



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

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
MEDIANTE LC-MS/MS PARA LA DETECCIÓN DE
OXITETRACICLINA Y SU METABOLITO ACTIVO EN
DEYECCIONES DE POLLOS BROILER.**

Gigliola Elvira Terraza Rubio

Proyecto de 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 VID 2019 ENL07/19 Antimicrobials
SANTIAGO, CHILE 2020

Contenido

<u>INTRODUCCIÓN</u>	6
<u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	8
- <u>Industria Avícola</u>	8
- <u>Subproductos de la industria avícola</u>	9
- <u>Oxitetraciclina y su uso en la producción avícola</u>	10
- <u>Presencia de antibióticos en deyecciones: riesgos y consecuencias</u>	11
- <u>Estudios de validación</u>	12
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	13
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	13
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
- <u>Implementación del método analítico</u>	14
- <u>Procedencia de las muestras</u>	14
- <u>Reactivos y Estándares</u>	14
- <u>Proceso de extracción de Oxitetraciclina desde la matriz de deyecciones de pollo</u>	15
- <u>Parámetros para la validación de metodologías analíticas</u>	16
- <u>Análisis Instrumental</u>	18
- <u>Animales experimentales y condiciones de manejo</u>	19
- <u>Agentes antimicrobianos</u>	19
- <u>Obtención de muestras</u>	20

Índice de Tabla

<u>Tabla 1: ion precursor e iones productos con sus respectivos tiempos de retención</u>	22
<u>tabla 2: configuración del cromatógrafo api sciex 5500 TM</u>	23
<u>tabla 3: composición de la fase móvil</u>	23
<u>tabla 4: composición de la fase móvil</u>	24
<u>tabla 5: condiciones espectrométricas de masas específicas de la sustancia</u>	24
<u>tabla 6: promedio de los tiempos de retención y su cv% a partir de la inyección de seis drogas puras según los analitos de interés</u>	25
<u>tabla 7: límite de detección y cuantificación con sus valores instrumentales.</u>	27
<u>tabla 8: r² y cv% de las tres curvas de calibración a las concentraciones: 0,12, 80, 120 y 160 µg/kg-1.</u>	27
<u>tabla 9: promedio, des. Est. Y cv% de la recuperación de otc y 4-epi-otc en matriz de deyecciones de pollo.</u>	28
<u>tabla 10: cálculo del promedio, la ds y el cv de la repetibilidad para cada nivel de fortificación de otc y 4-epi-otc.</u>	28
<u>tabla 11: cálculo del promedio, la ds y el cv de la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de fortificación de otc y 4-epi-otc.</u>	29
<u>tabla 12: promedio, des. Est. Y cv de la estabilidad para muestras de deyecciones de pollo broiler.</u>	29
<u>tabla 13: concentración de otc y 4-epi-otc en deyecciones de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (oxitetraciclina al 10% suspensión oral)</u>	30

RESUMEN

Estudios anteriores han demostrado que existe la presencia de residuos de antibióticos en deyecciones de aves. Esto cobra relevancia, debido a que esta matriz es incorporada a diferentes áreas productivas como la alimentación animal o la fertilización de suelos. Dado lo anterior, se hace necesario contar con una metodología analítica que permita extraer de manera confiable y precisa Oxitetraciclina y su metabolito activo 4-epi-Oxitetraciclina en matriz de deyecciones de pollo boiler. EL objetivo de la presente memoria de título fue desarrollar una metodología analítica mediante LC-MS/MS, para la detección Oxitetraciclina y su metabolito activo 4-epi-Oxitetraciclina en deyecciones de pollo Broiler. Esta metodología fue implementada y validada en Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET). En conjunto con llevo a cabo la verificación a través de un grupo experimental tratado con el analito de interés a dosis terapéuticas.

