



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

**DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE RESGUARDO DE
FLUMEQUINA EN HUEVOS OBTENIDOS DE GALLINAS
DE POSTURA.**

Claudio Marcelo Escobar Rivera

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

PROFESOR GUÍA: Dra. Betty San Martín

SANTIAGO, CHILE
2013



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

**DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE RESGUARDO DE
FLUMEQUINA EN HUEVOS OBTENIDOS DE GALLINAS
DE POSTURA**

Claudio Marcelo Escobar Rivera

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

Nota Final:

		Nota	Firma
Profesora Guía:	Dra. Betty San Martín
Profesor Consejero:	Dra. Daniela Iraguen
Profesor Consejero:	Dra. Lissette Lapierre

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS:

“Mis más profundos agradecimientos a mis padres, quienes fueron pilares fundamentales para el desarrollo de mi carrera, siempre apoyando y confiando en mis capacidades. A ellos, sólo me queda retribuirles su dedicación con mi apoyo incondicional, mi evolución personal y un responsable desempeño profesional. Quisiera destacar también el importante y solidario apoyo de mis compañeros de aula a lo largo de estos años, con quienes compartí enriquecedores momentos, y como no a la notable labor docente, digna de tan laureada institución como lo es nuestra Universidad de Chile

INDICE

Resumen	02
Summary	04
Introducción	05
I. Revisión Bibliográfica	07
I.1 Quinolonas y Fluoroquinolonas	07
I.2 Características farmacocinéticas y farmacodinámicas	09
I.3 Aplicaciones Terapéuticas	10
I.4 Mecanismos de acción	11
I.5 Resistencia Bacteriana	12
I.6 Residuos de Quinolonas y fluoroquinolonas en alimentos de origen animal y sus riesgos en la salud humana	14
I.7 Límites Máximos Residuales y Límites Mínimos de Funcionamiento Exigidos	15
I.8 Monitoreo de residuos a nivel nacional	18
I.9 Períodos de resguardo de los fármacos utilizados en animales de producción	20
I.10 Métodos analíticos para la detección de residuos de Fluoroquinolonas	22
I.11 Distribución de los antimicrobianos en huevos	23
II. Hipótesis	27
III. Objetivos	27
IV. Materiales y métodos	28
IV.1 Objetivo N° 1	28
IV.2 Objetivo N° 2	33
IV.3 Objetivo N°3	33
V. Resultados	35
VI. Discusión	45
VII. Conclusión	48
VIII. Bibliografía	49
IX. Anexo	58

RESUMEN

Las quinolonas y fluoroquinolonas han sido ampliamente utilizadas en producción animal. Sin embargo su uso terapéutico no está exento de riesgos en la salud pública, fundamentalmente en lo que se refiere a la presencia de residuos de estos fármacos en los productos de origen animal, su consecuencia toxicológica, y la generación de resistencia en bacterias transmitidas al hombre.

El método analítico utilizado para la determinación de flumequina en huevos, fue previamente validado de acuerdo a las recomendaciones de la Decisión 2002/657/CE de la Comunidad Europea. Para la detección y cuantificación de la flumequina en clara y yema se utilizó Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con detector de fluorescencia. El límite de detección de la técnica fue de 0,5 $\eta\text{g/g}$, y la recuperación mayor al 80% en promedio.

Para la determinación del período de resguardo en huevos, se administró una formulación comercial de flumequina al 20% durante 5 días consecutivos, a gallinas ponedoras; fueron analizadas las claras y yemas por separado durante y posterior al tratamiento.

Las concentraciones de flumequina durante el tratamiento fueron elevadas superando los 6000 $\eta\text{g/g}$ en clara, y los 600 $\eta\text{g/g}$ en yema, y alcanzándose el peak de concentración al tercer día de tratamiento en los dos compartimentos del huevo. Al finalizar el tratamiento los niveles de concentración decrecieron considerablemente en los primeros 5 días, por debajo de 220 $\eta\text{g/g}$ y 112 $\eta\text{g/g}$ en clara y yema respectivamente, llegando a concentraciones por debajo del límite de detección (0,5 $\eta\text{g/g}$), a los 35 días posterior al término del tratamiento en clara y a los 20 días en yema. El período de resguardo fue de 46 días al aplicarse un margen de seguridad de un 30%, y utilizándose la flumequina en la dosis y ritmo horario determinado por este estudio.

Según los resultados obtenidos en este estudio las concentraciones de flumequina se depletaron por un período más prolongado en claras por lo que se podría tomar éste compartimento como tejido marcador.

SUMMARY

Quinolones and fluoroquinolones have been widely used in animal production. However their therapeutic use is not free from public health risks, essentially in regard to residues of these drugs in animal products, its toxicological implications, and the generation of resistance in bacteria transmitted to humans.

The analytical method used for the determination of flumequine in eggs, was previously validated in accordance to the recommendations of the Decision 2002/657/EC of the European Community. Chromatography High Performance Liquid (HPLC) with fluorescence detector was used for the detection and quantification of flumequine in white and yolk. The detection limit of the technique was 0.5 $\eta\text{g/g}$, and recovery was greater than 80% on average.

A commercial formulation of flumequine at 20% was administered to laying hens for 5 consecutive days to determine the withdrawal time of eggs. Yolks and whites of the eggs were analyzed separately during and after the treatment.

Flumequine concentrations during treatment were higher than 6000 $\eta\text{g/g}$ in white and higher than 600 $\eta\text{g/g}$ in yolk, reaching the concentration peak on the third day of treatment for both compartments of the egg. After treatment, levels concentration decreased significantly in the first 5 days, below 220 $\eta\text{g/g}$ in white and 112 $\eta\text{g/g}$ in yolk, reaching concentrations below the detection limit (0.5 $\eta\text{g/g}$), at 35 days after the completion of treatment in white and 20 days in yolk.

Assigning a 30% security margin, and using flumequine in the dose and rate schedule determined by this study, the withdrawal time was 46 days.

As in this study the flumequine concentrations were depleted for a longer period in white, this compartment could be considered a tissue marker.

INTRODUCCIÓN

En Chile, la producción de huevos para el año 2009, fue de 2.945 millones de unidades anual, pronosticándose un aumento del 3,08% para el 2010, mientras que el consumo per cápita en el año 2009 fue de 173 huevos/háb/año (ASOHUEVO, 2010). Las apropiadas condiciones sanitarias del sector y los tratados comerciales han permitido un escenario óptimo para la inserción de Chile en el mercado internacional, exportando huevos a Estados Unidos, México y España, siempre que se cumpla la normativa de inocuidad alimentaria requerida por cada uno de los países importadores.

Por otro lado, la creciente demanda de productos de origen animal por parte de la población humana, ha llevado a la intensificación de los sistemas productivos, estando los animales cada vez más expuestos a sufrir enfermedades de diversa índole. Esta situación ha significado además, un aumento en la demanda de las diferentes herramientas terapéuticas entre las que se encuentran los antimicrobianos (San Martín, 2001).

Conjuntamente con el aumento en la producción y la demanda, se ha incrementado el interés de los consumidores por el origen e inocuidad de los alimentos, y en especial los de origen animal, ya sea por el potencial peligro de contraer enfermedades zoonóticas como por la presencia de residuos y contaminantes en los productos.

El uso de las fluoroquinolonas ha permitido mejorar la salud y bienestar de las aves al ser utilizadas como terapia. No obstante, el uso terapéutico de estos fármacos no está exento de riesgos en la salud pública. Estos riesgos se centran fundamentalmente en dos aspectos: la generación de resistencia en bacterias que pueden ser transmitidas al ser humano y la presencia de residuos de estos fármacos en los huevos, lo que podría causar reacciones tóxicas y/o alteración de la microbiota intestinal humana. Ambos riesgos toman aún mayor importancia si se considera que estos fármacos son de uso humano.

El Servicio Agrícola y Ganadero, como organismo responsable de velar por la sanidad de la producción pecuaria en Chile, es el encargado de la inspección y del control sanitario de los alimentos y los productos farmacéuticos de uso veterinario, procurando satisfacer las exigencias sanitarias que impongan los países o mercados externos para la comercialización de los productos de origen animal chilenos. Actúa como garante de las certificaciones zoosanitarias, bromatológicas y de calidad e inocuidad de los productos pecuarios de exportación.

En el caso del huevo de consumo, diversos autores han demostrado que los antimicrobianos utilizados en la industria avícola se transfieren a este alimento durante su proceso de formación, existiendo el riesgo que alcancen concentraciones que superan los límites máximos permitidos por diferentes organismos gubernamentales e intergubernamentales. A pesar de esto los Programas de Monitoreo de Residuos de Farmacos en Chile no incluye el análisis de estos.

Debido a esto, surge la necesidad de contar con un método analítico validado para la detección de residuos de flumequina en huevos de consumo, con el propósito de evaluar la presencia de esta droga en los distintos componentes del huevo, y establecer los períodos de carencia para una determinada presentación comercial de flumequina.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Quinolonas y Fluoroquinolonas.

Las quinolonas fueron descubiertas en 1962 por Lescher *et al.*, y a diferencia de los primeros antimicrobianos descubiertos el siglo pasado, no fueron aisladas desde organismos vivos, sino que sintetizadas desde un químico. El hallazgo fortuito de la actividad antibacteriana de derivados de la 1,8 naftiridina en el contexto del desarrollo de agentes antimaláricos, permitió la síntesis del ácido nalidíxico. De esta manera, estos investigadores ocupan un lugar trascendente en el descubrimiento y desarrollo de este tipo de quimioterápicos (Mella *et al.*, 2000; Andriole, 2005).

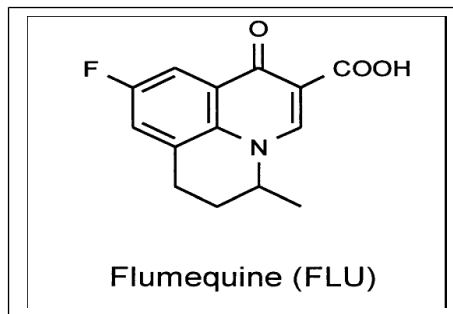
Las primeras quinolonas usadas con fines terapéuticos en medicina veterinaria fueron el ácido nalidíxico y ácido oxolínico. En la década de 1980, con el propósito de ampliar el espectro de acción y mejorar sus propiedades farmacocinéticas, la estructura fue modificada sintetizándose compuestos que presentaban los sustituyentes 6- fluoro y 7- piperazinil, dando origen al grupo de las fluoroquinolonas (Mella *et al.*, 2000).

La adición del grupo fluoro en la posición 6 del anillo básico de las quinolonas, amplió el espectro de acción hacia bacterias Gram positivas, además de mejorar la penetración a las células bacterianas. La adición del grupo piperazinil en la posición 7 mejoró la actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp.* (Andriole, 2005).

La primera fluoroquinolona sintetizada fue la flumequina, la cual fue patentada en el año 1973. La flumequina es actualmente utilizada en medicina veterinaria y su uso está permitido en animales de producción tales como bovinos, cerdos y principalmente aves de corral. La administración de la flumequina es comúnmente vía oral y es recomendada para cuadros gastroentéricos provocados por bacterias Gram negativas (Appelbaum y Hunter, 2001).

La flumequina en particular se caracteriza por la presencia del radical 6 fluoro y por la ausencia del radical 7 piperazinil. Este fármaco tiene buena actividad antimicrobiana sobre aerobios Gram negativos como *Escherichia coli*, sin embargo, tiene escasa actividad sobre aerobios Gram positivos o bacterias anaerobias (Andriole, 2005).

Figura 1: Estructura química de la flumequina.



