



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

**DISEMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN MATRICES
AMBIENTALES: IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE OXITETRACICLINA Y 4-EPI-OTC EN
SUELOS AGRÍCOLAS**

Lilibeth Ninoska Castillo Zambrano

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

PROFESOR GUÍA: DRA. JAVIERA CORNEJO KELLY
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

PROYECTO COORDINADO DE LA INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (D52041)

SANTIAGO, CHILE
2020

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.- INDUSTRIA PECUARIA	4
2.- EL SUELO, DESTINO DE LOS RESIDUOS	5
3.- CONSECUENCIA DE LA DISEMINACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS AL MEDIO AMBIENTE	6
4.- OXITETRACICLINA, ANTIBIÓTICO DE IMPORTANCIA CRÍTICA.....	7
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN.....	10
2. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	11
3.- IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	11
RESULTADOS	14
1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	14
2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	16
3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3	19
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	37

RESUMEN

En la actualidad, los contaminantes emergentes de mayor impacto ambiental son los fármacos, dentro de los cuales se encuentran los antimicrobianos, siendo la oxitetraciclina (OTC) la más usada en medicina veterinaria. Esta es considerada "de importancia crítica", por su uso como tratamiento para infecciones graves en animales. La OTC llega al ambiente por medio de las heces excretadas al suelo agrícola, las que son utilizadas comúnmente como abono. Su diseminación puede afectar la eficacia de los antibióticos como tratamiento, modificar las poblaciones bacterianas en el ambiente y microbiota de organismos, y favorecer la masificación de genes de resistencia.

En este estudio, se recopilan antecedentes bibliográficos sobre la diseminación de oxitetraciclina y su epímero en suelo. Además, se implementó un método analítico que permitió detectar y cuantificar estos compuestos. Los resultados obtenidos demuestran que es capaz de extraer correctamente la OTC y su epímero, desde suelo, con características de detección lineales. Actualmente no existe un marco regulatorio eficaz de concentración de OTC en suelo, por lo que este trabajo es un inicio para el establecimiento de normas de utilización de antimicrobianos y su correcta administración.

ABSTRACT

At present, the emerging contaminants with the greatest environmental impact are drugs, among which are antimicrobials, with oxytetracycline (OTC) being the most used in veterinary medicine. This is considered "of critical importance", for its use as a treatment for serious infections in animals. OTC reaches the environment through faeces excreted to agricultural soil, which are commonly used as fertilizer. Their dissemination can affect the efficacy of antibiotics as treatment, modify bacterial populations in the environment and the microbiota of organisms, and rising the massification of resistance genes.

In this study, bibliographic antecedents are compiled on the dissemination of oxytetracycline and its epimer in soil. In addition, an analytical method was implemented that allowed the detection and quantification of these compounds. The results obtained show that it is capable of correctly extracting OTC and its epimer, from the ground, with linear detection characteristics. Currently there is no effective legal regulations for the concentration of OTC in soil, so this work is a beginning for the establishment of standards for the use of antimicrobials and their correct administration.

INTRODUCCIÓN

Durante décadas los contaminantes emergentes habían pasado inadvertidos en el medio ambiente. Sin embargo, en la actualidad se han transformado en un tema de gran interés debido al aumento de las concentraciones de estos, tanto en el ambiente como en los alimentos, representando un riesgo para la salud pública. Actualmente los contaminantes emergentes de mayor impacto son los fármacos, tanto de uso humano como veterinario.

En medicina veterinaria, los fármacos de mayor uso son los antimicrobianos, entre los cuales encuentra la oxitetraciclina (OTC). Esta es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "de importancia crítica", debido a su uso como un tratamiento alternativo para infecciones graves en animales. Los residuos de OTC llegan al suelo por medio de las heces, generando una presión selectiva sobre bacterias resistentes lo que sugiere un potencial escenario para la salud pública, dado que no existe una regulación a la eliminación de residuos de antibióticos en suelo. En la actualidad se busca estimar su persistencia en el ambiente, como en aguas subterráneas o suelo, y así determinar el potencial efecto sobre la salud humana.

El suelo, un factor de producción esencial en el sector agropecuario, es considerado uno de los compartimentos ambientales más afectados, debido a la constante introducción de antibióticos a través de diferentes fuentes, como la excreción directa del ganado al suelo por medio de las heces o el uso de guano como fertilizante. Considerando esto, se hace necesario estudiar la diseminación de este antibiótico en matrices ambientales, como el suelo agrícola.

El presente estudio se enfoca en reconocer la importancia de la presencia de esta molécula en esta matriz ambiental, y la relevancia de poder detectarla y cuantificarla. Para esto, se realizó una revisión bibliográfica sobre el tema y se desarrolló un método analítico de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masa (HPLC-MS / MS) capaz de detectar y cuantificar la concentración de OTC y su epímero, 4-epi-OTC en suelos agrícola.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- Industria Pecuaria

En la actualidad, la industria agropecuaria ha aumentado su producción mundial debido a la demanda de una población humana en crecimiento. La FAO, en el 2018, mencionó que la producción mundial anual de carne aumentó 1%, a 327 millones de toneladas (Mt), lo que refleja un aumento principalmente en la producción de carne de bovino, cerdo, y aves de corral. Además, se prevé que esta crecerá más de 40 Mt en 2028, para llegar a casi 364 Mt (OCDE y FAO, 2019). Debido al crecimiento de la industria pecuaria, ha aumentado el uso de fármacos veterinarios, dentro de los cuales se encuentran principalmente los antibióticos. El último informe realizado por la OIE, que corresponde a la actualización del año 2019, estimó que el uso de antibióticos por kg de biomasa animal es de 144.39 mg para el año 2015 y 153.02 mg para el año 2016, esto según el análisis y las estimaciones nacionales del nivel de datos cubiertos para 2016. En este informe, indicó que las cantidades notificadas de antimicrobianos fueron 97,784 toneladas, lo cual corresponde a los datos entregados solo por 93 países (OIE, 2019). Un estudio realizado por Van Boeckel *et al.*, (2017) estimó que para el 2030 el uso de antibióticos en animales destinados a consumo se proyecta a 200.235 toneladas (Van Boeckel *et al.*, 2017).

Los antibióticos utilizados en animales destinados a consumo humanos se administran principalmente para tratar y prevenir enfermedades, los cuales son excretados a través de la orina o las heces en su estado original o como metabolito activo, los que finalmente terminan en abono usado como fuente de materia orgánica para mejorar la calidad del suelo (Kumar *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2012, Quaik *et al.*, 2020).

Para monitorear y controlar la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos se han determinado límites máximos de residuos (LMR) en los productos alimenticios con la finalidad de evitar el impacto negativo en la salud humana (CE, 2009a; Berendsen *et al.*, 2011; *Codex Alimentarius* 2017). Sin embargo, en el caso de los subproductos de la producción animal, como las heces, no existen LMR establecidos, pues no son considerados alimento, por lo que no se

controla la presencia y persistencia de antibióticos en estas matrices (Berendsen *et al.*, 2015; Berendsen *et al.*, 2018).

2.- El Suelo, destino de los residuos

El suelo posee numerosas funciones ambientales, socioeconómicas y culturales, las cuales son señaladas por la Comisión Europea (CE, 2002a), en su documento denominado “Estrategia temática para la protección del suelo”. Este define las principales funciones del suelo, como fuente de alimentos, factor para la protección del agua, fuente de materias primas, entre otros (CE, 2002a).

El suelo es un recurso prácticamente no renovable, con una cinética de degradación relativamente rápida, y tasas de formación y regeneración extremadamente lentas. Tiene una gran capacidad de almacenamiento y amortiguación, debido en gran parte a su contenido en materia orgánica. Dicha capacidad está relacionada tanto con el agua, los minerales y los gases como con un gran número de contaminantes químicos (Pro, 2016). Algunos de estos contaminantes químicos, como los antibióticos de uso veterinario, ingresan al suelo principalmente a través de excrementos animales (Heuer *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012; Chen, 2014). Una vez que un medicamento llega al suelo, puede dividirse entre las partículas del suelo, transportarse a las aguas superficiales, lixiviar a las aguas subterráneas, o degradarse (Boxall, 2008) o incluso podría ser absorbido por las plantas, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de estos fármacos, así como de las propiedades del suelo (Pan y Chu, 2017). Esto último fue confirmado por un estudio realizado en los Países Bajos, el cual reveló la presencia de antibióticos en el suelo y su traspaso a los alimentos, como verduras y cereales, lo que podría ser un riesgo para personas alérgicas a ciertos antibióticos, además de generar una mayor resistencia bacteriana a los antimicrobianos (Kumar *et al.*, 2005; Boxall *et al.*, 2002 citado por Wang y Wang, 2015).

La situación actual, ha generado una emergente preocupación por los recursos no renovables, como es el caso del suelo. Diferentes estudios dirigidos a monitorear la presencia de antibióticos en el ambiente han encontrado concentraciones significativas de residuos de antibióticos en diferentes compartimentos como suelo y agua (Martínez-Carballo *et al.*, 2007; Hou *et al.*,

2015). En el caso particular de las explotaciones ganaderas que producen grandes cantidades de heces animal y / o purines, que posteriormente son aplicados a los suelos agrícolas, se ha detectado tetraciclinas en diferentes concentraciones (Boxall, 2008; Pro, 2016). Por ejemplo, Martínez-Carballo *et al.*, (2007) detectó altas concentraciones de tetraciclinas, clortetraciclinas y oxitetraciclinas (3,3, 6,4 y 3,4 ug/kg; respectivamente) en suelos agrícolas.