Los resultados obtenidos señalan que la metodología implementada cumple con los parámetros establecidos por la Comisión de decisión 2002/657/CE, por ende, es una metodología analítica válida para los objetivos establecidos, siendo específica, precisa, lineal, con una recuperación adecuada. De acuerdo con la FDA: VICH GL49 se determinó un límite de detección de 12,13 y 12,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Oxitetraciclina y 4-epi-oxitetraciclina correspondientemente. Para el límite de cuantificaciones, los valores obtenidos fueron de 36,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para oxitetraciclina y 36,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el caso de 4-epi-oxitetraciclina. Los rangos de recuperación oscilaron entre 98-101% para todas las concentraciones estudiadas.

El análisis de las muestras del grupo experimental de pollos boiler tratados con dosis terapéuticas de oxitetraciclina vía oral, arrojó como resultado concentraciones crecientes tanto del analito de interés como su epímero, con resultados que oscilaron entre 206-1642 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para oxitetraciclina y 89 a 587 ng/kg para 4-epi-oxitetraciclina.

INTRODUCCIÓN

La industria avícola representa un papel fundamental en nuestra sociedad debido a la gran demanda de la población por esta fuente proteica, a causa de su precio asequible y gran calidad nutricional. Al tratarse de una producción de carácter intensivo, la probabilidad del contagio de enfermedades infecciosas se incrementa, donde las de mayor prevalencia son las de origen bacteriano.

Para combatir estas patologías la industria cuenta con herramientas terapéuticas, como los antibióticos, siendo la oxitetraciclina, nombre comercial de este antibiótico, la más extensamente utilizada para el tratamiento de enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum* y *sinovia* entre otras, por su amplio espectro y facilidad de aplicación en masas.

A pesar de los beneficios que trae el uso de antibióticos de manera terapéutica en pollos Broiler, existen riesgos asociados a su utilización por la persistencia de residuos en los tejidos comestibles. Debido a esto, organismos internacionales han establecidos regulaciones para controlar la presencia de estos residuos de antibióticos en los productos. Sin embargo, en el caso de los subproductos no existe ningún tipo de monitoreo o vigilancia.

Es así como la cama de pollo Broiler que es un subproducto de la producción avícola, es utilizada en diferentes actividades como en alimentación animal y la fertilización de suelos, podría representar un riesgo para la salud pública, al persistir en este tipo de subproducto residuos farmacológicos, debido a que muchos de estos son de excreción renal y biliar. Un ejemplo de esto fármacos es la oxitetraciclina, por ende, existe cierta probabilidad de encontrar esta tetraciclina y/o su metabolito activo en las deyecciones que componen la cama de Broiler.

La inexistencia de un control de la presencia de residuos antibióticos en la cama de pollo Broiler, trae consecuencias tanto en el medioambiente donde es utilizada como fertilizante, como en la flora intestinal de los animales alimentados con este subproducto.

A causa de lo anterior y del riesgo que representa la introducción de oxitetraciclina a la cadena alimentaria a través del uso de cama de pollo Broiler en diferentes actividades, es importante implementar y validar una metodología que sea capaz de determinar la presencia de oxitetraciclina y su epímero (4-epi-oxitetraciclina) en matriz de deyecciones de pollo Broiler.

El objetivo de la presente memoria de título es implementar y validar una metodología analítica, con el fin de demostrar que el método implementado para la detección de oxitetraciclina y su epímero en deyecciones de pollo Broiler, es adecuado para el fin propuesto y la entrega de resultados confiables y reproducibles.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Industria Avícola

La industria avícola en nuestro país representa un importante papel en la producción de carnes, debido a que en términos de consumo representa el 43% del total en el año 2019(ASPROCER,2019). Esto se debe a su estatus como la fuente más económica y más asequible de proteínas cárnicas que ofrece el mercado en nuestro país (Giacomozzi, 2015).

