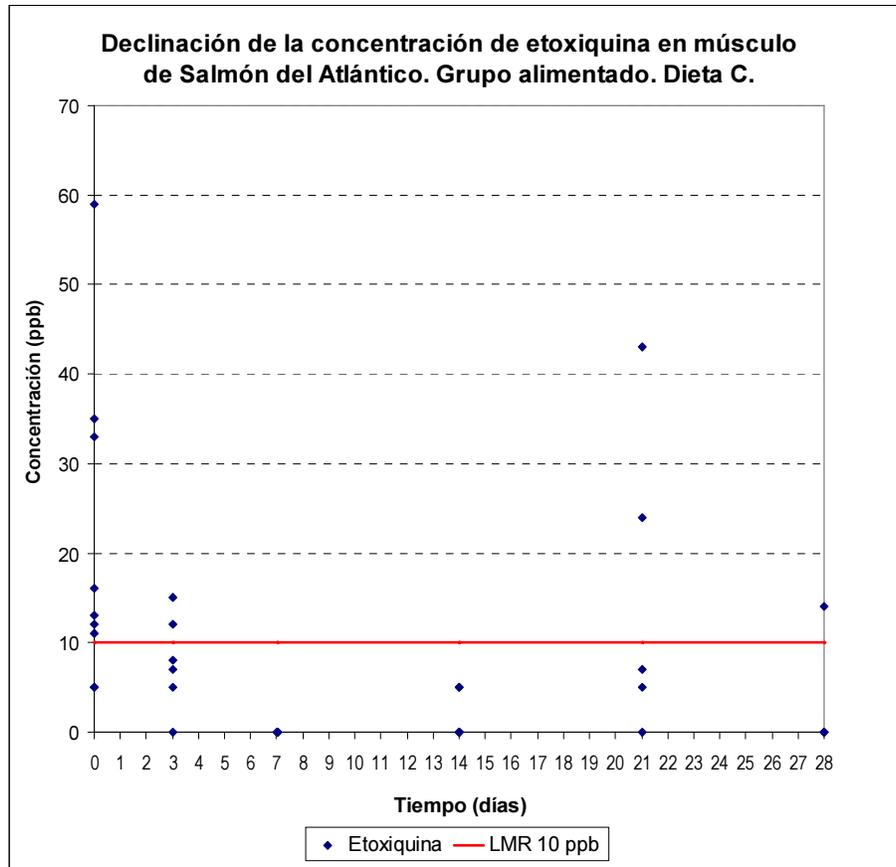
filete de salmón del Atlántico fueron graficadas sólo como dispersión de puntos y se presentan en la Figuras N° 2 - 6.



**Figura N° 2: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo B, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta B indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 14 una observación lo supera ampliamente alcanzando 80 ppb y después todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay una observación con concentración detectable de 5 ppb.

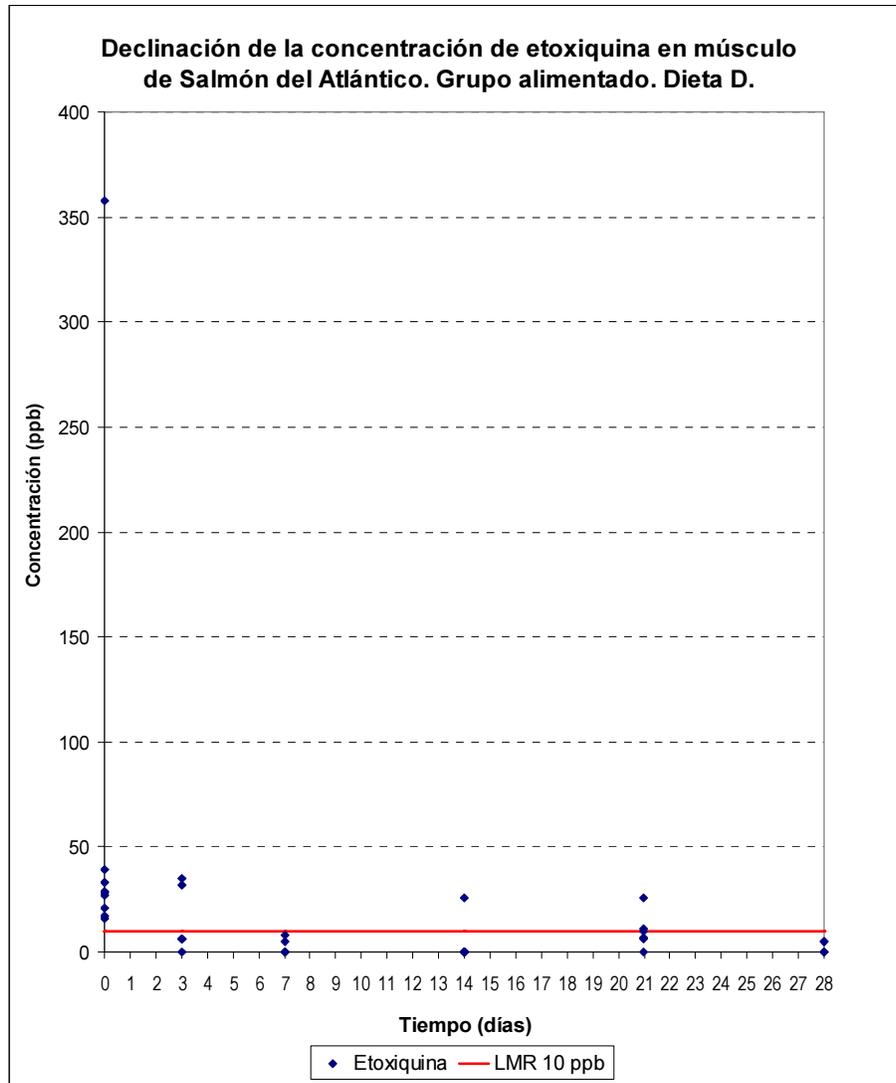
En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.



**Figura N° 3: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo C, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta C indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 una observación lo supera ampliamente alcanzando 59 ppb y en el día 21 una observación alcanza los 43 ppb. Además, en el día 28 aún hay una observación con concentración detectable de 14 ppb.

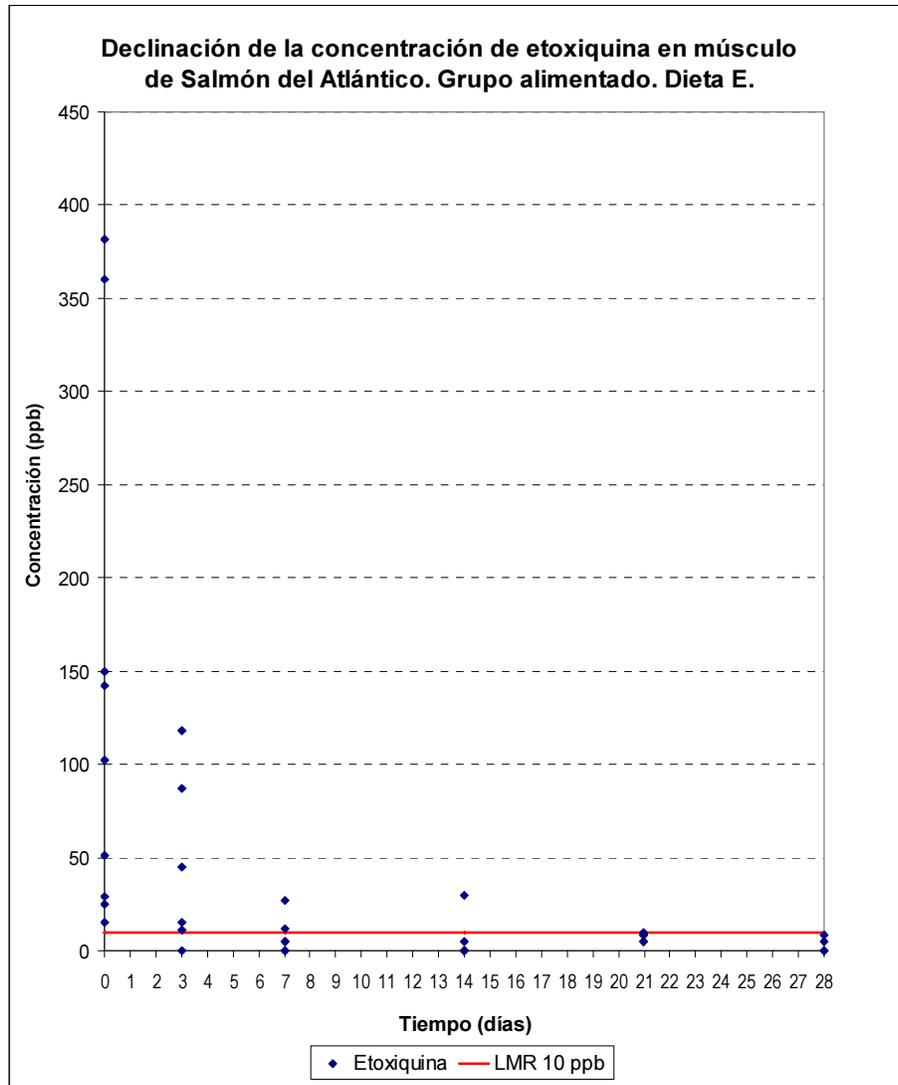
En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.