3.- Consecuencia de la diseminación de los antibióticos al medio ambiente

Los antibióticos son una de las clases de agentes farmacológicos más utilizados en la medicina, y debido a que pueden desafiar a las poblaciones microbianas ambientales, interfiriendo con el funcionamiento del microsistema deben ser considerados como contaminantes importantes (Lin *et al.*, 2016; Lukaszewicz *et al.*, 2018). La literatura señala que los residuos de antibióticos a través de las deyecciones o deposiciones, genera una presión selectiva sobre bacterias contribuyendo a la proliferación de bacterias resistentes (Heuer *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012; Fletcher, 2015; Beyene 2016; Van Boeckel *et al.*, 2017; Manyi-Loh *et al.*, 2018). Las concentraciones residuales de antibióticos en los suelos suelen ser bajas en la mayoría de las marices ambientales, pero incluso esas bajas concentraciones pueden desencadenar respuestas bacterianas específicas, alterando la flora y fauna del suelo (Aga *et al.*, 2016; Armalyte *et al.*, 2019). La comunidad bacteriana del suelo alterada se distribuye principalmente dentro de los phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Armatinonadetes, Planctomycetes y Chloroflexi (Lin *et al.*, 2016).

Muchos estudios han indicado que la OTC es un antibiótico residual común en suelos fertilizado con estiércol, lo cual provoca la acumulación de este antibiotico en los tejidos corporales de los invertebrados del suelo. Esto puede afectar el funcionamiento del ciclo del nitrógeno del suelo y la descomposición de la materia orgánica (MA *et al.*, 2019). Además, está comprobado que la disponibilidad de la OTC, genera una presión selectiva sobre las bacterias contribuyendo a la proliferación de bacterias resistentes en el intestino de invertebrados como los gusanos blancos, propagando los genes de resistencia por excreción y, por lo tanto, puede transferirse a otra fauna del suelo, como la lombriz de tierra, al ingerir tierra, y puede transmitirse a las verduras o plantas a través de la ingesta de nutrientes del suelo, provocando

finalmente, un daño en la salud humana a través de las cadenas alimentarias (MA et al., 2019). Pro (2016) señala que “La consecuencia más clara de la liberación de los antibióticos al medio ambiente es seleccionar bacterias resistentes a antibióticos”. Por otra, parte la Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que el mayor problema no es la resistencia bacteriana en sí, si no que la pérdida de la eficacia de los tratamientos antibióticos, tanto en animales, como en personas (OMS, 2014).

4.- Oxitetraciclina, antibiótico de importancia crítica

La oxitetraciclina (OTC), de la familia de la tetraciclina (TC), inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas (Lukaszewicz *et al.*, 2018). La amplia gama de sus aplicaciones, el tipo de enfermedad y la variedad de especies de animales que trata, convierten a este agente en un insumo sumamente importantes para la medicina (Chen, 2013; OIE, 2018). Por este motivo grandes organizaciones a nivel mundial (FAO/OMS/OIE) la han categorizado como "antimicrobiano de importancia elevada" para la salud humana, y “antibiótico de importancia crítica” para los tratamientos veterinarios (FAO, 2011; OIE, 2018).

Este antibiótico, dado su extenso uso, se ha detectado en diferentes compartimientos ecológicos, entre ellos el suelo (Boxall, 2008; Ok *et al.*, 2011; Daghrir y Drogui, 2013). Un estudio realizado en Dinamarca señala que la familia de las TC posee tasas de adsorción (retención) más altos que otros compuestos farmacéuticos, dentro de los cuales, la OTC es la más persistente (Rabølle, 2000 citado por Wang y Wang, 2015).

Dado el grado de persistencia en suelo de la OTC y su amplia utilización en animales productivos, es importante determinar la magnitud de la diseminación de los residuos de este antibiótico. Slanaa y Dolencb (2013), en “*Environmental Risk Assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine—A field study and laboratory approach*”, estudiaron la cinética de la OTC, y descubrieron que, en el compostaje, la OTC se degradó en un 92%, mientras que su epímero, 4epiOTC, se degradó en un 50% durante el mismo periodo de tiempo. Lo que señala una mayor persistencia en el ambiente. Por este motivo, también, es necesario detectar y analizar en conjunto con su epímero, 4-epi-OTC, ya que, si bien la OTC se excreta prácticamente en su forma original, un 10% es metabolizado y excretado como 4epiOTC

(Slanaa y Dolencb, 2013). Además, es utilizado como marcador de residuos (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2012).

Teniendo en cuenta toda la información señalada, el objetivo principal de este estudio es implementar un método capaz de detectar y cuantificar simultáneamente la concentración de OTC y 4-epi-OTC en suelo agrícola.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diseminación de oxitetraciclina y 4-epi-otc en suelos agrícolas y la relevancia de poder detectar y cuantificar estos compuestos en esta matriz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar el impacto y la diseminación de los antibióticos de las familias de las tetraciclinas como contaminantes ambientales en suelo agrícola.
- 2.- Reconocer la importancia de contar con metodologías analíticas para detectar y cuantificar tetraciclinas en suelo agrícola.
- 3.- Implementar una metodología analítica para detectar oxitetraciclina y 4-epi-otc en suelo agrícola y proyectar sus potenciales en la gestión de impacto ambiental de la producción animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recopilación de Información

Mediante la revisión bibliográfica y posterior búsqueda se reúne el material pertinente a los antibióticos como contaminantes emergentes, impacto de los residuos de tetraciclinas en el suelo agrícola, y la importancia de contar con una metodología analítica para detectar tetraciclinas en el suelo. Luego de conocer toda la información señalada se procede a implementar un método analítico capaz de detectar y cuantificar la concentración de OTC y 4-epi-OTC en suelo agrícola.

1.1.- Fuentes de información

Se utilizaron repositorios locales como la biblioteca virtual de la Universidad de Chile, accediendo a través de ella a bases de datos internacionales como ISI – Web of Knowledge, Science Direct, y Wiley. También se utilizó el recurso online de ResearchGate y Google Scholar. Dentro de la información de organizaciones internacionales como OMS, OIE y FAO, se utilizaron sus propios dominios para realizar búsquedas de documentos oficiales.

1.2.- Búsqueda de información

Dentro de las palabras claves para este proyecto se utilizaron términos relevantes como: soil pollutants, antibiotic residues, antibiotic residues in feces, tetracycline residues, oxytetracycline in the soil, analytical methodologies, entre otros términos utilizados solos o en conjunto con algunos de los términos indicados anteriormente para limitar los resultados de la búsqueda.

1.3.- Criterios de elegibilidad

La búsqueda de información se realizó en inglés, entendiendo que gran parte de la información científica actualizada se encuentra en ese idioma. Las dudas respecto a traducciones de palabras puntuales se hicieron mediante el traductor de WordReference en su dominio de Internet. Se utilizaron artículos y libros actualizados, con información relevante para el proyecto, la cual se analizó juzgando el título y el abstract de dichos artículos. Se excluyeron los documentos con fecha anterior al año 2015.

Dentro de los documentos oficiales de organismos internacionales se realizó una búsqueda en inglés y español ante la posibilidad de encontrar contenido de la región latina/hispanohablante exclusivamente, de carácter relevante para este proyecto.

2. Análisis de Información

2.1.- Proceso de extracción de datos

Posterior a la descarga de los documentos desde Internet, se cambiaron los nombres a los archivos a su título de publicación respectivo y luego se ordenaron de acuerdo al tipo (libro, paper, documento oficial, entre otros) y tema (Residuos de productos farmacéuticos en el ambiente, Toxicidad de los antibióticos, entre otros). Para lograr un análisis más eficiente de los documentos se procede a leer todo el artículo rescatando los datos relevantes y atingentes a los objetivos de este estudio.

2.2.- Medidas de resumen y síntesis de resultados

Obtenida la información necesaria, se realizó una tabla resumen con todos los datos, esto permitió manejar y combinar los resultados de los diferentes estudios de manera más eficiente identificando el impacto de los residuos de tetraciclinas en suelo agrícola y reconocer la importancia del método analítico.

3.- Implementación del método analítico

El trabajo de implementación del método analítico se realizó en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, acreditado bajo la norma ISO 17025.

Para la detección de OTC y su epímero, 4-epi-OTC en muestras de suelo se utilizó una metodología analítica para OTC por HPLC-MS/MS, la cual fue desarrollada en el laboratorio basándose en las características químicas de la oxitetraciclina.

3.1.- Procedencia de las muestras

Para la implementación del método se utilizaron muestras de suelo agrícola de la región central obtenidas en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, las cuáles fueron analizadas para verificar la oxitetraciclina.

3.2.- Soluciones estándar

Las soluciones estándar para el analito (Dr Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania, pureza 95,6%) se prepararon a una concentración de 1,000 ng mL⁻¹ disolviendo clorhidrato de oxitetraciclina y 4-epi-oxitetraciclina en metanol.

Para el estándar interno (IS), se preparó una solución madre primaria a una concentración de 1000 ng mL⁻¹ disolviendo tetraciclina deuterada (TC-D6, Toronto Research Chemicals Toronto, Canadá, pureza 80%) en metanol.

Se entiende por muestra en blanco aquella que contiene todos los componentes de la matriz excepto el analito, por esta razón en este estudio a las muestras en blanco, no se les aplicó las soluciones de trabajo de OTC y 4-epi-OTC, mientras que la solución de trabajo TC-D6 se agregó una concentración de 25 ng mL⁻¹. Todas estas soluciones se almacenarán a -80°C durante todo el periodo de estudio.

3.3.- Solventes y reactivos

Para la extracción, se preparó una solución tampón de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) - McIlvaine (pH 4 ± 0.1) mezclando 500 ml de solución A (21 g de ácido cítrico monohidrato en 1 litro de agua) con 280 ml de solución B (35,6 g de fosfato disódico en 1 litro de agua), y luego se agregó 74,4 g de EDTA para completar la solución.