La producción está concentrada geográficamente en tres regiones, Valparaíso, Metropolitana y de O'Higgins, representado en conjunto el 94,6% de la producción (SAG, 2011). Este sector productivo ha evolucionado en forma notable en las últimas décadas, consolidándose como una de las principales industrias agropecuarias chilenas. El beneficio total ha crecido a una tasa anual promedio de 3% en los últimos veinte años. Gran parte de la producción nacional se obtiene bajo un modelo de integración vertical lo que ha permitido un fuerte crecimiento del rubro y de las exportaciones (Giacomozzi, 2015).

Para productos generados por la industria avícola de directo consumo humano se establecen límites máximos residuales de medicamentos veterinarios. El Codex Alimentarius establece estos límites para tejidos comestibles como hígado, riñón, músculo y huevos (CX/MRL, 2018).

- **Subproductos de la industria avícola**

Este sector productivo al igual que otros, genera subproductos que no son utilizados de forma directa por parte de los consumidores. Estos subproductos representan costos ambientales que incluyen energía, gran consumo de agua y la producción de grandes sólidos totales. Sin embargo, existen alternativas para la utilización de estos subproductos, tal como se muestra en el estudio de Seidavi *et al* (2018), donde teniendo conciencia del gran impacto ambiental que se genera por la producción y posteriores manejos de los residuos de la industria, se postulan nuevos horizontes para estos subproductos, como por ejemplo utilizarlos en la alimentación y salud humana, como también para la producción de energías como el biodiesel.

Un residuo generado por la industria avícola es la cama de pollo boiler, la cual está compuesta por deyecciones, plumas, restos de alimentos y cantidades variables de material absorbente (Ziller, 2006), lo que resulta ser una buena fuente de proteínas, energía y minerales. Por esta razón, es ampliamente utilizada en la alimentación de ganado bovino, dado que estos poseen un sistema digestivo único que permite que utilicen subproductos como fuentes de nutrientes dietéticos (Gadberry, 2014).

El desarrollo de las explotaciones avícolas, particularmente en la producción de pollos de engorde, trae la posibilidad de aprovechamiento de la cama de Broiler para otras actividades, por ejemplo, como fuente de nutrientes para la agricultura. La elevación del costo de los fertilizantes comerciales y el aumento de la contaminación ambiental, hacen del uso de residuos orgánicos en la agricultura una opción atractiva, desde el punto de vista económico (Silva *et al*, 2011).

- Oxitetraciclina y su uso en la producción avícola

Entre los diferentes antibióticos utilizados en la industria avícola se encuentra la oxitetraciclina, antibiótico de la familia de las tetraciclinas, descubierto en el año 1950, aislada desde un cultivo de *Streptomyces rimosus*. El mecanismo de acción de oxitetraciclina (OTC) es igual que para todas las tetraciclinas, inhibiendo de la síntesis de las proteínas bacterianas por unirse a la subunidad menor 30S del ribosoma, específicamente el sitio aminoacilo. La inhibición se lleva a cabo mediante la fijación del Aminoacil-tRNA al sitio A, impidiendo el primer paso de la fase de alargamiento (Chopra & Roberts, 2001).

La principal vía de administración de las tetraciclinas es la oral, sin embargo, la OTC puede ser también administrada por vía endovenosa e intramuscular. Cuando son administradas vía oral, su absorción varía dependiendo del tipo de tetraciclina, en general su absorción a nivel estomacal e intestinal es menor al 80%. Se metabolizan en el hígado y se eliminan sin metabolizar a través de las vías biliar y renal. La concentración en la bilis es entre 5 y 25 veces superior a la concentración sérica (Vicente & Pérez, 2010).

Típicamente la OTC ha sido un antimicrobiano utilizado en el tratamiento oral de patologías gastrointestinales y respiratorias de pollos de engorde (Odoe *et al*, 2015). Los agentes bacterianos que son sensibles a este antimicrobiano son: *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum* y *sinoviae*, *Avibacterium paragallinarum* y *Escherichia coli*. Actualmente el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) autoriza 5 formulaciones farmacéuticas de oxitetraciclinas, cuya principal vía de administración es la oral (SAG, 2019).