**Figura N° 4: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo D, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta D indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 una observación lo supera ampliamente alcanzando 358 ppb y después del día 21 todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay dos observaciones con concentración detectable de 5 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.

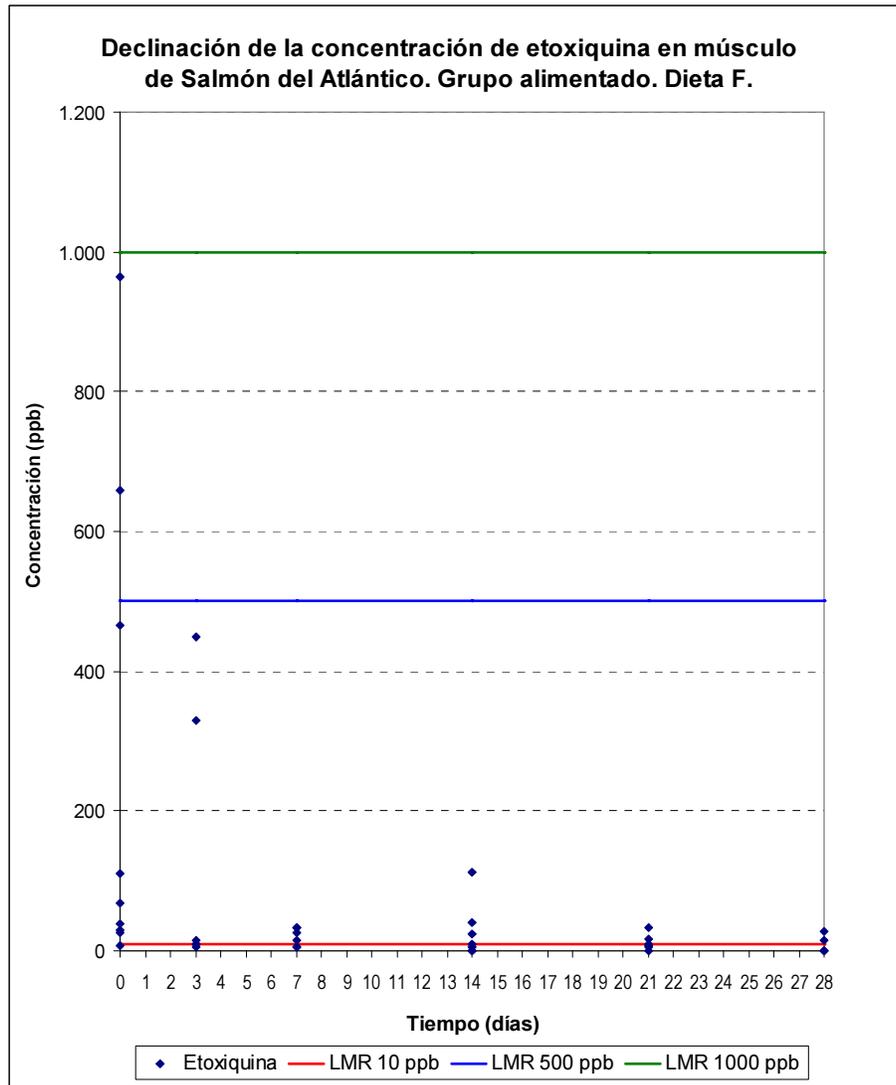


**Figura N° 5: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo E, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta E indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 dos observaciones lo superan ampliamente alcanzando 382 y 360 ppb y después del día 21 todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay dos observaciones con concentraciones detectables de 8 y 5 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas

al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.



**Figura N° 6: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo F, en los peces alimentados con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta F indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. Además, en el día 28 aún hay dos observaciones con concentraciones detectables de 28 y 14 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones superiores al LMR 1.000 ppb durante todo el período. Sin embargo, en el día 0 dos observaciones

superan ampliamente el LMR 500 ppb alcanzando 964 y 658 ppb y después todas las observaciones son inferiores.

## 2.2 Declinación en los peces sometidos a ayuno

El resumen de los datos de concentración de etoxiquina en el filete de salmón del Atlántico obtenidos en los días de muestreo, durante la segunda etapa y en el grupo sometido a ayuno, se presenta en el Cuadro N° 3.

**Cuadro N° 3: Rangos de concentraciones mínima y máxima de etoxiquina (ppb) por día de muestreo, según dieta, durante la segunda etapa.**

Dieta	Día de muestreo											
	0		3		7		14		21		28	
	n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango	n	Rango
A	9	ND – 17	6	ND – 10	6	ND – 6	7	ND – 5	5	ND – 11	5	ND
B	9	ND – 24	6	ND – 11	6	ND	6	ND	5	ND – 6	5	ND – 5
C	9	5 – 59	6	ND – 16	6	ND – 5	8	ND – 5	6	ND – 17	5	ND – 5
D	9	16 – 358	6	ND – 29	6	ND – 34	7	ND – 5	5	ND – 6	4	ND – 5
E	9	15 – 382	6	7 – 224	6	ND – 9	7	ND – 7	6	ND – 7	4	ND – 13
F	9	7 – 964	6	14 – 1.260	7	ND – 77	6	ND – 32	5	ND – 26	4	7 – 33

n: Número de observaciones.

ND: No detectada.

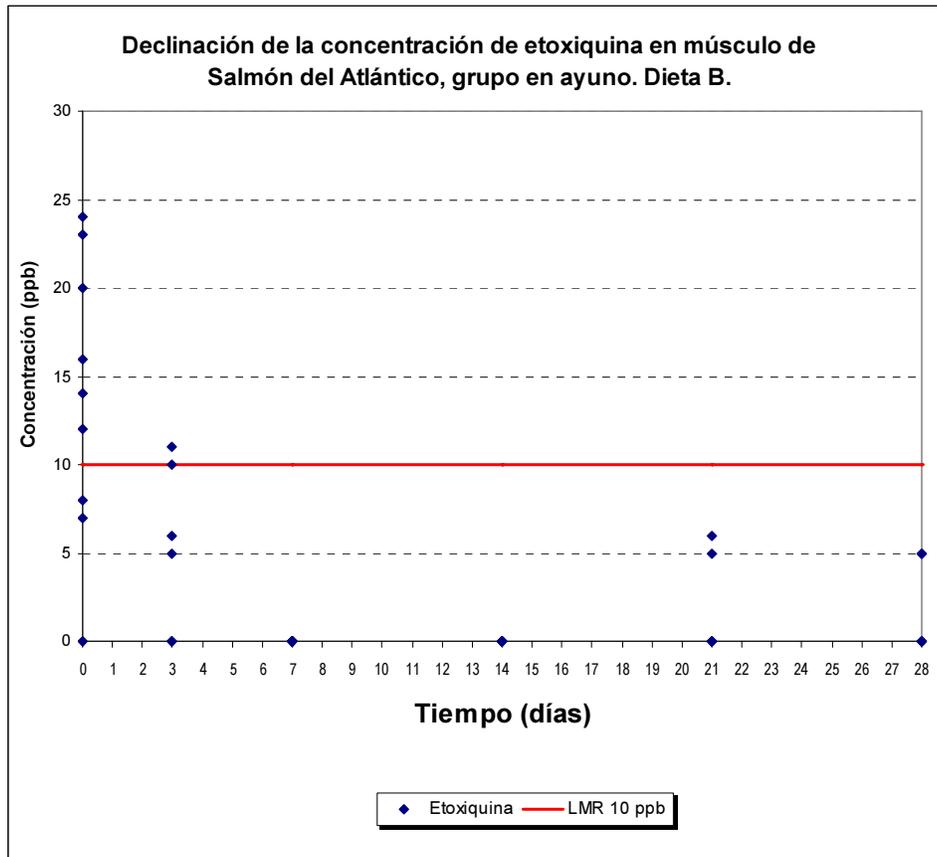
En esta etapa también se observó que la dispersión de los datos para cada uno de los grupos experimentales fue bastante elevada, dando cuenta de la amplia variabilidad individual de los peces.