Los disolventes de metanol, acetonitrilo y agua fueron de grado HPLC, mientras que el ácido cítrico monohidrato, el fosfato disódico y los reactivos de ácido etilendiaminotetraacético fueron de calidad analítica.

3.4.- Procedimiento de Extracción

Para la extracción se estudiaron en paralelo dos procedimientos, los cuales fueron designados como Método 1 (anexo 1) y Método 2 (anexo 2). El primero se basa en el análisis realizado por el autor Lukaszewicz *et al.* (2018), en su reciente estudio “*A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique*”. Mientras que el método 2 se basa en una investigación realizada por Berendsen *et al.* (2015) en su estudio “*The analysis of animal faeces a tool to monitor antibiotic usage*”. Los detalles de los métodos están incluidos como anexos en esta investigación.

RESULTADOS

1. Objetivo específico 1

1.1.- Marco del estudio

El estudio se basa en 16 artículos publicados entre el año 2015 y 2020. De la totalidad de los artículos, 7 se centraron en la contaminación de los residuos de los productos farmacéuticos en el ambiente, siendo la principal matriz de estudio las heces generadas por la producción animal (Beek *et al.*, 2016b; Zhang *et al.*, 2016; Inyinbor, *et al.*, 2018; Gros *et al.*, 2019; Menz *et al.*, 2019; Ghirardini *et al.*, 2020; Quaik *et al.*, 2020). Por otra parte, los estudios dedicados a verificar la toxicidad de los residuos de antibióticos en cultivos o en la microbiota del suelo fueron 5, de los cuales 2 se dedicaron a estudiar exclusivamente a la Oxitetraciclina (CAO *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2019). Los artículos restantes fueron investigaciones experimentales sobre la absorción de los antibióticos en el suelo o posibles soluciones para disminuir el impacto de los residuos en el ambiente.

Artículos recopilados:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) Ghirardini <i>et al.</i> , 2020 | 9) Inyinbor, <i>et al.</i> , 2018 |
| 2) Quaik <i>et al.</i> , 2020 | 10) Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018 |
| 3) Menz <i>et al.</i> , 2019 | 11) Klatte <i>et al.</i> , 2017 |
| 4) Conde-Cid <i>et al.</i> , 2019 | 12) Zhang <i>et al.</i> , 2016 |
| 5) Cao <i>et al.</i> , 2016 | 13) Beek <i>et al.</i> , 2016b |
| 6) Gros <i>et al.</i> , 2019 | 14) Hussain <i>et al.</i> , 2016 |
| 7) Qin <i>et al.</i> , 2019 | 15) Bailey <i>et al.</i> , 2015 |
| 8) Goulas <i>et al.</i> , 2018 | 16) Pan y Chu, 2016 |

1.2.- Síntesis de los resultados

Con la finalidad de relacionar y sintetizar los diferentes temas de los artículos recopilados, se realizaron tablas que permiten cohesionar la información y mostrar un panorama de los puntos abordados por estos estudios. En estas tablas se seleccionaron temas atinentes al estudio, y mediante la lectura de los artículos se verificó si estos abordaban dichos temas. A continuación, se señala el tema y su descripción respectiva.

	Descripción	Referencias
ANTIBIÓTICOS EN EL AMBIENTE	Existe un aumento significativo en el consumo de productos farmacéuticos, principalmente de los antibióticos. Estos son una amenaza ambiental debido a la acumulación de sus residuos en los distintos compartimentos.	Beek <i>et al.</i> , 2016; Klatte <i>et al.</i> , 2017; Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018; Inyinbor, <i>et al.</i> , 2018; Qin <i>et al.</i> , 2019; Menz <i>et al.</i> , 2019; Conde-Cid <i>et al.</i> , 2019; Quaik <i>et al.</i> , 2020.
FAMILIA DE LAS TETRACICLINAS (TC)	Las TC son consideradas como uno de los cinco antibióticos más utilizados en medicina y el más frecuente en medicina veterinaria.	Pan y Chu, 2016; Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018; Menz <i>et al.</i> , 2019; Conde-Cid <i>et al.</i> , 2019; Quaik <i>et al.</i> , 2020; Ghirardini <i>et al.</i> , 2020.

Tabla 1. Antibióticos.

	Descripción	Referencias
TETRACICLINA EN EL SUELO	Las TC son los antibióticos detectados con mayor frecuencia en suelos fertilizados con heces de animales.	Bailey <i>et al.</i> , 2015; Hussain <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018; Gros <i>et al.</i> , 2019; Menz <i>et al.</i> , 2019; Conde-Cid <i>et al.</i> , 2019; Quaik <i>et al.</i> , 2020.
OXITETRACICLINA EN SUELO	Estos autores detectaron Oxitetraciclina en el suelo, incluyendo algunos de ellos las cifras más altas notificadas hasta la fecha.	Hussain <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Gros <i>et al.</i> , 2019; Qin <i>et al.</i> , 2019.
PERSISTENCIA EN EL SUELO	Las TC usadas en veterinaria se acumulan fácilmente en el suelo agrícola, siendo la Oxitetraciclina el más persistente.	Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018; Gros <i>et al.</i> , 2019; Qin <i>et al.</i> , 2019; Menz <i>et al.</i> , 2019; Conde-Cid <i>et al.</i> , 2019; Quaik <i>et al.</i> , 2020.

Tabla 2. Antibióticos en el suelo.

	Descripción	Referencias
METABOLITOS ACTIVOS	Las TC se excretan principalmente como el compuesto original, pero existe una pequeña fracción con actividad antibiótica y la capacidad de volver a transformarse al compuesto original.	Pan y Chu, 2016; Beek <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Klatte <i>et al.</i> , 2017; Menz <i>et al.</i> , 2019; Ghirardini <i>et al.</i> , 2020.
Tabla 3. Metabolitos de los antibióticos.		

	Descripción	Referencias
RESISTENCIA BACTERIANA	Estos autores concuerdan que los residuos de antibióticos en el suelo facilitan la presencia de genes de resistencia a los antibióticos.	Bailey <i>et al.</i> , 2015; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Klatte <i>et al.</i> , 2017; Lukaszewicz <i>et al.</i> , 2018; Inyinbor, <i>et al.</i> , 2018; Goulas <i>et al.</i> , 2018; Gros <i>et al.</i> , 2019; CAO <i>et al.</i> , 2016; Menz <i>et al.</i> , 2019; Quaik <i>et al.</i> , 2020; Ghirardini <i>et al.</i> , 2020.
Tabla 4. Resistencia a los antibióticos.		

En estas tablas podemos corroborar que el aumento del consumo de antibióticos es un tema bastante mencionado en la literatura, y el principal factor del aumento de los residuos de antibióticos en los compartimentos ambientales. Dentro de estos antibióticos, 6 de los 16 artículos estudiados, mencionan que los antibióticos de la familia de las tetraciclinas son los más usados, tanto en medicina humana como animal (Tabla 1). Por este motivo, y por su alta persistencia en el suelo, las tetraciclinas, específicamente la Oxitetraciclina, son los antibióticos más detectados en los estudios realizados en el suelo agrícola (Tabla 2). Además, varios autores confirman la necesidad de estudiar estos antibióticos en conjunto con sus metabolitos, ya que estas sustancias tienen actividad antimicrobiana, la cual también afecta la microbiota del suelo facilitando la presencia de genes de resistencia (Tabla 3 y 4).

2. Objetivo específico

Análisis de la información

La producción de antibióticos ha ido incrementando, y que la cifra del uso anual de antibióticos es de 100.000 a 200.000 toneladas a nivel mundial, siendo destinado dos tercios solo para uso

veterinario (Conde-Cid *et al.*, 2019; Menz *et al.*, 2019, Quaik *et al.*, 2020). Muchos de estos antibióticos terminan siendo excretados por las heces en grandes concentraciones siendo una amenaza para el ambiente. En este tema, resaltó un artículo con datos sobre la aparición de los productos farmacéuticos en heces de origen animal entre los años 1980 y 2019. Los contaminantes monitoreados fueron 145 compuestos químicos, de los cuales 85 corresponden a antibióticos, siendo la familia de las tetraciclinas el contaminante detectado con mayor frecuencia en las heces de origen animal y en suelos fertilizados (Quaik *et al.*, 2020; Ghirardini *et al.*, 2020), lo cual puede ser explicado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), quien mencionó que los antibióticos más persistentes en suelo estaban correlacionados con la línea de consumo, siendo nuevamente la familia de las tetraciclinas el más abundante (Figura 1), destacándose la oxitetraciclina y la clortetraciclina. (Conde-Cid *et al.*, 2019; Quaik *et al.*, 2020; Ghirardini *et al.*, 2020)

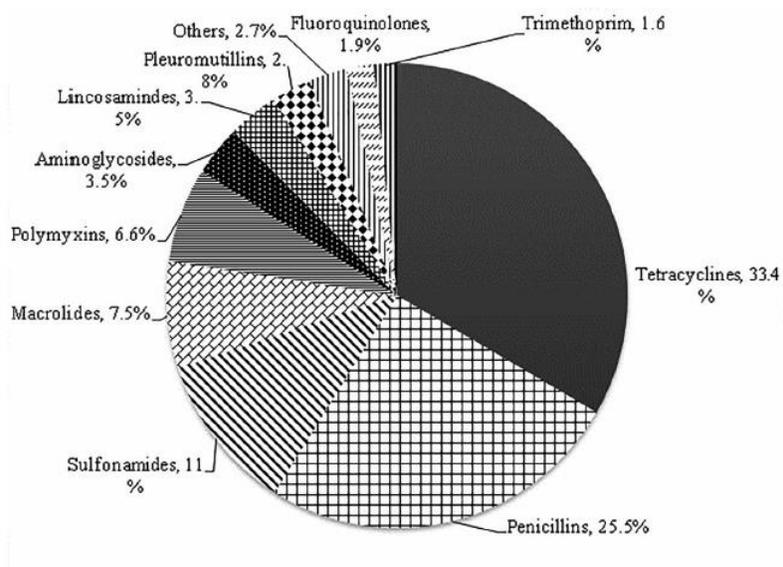


Figura 1. Consumo de antibióticos para animales productores de alimentos (Quaik *et al.*, 2020)

