

UCH-FC
Q. Ambiental
C 257
C. 1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO CUALITATIVO PARA LA EXTRACCIÓN
Y DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA EN SEDIMENTOS MARINOS
DE LA X REGIÓN”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

Álvaro Antonio Carrasco Castro



Director de Seminario de Título y Profesor Patrocinante:
Dra. Isel Cortés Nodarse

Diciembre de 2009



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

ÁLVARO ANTONIO CARRASCO CASTRO

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO CUALITATIVO PARA LA EXTRACCIÓN Y
DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA EN SEDIMENTOS MARINOS
DE LA X REGIÓN”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental.

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. Isel Cortés Nodarse
**Director Seminario de Título
y Profesor Patrocinante**

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Corrector

Dr. Aurelio San Marín Barrientos
Corrector

Santiago de Chile, Diciembre de 2009

BIOGRAFÍA



Álvaro Antonio Carrasco Castro

Nació un 30 de mayo de 1980, su formación escolar básica y media fue realizada en el Liceo Miguel de Cervantes y Saavedra. Él año 1999 ingreso a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias c/m en Química. Posteriormente, en el año 2004 ingreso a la Carrera de Licenciatura en Ciencias Ambientales c/m en Química Ambiental, en la misma Facultad, donde obtuvo su grado académico el año 2007. Durante el año 2008 realizó su memoria de título en el Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA) en el área de Química Analítica, realizando análisis de Oxitetraciclina en sedimentos marinos, bajo la tutela de la Dra. Isel Cortés. Desde el año 2001 a la fecha, Alvaro Carrasco se ha desempeñado como profesor ayudante alumno en diferentes cursos de la carrera. Entre el año 2004 y 2005 se desempeño como profesor de Química de enseñanza media, además de participar en diversas actividades académicas y extraprogramáticas de la Universidad.

DEDICATORIA

*A MIS PADRES, FLOR, RUBÉN, HERMANO GONZALO Y TATA
Q.E.P.D., PERSONAS QUE AMO Y QUE ESTARÁN
SIEMPRE EN MI CORAZÓN.*



“Armonía, satisfacción, amor de vida...”

...premios que iluminaron nuestro andar y alimentaron la razón de existir.”

FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Mis primeros agradecimientos son para aquellas personas que, con o sin estar presentes siempre han estado a mi lado, por ese incondicional apoyo, confianza y fé depositada cada día de mi vida, Flor y Rubén, mis padres.

A mi hermano Gonzalo por lo buena persona y solidario que es, por su sensibilidad, y porque sin saberlo, pone una sonrisa en mi, en los momentos realmente necesarios. Aunque a veces le pegaría.

A mis amigos con los que di mis primeros pasos en la universidad, Sandra O, Sandra R, Zaida, Vicky, Meche, Cancino y Cruzat, de gran importancia y apoyo en mis inicios como estudiante. A los que posteriormente fueron llenando mi vida, Álvaro “Zapallo” Astudillo, Don Pato, lucho garrido, Carlos “maquina” Areche, equipo de futbol de ciencias (por el glorioso campeonato 2008), “mamá ta’ presa”, Chicas del futbol y tantos otros.

A mi tutora Dra. Isel Cotes, por la oportunidad, apoyo y confianza durante mi trabajo; y por su comprensión en determinados momentos de extrañeza y turbidez en mi trabajo.

Al Dr. Manuel Leiva por permitir mi ingreso al laboratorio de Química y Referencia medio ambiental en CENMA.



A los profesores que me entregaron un minuto de su tiempo, en especial a la Profesora Sylvia Copaja y al Profesor Aurelio San Martín, por su apoyo, voluntad y dispuesta ayuda.

A mis amigos del "barrio", Jenny, Ely, Rori, Dano, Lalo, Roro y a todo el team Sofá; excelentes personas, importantísimos en mi vida.



INDICE DE CONTENIDOS



	<i>Página</i>
Índice de contenidos.....	iv
Índice de tablas y cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Aspectos Generales.....	1
1.2. Control de Residuos.....	4
1.3. Antibióticos.....	7
1.4. Oxitetraciclina en sedimentos marinos.....	12
1.4.1. Factores que favorecen la acumulación.....	12
1.4.2. Modo de enlace y riesgos de acumulación.....	14
1.5. Determinación de Oxitetraciclina.....	16
1.5.1. Extracción de Oxitetraciclina.....	16
1.5.2. Métodos Cromatográficos.....	17
1.6. Hipótesis del Trabajo.....	19
1.7. Objetivos.....	20
1.7.1. Objetivo General.....	20
1.7.2. Objetivos Específicos.....	20



II. PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1. Materiales.....	22
2.2. Reactivos.....	23
2.3. Aparatos e Instrumentos.....	23
2.4. Procedimientos experimentales.....	24
2.4.1. Muestreo de sedimento marino.....	24
2.4.2. Preparación de las soluciones.....	27
2.4.3. Estudio de estabilidad de Oxitetraciclina en condiciones Ambientales (Luz de día a 20°C) y a 4°C.....	29
2.4.4. Estudios de recuperación de Oxitetraciclina.....	30
2.4.5. Extracción de muestras de sedimento marino.....	30
2.4.6. Condiciones cromatográficas.....	32
2.4.7. Determinación de Oxitetraciclina por TLC-RP.....	32
2.4.8. Tratamiento de datos.....	33
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. Estabilidad de Oxitetraciclina en condiciones ambientales (Luz de día a 20°C) y refrigerada a 4°C.....	36
3.2. Ajuste de Fase móvil.....	43
3.3. Metodología de análisis.....	44
3.3.1. Curva de Calibración de Oxitetraciclina.....	44

3.3.2. Eficiencia de la extracción de OTC desde los sedimentos marino.....	47
3.3.3. Extracción de muestras de sedimento marino.....	54
3.3.4. Determinación de Oxitetraciclina por TLC-RP.....	62
IV. CONCLUSIONES.....	68
V. RECOMENDACIONES.....	71
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
VII. ANEXOS.....	76



INDICE DE TABLAS Y CUADROS

	<i>Página</i>
Tabla 1.- Límites máximos residuales (LMRs) por mercados reguladores de carne y pescado.....	6
Tabla 2.- Familia de las tetraciclinas, compuestos obtenidos de forma naturales, o bien por semisíntesis.....	9
Tabla 3.- Curvas de calibración: rango menor (0,05-5 mg/L) y mayor (5-50 mg/L) de Oxitetraclina.....	29
Tabla 4.- Estabilidad de Oxitetraclina en condiciones ambientales (20°C y luz de día).....	36
Tabla 5.- Estabilidad de Oxitetraclina a 4°C y protegida de la luz.....	39
Tabla 6.- Estudio de ajuste de fase móvil.....	43
Tabla 7.- Resultados de curva de calibración de Oxitetraclina: Rango lineal de trabajo, LD y LD.....	44
Tabla 8.- Primeros resultados de % recuperación de Oxitetraclina.....	48
Tabla 9.- Composición química de sedimento alternativo.....	49
Tabla 10.- Concentración de Calcio (Ca ⁺²) y Magnesio (Mg ⁺²) en muestras de sedimento marino.....	50
Tabla 11.- Parámetros físicos y químicos en muestra 67-1, escogida para la recuperación.....	51
Tabla 12.- Resultados con la muestra 67-1.....	51
Tabla 13.- Resultados de % recuperación con la muestra 67-1.....	52
Tabla 14 (a, b, c y d).- Resultados de tiempos de retención y máximos de absorción en muestras de sedimento marino.....	54



Tabla 15.- Valores de Rf calculados para las muestras de sedimento marino y para estándares de Oxitetraciclina.....66

Tabla 16.- Parámetro medidos en agua (profundidad, temperatura, pH, Eh y Oxígeno disuelto) en cada punto de muestreo.....77

Tabla 17.- Parámetros medidos en el sedimento marino (Temperatura, pH, Eh, Zn, Cu, M.O. y % humedad) en cada punto de muestreo.....78



INDICE DE FIGURAS



	<i>Página</i>
Figura 1.- Posibles impactos ambientales provocador por la salmonicultura en Chile.....	2
Figura 2.- Estructura química básica de las Tetraciclinas.....	9
Figura 3.- Estructura química de Oxitetraciclina.....	11
Figura 4.- Vías de entrada de fármacos al medio ambiente.....	12
Figura 5 y 6.- Formas de enlace de Oxitetraciclina con cationes metálicos, en la formación de complejos en sedimentos marinos.....	14 y 15
Figura 7.- Fundamento teórico de extracción de Oxitetraciclina desde los sedimentos marinos.....	17
Figura 8.- Ubicación y distribución de centros de cultivo muestreados en la X región.....	24
Figura 9, 10 11 y 12.- Instrumentos usados en terreno: pH-metro, Sonda multiparametro, Auxiliar de navegación y draga.....	25 y 26
Figura 13.- Espectro de absorción de Oxitetraciclina a tiempo cero de exposición a condiciones ambientales.....	37
Figura 14.- Espectro de absorción de Oxitetraciclina después de 3 días de exposición a condiciones ambientales.....	38
Figura 15.- Espectro de absorción de Oxitetraciclina a tiempo cero, conservada a 4°C.....	40
Figura 16.- Espectro de absorción de Oxitetraciclina después de 3 días después, conservada a 4°C.....	40

Figura 17.- Estructura química de la especie predominante de Oxitetraciclina a pH 4.....	41
Figura 18.- Estructuras resonantes de Oxitetraciclina a pH 4.....	42
Figura 19.- Cromatograma de un punto de la curva de calibración (3 mg/L).....	45
Figura 20.- Espectro de absorción un punto de la curva de calibración (3 mg/L).....	46
Figura 21.- Resumen de etapas para determinar la recuperación de Oxitetraciclina	47
Figura 22.- Cromatograma de la muestra de Oxitetraciclina recuperada.....	53
Figura 23.- Espectro de absorción de la muestra recuperada de Oxitetraciclina.....	53
Figura 24.- Cromatograma comparativo: Muestra 16-3 v/s Muestra 16-3/coinyectada 3 mg/L OTC.....	58
Figura 25.- Cromatograma comparativo: Muestra 67-1 v/s Muestra 67-1/coinyectada 3 mg/L OTC.....	59
Figura 26.- Cromatograma comparativo: Muestra 116-3 v/s Muestra 116-3/coinyectada 3 mg/L OTC.....	60
Figura 27.- Cromatograma comparativo: Muestra 133-1 v/s Muestra 133-1/coinyectada 3 mg/L OTC.....	61
Figura 28.- Placa Cromatográfica RP de un estándar Oxitetraciclina de 1000 mg/L.....	62
Figura 29.- Placa cromatográfica RP comparativa de estándares de Oxitetraciclina en concentraciones de 100, 50, 30, 20 y 10 mg/L.....	63



Figura 30.- Placa Cromatográfica RP de 20 muestras y un estándar de Oxitetraciclina
20 mg/L.....64

Figura 31.- Placa Cromatográfica RP de 13 muestras y estándares de oxitetraciclina
100, 50, 30 y 20 mg/L.....65



LISTA DE ABREVIATURAS

CES : Centros Engorda de Salmones

LMRs : Límites máximos residuales

Na₂EDTA : Etilendiaminotetracetato disódico

OTC : Oxitetraciclina

PAC : Programa de aseguramiento de calidad

Sernapesca : Servicio Nacional de Pesca

TCs : Tetraciclinas

TLC-RP : Cromatografía en capa fina en fase reversa

RESUMEN

La acuicultura a nivel nacional e internacional ha mostrado un enorme crecimiento en los últimos 30 años. Sin embargo, pese a que esta actividad ha significado grandes beneficios a nivel económico y social, la problemática ambiental que está generando actualmente por el deterioro de ecosistemas marinos, pone de manifiesto la mala gestión aplicada en los centros de cultivo de salmones.

El crecimiento económico generado por esta actividad ha motivado a los responsables de cada salmonera a incrementar su producción, sin importar en muchos casos, el daño que esto implique. Con el propósito de controlar y prevenir progresivos desastres medioambientales debido a este tipo de conductas el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) ha implementado un programa de control de uso y control de residuos de productos farmacéuticos, contaminantes, sustancias prohibidas y sustancias no autorizadas, con el propósito de monitorear y fiscalizar constantemente la gestión ejercida en los centros de cultivo de salmones.

Para el tratamiento y control de enfermedades de origen bacteriano, se han utilizados diversos tipos de fármacos; situación que ^ha generado gran preocupación e interés a nivel científico y público, debido a la contaminación que puede generar grandes cantidades de droga activa adicionadas en la columna de agua, a través del alimento.

La respuesta inmune de salmones a estos tratamientos ha incentivado a salmoneras al uso excesivo de fármacos, generando un impacto ambiental en el recurso marino (sedimento, agua, etc.). La progresiva deposición y persistencia de los

antibióticos explicaría la acumulación en sedimentos marinos, los que debido a la presencia de agentes quelantes favorecerían la retención de antibiótico en forma de complejos con cationes metálicos (Ca^{+2} , Mg^{+2} , etc.), disminuyendo su concentración efectiva y promoviendo la aparición de cepas bacterianas resistentes a estos fármacos.

El desarrollo de una metodología cualitativa para la extracción y detección de antibióticos en sedimentos marinos, pretende estimar el nivel de alteración que presenta el recurso e iniciar estudios direccionados al desarrollo de un método analítico cuantitativo para determinar Oxitetraciclina o bien otros antibióticos en sedimentos marinos. Para la detección se empleó como método Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PAD) con una columna en fase inversa.

Los primeros resultados apuntan a mejorar aun más el método de extracción. Por su parte, el método establecido, mostró que Oxitetraciclina no estaría presente en los sedimentos marinos en su forma activa, sin embargo se detectaron otros compuestos, los cuales podrían corresponder a compuestos degradados o modificados estructuralmente.

La continuidad de estos estudios de manera amplia y detallada es de gran importancia, pues los nocivos efectos ambientales se proyectan más allá de los recintos de acuicultura.

ABSTRACT

Aquaculture at national and international level has shown a tremendous growth in the last 30 years. However, despite this activity has shown great benefits at economic and social level, environmental due to the current deterioration of marine ecosystems, reveals the mismanagement applied in crops centers.

The economic growth generated by this activity has prompted the heads of each salmon to increase production, however, in many cases, without a care of the damage that this implies. With the aim of controlling and preventing progressive environmental disaster due to this type of conduct, the National Fisheries Service (Sernapesca) implemented a program to control the use and waste of pharmaceutical products, pollution, prohibited substances and unauthorized substances, with to constantly monitor and control exercised in the management of salmon farming center.

For the treatment and control of diseases of bacterial origin, have used various types of drugs, a situation which generated great interest and concern from the scientific and public because of contamination that can generate large amounts of active drug added to the column water, through food.

The immune response of salmon to these treatments has encouraged excessive use of drugs, creating an environmental impact on marine resources (sediment, water, etc.). The progressive deposition and persistence of antibiotics may explain the accumulation in marine sediments, which due to the presence of chelating agents advantaged retention of antibiotic form complexes with metal cations (Ca^{+2} ,

Mg⁺², etc.), Decreasing its effective concentration and promoting the emergence of bacterial strain resistant to these drugs.

The development of a qualitative methodology for the extraction and detection of antibiotics in marine sediments is aimed at estimating the level of disruption that the resource present and initiate studies towards development of a quantitative analytical method for determining Oxytetracycline or other antibiotics in marine sediments. The detection method used was a high-resolution liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-PAD) with a reverse phase column.

Early results point to a further improves of the extraction method. For its part, the established method, showed that Oxytetracycline would not be present in marine sediments in its active form, however other compounds were detected, which could correspond to compounds structurally degraded or modified.

The continuation of studies more comprehensive and detailed is very important because the adverse environmental impacts are projected beyond the aquaculture precincts.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

Desde hace un par de décadas, las aguas marinas han sido cuerpo receptor de intensa acuicultura en tres regiones del sur de Chile, actividad que ha mostrado un notable avance en términos de tecnología, producción y comercialización a nivel nacional e internacional. Gracias a su extenso borde costero, Chile, se ha convertido en un importante productor y exportador de salmónes, pasando a ser el segundo productor mundial, después de Noruega. Cada año, Salmón Chile entrega un informe detallado del total de especies exportadas y la variación respecto al año anterior, entre los períodos de Enero a Noviembre. En el año 2008, la producción llegó a 400.771 toneladas, alcanzando un crecimiento acumulado de 12,7% con respecto al año 2007 (Salmón Chile, 2008). Si bien, esta actividad proporciona grandes beneficios económicos, existen graves problemas que están afectando tanto la producción de especies como el recurso marino. Enfermedades de tipo bacterianas en especies y deterioro ambiental en aguas y sedimento, son algunos de los problemas detectados hasta ahora (H. Kol, 2006).

Para la prevención y control de enfermedades, la industria farmacéutica ha introducido una serie de compuestos químicos biológicamente activos y de uso veterinario, con objetivo de minimizar las pérdidas causadas por enfermedades de origen patógeno. Entre estos compuestos están los antibióticos, los cuales son administrados vía oral (a través del alimento), por inyección directa (aplicado en un

numero pequeño de especies), tratamiento por baño (adición del fármaco por unidad de cultivo), entre otros.

Críticas permanentes se han generado debido a registros por destrucción de bancos naturales de organismos y recursos bentónicos; contaminación de aguas y sedimentos por combustibles, fecas de peces, restos de alimento y actualmente el uso excesivo de fármacos; contaminación de mitílidos (moluscos) y algas por alimentos no digerido de peces; y desaparición paulatina del recurso pelágico silvestre debido al pastoreo de salmones que escapan de los CES (Conapah, 2008). La Figura 1 muestra algunos flujos e impactos ambientales que puede generar la actividad acuícola, tras una mala gestión y control en cada etapa.