- **Presencia de antibióticos en deyecciones: riesgos y consecuencias**

Varios antibacterianos utilizados en medicina veterinaria han sido detectados en las deyecciones del animal tras aplicación terapéutica (Slana *et al*, 2014), esto se debe a la pobre absorción que poseen los antibióticos, tanto así, que se describe que entre el 30-90% de estos es excretado como metabolito activo. Debido a lo anterior esperable una alta presencia de estos fármacos en orina y heces (Berendsen *et al*, 2015).

En los animales la presencia de antibióticos en subproductos utilizados en la alimentación de estos puede repercutir negativamente en el microbiota comensal del huésped, y afectar la funcionalidad intestinal de este último (Rodríguez, 2016). En rumiantes, es sabido que la fermentación microbiana en rumen y el intestino inferior suministra la mayor parte de la energía y las proteínas requeridas, sin embargo, esto puede afectarse por los antimicrobianos debido a que causan un desequilibrio en el microbiota (Ji *et al*, 2018).

Como se mencionó, el uso de la cama de Broiler como fertilizante genera cierta probabilidad de que residuos de medicamentos, y en este caso puntual antibióticos y sus metabolitos, sean introducidos en el suelo. Una vez introducidos en la tierra, los antibióticos pueden ingresar al medio acuático indirectamente a través de escorrentía superficial y/o la lixiviación hacia aguas subterráneas (Carvalho & Santos, 2016).

Los cultivos pueden absorber estos antibióticos presente en la cama de Broiler, sin embargo, normalmente su captación por las plantas es muy pequeña, pero en algunos casos puede ser suficiente para inducir efectos fitotóxicos en el crecimiento de las plantas (Bártíková *et al*, 2016).

En los seres humanos, la oxitetraciclina representa un riesgo para la salud debido a que incluso en concentraciones muy bajas, estos fármacos estimulan la selección de agentes microbianos resistentes en el medio ambiente e incluso pueden causar alergias graves o toxicidad a los seres humanos (Kwon-Rae *et al*, 2010; Andersson y Hughes, 2014).

- **Estudios de validación**

La validación de una metodología analítica es de suma importancia, ya que corresponde al proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas o para el uso indicado (FDA, 2015).

Organismos reconocidos mundialmente como *Codex Alimentarius*, la FDA (*Food and Drug Administration*) VICH GL49 *Validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011) y la Comunidad Europea decisión de la comisión 2002/657/CE (CE, 2002), establecen directrices para la validación de métodos analíticos.

La importancia de la validación de los métodos analíticos radica en que los resultados obtenidos a partir de estos sean confiables y precisos. Por lo tanto, resulta esencial dentro de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables. Existen diferentes estudios sobre la validación de metodologías analíticas en productos de origen animal, como por ejemplo el estudio de Cornejo *et al* en el año 2017, donde se utilizó matrices de hígado, músculo y plumas para la detección de OTC y 4-e pi-OTC. Por otro lado, en el caso de Pokrant *et al* en el año 2018 y Maddaleno *et al* en el año 2018, publicaron la validación de un método analítico de acuerdo a un protocolo de interno basado en la decisión 657/2002/EC de tetraciclinas y lincomicina, respectivamente.

La extracción de antibióticos desde heces se ha realizado con anterioridad, estableciendo así métodos conocidos para llevar a cabo este proceso. Jasen *et al.* (2019), evaluó 24 solventes para la extracción de antibióticos (tetraciclinas, quinolonas, macrolidos, lincosamidas y sulfonamidas). Por otra parte, se ha estudiado la persistencia de antibióticos en deyecciones de diferentes especies, como lo demuestra Berendsen *et al.* (2018), donde se detectaron tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas, macrolídeos, lincosamidas y pleuromultilinas.