Otro tema importante es la seguridad ambiental de los nuevos productos farmacéuticos veterinarios, la cual se determina actualmente según las directrices GL6 y GL38 de la Conferencia Internacional de Armonización Veterinaria (VICH), que se resume en dos fases. La Fase I estima la liberación total de la sustancia al ambiente. Si la concentración ambiental en el suelo excede los $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, se requiere una evaluación más detallada en la fase II. La Fase II evalúa la toxicidad microbiana mediante dos pruebas: una prueba de transformación de

nitrógeno (OECD TG 216) para evaluar los efectos sobre los microorganismos del suelo y una prueba de inhibición del crecimiento (OECD TG 201) para determinar los efectos sobre las cianobacterias de agua dulce. Sin embargo, muchos medicamentos veterinarios que ya circulan por el mercado nunca han sido reevaluados según la presente directriz, por lo tanto, se desconoce su efecto potencial en el ambiente (VICH, 2000; VICH, 2004; EMA *et al.*, 2016; Menz *et al.*, 2019). Estudios recientes evaluaron la Tetraciclina y encontraron concentraciones residuales en suelo agrícola de $2.316 \mu\text{g kg}^{-1}$ los días de la fertilización y de $115 \mu\text{g kg}^{-1}$ cien días después de la aplicación. En China, el año 2016, se encontró una concentración de $8.400 \mu\text{g kg}^{-1}$, el nivel más alto que se haya reportado para la oxitetraciclina en el suelo. Además, calcularon que la degradación media de las tetraciclinas corresponde a 50 años en el suelo (Zhang *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2019; Menz *et al.*, 2019). Estos resultados, se deben a que los antibióticos de la familia de las tetraciclinas poseen una alta tasa de excreción, del 80 al 90%, y, además, son altamente persistentes en las capas profundas del suelo (Quaik *et al.*, 2020). Las tetraciclinas poseen un alto porcentaje de adsorción por sus fuertes interacciones con los componentes del suelo, como la arcilla y la materia orgánica (Conde-Cid *et al.*, 2019). En los suelos agrícolas el porcentaje de arcilla es alto, lo que hace que sea predisponente a una mayor adsorción. Por otra parte, la materia orgánica en los suelos agrícolas no sobrepasa normalmente el 4%, pero con la constante aplicación de heces como fertilizantes los porcentajes de adsorción se elevan cercanos al 100% (Conde-Cid *et al.*, 2019).

En la actualidad, existe un control en las tasas de aplicación de fertilizantes orgánicos para prevenir la contaminación de los recursos hídricos, sin embargo, ninguna de las políticas actuales aborda efectivamente la contaminación por productos farmacéuticos (Gros *et al.*, 2019). Los antibióticos de la familia de las tetraciclinas como nuevos contaminantes emergentes no están cubiertos por los programas de monitoreo ambiental y no hay regulaciones sobre los niveles de concentración permisibles de estos compuestos en los ecosistemas naturales (Klatte *et al.*, 2017; Lukaszewicz *et al.*, 2018). Los residuos de antibióticos, las bacterias y los genes resistentes a los antibióticos se introducen en el ambiente mediante la aplicación constante de los desechos de los animales amenazando la eficacia de los antibióticos (Goulas *et al.*, 2018). Como resultado de su amenaza para la salud pública, la Organización Mundial de la Salud

(OMS) ha clasificado su propagación como una de las tres amenazas más graves para la salud pública en el siglo XXI (Beek *et al.*, 2016b; Klatte *et al.*, 2017; Inyinbor, *et al.*, 2018).

Considerando los antecedentes recopilados se puede observar la importancia de contar con una metodología analítica capaz de detectar y cuantificar los antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas.

3. Objetivo específico 3

Implementación del método analítico

La implementación del método analítico se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, de acuerdo con las características químicas que posee la Oxitetraciclina, escogiéndose solventes que permitieran su extracción de manera adecuada y así tener una recuperación aceptable.

4.1.- Metodología de extracción

Para la extracción se estudiaron en paralelo dos procedimientos, el Método 1 basado en el análisis realizado por el autor Lukaszewicz *et al.* (2018), y el método 2 por Berendsen *et al.* (2015). El método 1 no dio resultados concluyentes (Figura 1 y 2), por lo que se procedió a implementar el método 2 de la siguiente forma: Las muestras de suelo (1 ± 0.01 g) fueron pesadas en tubos Falcon de 50 ml para ser fortificadas con el Estándar Interno de TC-D6, y según corresponda con OTC y 4-epi-OTC (Anexo 3). Estos se mezclaron con 2 ml de Acetonitrilo (ACN) y 8 ml de 0.1 M EDTA: tampón McIlvaine (pH 4.0). Posteriormente fueron agitadas en vortex por 10 segundos, sonicadas por 5 minutos a una potencia de 400 W y centrifugadas por 10 minutos a 3.360 g. A continuación, se filtró el sobrenadante por lana de vidrio en jeringas de 10 ml con filtro de jeringa millex de 0.2 μ m rescatando el filtrado en un tubo Falcon limpio de 50 ml. Se presionó con el embolo para pasar la totalidad de la muestra y diluir acondicionando con 13 ml de EDTA: tampón McIlvaine. Las muestras fueron agitadas por 2 minutos y centrifugadas por 10 minutos a 3.360 g. Luego se acondicionaron las columnas de extracción de fase sólida (SPE) Oasis HLB (6cc) con 5 ml de metanol y 5 ml de agua MiliQ

para cargar la muestra. Una vez eliminado el filtrado, se lavaron las columnas con 5 ml de agua MiliQ y se secaron al vacío por 5 minutos. Las muestras fueron eluidas con 10 ml de metanol y llevadas a sequedad bajo flujo de nitrógeno en baño de agua entre 40 a 50 °C. Finalizado el secado, se reconstituyeron con 500 uL de solución metanol-agua grado HPLC (2:3), se agitaron en vortex por 5 minutos, se sonicaron por 5 minutos y se centrifugaron a 3.360 g por 5 minutos, posteriormente fueron trasladadas a un tubo de 1,5 ml para ser nuevamente centrifugadas por 10 minutos a 2.245 g y pasar rápidamente a un vial de vidrio mediante filtro de jeringa millex de 0.2 um.

4.2.- Condiciones instrumentales

Las condiciones para el espectrómetro de masas de triple cuádruplo, API 5500® de Applied Biosystems Sciex, para la detección de los analitos de interés, OTC y 4-epi-OTC, desde la matriz suelo se detallan en el anexo 4.

4.3.- Análisis de los datos

Se detectaron cromatográficamente los analitos OTC y 4-epi-OTC, para determinar si el método analítico implementado extrae de forma adecuada los analitos a partir de la matriz (suelo), se determinó su expresión cromatográfica mediante las masas y tiempo de retención específico para OTC y 4-epi-OTC (Tabla 5), que se realizó con el analito puro, un blanco y un control del método 1 (Figura 1 y 2) y del método 2 (Figura 3 y 4). Las masas del EI TC-d6 se pueden observar en la Tabla 6.

Analito	Ion Precursor	Ion Producto	Tiempo de Retención
Oxitetraciclina	461	426	11,66 min
		381	
4-Epi-Oxitetraciclina	461	426	7,13 min
		381	

Tabla 5. Masas de ion precursor, iones producto y tiempo de retención promedio de Oxitetraciclina y 4-eioxieraciclina.

Analito	Ion Precursor	Ion Producto	Tiempo de Retención
Tetraciclina-d6	451	160	9,99 min

Tabla 6. Masa de ion precursor, ion producto y tiempo de retención del estándar interno TC-d6.

Figura 1. Expresión cromatográfica de Oxitetraciclina en la matriz de suelo según el método 1 de extracción. (A) Inyección con OTC. (B) Muestra blanco. (C) Muestra control