La evolución en el desarrollo de las quinolonas y fluoroquinolonas ha permitido clasificarlas en distintas generaciones. (Van Bambeke *et al.*, 2005):

La primera generación comprende compuestos originales tales como el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipedímico y cinoxacino. Esta generación se caracteriza por una baja biodisponibilidad oral, limitada distribución a tejidos, y espectro de acción limitado a *Escherichia coli* y otros organismos Gram negativos. (Van Bambeke *et al.*, 2005). A pesar de que aún no existe un acuerdo en cuanto a la clasificación de la flumequina, sí se acepta como una fluoroquinolona de primera generación.

La segunda generación corresponde a las fluoroquinolonas propiamente tal, desarrolladas en la década de 1980. Este grupo exhibe una mayor actividad antibacteriana contra *Enterobacteriaceae*, otras bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa*, y una cierta actividad contra cocos Gram positivos. Se caracterizan por poseer una mejor biodisponibilidad oral y distribución sistémica. Entre ellas se encuentran el norfloxacin, ciprofloxacino, enrofloxacin, danofloxacin, difloxacino y marbofloxacino (Martinez *et al.*, 2006).

La tercera generación mantiene las características de la segunda generación, pero adicionalmente exhibe una mayor actividad contra bacterias Gram positivas, anaerobios, y mycobacteria. Poseen una excelente biodisponibilidad oral y una prolongada vida media de eliminación terminal entre ellas se encuentran el grepafloxacino, gatifloxacino, esparfloxacino, temafloxacino, tosufloxacino y pazufloxacino (Ball, 2000).

La cuarta generación comprende fármacos tales como trovafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino y sitafloxacino (Martinez *et al.*, 2006).

1.2 Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de las fluoroquinolonas.

La farmacocinética se refiere a la disposición de un fármaco en el organismo y se centra en parámetros tales como la absorción, unión a proteínas, distribución y eliminación. Por otro lado, ya que el objetivo final de una terapia antimicrobiana es disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada a infección, la maximización de estos resultados requiere de la comprensión de las complejas interacciones entre la droga administrada y el patógeno infectante (Wispelwey, 2005)

En general las fluoroquinolonas poseen una rápida absorción cuando se administran por vía oral, logrando máximas concentraciones plasmáticas una a dos horas post administración. La absorción es escasamente afectada por los alimentos; sin embargo, puede disminuir en presencia de cationes bivalentes, incluyendo Al^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} y Fe^{++} , que frecuentemente se encuentran en algunos medicamentos, como también en productos lácteos (Turnidge, 1999).

La unión a proteínas plasmáticas es baja (entre un 20-40%) y se une principalmente a albúmina. La vida media plasmática de los distintos representantes de este grupo de antimicrobianos varía entre 1,5 a 17 horas, siendo mayor en las generaciones más nuevas. El volumen de distribución es alto, excediendo los 1,5 L/Kg, por lo que alcanza altas concentraciones intracelulares (Alós, 2003; Andersson y MacGoman, 2003).

La distribución en tejidos es buena, con excelentes niveles en tejido intersticial, células fagocíticas y concentraciones urinarias que exceden las concentraciones mínimas inhibitorias para muchos patógenos. La concentración en próstata, bilis, pulmón, neutrófilos y macrófagos es superior a la sérica, mientras que en líquido cefalorraquídeo alcanza la mitad (Andriole, 2005).

Las vías de biotransformación y excreción difieren entre los distintos compuestos, pero principalmente son metabolizadas por el hígado con eliminación urinaria y fecal de los metabolitos. La eliminación renal ocurre por filtración glomerular y secreción tubular y existe transporte activo de las quinolonas en el intestino (Rodríguez *et al.*, 2000).

Con respecto a la farmacodinamia, esta hace referencia a los cambios bioquímicos y fisiológicos que provoca la droga en el tejido o célula blanco en relación a la concentración alcanzada y dosis. La actividad de las quinolonas es concentración dependiente, lo cual significa que actúa cuando las concentraciones están por sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI), presentando además un efecto postantibiótico prolongado (Andersson y MacGoman, 2003). Esto permite diseñar los esquemas terapéuticos en relación a la dosis y ritmo horario.

1.3. Aplicaciones Terapéuticas de las quinolonas y fluoroquinolonas.

Las fluoroquinolonas son utilizadas para el tratamiento de diversos cuadros infecciosos que afectan el sistema respiratorio, sistema urogenital, próstata, piel, huesos, articulaciones y sistema digestivo. En este último caso, son frecuentes las infecciones por *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* y *Escherichia coli* (Andriole, 2005).

En la industria avícola nacional el uso de la flumequina está indicada principalmente para el tratamiento de enfermedades producidas por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Pasteurella spp.* Su uso está permitido en pollos Broilers y aves de corral, no autorizándose su uso en gallinas ponedoras de huevos destinados al consumo humano. Por otro lado al no existir a nivel nacional la autorización del uso de fármacos extraetiqueta, es

decir, que no se consideren las instrucciones establecidas en el prospecto oficialmente autorizado por las entidades responsables del registro de medicamentos, la flumequina podría ser usada como terapia o como medida preventiva en aves de postura. Con el consecuente riesgo que se presenten residuos de esta droga en los huevos destinados al consumo humano, en la medida que no se conozcan los períodos de resguardo.

1.4. Mecanismo de acción de las quinolonas y fluoroquinolonas

Las quinolonas y fluoroquinolonas actúan inhibiendo la actividad de la enzima topoisomerasa II o DNA-girasa en bacterias Gram negativas y sobre la topoisomerasa IV en Gram positivas, las cuales actúan en el proceso de replicación del ADN bacteriano. Una inhibición prolongada conduce a la muerte de la célula, teniendo un efecto bactericida (Jacoby , 2005; San Martín *et al.*, 2005).

Las topoisomerasas se encuentran en todos los organismos vivos; pero las quinolonas sólo afectan a las topoisomerasa II y IV de las bacterias y no a las células eucariotas humanas, debido a que las topoisomerasas en el humano están formadas por sólo 2 subunidades en lugar de las 4 que poseen las células bacterianas. En el caso de la topoisomerasa II, estas subunidades son la GyrA y GyrB; y para la topoisomerasa IV son la ParC y la ParE (Cué *et al.*, 2005). Estas dos enzimas trabajan conjuntamente en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN.

Las quinolonas y fluoroquinolonas se unen a éstas enzimas, formando un complejo fármaco-enzima alterando su conformación y, de esta manera, les impiden cumplir su función (Jacoby, 2005).

La mayoría de las bacterias tienen ambas enzimas, pero en Gram negativas la ADN girasa es más susceptible a la acción del fármaco, mientras que en bacterias Gram positivas la topoisomerasa IV es más susceptible (Andriole, 1999).

1.5. Resistencia Bacteriana

Actualmente se conocen tres mecanismos de resistencia: mutaciones que alteran el blanco de la droga, mutaciones que reducen la acumulación de droga, y plásmidos que protegen la célula del efecto letal de las quinolonas, siendo el primero el mecanismo de resistencia más importante (Bearden y Danziger, 2001).

El principal mecanismo de resistencia se logra mediante mutaciones en los genes de las enzimas, produciéndose un cambio en la secuencia de los aminoácidos que codifican las subunidades de cada enzima. Estas mutaciones afectan a los genes *gyrA* de la topoisomerasa II en bacterias Gram negativas y al gen *parC* en la topoisomerasa IV en bacterias Gram positivas. Estas mutaciones se encuentran en una región específica identificada como QRDR (región determinante de la resistencia a quinolonas), alterándose la afinidad de la quinolona por la enzima.

También se describe resistencia asociada a alteraciones en la membrana plasmática que reducen la acumulación de la droga en el interior de la célula bacteriana. Esto ocurre por alteración de las porinas, o por una acelerada salida de la droga mediada por bombas de eflujo dependientes de energía (Fábrega *et al.* , 2008).

La resistencia asociada a la presencia de plásmidos se debe a que presentan un gen (*qnr*) de resistencia frente a las quinolonas (Jacoby ,2005). La proteína Qnr es capaz de unirse y proteger a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV del efecto de las quinolonas. Los plásmidos pueden transferirse horizontalmente, lo que implica que puede transferir resistencia a otras bacterias tanto patógenas como no patógenas (Jacoby, 2005). Sólo se ha confirmado este tipo de resistencia en un número pequeño de cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Aunque generalmente las fluoroquinolonas usadas en medicina veterinaria son diferentes a las disponibles para uso clínico humano, la bacteria generalmente genera resistencia cruzada a todas las fluoroquinolonas (Orden y De La Fuente, 2001).

En producción avícola, a nivel internacional, se ha descrito el desarrollo de resistencia en bacterias transmisibles al hombre, tales como *Salmonella spp.* (Eaves *et al.*, 2004; Esaki *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006), *Campylobacter spp.* (Griggs *et al.*, 2005; Humphrey *et al.*, 2005) y *Escherichia coli* (Lee *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005). Chile no está ajeno a este problema, ya que se ha observado resistencia frente a estos fármacos en cepas de *Salmonella spp.* aisladas de pollos broiler, aves de postura y huevos (San Martín *et al.*, 2005). Esto, se ha asociado con una disminución de la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de enfermedades zoonóticas bacterianas, en los cuales estos fármacos son de primera línea de elección (Turnidge, 2004; Norstrom y *et al.*, 2006).

El desarrollo de resistencia a estos antimicrobianos ha generado un gran debate sobre el uso de estos fármacos en animales de producción, esto sobre todo por la amenaza a la salud pública, causada por el riesgo de transferencia de bacterias zoonóticas (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* y *Escherichia coli*), con genes de resistencia que podrían traspasarse tanto a bacterias patógenas o no patógenas del tracto gastrointestinal humano, generando la disminución en la eficacia terapéutica en el tratamiento de infecciones en medicina humana (Orden y De La Fuente, 2001).

En el caso de la “Food and Drug Administration” de los Estados Unidos de América (FDA), en 1994 un grupo de expertos recomendaron que el uso de fluoroquinolonas en animales de producción fuera permitido, siempre y cuando se controlara el uso inadecuado y el desarrollo de resistencia (Orden y De La Fuente, 2001). En el año 1997, la FDA de Estados Unidos de América prohibió el uso extraetiqueta de fluoroquinolonas debido a la gran preocupación por el desarrollo de resistencia bacteriana (FDA, 2001; Chu *et al.*, 2002).

Una medida tomada por la OMS fue la publicación “Impacto en medicina humana por el uso de antimicrobianos en animales de producción”, en la cual se recomienda la discontinuación del uso de los antimicrobianos como promotores de crecimiento, recomendación que también hizo el Instituto de Medicina de los Estados Unidos de América en el año 2003 (Fábrega *et al.*, 2008).

1. 6. Residuos de quinolonas y fluoroquinolonas en alimentos de origen animal y sus riesgos en la salud humana

El potencial antimicrobiano de las fluoroquinolonas y su autorización para ser utilizado en especies productivas, ha justificado un aumento en la terapia con estos productos. Sin embargo su uso irracional en terapias y profilaxis en plantales de animales destinados a consumo humano, se convierte en un riesgo para el consumidor. Este riesgo radica en la presencia de residuos farmacológicos en alimentos de origen animal que podrían causar reacciones alérgicas, alteración en la microbiota intestinal normal del hombre, y eventualmente cuadros de toxicidad aguda o crónica en los consumidores. Otro riesgo latente es la generación de bacterias enteropatógenas resistentes a estos antimicrobianos, las cuales pueden ser transmitidas al hombre a través de la cadena alimentaria (Kukanish *et al.*, 2005; Hassouan *et al.*, 2007).

Comparadas con otros agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, las fluoroquinolonas pueden ser consideradas relativamente bien toleradas (Andriole, 1999), sin embargo se describe la presencia de reacciones adversas, las cuales pueden ser de presentación aguda o crónica (Martínez *et al.*, 2006). Mayor relevancia toma la ingesta de estos residuos en los alimentos de origen animal, debido a la dificultad de vincular la causalidad del efecto adverso presentado, con el consumo de alimentos (Codex Alimentarius, 1995).