OBJETIVO GENERAL

Implementar, optimizar y validar una metodología analítica para detectar y cuantificar Oxitetraciclina y su epímero (4-epi-OTC) en deyecciones de pollos Broiler.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Implementar y optimizar una metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su epímero (4-epi-OTC) en deyecciones de pollo Broiler.
- 2.** Validar la metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su epímero (4-epi-OTC) en la matriz de interés.
- 3.** Verificar la metodología analítica planteada, mediante la cuantificación de los analitos de interés en deyecciones de pollos tratados con dosis terapéutica de una formulación comercial de Oxitetraciclina.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Implementación del método analítico

El trabajo de implementación y validación 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, Of 2005.

Para la detección de OTC y 4-epi-OTC en deyecciones de pollo, se utilizó una metodología analítica para oxitetraciclina y su epímero (4-epi-OTC) por LC-MS/MS, la cual fue desarrollada en el laboratorio basándose lo establecido por Berendsen *et al* 2015.

- Procedencia de las muestras

Para la validación del método se utilizaron muestras de deyecciones de pollos provistas por el Departamento de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile las cuales fueron inspeccionadas previamente para descartar la presencia de antibióticos.

- Reactivos y Estándares

Para el análisis y cuantificación de OTC fueron utilizados estándares con pureza certificada (88.1% de pureza) adquiridos de Sigma Aldrich. El estándar interno (EI) fue Tetraciclina d-6 de pureza certificada adquirida de Toronto Research Chemicals (> 90% de pureza). El objetivo del EI es corregir la señal y permitir cuantificar de la manera correcta, ya que compensa posibles errores derivados de la manipulación de la muestra (Oliveira *et al*, 2010).

Para la determinación de Oxitetraciclina en la matriz de deyecciones se utilizaron los siguientes reactivos y solventes: Buffer EDTA-McIlvain, agua destilada, desionizada generada en el laboratorio mediante el sistema Milli-Q (Milli-pore; resistencia $\geq 18,2 \text{ M}\Omega$), metanol grado HPLC (J.T. Baker o similar), acetonitrilo y columnas de extracción en fase sólida (SPE) OASIS™ HLB® (6cc).

- Proceso de extracción de Oxitetraciclina desde la matriz de deyecciones de pollo

Las muestras de la matriz fueron obtenidas directamente del tracto intestinal de los pollos. Las cuales, como se mencionó con anterioridad, fueron facilitada por el Departamento de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Para la extracción de OTC desde deyecciones, se pesó 1g de muestra en un tubo Falcon de 50 ml, al cual se le añadió el EI Tetraciclina-d6 (25ng/g) y se realizó la fortificación con OTC Y 4-epi-OTC de cada muestra. Posterior al proceso de fortificación se procedió a añadir 8 ml de buffer EDTA-McIlvain y 2 ml de acetonitrilo. La muestra fue agitada en vórtex durante 10 minutos y sonicada por 5 minutos. Se centrifugo a 3500 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante fue purificado mediante un filtro de lana de vidrio Whatman®. El filtrado fue recibido en un nuevo tubo falcon de 50 ml y se agregó 13 ml de buffer EDTA-McIlvain. Nuevamente se agitó por 2 minutos y se centrifugo a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se aplicó completamente en columnas de extracción de fase sólida (SPE) OASIS™ HLB (6cc), previamente acondicionadas con 5 ml de metanol y 5 ml de agua MilliQ.

Las columnas se lavaron con 5 ml de agua MilliQ y secó al vacío por 5 minutos. Una vez secas las columnas se eluyó con 10 ml de metanol; el eluido fue recibido en un tubo de vidrio, el cual posteriormente fue puesto bajo flujo de nitrógeno, a 40-50°C para secar el contenido.

Posterior al secado, se procedió a reconstituir con 200 µl de metanol y 300 µl de agua MilliQ. Las muestras reconstruidas fueron agitadas, sonicadas y centrifugadas a 1700 rpm durante 5 minutos. El extracto se traspasó a tubo Eppendorf y centrifugó a 3500 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Finalmente, se traspasó a viales utilizando una jeringa de 1 ml, filtrando por millipore, para poder ser leídas por el equipo. Todo el proceso descrito con anterioridad se describe en el anexo 1.