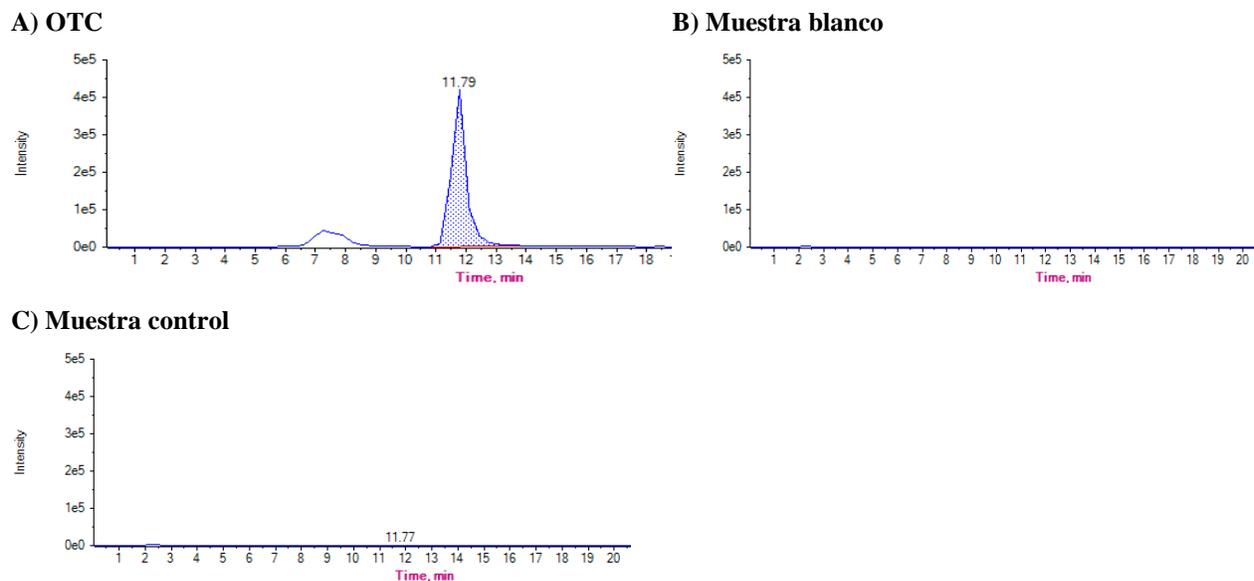
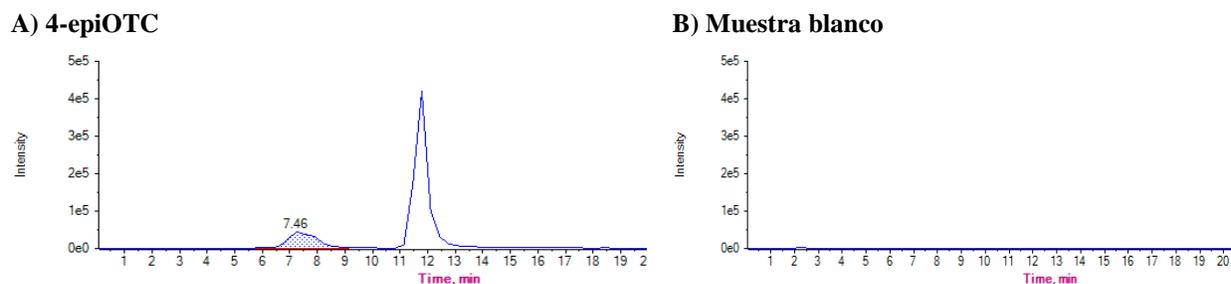


Figura 2. Expresión cromatográfica de 4-epi-Oxitetraciclina en la matriz de suelo según el método 1 de extracción. (A) Inyección con 4-epiOTC. (B) Muestra blanco. (C) Muestra control



C) Muestra control

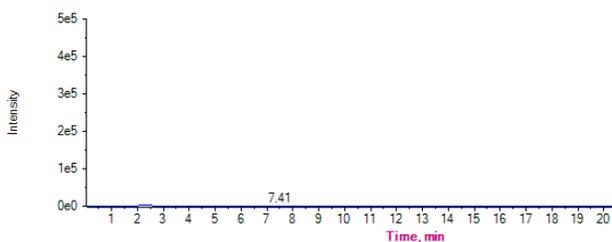
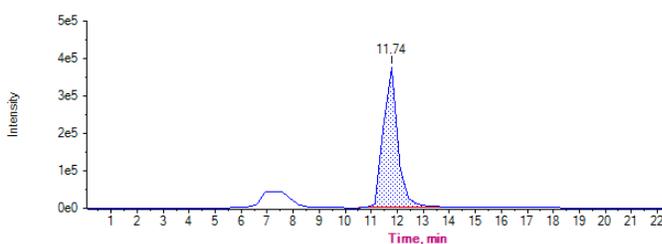
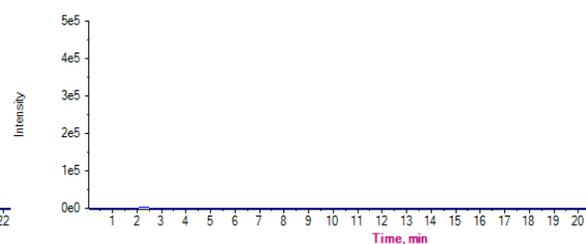


Figura 3. Expresión cromatográfica de Oxitetraciclina en la matriz de suelo según el método 2 de extracción. (A) Inyección con OTC. (B) Muestra blanco. (C) Muestra control

C) OTC



D) Muestra blanco



C) Muestra control

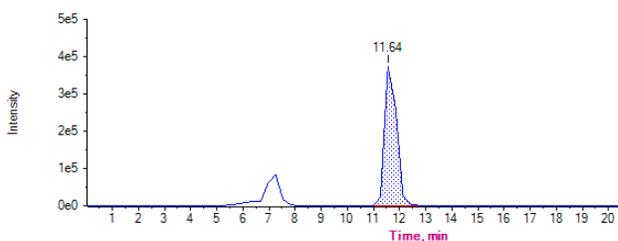
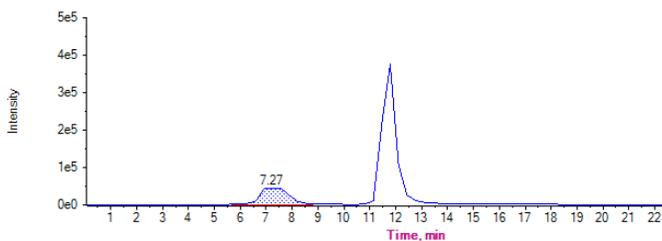
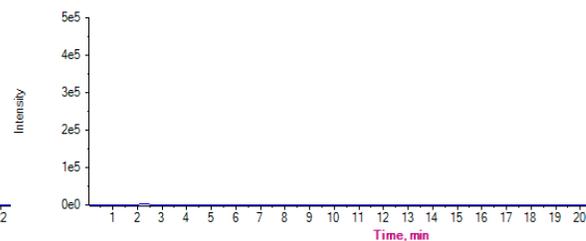


Figura 4. Expresión cromatográfica de 4-epi-Oxitetraciclina en la matriz de suelo según el método 2 de extracción. (A) Inyección con 4-epiOTC. (B) Muestra blanco. (C) Muestra control

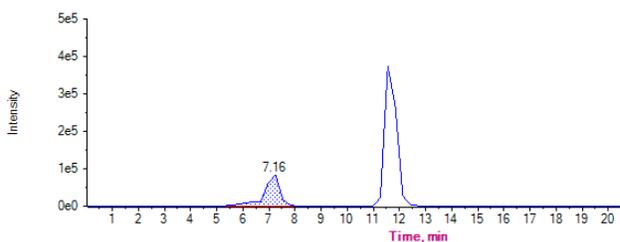
A) 4-epiOTC



B) Muestra blanco



C) Muestra control



La linealidad del método ($R^2 > 0,95$) se determinó con una curva de calibración fortificada a cinco concentraciones: 25, 50, 75, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, las cuales fueron extraídas mediante el método 2 (Figura 5 y 6). Esto fue realizado bajo las condiciones cromatográficas descritas en el anexo 4.

Figura 5. Curva de calibración fortificada con Oxitetraciclina a cinco concentraciones.

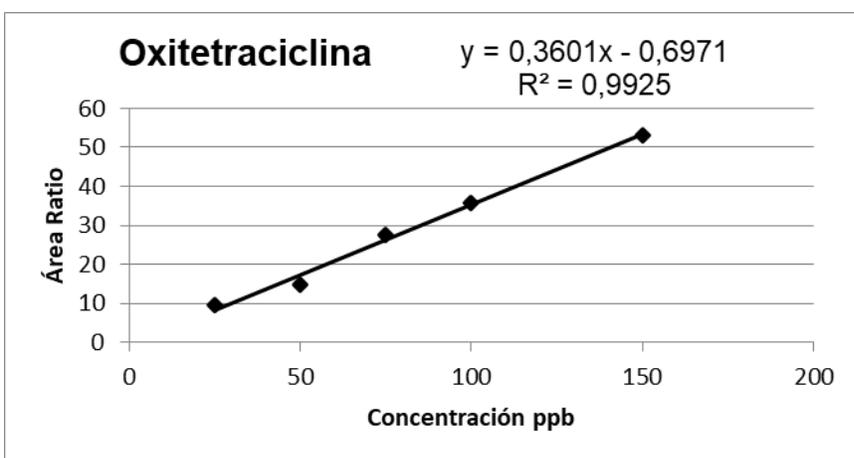
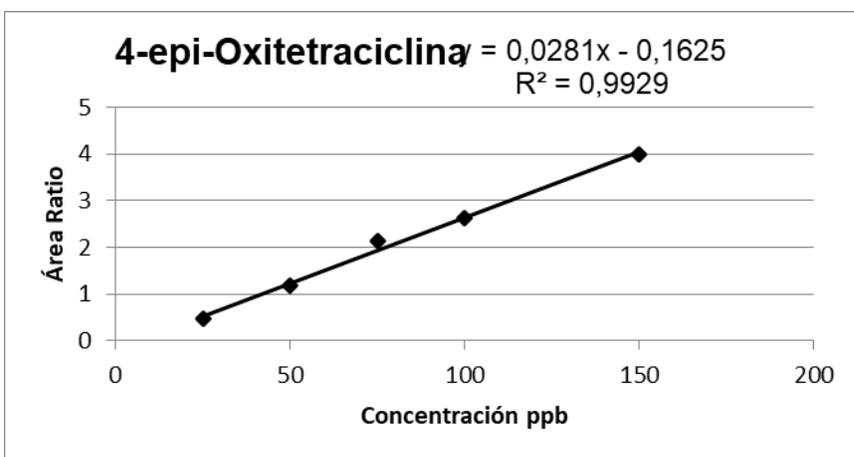


Figura 6. Curva de calibración fortificada con 4-epi-OTC a cinco concentraciones.