Dentro de las reacciones adversas más frecuentes, están los trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarreas. También se ha descrito fototoxicidad, erupción cutánea, prurito, urticaria y eritema en piel (Andriole, 1999). También se han documentado reacciones más severas como alteraciones en el sistema nervioso central acompañadas de agitaciones, temblores y ataxia, y cardiotoxicidad (Martínez *et al.*, 2006). Además en estos últimos años, mediante estudios de carcinogenicidad, se ha postulado que la flumequina podría tener la potencialidad de producir tumores hepatocelulares (Kashida *et al.*, 2002; Uehara *et al.*, 2002).

También se ha detectado cierta condrotoxicidad causada por las quinolonas en animales inmaduros, afectando el cartílago articular y/o la placa de crecimiento epifisial, dependiendo de la etapa de desarrollo. La patogénesis de la condrotoxicidad se puede explicar probablemente por las propiedades quelantes sobre el magnesio. La artropatía en humanos es un potencial efecto adverso y su influencia sobre el cartílago articular según estudios “*in vivo*”, ha determinado que su uso en pediatría y gestación esté contraindicado. También se han descrito casos de tendinitis y ruptura espontánea de tendón en pacientes tratados con fluoroquinolonas (Yoon *et al.*, 2004).

1.7. Límites Máximos Residuales (LMR) y Límites Mínimos de Funcionamiento Exigido (MRPL)

Organizaciones nacionales e intergubernamentales han establecido los Límites Máximos Residuales (LMR) para los antimicrobianos basándose en los estudios de toxicidad y en las alteraciones en la microbiota intestinal humana. La definición de estos LMR, facilita el control y monitoreo de los residuos en los alimentos a través de los diversos Programas de Control de Residuos de Fármacos que permiten definir medidas preventivas en los sistemas productivos asegurando alimentos inocuos a la población (OMS, 2006).

Los estudios toxicológicos a su vez se basan en la ingesta diaria admisible (ADI), considerando así la exposición aguda y a largo plazo de la ingesta de residuos de fármacos. Se estudia carcinogenicidad, mutagenicidad y genotoxicidad, toxicidad reproductiva, toxicidad en el desarrollo, teratología, cardiotoxicidad y en el caso de agentes antibióticos, la seguridad para la microflora intestinal. Por lo tanto, la ADI proporciona la base para determinar el LMR del fármaco en productos de animales destinados al consumo humano (Cerniglia y Kotarski, 2005) y es un valor relevante de protección para el consumidor frente a los residuos de medicamentos veterinarios presentes en los alimentos.

La Comisión del Codex *Alimentarius* (1995), define los LMR para los medicamentos veterinarios como, la concentración máxima de residuos resultantes del uso de un medicamento, expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base de peso fresco, que se permite legalmente o se reconoce como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo.

La Organización Mundial de Comercio (OMC), estableció un acuerdo entre los países miembros sobre la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. En dicho acuerdo, si bien es cierto la OMC autoriza a los países a establecer sus propias reglamentaciones, alienta a los gobiernos a que armonicen sus medidas, recomendando que se utilicen normas y directrices internacionales elaboradas por la Comisión Mixta FAO/OMS (JECFA) y *Codex Alimentarius*, cuando existan (San Martín, 2001).

También existen organizaciones gubernamentales e intergubernamentales que velan por el cumplimiento en el control de residuos y se encargan de sancionar las infracciones en este sentido. La FDA a través del Centro para Medicina Veterinaria (CVM) se encarga de investigar los casos ilegales de presencia de residuos en productos de origen animal (Donoghue, 2003).

La Unión Europea, a través de la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) se encarga de la protección y la promoción de la salud pública y animal, a través del control sobre el uso de los medicamentos (Europa, 2008).

Los LMRs establecidos por la Unión Europea para las distintas quinolonas utilizadas en aves de corral son de 100 µg/kg para ácido oxolínico y enrofloxacino más su metabolito, 400 µg/kg para flumequina y 200 µg/kg para danofloxacino (Europa, 1990).

A nivel nacional, en el año 1999, el Ministerio de Salud fijó los LMRs para fármacos de uso veterinario (Chile. Ministerio de Salud, 1999).

A modo de referencia los LMRs establecidos de flumequina para su uso en pollos broilers en Europa, Chile y Japón se señalan en el Cuadro número 1.

Cuadro 1: LMRs para flumequina en tejidos de pollos Broiler

Fármaco	LMR Unión Europea	LMR Chile	LMR Japón	Tejido
Flumequina	400 µg/Kg.	500 µg/Kg.	500 µg/Kg.	Músculo
	250 µg/Kg.	1000 µg/Kg.	1000 µg/Kg.	Piel y grasa
	800 µg/Kg.	1000 µg/Kg.	500 µg/Kg.	Hígado
	1000 µg/Kg.	3000 µg/Kg.	3000 µg/Kg.	Riñón

Se han establecido LMR para las fluoroquinolonas, incluyendo la flumequina, en diferentes tejidos comestibles de aves y otras especies (músculo, grasa, hígado y riñón); sin embargo, a nivel nacional e internacional, estos no han sido definidos en huevos (Lolo *et al.*, 2005). En nuestro país, el Reglamento Sanitario de los Alimentos, establece LMRs en huevos para oxitetraciclina, colistina, bacitracina y espectinomocina, pero no así para flumequina, por lo que su uso en aves ponedoras no está autorizado. El hecho de que éste fármaco esté disponible en el mercado, puede llevar a su uso en gallinas productoras de huevos destinados al consumo humano; esta situación conlleva al riesgo de que los huevos puedan contener residuos de flumequina.

En el año 2002 la Unión Europea mediante la Decisión 2002/657/CE (Europa, 2002), estableció un nuevo concepto que puede aplicarse a los medicamentos para los cuales no se ha establecido un LMR y para aquéllos que han sido prohibidos o no autorizados. Este es el Límite Mínimo de Funcionamiento Exigido (MRPL), el cual depende de la sensibilidad del método analítico y está estrechamente relacionado con la tecnología utilizada. Además, indicó que los laboratorios de control oficial deben utilizar sistemas de aseguramiento de calidad y métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes para así asegurar la trazabilidad con arreglo a normas comunes o normas consensuadas (Europa, 2002). Éste concepto de MRPL y su

determinación abre la posibilidad de utilizar la flumequina actualmente en aves de postura, permitiendo establecer períodos de resguardo para formulaciones de flumequina utilizadas en gallinas de postura, y también su monitoreo en Programas de Control de Residuos.

El objetivo de todas las organizaciones intergubernamentales preocupadas de la vigilancia de residuos de medicamentos veterinarios en productos de origen animal, destinados a consumo humano, es la inocuidad de los mismos, protegiendo de esta manera la salud de las personas. El *Codex Alimentarius* define la inocuidad como “*la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y / o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan*”. En términos de residuos de fármacos, esta definición requiere el uso prudente de éstos en nuestra profesión. Así en el Código Sanitario de Animales Terrestres de la OIE, se habla del uso prudente y responsable de antimicrobianos en medicina veterinaria (OIE, 2008).

1.8. Monitoreo de residuos a nivel nacional

En el ámbito nacional, es importante señalar que en estos últimos años ha existido un gran esfuerzo por parte de los organismos gubernamentales, privados y universidades, orientados a la entrega de un producto de origen animal inocuo y seguro para la población. Se suma a esto, que el sector pecuario exportador ha debido experimentar cambios significativos en su quehacer habitual, producto de un conjunto de transformaciones en relación directa con los procesos de globalización económica, lo cual los lleva a poner en práctica normas concordantes con los objetivos fundamentales de la OMC.

Es así, que el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura, está encargado del Registro de Medicamentos Veterinarios y de certificar los productos de exportación. Por su parte, el Ministerio de Salud vela por la inocuidad de los alimentos que van a la población nacional a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos (San Martín, 2001). El 25 de Agosto de 1999, este reglamento fijó los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano, y en

el mismo año además se elaboró un Programa Nacional de Vigilancia y Control de Residuos en Alimentos (Chile, 1999).

Chile es un país que posee condiciones zoonositarias privilegiadas, lo que favorece el comercio internacional. El uso racional de fármacos en sistemas de producción animal favorecería esta condición para así mantener los mercados ya alcanzados o acceder a nuevos mercados para los productos pecuarios (SAG, 2008a).

Actualmente existen Programas de Control de Residuos para carnes de ovino, liebre, pollo, cerdo, pavos, miel, bovino y lácteos. Los Laboratorios de determinación de Residuos son acreditados por el SAG a través del Sistema de Acreditación de Terceros, en el cual se establece una norma general que deben cumplir todas las entidades acreditadas. En Chile, el Instituto Nacional de Normalización (INN) otorga la Acreditación ISO 17025, que es uno de los requisitos que exige el instructivo técnico de diagnóstico de residuos (SAG, 2008b).

Chile cuenta con 5 Laboratorios de determinación de Residuos acreditados por el SAG, la supervisión y fiscalización periódica de éstos está a cargo del Sistema de Acreditación de Terceros que estableció el SAG el año 2004, en el cual se establece una norma general que deben cumplir todas las entidades acreditadas, y un reglamento específico para los laboratorios de ensayos. Este establece los requisitos necesarios para la realización de análisis/ensayos como apoyo para la ejecución de actividades en el marco de programas oficiales del Servicio, para cada área de análisis debe además cumplir con el instructivo técnico correspondiente.

El SAG no contempla en sus programas nacionales de control de residuos farmacológicos el monitoreo de huevos, y los laboratorios nacionales no cuentan con métodos analíticos validados para la detección de residuos de distintos fármacos en este alimento.

1.9. Períodos de resguardo de los fármacos utilizados en animales de producción.

El uso racional de antimicrobianos comprende el cumplimiento de las indicaciones y modo de empleo del medicamento así como el cumplimiento de los períodos de resguardo. El Codex Alimentarius señala que el cumplimiento del período de resguardo para cada formulación de un fármaco, es una de las principales medidas para controlar la presencia de residuos en los tejidos animales que van a consumo de la población humana (FAO/OMS, 1995).

Los LMR's o MRPL's nos permiten definir los períodos de resguardo, siendo éste el tiempo transcurrido desde que se aplica la última dosis de tratamiento de un fármaco, hasta que los niveles de residuos de la droga estén por debajo de los correspondientes LMR's o MRPL's en todos los tejidos del animal (Europa, 1996). El período de resguardo se determina mediante estudios de depleción, considerando los tiempos de eliminación del fármaco desde el organismo animal (Lolo *et al.*, 2005).

Depende de factores como: la vía de administración, dosis, determinando los niveles plasmáticos alcanzados por el fármaco, vida media de eliminación y la forma farmacéutica, que en particular, afecta los parámetros farmacocinéticos, tales como velocidad y magnitud de absorción, y la vida media de eliminación.

El periodo de resguardo establecido para una formulación farmacéutica es seguro cuando se respetan las indicaciones del medicamento, posología adecuada, y la especie de destino. De esta manera, la potencial presencia de residuos en los productos comerciales destinados al consumo humano, estarán a niveles traza, es decir, bajo los LMRs fijados, por lo que la seguridad del consumidor no estará comprometida (Anadón, 1995). Usos extraetiqueta de fármacos y la administración de una determinada formulación farmacéutica en forma inapropiada altera los períodos de resguardo de una droga favoreciendo la presencia de residuos ilegales en los tejidos comestibles (Anadón, 2001).

Para determinar los períodos de resguardo se deben realizar estudios de depleción, en los cuales a un grupo de animales de una determinada especie productiva, se les administra una fórmula farmacéutica comercial de un medicamento. Para el caso de las aves de postura, estos estudios se deben realizar en huevos, ya que dependiendo de las características fisicoquímicas del fármaco podrían alcanzar los ovarios, folículos en crecimiento y oviducto y de esta forma difundir a la yema o a la clara, como es el caso de las fluoroquinolonas. En estos estudios, se monitorean las concentraciones de droga, desde la última aplicación del medicamento a las gallinas ponedoras, hasta el momento en que las concentraciones en huevo alcancen el MRPL o el LMR (Lolo *et al.*, 2005).