También se puede apreciar que el grupo A presenta concentraciones detectables hasta el día 21 a pesar de haber recibido una dieta supuestamente libre de etoxiquina.

La mayor concentración detectada fue de 1260 ppb para el grupo F en el día 3. En

cambio, el grupo B en el día 7 y 14, y el grupo A en el día 28 no presentaron concentraciones detectables de etoxiquina en ninguno de los peces muestreados.

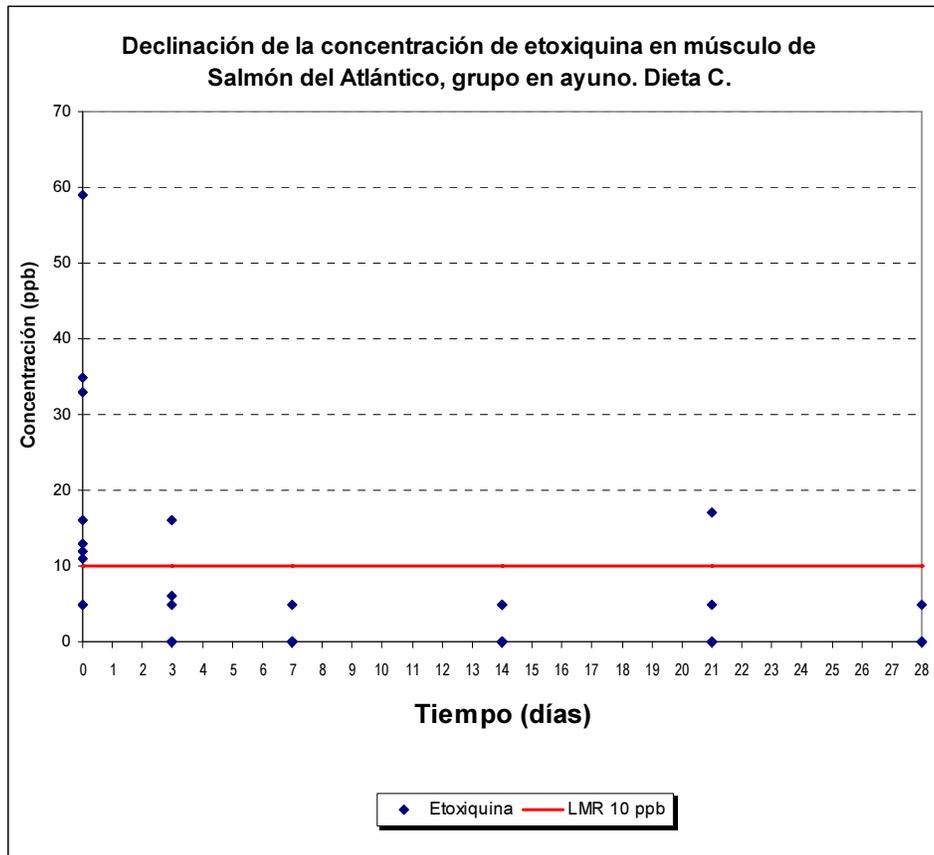
Debido a la gran variabilidad de los datos, las concentraciones de etoxiquina en el filete de salmón del Atlántico fueron graficadas sólo como dispersión de puntos y se presentan en la Figuras N° 7 - 11.



**Figura N° 7: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo B, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta B indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 una observación lo supera ampliamente alcanzando 24 ppb y después del día 3 todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay dos observaciones con concentración detectable de 5 ppb.

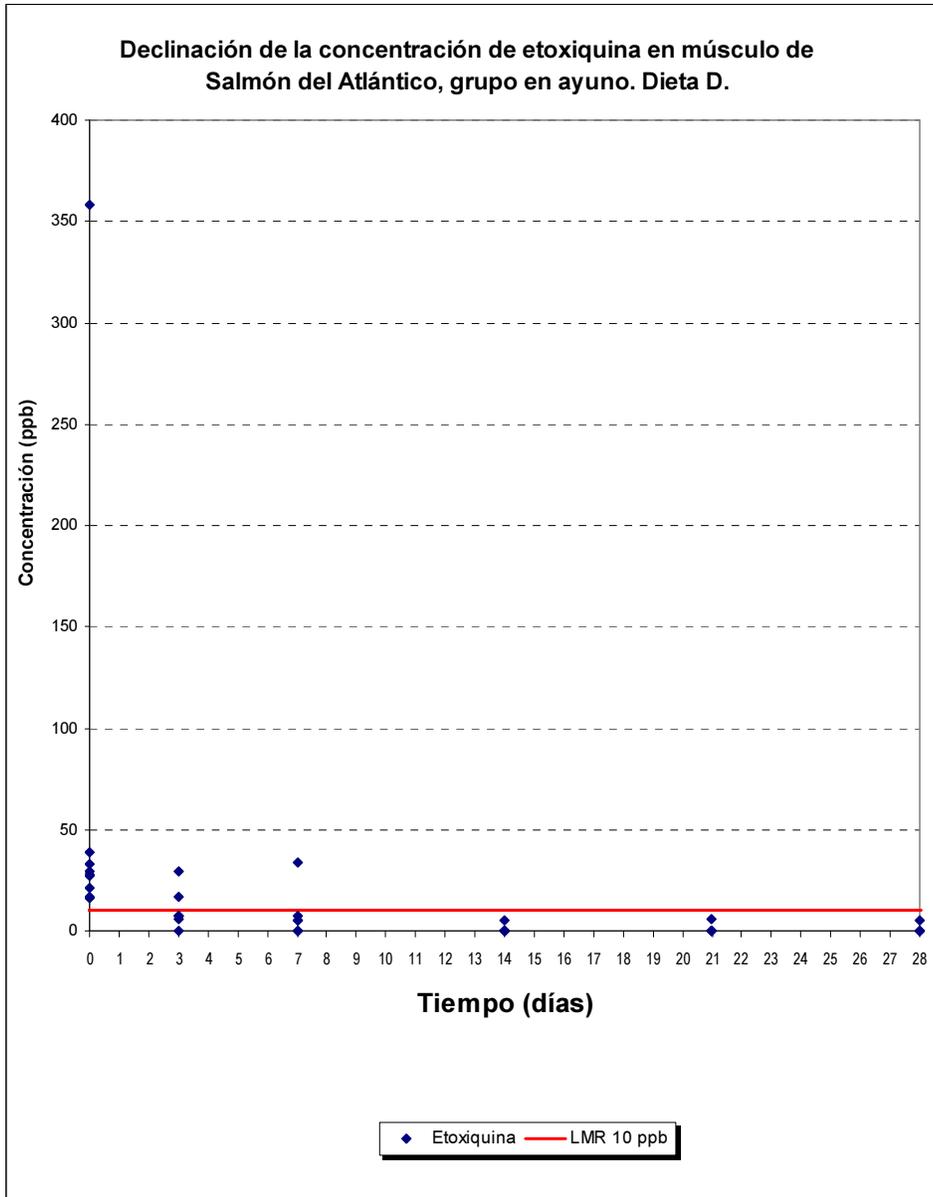
En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.



**Figura N° 8: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo C, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta C indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 una observación lo supera ampliamente alcanzando 59 ppb, en el día 3 una observación alcanza los 16 ppb, en el día 21 una observación alcanza los 17 ppb y después todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay una observación con concentración detectable de 5 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.