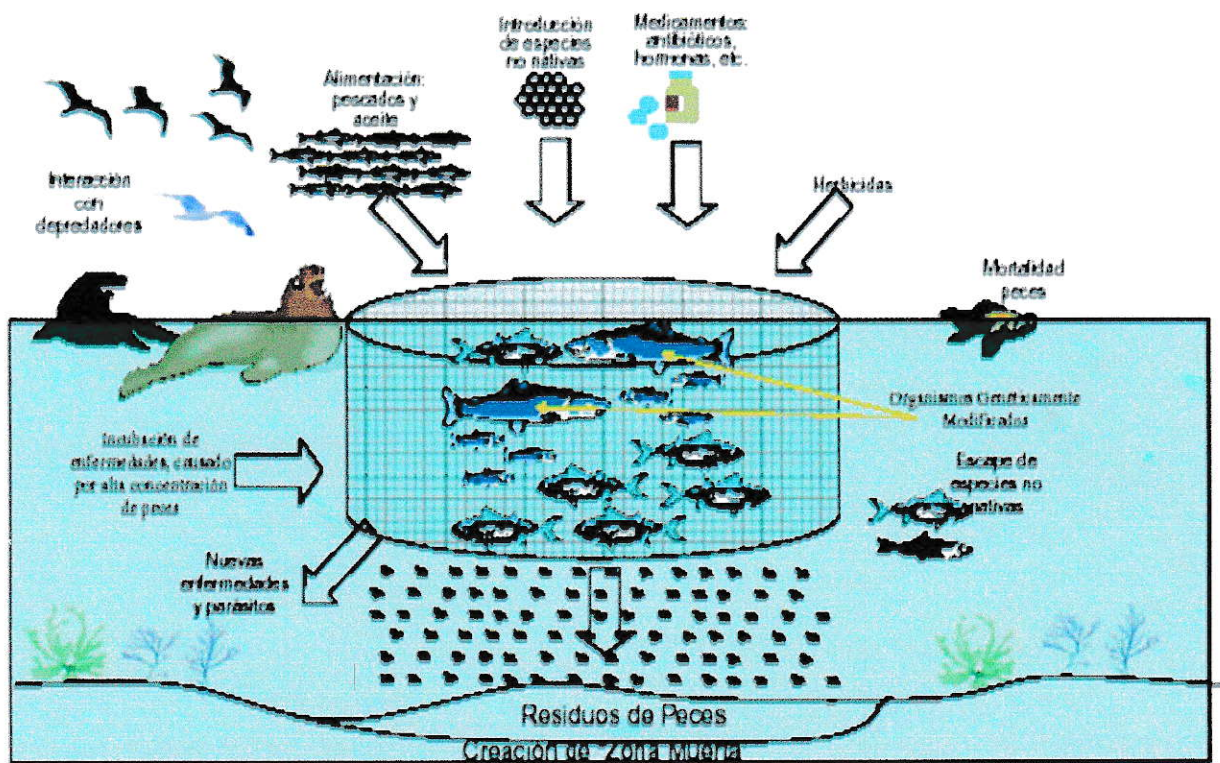


Figura 1.- Posibles impactos ambientales de la acuicultura

Un evento contaminante de fuerte impacto es el indiscriminado uso de antibióticos en los CES, ya que este tipo de medicamentos ejerce una fuerte presión selectiva sobre bacterias, causando el surgimiento y diseminación de cepas resistentes a una gran variedad de fármacos, además del grave problema que significa la presencia de elementos genéticos que transmiten resistencia a través de diversas matrices del medio ambiente (Álvarez y col., 2006). Este hecho podría explicar la negativa respuesta de peces tratados con antibiótico.

Por otra parte, el fondo marino es considerado un resumidero de una gran cantidad de sustancias y elementos químicos generados por actividades antrópicas o de origen natural, que componen finalmente el sedimento marino. Para diferenciar entre los distintos tipos de sedimentos marinos y estimar que tan alterados están, son utilizados parámetros como coloración, tamaño y forma de partículas, permeabilidad, contenido de materia orgánica, acidez, contenido de cloruro de sodio, potencial redox, entre otros; parámetros que varían desde la superficie de contacto con el agua hacia el interior del sedimento, y cuya composición depende en gran medida de la flora bacteriana. La matriz que compone el sedimento marino es bastante compleja y consta de fases detríticas de diferentes tamaños (arena, grava y arcilla), pueden ser de origen orgánico e inorgánico, además de presentar una composición química rica en óxidos de hierro y manganeso, silicatos y materia orgánica. Las características que presentan los sedimentos marinos en profundidades superiores a 20 m, por ejemplo condiciones anóxicas, pueden influir en la persistencia de determinadas especies significativas en el deterioro de ecosistemas marinos (González y col., 2004; Sánchez G., 2007).

Considerando que los fármacos son suministrados en su mayoría, a través del alimento, existe una gran probabilidad de que, el alimento no consumido y que no se alcanza a metabolizar en el interior del pez se deposite lenta y progresivamente en los sedimentos marinos, bajo los centros de cultivo. Por esto, debido a la farmacocinética de los antibióticos, la dosis efectiva para un uso óptimo dependerá principalmente de la vía de administración y del tipo de medicamento utilizado. Por ejemplo, para el caso de Oxitetraciclina administrada vía oral, de una dosis de 75 mg/Kg, solo un 5,6% es absorbido, quedando más de un 90% disponible en la columna de agua o en sedimentos, mientras que el mismo antibiótico es absorbido en más de un 85% cuando es administrado vía inyección (USP, 2003).

Este hecho, sumado a la persistencia que muestran antibióticos en la matriz del sedimento, debido a las propiedades y sustancias presentes en el sedimento marino, hacen necesario desarrollar un método de extracción, detección y la posterior cuantificación de fármacos en sedimentos marinos de zonas de acuicultura (Hektoen y col., 1995)

1.2. CONTROL DE RESIDUOS

El fuerte incremento de la industria salmonera a nivel nacional, motiva al Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) a crear un programa de control de fármacos, contaminantes y sustancias prohibidas. Este programa establece principalmente los procedimientos para controlar el uso de estos productos y sustancias, que al

encontrarse superando los niveles establecidos puedan generar algún tipo de impacto negativo, tanto a la salud humana como al medio ambiente.

En este contexto, la detección de trazas de fármacos antimicrobianos en los distintos ejemplares de peces, sumado al programa de control de fármacos, y en un futuro la detección de fármacos en matrices medio ambientales, representa un beneficio directo sobre la protección de la salud, garantizando la inocuidad y salubridad de los productos elaborados a base de peces de cultivo, permitiendo además la confiabilidad al momento de comercializar estos alimentos. El uso racional de antibióticos se encuentra normado a través del *codex Alimentarius* por organismos internacionales como la Organización Mundial de la salud (OMS) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

La inocuidad de alimentos generados en salmoneras es asegurada estableciendo un Límite Máximo Residual (LMR), el cual es definido como la concentración máxima de residuos resultantes del uso de medicamentos veterinarios (expresada en mg/Kg de peso por producto húmedo). Estos límites son aplicados y evaluados por Semapesca, el cual cuenta con un programa de aseguramiento de calidad (PAC) que contempla la presencia de este tipo de residuos (Semapesca, 2005).

Los límites máximos residuales (LMRs) de distintos fármacos antimicrobianos, establecidos para carne y piel de pescado son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1.- Límites máximos residuales establecidos por mercados regulados en carne y piel de pescado (Sernapesca, 2005)

Producto Farmacéutico	USA (µg/kg)	Unión Europea (µg/kg)	Japón (µg/kg)	Chile (µg/kg)
Oxitetraciclina	2000	100	200	100
Ácido Oxolínico	Ausencia	100	Ausencia	100
Flumequina	Ausencia	600	Ausencia	600
Sulfas	Ausencia	100	Ausencia	-
Trimetroprin	Ausencia	50	Ausencia	-
Florfenicol	Ausencia	1000	Ausencia	1000
Eritromicina	Ausencia	200	Ausencia	200
Enrofloxacino	Ausencia	100	Ausencia	-
Amoxicilina	Ausencia	50	Ausencia	-
Espiramicina	Ausencia	Ausencia	200	-
Ivermectina	Ausencia	Ausencia	Ausencia	-
Benzoato de emamectina	Ausencia	100	Ausencia	100

Los antibióticos más utilizados en acuicultura Chilena, y verificados por el programa de aseguramiento de calidad son Oxitetraciclina, Ácido Oxolínico y Flumequina.

Es importante destacar que, los límites máximos residuales existentes y la normativa legal que rige el programa de control de fármacos son establecidos solo para carne y piel de pescado, excluyendo de la norma fármacos residuales que pueden encontrarse en los ecosistemas marinos. En este contexto, sería de gran relevancia medio ambiental contar con límites máximos residuales y normas de control residuos de antibióticos, por ejemplo para las deposiciones en sedimentos marinos. La inexistencia de una normativa legal que regule niveles de antibióticos depositados en sedimentos marinos, representa un inquietante y latente problema.

Dos entradas importantes de fármacos a los sedimentos son la adición de antibióticos a través del alimento y a través de excretas de salmones. En primer lugar, una gran cantidad de alimento no es consumido por los peces, acumulándose progresivamente en los fondos marinos, y en segundo lugar el alimento digerido por salmones no es metabolizado en su totalidad, siendo liberado a través de las excretas de peces hacia el ambiente. Estimaciones indican que entre un 70 y 80% de droga activa termina en el medio ambiente, mayoritariamente depositada en los sedimentos marinos (Hektoen y col., 1995; Kerry y col., 1995).

Actualmente, considerando las enormes cantidades de fármaco adicionado a los cultivos, existe la probabilidad de encontrar altas concentraciones de antibiótico en los sedimentos marinos. Este resultado, estaría fundamentado en la capacidad que tienen algunos antibióticos para formar quelatos con cationes di y trivalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} , entre otros) presentes en los sedimentos marinos, debido a la presencia de grupos cetónicos y enoles (S.R. Martín, 1979; Arias y col., 2005). La presencia de antibiótico complejado en sedimentos marinos representa una posible explicación tanto para el crecimiento de cepas bacterianas resistentes a este tipo de medicamentos, como también a la persistencia que muestran los antibióticos en esta matriz (T. Maki y col., 2006; Hektoen y col., 1995).

1.3. ANTIBIÓTICOS

Con el fin de controlar enfermedades de origen patógeno que afectan las distintas especies de salmones, es necesario disponer de compuestos químicos de uso veterinario, que puedan ser usados por vía interna. Tales compuestos son denominados antibióticos, los cuales pueden ser de origen natural o bien de origen sintético.

Los antibióticos son especies químicas producidas por microorganismos, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Se diferencian de los análogos de factores de crecimiento en que, son productos elaborados por actividad microbiana (naturales), más que por semisíntesis de compuestos químicos (Clark y col., 2001). La eficacia de estos medicamentos ha sido mejorada modificando químicamente su estructura en condiciones de laboratorio, obteniendo especies semisintéticas con un mayor espectro de acción.

Son empleados para el tratamiento de infecciones sistémicas, circulatorias, respiratorias, urogenitales, gastrointestinales, oftálmicas, tejidos blandos, esqueléticas y tópicas, entre otras, y desde hace un par de décadas son utilizados ampliamente en medicina veterinaria, para el control de enfermedades de origen patógeno. Se clasifican de acuerdo a su estructura y mecanismo de acción; y actualmente son de vital importancia debido a la toxicidad selectiva que presentan (Clark y col., 2001).

Entre los antibióticos más utilizados en acuicultura a nivel nacional encontramos el grupo de las Tetraciclinas (TCs). Fueron descubiertas en el año 1948 y se caracterizan por ser compuestos de amplio espectro bacterial que inhiben una gran cantidad de bacterias Gram positivas, Gram negativas, Rickettsias, Clamidias y algunos Protozoos. La estructura básica de las Tetraciclinas consta de un sistema de anillos hidronaftaceno que contiene cuatro anillos fundidos, unidad que puede estar sustituida en diferentes posiciones, dando origen a nuevos derivados de Tetraciclina (Nieto-Zambrano S., 2006). Las Tetraciclinas pueden agruparse en tres grupos diferentes:

- Tetraciclinas naturales: Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina y Demeclociclina.

- Tetraciclinas semisintéticas: Doxiciclina, Metaciclina y Minociclina.

- Formas latentes de Tetraciclinas: 1) derivado generado por reacción de Mannich sobre la función amida, 2) por formación de sales y 3) por asociación molecular.

La estructura básica de las Tetraciclinas y algunos de sus derivados son presentados en la Figura 2 y Tabla 2 (Oka y col., 2000).

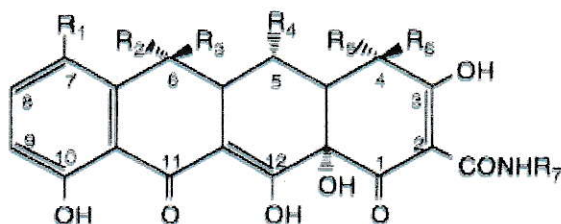


Figura 2: Estructura básica de Tetraciclinas

Tabla 2.- Familia de las Tetraciclinas; compuestos naturales y semisintéticos

Compound	Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Tetracycline (TC)	A	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Oxytetracycline (OTC)	A	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Chlortetracycline (CTC)	A	Cl	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Doxycycline (DC)	A	H	CH ₃	H	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Minocycline (MINO)	A	N(CH ₃) ₂	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Methacycline (MTC)	A	H	=CH ₂		OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Demeclocycline (DMCTC)	A	Cl	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Rolitetracycline (PRMTC)	A	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	^a
4-Epiroxytetracycline (EOTC)	A	H	CH ₃	OH	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
Anhydrooxytetracycline (AOTC)	B	H	-	-	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
4-Epitetracycline (ETC)	A	H	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂	H
Anhydrotetracycline (ATC)	B	H	-	-	H	N(CH ₃) ₂	H	H
4-Epiarhydrotetracycline (EATC)	B	H	-	-	H	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epichlortetracycline (ECTC)	A	Cl	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epidoxycycline (EDC)	A	H	CH ₃	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	H



La **Oxitetraciclina** (OTC) es un antibiótico de amplio espectro bacterial perteneciente a la familia de las Tetraciclinas. Fue introducido en medicina veterinaria mucho después de estar disponible para el uso humano (Oka y col., 2000). Es una sustancia producida por el crecimiento de ciertas cepas de *Streptomyces rimosus* o bien obtenida por métodos sintéticos. Altamente efectivo en el tratamiento de infecciones causadas por numerosas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su modo de acción se basa en que, una vez dentro de la célula bacteriana inhibe la síntesis de proteínas ligándose a la sub unidad 30S de los ribosomas bloqueando la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor del complejo RNAm-ribosoma, generando como consecuencia el rechazo de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Nieto-Zambrano S., 2006).

Físicamente es un polvo cristalino de color amarillo, muy poco soluble en agua y altamente soluble en disoluciones acidas y básicas. La formula IUPAC de OTC es la (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12*a*-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-octahidrotetraceno-2 carboxamida (USP NF, 2008). Las sales de OTC son altamente solubles en agua, alcohol y en disoluciones acidas y básicas. En solución acuosa aparece turbidez con el tiempo, debido a la precipitación de Oxitetraciclina. Esta propiedad depende principalmente de dos funciones acidas: un grupo fenólico (anillo D) y un grupo enólico (Anillo B), además de un grupo dimetilamina y un grupo carboxamida (Anillo A).

OTC posee propiedades acido base, debido a funciones orgánicas como amino e hidroxilos, las cuales provocan que sea altamente dependiente del pH. Presenta tres valores de pKa, el primero corresponde al grupo C₃-OH en el anillo A

($pK_{a1}=3,22$), el segundo corresponde al grupo C_4-NR_2 en el anillo A ($pK_{a2}=7,64$) y el tercero corresponde al grupo $C_{10}-OH$ en el anillo D ($pK_{a3}=8,94$) (Qiang y Adams, 2004). La estructura de OTC y la descripción anterior es presentada en la figura 3.

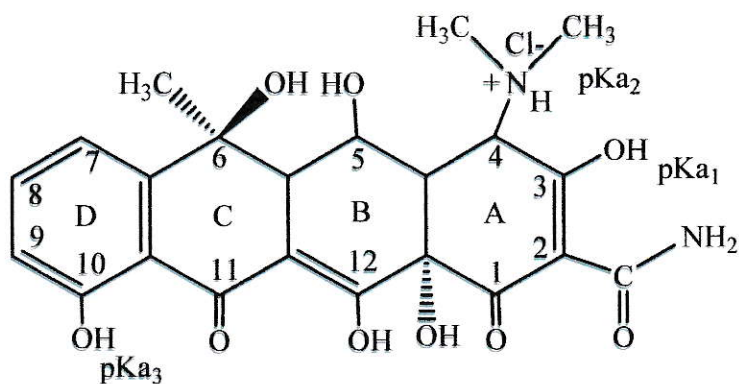


Figura 3: Estructura de Oxitetraciclina (La designación con letras de los anillos fundidos de OTC se mantiene de acuerdo a la referencia Qiang y Adams, 2004).

OTC puede sufrir epimerización (mezclas de otras TCs) o degradación bajo las siguientes condiciones: pHs altamente ácidos y básicos, exposición a la luz por más de 30 min, condiciones altamente oxidantes o reductoras, y temperaturas superiores a los 30°C (Oka y col., 2000). Por lo tanto, para lograr su óptima determinación es necesario ajustar estas condiciones.

1.4. Oxitetraciclina en sedimentos marinos

1.4.1. Factores que favorecen la acumulación

En términos generales, las vías de ingreso de medicamentos al medio ambiente son: descarga a efluentes de aguas residuales provenientes de actividades agrícolas, excreción de sustancias en la orina y fecas de animales para la producción de alimentos, residuos procedentes de tratamientos para los animales y eliminación inadecuada de antibióticos no utilizados. La figura 4 muestra un detalle de lo expuesto anteriormente (Nieto-Zambrano S., 2006).