Las reglamentaciones internacionales señalan que los estudios de depleción se deben realizar en grupos de aves a las cuales se les administra el fármaco, utilizando una formulación comercial y el régimen terapéutico recomendado. El número de animales por tiempo de muestreo varía según el organismo regulador. La FDA recomienda el uso de 5 animales por tiempo de muestreo, tomando como mínimo 20 animales por estudio (FDA, 2005b). Por otro lado, el Comité para Medicamentos Veterinarios (CVMP) recomienda entre 3 a 10 animales por tiempo de muestreo (CVMP, 1997)

Los intervalos de tiempo en el muestreo varían según las características farmacocinéticas de la droga. La toma de muestras considera los tejidos animales que están destinados al consumo humano para la detección y cuantificación del analito en estudio. El parámetro farmacocinético considerado para los estudios de depleción es la fase de eliminación terminal del fármaco, para lo cual se realizan curvas de concentración del fármaco (en escala semilogarítmica) versus tiempo (en días). Se considera que la fase de eliminación terminal sigue un modelo monocompartimental con una cinética de eliminación de primer orden y se analiza a través de un Análisis de Regresión Lineal, considerando un nivel de confianza del 95% (CVMP, 1997).

Debido a la eventual variabilidad que presenta el comportamiento del fármaco en los diferentes individuos y que en la determinación de los períodos de resguardo se trabaja con un número reducido, pero suficiente de animales, pueden presentarse desviaciones importantes en relación al comportamiento poblacional. El CVMP (1997) recomienda aplicar un margen de seguridad entre un 10 a un 30% por sobre el período establecido para compensar la variabilidad biológica entre individuos.

1.10. Métodos analíticos para la detección de residuos de fluoroquinolonas.

Los principales métodos analíticos para la determinación de residuos de medicamentos en alimentos de origen animal son los cromatográficos (cromatografía líquida con detección ultravioleta, fluorescencia o espectrometría de masas y cromatografía de gases). Estas técnicas se caracterizan por ser específicas, selectivas y sensibles, permitiendo determinar pequeñas concentraciones de los fármacos en la matriz o muestra que se analizan (Pérez, 2004). Existen diferentes métodos analíticos para la detección de residuos de medicamentos veterinarios en huevos, pero en el caso de las fluoroquinolonas, la Cromatografía Líquida con Detector de fluorescencia es actualmente la de mayor uso a nivel mundial (Chu *et al.*, 2002; Donoghue y Schneider, 2003).

Generalmente, los métodos analíticos descritos en la literatura muestran un amplio rango de procedimientos de extracción y limpieza, dependiendo del tipo de quinolona y tejido analizado. En el caso particular de los huevos, ésta es una matriz difícil de analizar ya que los lípidos y proteínas deben ser removidos antes del análisis. El tratamiento de las muestras incluye un paso de extracción con solventes polares o mezclas hidro-orgánicas en medio ácido o básico, seguido de varios procedimientos de extracción líquido-líquido o sólido-líquido (Ramos *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2003).

Con el fin de obtener resultados reproducibles y repetitivos, los laboratorios deben previamente validar los métodos analíticos utilizados en la detección de fármacos, aún cuando éstos sean oficiales, de referencia, o hayan sido previamente descritos. Al respecto, la Directiva de las Comunidades Europeas en relación al Funcionamiento de los Métodos

Analíticos y la Interpretación de los Resultados, señala que el concepto de métodos de rutina y de métodos de referencia, se encuentra obsoleto, reemplazándose por un planteamiento que establece criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos (Europa, 2002). El procedimiento de validación de un método analítico debe incorporarse en todas las investigaciones cuyos resultados dependan de la química analítica, ya que permiten al laboratorio demostrar que el método seleccionado y desarrollado para una sustancia específica, en una muestra específica, produce resultados comparables.

1.11 Distribución de los antimicrobianos en huevos.

El huevo está formado básicamente por tres componentes: la yema, que es el equivalente al óvulo microscópico de los mamíferos; la albúmina, o clara, que es secretada por el aparato reproductor; y el cascarón, que proporciona la protección y los minerales al embrión en desarrollo. El tamaño, composición del huevo y la velocidad a las que se producen, son influenciados por numerosos factores genéticos, ambientales y fisiológicos. Los constituyentes del huevo se elaboran en dos fases sucesivas. En el ovario se deposita el vitelo durante los 10 a 12 días que preceden a la ovulación. Una vez ovulado y durante su paso por el oviducto, se depositan los otros constituyentes del huevo; esta fase dura 24 a 26 horas (Proudman, 2002).

Morfológica y funcionalmente, el oviducto puede dividirse en seis regiones: Infundíbulum, Magnum, Istmo, Istmo rojo o Glándula Tubular de la Cáscara, Glándula de la Cáscara propiamente tal y Vagina. Todos los segmentos excepto la vagina, están involucrados en el proceso de formación del huevo (Fernández y Arias, 2000).

La yema se compone predominantemente de lipoproteínas formadas en el hígado, las cuales son transportadas al ovario vía sanguínea. Estas lipoproteínas son depositadas en los folículos ováricos en forma de capas concéntricas. Este proceso tarda alrededor de 10 días en completarse. No se sabe con exactitud si la yema se deposita hasta el momento de

la ovulación o si transcurre un día entre la última deposición de material y la ovulación (Donoghue y Myers, 2000; Kan y Petz, 2000).

Al ovular la yema pasa al Infundíbulo, que es la región más proximal al ovario, donde se da lugar a la fecundación antes del depósito de la albúmina. Este proceso demora entre 15 a 20 minutos. En el Magnum la yema permanece 3-4 horas, y es aquí donde se sintetiza la totalidad de las proteínas de la clara. La formación de la clara ocurre en general en 3 fases, estas son: síntesis y almacenamiento de albúmina previo a la ovulación, secreción de proteínas almacenadas, y síntesis y secreción de nuevas proteínas durante el paso del óvulo (yema) bajando por el sistema reproductivo y, adición de agua. Después de la ovulación, estas proteínas almacenadas son secretadas alrededor del óvulo (Donoghue y Hairston, 2000). La liberación de la albúmina es probablemente afectada por la estimulación mecánica del huevo en descenso.

En el Istmo el huevo permanece 1-2 horas y aquí ocurre el depósito de las membranas de la cáscara. En el Istmo rojo o Glándula Tubular de la Cáscara ocurre el depósito de las mamilas lugar donde se iniciará la mineralización de la cáscara. Al abandonar el Istmo rojo el huevo alcanza la Glándula de la Cáscara donde permanecerá aproximadamente 20 horas. En esta región ocurren dos fenómenos: hidratación de las proteínas de la clara lo que hace que el huevo tome estrecho contacto con la pared de esta región y mineralización de la cáscara que se produce por la precipitación de calcio en asociación con una trama orgánica. Durante las dos últimas horas de formación de la cáscara, se detiene la mineralización y se inicia el depósito de cutícula. Luego del depósito de ésta, la glándula de la cáscara se contrae y expulsa el huevo hacia la vagina (Fernández y Arias, 2000).

Los medicamentos veterinarios utilizados en gallinas ponedoras son aplicados en forma masiva a través del agua o el alimento. Algunas de estas drogas están diseñadas para un efecto sistémico, por lo que deben absorberse en el intestino para llegar a plasma y distribuirse en el organismo para ejercer su acción. Esta absorción se debe a las propiedades lipofílicas de los fármacos que les permiten interactuar y traspasar

membranas. Cuando estos compuestos alcanzan la sangre, estos son distribuidos por todo el organismo, incluyendo en gallinas ponedoras los ovarios con folículos en crecimiento y el oviducto, donde la clara es formada y secretada (Kan, 2003).

La farmacocinética de la flumequina en huevos de consumo, depende de varios factores como la fisiología de formación del huevo, la composición de la yema y la clara, las propiedades fisicoquímicas de la flumequina y de los componentes del huevo. Así, dependiendo de la hidrosolubilidad o liposolubilidad de la droga, esta tendrá mayor afinidad a la clara o a la yema respectivamente.

En general los residuos en clara son un reflejo de los niveles plasmáticos de la droga, y aparecen en 2 a 3 días de iniciada la exposición. Los residuos en yema, por lo general requieren de una exposición previa de 8 a 10 días para alcanzar niveles constantes. Por otro lado de acuerdo al tiempo y momento de exposición del fármaco en relación al proceso de formación de la yema, los niveles de residuos en ésta pueden aumentar, mantenerse constantes o disminuir. Así también la ausencia de residuos en el huevo toma entre 2 a 3 días en la clara, y entre 8 a 10 días en la yema, desde el retiro de la exposición a la droga (Donoghue y Myers, 2000; Kan y Petz, 2000). Sin embargo, si el nivel de exposición es muy alto y el límite de detección para la droga es lo suficientemente bajo, sería posible detectar residuos de drogas en aquellos huevos cuyas yemas se encontraban en la fase intermedia de crecimiento folicular. De lo contrario, si la sensibilidad del método analítico utilizado no es adecuada, los residuos presentes en el huevo podrían ser detectados sólo por un corto período de tiempo, o no ser detectados (Donoghue y Myers, 2000; Donoghue *et. al.* 1997).

Anhalt (1977) y Hafez (1991) consideraron la yema como el principal compartimento del huevo a ser tomado en cuenta cuando se consideran residuos de droga. Esto, contrasta con las observaciones realizada por Blom (1975), quien reportó niveles de residuos de sulfonamidas mucho más altos en clara que en yema.

Debido a estos factores mencionados se hace necesario observar como se comporta la flumequina en esta matriz, en que magnitud se traspasa al huevo y cuanto tiempo demora en desaparecer de éste.

II. HIPÓTESIS

“La administración de flumequina en aves de postura genera residuos de esta droga en yema y clara, por a lo menos una semana después de su administración”.

II. OBJETIVOS

Objetivo General:

“Estudiar el comportamiento de la flumequina en huevos de gallinas de postura, para determinar su período de resguardo en huevos de consumo.”

Objetivos Específicos:

1. Validar una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la detección de residuos de flumequina en huevos de aves de postura, de acuerdo a las recomendaciones de normativas internacionales.
2. Evaluar la magnitud de transferencia de flumequina a los compartimentos del huevo.
3. Determinar el período de resguardo de una formulación de flumequina en huevos de gallinas de postura tratadas con este fármaco.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Objetivo N° 1:

“Validar una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la detección de residuos de flumequina en huevos de aves de postura, de acuerdo a las recomendaciones de normativas internacionales.”

El método fue validado según las recomendaciones de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (Europa, 2002).

Animales y matriz de trabajo.

Se utilizaron aproximadamente 150 huevos sin antimicrobianos (blanco), recolectados de gallinas Leghorn sin tratamiento alguno. Estas gallinas fueron criadas desde las 14 semanas de edad en el galpón experimental del Departamento de Fomento de la Producción Animal, el que cuenta con dispositivos adecuados para el manejo de la temperatura ambiental, ventilación e iluminación natural y artificial. Las condiciones de manejo de las aves, se efectuaron de acuerdo a los preceptos del bienestar animal, sancionadas por el Comité de Ética de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las aves experimentales fueron alimentadas con dietas libres de antimicrobianos, (para evitar la interferencia con la droga en estudio), respondiendo a los requerimientos nutricionales entregados por el National Research Council (1994), para la línea genética.

Preparación de las muestras y validación de los métodos analíticos.

Debido a las distintas características fisicoquímicas entre los compartimentos del huevo, la clara y yema se analizaron por separado. Las muestras constan en 1 gramo de clara, y 1 gramo de yema de cada huevo en estudio.