- **Parámetros para la validación de metodologías analíticas**

La validación del método analítico se realizó siguiendo las recomendaciones de la Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). Basándose en estos documentos se generó un protocolo de validación, que contempla la evaluación de diferentes parámetros con el fin de que la metodología sea válida para su uso en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Los parámetros a evaluar corresponden a:

- i. Tiempo de retención del analito:** Para determinar el tiempo de retención se analizaron 6 repeticiones del fármaco puro para evaluar los tiempos de retención. Dentro de un mismo set (muestras que se analizaron en un mismo momento) se aceptó un coeficiente de variación (CV) $\leq 2,5\%$.
- ii. Especificidad:** Es la capacidad de un método de distinguir entre el analito medido y otra sustancia. Para los métodos analíticos, es importante el poder de discriminación entre el analito y las sustancias estrechamente relacionadas (isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, constituyentes de la matriz, etc.). Se analizaron 20 muestras blanco de cada matriz, para visualizar si existe interferencia en la región de interés, en la cual se espera elución de la Oxitetraciclina.

- iii. Límite de Detección (LD):** Corresponde a la concentración mínima que se puede detectar en forma confiable y precisa. Para determinar el LD se fortificaron muestras a distintas concentraciones y se seleccionaron la concentración en que la relación señal-ruido es a lo menos 2 ó 3:1. Esta concentración seleccionada se repitió 20 veces.
- iv. Límite de Cuantificación (LC):** Corresponde a la concentración mínima que se puede cuantificar de forma confiable y precisa, por lo cual solo los valores sobre esta concentración son efectivamente cuantificables.
- Para determinar la LC, al LD se le suma 1,64 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en las 20 muestras fortificadas analizadas previamente. Se acepto si el resultado cumple con la relación señal-ruido mínima de 10:1.
- v. Linealidad de la curva de calibración:** Es la relación entre el nivel de concentración y el factor de respuesta lineal. Se utilizaron cinco concentraciones, siendo la concentración más baja igual al LD. Se realizaron tres curvas y un análisis de sus pendientes. Se aceptaron los rangos de concentración si $R^2 \geq 0,99$ y el CV entre las pendientes sea $\leq 25\%$.
- vi. Recuperación:** Corresponde al porcentaje de la verdadera concentración de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico. Para la determinación de la recuperación se seleccionaron 18 muestras blanco, los cuales se fortifican en tres niveles (6 muestras por cada nivel). Los niveles de recuperación deben estar entre un 50-120%.
- vii. Precisión:** se obtiene mediante la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio.
- a. Repetitividad:** se eligieron 18 muestras blancos de diferentes fuentes y se fortificaron al nivel de tres puntos de la curva de calibración (seis muestras fortificadas a cada nivel).
 - b. Reproducibilidad intralaboratorio:** Se eligen 18 muestras de muestras de iguales o diferentes fuentes. Se realizaron seis curvas fortificadas de diferentes fuentes a los mismos tres niveles que en repetitividad, pero los análisis se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones, como por diferentes analistas, días e instrumentos.

viii. **Estabilidad:** Se refiere al grado de degradación a que la sustancia está sometida en el tiempo. Para determinar estabilidad del analito en la solución se prepararon nuevas soluciones madre del analito y se diluyeron para obtener el número suficiente de alícuotas de cada concentración seleccionada en torno al límite de funcionamiento mínimo exigido. Se prepararon soluciones de los analitos empleados en la fortificación y en la solución del análisis final (solución de reconstitución). El tiempo de almacenamiento fue de una y cuatro semanas.

- **Análisis Instrumental**

El análisis de las muestras de deyecciones de aves se llevará a cabo mediante el uso de cromatografía líquida (bomba binaria Agilent 1260, autosampler Agilent 1290 y horno TCC Agilent 1290), acoplada a un espectrómetro de masas API 5500 de Applied Biosystems Sciex.