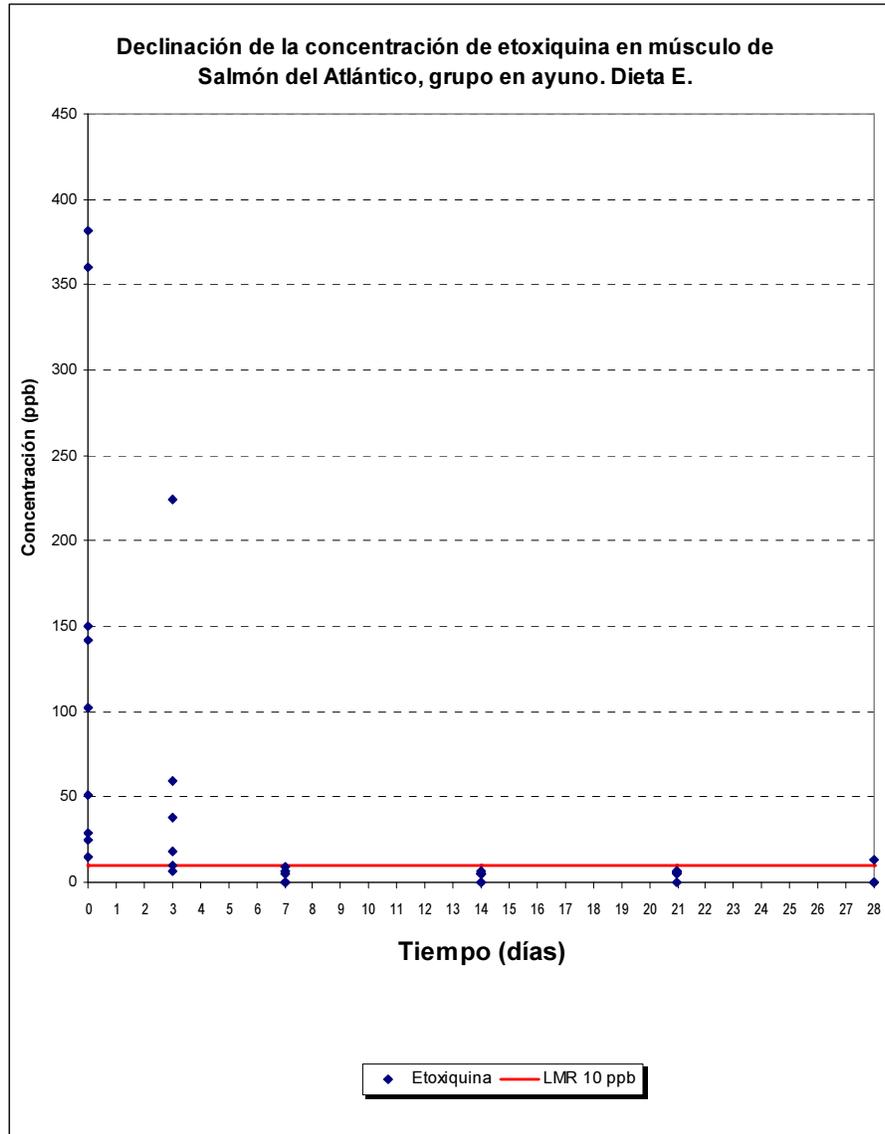


**Figura N° 9: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo D, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta D indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 una observación lo supera ampliamente alcanzando 358 ppb y después del día 7 todas las observaciones son inferiores. Además, en el día 28 aún hay una observación con concentración detectable de 5 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas

al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.

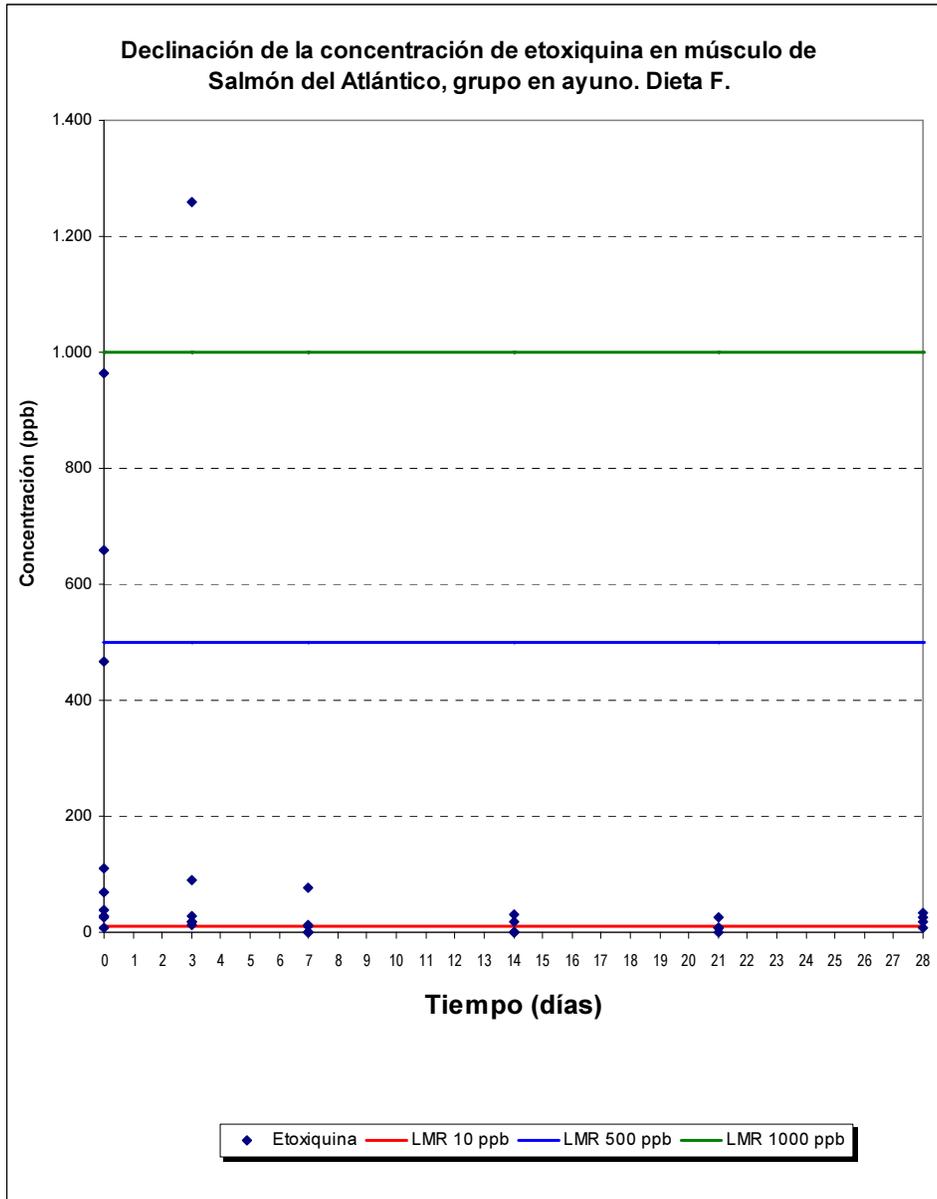


**Figura N° 10: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo E, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta E indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. En el día 0 dos observaciones lo superan ampliamente alcanzando 382 y 360 ppb. Además, en el día 28 aún hay una observación con concentración detectable de 13 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta no se detectaron concentraciones cercanas

al LMR 500 ppb ni al LMR 1.000 ppb durante todo el período.



**Figura N° 11: Dispersión de las concentraciones de etoxiquina en filetes de salmón del Atlántico para el grupo F, en los peces sometidos a ayuno durante la segunda etapa.**

El gráfico de la dieta F indica que bastantes observaciones se ubican por encima del LMR 10 ppb, principalmente en el día 0. Además, en el día 28 aún hay cuatro observaciones con concentraciones detectables de 33, 25, 17 y 7 ppb.

En los peces alimentados con esta dieta, el día 0 dos observaciones superan

ampliamente el LMR 500 ppb alcanzando 964 y 658 ppb. En el día 3 una observación supera incluso el LMR 1.000 ppb alcanzando una concentración de 1260 ppb y después todas las observaciones fueron inferiores al LMR 500 ppb.

## DISCUSIÓN

El primer elemento que llamó la atención del análisis de los datos recolectados fue la gran dispersión de las observaciones. Esto indicó una variabilidad individual muy elevada que puede ser atribuible a las condiciones experimentales en terreno tales como: la imposibilidad práctica de administrar la etoxiquina en forma individual a los peces, la falta de certeza respecto al consumo equitativo del alimento tratado con etoxiquina y el efecto de la redistribución en los estanques sobre el apetito de los peces.