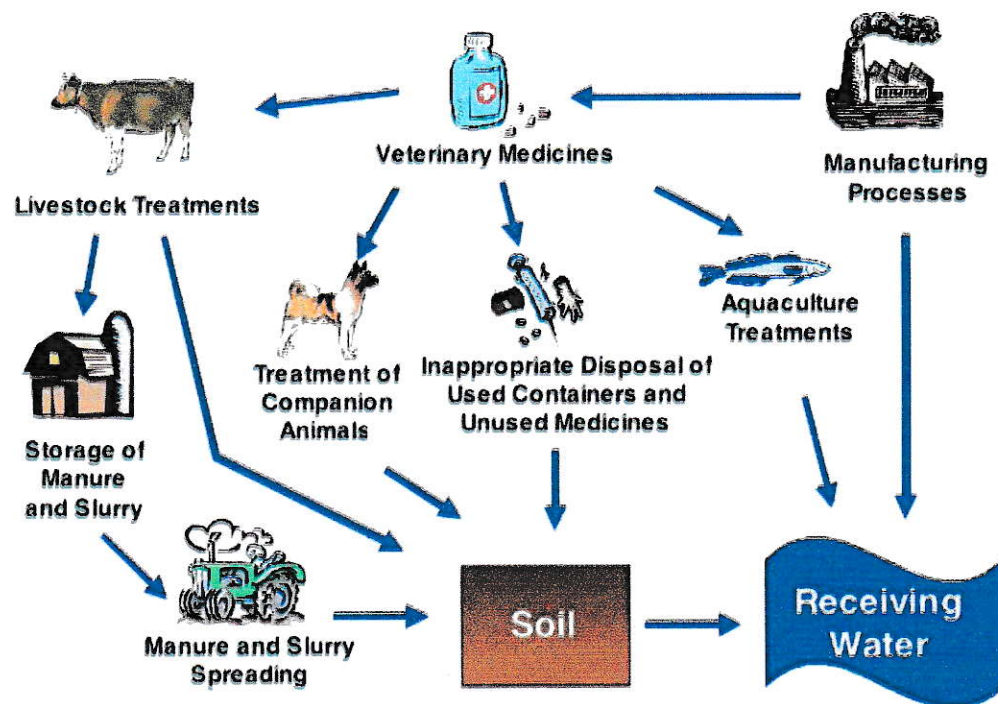


Figura 4: Vías de entrada de antibióticos al medio ambiente

Como fue mencionado anteriormente, OTC es utilizado comúnmente en medicina veterinaria, debido a su gran selectividad y eficacia en el control de enfermedades de origen bacteriano. El interés de la industria salmonera por mantener cultivos sanos y aumentar el rendimiento de la producción de peces, cada año ha incentivado la adopción de conductas erradas e inconscientes. La administración excesiva de medicamentos los CES, pueden estar afectando en gran manera los ecosistemas marinos, sin notar el real impacto que se esta generando bajo las jaulas de cultivo, ya que es sabido que, un alto porcentaje de alimento (70-80%) no es consumido por los peces, sumado a la baja absorción intestinal que presenta OTC, una vez ingerida por los salmones (Hektoen y col., 1995; Kerry y col., 1995).

Los sedimentos marinos pueden verse fuertemente afectados por la lenta y progresiva deposición de residuos con sustancias antibióticas. Ahora bien, factores que favorecen la acumulación de sustancias en los fondos marinos son, en primer lugar factores físicos, como velocidad de sedimentación conjuntamente con la cantidad de residuales presente en la columna de agua, además de un proceso de compactación, el cual implica una reorganización de partículas en respuesta a nuevas condiciones de presión por sobrecarga (Sánchez G., 2007) y en segundo lugar, factores relacionados con la composición química de los sedimentos, los cuales explicarían la persistencia de Oxitetraciclina en los fondos marinos (Hektoen y Col., 1995; MacKay y Canterbury, 2005).

En este contexto y de acuerdo a la literatura, la presencia de cationes metálicos di y trivalentes presentes en el sedimento marino (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} ,

Co^{2+} , VO^{2+}) favorecerían la acumulación y retención de OTC, debido a la formación de complejos con estas especies catiónicas (Chopra y Roberts, 2001; Arias y col., 2005).

1.4.2. Modo de enlace y Riesgos de acumulación

La tendencia de OTC a formar complejos con cationes di y trivalentes esta fundamentada en las características estructurales que posee este antibiótico. Los posibles sitios de quelación son, un sistema amino-alcohol en C_3 y C_4 (Anillo A), un sistema dicarbonil entre C_1 y el grupo carboxamida (anillo A) y un sistema β -dicetona entre C_{11} y C_{12} (entre anillo B y C). Ahora bien, de acuerdo a la literatura, los sitios más favorecidos para formar complejo son el primero y tercero descritos anteriormente. (Chopra y Roberts, 2001; Arias y col., 2005; F. de Paula y col., 1999). Las formas de unión descritas son ilustradas en la figura 5 y 6.

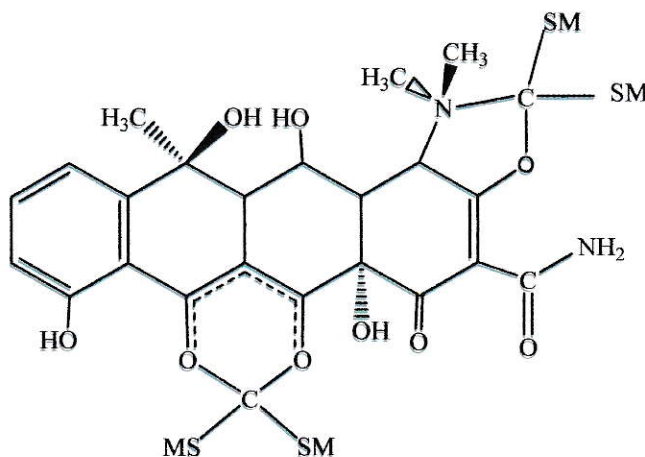


Figura 5: Complejo de OTC, donde C = catión metálico y MS = Matriz del sedimento.

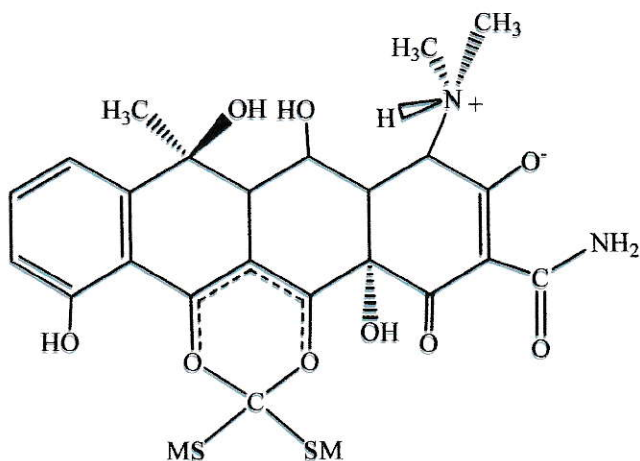


Figura 6: Complejo de OTC, donde C = catión metálico y MS = Matriz del sedimento.

La formación de complejos estará condicionada al pH de trabajo y al tipo de catión metálico presente en el sedimento. Los complejos presentados anteriormente pueden obtenerse mayoritariamente entre pH 4 y 7 (F. de Paula y col., 1999; Chopra y Roberts, 2001).

Los complejos de OTC carecen de actividad antimicrobiana y disminuyen la biodisponibilidad del fármaco activo. Sin embargo, la persistencia de OTC en sedimentos marinos ejerce presión selectiva sobre microorganismos generados en esta matriz, promoviendo el crecimiento de bacterias resistentes a la acción de OTC (Álvarez y col., 2006). El surgimiento de este tipo de bacterias afecta directamente los CES e indirectamente a humanos.

1.5. Determinación de Oxitetraciclina

1.5.1 Extracción de Oxitetraciclina

La posibilidad de encontrar Oxitetraciclina complejada con cationes metálicos en sedimentos marinos, representa una potencial fuente de investigación científica, pudiendo llegar a contribuir al establecimiento de límites máximos residuales (LMR) en este tipo de matrices. En este contexto, es necesario proponer un sistema de extracción capaz de liberar el antibiótico de sedimentos, permitiendo así su detección y cuantificación.

La extracción propuesta en este trabajo esta fundamentada en la ruptura del complejo OTC-Catión de los sedimentos, mediante la adición de un agente quelante que presente una constante condicional mayor que la constante presentada por en complejo OTC-Catión (Arias y Col., 2005) formando así un complejo mas estable que el de OTC.

El Etilenodiaminotetracético disódico (Na_2EDTA) es un agente complejante hexadentado capaz de ceder seis pares de electrones. Se disuelve fácilmente en solución acuosa y forma complejos de alta estabilidad con la mayoría de los cationes metálicos, independiente de la carga que presenten. Gracias a estas características, la constante condicional que presenta el complejo EDTA/Catión es mayor que la constante que presenta el complejo OTC/Catión, por lo tanto, en sedimentos marinos debiera formarse un quelato más estable en presencia de Na_2EDTA , permitiendo saturar los sitios acomplejables e induciendo la liberación de OTC a la solución (Arias y

Col., 2005; Pouliquen y Col., 1992). La Figura 7 representa el fundamento teórico de la extracción a pH 4.

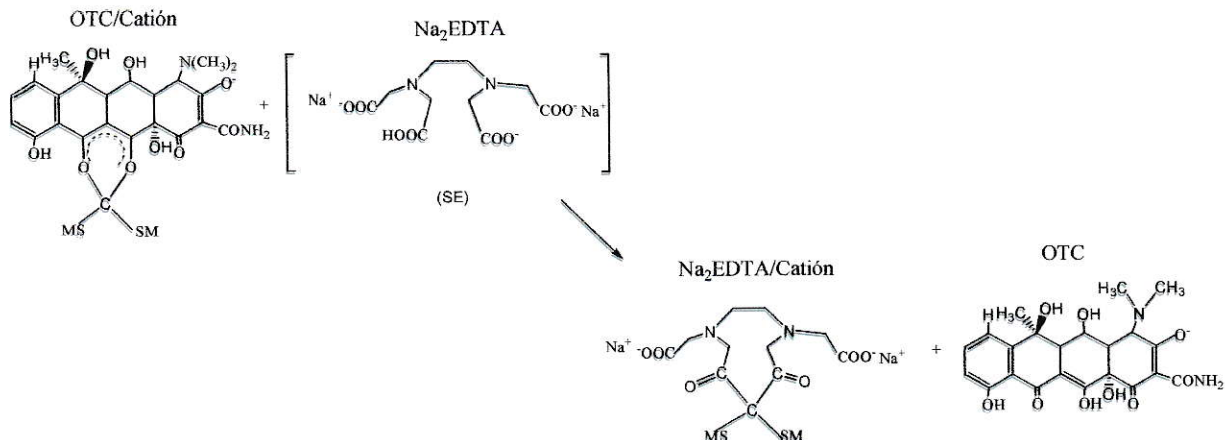


Figura 7: Extracción de Oxitetraciclina (OTC); donde MS = Matriz del Sedimento y SE = Solución Extractante

1.5.2 Métodos cromatográficos

Disponer de un método cromatográfico que permita detectar y cuantificar Oxitetraciclina en sedimentos marinos representa un gran avance para el estudio de ecosistemas marinos.

Oxitetraciclina ha sido determinada en diferentes matrices; orina, leche, tejido animal, agua y suelo, son algunas de ellas. Para su análisis se han utilizado diversas técnicas cromatográficas, entre ellas está la Cromatografía en capa fina (TLC) en fase inversa, Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de Arreglo de

fotodiodos (PDA), Fluorescencia, Masa (MS), Electroforesis Capilar (CE), entre otras (Oka y col., 2000; Díaz-Cruz y col., 2003).

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad en sustancias que son de interés a nivel industrial, como hidrocarburos, antibióticos, plaguicidas, sustancias inorgánicas entre otras. (Skoog y Leary, 1994).

En este trabajo se utilizará la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con un detector espectrofotométrico con arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA), detector que además de entregar una alta sensibilidad (100 pg – 1 ng), tiene la ventaja de permitir obtener el cromatograma completo a una sola longitud de onda o alternativamente, cuando los picos que eluyen están bien separados en el tiempo, es posible elegir diferentes longitudes de onda y analizar el espectro de absorción para cada pico cromatográfico.

1.6 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El desarrollo de una metodología Cualitativa para la extracción y detección de Oxitetraciclina en sedimentos marinos, permitirá poner en marcha una línea de investigación muy poco estudiada en acuicultura a nivel nacional.

Evidenciar la presencia de Oxitetraciclina en los sedimentos marinos dependerá de una adecuada elección del extractante y de un buen ajuste de condiciones en el cromatógrafo líquido (HPLC). Es de esperar que esta metodología permita detectar y estimar niveles de OTC, resultado que ayudaría a diagnosticar el grado de contaminación de los sedimentos, además de presentar ensayos preliminares para una futura cuantificación de este antibiótico.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo General

- ✓ Desarrollar una metodología cualitativa para la extracción y detección de Oxitetraciclina (OTC) depositada en sedimentos marinos, en cuatro zonas de la X Región.

1.7.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la estabilidad de OTC en condiciones ambientales (Luz de día a 20°C) y refrigerada a 4°C.
2. Evaluar las condiciones de Na₂EDTA pH-4 en Buffer McIlvaine, Buffer McIlvaine pH-4 y MeOH como agentes para la extracción de OTC en sedimentos marinos.
3. Evaluar la eficacia del método, mediante pruebas comparativas, sobre la base de las siguientes técnicas:
 - a) Elaboración de muestras sintéticas de sedimentos marinos con OTC y comparar contra muestras reales.
 - b) Evaluar parámetros analíticos como Intervalo lineal de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación.

4. Detección de OTC por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector UV con arreglo de fotodiodos (PAD), en muestras sintéticas y reales de sedimento marino.

5. Establecer criterios y descartar variables que ayuden al desarrollo y validación posterior de una metodología integrada de extracción y cuantificación de Oxitetraciclina en sedimentos marinos.

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

- ✓ Matraces de aforo de 10, 25, 100, 500 y 1000 mL (Clase A)
- ✓ Vasos de precipitado 50, 250 y 1000 mL (Clase B)
- ✓ Tubos de centrifuga propileno 14 mL (Sarstedt)
- ✓ Micropipeta 100-1000 μ L (Genex Beta)
- ✓ Micropipeta 10-100 μ L (Precisión)
- ✓ Micropipeta 5-10 μ L (Socorex)
- ✓ Micropipeta 1-10 mL (Transferpette[®]s)
- ✓ Pipetas 2, 3, 10 y 100 mL
- ✓ Propipeta
- ✓ Jeringas 2, 3 y 50 mL
- ✓ Papel Aluminio
- ✓ Filtro 0,45 mm (Analypore)
- ✓ Viales 1mL (Shell Vial W/Cap For Waters TM 96 Position Tray, Supelco)
- ✓ Papel pH (pH-Fix 0-14 Macherey-Nagel)
- ✓ Placas Cromatográficas: HPTLC-RP-8 F₂₅₄s 10x10 cm (Merck)
- ✓ Capilar fino para TLC
- ✓ Cámara cromatográfica 21x11x7 cm (Camag)

2.2. Reactivos

- ✓ Oxitetraciclina Hidrocluro 95% (Sigma-Aldrich p.a.)
- ✓ Ácido etilendiaminotetracético disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
(TITRIPLEX® III MERCK)
- ✓ Ácido Cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0,2 M (Merck)
- ✓ Fosfato disódico dihidratado (Na_2HPO_4) 0,2 M (Merck)
- ✓ Metanol (CH_2OH) grado HPLC (Fischer Chemical – Scientific)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Agua desionizada (Milli-Q)
- ✓ Acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC (Merck)
- ✓ Ácido Ortofosfórico 85% (H_3PO_4) (Merck)

2.3 Aparatos e Instrumentos

- ✓ Controlador HPLC (Waters 1525 Controller)
- ✓ Bomba (Waters 1525 Binary HPLC Pump)
- ✓ Detector UV con Arreglo Fotodiodos (Waters 2996 Photodiode Array Detector)
- ✓ Programa software (Empower)
- ✓ Columna cromatográfica Symetry® RP-18 5 μm 3,9x150 mm
- ✓ Balanza analítica (Shimadzu AUX-220)
- ✓ Balanza Granataria (Ficculab V-2400)
- ✓ Sonicator (Transsonic T 470/H Elma)
- ✓ Centrífuga (Boeco Germany U-320)
- ✓ Agitador Magnético (Lab Rotator)
- ✓ Lámpara UV a 260 nm

2.4 Procedimientos Experimentales

2.4.1 Muestreo se sedimentos marinos

Las muestras de sedimento marino fueron recolectadas en cuatro zonas de la X Región de Los Lagos, Chile. Las cuatro zonas de muestreo fueron: Reloncaví, Calbuco, Castro y Quellón. Cada una de estas zonas fue dividida por Centros Engorga de Salmones (CES), nueve centros en Reloncaví, trece centros en Calbuco, once centros en Castro y diez centros en Quellón. Cada centro fue subdividido en cuatro estaciones de muestreo, midiendo finalmente dos y tres puntos por cada estación. La Figura 8 muestra la ubicación y las coordenadas de cada zona y CES muestreado.

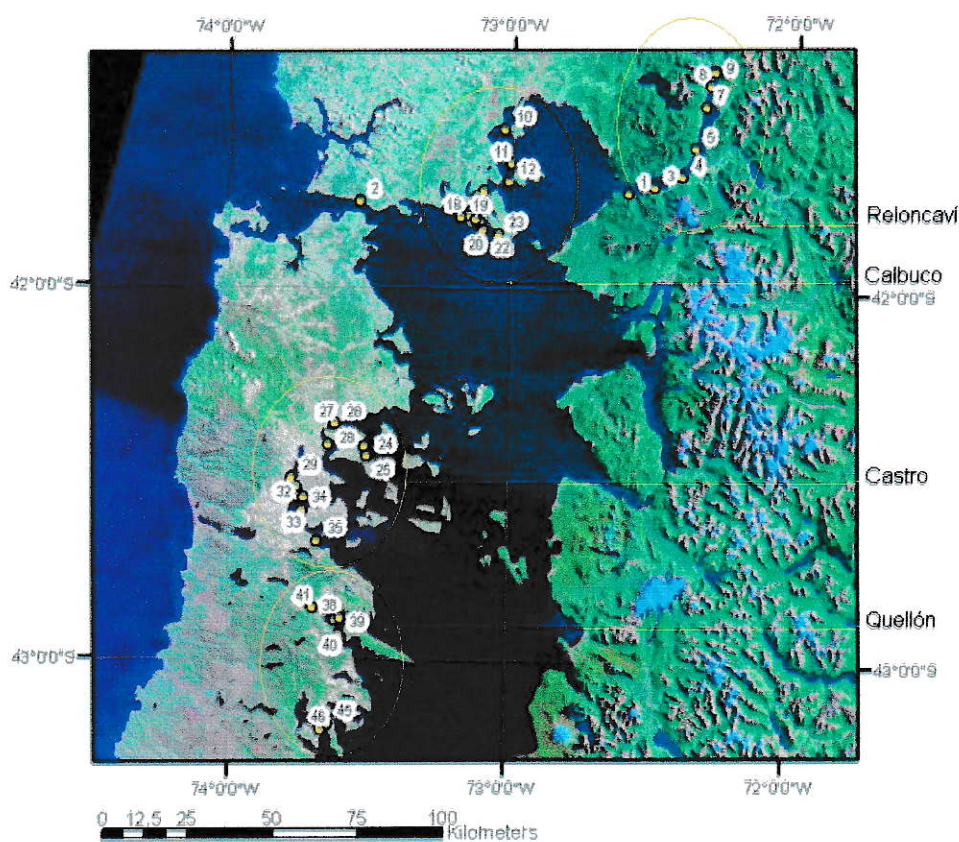


Figura 8: Ubicación y distribución de los centros muestreados, X región, Chile.