La cromatografía es un método analítico empleado en la separación, identificación y cuantificación de componentes químicos en mezclas complejas. La espectrometría de masas aporta a los métodos cromatográficos una sensibilidad y poder de confirmación mucho más elevados. Estas técnicas analíticas son las que más se ha extendido en las últimas décadas para la confirmación de residuos de antibióticos en productos de origen animal (La Rosa, 2016).

Los valores obtenidos desde la cromatografía acoplada al espectrómetro de masas se expresan mediante un cociente entre el área bajo el pico obtenida desde el analito con el área bajo el pico obtenida desde el estándar interno, denominándose este resultado como Área Ratio, expresada en la siguiente fórmula:

$$\text{Área Ratio} = \frac{\text{Área de Analito}}{\text{Área de EI}}$$

-

Animales experimentales y condiciones de manejo

Con el fin de verificar el método implementado se analizaron muestras de un grupo experimental de pollos Broiler de engorda machos de la línea genética Ross 308 tratados con Oxitetraciclina. Los animales fueron criados en suelo en las instalaciones pertenecientes al Depto. Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. En esta instalación se mantuvo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$), humedad (50-60%), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado, el cual fue formulado de acuerdo con los requerimientos nutricionales de la raza. El protocolo de manejo y supervisión de las aves experimentales se basó en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010). En lo que respecta al sacrificio de las aves, se respetó el Reglamento (CE) N° 1099/2009 relativo a la protección de los animales en el momento del sacrificio (CE, 2009b). Conjuntamente se solicitó un certificado de aprobación para uso de los animales experimentales al Comité institucional de cuidado y uso de animales y se respetaron las condiciones de bienestar animal aprobadas por este (anexo 3).

- Agentes antimicrobianos

En nuestro país, se encuentran disponibles 5 formulaciones de oxitetraciclina, las que se encuentran incluidas en el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Veterinario del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) autorizados por el para su uso en aves de engorda (SAG, 2019).

El tratamiento en las aves fue con una formulación comercial oxitetraciclina al 10% polvo oral, cuyo período de resguardo es de 7 días. Se administro mediante sonda orogástrica para asegurar el consumo del antibiótico a una dosis de 80mg/kg PV durante 7 días. Este antimicrobiano fue seleccionado debido a que es ampliamente utilizado en aves de engorde para el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

- Obtención de muestras

Las muestras fueron recolectadas de manera individual en un grupo experimental compuesto de 8 animales y de un grupo control compuesto de 12 aves. Se consideraron 4 muestreos los días 4, 5, 8, 10 después del tratamiento. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en bolsas plásticas estériles y debidamente rotuladas hasta su posterior procesamiento y análisis.

- Cuantificación de los residuos de OTC y 4-epi-Oxitetraciclina

Posterior a la extracción de los residuos desde las muestras de deyecciones obtenidas desde los animales experimentales tratados y su análisis cromatográfico, se llevó a cabo la cuantificación de OTC y 4-epi-OTC mediante el cálculo utilizando la ecuación de la recta ($y = a+bx$, en donde y = área, a = intercepto en el eje y , x = concentración, b = pendiente) obtenida a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración. Estas curvas se construyeron usando muestras blanco (muestras obtenidas desde aves control) fortificadas a diferentes concentraciones elegidas y equidistantes y fueron analizadas junto a las muestras experimentales. Se considerará un coeficiente de determinación (R^2) ≥ 0.99 , para efectos de la cuantificación.

- Bioseguridad

Debido al riesgo que representa el manejo de agentes químicos y animales experimentales, se tomaron en consideración las indicaciones expuestas en el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (2008), adjuntándose en el anexo 2 el certificado del comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile

RESULTADOS

- Objetivo específico N°1:

Implementar una metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su epímero (4-epi OTC) en matriz de deyecciones de pollo Broiler.