En vista de la variabilidad de los datos sólo fue posible describir los resultados expresándolos como rangos debido a la falta de cumplimiento de los supuestos estadísticos necesarios para efectuar análisis más exhaustivos.

Al analizar el grupo de la dieta A, sorprende encontrar que este presentó concentraciones detectables de etoxiquina hasta el día 21, tanto en el grupo que fue sometido a ayuno como en el grupo que continuó siendo alimentado con la dieta control durante la segunda etapa, considerando que esta fue formulada libre de etoxiquina. La explicación más probable para este comportamiento es que la dieta formulada pudo haber contenido concentraciones de etoxiquina inferiores al límite de detección de la técnica empleada en el análisis de los alimentos por el laboratorio Bioquality de Puerto Montt, el cual fue de 1900 ppb. Dado que el alimento fue fabricado en una planta industrial que habitualmente dosifica etoxiquina en las dietas que comercializa, es posible pensar que hubo contaminación residual por arrastre en la línea de proceso. Esto también ha sido reportado por Bohne *et al.* (2008), quienes encontraron 11 ppm de etoxiquina en la dieta control,

preparada con ingredientes libres de etoxiquina. Otra probable causa de este fenómeno radica en la procedencia de los peces, ya que al ser originalmente parte de una población sujeta a los manejos habituales de la industria, recibían alimentos comerciales. Estos alimentos usualmente incluyen etoxiquina como antioxidante en su formulación. Por lo tanto, si bien los peces antes de comenzar el estudio fueron alimentados con la dieta control, como factor fundamental del período de aclimatación, es posible que dicho tiempo haya sido insuficiente para asegurar una depleción completa en aquellos peces que acumularon mayor cantidad de etoxiquina. Una situación similar ha sido reportada por Bohne *et al.* (2008), quienes encontraron concentraciones promedio de  $14 \pm 8$  ppb de etoxiquina y  $2.326 \pm 718$  ppb de dímero de etoxiquina en el primer día de su experimento, antes de administrar las diferentes dietas.

En consecuencia, acorde con los resultados de este estudio y los de Bohne *et al.* (2008) y considerando un LMR 10 ppb es posible sugerir la conveniencia de analizar los alimentos con una técnica de mejor sensibilidad.

Por otra parte, respecto de las concentraciones de etoxiquina en el filete de salmón observadas durante la primera etapa —de administración de dietas con diferentes concentraciones de etoxiquina— no fue posible obtener información respecto al tiempo y dosis necesarios para llegar a un estado de concentración estable en los tejidos de los salmones ya que sólo se controló con un punto muestral. No obstante, existe el antecedente del ensayo de Bohne *et al.* (2008), quienes administraron etoxiquina en la dieta de salmones durante 12 semanas encontrando que el nivel de concentración de etoxiquina en el músculo de los peces no llegó a ser estable durante dicho período, excepto por el grupo experimental que recibió la dosis más alta (1800 ppm) en el alimento. Por consiguiente, en estudios futuros sería interesante evaluar dicho período con el fin de corroborar dicho

comportamiento.

Referente a la segunda etapa –de retiro del alimento con diferentes dosis de etoxiquina— en las figuras N° 2 – 11 se observa la presencia de peces con concentraciones detectables de etoxiquina durante los 28 días estudiados, en todos los grupos experimentales excepto el control. Esto no concuerda con lo expuesto recientemente por Bohne *et al.* (2008) quienes informaron que en su experiencia la eliminación de etoxiquina desde el músculo del salmón se caracterizó por ser rápida. Esto se manifestó en que todos los peces alimentados con dietas experimentales con concentraciones inferiores a 1.800 ppm de etoxiquina, alcanzaron un nivel basal de 10 ppb ya desde la primera semana de ayuno.

Según la literatura consultada, esta rápida depleción de la etoxiquina en los tejidos de los animales no se debería a procesos de eliminación sino a la biotransformación en diversos metabolitos que se depositan por largo tiempo. Al respecto, se ha sugerido que la etoxiquina se biotransforma, especialmente, en un dímero de etoxiquina, el cual constituiría la forma preferente de depósito en el músculo de salmón (Bohne y Hamre, 2005; Bohne *et al.*, 2007).

Además, Bohne *et al.* (2006) señalaron que la etoxiquina produciría una inhibición de la síntesis de las mismas enzimas hepáticas que intervienen en la metabolización de la propia etoxiquina. Esta inhibición sería lo que produciría el depósito y acumulación de la etoxiquina en el tejido muscular y se requeriría un período de 14 días de depuración para revertir esta situación (Bohne *et al.*, 2006).

Bohne *et al.* (2008) también indicaron que la rápida disminución que se observa en las concentraciones de etoxiquina es concomitante con un significativo incremento en la

concentración del dímero de etoxiquina. Por lo tanto, considerando que ante una situación de ayuno dicho incremento sólo puede provenir del transporte del metabolito desde otros tejidos o la bioconversión desde etoxiquina u otros metabolitos, esto implicaría que la tasa real de eliminación de la etoxiquina es igual a cero y la vida media es considerablemente mayor de 14 días (Bohne *et al.*, 2008).

Entonces, considerando los antecedentes de biotransformación se puede sugerir que la realización de estudios de depleción sería más interesante dirigirlos a los metabolitos de etoxiquina que ya han sido identificados y cuyas propiedades tóxicas aún no están claramente establecidas.

Finalmente, en cuanto al cumplimiento de los distintos LMR, especialmente el LMR de 10 ppb, este estudio preliminar permite hacer algunas recomendaciones:

- Los alimentos elaborados para ser consumidos por los salmones deberían ser analizados con una metodología de mejor sensibilidad que 1900 ppb.
- Un estudio de depleción acorde a normativas internacionales requiere una población mucho mayor que permita más puntos de muestreo.
- Es aconsejable mantener a los peces en el mismo estanque durante todo el período experimental.
- Se debe mantener las mismas condiciones de alimentación (ritmo horario y forma de entrega manual o automatizada) durante todo el período experimental.

## CONCLUSIONES

1. Luego de 28 días de dejar de alimentar Salmones del Atlántico con dietas que contenían dosis de 21 y 398 ppm de etoxiquina, aún es posible detectar en el filete concentraciones de etoxiquina superiores al LMR 10 ppb exigido en Alemania, en aquellos peces que continuaron siendo alimentados con una dieta libre de etoxiquina.
2. Luego de 28 días de dejar de alimentar Salmones del Atlántico con dietas que contenían dosis de 221 y 398 ppm de etoxiquina, aún es posible detectar en el filete concentraciones de etoxiquina superiores al LMR 10 ppb exigido en Alemania, en aquellos peces que fueron sometidos a ayuno.
3. Luego de 3 días de dejar de alimentar Salmones del Atlántico con dietas que contenían dosis de 398 ppm de etoxiquina, aún es posible detectar en el filete concentraciones de etoxiquina superiores al LMR 1000 ppb exigido en Japón y el LMR 500 ppb exigido en los Estados Unidos de Norteamérica, en aquellos peces que fueron sometidos a ayuno.
4. Después del día en que se dejó de alimentar Salmones del Atlántico con dietas que contenían dosis de 398 ppm de etoxiquina, ya no es posible detectar en el filete concentraciones de etoxiquina superiores al LMR 500 ppb exigido en los Estados Unidos de Norteamérica, en aquellos peces que continuaron siendo alimentados con una dieta libre de etoxiquina.

5. Para evitar la contaminación con etoxiquina en el filete de Salmones del Atlántico del grupo control, es recomendable analizar los alimentos formulados como libres de etoxiquina con una técnica de mejor sensibilidad que 1900 ppb.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ALANKO K.; JOLANKI R.; ESTLANDER T.; KANERVA L.** 1998. Occupational 'multivitamin allergy' caused by the antioxidant ethoxyquin. *Contact Dermatitis* 39: 263-264.
- **AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.** 1997. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> Rev. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- **BAILEY, C.; SRINIVASAN, L.; MCGEACHIN, R.** 1996. The effect of ethoxyquin on tissue peroxidation and immune status of single comb White Leghorn cockerels. *Poult. Sci.* 75: 1109-1112.
- **BAMMLER T.; SLONE D.; EATON D.** 2000. Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxin b1 biotransformation in non-human primates. *Toxicol. Scs.* 54: 30-41.
- **BARON C.; BØRRESEN T.; JACOBSEN C.** 2005. UV Treatment of fishmeal: a method to remove dioxins?. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7091-7097.
- **BŁASZCZYK, A.; OSIECKA, R.; SKOLIMOWSKI, J.** 2003. Induction of chromosome aberrations in cultured human lymphocytes treated with ethoxyquin. *Mutat. Res.* 542: 117-128.