El muestreo final contemplo un total de 445 puntos, siguiendo un protocolo de muestreo que tiene como finalidad mantener un control en el sistema de muestreo, de forma de no perder ni alterar información en ninguna de las etapas de la toma, transporte y almacenamiento de la muestra, asegurando así la representatividad de los resultados.

En terreno y en cada muestra se midieron los siguientes parámetros físico-químicos:

- ✓ Mediciones en agua: pH, Oxígeno, Potencial redox, Profundidad, Temperatura y Conductividad eléctrica.
- ✓ Mediciones en sedimentos: pH, Potencial redox y Temperatura.

Algunos equipos e instrumentos utilizados en terreno son presentados en la Figura 9, 10, 11 y 12.



Figura 9: pH-metro



Figura 10: Sonda Multiparametro

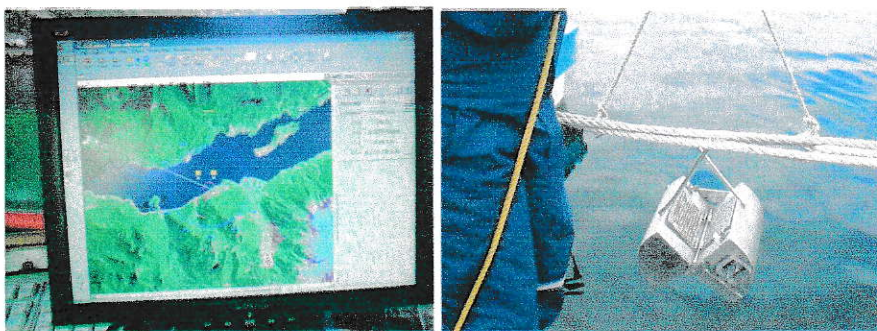


Figura 11: Auxiliar de Navegación

Figura 12: Draga

Para el análisis en laboratorio fueron seleccionadas cinco muestras de cada zona, con el propósito acotar el estudio y optimizar variables e insumos. Se midieron parámetros físico-químicos en terreno (pH, T, Eh, etc.), de los veinte puntos seleccionadas en agua y sedimento (Ver anexo, Figuras 16 y 17).

Finalizado el muestreo y la determinación de parámetros físico-químicos, las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas selladas y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta el análisis en laboratorio.

2.4.2. Preparación de las soluciones

- Solución amortiguadora Mcllvaine pH-4.- se mezcló 1,92 g de Ácido Cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7$) y se aforó a 100 mL con agua desionizada (Solución 0,2 M $C_6H_8O_7 \times H_2O$). Se mezcló 3,56 g de Fosfato de Sodio dihidratado ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) y se aforo a 100 mL con agua desionizada (Solución 0,2 M de $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$). Posteriormente se mezcló 38,55 mL de solución 0,2 M de $C_6H_8O_7 \times H_2O$ y se aforó a 100 mL con solución 0.2 M de $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$. Se comprobó que el pH fuera 4.
- Solución de Na_2EDTA 0,1M/Buffer Mcllvaine.- Se preparó 100 mL de esta solución. Para esto se agregó 1,86 g de Na_2EDTA y se disolvió aforando a 50 mL con Solución Buffer Mcllvaine pH-4. Esta solución se mantuvo refrigerada a 4°C antes y después de su uso.
- Solución de Acido Ortofosfórico (H_3PO_4) 0,001 M.- La concentración de H_3PO_4 85% p/v corresponde a 8,68 M. Sabido esto, se agregó 1150 μ L de ácido a un matraz y se aforó a 1000 mL con agua desionizada. Se verificó que el pH fuera 3.

- Fase Móvil.- Es una solución de Ácido Ortofosfórico 0,001 M (pH 3) con Acetonitrilo (Grado HPLC) en proporción 85:15 (v/v).
- Solución Stock (A) de estándar de Oxitetraciclina (1000 mg/L).- Se preparó disolviendo 50 mg de OTC Hidrocloruro en 50 mL de MeOH (grado HPLC). Esta solución se mantuvo a 4°C y aislada de la luz con papel aluminio.
- Solución Stock (B) de estándar de Oxitetraciclina (100 mg/L).- Se Preparó diluyendo 2,5 mL de solución Stock (A) en un matraz aforando a 25 mL con MeOH (grado HPLC). Esta solución se mantuvo a 4 °C y aislada de la luz con papel aluminio.
- Curva de Calibración de estándar de Oxitetraciclina.- Se preparó a partir de la solución Stock (B), aforando cada punto de la curva con solución de fase móvil (Mezcla: ACN/H₃PO₄ – 15:85 v/v). Se preparó dos curvas de calibración una en el rango menor (0,05 – 5 mg/L), para calcular el límite de detección y cuantificación (LD y LC), y una curva en un rango mayor (5 – 50 mg/L) para muestras que estén fuera del rango menor. El detalle de preparación se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3.- Curvas de calibración rango menor y rango mayor.

Rango	Concentración (mg/L)	Vol. Solución Stock B (μL)	Aforar (mL)
Menor	0,05	5	10
	0,1	10	10
	0,5	50	10
	1	100	10
	3	300	10
	5	500	10
Rango	Concentración (mg/L)	Vol. Solución Stock B (mL)	Aforar (mL)
Mayor	5	0,5	10
	10	1	10
	30	3	10
	50	5	10

2.4.3. Estudio de estabilidad de OTC refrigerada a 4°C y en condiciones ambientales (Luz de día a 20°C)

Se preparó 10 mL de una solución 10 mg/L de OTC estándar a partir de la solución Stock (B), diluyendo con fase móvil (detallada en 2.4.1.). De esta solución se tomaron 5 mL, los que se mantuvieron siempre refrigerados a 4°C. Se realizaron mediciones cromatográficas cada 30 minutos, desde tiempo cero hasta 120 minutos. Posteriormente se midió a los 240 minutos, 24 hrs. (1440 min) y 72 hrs. (4320 min).

Paralelamente a esta prueba, los 5 mL restantes de solución fueron expuestos a luz y temperatura ambiental (20°C), realizando mediciones cromatográficas en el mismo intervalo de tiempo descrito anteriormente.

La estabilidad de OTC se evaluó por la variación en las bandas de absorción del espectro de OTC a cada uno de los tiempos descritos.

2.4.4. Estudio de recuperación de OTC

Previo a la elección de la muestra para el estudio de recuperación, se determinó la concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} en ocho muestras de sedimento marino. Se escogió dos de cada zona. La determinación del contenido de Calcio y Magnesio se realizó de acuerdo al procedimiento en la literatura (Instituto de investigaciones agropecuarias, 2000).

Se escogió una muestra de sedimento marino, cuya concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} fue considerablemente alta.

Para el estudio de recuperación de OTC se procedió de la siguiente manera:

- ✓ Se pesó 1 g de la muestra de sedimento en balanza analítica y se almacenó en un tubo de centrifuga de propileno, cubierto en papel aluminio.
- ✓ A continuación se adicionaron 500 μL de una estándar de OTC 20 ppm.
- ✓ Posteriormente el tubo fue guardado a 4°C durante un periodo de 30 min, para permitir la absorción de OTC en la matriz del sedimento.
- ✓ Terminado el tiempo de absorción la muestra es sometida a extracción como se indica en el punto 2.4.5.

2.4.5. Extracción de muestras de sedimentos

Previo a la extracción, las muestras de sedimento fueron tamizadas en tamiz fino de 63 μm de diámetro de poro. Durante todo el proceso de extracción es importante mantener las siguientes condiciones: Temperatura inferior a 15 °C y tubos absolutamente aislados de la luz. Esto permitirá que el antibiótico no se descomponga antes de su análisis.

La extracción se llevó a cabo de acuerdo a los siguientes pasos:

- ✓ Se pesó 1 g de sedimento en balanza analítica y se almacenó en un tubo de centrifuga de propileno, cubierto en papel aluminio.
- ✓ Se adicionaron 3 mL de Na_2EDTA 0,1M pH 4 en Buffer McIlvaine.
- ✓ Se da inicio a la extracción mediante homogenización durante 120 min, en un agitador a 250 revoluciones/seg.
- ✓ Finalizado el periodo de agitación el tubo con la muestra es introducido en un baño de ultrasonido durante 10 min.
- ✓ Posteriormente la muestra es centrifugada durante 30 min a 4000 rpm.
- ✓ El sobrenadante es traspasado con pipeta Pasteur a un tubo limpio, y el sólido residual se extrae nuevamente durante 60 min con 2 ml de Na_2EDTA pH 4 en buffer McIlvaine.
- ✓ Finalizados los 60 min, la muestra es sonicada 5 min y centrifugada por 30 min a 4000 rpm.
- ✓ Ambos sobrenadantes son mezclados y filtrados a través de un filtro de diámetro 25mm y 0,45 μm de tamaño de poro.
- ✓ Finalmente los extractos fueron analizados por HPLC-PDA.

En forma independiente, la recuperación de OTC desde muestras de sedimento fue evaluada también con MeOH y Buffer McIlvaine pH 4 como agentes extractantes, aplicando el procedimiento descrito anteriormente.

2.4.6. Condiciones cromatográficas

- ✓ Fase Móvil: ACN (Grado HPLC) con H₃PO₄ 0,001 M (pH 3) en proporción 15:85 v/v
- ✓ Velocidad de Flujo: 1 mL/min
- ✓ Volumen de Inyección: 20 µL
- ✓ Longitud de onda: 270 nm
- ✓ Desgasificación de solventes: Helio Extra puro (composición 99,995% He, O₂ < 5ppm, H₂O < 2ppm; 100 mL/min)

2.4.7. Determinación por TLC – RP

Para la determinación por TLC-RP todas las muestras fueron extraídas de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 2.4.1. Posteriormente se redujo el volumen de los extractos, llevándolos a sequedad bajo corriente de Nitrógeno. A continuación las muestras fueron resuspendidas en 1 mL de MeOH, procurando disolver totalmente la muestra.

Se preparó cinco estándares de OTC en concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 mg/L. Para esto se tomaron 0,5, 1, 1,5 y 2,5 mL de solución Stock B (100 mg/L) y se aforó a 5 mL con MeOH. Estas soluciones fueron utilizadas como referencia, junto a las muestras de sedimento marino para el análisis por TLC.

Mediante un capilar fino, abierto en ambos extremos, se extrae una pequeña cantidad (aprox. 1 cm del capilar) de la solución que contiene la muestra. A través de un movimiento rápido se toca levemente la superficie del absorbente en la placa con la punta del capilar, a una distancia no menor a 0,5 cm de los bordes (inferior y lateral), pudiendo apreciar el punto de aplicación a simple vista.

El desarrollo de las placas se llevó a cabo en una cámara cromatográfica (21x11x7cm), utilizando como eluyente MeOH con gotas de CHCl₃. La placa se ubicó en forma vertical en la cámara cromatográfica. Se debe verificar que el eluyente no toque la placa en el punto de aplicación de la muestra.

El revelado de las placas se llevó a cabo bajo lámpara UV a longitud de onda corta, 260 nm. Es conveniente marcar con lápiz grafito las manchas que se observen en la placa y el recorrido final del solvente. Dicho esto, los valores de R_f son calculados utilizando la ecuación 2.4.7.a.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto desde el punto de aplicación}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}} \quad (2.4.7.a)$$

2.4.8. Tratamiento de datos

En este trabajo se determinaron los siguientes parámetros analíticos:

- **Límite de detección (LD)**

Este valor representa aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la señal del blanco o línea base. Si bien esta definición deja un margen amplio en la estricta definición de límite de detección, comúnmente se utiliza como: señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. En métodos cromatográficos de análisis, donde el pico corresponde al analito, debe ser distinguido de la línea base cromatográfica. Una opción para su determinación es midiendo el ruido del cromatograma, de al menos 3 blancos sometidos a todo el proceso analítico de extracción. En esta oportunidad, la determinación del LD en unidades de concentración se realizó a través de un análisis de varianza de la regresión lineal, del cual se obtuvo un valor de error típico y un coeficiente de la variable X_1 . A partir de la ecuación 2.4.8.a. se calcula el LD del instrumento.

$$LD = \frac{(3 * \text{Error típico } X_1) * \sqrt{0,5}}{\text{Coef. Variable } X_1} \quad (2.4.8.a)$$

- **Limite de Cuantificación (LC)**

Corresponde a la concentración mínima de analito que puede ser determinada de manera cuantitativa, con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Comúnmente

es establecido a través de una muestra o un material, ubicando un factor 10 en reemplazo de 3 (ecuación 2.4.8.b), y así multiplicar la señal del blanco o línea base.

$$LD = \frac{(10 * \text{Error típico } X_1) * \sqrt{0,5}}{\text{Coef. Variable } X_1} \quad (2.4.8.b)$$

- **Porcentaje de Recuperación**

Procedimiento que establece la relación entre el valor obtenido por aplicación de un método de ensayo a un material de referencia y su valor teórico o esperado. Cuando la recuperación no es cercana al 100%, establece la desviación del valor real, que nos permite corregir los resultados obtenidos o modificar el método con el fin de mejorar la recuperación. La ecuación utilizada en la determinación de la recuperación es la 2.4.8.c.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(C_1 - C_2) * 100}{C_3} \quad (2.4.8.c)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo fue orientado al desarrollo de un método cualitativo para extraer y detectar residuos de OTC presentes en los sedimentos marinos. Las primeras pruebas fueron orientadas al estudio de la estabilidad OTC, y así establecer óptimas condiciones de trabajo en laboratorio.

3.1. Estabilidad de OTC en condiciones ambientales (Luz de día a 20°C) y a 4°C.

Las primeras pruebas fueron realizadas en condiciones ambientales. La tabla 4 muestra la variación de 4 medidas del total realizadas. Este resultado concuerda con documentos publicados donde se informa que OTC es fotosensible e inestable a tiempos prolongados de exposición a temperatura ambiente (Oka y col. 2000).

Tabla 4.- Estabilidad de OTC en condiciones ambientales.

Tiempo de exposición (min)	t _R (min)	λ de absorción (nm)
0	3,21	216,3 - 269,4 - 355,0
60	3,14	268,4 - 355,0
	6,16	271,4 - 337,8
120	2,33	229
	3,07	210,3 - 290,3
	6,08	233,7
4320 (3 días)	2,35	256,5

De acuerdo a la Tabla 4 es posible afirmar que OTC se descompone en condiciones ambientales. Evidencia de este resultado es la variación de los tiempos de

retención y las longitudes de onda de absorción de OTC. Se aprecian nuevas señales a distintos tiempos de retención, y un corrimiento y desaparición de bandas de absorción en los 4 tiempos presentados, lo que explicaría la desaparición o transformación de ciertos grupos cromóforos en la molécula OTC.

A continuación las Figuras 13 y 14 muestran los espectros de absorción correspondientes a OTC en tiempo cero y después de 3 días de exposición.

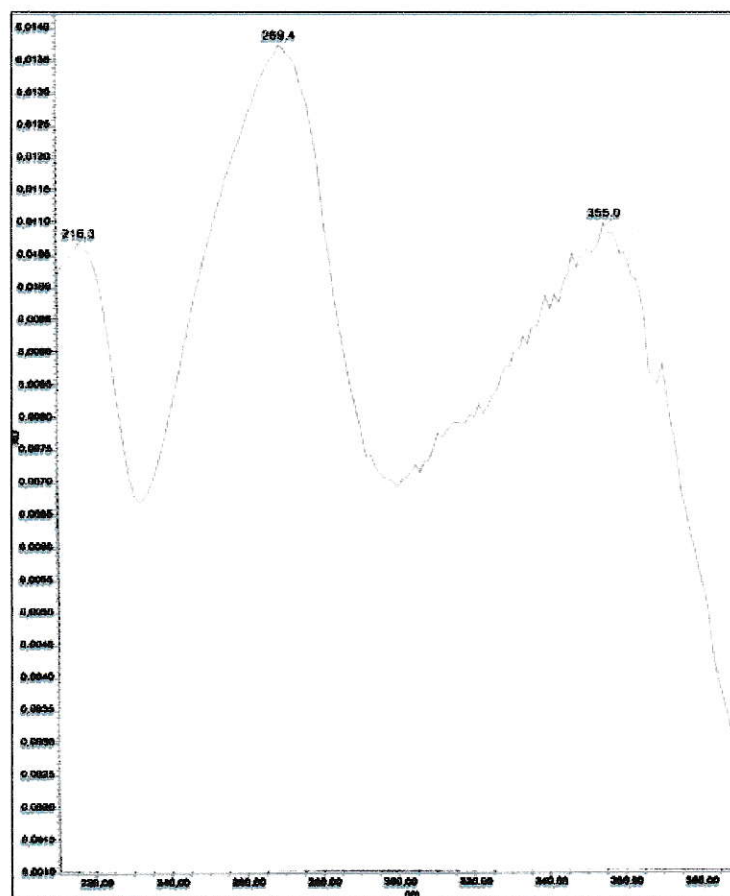


Figura 13.- Espectro de absorción medido tiempo cero en condiciones ambientales.