A cada una de las muestras se les añadieron diferentes concentraciones de flumequina de 0,5-1-2-4 y 8 ppb las que se lograron a partir de soluciones madres de 1 mg/ml. Se utilizaron estándares de pureza certificada de flumequina (Sigma®). Una vez fortificadas las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción utilizando un protocolo basado en el método de Zeng et al. (2005).

A las muestras de yema se les agregó 500 µl de acetonitrilo y fueron agitadas por 5 minutos. Luego a ambas muestras (claras y yemas) se les agregó 4 ml de una solución de ácido acético/etanol absoluto, en una proporción de 1:99 y fueron agitadas durante 5 minutos para homogeneizar la muestra.

Hecho esto las muestras son agitadas durante 30 minutos a 200 rpm y dejadas en reposo 5 minutos, después son centrifugadas durante 20 minutos a 3220 g. El sobrenadante fue traspasado a un tubo de vidrio y secado bajo flujo de nitrógeno a 78° Celsius obteniéndose un sedimento, el cual fue disuelto en 500 µl de acetonitrilo, agitado durante 5 minutos y sonicado por 5 minutos. Luego se les agregó 2 ml de hexano, se agitaron y sonicaron nuevamente por 5 min y dejadas en reposo por 5 min lográndose una solución bifásica en la que se elimina la fase superior. En las muestras de yema la extracción con hexano fue repetida una vez más.

Nuevamente las muestras fueron secadas bajo flujo de nitrógeno a 78°c, y el residuo disuelto en 250 µl de fase móvil, agitadas y sonicadas por 2 minutos.

Finalmente, las muestras fueron traspasadas a un tubo eppendorf y centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados y traspasados a a viales de HPLC para su lectura en el equipo cromatógrafico.

Fase móvil:

Solución A: en un litro de agua HPLC agregar 1,348 µl de ácido ortofosfórico al 85%.

Solución B: 250 ml de agua HPLC.

Solución C: 600 ml acetonitrilo.

Mezclar y agitar, la mezcla debe encontrarse en un rango de ph de 2,1 - 2,5.

Sistema Cromatográfico y Condiciones Cromatográficas.

El sistema cromatográfico fue Cromatografía Líquida con Detector de Fluorescencia (HPLC, Waters 2475) y una columna C-18 (Symmetry®, Waters, Irlanda) de 5 μm (250 mm x 4,6 mm). Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las descritas por Zeng et al. (2005): flujo de la fase móvil 0,7 ml/minuto; temperatura de la columna 35° C; longitud de onda excitación/emisión: 325/360 nm.

Parámetros de validación

Basándose en las recomendaciones de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (Europa, 2002), los parámetros definidos fueron: tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, precisión, repetitividad, límite de decisión ($CC\alpha$), capacidad de detección ($CC\beta$) y robustez.

a) Tiempo de retención del analito.

Se analizaron 6 repeticiones de droga pura, y fueron comparadas con los cromatogramas de las muestras blanco, determinándose el promedio del tiempo de elución del analito.

b) Especificidad.

Se refiere a la capacidad de un método analítico en distinguir al analito en estudio entre otras sustancias, y se determinó analizando 20 muestras blanco de yema, y 20 muestras blanco de clara verificando la posibilidad de presentarse interferencias con otras sustancias en la región de elución del analito.

c) Recuperación.

Se determinó comparando curvas de droga pura (sin matriz), con 3 curvas de muestras fortificadas a 1-2-4-8 ng/g en claras y 0,5-1-2-4 ng/g en yemas, calculándose así el porcentaje de droga recuperada luego de la extracción (3 muestras para cada concentración).

El porcentaje de recuperación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = 100 * \frac{\text{Área del fortificado}}{\text{Área de la Droga Pura}}$$

Los valores de recuperación obtenidos se aceptaron cuando éstos se encontraron entre los señalados en la directiva 2002/657/CE.

d) Precisión. (Reproducibilidad intralaboratorio).

Se analizaron 6 curvas fortificadas a 0,5, 2 y 8 $\eta\text{g/g}$, realizadas por diferentes analistas y en distintos días, y se calculó la concentración detectada en cada muestra. Además, se calculó el promedio, la desviación estándar y coeficiente de variación en % (CV %), para cada concentración. Se verificó que las linealidades de cada curva tuvieran una correlación (r) > 0,95.

e) Linealidad de la curva.

La linealidad del método se mostró a través de 3 curvas de calibración de 0,5, 1, 2, 4 y 8 $\eta\text{g/g}$, siendo la más baja igual a $CC\alpha$. La fórmula utilizada es; área = pendiente* concentración + intercepto. cuyo Coeficiente de Correlación es cercano a uno ($r > 0,95$).

f) Repetibilidad.

Se determinó de la misma manera que la precisión, es decir, mediante 6 curvas de 3 puntos cada una. Los resultados fueron aceptados cuando el coeficiente de variación de las curvas era la mitad o igual al coeficiente de variación de la precisión.

g) Límite de decisión o detección ($CC\alpha$).

Corresponde al valor límite a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (1% falso positivo) que una muestra no es conforme. Para calcularlo analizamos 5 curvas de 0,5-1-2-4-8 $\eta\text{g/g}$, incluyendo una muestra blanco (concentración cero) para cada curva. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la ordenada en origen.

h) Capacidad de detección (CC β).

Corresponde a la concentración mínima de una sustancia que se puede detectar, identificar o cuantificar con una posibilidad de error β (5%). Se calculó analizando 20 muestras blanco enriquecidas en la concentración del límite de decisión. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual al límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar del coeficiente de variación obtenido entre cada muestra.

i) Robustez.

Corresponde a la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Se identificaron 3 factores que pudieran influir en los resultados finales de los análisis, (tiempo de agitado en shaker, tiempo centrifugación, temperatura secado), los que se variaron ligeramente y mediante el Método de Youden (diseño factorial fraccional incompleto) se diseñaron 8 cartas de trabajo que incluían las modificaciones alternadamente, lo que permitió detectar las interacciones entre dichos factores:

- *Carta A: agitar 25 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 50°C.*
- *Carta B: agitar 30 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 50°C.*
- *Carta C: agitar 25 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 50°C.*
- *Carta D: agitar 30 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 50°C.*
- *Carta E: agitar 25 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 78°C.*
- *Carta F: agitar 30 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 78°C.*
- *Carta G: agitar 25 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 78°C.*
- *Carta H: agitar 30 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 78°C.*

Se considera que el método es robusto si la Desviación Estándar (D.S.) calculada es menor que la D.S. de la precisión tanto en yema como en clara.

4.2.- Objetivo N° 2:

“Evaluar la magnitud de transferencia de flumequina a los compartimentos del huevo.”

-

4.3.- Objetivo N° 3:

“Determinar el período de resguardo de una formulación de flumequina en huevos de gallinas de postura tratadas con este fármaco.”

Animales de experimentación:

Se utilizaron 15 pollitas Leghorn de 14 semanas de edad las que fueron criadas en el galpón experimental del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con un adecuado manejo de temperatura ambiental, ventilación e iluminación natural y artificial.

Estas se alojaron en jaulas convencionales con comederos lineales y bebederos automáticos de niple permitiendo un consumo de alimento y agua “ad libitum”. Fueron alimentadas con dietas libres de antimicrobianos que cubren los requerimientos nutricionales según lo señalado por el National Research Council (NRC, 1994) para la línea genética, y fase inicial de postura. El manejo de las aves, se realizaron bajo los preceptos del bienestar animal, sancionadas por el Comité de Ética de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Las gallinas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos:

- *Grupo A:* grupo tratamiento formado por 12 gallinas, para asegurar la recolección mínima de 10 huevos diarios en su peak de postura.
- *Grupo B:* grupo sin tratamiento (control) formado por 3 gallinas.

Al *grupo A* se le administró una dosis de 26,6 mg/kg p.v. de una presentación comercial de flumequina 20% cada 24 horas por 5 días consecutivos, mediante sonda

gástrica. Al *grupo B* se le administró agua como placebo, para descartar diferencias en los resultados por el manejo de las aves.

Recolección de los Huevos.

Para la evaluación de la transferencia de flumequina a los distintos compartimentos del huevo, los huevos se recolectaron a partir del día 0 (inicio del tratamiento) y se analizaron 6 muestras de clara y yema por día.

Para la determinación de los períodos de carencia, los huevos del grupo A fueron recolectados durante 50 días post-tratamiento, analizándose 6 muestras de clara y 6 de yema por cada día de recolección. Estos huevos fueron marcados señalándose el día de recolección y mantenidos refrigerados (entre 4°C y 8°C) hasta el análisis cromatográfico.

Para determinar el período de resguardo de flumequina en huevos, se determinó las concentraciones de este antimicrobiano en función del tiempo. Para esto, se realizaron curvas en escala semilogarítmica para la concentración de flumequina en huevos versus tiempo. Se realizó un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica se definió el momento (días) en el cual las concentraciones alcanzan el $CC\alpha$. Tomando en cuenta las desviaciones individuales en relación al comportamiento poblacional, consideramos un margen de seguridad de un 30% en días (Arboix y Martín-Jiménez, 2002; CVMP, 1997).

El período de resguardo se determinó cuando todas las observaciones estaban bajo el $CC\alpha$. Adicionalmente, se agregó el 30% de margen de seguridad. En caso que el período de resguardo coincida con una fracción de 1 día (por ejemplo 11,3 días) se debe considerar el período incluyendo un día completo (12 días) (Arboix y Martín-Jiménez, 2002).

V. RESULTADOS

✓ Objetivo N° 1: “*Validar una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la detección de residuos de flumequina en huevos de aves de postura, de acuerdo a las recomendaciones de normativas internacionales.*”

1. Tiempo de retención de los analitos:

El promedio del tiempo de retención para flumequina, fue de 20,34 minutos con una desviación estándar (D.S.) de 0,65.

2. Especificidad:

En 20 muestras blancos de yema y clara no se observaron interferencias de la matriz con el analito.

3. Recuperación:

Los datos de recuperación obtenidos para flumequina en clara y yema se presentan en el cuadro N° 2 y N° 3:

Cuadro 2:

Porcentajes de Recuperación de flumequina en clara fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC con detector de fluorescencia.

Concentración de fortificación (ng/g)	Recuperación (%)			Rangos (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
1	84	75	87	75-87
2	110	98	74	74-110
4	79	79	77	77-79
8	91	96	79	79-96

Cuadro 3:

Porcentaje de Recuperación de flumequina en yema fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC con detector de fluorescencia.

Concentración de fortificación (ng/g)	Recuperación (%)			Rangos (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
0,5	80	49	61	49-80
1	76	66	62	62-76
2	83	77	70	70-83
4	80	68	131	68-131

Los rangos de recuperación estuvieron dentro de lo recomendado por la Decisión 657 de año 2002 (CEE, 2002).

4. Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):

El método demostró ser preciso ya que el CV (%) fue menor al 20%. Los resultados obtenidos se muestran en los cuadros N° 4 y N° 5.

Cuadro 4:

Precisión o reproducibilidad intralaboratorio de flumequina en clara fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración de enriquecimiento (ng/g)	Concentración Curvas (ng/g)						Promedio (ng/g)	d.s.	C.V.%
	1	2	3	4	5	6			
0,5	0,40	0,64	0,47	0,45	0,51	0,49	0,49	0,08	16,5
2	2,1	1,8	2,0	2,1	2,0	2,0	2,01	0,10	5,0
8	8,1	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,03	0,06	0,7

*d.s. (desviación estándar)

Cuadro 5:

Precisión o reproducibilidad intralaboratorio de flumequina en yema fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración de enriquecimiento (ng/g)	Concentración Curvas (ng/g)						Promedio (ng/g)	d.s.	C.V. %
	1	2	3	4	5	6			
0,5	0,68	0,56	0,46	0,46	0,51	0,57	0,54	0,08	15,3
2	1,8	1,9	2,1	2,0	2,0	1,9	1,95	0,10	4,9
8	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,00	0,01	0,2

*d.s. (desviación estándar)

5. Linealidad de la Curva:

En el cuadro 6 se presentan los resultados de la curva de calibración obtenidos del Análisis de Regresión Lineal de las áreas cromatográficas versus concentración (ng/g). Todas las curvas obtuvieron un $r \geq 0,99$.