- **BŁASZCZYK, A.; SKOLIMOWSKI, J.** 2005. Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin and two of its salts. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10: 15-21.
  
- **BŁASZCZYK, A.** 2006. DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 163: 77-83.
  
- **BŁASZCZYK, A.; SKOLIMOWSKI, J.; MATERAC A.** 2006. Genotoxic and antioxidant activities of ethoxyquin salts evaluated by the comet assay. *Chemico-Biological Interactions.* 162: 268–273.
  
- **BŁASZCZYK, A.; SKOLIMOWSKI, J.** 2007a. Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin salts in human lymphocytes in vitro. *Food Chem.* 105: 1159–1163.
  
- **BŁASZCZYK, A.; SKOLIMOWSKI, J.** 2007b. Preparation of ethoxyquin salts and their genotoxic and antioxidant effects on human lymphocytes. *ARKIVOC.* VI: 217-229.
  
- **BMELV. BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ. ALEMANIA.** 2007. Rückstands-Höchstmengenverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Oktober 1999 (BGBl. I S. 2082; 2002 I S. 1004), zuletzt geändert durch die Verordnung vom 20. April 2007 (BGBl. I S. 580). [en línea]. 20 de Abril de 2007. <[http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/rhmv\\_1994/gesamt.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/rhmv_1994/gesamt.pdf)>. [consulta: 09-08-2007]
  
- **BOHNE, V.J.B.; HAMRE, K.** 2005. Ethoxyquin and metabolites concentrations in the fillet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L). **In:** *Aquaculture Europe.* Trondheim, Norway.

5-9 de Agosto de 2005. European Aquaculture Society.

- **BOHNE, V.J.B.; HAMRE, K.; ARUKWE, A.** 2006. Hepatic biotransformation and metabolite profile during a 2-week depuration period in Atlantic Salmon fed graded levels of the synthetic antioxidant, ethoxyquin. *Toxicol. Scs.* 93: 11-21.
- **BOHNE, V.J.B.; HAMRE, K.; ARUKWE, A.** 2007. Hepatic metabolism, phase I and II biotransformation enzymes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L) during a 12 week feeding period with graded levels of the synthetic antioxidant, ethoxyquin. *Food Chem. Toxicol.* 45: 733-746.
- **BOHNE, V.J.B.; HOVE H.; HAMRE, K.** 2007. Simultaneous quantitative determination of the synthetic antioxidant ethoxyquin and its major metabolite in atlantic salmon (*Salmo salar*, l), ethoxyquin dimer, by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 90: 587-597.
- **BOHNE, V.J.B.; LUNDEBYE, A.; HAMRE, K.** 2008. Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Chem. Toxicol.* 46: 1834-1843.
- **BRANNEGAN D.; ASHRAM-KHORASSANI M.; TAYLOR L.** 2001. High-performance liquid chromatography coupled with chemiluminescence nitrogen detection for the study of ethoxyquin antioxidant and related organic bases. *J. Chrom. Sc.* 39: 217-221.
- **BURKA L.; SANDERS, J.; MATTHEWS H.** 1996. Comparative metabolism and disposition of ethoxyquin in rat and mouse. II. *Metabolism. Xenobiotica.* 26: 597-611.

- **CAÑEDO Y.; MACÍAS J.** 2007. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish from four different regions of Mexico. *Ciencias Marinas*. 33: 217–227.
  
- **CODEX ALIMENTARIUS.** 1993. CAC/GL 16 Guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods. [en línea]. <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/47/CXG\\_016e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/47/CXG_016e.pdf)>. [consulta: 30-04-2008].
  
- **COMUNIDAD EUROPEA.** 1998. OJ L 289 Reglamento de la Comisión (CE) 2316/1998 del 26 de Octubre de 1998 concerniente a la autorización de nuevos aditivos y enmendando las condiciones de autorización de un número de aditivos ya autorizados en alimentos. [en línea]. 28 de Agosto de 1998.
  
- **COMUNIDAD EUROPEA.** 2002. 2002/657/CE Corrección de errores de la Decisión de la Comisión por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. [en línea]. 14 de Agosto de 2002. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSL EG:2002D0657:20040110:ES:PDF>>. [consulta: 02-05-2008].
  
- **CVM. CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 1997. FDA requests that ethoxyquin levels be reduced in dog foods. [en línea]. 14 de Agosto de 1997. <[http://www.fda.gov/cvm/CVM\\_Updates/1997updates.html](http://www.fda.gov/cvm/CVM_Updates/1997updates.html)>. [consulta: 17-08-2007].
  
- **DAHLE H.; SKAARE J.** 1975. Gas Chromatographic Determination of Ethoxyquin in Feed and Food Products. II. *J. Agric. Food Chem.* 23: 1093-1095.

- **DEWHURST, I.** 1998. JMPR Evaluations, Part II: Toxicological. In: Joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group. Roma, Italia. 21-30 de Septiembre de 1998. Food and Agriculture Organization (FAO).
- **DE KONING, A.** 1998. A new method for measuring efficacies of antioxidants in fish meal. *Int. J. Food Prop.* 1: 255–261.
- **DE KONING, A.** 2002. The antioxidant ethoxyquin and its analogues: a review. *Int. J. Food Prop.* 5: 451-461.
- **DE KONING, A.** 2005. Properties of South African fish meal: a review. *S. Afr. J. Sci.* 101: 21-25
- **DOREY G.; LOCKHART B.; LESTAGE P.; CASARA P.** 2000. New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants. *Bioorg & Med. Chem Lett.* 10: 935-939.
- **EATON D.; GALLAGHER E.** 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 135–172.
- **ELLIS E.; JUDAH D.; NEAL G.; HAYES J.** 1993. An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10350-10354.
- **ELLIS E.; JUDAH D.; NEAL G.; O'CONNOR T.; HAYES J.** 1996. Regulation of

carbonyl-reducing enzymes in rat liver by chemoprotectors. *Canc. Res.* 56: 2758-2766.

- **FDA. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION.** 2006a. 21CFR172.140 Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 3, Part 172, Section 140, Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. [en línea]. 1º de Abril de 2006. <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>>. [consulta: 09-08-2007]
- **FDA. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION.** 2006b. 21CFR573.380 Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 6, Part 573, Section 380, Food additives permitted in feed and drinking water of animals. [en línea]. 1º de Abril de 2006. <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>>. [consulta: 09-08-2007]
- **GROSS K.; BOLLINGER R.; THAWNGHMUNG P.; COLLINGS G.** 1994. Effect of three different preservative systems on the stability of extruded dog food subjected to ambient and high temperature storage. *J. Nutr.* 124: 2638S-2642S
- **GUNSTONE F.D.; MORDI R.C.; THORISSON S.; WALTON J.C.; JACKSON R.A.** 1991. EPR study of radical intermediates from the oxidation of 6-ethoxy-2,2,4-trimethyl- and 6-ethoxy-2,2,4,8-tetramethyl-1,2-dihydroquinoline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 12: 1955-1958.
- **HAMRE, K.; KOLÁS, K.; SANDNES, K.; JULSHAMN, K. ; KIESSLING, A.** 2003. Feed intake and absorption of lipid oxidation products in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets coated with oxidised fish oil. *Fish Physiol. Biochem.*, 25: 209–219

- **HAMRE, K.; CHRISTIANSEN R.; WAAGBØ R.; MAAGE A.; TORSTENSEN B.E.; LYGREN B.; LIE Ø.; WATHNE E.; ALBREKTSSEN S.** 2004. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on growth performance and fillet quality. *Aquacul. Nut.* 10: 113-123.
  
- **HAN H.; HUSSEIN H.; GLIMP H.; SAYLOR D.; GREENE L.** 2002. Carbohydrate fermentation and nitrogen metabolism of a finishing beef diet by ruminal microbes in continuous cultures as affected by ethoxyquin and(or) supplementation of monensin and tylosin. *J. Anim. Sci.* 80: 1117–1123.
  