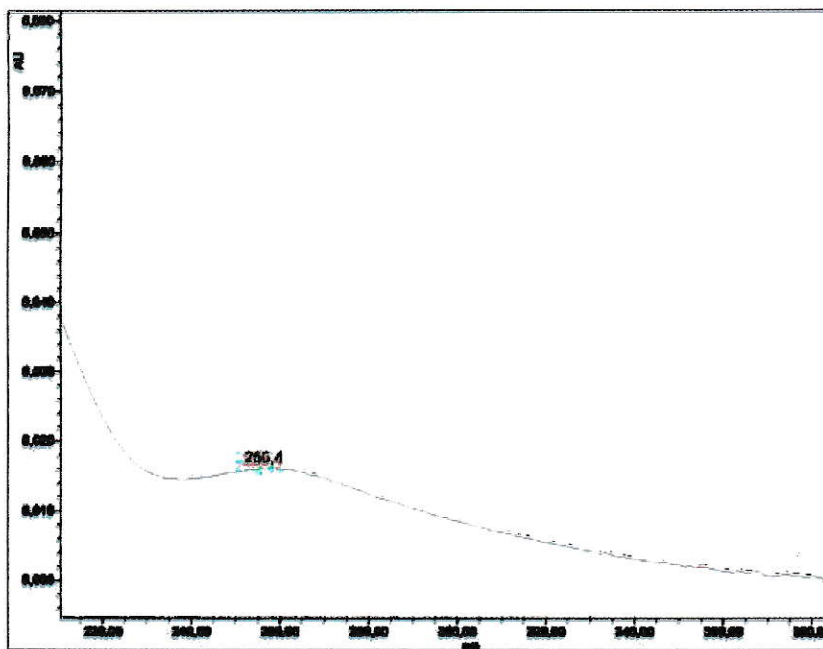


Figura 14.- Espectro de absorción medido 3 días después de la exposición en condiciones ambientales

De acuerdo a estos espectros es posible apreciar que las bandas de absorción de OTC son absolutamente diferentes después de 3 días de exposición, lo cual explica la inestabilidad de OTC en estas condiciones.

El estudio a 4°C mostró que la estabilidad de OTC se mantiene en todo el intervalo de tiempo. Los tiempos de retención y longitudes de onda de absorción de OTC revelaron que no hay descomposición en estas condiciones. La tabla 5 muestra los resultados de estabilidad a 4°C a 0, 60, 120 y 4320 min.

Tabla 5.- Estabilidad de OTC a 4°C.

Tiempo de exposición (min)	t_R (min)	λ_{max} de absorción (nm)
0	3,04	215,2 - 268,2 - 355,0
60	3,13	217,5 - 269,4 - 356,2
120	3,12	216,3 - 269,4 - 355,0
4320 (3 días)	3,02	216,3 - 270,6 - 355,0

De acuerdo esta tabla, es posible apreciar la estabilidad de OTC, ya que tanto las longitudes de onda de absorción como los tiempos de retención no experimentan variación.

Los leves corrimientos apreciados tanto en las longitudes de onda como en los tiempos de retención son atribuidos a pequeños cambios en la polaridad de solventes, pH, o bien por detalles estructurales que contiene la molécula (Skoog y Leary, 1994).

A continuación las Figuras 15 y 16 muestran los espectros de absorción correspondientes a OTC en tiempo cero y después de 3 días a 4°C, donde es posible corroborar que el comportamiento de los tres máximos de absorción se mantuvo, indicando que los grupos cromóforos no sufren transformación alguna.

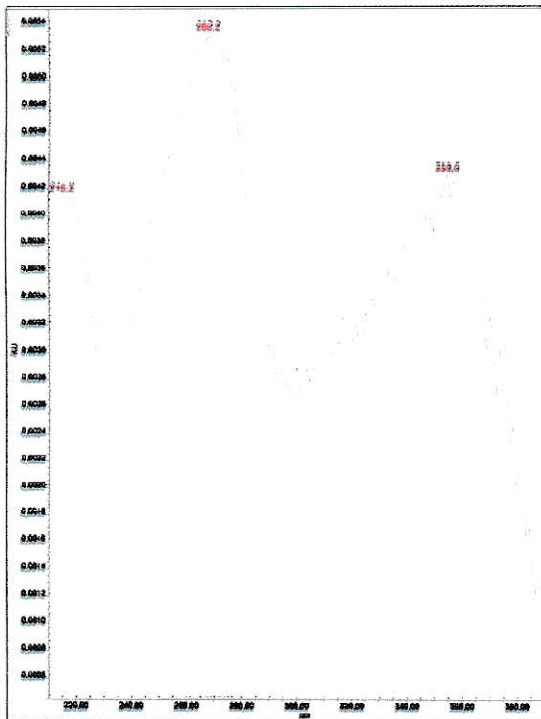


Figura 15
*Espectro de absorción
 medido a tiempo cero a 4°C.*

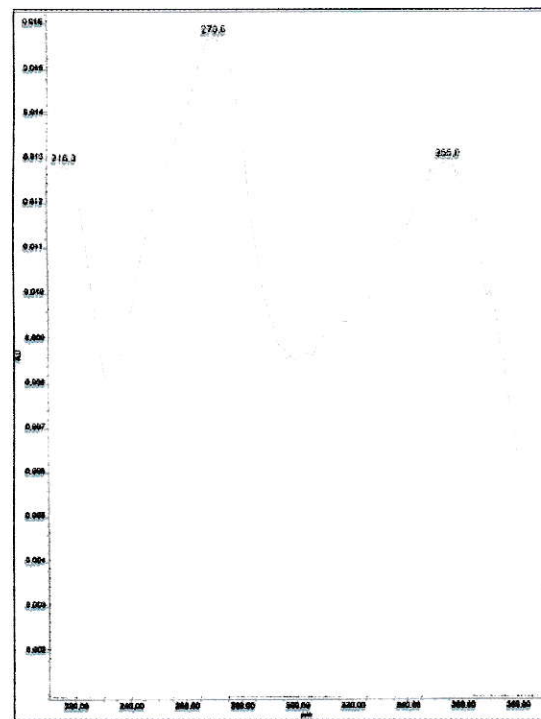


Figura 16
*Espectro de absorción
 medido 3 días después, a 4°C*

Las bandas de absorción aproximadas a 216 – 270 y 355 nm, presentes en los espectros de las figuras 13, 15 y 16, corresponden a los grupos cromóforos presentes en la molécula de OTC. Siendo el pH de trabajo igual a 4 y de acuerdo a los valores de pKa de OTC (Qiang y Adams, 2004), la especie predominante de OTC se presenta en la figura 17.

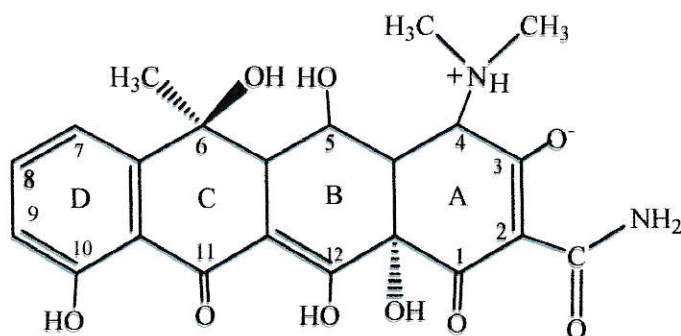


Figura 17.- Especie predominante de OTC a pH 4 (se mantiene la designación con letras A, B, C y D de los anillos fundidos de OTC, de acuerdo a referencia Qiang y Adams, 2004)

De acuerdo a la figura 17, el anillo D de OTC es un fenol cuya absorción en el UV estaría próxima a los 216 nm. El sistema cetona α, β insaturada entregaría una banda de absorción próxima a los 270 nm. Ahora bien, la carga negativa en $C_3 - O^-$ puede sufrir deslocalización a los sistemas conjugados en el anillo A, formando tres estructuras resonantes, sistemas que desplazarían el máximo de absorción hacia una longitud de onda mas larga, por lo tanto la banda a 355 es asignable a este sistema. La figura 18 muestra las estructuras resonantes de OTC a pH 4.

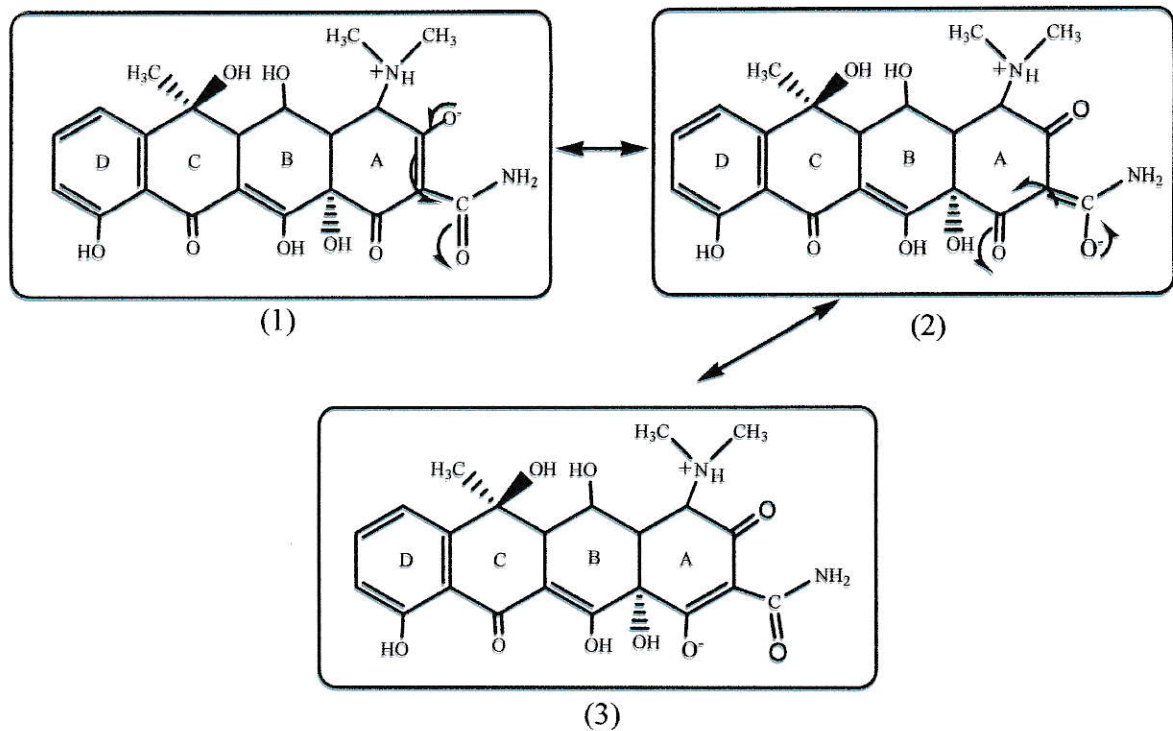


Figura 18.- Estructuras resonantes de OTC a pH 4.

Finalizado este estudio es posible afirmar que la estabilidad de OTC se ve afectada en condiciones ambientales, ya que las bandas de absorción fueron variando en el tiempo, además de apreciar nuevas señales a distintos tiempos de retención. Sin embargo, a 4 °C y protegida de la luz la estabilidad se mantuvo al menos por tres días. Por lo tanto es preciso ajustar estas condiciones para una determinación óptima (muestras cubiertas con papel aluminio para evitar el contacto con la luz, manteniendo la temperatura lo más cercana a 4°C en cada etapa de extracción).

3.2. Ajuste de fase móvil

Se realizaron pruebas con distintos solventes (orgánicos y acuosos) y en distintas proporciones (Ver Tabla 6). Se utilizó como estándar de prueba una solución OTC 3 mg/L.

Tabla 6.- Fases móviles de prueba (% v/v)

Fase Móvil	MeOH	ACN	Acido Acético (0,01M)	Agua	Acido Oxálico (0,01M)	Acido Orto fosfórico (0,001M)
1	30	-	-	-	70	-
2	20	-	-	-	80	-
3	20	30	-	-	50	-
4	-	24	-	-	-	76
5	-	15	-	-	-	85
6	-	50	1	49	-	-
7	-	70	1	29	-	-
8	-	65	1	34	-	-
9	-	75	1	24	-	-
10	-	50	2	48	-	-
11	-	40	57	3	-	-

De todas las pruebas realizadas, la fase móvil con mejores resultados fue la N°5, compuesta por una mezcla 15:85 de ACN/H₂PO₄, mostrando un tiempo de retención de 3 min y con una señal bien definida.

3.3. Metodología de análisis

3.3.1. Curvas de calibración

Se ensayaron curvas de calibración en distintos solventes (MeOH, MeOH/EDTA-Buffer pH 4, MeOH/Buffer, MeOH/H₂O desionizada), las que no mostraron un comportamiento lineal ($R^2 < 0,8$). Sin embargo, utilizando fase móvil seleccionada previamente para aforar los estándares se logró establecer la linealidad de la curva ($R^2 < 0,996$).

La curva de calibración fue medida por triplicado, graficando los valores promedio de áreas correspondientes a cada estándar. La tabla 7 presenta las áreas promedio a cada concentración, el límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla 7.- Datos de la curva de calibración de OTC

Concentración (mg/L)	Á (µV/seg)
0,05	<LD
0,1	3584
0,5	4682
1	10871
3	21226
5	35806
LD (mg/L)	0,077
LC (mg/L)	0,257

La ecuación de la curva de calibración es:

$$Y = 6538,74 X + 2679,42 \quad (3.3.1.a)$$

donde m = pendiente = 6538,74; n = intercepto = 2679,42; y el factor de correlación es de 0,996.

A continuación la figura 19 y 20 muestran el cromatograma y espectro de absorción de un punto de la curva de calibración.

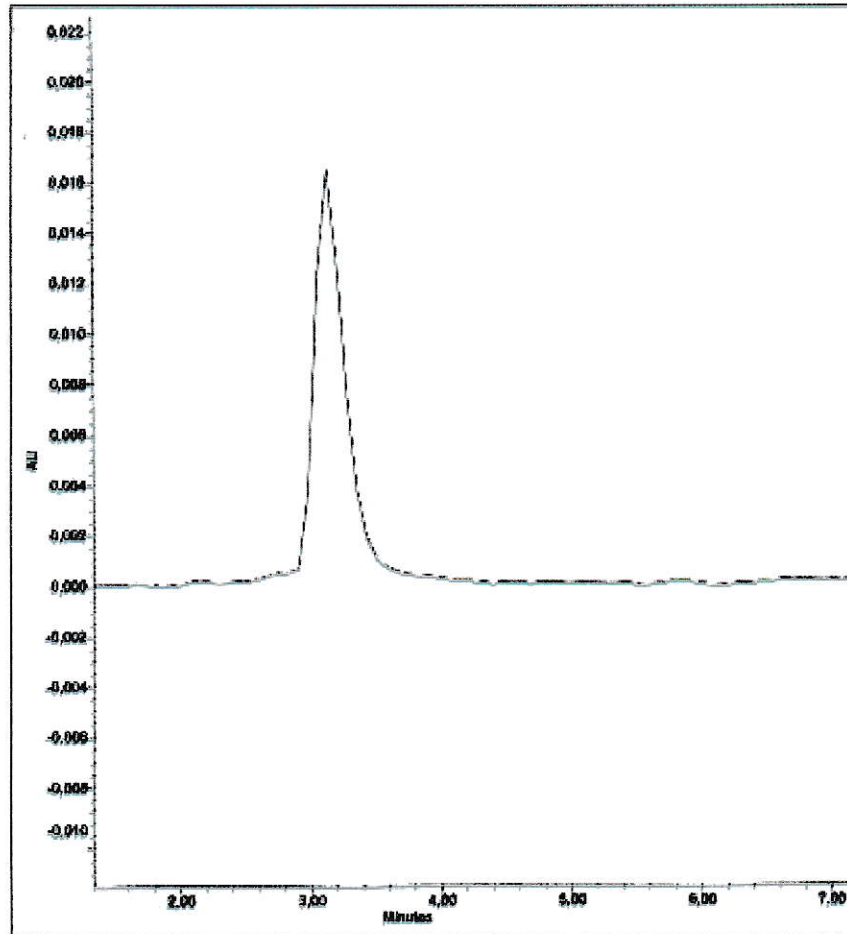


Figura 19.- Cromatograma estándar de OTC de 3 mg/L, obtenido a 260 nm.

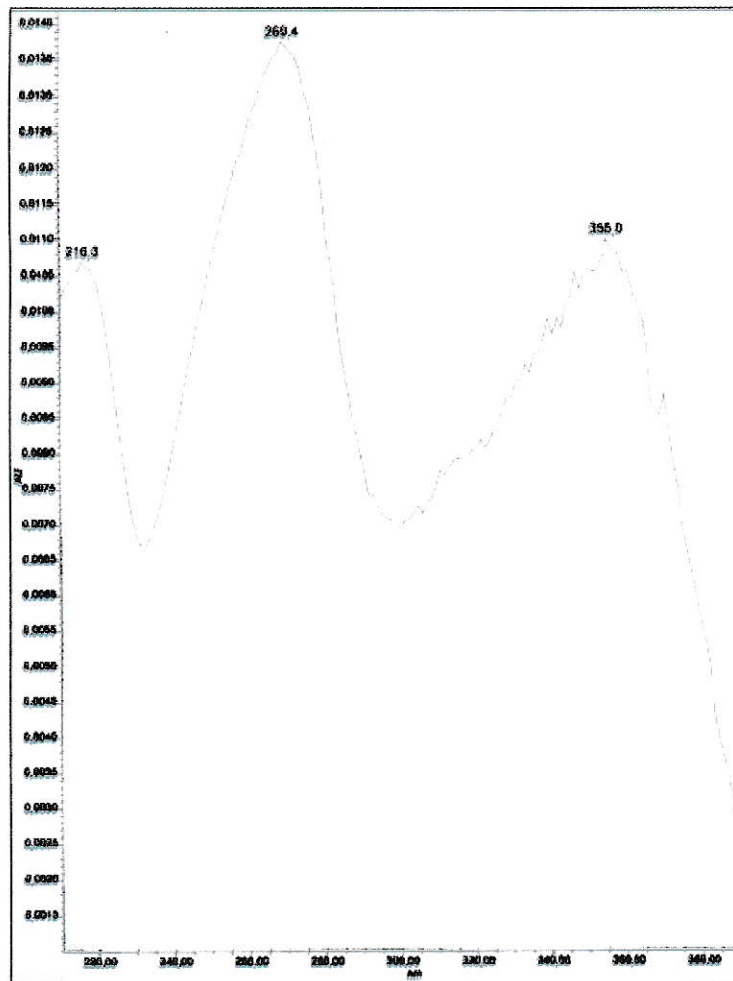


Figura 20.- Espectro de Absorción estándar de OTC 3 mg/L.