DISCUSIÓN

De acuerdo con la información recopilada, se ha determinado que el crecimiento global de la industria agropecuaria ha provocado un aumento en el uso de los fármacos veterinarios, dentro de los cuales se encuentran principalmente los antibióticos (OCDE y FAO, 2019; OIE, 2019). Autores señalan que la producción de antibióticos anual es de 100.000 a 200.000 toneladas a nivel mundial, de los cuales, dos tercios son solo para uso veterinario (Conde-Cid et al., 2019; Menz et al., 2019, Quaik et al., 2020). Cifra que esta subestimada, pues la OIE, en el año 2019, indicó que las cantidades notificadas de antimicrobianos usados solamente en veterinaria fue de 97,784 toneladas.

Los antibióticos administrados a los animales destinados a consumo humano son metabolizados y excretados a través de la orina o las heces, con la finalidad de ser usados como abono para el suelo (Kumar *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2012, Quaik et al., 2020). La aplicación de los fertilizantes al suelo tiene como objetivo mejorar la calidad de este, ya que también es un receptor de variados contaminantes residuales, lo que hoy en día ha sido gran motivo de estudio. Dentro de los principales contaminantes residuales se encuentran los antibióticos (Heuer et al., 2011; Ji et al., 2012; Chen, 2014; Pro, 2016). Este tema ha sido de gran interés a nivel mundial, por lo cual hoy en día, los nuevos productos farmacéuticos veterinarios deben ser evaluados para determinar su seguridad ambiental, lo que no ha sido aplicado en muchos medicamentos veterinarios que ya circulan por el mercado (VICH, 2000; VICH, 2004; EMA et al., 2016; Menz et al., 2019). Por otra parte, los límites máximos de residuos (LMR) han sido establecidos con la finalidad de evitar el impacto negativo en la salud humana (CE, 2009a; Berendsen et al., 2011; Codex Alimentarius 2017). Sin embargo, no existen LMR para los subproductos de la producción animal, como las heces, ya que no son considerados alimento (Berendsen et al., 2015; Berendsen et al., 2018). Por lo tanto, si bien, hay directrices que determinan las concentraciones ambientales permitidas, aun no hay un marco regulatorio completo que asegure la protección ambiental, humana y animal. Esto es confirmado por Gros *et al.*, (2019), quien señala que, ninguna de las políticas actuales aborda efectivamente la contaminación por productos farmacéuticos.

Basados en la información recopilada en esta revisión, se confirma que la familia de las tetraciclinas son los antibióticos más utilizados en medicina veterinaria, y por consecuencia es el contaminante detectado con mayor frecuencia en suelos fertilizados (OIE, 2019; Quaik et al., 2020; Ghirardini et al., 2020). Esto es afirmado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), quien mencionó que los antibióticos más persistentes en suelo estaban correlacionados con la línea de consumo, lo cual explica la alta frecuencia en la que es detectada la oxitetraciclina (OTC) en suelo agrícola (Boxall, 2008; FAO, 2011; Ok et al., 2011; Daghrir y Drogui, 2013; OIE, 2018). Algunas de las concentraciones registradas en la literatura sobre pasaron los límites establecidos por VICH (2000), en su informe “Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria”, alcanzando concentraciones de $2.316 \mu\text{g kg}^{-1}$ en suelos fertilizados, e incluso llegando a $8.400 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Zhang et al., 2016; Qin et al., 2019; Menz et al., 2019).

Si bien, muchos autores señalan que la consecuencia de la diseminación desregulada de antibióticos al medio ambiente, es la proliferación de bacterias multiresistentes y la absorción de residuos por parte de verduras o plantas, la OMS insiste que el mayor problema es la pérdida de la eficacia en los tratamientos con antibióticos, tanto en animales, como en personas (Heuer et al., 2011; Ji et al., 2012; OMS, 2014; Fletcher, 2015; Beyene 2016; Pro, 2016; Van Boeckel et al., 2017; Manyi-Loh et al., 2018).

Considerando los antecedentes recopilados, se puede observar y reconocer el impacto de la diseminación de los antibióticos al ambiente y la necesidad de contar con metodologías analíticas que detecten y cuantifiquen estos residuos. Para una revisión futura, debe ser necesario utilizar metodologías que aseguren la aleatoriedad de los estudios escogidos y su representatividad, como la metodología PRISMA (“Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses”, la que determina un flujo con una lista de pasos para el proceso de selección de documentos en una revisión sistemática o metaanálisis).

Los métodos analíticos para la detección de Oxitetraciclina descritos en esta memoria de título fueron basados en las investigaciones de Lukaszewicz et al., (2018) y Berendsen et al., (2015), quienes la implementaron en suelo y heces respectivamente. La investigación descrita por

Lukaszewicz et al., (2018), se centra en comparar distintas concentraciones de solventes y reactivos para el proceso de extracción y se escogió para el método 1, de este trabajo, aquellas concentraciones donde se obtuvo mejores resultados por Lukaszewicz et al., (2018). El autor, en este procedimiento, aplicó una técnica de extracción asistida por microondas (MAE), la que otorga una mayor solubilidad de los analitos en los solventes, la cual no se pudo implementar, debido a que no se contaba con el instrumental descrito. Por otro lado, la investigación realizada por Berendsen et al. (2015), estudia varios compuestos, incluyendo la OTC. La diferencia principal entre el método utilizado por este autor y el implementado en esta memoria, es la cantidad de veces que se agita, sonica y centrifuga la muestra para aumentar la superficie de contacto, además se decide filtrar dos veces más que el original debido a la complejidad de la matriz utilizada, en este caso suelo. Ambas metodologías se realizaron en el laboratorio FARMAVET en paralelo, pero solo una mostró resultados que permitieron implementar la metodología de forma exitosa.

El primer paso para el análisis fue inyectar 6 repeticiones del analito puro, y así obtener el tiempo de retención para OTC y su epímero, de 11,66 min y 7,13 respectivamente. Esto permite reconocer como se comporta el analito, y poder diferenciarlo de otras moléculas al momento de evaluar las muestras de suelo. Las expresiones cromatográficas dispuestas en la figura 1 y 2, muestran los resultados obtenidos por el método 1, donde la gráfica A representa cómo se comporta la OTC y su epímero, mientras que la muestra control, fortificada con 50 ng/g detectó señales despreciables. Esto demuestra que el método 1 no extrae eficazmente la OTC y su epímero. Por otra parte, la gráfica de la muestra control del método 2 (figura 3 y 4), muestra claramente el peak cromatográfico de detección de OTC y 4epi-OTC. Por lo tanto, podemos afirmar que el método 2 es capaz de extraer los analitos OTC y 4epi-OTC, desde la matriz utilizada.

La curva de calibración para determinar la linealidad del método fue realizada de acuerdo con los siguientes intervalos de trabajo: 25, 50, 75, 100 y 150 µg/kg, con un $R^2 > 0,99$ para OTC y su epímero, superando el mínimo establecido de 0,95 como criterio de aceptación. El modelo matemático obtenido de las curvas de calibración se condice con una regresión lineal, donde la variable dependiente (y) corresponde al área ratio y la variable independiente (x) corresponde a

la concentración. Esto implica que la respuesta entregada por el espectrómetro de masas (área ratio), es directamente proporcional a la concentración de analito detectada en la muestra (Figura 5 y 6). Esto fue realizado bajo las condiciones cromatográficas descritas en el anexo 4.

La implementación de la metodología analítica fue llevada a cabo según los estándares de calidad del laboratorio FARMAVET, el cual está certificado bajo la norma ISO 17025, Of 2005.

CONCLUSIÓN

En base a una exhaustiva revisión bibliográfica y una metódica recopilación de antecedentes, se observa el presente aumento en el uso de fármacos veterinarios debido al crecimiento exponencial de la industria agropecuaria. Si bien, la última actualización de datos notificada por la OIE corresponde al año 2019, esta cifra puede estar subestimada, debido a que la información abarca datos recopilados entre el año 2016 al 2018. Además, es importante destacar que, de un total de 182 países miembros de la OIE, sólo 118 aportaron datos cuantitativos, por lo que, aunque se desconoce la situación actual global, se puede determinar claramente que desde el 2018 hasta la fecha existe un presente aumento en el número de animales destinados a consumo humano, lo que producirá un mayor uso en los fármacos veterinarios, específicamente, los antibióticos de la familia de las tetraciclinas.

A pesar de que no existen datos suficientes para conocer la magnitud de la diseminación de estos residuos, sí existe literatura capaz de evidenciar que esto representa un problema, pues numerosos estudios han confirmado la presencia de tetraciclinas en suelo agrícola. Por lo que existe, la necesidad inmediata de contar con un marco regulatorio completo que monitoree y controle las concentraciones residuales de antimicrobianos que están siendo acumuladas en las diferentes matrices ambientales, siendo la más importante el suelo. Como destacamos anteriormente, el suelo es receptor de múltiples contaminantes químicos por lo que se deteriora con mayor rapidez, generando que su función agrícola se vea perjudicada, afectando también la industria pecuaria, e incluso toda la cadena productora de alimento.