- **HANIG J.; YODER P.; KROP S.** 1984. Protection with butylated hydroxy-toluene and other compounds against intoxication and mortality caused by hexachlorophene. *Food Chem. Toxicol.* 22: 185-189.
  
- **HAYES J.; McLEOD R.; ELLIS E.; PULFORD D.; IRELAND L.; McLELLAN L.; JUDAH D.; MANSON M.; NEAL G.** 1996. Regulation of S-transferases and aldehyde reductases by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. *IARC Sci. Publ.* 139: 175-187.
  
- **HAYES J.; CHANAS S.; HENDERSON C.; McMAHON M.; SUN C.; MOFFAT G.; WOLF C.; YAMAMOTO M.** 2000. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 33-41.

- **HE, P.; ACKMAN, R.** 2000a. HPLC determination of ethoxyquin and its major oxidation products in fresh and stored fish meals and fish feeds. *J. Sci. Food Agric.* 80: 10-16.
- **HE, P.; ACKMAN, R.** 2000b. Purification of ethoxyquin and its two oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3069-3071.
- **HENSON K.; STAUFFER G.; GALLAGHER E.** 2001. Induction of glutathione S-transferase activity and protein expression in Brown Bullhead (*Ameiurus nebulosus*) liver by ethoxyquin. *Toxicol. Sci.* 62: 54-60.
- **IMO. INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION.** 2004. DSC 9/WP.2/Add.2 Review of the BC code, including evaluation of properties of solid bulk cargoes. [en línea]. <<http://www.imodocs.imo.org/ENGLISH-pdf/DSC/9/4-Add.2.pdf>>. [consulta : 09-08-2007].
- **ITO N.; HIROSE M.; FUKUSHIMA S.; TSUDA H.; SHIRAI T.; TATEMATSU M.** 1986. Studies on antioxidants; their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Fd. Chem. Toxic.* 24: 1071-1082.
- **JMPR. JOINT MEETING OF THE FAO/WHO PANEL OF EXPERTS ON PESTICIDE RESIDUES.** 2005. Pesticide residues in food – 2005. **In:** Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. Génova, Suiza. 20–29 Septiembre de 2005. [en línea]. < [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/DOWNLOAD/2005\\_rep/report2005jmpr.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/DOWNLOAD/2005_rep/report2005jmpr.pdf) >. [consulta : 29-04-2008]. Organización Mundial de la Salud y Organización para la Agricultura y la Alimentación, de las Naciones

Unidas.

- **KESTEMONT, P.; VANDELOISE, E.; MÉLARD, C.; FONTAINE, P. ; BROWN, P.B.** 2001. Growth and nutritional status of Eurasian perch *Perca fluviatilis* fed graded levels of dietary lipids with or without added ethoxyquin. *Aquaculture* 203: 85-99.
  
- **KNOEVENAGEL E.** 1921. Zur kenntnis der keton-anile, I.: Darstellung aliphatischer keton-anile und alkalische spaltung von keton-anil-jodalkylaten. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* 54B: 1722-1730.
  
- **KUMAR S.; ENGMAN L.; VALGIMIGLI L.; AMORATI R.; FUMO M.; PEDULLI G.** 2007. Antioxidant profile of ethoxyquin and some of its S, Se, and Te analogues. *J. Org. Chem.* 72: 6046 - 6055.
  
- **LÓPEZ M.; RIBA M.** 1999. Residue levels of ethoxyquin, imazalil, and iprodione in pears under cold-storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3228–3236.
  
- **MADDOCK R.; WULF D.; MCKENNA D.** 2003. The effect of ethoxyquin and vitamin E supplementation on the display life of beef steaks. *J. Food Sc.* 68: 1072-1074.
  
- **MANSON M.; GREEN J.; WRIGHT B.; CARTHEW P.** 1992. Degree of ethoxyquin-induced nephrotoxicity in rat is dependent on age and sex. *Arch. Toxicol.* 66: 51-56.
  
- **MEYDANI M.; MEYDANI S; SHAPIRO A.; MACAULEY J.; BLUMBERG J.** 1991. Influence of dietary fat, vitamin e, ethoxyquin and indomethacin on the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> in brain regions of mice. *J. Nutr.* 121: 438-444.

- **MHLW. MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE. JAPÓN.** 2005. MHLW Notification, N° 370, 1959, amendment N° 499 (Specifications and Standards for Foods, Food Additives, etc.). [en línea]. <<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/MRLs-p>> [consulta: 09-08-2007]
- **MIELKE E.; DRAKE S.** 2004. Control of storage-related physiological disorders of “D’Anjou” pears by integrated reduced dosage of ethoxyquin and low oxygen treatments. *J. Food Qual.* 27: 471-482.
- **MIDDLETON T.; FERKET P.; BOYD L.** 2001. The effect of ethoxyquin on the quality of ground poultry mortality carcasses preserved by lactic acid fermentation and phosphoric acid stabilization. *Poultry Sci.* 80: 1154–1163.
- **NEAL, G.; JUDAH, D.; HARD, G.; ITO, N.** 2003. Differences in ethoxyquin nephrotoxicity between male and female F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 41: 193-200.
- **OHSHIMA M.; LAYUG D.; YOKOTA H.; OSTROWSKI-MEISSNER H.** 1996. Effect of graded levels of ethoxyquin in alfalfa leaf extracts on carotenoid and cholesterol concentrations in chicks. *An. Feed Sc. Tech.* 62: 141-150.
- **REYES J.; HERNÁNDEZ M.; MELÉNDEZ E.; GÓMEZ-LOJERO C.** 1995. Inhibitory effect of the antioxidant ethoxyquin on electron transport in the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. Pharm.* 49: 283-289.
- **RODRÍGUEZ-TRABADO A.; BALAGUÉ J.; GUSPI R.** 2007. Hypersensitivity to the

antioxidant ethoxyquin. *Actas Dermosifiliogr.* 98: 580.

- **RUBEL, D.; FREEMAN, S.** 1998. Allergic contact dermatitis to ethoxyquin in a farmer handling chicken feeds. *Australas. J. Dermatol.* 39: 89-91.
- **SANDERS, J.; BURKA L.; CHANAS B.; MATTHEWS H.** 2001. Comparative xenobiotics metabolism between Tg.AC and p53<sup>+/-</sup> genetically altered mice and their respective wild types. *Toxicol. Scs.* 61: 54-61.
- **SANHUEZA, J.; NIETO S.; VALENZUELA A.** 2000. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. *JAOCS.* 77: 933-936.
- **SCHREIER C.; GREENE R.** 1997. Determination of ethoxyquin in feeds by liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* 80: 725-731.
- **SHAH A.; PIERSON J.; PAVLOSTATHIS S.** 2005. Fate and effect of the antioxidant ethoxyquin on a mixed methanogenic culture. *Water Res.* 39: 4251-4263.
- **SKAARE J.; DAHLE H.** 1975. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Studies of Ethoxyquin in Some Organic Solvents. I. *J. Agric. Food Chem.* 23: 1091-1093.
- **SPAETHE S.M.; HSUEH W.H.; NEEDLEMAN PH.** 1989. Pharmacological manipulation of inflammation in rabbit hydronephrosis: effects of a combined cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitor ethoxyquin, a thromboxane synthase inhibitor RS-5186 and a PAF antagonist L-659,989. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 248: 1308

- **TAIMR L.; PRUSIKOVA M.** 1991. Chromatographic behaviour of the antidegradant ethoxyquin and its transformation products. *J. Chromatogr.* 587: 355–358.
  
- **THORISSON S.; GUNSTONE F.; HARDY R.** 1993. 8-Methylethoxyquin: A possible replacement for ethoxyquin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 931-933.
  
- **VAN GEMERT M.; KILLEEN J.** 1998. Chemically induced myelinopathies. *Internat. J. Toxic.* 17: 231-275.
  
- **WANG S.; BOTTJE W.; MAYNARD P.; DIBNER J.; SHERMER W.** 1997. Effect of santoquin® and oxidized fat on liver and intestinal glutathione in broilers. *Poultry Sci.* 76: 961–967.

**ANEXO A:**  
**FOTOGRAFÍAS DE LAS INSTALACIONES, PROCEDIMIENTOS DE TERRENO Y**  
**DE LABORATORIO**



A.1: Aditivos utilizados en la elaboración de las dietas experimentales.