El cromatograma y espectro de absorción del estándar de OTC 3 mg/L de la curva de calibración fueron presentados para describir el comportamiento de este antibiótico, el cual se mantuvo en todos los puntos de la curva.

3.3.2. Eficiencia de la extracción de OTC desde sedimentos marinos.

La eficiencia de la extracción se evaluó en base a la recuperación de OTC desde muestras de sedimento marino. Las pruebas de extracción realizadas serán presentadas en tres etapas de acuerdo al resumen de la Figura 21.

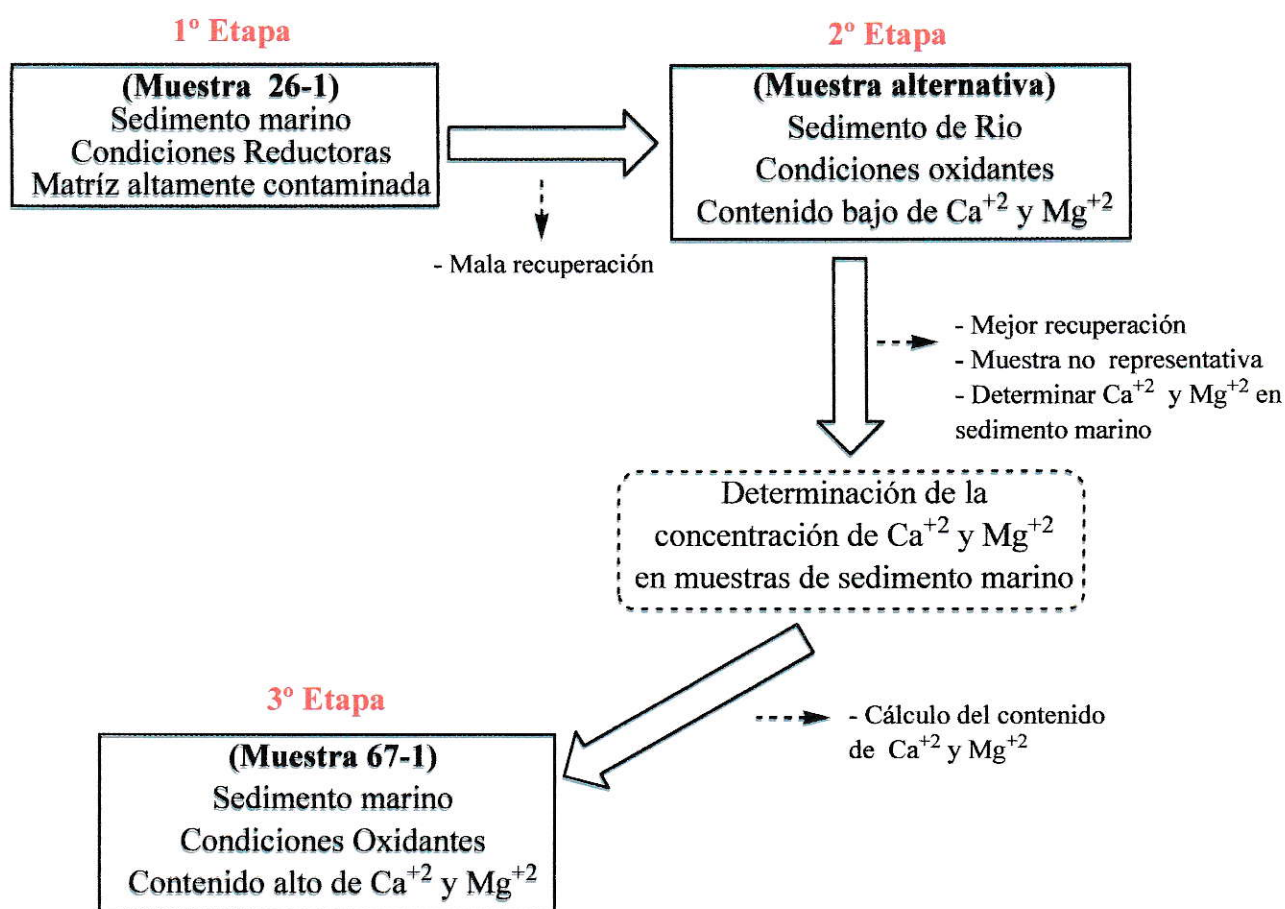


Figura 21.- Resumen de etapas para optimización de la recuperación de OTC.

- Primera Etapa

En el transcurso de este trabajo se evaluaron tres extractantes, todos con modos de acción diferente sobre el complejo de OTC en el sedimento. En primer lugar, Na₂ EDTA-Buffer Mcllvaine pH 4, con la función específica de ocupar el lugar OTC en el sedimento, formando un complejo de mayor estabilidad (Arias y Col., 2005; Pouliquen y Col., 1992); en segundo lugar, Buffer Mcllvaine pH 4 para evaluar la biodisponibilidad de OTC a este pH; y en tercer lugar, MeOH induciendo la ruptura de las interacciones de OTC en el sedimento por disolución en solvente orgánico.

En una primera instancia, los resultados mostraron porcentajes de recuperación muy bajos, encontrando en algunos casos muestras sin recuperación. Los valores de recuperación oscilaron entre 0 y 13% (ver Tabla 8), siendo estos valores inaceptables para la propuesta de un método analítico.

Tabla 8.- Primeros resultados de % recuperación de OTC.

Sedimento enriquecido	Volumen de Estándar OTC adicionado (µL)	[] OTC (mg/L)	Extractante	% de Recuperación
26-1	200	100	Na ₂ EDTA Buffer Mcllvaine pH4	12,3
26-1	200	5	Na ₂ EDTA Buffer Mcllvaine pH4	8,1
26-1	200	5	Buffer Mcllvaine pH4	1,2

Utilizando como extractante solvente orgánico (MeOH), las recuperaciones fueron inferiores al 1%, por lo tanto no son considerados en este trabajo.

Las bajas recuperaciones, en este caso, podrían estar altamente influenciadas por las características reductoras (redox negativo) de esta muestra en particular. Esta muestra fue escogida considerando que, para los estándares actuales de cumplimiento ambiental de la industria del salmón, un sitio con condiciones reductoras es clasificado como contaminado. Además, la concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} en la muestra 26-1 no fue determinada.

- Segunda Etapa

Considerando estos factores, se procedió a evaluar otra muestra con condiciones oxidantes (redox positivo) y tomando en cuenta sus contenidos de Ca^{+2} y Mg^{+2} , considerando el rol de estas especies en la formación de complejos con Na_2EDTA .

Se dispuso de un sedimento de río alternativo, no perteneciente a las zonas en estudio y por lo tanto 100% seguros de la ausencia de antibiótico. La composición química de este sedimento es presentada en la Tabla 9.

Tabla 9.- Composición química de sedimento alternativo

	pH	% M.O.	Eh (mV)	Ca^{+2} (mg/kg)	Mg^{+2} (mg/kg)
Sedimento alternativo	7,8	0,5	147,7	24,6	1,4

Las pruebas de recuperación en esta ocasión mejoraron, llegando a una recuperación de 35,6%. Sin embargo, estos resultados no aseguran representatividad en las muestras, ya que la matriz de sedimento de río difiere bastante de una matriz de

sedimento marino (geomorfología, clima, profundidad, características internas de la matriz, etc.). Es necesario probar la recuperación en un sedimento marino de composición químicas similar al sedimento alternativo.

- Tercera Etapa

Considerando lo expuesto anteriormente, se escogió una muestra de sedimento marino con condiciones oxidantes y con alta concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} . La Tabla 10 muestra el resultado de las concentraciones de Ca^{+2} y Mg^{+2} obtenidas en las muestras de sedimento marino.

Tabla 10.- Concentración de Calcio y Magnesio en muestras de sedimentos marinos.

Zona	Muestra	Ca^{+2} [] mg/kg	Mg^{+2} [] mg/kg
Reloncaví	11_2	33,8	27,5
	20_2	21,7	48,8
Calbuco	36-2	12,3	27,4
	67-1	55,9	60,81
Castro	78-1	6,6	18,62
	83-1	7,8	15,83
Quellón	126-1	6,8	18,01
	144-1	22,2	64,5

La muestra de sedimento marino seleccionada para las pruebas de recuperación fue la **67-1**. Sus características y composición química son presentadas en la Tabla 11.

Tabla 11.- Parámetros de muestra de sedimento marino escogida.

Muestra de sedimento	pH	% M.O.	Eh (mV)	Ca⁺² (mg/kg)	Mg⁺² (mg/kg)
67 - 1	7,4	2,4	160	55,9	60,81

Por otra parte, la necesidad de optimizar el método de extracción, llevó a aumentar los tiempos de agitación, sonicado y centrifugación en el proceso de extracción, estableciendo finalmente las condiciones descritas en el punto 2.4.4.

La tabla 12 presenta un resumen con los resultados obtenidos con la muestra 67-1.

Tabla 12.- Resultados con la muestra 67-1.

Sedimento enriquecido	Volumen Estándar OTC adicionado (µL)	[] de OTC adicionado (mg/L)	Extractante	Å (mV/seg)	[]* (mg/L)
67-1	500	20	Na ₂ EDTA-Buffer Mcllvaine pH4	62464,3	9,14
67-1	500	20	Buffer Mcllvaine pH 4	27703,1	3,83

* La concentración de las muestras fue calculada reemplazando las áreas en la ecuación 3.3.1.a. de la recta de la curva de calibración.

Para calcular el % de recuperación se utilizó la ecuación 2.4.6.c. Los resultados son presentados en la Tabla 13.

Tabla 13.- Resultados de % recuperación con la muestra 67-1.

Sedimento enriquecido	Extractante	% de Recuperación
67-1	EDTA/Buffer Mcllvaine pH4	45,7
67-1	Buffer Mcllvaine pH 4	19,1

Este resultado dejó en evidencia que tanto la composición química, como un mayor tiempo en las etapas de extracción son determinantes para mejorar la recuperación. Una mayor concentración de cationes metálicos y un potencial redox intermedio en el sedimento marino pueden estar favoreciendo la quelación de OTC, evitando su pronta descomposición.

Por otra parte, es probable que la prolongación de los tiempos en las etapas de extracción haya permitido una mayor interacción del extractante con la matriz, favoreciendo la liberación de OTC a la solución.

La Figura 22 y 23 muestran el cromatograma y espectro de absorción de la muestra 67-1 extraída con Na₂EDTA-Buffer Mcllvaine pH 4 (Ver tabla 13). El cromatograma de la muestra recuperada (fig. 22) presenta una señal con tiempo de retención 3,18 min; y el espectro de absorción (fig. 23) presenta máximos en 216,3, 269,4 y 355,0 nm. Al comparar estos valores con los del estándar de OTC 3 mg/L ($t_R = 3,2$ min; $\lambda_{max} = 216,3 - 269,3 - 355,0$) es posible afirmar que efectivamente la muestra recuperada corresponde a OTC.

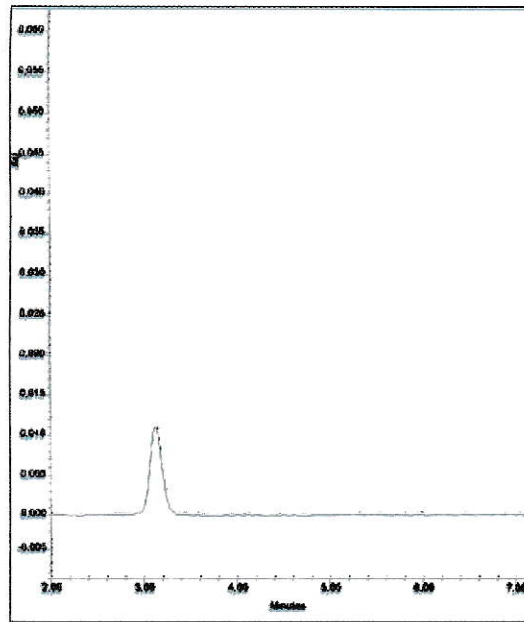


Figura 22.- Cromatograma muestra 67-1 recuperada.

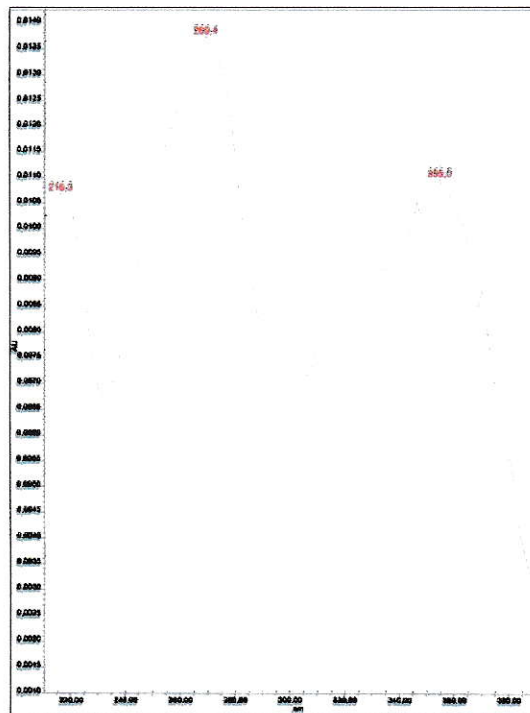


Figura 23.- Espectro de absorción muestra recuperada de OTC.

3.3.3. Extracción de muestras de sedimentos marinos

Las cinco muestras de cada zona seleccionadas (Ver Anexo, tabla 17) fueron extraídas y medidas siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.4.4.

Sabiendo que, el estándar de OTC tiene un tiempo de retención promedio de 3,1 min y su espectro de absorción muestra máximos aproximados en 216, 270 y 355 nm, se hace un análisis comparativo de los datos en muestras de sedimento marino. Los resultados de las muestras son presentados en las tablas a continuación.

Tabla 14a.- Muestras de sedimento marino en Reloncaví

Muestra	t_R (min)	λ_{max} de absorción (nm)
5-2	0,97	262,3
	2,96	254
	4,74	219,9 - 367,9
10-2	1,01	250,5
	4,35	286,0 - 332,3 - 351,4 - 384,7
	5,12	231,6 - 276,5 - 307,5
16-3	0,99	255,2
	1,25	263,5 - 333,5 - 360,3 - 376,3
	4,35	286,0 - 338,0 - 360,3 - 382,3
	5,15	229,3 - 284,8 - 307,3
20-2	1,03	257,6
	4,47	219,9 - 284,8 - 346,6 - 366,7
	5,27	231,6 - 282,4 - 303,8 - 320,4
24-2	1,02	255,2
	4,36	284,8 - 337,1
OTC – 3 mg/L	3,1	216,3 - 269,3 - 355,0

Tabla 14b.- Muestras de sedimento marino en Calbuco

Muestra	t_R (min)	λ_{max} de absorción (nm)
30-1	0,989	256,4
	1,553	256,4
	4,424	275,3 - 352,6 - 365,5
36-2	1,014	249,3
	1,291	265,8 - 320,4 - 350,2 - 371,5
48-2	4,586	223,4 - 271,7 - 287,1 - 345,4 - 371,5
63-1	1,008	255,2
67-1	1,424	255,2
OTC – 3 mg/L	3,1	216,3 - 269,3 - 355,0

Tabla 14c.- Muestras de sedimento marino en Castro

Muestra	t_R (min)	λ_{max} de absorción (nm)
78-2	1,315	211,6 - 324,0 - 339,5 - 356,4
83-1	1,035	256,1
96-2	1,024	254,0
	1,148	256,4
101-3	1,024	254
	1,374	264,6 - 376,3
116-1	4,825	223,4 - 280,0 - 341,9 - 370,3
	5,845	256,1 - 333,2
	6,308	226,9 - 270,6 - 322,8 - 373,9
OTC – 3 mg/L	3,1	216,3 - 269,3 - 355,0

Tabla 14d.- Muestras de sedimento marino en Quellón

Muestra	t_R (min)	λ_{max} de absorción (nm)
126-1	0,978	259,9
	1,505	258,7
133-1	1,041	259,9
	3,758	255,2
	4,794	254,0 - 286,0 - 344,3 - 370,3
	5,529	221,0 - 284,8 - 371,5 - 384,0
144-1	1,014	256,4
	1,328	212,48 - 264,6 - 349,0 - 371,5
	3,054	255,2
	3,277	223,4 - 276,5
	5,354	221,0 - 282,4 - 366,7
152-1	1,032	255
	4,947	223,4 - 286,0 - 369,1
160-1	1,036	254
OTC – 3 mg/L	3,1	216,3 - 269,3 - 355,0

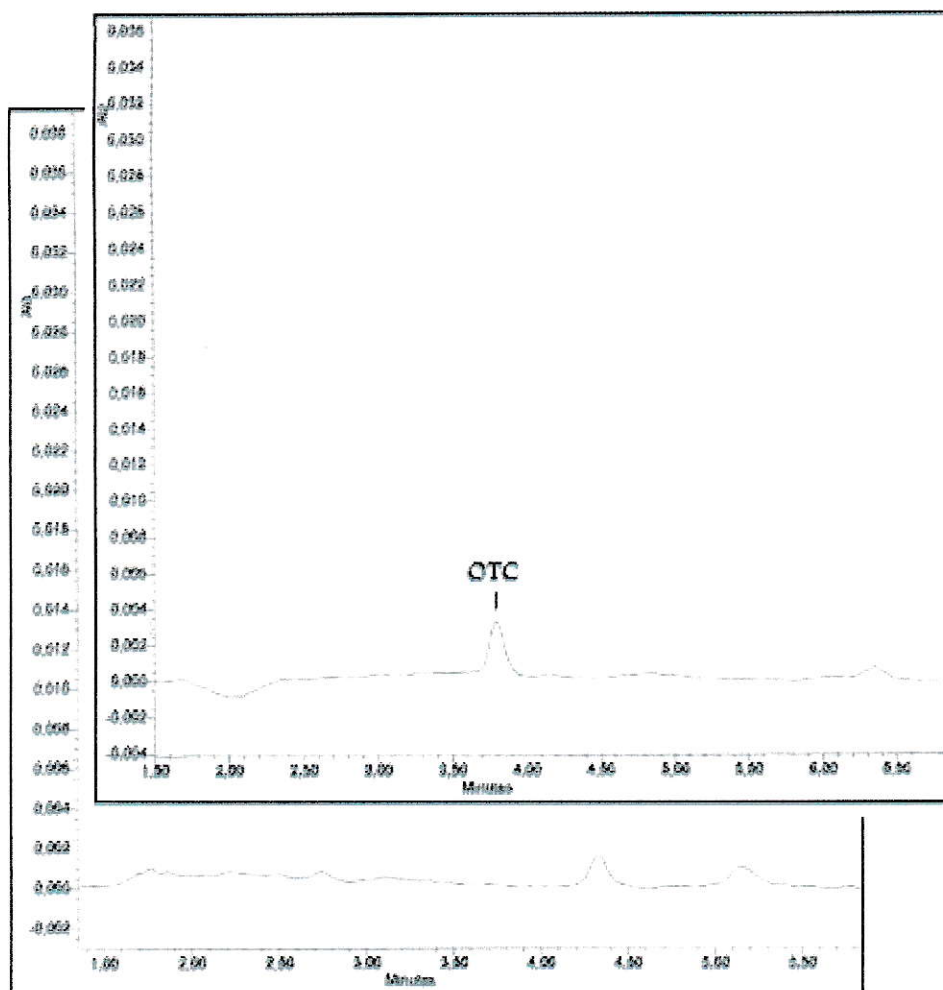
De acuerdo a los resultados expuestos en las 4 tablas anteriores, fue posible afirmar, por comparación de datos de λ_{max} y t_R, que ninguna de las muestras presenta OTC en su forma activa.