La OTC es el antibiótico más usado en la industria pecuaria, y por lo tanto el mayor contaminante residual en el suelo agrícola. Las altas concentraciones residuales en suelo de la Oxitetraciclina están asociadas no solo a su línea de consumo, sino que también a la alta tasa de excreción que presenta este antibiótico, además la constante aplicación de heces como fertilizantes en suelo y su alta adsorción a componentes del suelo. Considerando lo anterior, comprobamos la importancia de implementar una metodología analítica capaz de detectar y cuantificar las tetraciclinas en suelo. En este trabajo se implementó un método analítico capaz de extraer correctamente los analitos, OTC y su epímero, de la matriz para ser posteriormente

detectados. Además, los resultados obtenidos en la curva de calibración demuestran que es un procedimiento con características de detección lineales, ya que supera el criterio de aceptación establecido. Por lo tanto, el siguiente paso para esta metodología es hacer una validación completa, y así poder usarse como método rutinario de laboratorio para análisis de muestra y a futuro, ser considerado como parte de un plan nacional de control de residuos en el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

AGA, D; LENCZEWSKI, M; SNOW, D; MUURINEN, J; SALLACH, J; WALLACE, J. 2016. Challenges in the Measurement of Antibiotics and in Evaluating Their Impacts in Agroecosystems: A Critical Review. *J. Environ. Qual.* 45:2.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. 2012. Residuos de medicamentos de uso veterinario. In *Toxicología alimentaria* A. M. Cameán Fernández & M. Repetto Jiménez (Eds.), Díaz de Santos. Madrid, España. pp. 394–412.

ARMALYTĖ, J; SKERNIŠKYTĖ, J; BAKIENĖ, E; KRASAUSKAS, R; ŠIUGŽDINIENĖ, R; KAREIVIENĖ, V; KERZIENĖ, S; KLIMIENĖ, I; SUŽIEDĖLIENĖ, E; RUŽAUSKAS, M. 2019. Microbial Diversity and Antimicrobial Resistance Profile in Microbiota From Soils of Conventional and Organic Farming Systems. *Front Microbiol.* 10:892.

BARCELÓ, D.; LÓPEZ, M. 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. In: *Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas*. Barcelona, España. 11 marzo 2008. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. P-26.

BAILEY, C.; SPIELMEYER, A., FRINGS, M.; HAMSCHER, G.; SCHÜTTRUMPF, H. 2015. From agricultural fields to surface water systems: the overland transport of veterinary antibiotics. *J Soils Sediments* 15:1630–1634.

BEEK, T.; WEBER, F.; BERGMANN, A. 2016a. Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM). [en línea]. Environmental Research of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Building and Nuclear Safety. 67.<https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1968/publikationen/iww_abschlussbericht_saicm_arzneimittel_final.pdf > [consulta: 15 -05- 2019].

BEEK, T.; WEBER, F.; BERGMANN, A.; HICKMANN, S.; EBERT, I.; HEIN, A.; KÜSTER, A. 2016b. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Setac.* 35(4):823-835.

BERENDSEN, B.; ELBERS, I.; STOLKER, A. 2011. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Addit. Contam. A*, 28(12): 1657–1666.

BERENDSEN, B.; LAHR, J.; NIBBELING, C.; JANSEN, L.; BONGERS, I.; WIPFLER, E.; VAN DE SCHANS, M. 2018. The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*. 204:267-276.

BERENDSEN, B.; WEGH, R.; MEMELINK, J.; ZUIDEMA, T.; STOLKER, L. 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*. 132: 258–268.

BEYENE, T. 2016. Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *J. Veterinar. Sci. Technol.* 7:285.

BOXALL, A. 2008. Fate of Veterinary Medicines Applied to Soils. In: Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer. Heidelberg, Alemania. pp. 103- 119.

BOXALL, A.; BLACKWELL, P.; CAVALLO, R.; KAY, P.; TOLLS, J. 2002. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*. 131(1–2): 19–28 (citado por WANG, S.; WANG, H. 2015. Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 9(4):565-574).

CAO, J.; WANG, C.; JI, D. 2016. Improvement of the soil nitrogen content and maize growth by earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi in soils polluted by oxytetracycline. *ScienceDirect*. 571:926-934.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2002a. Estrategia temática para la protección del suelo. In: Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. Bruselas, Bélgica. 22 septiembre 2006. Diario oficial de la Unión Europea.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2002b. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. In: 2002/657/EC: Commission Decision. 12 agosto.2002. Diario oficial de la Unión Europea. L 221: 8-36.

CE. COMISIÓN EUROPEA. 2009a. Regulación N° 37/2010 de 22 de diciembre de 2009 sobre sustancias farmacológicamente activas y su clasificación respecto de los límites máximos residuales en productos alimenticios de origen animal. Diario oficial de la Unión Europea. L 15: 1-72.

CHEN, W.; LIU, W.; PAN, N.; JIAO, W.; WANG, M. 2013. Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community. *J Soil Sci Plant Nutr* 13 (4): 967-975.

CHEN, G.; HE, W.; WANG, Y.; ZOU, Y.; LIANG, J.; LIAO, X.; WU, Y. 2014. Effect of different oxytetracycline addition methods on its degradation behavior in soil. *Sci Total Environ.* 479–480 (2014): 241–246.

CODEX ALIMENTARIUS. 2017. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. CAC/MRL 2–2017.

CONDE-CID, M.; FERNÁNDEZ, D., NÓVOA, J.; NÚÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, M.; ARIAS, M.; ÁLVAREZ, E. 2019. Experimental data and model prediction of tetracycline adsorption and desorption in agricultural soils. *ScienceDirect*.177.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11:209–227.

EMA; CVMP; ERA. 2016. Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL38. European Medicines Agency (EMA). London, U.K. 77p.

FAO. 2011. Reunión conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre los antimicrobianos de importancia crítica. **In:** Informe de la reunión de expertos. Roma, Italia. 26-30 noviembre 2007. FAO-OMS-OIE. P-68.

FLETCHER S. 2015. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environ Health Prev Med.* 20:243–252.

GHIRARDINI, A.; GRILLINI, V.; VERLICCHI, P. 2020. A review of the occurrence of selected micropollutants and microorganisms in different raw and treated manure – Environmental risk due to antibiotics after application to soil. *ScienceDirect*. 707.

GOULAS, A.; LIVOREIL, B.; GRALL, N.; BENOIT, P.; COUDERC-OBERT, C.; DAGOT, C.; PATUREAU, D.; PETIT, F.; LAOUÉNAN, C.; ANDREMONT, A. 2018. What are the effective solutions to control the dissemination of antibiotic resistance in the environment? A systematic review protocol. *Environ Evid.* 7(3).

GROS, M.; MAS-PLA, J.; BOY-ROURA, M.; GELI, I.; DOMINGO, F.; PETROVIĆ, M. 2019. Veterinary pharmaceuticals and antibiotics in manure and slurry and their fate in amended agricultural soils: Findings from an experimental field site (Baix Empordà, NE Catalonia). *ScienceDirect.* 654:1337-1349.

HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol.* 14(3):236-243.

HOU, J.; WAN, W.; MAO, D.; WANG, C. 2015. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(6):4545-54.

HUSSAIN, S.; NAEEM, M., CHAUDHRY, M.; IQBAL, M. 2016. Accumulation of Residual Antibiotics in the Vegetables Irrigated by Pharmaceutical Wastewater. *Expo Health.* 8:107–115.

INYINBOR, A.; BELLO, O.; FADIJI, A.; INYINBOR, H. 2018. Threats from antibiotics: A serious environmental concern. *ScienceDirect.* 6(1):784-793.

JI, X.; SHENA, Q.; LIUA, F.; MAB, J.; XUB, G.; WANGC, Y.; WU, M. 2012. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. *J Hazard Mater.* . 235– 236:178– 185.

KLATTE, S.; SCHAEFER, H.; HEMPEL, M. 2017. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *ScienceDirect.* 5:61-66.

KUMAR, K.; GUPTA, S.; BAIDOO, S.; CHANDER, Y.; ROSEN, C. 2005. Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *J. Environ. Qual.* 34:2082–2085.

LIN, H; JIN, D; FREITAG, T; SUN, W; YU, Q; FU, J; MA, J. 2016. A compositional shift in the soil microbiome induced by tetracycline, sulfamonomethoxine and ciprofloxacin entering a plant-soil system. *ScienceDirect*. 212:440-448.

LUKASZEWICZ, P.; BIAŁK-BIELIŃSKA¹, A.; DOŁŻONEK, J.; KUMIRSKA, J.; CABAN, M.; STEPNOWSKI, P. 2018. A new approach for the extraction of tetracyclines from soil matrices: application of the microwave-extraction technique. *Anal Bioanal Chem*. 410:1697–1707.

MA, J; ZHU, D; SHENG, D; O'CONNOR, P; ZHU, Y. 2019. Soil oxytetracycline exposure alters the microbial community and enhances the abundance of antibiotic resistance genes in the gut of *Enchytraeus crypticus*. *ScienceDirect*. 673:357-366.

MANYI-LOH, C.; MAMPHWELI, S.; MEYER, E.; OKOH, A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*. 23:795.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ Pollut*. 148(2):570–9.

MENZ, J.; OLSSON, O.; KÜMMERER, K. 2019. Antibiotic residues in livestock manure: Does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment?. *ScienceDirect*. 379.

OCDE; FAO. 2019. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2019-2028. Edición 2019. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma, Italia. 344p.

OIE. 2018. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. **In:** Comité Internacional de la OIE en su 75.^a Sesión General (Resolución N° XXVIII). París, Francia. Mayo 2018. P-10.

OK, Y.; KIM, S.; KIM, K.; LEE, S.; MOON, D.; LIM, K.; SUNG, J.; HURSO. YANG, J.; 2011. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province. *Environ Monit Assess* 174:693–701.

OMS. 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 232 pág.

PAN, M.; CHU, L. 2016. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *ScienceDirect*. 126:228-237.

PAN, M.; CHU, L. 2017. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Sci. Total Environ*. 599:500–512.

PRO, F. 2016. Valoración de efectos toxicológicos de oxitetraciclina en organismos terrestres y acuáticos mediante el empleo de sistemas multi-especie en el suelo. Memoria para optar al grado de doctor. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. 161 p.

QIN, J.; XIONG, H.; MA, H.; LI, Z. 2019. Effects of different fertilizers on residues of oxytetracycline and microbial activity in soil. *Environ Sci Pollut Res*. 26:161–170.