Cuadro 6:

Análisis de Regresión Lineal de flumequina en muestras de clara y yema fortificadas a distintas concentraciones, y analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	CLARAS			YEMAS		
	Áreas cromatográficas (cps)			Áreas cromatográficas (cps)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	58145	311679	234518	598725	23136	327391
1	111518	719432	671808	813148	68328	621893
2	202280	1289366	1357394	1423578	172201	1167309
4	393858	2532482	2813824	2645941	369896	2329240
8	766087	5025733	5458990	5133197	802847	4836802
Intercepto	14675,45	45250,87	-40011,16	230936,08	-35534,50	-6424,16
Pendiente	94097,46	622737,91	692683,21	610316,68	104134,22	600951,98
r	0,9999	0,9997	0,9992	0,9995	0,9995	0,9994

6. Repetibilidad:

La repetibilidad fue aceptada cuando el coeficiente de variación (C.V.) de cada concentración medida, se ubicaba dentro de un rango de valores correspondientes a la mitad o es igual al CV de la Precisión. Los datos obtenidos se muestran a continuación en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7:

Repetibilidad de flumequina en clara fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración de enriquecimiento (ng/g)	Concentración Curvas (ng/g)						Promedio (ng/g)	d.s.	C.V.%
	1	2	3	4	5	6			
0,5	0,47	0,59	0,49	0,51	0,49	0,45	0,50	0,05	9,6
2	2,0	1,9	2,0	2,0	2,0	2,1	2,00	0,06	3,0
8	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,00	0,01	0,1

*d.s. (desviación estándar)

Cuadro 8:

Repetibilidad de flumequina en yema fortificada a distintas concentraciones, y analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración de enriquecimiento (ng/g)	Concentración Curvas (ng/g)						Promedio (ng/g)	d.s.	C.V.%
	1	2	3	4	5	6			
0,5	0,68	0,61	0,53	0,64	0,52	0,46	0,57	0,08	14,6
2	1,8	1,9	2,0	1,8	2,0	2,0	1,91	0,10	5,5
8	7,9	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,00	0,03	0,4

*d.s. (desviación estándar)

7 y 8. Limite de Decisión $CC\alpha$ y Capacidad de detección $CC\beta$:

Los datos de $CC\alpha$ y $CC\beta$ para flumequina en clara y yema analizadas por HPLC fluorescencia se presentan en el Cuadro 9.

Cuadro 9:

$CC\alpha$ y $CC\beta$ para flumequina en clara y yema analizadas por HPLC fluorescencia.

Droga	Matriz	$CC\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Flumequina	Clara	0,41	0,59
	Yema	0,51	0,65

De acuerdo a los valores obtenidos para el $CC\alpha$ en clara y yema para flumequina, se informa 0,5 $\eta\text{g}/\text{g}$, valor límite a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (1%) que una muestra no es conforme. En el caso del $CC\beta$, se informa como 1 $\eta\text{g}/\text{g}$, tanto en clara y yema, contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%).

9. Robustez

El método analítico seleccionado fue robusto ya que las D.S. calculadas para clara y yema luego de introducir modificaciones en el método, fueron menores que la D.S. de la precisión. Las D.S. para flumequina en clara y yema fueron de 0,008 y 0,01 $\eta\text{g}/\text{g}$ respectivamente lo que es menor a la D.S calculada en la precisión (0,08 para ambas matrices).

El factor que más afectó en la robustez del método fue el centrifugado por 20 minutos, considerándose como medida precautoria.

✓ Objetivo 2: *“Evaluar la magnitud de transferencia de flumequina a los compartimentos del huevo durante el tratamiento.”*

Las concentraciones obtenidas de flumequina en clara y yema por cada día de tratamiento se presentan en el Cuadro 10.

Cuadro 10:

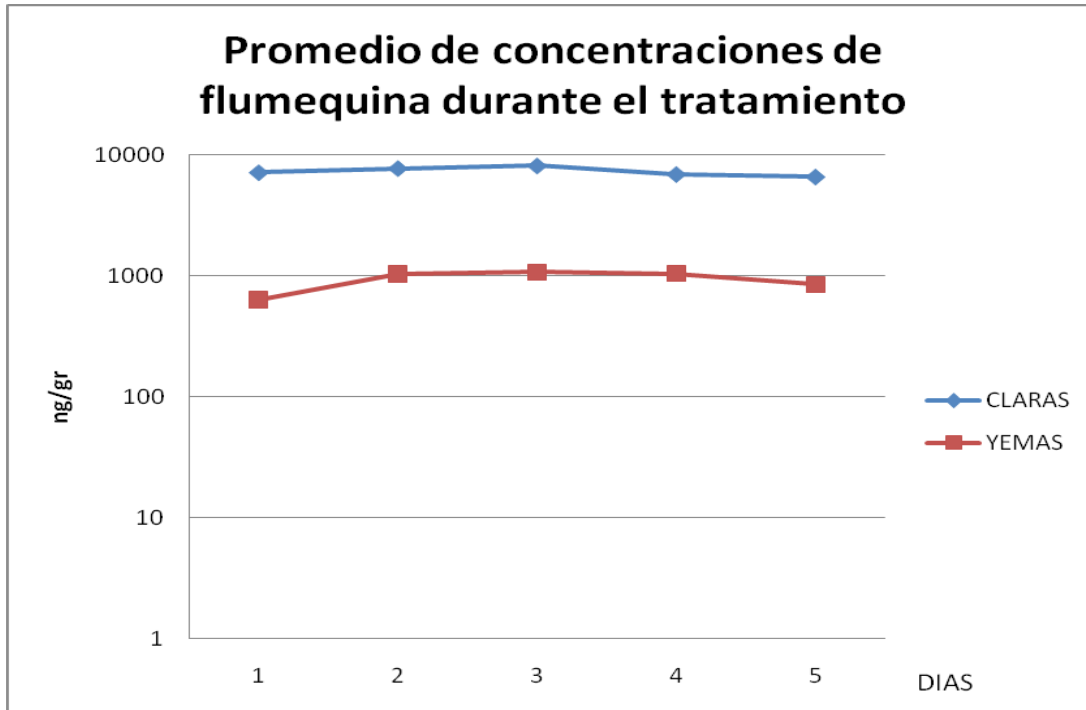
Concentraciones de flumequina en clara y yema durante el tratamiento.

COMPARTIMENTO	N° MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/g)				
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
CLARAS	1	6685,7	8849,6	6534,3	7506,0	6185,7
	2	7191,6	7013,3	6778,8	6800,8	6404,6
	3	7489,1	8002,2	6444,2	5916,1	6836,0
	4	7011,3	6591,9	8865,3	6616,9	6063,2
	5	7761,0	7849,6	9480,9	7701,8	7076,9
	6	6483,4	7873,4	10458,6	6585,9	6589,2
YEMAS	1	618,2	1299,4	1137,6	1220,4	874,2
	2	648,1	902,6	969,7	1021,0	802,9
	3	690,5	883,5	1312,3	1042,3	796,3
	4	608,1	1064,6	1140,2	967,3	875,2
	5	598,3	1024,9	941,7	929,1	907,4
	6	614,2	1049,3	907,6	1073,3	824,9

Los valores máximos de flumequina en ambos compartimentos se detectaron en los huevos recolectados al tercer día de tratamiento, y las concentraciones fueron siempre mayores en clara durante el tratamiento.

Figura 1:

Concentraciones promedios de Flumequina en clara y yema en cada día de tratamiento, graficadas en escala semilogarítmica.



- ✓ **Objetivo 3:** *“Determinar el período de resguardo de una formulación de flumequina en los huevos obtenidos de gallinas de postura tratadas con este fármaco.”*

Los resultados de la cinética de depleción de flumequina en clara y yema se presentan en los Cuadros N° 11 y N°12.

Cuadro 11:

Concentraciones de flumequina en claras analizadas por HPLC fluorescencia durante los días de postratamiento.

CLARA N° MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/g)									
	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 18	Dia 20	Dia 25	Dia 26	Dia 30
1	1155,3	160,7	165,2	113,6	59,3	1,9	2,2	1,1	0,7	2,7
2	1240,0	157,2	200,9	100,0	41,1	1,7	2,0	1,3	0,5	0,5
3	806,7	182,8	349,5	102,9	36,8	1,4	1,6	1,3	0,6	1,0
4	918,9	167,1	183,6	115,9	46,9	1,6	1,4	1,4	0,7	1,2
5	1532,8	181,1	162,8	122,1	68,8	1,7	1,6	1,3	0,5	0,9
6	1437,3	133,8	249,5	108,4	59,8	1,6	1,6	1,6	0,6	1,2
7	1343,1	171,7	182,4	116,4	74,4	2,1	1,6	1,0	0,6	0,8
8	1595,3	179,2	157,6	131,9	57,4	1,8	1,6	1,0	0,6	ND

Cuadro 12:

Concentraciones de flumequina en yemas analizadas por HPLC fluorescencia durante los días de postratamiento.

YEMA N° Muestra	CONCENTRACIÓN (ng/g)									
	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 18	Dia 20	Dia 25	Dia 26	Dia 30
1	555,8	367,9	84,9	14,4	10,7	0,5	0,5	ND	ND	ND
2	477,6	406,2	92,8	13,4	10,9	0,4	ND	ND	ND	ND
3	491,8	454,5	154,8	14,7	9,8	0,4	ND	ND	ND	ND
4	594,2	438,5	132,3	17,0	10,1	0,4	ND	ND	ND	ND
5	632,4	355,1	94,2	11,6	7,0	0,4	ND	ND	ND	ND
6	574,0	352,9	105,7	18,4	8,9	0,4	ND	ND	ND	ND
7	549,2	320,6	122,7	14,5	8,3	0,5	ND	ND	ND	ND
8	474,1	412,8	98,3	14,3	10,3	0,5	ND	ND	ND	ND

En los primeros tres días postratamiento las concentraciones decrecen fuertemente en claras, llegando a valores cercanos a los 200 ng/g, lo que no se repite en yemas en las que el decrecimiento es menos pronunciado. No obstante los niveles de flumequina continuaron siendo mayores en clara, lo que sólo cambio en el día 3 de postratamiento, volviendo a la tendencia en el siguiente día analizado correspondiente al día 5 postratamiento.

Figura 2:

Concentraciones promedio de flumequina obtenidas durante los días postratamiento, expresadas en escala semilogarítmica.