Es probable que debido a la inestabilidad de OTC, esta se encuentre modificada estructuralmente o como antibiótico descompuesto, lo que explicaría la presencia de máximos de absorción similares a los de OTC en algunas muestras (16-3, 144-1 y 152-1; tablas 14a y 14d); y en otros casos bandas que no siguen este patrón, pero muestran al menos un máximo bien definido (muestras 24-2 y 101-3; tabla 14a y 14c).

Por otra parte, debido a que la matriz del sedimento marino es muy compleja, existe la posibilidad de extraer otro tipo de compuestos orgánicos (por ejemplo, sustancias húmicas), que absorben en el UV. Una forma de afirmar o descartar la presencia de antibiótico en otro estado es analizando los compuestos de degradación o bien especies estructuralmente modificadas, prueba que no fue realizada en este trabajo.

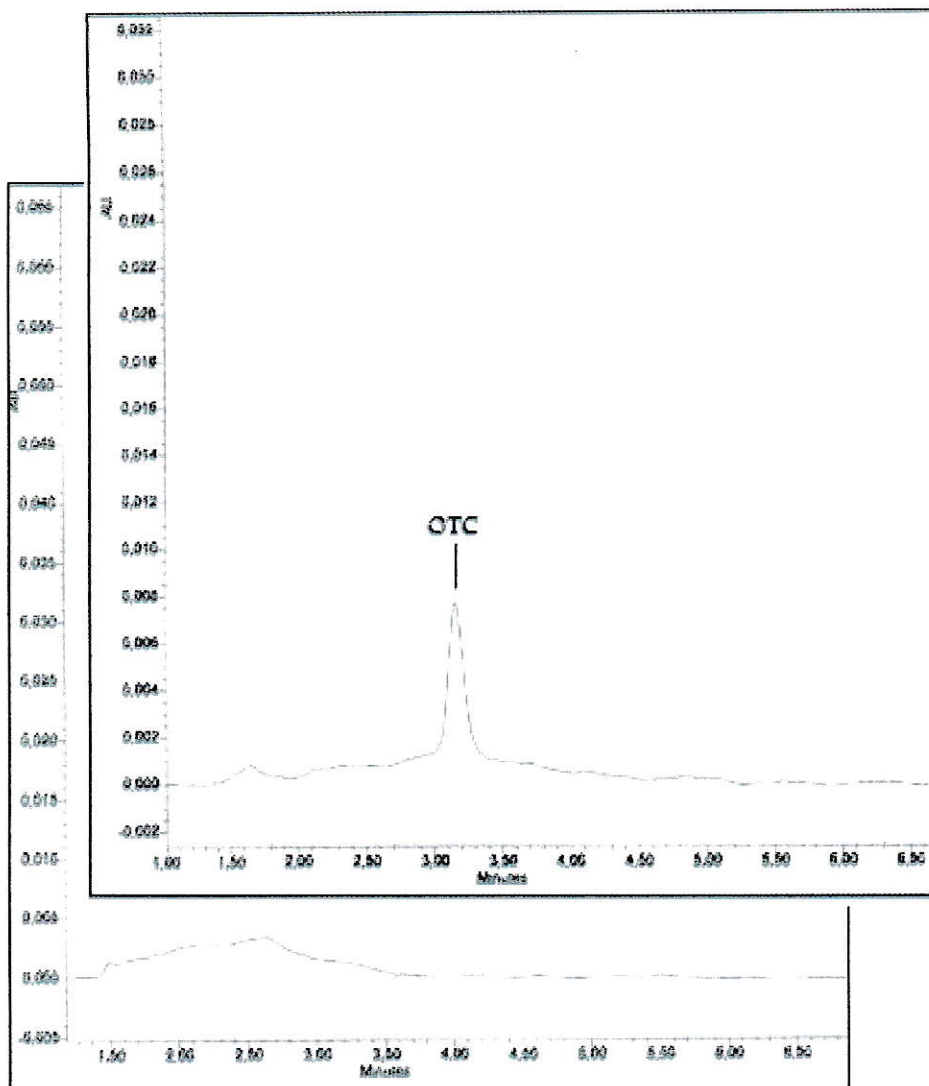
Las figuras 24, 25, 26 y 27 muestran un cromatograma de una muestra de sedimento marino de cada zona, donde se comprueba la ausencia de OTC. Además, para mayor claridad de lo expuesto en el párrafo anterior, se realizaron coinyecciones de 500 μ L de estándar de OTC 3 mg/L a las muestras.

Figura 24.- Cromatogramas comparativos; 16-3 v/s 16-3/coinyección 3 mg/L OTC.



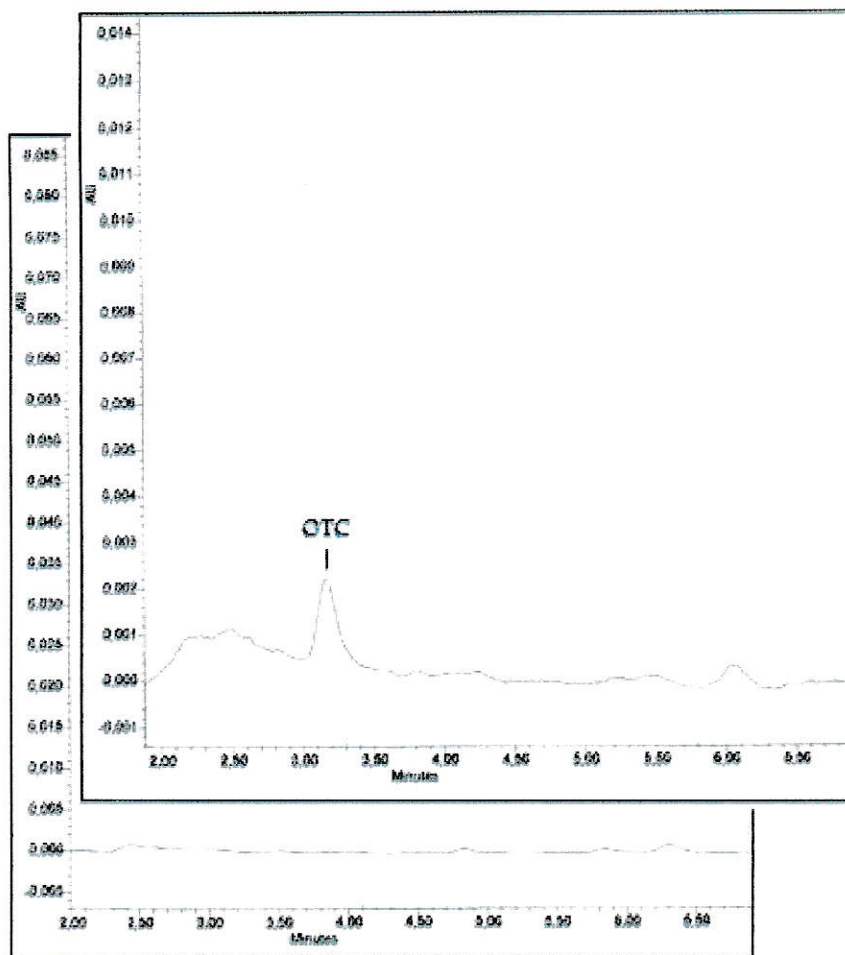
El cromatograma inferior presenta 2 señales en 4,3 y 5,1 min. Al comparar los máximos de absorción y los tiempos de retención de ambas señales con los datos de un estándar de OTC de 3 mg/L (Tabla 14a) es posible confirmar la ausencia de OTC en su forma activa en el sedimento marino. Este resultado es corroborado mediante la coinyección de un estándar de OTC 3 mg/L a la muestra 16-3 (cromatograma superior) donde aparece la señal de OTC a un t_R de 3,8 min.

Figura 25.- Cromatogramas comparativos; 67-3 v/s 67-3/coinyección 3 mg/L OTC



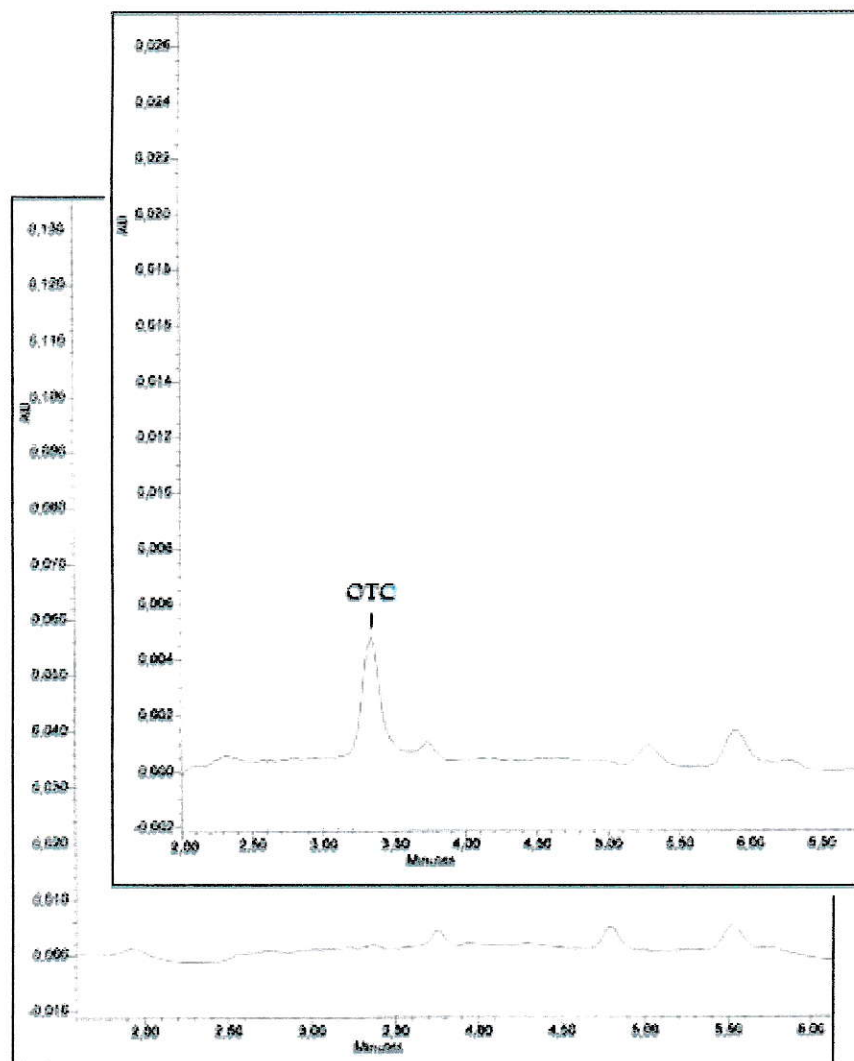
El cromatograma inferior no presenta señal correspondiente a OTC y ningún otro tipo de señal. Para confirmar la ausencia de OTC en la muestra se coinyectó un estándar de OTC 3 mg/L, cuya señal se observó claramente en el cromatograma superior.

Figura 26.- Cromatogramas comparativos; 116-3 v/s 116-3/coinyección 3 mg/L OTC.



Este caso muestra un resultado similar a la muestra 16-3. El cromatograma de la muestra 116-3 (inferior), presenta 3 señales en 4,8, 5,8 y 6,3 min respectivamente. Al comparar tiempos de retención y máximos de absorción con un estándar de OTC 3 mg/L es posible confirmar la ausencia de OTC en su forma activa. La coinyección de un estándar de OTC (cromatograma superior) corroboró la ausencia de antibiótico en la muestra 116-3.

Figura 27.- Cromatogramas comparativos; 133-1 v/s 133-1/coinyección 3 mg/L OTC.



El cromatograma de la muestra 133-1 muestra 3 señales claras en 3,7, 4,7, 5,5 min respectivamente. A simple vista la señal en 3,7 min podría corresponder a OTC, pero esta posibilidad es descartada al comparar los máximos de absorción de esta señal con los valores de OTC coinyectada en la muestra 133-1 (Cromatograma superior), donde se confirmó que no son equivalentes.

3.3.4. Detección de OTC por TLC-RP

Para verificar si era posible detectar OTC por TLC-RP se utilizó un estándar de OTC 1000 mg/L (Solución Stock A; ver 2.4.1), prueba usada también para ajustar el solvente de elución, en la obtención de un buen Rf.

Una vez desarrolladas las placas el revelado fue hecho bajo lámpara UV a 260 nm y el análisis comparativo fue llevado a cabo mediante los valores de Rf de cada una de las muestras. El resultado de esta prueba es presentado en la figura 28.

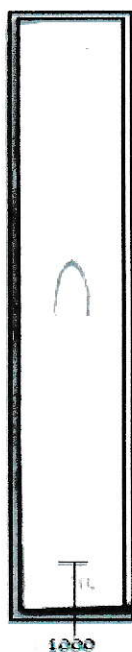


Figura 28.- Placa cromatográfica de estándar de OTC 1000 mg/L.

De acuerdo a la figura 28 se confirmó que es posible detectar OTC a través de este método. Ahora bien, el uso de MeOH como eluyente para el desarrollo de las placas cromatográficas, entregó un buen resultado de Rf (Rf aproximado a 0,5).

Suponiendo que la cantidad de OTC presente en los sedimentos fuera mucho menor a 1000 mg/L, es necesario establecer qué tan sensible es este método y definir hasta que concentración será posible detectar. Para esto se desarrolló una placa con estándares de OTC en 5 concentraciones distintas (100, 50, 30, 20 y 10 mg/L). Los resultados de esta prueba se presentan en la figura 29.

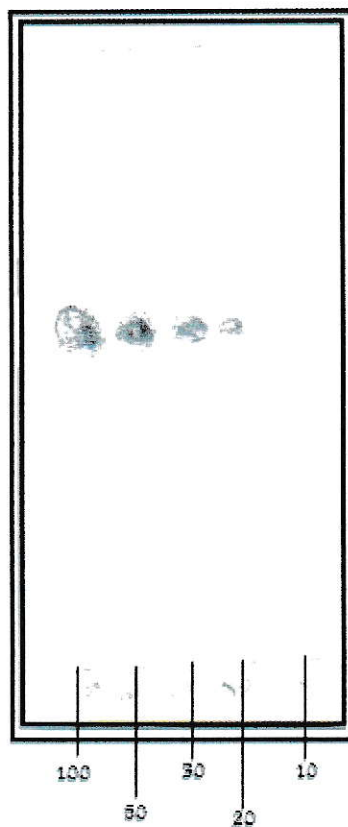


Figura 29.- Placa cromatográfica de estándares de OTC 100, 50, 30, 20 y 10 mg/L

El R_f que presentan las muestras de OTC es de 0,5. Ahora bien, este análisis permitió establecer que mediante este método solo será posible detectar concentraciones iguales o superiores a 20 mg/L.

A continuación se llevó a cabo el análisis de 20 muestras seleccionadas de sedimento marino (Ver Anexo, tabla 17). En las placas cromatográficas fue agregado también un estándar de 20 mg/L de OTC, para el análisis por comparación de Rf. Esta prueba se realizó por duplicado, estudiando en segunda instancia las 13 muestras que en la primera prueba revelaron compuesto. Los resultados son presentados en la figura 30 y 31.