A.2: Incorporación de los aditivos en polvo a la máquina mezcladora de alimentos.



A.3: Muestra de alimento *pelletizado* antes de la incorporación de aceite.



A.4: Ubicación geográfica del centro experimental (en Quillaipe). Fuente:

<http://www.turistel.cl/secciones/mapas/ruteros/chiloe.htm>



A.5: Instalaciones del centro experimental Quillaipe de Fundación Chile.



A.6: Instalaciones del centro experimental Quillaipe de Fundación Chile (otro ángulo).



A.7: Estanques interiores provistos de alimentadores automáticos.



A.8: Ejemplares de salmón del Atlántico bajo sedación en un día de muestreo.



A.9: Manipulación de un ejemplar de salmón del Atlántico



A.10: Autosampler utilizado durante el análisis de laboratorio.



A.11: Bomba HPLC utilizada durante el análisis de laboratorio.



A.12: Detector de fluorescencia utilizado durante el análisis de laboratorio.



A.13: Módulo de control de temperatura y degasificador utilizados.



A.14: Set de muestras durante el proceso de extracción del analito.

**ANEXO B:**  
**CUADROS COMPLEMENTARIOS**

B.1: Composición porcentual de los alimentos experimentales, por dieta y según ingredientes.

Ingredientes (%)	Dieta					
	A	B	C	D	E	F
Harina de jurel (sin etoxiquina)	40	38,75	37,5	30	20	0
Harina de jurel (1813 ppm de etoxiquina)	0	1,25	2,5	10	20	40
Gluten de maíz	10	10	10	10	10	10
Concentrado de soya	12,33	12,33	12,33	12,33	12,33	12,33
Trigo molido	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
Premezcla de vitaminas y minerales	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Premezcla de vitamina C al 20 %	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Premezcla de vitamina E al 20 %	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Astaxantina AquAsta® al 1%	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Fosfato	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Agua	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Aceite de pescado	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
OiIMIX®	24,7	24,7	24,7	24,7	24,7	24,7
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

B.2: Análisis químico proximal de las harinas de pescado según contenido de etoxiquina.

	Harina con etoxiquina	Harina sin etoxiquina
<b>Materia Prima</b>	jurel 100%	jurel 100%
etoxiquina adicionada (ppm)	2500	0
Proteína (%)	69,4	68,4
Humedad (%)	7,8	8,2
Grasa (%)	8,5	8,6
Cenizas (%)	14,1	14,8
Sal (%)	2,1	2,5
AGL (%)	3,2	3,1
NVT (mg/100g)	80,1	103,6
Histamina (ppm)	229	181
Densidad (g/ml)	0,46	0,48

AGL: Ácidos Grasos Libres  
NVT: Nitrógeno Volátil Total

B.3: Contenido de proteína cruda, humedad, cenizas y etoxiquina según dieta experimental.

Dieta	Parámetro	Prot. Cruda (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	etoxiquina
					(ppm)
A	Media	43,77	6,01	7,63	3,96
	Desv. Estándar	0,35	0,35	0,71	0,53
	Coef. Variación	0,80	5,77	9,26	13,31
B	Media	44,01	5,28	7,84	14,20
	Desv. Estándar	0,41	0,22	0,23	0,45
	Coef. Variación	0,93	4,16	2,99	3,15
C	Media	44,31	5,17	7,85	26,00
	Desv. Estándar	0,19	0,10	0,18	0,71
	Coef. Variación	0,43	1,85	2,24	2,72
D	Media	44,54	4,48	7,91	112,60
	Desv. Estándar	0,30	0,14	0,14	7,67
	Coef. Variación	0,68	3,23	1,80	6,81
E	Media	45,20	4,60	7,90	222,40
	Desv. Estándar	0,91	0,16	0,09	6,91
	Coef. Variación	2,02	3,40	1,14	3,11
F	Media	44,33	4,67	7,72	410,40
	Desv. Estándar	0,27	0,20	0,13	7,37
	Coef. Variación	0,61	4,22	1,62	1,80

B.4: Concentraciones de etoxiquina (ppb) detectadas en filete de salmón del Atlántico durante la primera etapa de administración de etoxiquina en diferentes dosis en el alimento, por día de muestreo y según dieta recibida. Observaciones individuales.

Tiempo de muestreo (días)	Dietas					
	A	B	C	D	E	F
30	5	ND	ND	727	339	1593
	ND	6	100	14	16	250
	30	ND	22	939	251	21
	5	21	185	94	150	37
	26	28	13	7	517	3559
	7	8	51	71	166	134
	ND	ND	190	431	108	2065
	14	57	ND	76	35	ND
	ND	ND	221	120	80	1836

ND: No Detectada

B.5: Concentraciones de etoxiquina (ppb) detectadas en filete de salmón del Atlántico durante la segunda etapa de retiro de las diferentes dosis de etoxiquina en el alimento, por día de muestreo y según dieta recibida en la primera etapa. Grupo alimentado con dieta libre de etoxiquina durante la segunda etapa. Observaciones individuales.

Tiempo de muestreo (días)	Dietas					
	A	B	C	D	E	F
0	9	24	5	39	25	7
	17	14	59	33	150	964
	10	8	33	358	360	25
	8	7	12	27	29	69
	6	16	13	29	102	658
	10	23	5	16	15	29
	9	20	35	21	142	466
	5	12	11	28	51	38
	ND	ND	16	17	382	111
3	7	13	8	6	118	15
	9	ND	12	32	15	10
	7	7	5	6	45	330
	10	9	ND	35	87	450
	5	5	15	6	11	9
	9	5	7	ND	ND	5
7	ND	ND	ND	5	5	5
	5	5	ND	ND	5	34
	ND	ND	ND	ND	27	34
	ND	ND	ND	ND	12	5
	ND	ND	ND	ND	ND	15
	ND	ND	ND	8	ND	25
14	5	ND	5	ND	30	6
	ND	ND	5	26	ND	24
	ND	ND	ND	ND	ND	10
	ND	ND	ND	ND	5	ND
	5	80	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	113
	ND	ND	ND	ND	ND	40
21	6	ND	24	26	5	17
	15	ND	43	11	5	ND
	ND	ND	ND	ND	10	8
	5	ND	5	10	8	33
	7	7	7	7	9	6
	7	6	7	6	8	10
28	ND	ND	ND	5	8	14
	ND	5	ND	ND	ND	28
	ND	ND	ND	5	ND	ND
	ND	ND	14	ND	5	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No Detectada

B.6: Concentraciones de etoxiquina (ppb) detectadas en filete de salmón del Atlántico durante la segunda etapa de retiro de las diferentes dosis de etoxiquina en el alimento, por día de muestreo y según dieta recibida en la primera etapa. Grupo sometido a ayuno durante la segunda etapa. Observaciones individuales.

Tiempo de muestreo (días)	Dietas					
	A	B	C	D	E	F
0	9	24	5	39	25	7
	17	14	59	33	150	964
	10	8	33	358	360	25
	8	7	12	27	29	69
	6	16	13	29	102	658
	10	23	5	16	15	29
	9	20	35	21	142	466
	5	12	11	28	51	38
	ND	ND	16	17	382	111
3	10	11	16	7	224	27
	5	10	6	ND	10	19
	6	ND	ND	17	7	1260
	6	6	5	7	18	14
	ND	ND	ND	29	59	89
	ND	5	ND	6	38	17
7	5	ND	ND	34	5	ND
	6	ND	ND	ND	7	ND
	ND	ND	ND	ND	9	ND
	ND	ND	ND	5	ND	77
	ND	ND	ND	7	ND	13
	5	ND	5	5	ND	11
14	ND	ND	ND	5	5	ND
	ND	ND	ND	ND	5	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	5	19
	5	ND	ND	ND	7	32
	ND	ND	5	ND	5	ND
21	ND	6	5	ND	6	7
	ND	ND	ND	6	ND	26
	5	5	ND	ND	7	7
	6	ND	ND	ND	6	7
	11	ND	17	ND	7	ND
28	ND	5	ND	5	13	17
	ND	ND	ND	ND	ND	25
	ND	ND	ND	ND	ND	7
	ND	ND	5	ND	ND	33
	ND	5	ND	ND	ND	ND

ND: No Detectada