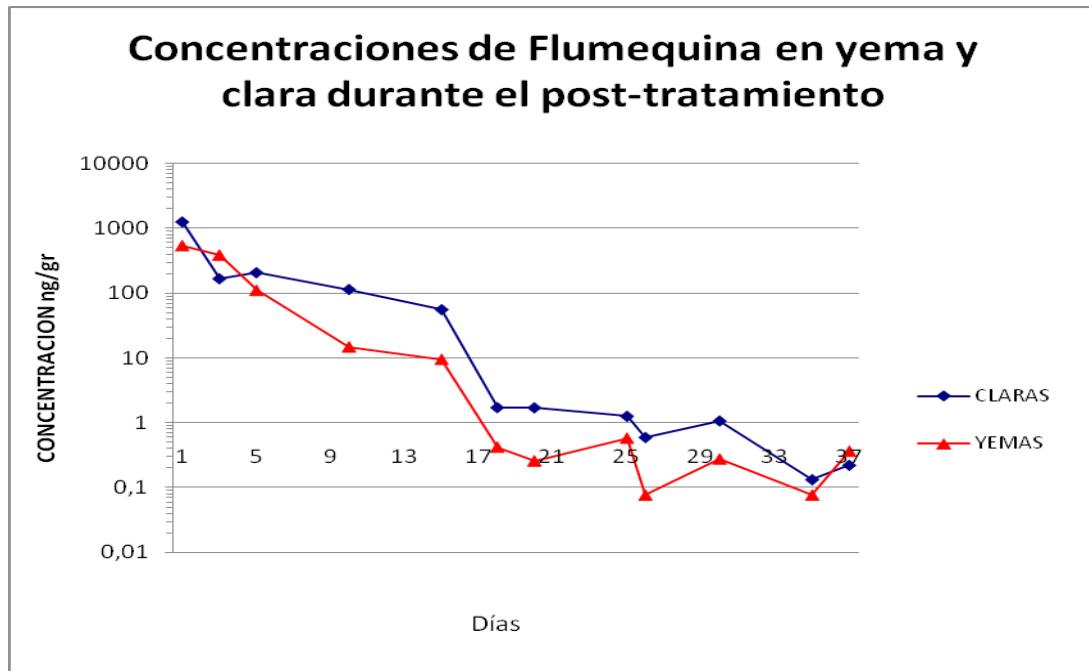


Figura 3:

Depleción de flumequina en clara y yema después de iniciado el tratamiento. Los datos se presentan en escala semilogarítmica.

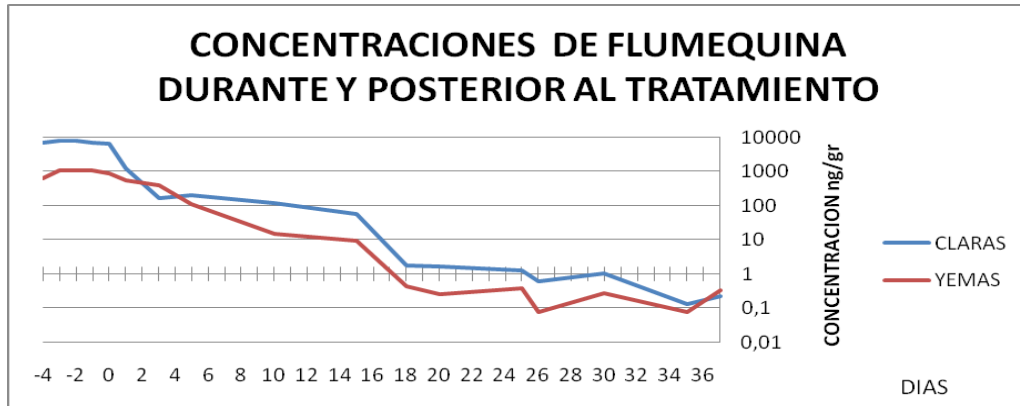
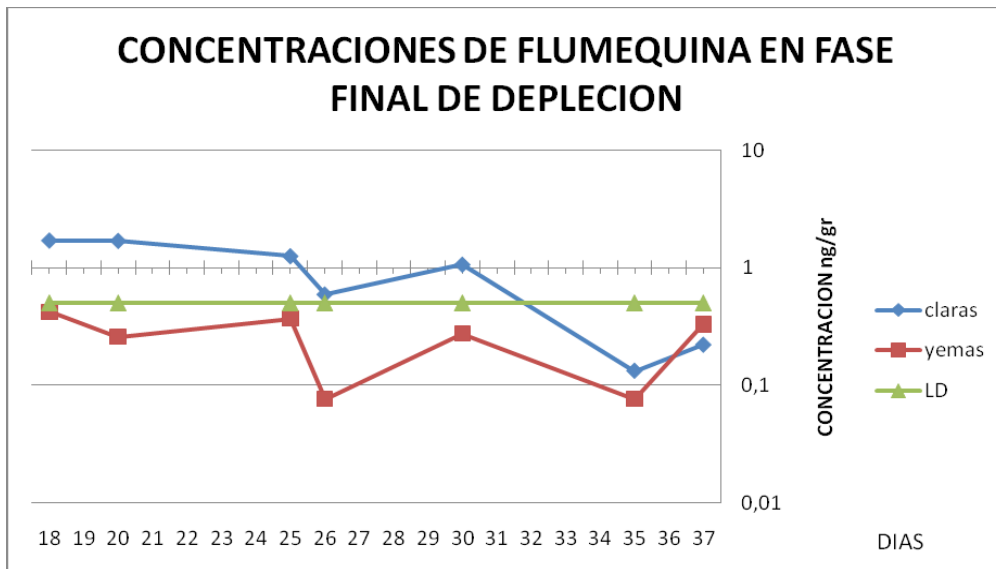


Figura 5: Fase final de depleción de flumequina en claras y yemas.



Debido a que a partir del día 35 postratamiento las observaciones se encuentran bajo el valor de $CC\alpha$, y sumándose el 30% de margen de seguridad, el periodo de resguardo calculado en este estudio para una formulación de flumequina al 20%, es de 46 días.

VI. DISCUSIÓN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos ampliamente usados en producción avícola como tratamiento y/o profilaxis para enfermedades infecciosas, por lo tanto la

detección de residuos de estos fármacos en alimentos de origen aviar para consumo humano, es de gran importancia para garantizar la inocuidad de estos alimentos.

En Chile existen fluoroquinolonas que no están autorizadas para su uso en aves de postura, pero sí para su uso en pollos broilers y pavos por lo que su uso extraetiqueta se hace inminente. Esta potencial amenaza, se exagera al no contar en Chile con métodos validados para la detección de residuos de estas fluoroquinolonas en huevos de consumo, poniéndose en riesgo la inocuidad alimentaria en la población.

Según lo anterior, surge la necesidad de aplicar medidas de prevención y control, para evitar la presencia de residuos antimicrobianos en este alimento. Pudiendo ser éste estudio una ayuda inicial para lograr estos fines.

Para llevar a cabo este estudio se requirió de la previa validación de una metodología analítica para la determinación de residuos de flumequina en huevos de consumo, la que se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la Directiva 2002/657 de la Comunidad Europea. Para la cual determinamos parámetros tales como tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, repetibilidad, precisión, linealidad de la curva, límite de decisión $CC\alpha$, capacidad de detección $CC\beta$ y robustez. Para éste estudio se utilizó un protocolo de extracción basado en el método de Zeng *et al.* (2005), ajustándose a las condiciones analíticas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FAVET) de la Universidad de Chile.

La metodología analítica usada para el estudio, fue la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con Detector de Fluorescencia, lográndose una alta sensibilidad.

En este estudio el tiempo de retención del analito fue de 20,34 minutos, valor similar al estudio hecho por Hassouan, *et al* (2007), el cual fue de 19,6 min. También se

logró un límite de detección y cuantificación de 0,5 y 1 ng/gr respectivamente los cuales fueron menores a los obtenidos por el mismo autor de 7 y 24 ng/gr respectivamente, demostrando la alta sensibilidad de la técnica utilizada.

El método resultó ser robusto considerándose como el factor más influyente el centrifugado, debiéndose tomar las precauciones del caso. Los restantes parámetros de la validación están dentro de la norma, por lo tanto esta metodología podría ser utilizada en los futuros Programas de Control de Residuos de flumequina en huevos de consumo humano en Chile.

La detección de residuos de flumequina en huevos de gallinas ponedoras previamente tratadas con flumequina, demuestra la capacidad de distribución de estos antimicrobianos por todo el organismo al alcanzar la sangre después de su administración por vía oral, incluyendo los folículos en crecimiento presentes en los ovarios de las gallinas ponedoras y el oviducto, tal como también fue señalado por Kan (2003).

Las concentraciones de flumequina en clara fueron mayores que las detectadas en yema durante el tratamiento y posterior a éste, condición que solo se invirtió en el día 3 posterior al tratamiento. Esto se puede atribuir a que el principal componente de la clara es la albúmina, una proteína presente en la sangre y a la cual las fluoroquinolonas se unen entre un 20% - 40%, por lo que las concentraciones del antimicrobiano en la sangre se reflejan en la clara.

La tendencia decreciente de la concentración de flumequina en yemas a través del tiempo es menos pronunciada que en claras, no obstante las concentraciones son menores que en ésta.

Los niveles máximos de residuos de flumequina se detectaron en ambos compartimentos en los huevos recolectados al tercer día de tratamiento, corroborando lo señalado por Donogue y Myers (2000) con respecto a la clara, pero no así en la yema, que según sus estudios estos niveles deberían alcanzar su máxima expresión en los días 8 a 10

desde el inicio del tratamiento, lo cual se dio en el día 3 del tratamiento ,pero lográndose cierta estabilidad en las concentraciones al día 8 desde el inicio del tratamiento.

En los 3 días posteriores al tratamiento, los niveles de residuos en claras decaen fuertemente llegando a valores cercanos a 200 ng/gr. Determinándose niveles bajo los límites de detección, el día 35 en claras y el día 20 en yemas, y un período de resguardo de 46 días al considerar el 30% de seguridad.

Con respecto a la presencia de residuos de flumequina por un largo período, esta tiene estrecha relación con la tecnología aplicada en el análisis, por lo que se podría deducir que en este estudio fue de las más avanzadas, por su alta sensibilidad.

También podríamos convenir en que la flumequina posee características hidrosolubles, debido a su mayor afinidad y depósito a lo largo del tiempo en claras, más que en yemas.

VII. CONCLUSIÓN

- 1) Se logró validar una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la detección de residuos de flumequina en huevos de aves de postura,

de acuerdo a los criterios de validación recomendados por la Directiva 2002/657 de la Comunidad Europea.

- 2) Se evaluó la magnitud de transferencia de flumequina al huevo determinándose una mayor afinidad de esta por la clara, llegando a su valor máximo en el tercer día de tratamiento.
- 3) Según los resultados obtenidos en este estudio se determina un período de resguardo de 46 días, para evitar la presencia de residuos de flumequina en los huevos destinados al consumo humano, tomándose en cuenta la alta sensibilidad de detección de la técnica analítica utilizada en este estudio.

El tratamiento de aves de postura con una formulación de flumequina al 20%, por un período de 5 días, genera residuos de ésta en clara y yema por un período mayor a una semana después de su administración.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- **ALÓS, J.** 2003. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21: 261-268.

- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; DÍAZ, M.J.; BRINGAS, P.; MARTÍNEZ, M.A.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; FERNÁNDEZ, M.C.; FERNÁNDEZ, R.** 1995. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J Vet Res.* **56**:501–506.
- **ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M.R.; ITURBE, J; MARTINEZ, M. A.; DIAZ, M. J.; FREJO, M. T.; MARTINEZ, M.** 2001. Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci.* **71**: 101-109.
- **ANDERSON, M. ; MACGOMAN, A.** 2003. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* **51**: 1-11.
- **ANDRIOLE, V.** 1999. The future of the quinolones. *Drugs.* **58**: 1-5.
- **ANDRIOLE, V.** 2005. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis.* **41**: 113-119.
- **ANHALT, G.** 1977. Physiologie der Eientstehung und Einlagerung antibakterieller Wirkstoffe. *Arch. Gefluegelk.* **41**: 232-237 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. [J Agric Food Chem.](#) **48**: 6397-6403.
- **APPELBAUM, P.C.; HUNTER P.A.** 2001. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* **16**: 5-15.
- **ARBOIX, M.; MARTÍN-JIMÉNEZ, T.** 2002. Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. **In:** Botana, L.; Landoni, M.; Martín-Jiménez, T. (Eds.). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España. pp. 681-689.
- **ASOHUEVO-CHILE A. G.** 2010. Asociación Gremial de Productores de Huevos de Chile. Estadísticas generales. [en línea]. <<http://www.asohuevo.cl>> [consulta 22-12-2010].
- **BALL, P.** 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J Antimicrob Chemother.* **46 Suppl T1**: 17-24.
- **BEARDEN, D.; DANZIGER, L.** 2001. Mechanism of action of and resistance to quinolones. (Abstract). [Pharmacotherapy.](#) **21**: 224-232.