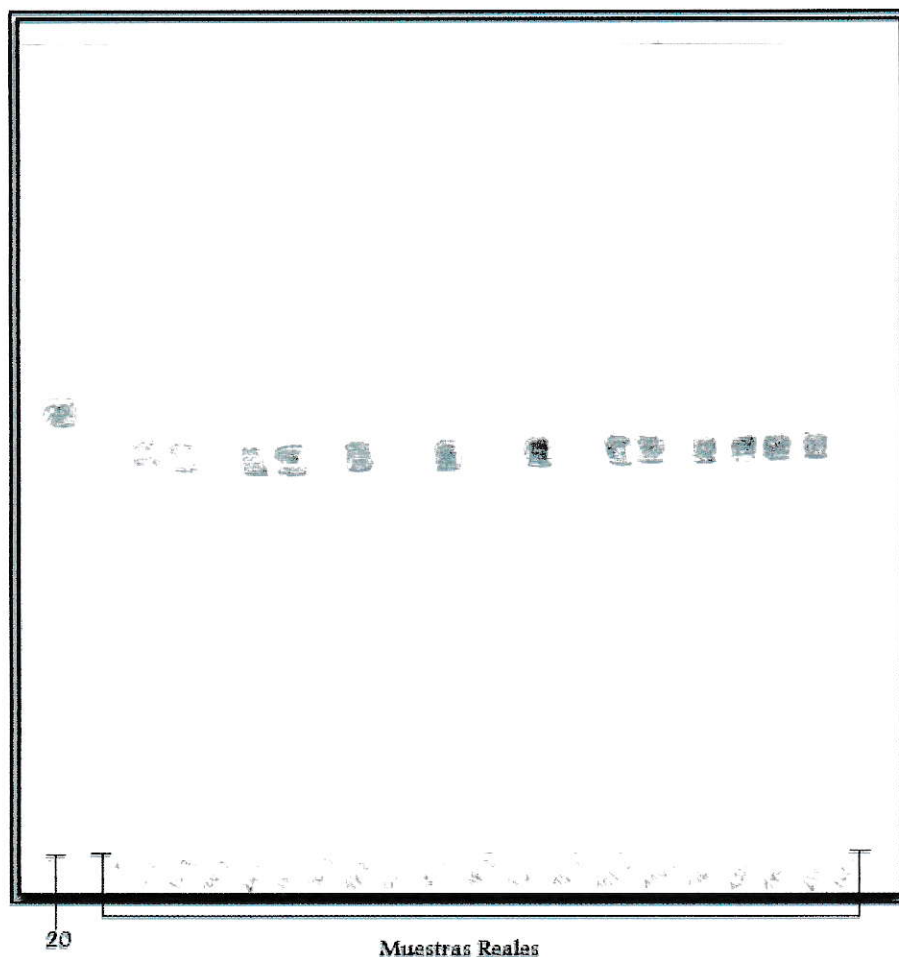


Figura 30.- Placa cromatográfica de 20 muestras de sedimento marino y estándar de OTC 20 mg/L.

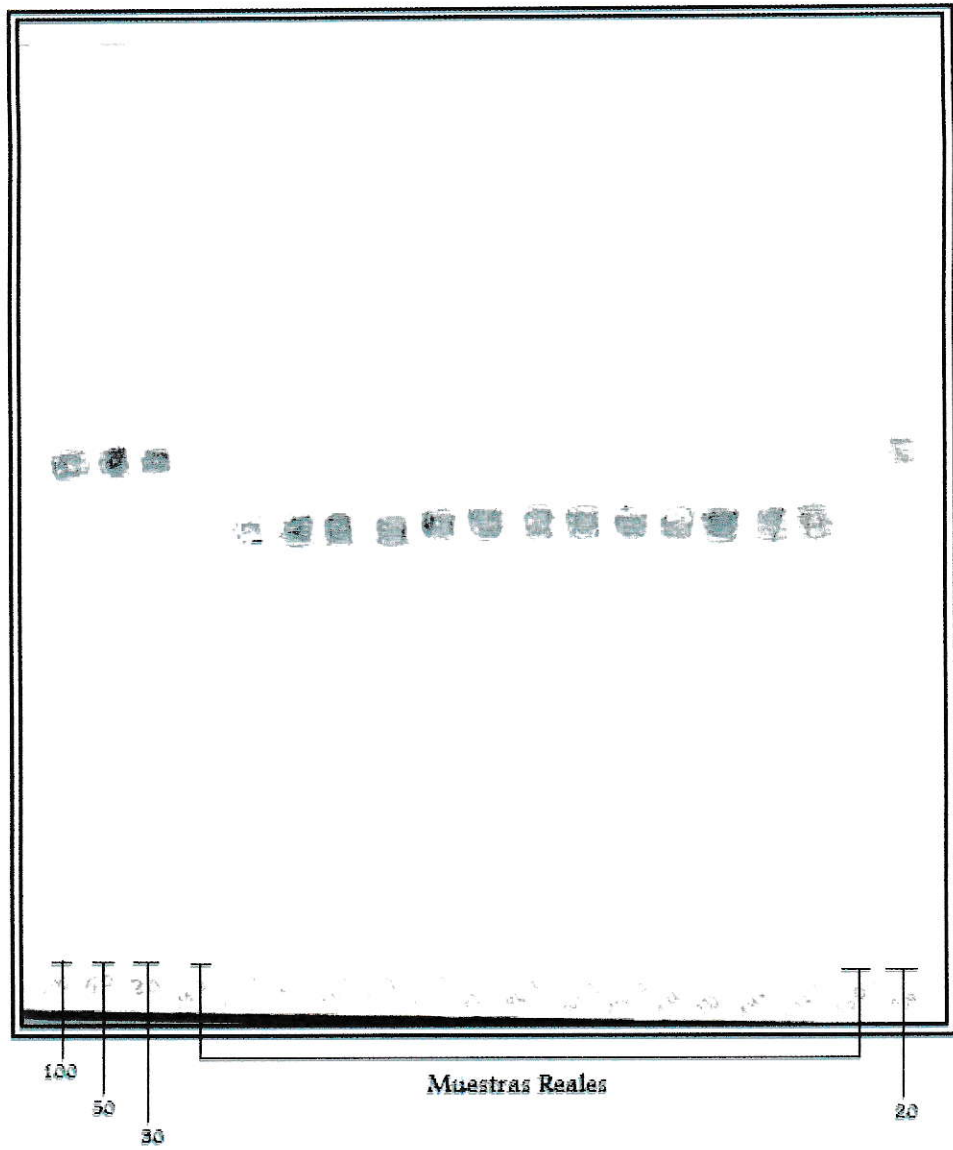


Figura 31.- Placas cromatográfica de 13 muestras de sedimento marino y Estándares de OTC 10, 50, 30 y 20 mg/L.

La Tabla 15 presenta los valores de Rf de las 13 muestras que revelaron un determinado compuesto, además de los valores de Rf de cada uno de los estándares.

Tabla 15.- Valores de Rf en muestras de sedimento marino y estándares de OTC.

Muestra	Rf
10-2	0,48
16-2	0,49
24-1	0,48
30-1	0,48
48-2	0,48
67-1	0,48
83-1	0,48
101-3	0,48
116-3	0,48
126-1	0,48
133-1	0,48
144-1	0,48
152-1	0,48
OTC-100 mg/L	0,55
OTC-50 mg/L	0,55
OTC-30 mg/L	0,55
OTC-20 mg/L	0,55

En primer lugar, al observar las placas (Figura 30 y 31) fue posible notar que las manchas correspondientes a los estándares de OTC se encontraban sobre el resto de las manchas reveladas, por lo tanto el compuesto detectado en las muestras no corresponde a OTC. Este resultado fue corroborado al comparar los valores de Rf de OTC con el resto de muestras, los cuales difieren notablemente.

Es muy probable que el compuesto desconocido detectado corresponda a una especie descompuesta de OTC, o bien a un compuesto orgánico propio del sedimento marino.

Finalmente el Screening por placa fina permitió detectar y descartar, de manera cualitativa la presencia y ausencia de OTC en concentración mayor o igual a 20 ppm, en las 20 muestras de sedimento marino seleccionadas.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo mostraron que los objetivos planteados en un comienzo, fueron logrados prácticamente en su totalidad. De acuerdo a esto, es posible plantear las siguientes conclusiones:

- 1) Las pruebas de estabilidad de OTC, en condiciones ambientales (Luz de día a 20°C) y bajo refrigeración (4°C), mostraron que OTC es inestable en condiciones ambientales, sin embargo mantiene su estabilidad a 4°C y cubierta de la luz. Esta prueba permitió establecer condiciones óptimas de trabajo.
- 2) El estudio previo de fase móvil permitió definir la composición y los tipos de solventes que entregaron los mejores resultados en los cromatogramas ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$ - 85:15 v/v), es decir una señal en un tiempo de retención razonable, sin interferentes y con buena resolución.
- 3) El estudio de recuperación de OTC mostró que, entre los 3 sistemas de extracción probados ($\text{Na}_2\text{EDTA}/\text{Buffer}$ Mcllvaine pH 4; MeOH y Buffer Mcllvaine pH 4) el de mejor resultados fue Na_2EDTA con amortiguador Mcllvaine pH 4. Sin embargo, al final del trabajo se comprobó que el método no es altamente efectivo, ya que la recuperación de OTC llegó a un 45,7%.

- 4) El análisis a las muestras de sedimento marino reveló que, ninguna de ellas presentaba OTC en su forma activa. Sin embargo, fueron detectadas otras señales en el cromatograma, las cuales pueden corresponder a OTC degradada, modificada estructuralmente, o bien a otro tipo de antibiótico.

- 5) De acuerdo a las características físicas y químicas medidas al momento del muestreo, es posible afirmar que las muestras presentan un alto grado de descomposición (fuerte olor a H₂S, Bajo contenido de M.O. y potenciales redox extremos), lo cual favorecería la degradación de OTC.

- 6) La ausencia de OTC en los sedimentos marinos no sólo debe atribuirse a la posible degradación de la molécula; la baja recuperación mostró que el método no fue el más adecuado, por lo tanto la detección de OTC en pequeñas concentraciones estará limitada por la baja efectividad del método.

- 7) A través de un Screening por TLC-RP fue posible establecer que, si existiera OTC en los sedimentos marinos, la concentración debe ser inferior a los 20 mg/L, pues la sensibilidad de este método permitía detectar sólo concentraciones de OTC iguales o superiores a los 20 mg/L. Sin embargo, este método permitió detectar un compuesto desconocido de menor polaridad que OTC, el cual debiera ser detectado por HPLC-PDA.

- 8) Considerando las enormes cantidades de antibiótico adicionados cada año (400.771 toneladas el año 2008) en CES y que aproximadamente un 70% del fármaco termina depositado en los sedimentos marinos, descartar que si existiera OTC como droga activa su concentración debe ser inferior a los 20 mg/L, podría considerarse un resultado positivo en términos Ambientales.
- 9) Finalmente debido a los riesgos que conlleva el uso intensivo de fármacos es necesario que se determine, mediante estudios amplios y detallados, la relevancia de los hallazgos presentados, tanto para la salud humana, como también para el medioambiente.

V. RECOMENDACIONES

Para el futuro desarrollo de un método cromatográfico analítico, capaz de cuantificar OTC en sedimentos marinos, es fundamental obtener una buena recuperación y asegurar que el método sea representativo. Para la optimización del método es pertinente hacer las siguientes recomendaciones:

1. Realizar pruebas prolongando los tiempos en cada etapa de extracción.
2. Probar la recuperación a distintas concentraciones de Na₂EDTA/Buffer McIlvaine pH 4.
3. Probar el método en pH cercano a la neutralidad (pH medido en aguas en cada punto de muestreo) y así estudiar la biodisponibilidad de OTC en estas condiciones.
4. Optar por un extractante alternativo, que presente características similares a Na₂EDTA.
5. Disponer de compuestos derivados de OTC y estar en conocimiento de sus productos de degradación, para un mejor análisis comparativo.

Por otra parte, además de suponer que, la ausencia de OTC se debe a descomposición o bien transformaciones estructurales en el sedimento marino, es importante no descartar otros procesos físicos como solubilización en la columna de agua o dispersión por corrientes, los cuales pueden explicar la total ausencia en estudios posteriores.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

J. D. Álvarez R., Claudia P. Agüero, Ana M. Álvarez y José Obregón; 2006.

“Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, aguas y sedimentos en Venezuela” Laboratorio de microbiología de peces y crustáceos, INIA-CENIAP.

Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

Arias M., García-Falcón M.S., García-Ríos L., Mejuto J.C., Rial-Otero R. y Simal Gándara J. 2005.

Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalent cations.

J. Food Eng. 78:69-73.

Chopra I. y Rogerts M.

Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 232-60.

M. S. Diaz-Cruz, Maria J. Lopez de Alba, Damià Barceló, 2003

Environmental behavior and analysis of veterinary and human, drugs in soils, sediments and sludge.

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 6

González, E., R. Ahumada, V. Medina, J. Neira, U. González, 2004

Espectrofotometría de absorción atómica con tubo en la llama: aplicación en la determinación total de cadmio, plomo y zinc en aguas frescas, agua de mar y sedimentos marinos”. Quim. Nova, 27

Goth, W. G. Clark, D. Craigbrater, A. R. Johnson, 2001.

Farmacología medica. Masby, 13ª Edición.

Héctor Kol, 2006

Efectos ambientales y económicos de la salmonicultura intensiva sobre la pesca artesanal en Reloncaví, X Región-Chile

Hektoen H, Berge J A, Hormazabal V, Yndestad M., 1995.

Persistence of antibacterial agents in marine sediments.

Aquaculture; 133: 175-84.

Joe Kerry, Maura Hiney, Rosie Coynea, Saoirse NicGabhainn, Deirdre Gilroy, Dave Cazabona, Pete Smith, 1995.

Fish feed as a source of oxytetracycline-resistant bacteria in the sediments under fish farms.

Aquaculture 131: 101-113

F. De Paula, S. Carvalho, H. Duarte, E. Paniago, A. Mangrich, E. Pereira-Maia, 1999.

A physicochemical study of the tetracycline coordination to oxovanadium (IV)

J. of Inorganic Biochemistry 76:221–230

Instituto de investigación agropecuarias (series la platina N°16), 2000

Métodos de Análisis de Suelos – INIA

A. A. MacKay, B. Canterbury, 2005

Oxitetracline Sorption to Organic Matter by Metal-Bridging

Environmental Engineering Program, Univ. Of Connecticut, 261 Glenbrook Rd

Nieto-Zambrano S., 2006

Tetraciclina (TC) adsorption from aqueous solutions

University of Puerto Rico; Mayaguez

Oka H., Ito Y. y Matsumoto H. 2000.

Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods.

J. Chromatogr. A. 882:109-133.

H. Pouliquen, H Le Bris, Louis Pinault, 1992

Experimental study of the therapeutic application of oxytetracycline, its attenuation in sediment and sea water, and implications for farm culture of benthic organisms, Mar.

Ecol. Prog. Ser. Vol. 89: 93-98

Qiang Z. y Adams C., 2004.

Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. Water res. 38: 2874-2890.

Sanchez-Garcia L., 2007

Caracterización geoquímica de sedimentos marinos del golfo de Cádiz e implicaciones ambientales. Distribución y composición molecular de lípidos y formas refractarias de la materia orgánica.

Instituto Geológico y Minero de España

Sernapesca, Servicio nacional de pesca, 2005.

Programa de control de fármacos; Manual de procedimientos sección 1. Programa de control de residuos.

Skoog D., J.J. Leary, 1994.

Análisis instrumental. Mc Graw Hill 4° edición.

S. R. Martin, 1979

Equilibrium and kinetic studies on the interaction of Tetracyclines with calcium and magnesium

Biophysical Chemistry 10 (1979) 319-326

USP, United States Pharmacopeia (USP). 2003.

Veterinary monographs tetracyclines.

<http://www.usp.org/pdf/veterinary/tetracyclines.pdf>.

USP-NF, 2007

United States Pharmacopeia, formulario nacional

VII. ANEXOS

Tabla 16.- Parámetros medidos en terrenos en la columna de agua.

Zona	Muestra y Centro	Profundidad (m)	T (°C)	pH	O ₂ medido (mg/L)	Potencial Rx (mV) Correg v/s ENH
Reloncaví	5-2 / C-2	48,3	11	7,6	0,8	416
	10-2 / C-4	41,4	11,1	7,5	3,5	475
	16-3 / C-7	17,9	11,6	7,6	3,7	441
	20-1 / C-8	43,9	11,5	7,7	2,8	494
	24-1 / C-9	42,9	10,9	7,2	0,5	-5
Calbuco	30-1 / C-10	47,7	11,4	7,6	2,9	165
	36-2 / C-12	39,7	11,6	7,8	4,1	380
	48-2 / C-15	31,7	12,1	7,8	4,3	314
	63-1 / C-20	4,9	13,6	7,9	4,8	330
	67-1 / C-21	32,8	11,9	7,9	4,1	363
Castro	78-2 / C-24	34,2	12,2	7,9	4,4	391
	84-1 / C-25	50	11,9	7,9	4,2	345
	96-2 / C-29	46,7	11,9	7,9	3,7	371
	101-3 / C-30	45	11,8	7,9	3,4	274
	116-3 / C-34	45	11,9	7,9	3,2	317
Quellón	126-1 / C-36	29,6	11,6	7,9	3,8	251
	133-1 / C-38	25,3	11,4	7,9	2,2	127
	144-1 / C-41	36,7	12,3	7,9	4,4	250
	152-1 / C-43	23,7	12,3	7,9	4,4	250
	160-1 / C-45	28,5	11,8	8	4,4	350

Tabla 17.- Parámetros medidos en terrenos en el sedimento marino.

Zona	Muestra y centro	T °C	pH	Potencial Rx (mV) Correg v/s ENH	% M.O.	Apariencia
Reloncaví	5-2 / C-2	48,3	11	7,6	0,8	416
	10-2 / C-4	41,4	11,1	7,5	3,5	475
	16-3 / C-7	17,9	11,6	7,6	3,7	441
	20-1 / C-8	43,9	11,5	7,7	2,8	494
	24-1 / C-9	42,9	10,9	7,2	0,5	-5
Calbuco	30-1 / C-10	47,7	11,4	7,6	2,9	165
	36-2 / C-12	39,7	11,6	7,8	4,1	380
	48-2 / C-15	31,7	12,1	7,8	4,3	314
	63-1 / C-20	4,9	13,6	7,9	4,8	330
	67-1 / C-21	32,8	11,9	7,9	4,1	363
Castro	78-2 / C-24	34,2	12,2	7,9	4,4	391
	84-1 / C-25	50	11,9	7,9	4,2	345
	96-2 / C-29	46,7	11,9	7,9	3,7	371
	101-3 / C-30	45	11,8	7,9	3,4	274
	116-3 / C-34	45	11,9	7,9	3,2	317
Quellón	126-1 / C-36	29,6	11,6	7,9	3,8	251
	133-1 / C-38	25,3	11,4	7,9	2,2	127
	144-1 / C-41	36,7	12,3	7,9	4,4	250
	152-1 / C-43	23,7	12,3	7,9	4,4	250
	160-1 / C-45	28,5	11,8	8	4,4	350