QUAIK, S., EMBRANDIRI, A.; RAVINDRAN, B.; HOSSAINA, K., AL-DHABIF, N., ARASU, M., IGNACIMUTHU, S.; ISMAIL, N. 2020. Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. *ScienceDirect*. 32(2):1300-1305.

RABØLLE, M.; SPLIID, N. 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline, and tylosin in soil. *Chemosphere*. 40(7): 715–722 (citado por WANG, S.; WANG, H. 2015. Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Environ. Sci. Eng*. 9(4):565-574).

SLANAA, M; DOLENCB, M. 2013. Environmental Risk Assessment of antimicrobials applied in veterinary medicine. A field study and laboratory approach. *Environ Toxicol Pharmacol* 35:131–141.

[SAG] SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2009. Protocolo de toma de muestras de suelo. Gobierno de Chile. [en línea] <<https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/Protocolo%20toma%20muestras%20suelo.pdf>> [consulta: 20-03-2019].

VAN BOECKEL, T.; BROWERB, C.; ILBERTC, D. M.; GRENFELLA, B.; LEVINA, S.; ROBINSONI, T.; TEILLANTA, A.; LAXMINARAYANB, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112(18): 5649–5654.

VAN BOECKEL, T.; GLENNON, E.; CHEN, D.; GILBERT, M.; ROBINSON, T.; GRENFELL, B.; LEVIN, S.; BONHOEFFER, S.; LAXMINARAYAN, R. 2017. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* 357: 1350-1352.

VICH. 2000. Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPs) - Phase I. **In:** VICH topic GL6 (Ecotoxicity Phase I). London, U.K. 20 Junio 2000. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Information Technology Unit. pp. 1-9.

VICH. 2004. Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPs) - Phase II. Bruxelles. **In:** Committee for medicinal products for veterinary use. London, U.K. Octubre 2004. European Medicines Agency (EMA). pp. 1-39.

WANG, S.; WANG, H. 2015. Adsorption behavior of antibiotic in soil environment: a critical review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 9(4):565-574.

ZHANG, H.; ZHOU, Y.; HUANG, Y.; WU, L.; LIU, X.; LUO, Y. 2016. Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. *ScienceDirect.* 152:229-237.

ANEXOS

Anexo 1. Metodología analítica para extracción basada en Lukaszewicz *et al.* 2018.

Metodología analítica para extracción de OTC y 4-epi-OTC en Suelo mediante HPLC-MS/MS

Metodología de extracción:

1. Pesar 1 ± 0.01 g de Suelo en un tubo Falcon de 50 mL.
2. Fortificar todas las muestras con Estándar Interno Tetraciclina D6 (curvas y controles positivos fortificar con estándar OTC y 4-epi-OTC).
3. Agregar 20 mL de ACN (acetonitrilo) y 10 ml 0,1 M EDTA: tampón McIlvaine (pH 4,0).
4. Agitar en vortex por 30 segundos.
5. Sonicar por 10 minutos a una potencia de 400 W.
6. Centrifugar por 10 minutos a 3.360 g.
7. Filtrar todo el sobrenadante por lana de vidrio en jeringa de 10 mL con filtro de jeringa millex de 0.2 μ m, rescatar el filtrado en un tubo falcon limpio de 50 mL. Pasar toda la muestra y presionar con émbolo.
8. Centrifugar por 10 minutos a 3.360 g.
9. Acondicionar columna de extracción de fase sólida (SPE) Oasis HLB (6cc) con 5 mL de metanol y 5 mL de agua MiliQ.
10. Cargar la muestra por la columna Oasis HLB y eliminar.
11. Lavar las columnas con 5 ml de agua.
12. Secar al vacío por 5 minutos.
13. Eluir con 10 ml de metanol
14. Llevar las muestras a sequedad bajo flujo de Nitrógeno en baño de agua entre 40-50°C.
15. Reconstituir con 500 μ L de solución Metanol-Agua grado HPLC (9:1).
16. Agitar en Vortex por 5 minutos
17. Sonicar por 5 minutos y centrifugar por 5 minutos a 3.360 g.
18. Pasar a tubo eppendorf de 1,5 mL
19. Centrifugar por 10 min a 2.245 g.
20. Pasar a vial vidrio mediante filtro de jeringa millex de 0.2 μ m (rotulado con analito, matriz y muestra).

**Metodología analítica para extracción de OTC y 4-epi-OTC en Suelo mediante
HPLC-MS/MS**

Metodología de extracción:

1. Pesar 1 ± 0.01 g de Suelo en un tubo Falcon de 50 mL.
2. Fortificar todas las muestras con Estándar Interno Tetraciclina D6 (curvas y controles positivos fortificar con estándar OTC y 4-epi-OTC).
3. Agregar 8 mL 0,1 M EDTA: tampón McIlvaine (pH 4,0) y 2 mL de ACN (acetonitrilo).
4. Agitar en vortex por 10 minutos.
5. Sonicar por 5 minutos a una potencia de 400 W.
6. Centrifugar por 10 minutos a 3.360 g.
7. Filtrar todo el sobrenadante por lana de vidrio en jeringa de 10 mL con filtro de jeringa millex de 0.2 μ m, rescatar el filtrado en un tubo Falcon limpio de 50 mL. Pasar toda la muestra y presionar con émbolo. Diluir con 13 mL de tampón EDTA:McIlvaine
8. agitar en vortex por 2 minutos y centrifugar por 10 minutos a 3.360 g.
9. Acondicionar columna de extracción de fase sólida (SPE) Oasis HLB (6cc) con 5 mL de metanol y 5 mL de agua MiliQ.
10. Cargar la muestra por la columna Oasis HLB y eliminar.
11. Lavar las columnas con 5 ml de agua.
12. Secar al vacío por 5 minutos.
13. Eluir con 10 ml de metanol
14. Llevar las muestras a sequedad bajo flujo de Nitrógeno en baño de agua entre 40-50°C.
15. Reconstituir con 500 μ L de solución Metanol-Agua grado HPLC (2:3).
16. Agitar en Vortex por 5 minutos
17. Sonicar por 5 minutos y centrifugar por 5 minutos a 3.360 g.
18. Pasar a tubo eppendorf de 1,5 mL
19. Centrifugar por 10 min a 2.245 g.
20. Pasar a vial vidrio mediante filtro de jeringa millex de 0.2 μ m (rotulado con analito, matriz y muestra).

Anexo 3. Carta de fortificación

PREPARACIÓN SOLUCIÓN INTERMEDIA					
ANALITOS	S.S (µg/ml) (ppm)	VOL. FINAL (mL)	ALICUOTA (mL)		CONC. FINAL S.I (µg/g) (ppm)
OTC 4-epi-OTC	1000	50	0,05	SS	1
			TOMAR 50 µl de cada estándar S.S y aforar en 50 ml con Metanol grado HPLC		

FORTIFICACIÓN CURVA DE CALIBRACIÓN				
ANALITOS	S.I (ng/ml) (ppb)	PESAJE MATRIZ (g)	ALICUOTA (µl)	CONC. FINAL (ng/g)
OTC; 4-epi-OTC	1000	1	25	25
			50	50
			75	75
			100	100
			150	150

PREPARACIÓN ESTANDAR INTERNO					
ANALITOS	S.S (µg/ml) (ppm)	VOL. FINAL (mL)	ALICUOTA (mL)		CONC. FINAL S.I (µg/g)
Tetraciclina- D6	1000	50	0,05	SS	1
			TOMAR 50 µl de cada estándar S.S y aforar en 50 ml con Metanol grado HPLC		

FORTIFICACIÓN MUESTRAS				
ANALITOS	S.I (ng/ml)	PESAJE MATRIZ (g)	ALICUOTA (µl)	CONC. FINAL (ng/g)
Tetraciclina-D6	1000	1	25	25

Anexo 4. Condiciones cromatográficas del método analítico para la extracción de Oxitetraciclina y 4-epi-OTC a partir de suelo.

**Condiciones cromatográficas para el método de extracción de OTC y 4-epi-OTC en
Suelo mediante HPLC-MS/MS**

- **Fases móviles:**
 - Fase móvil A: 0.1% Acido fórmico en agua (pH 2.7 +/- 0.2).
 - Fase móvil B: 0.1% Acido fórmico en metanol (pH 3.0 +/- 0.3).
- **Flujo:**
 - 0,2 ml/min
- **Columna analítica:**
 - Sunfire™ C 18 3.5 µm, 150 × 2.1 mm (Waters Corp).
- **Volumen de Inyección:**
 - 20 µl.
- **Temperatura de la columna:**
 - 35 °C +/- 1°C.

Anexo 5. Carta Grantt

Objetivos Específicos	Actividades	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Objetivo específico 1: Identificar el impacto de los antibióticos de las familias de las tetraciclinas como contaminantes ambientales en suelo agrícola.	Búsqueda de información						
	Selección de los estudios						
	Análisis de la información						
Objetivo específico 2: Determinar la importancia de contar con metodologías analíticas para detectar tetraciclinas en suelo agrícola.	Búsqueda de información						
	Selección de los estudios						
	Análisis de la información						
Objetivo específico 3: Implementar una metodología analítica para detectar oxitetraciclina y 4-epi-otc en suelo agrícola y proyectar sus potenciales en la gestión de impacto ambiental de la producción animal.	Revisión bibliográfica de metodologías analíticas para extracción de OTC y 4-epi-OTC						
	Desarrollo de carta de trabajo para extracción de residuos desde la matriz						
	Extracción de OTC y 4-epi-OTC desde suelo en base a carta de trabajo establecida						
	Ajustes de condiciones cromatografías						
	Análisis de muestras						
	Análisis de resultados						
Presentación avance							
Escritura proyecto final							
Presentación proyecto final							