- **BLOM, L.** 1975. Plasma Half-Lives and the Excretion into Egg-White and -yolk of Three Sulphonamides and Pyrimethamine after Medication of Laying Hens. Acta Pharmacol. Toxicol. 37: 79-93 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. [J Agric Food Chem](#). 48: 6397-6403.
- **CEE. COMISIÓN DE ESTADOS EUROPEOS. 1990.** Reglamento N° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. 113 p.
- **CEE. COMISIÓN DE ESTADOS EUROPEOS. 2002.** Decisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002 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. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 36 p.
- **CERNIGLIA, C.E.; KOTARSKI, S.** 2005. Approaches in the safety evaluation of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. J Vet Pharmacol Ther. 28: 3-20.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 1999. Resolución Exenta N° 1462/1999. Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios destinados al consumo humano. Publicada en el Diario Oficial el 04 de octubre de 1999: 2-35.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 1999. [Resolución exenta N°1462/1999. Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados a consumo humano.](#) Publicada en el D. Oficial de 01.03.02. 29 p.
- **CHU, P.; WANG, R.; CHU, H.** 2002. Liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in egg albumen and egg yolk of laying hens using fluorometric detection. J Agric Food Chem. 50: 4452-4455.
- **COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS.** 1995. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Sección 4: 80-82.
- **CUÉ, M.; MOREJÓN, M.; SALUP, R.** 2005. Actualidades de las Quinolonas. Rev Cubana Farm. 39: 1-15.

- **CVMP. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.** 1997. EMEA/CVMP/036/95 **FINAL**. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods. The European Agency for the evaluation of Medicinal Products (EMA). 37 p.
- **DE LA FUENTE, M.; DAUROS, P.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; SEPÚLVEDA, M.; ZEMELMAN, R.; GONZÁLEZ, G.** 2007. Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos gramnegativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. *Rev Méd Chile*. 135: 1103-1110.
- **DONOGHUE, D.J., HAIRSTON H., GAINES S., BARTHOLMEW MJ., DONOGHUE AM.**1997. Modeling residue uptake in eggs: yolks contain ampicillin residues even after drug withdrawal and non- detectability in the plasma. *Poult Sci*; 76: 458-462.
- **DONOGHUE, D.** 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns?. *Poult Sci*. 82: 618-621.
- **DONOGHUE, D.; HAIRSTON, H.** 2000. Food safety implication: certain antibiotics may rapidly contaminate egg albumen during the process of its formation. *Br Poult Sci*. 41: 174-177.
- **DONOGHUE, D.; MYERS, K.** 2000. Imaging residue transfer into egg yolks. *J Agric Food Chem*. 48: 6428-6430.
- **DONOGHUE, D.J. Y SCHNEIDER, M.J.** 2003. Comparison between a bioassay and liquid chromatographic-fluorescence-mass spectrometry(n) for the determination of incurred enrofloxacin in whole eggs. *JAOAC Int*. 86: 669-674.

- **EAVES, D.; RANDALL, L.; GRAY, D.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M.; WHITE, A.; PIDDOCK,L.** 2004. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemoth*. 48: 4012-4015.

- **ESAKI, H.; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROKI, A.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J Antimicrob Chemoth.* 53: 266-270.
- **EUROPA.** 1990. Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. 113 p.
- **EUROPA** 1996. Approach towards harmonisation of withdrawal periods. 036/95. EMEA/CVMP/1996.
- **EUROPA.** 2002. Decisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002 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. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.* 36 p.
- **EUROPA.** 2008. European Medicines Agency. EMEA. About EMEA - Structure. [en línea]. <<http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/emeaoverview.htm>> [consulta: 18-01-2009].
- **FÁBREGA, A. ; SÁNCHEZ-CESPEDES, J.;SOTO, S.; VILA, J.** 2008. Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 307-315.
- **FAO/OMS.** 1995. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Sección 4:80-82.

- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2001. The Human Health Impact of Fluoroquinolone Resistant *Campylobacter* Attributed to the Consumption of Chicken. 113 p.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2005b. Guideline for establishing a withdrawal period. [en línea]. <<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/1732.htm>> [consulta 09-09-2008].

- **FERNÁNDEZ, M.; ARIAS, J.** 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. Monografías de Medicina Veterinaria. [en línea]. <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D18364%2526ISID%253D452,00.html> [consulta: 01-03-2008].
- **GRIGGS, D.; JOHNSON, M.; FROST, J.; HUMPHREY, T.; JØRGENSEN, F.; PIDDOCK, L.** 2005. Incidence and Mechanism of Ciprofloxacin Resistance in *Campylobacter* spp. Isolated from Commercial Poultry Flocks in the United Kingdom before, during, and after Fluoroquinolone Treatment. *Antimicrob Agents Chemoth.* 49: 699-707.
- **HAFEZ, H.** 1991. Factors influencing Drug Residues in Poultry Products: A review. *Arch. Gefluegelk.* 55: 193-195 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.
- **HASSOUAN, M.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHEZ J.; CABRERA-AGUILERA, M.; NAVALÓN, A.** 2007. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 852: 625-630.
- **HUMPHREY, T.; JØRGENSEN, F.; FROST, J.; WADDA, H.; DOMINGUE, G.; ELVISS, N.; GRIGGS, D.; PIDDOCK, L.** 2005. Prevalence and Subtypes of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter* spp. in Commercial Poultry Flocks before, during, and after Treatment with Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 690-698.
- **JACOBY, G.** 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases.* 41: 120-126.
- **JAPÓN.** 2005. Ministry of Health and Welfare. Notification No. 499. Specifications and Standars for Food, Food Additivies. 126 p.
- **KAN, C.; PETZ, M.** 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.

- **KAN, C. 2003.** Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. Alemania. Universidad Wuppertal. 80 p.
- **KASHIDA, Y., SASAKI, Y.F., OHSAWA, K., YOKOHAMA, N., TAKAHASHI, A., WATANABE, T., MITSUMORI, K. 2002.** Mechanistic study on flumequine hepatocarcinogenicity focusing on DNA damage in mice. *Toxicological Sciences* 69, 317-321.
- **KHAN, A.; NAWAZ, M.; WEST, S.; KHAN, S.; LINT, J. 2005.** Isolation and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* from Poultry Litter. *Poult Sci.* 84: 61–66.
- **KUKANICH, B., GEHRING, R.; WEBB, A.I.; CRAIGMILL, A.L.; RIVIERE, J.E. 2005.** Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. *J Am Vet Med Assoc.* 227: 1574-1577.
- **LEE, Y.; CHO, J.; KIM, K.; TAK, R.; KIM, A.; KIM, J.; IM, S.; KIM, B. 2005.** Fluoroquinolone Resistance and gyrA and parC Mutations of *Escherichia coli* Isolated from Chicken. *J Microbiol.* 43: 391-397.
- **LOLO, M., PEDREIRA, S., FENTE, C., VÁZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M. 2005.** Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. *J Agric Food Chem.* 53, 2849-2852.
- **MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. 2006.** Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* 172: 10-28.
- **MELLA, S.; ACUÑA, G.; MUÑOZ, M.; PEREZ, C.; LABARCA, J.; GONZALEZ, G.; BELLO, H.; DOMINGUEZ, M.; ZEMELMAN, R. 2000.** Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect.* 17: 53-66
- **NORSTRÖM, M.; HOFSHAGEN, M.; STAVNES, T.; SCHAU, J.; LASSEN, J.; KRUSE, H. 2006.** Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from humans and broilers in Norway. *Epidemiol Infect.* 134: 127-130.

- **NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. National Academy Press. Washington D.C.
- **OIE. OFICINA INTERNACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2008. Informe de de la Octava reunión de la OIE grupo de trabajo de seguridad alimentaria en producción animal. París, 2008.
- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2006. Technical report series: 939. Evaluation of Certain Veterinary Drugs Residues in Food. Sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- **ORDEN, J.; DE LA FUENTE, R.** 2001. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a las quinolonas en bacterias de origen animal. Revista Española de salud publica. 76:4.
- **PÉREZ, B.** 2004. La detección de residuos farmacológicos en los alimentos. [en línea].www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2004/07/20/13468.php> [consulta 09-09-2008].
- **PROUDMAN, J.** 2002. Reproducción de las aves de corral: macho y hembra. **In:** Hafez, E.; Hafez, B. (Eds.). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. Kiawah Island, South Carolina, USA. pp. 243-265.
- **RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCÍA, E.; REUVERS, T.; HOOGHUIS, H.** 2003. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescent detection. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 789: 373-381.
- **RODRÍGUEZ, E.; MORFÍN, R.; ESPARZA, S.; CASTRO, P.** 2000. Programa de actualización continúa para infectología. [en línea]. <<http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/index.htm>> [consulta 15-02-2008].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2008a. Medicamentos de uso veterinario autorizados. [en línea]. <http://laima.sag.cl/AppSag/public/medicamentos/medicamentos_BL.jsp> [consulta 18-08-2008].

- **SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2008b. Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios Año 2008. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf> [consulta 18-08-2008].
- **San Martín, B.** 2001. Residuos químicos en los alimentos de origen animal: un análisis global de la situación mundial y nacional. <http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9590%2526ISID%253D467,00.html> [consulta 20-04-2009].
- **San Martín, B.; Lapierre, L.; Toro, C.; Bravo, V.; Cornejo, J.; Hormazabal, J.; Borie, C.** 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant Salmonella spp. From poultry farms Veterinary Microbiology. 110: 239-244.
- **SHIM, J., LEE, M.; KIM, M.; LEE, C.; KIM, I.** 2003. Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography. Biosci biotechnol biochem. 67: 1342-1348.
- **TURNIDGE, J.** 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. Drugs. 58: 29-36.
- **TURNIDGE, J.** 2004. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. J Antimicrob Chemoth. 53:26-27.
- **UEHARA, T., KASHIDA, Y., WATANABE, T., YASUHARA, K., ONODERA, H.** 2002. Susceptibility of liver proliferative lesions in heterozygous p53 deficient CBA mice to various carcinogens. J. Vet. Med. Sci. 64(7): 551-556.
- **VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J. M.; VAN ELDERE, J.; TULKENS, P. M.** 2005. Quinolones in 2005: an update. Clin Microbiol Infect. 11: 256-280.
- **WISPELWEY, B.** 2005. Clinical Implications of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 41: 127-135.
- **YOON, J.H; BROOKS JR, R.L; KHAN, A; PAN, H; BRYAN, J; ZHANG, J; BUDSBERG, S.C; MUELLER, P.O.E; HALPER, J.** 2004. The effect of

enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horse tendon cells. *Cell Biol Toxicol.* 20:41-54

- [ZHAO, S.](#); [MCDERMOTT, PF.](#); [FRIEDMAN, S.](#); [ABBOTT, J.](#); [AYERS, S.](#); [GLENN, A.](#); [HALL-ROBINSON, E.](#); [HUBERT, S.](#); [HARBOTTLE, H.](#); [WALKER, R.](#); [CHILLER, T.](#); [WHITE, D.](#) 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among Salmonella from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. [Foodborne Pathog Dis.](#) 3: 106-117.


IX. ANEXO 1




UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO

Con relación a los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales en el Proyecto titulado **“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y ESTUDIOS DE DEPLECIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN HUEVOS DE CONSUMO: PRIMER ESTUDIO NACIONAL CONSIDERANDO LAS NORMATIVAS INTERNACIONALES DE INOCUIDAD ALIMENTARIA VIGENTE”**, cuyo Investigador Responsable es la Profesora BETTY SAN MARTIN N., el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que este satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité.


Dr. JULIO LAREÑAS HERRERA
Decano (S)
Presidente
Comité de Bioética Animal



Santiago, Julio 7 de 2006