Para implementar la metodología analítica para la extracción de OTC y 4-epi-OTC en deyecciones

y cama se utilizó como referencia el estudio previamente publicado, “*Determination of Chlortetracycline Residues, Antimicrobial Activity and Presence of Resistance Genes in Droppings of Experimentally Treated Broiler Chickens*”, por Cornejo *et al.* (2018). En base a esta metodología se elaboró una carta de trabajo, la cual puede ser revisada en el anexo N°4.

Utilizando como referencia este estudio, se realizaron modificaciones a la metodología analítica, debido a que al tratarse de una matriz completa, los cambios realizados tienen como objetivo optimizar la recuperación del analito de interés. Dentro de los cambios se incluye la reducción del gramaje de la muestra, este cambio trae como consecuencia una disminución en la sensibilidad del método. Por otro lado, se aumentó el volumen de solventes, tanto de acetonitrilo como de McIlvaine-EDTA, al realizar este cambio se aumenta la recuperación del método. Finalmente, el último cambio realizado, fue el cambio de lana de vidrio a filtros de microfibra de vidrio, con la finalidad de mejorar la limpieza o clean up de la muestra.

Con la finalidad de establecer si la metodología analítica cumple con el objetivo de la extracción de los analitos OTC y 4-epi-OTC desde la matriz de interés. Los analitos después del proceso de extracción se detectaron mediante LC-MS/MS y fueron identificados mediante las masas precursoras y producto (tabla n°1) y tiempo de retención (tabla n°1) para ambos analitos. El tiempo de retención fue calculado a partir de 6 inyecciones de estándar certificado. La desviación estándar relativa (RSD) tuvo un valor de 0,05% para OTC y 0,31% para 4-epi-OTC.

Tabla 1: Ion precursor e iones productos con sus respectivos tiempos de retención

Analito	Ion Precursor (Da)	Iones Productos (Da)	Tiempo retención
Oxitetraciclina	461.000	426.000	11.645 min
		381.000	
4-epi-Oxitetraciclina	461.000	426.000	8.945 min
		381.000	

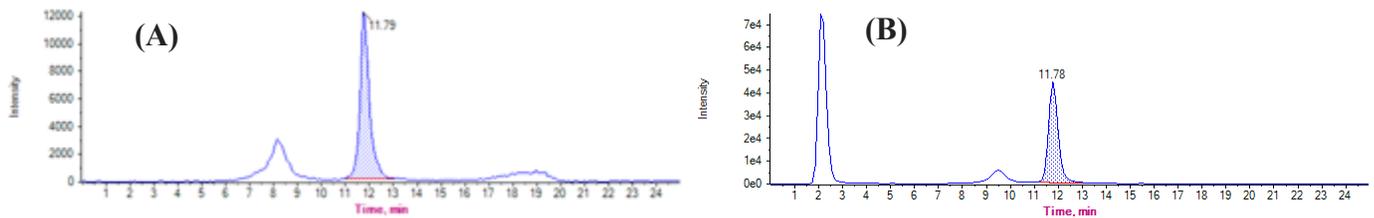


Figura 1 Cromatogramas de inyección de estándar certificado de OTC (A) y muestras fortificadas a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (B).

En esta etapa se establecieron además condiciones para el espectrómetro de masas de triple cuádruplo, que corresponde a un API 5500[®] de Applied Biosystems Sciex (tabla n°2), para la detección de los analitos de interés desde la matriz deyecciones. Por su parte la Tabla N° 3 y 4 detallan las condiciones del autosampler y el gradiente de la bomba del cromatógrafo líquido Agilent 1200. Por otro lado, en la tabla n°5 se muestran condiciones espectrométricas de masas específicas de la sustancia.

Tabla 2: Configuración del cromatógrafo API SCIEX 5500 TM

Columna analítica:	Sunfire TM C 18 3.5 μ m, 150 \times 2.1 mm (Waters Corp).
Volumen de inyección:	20 μ l
Temperatura de la columna:	35 $^{\circ}$ C +/- 1 $^{\circ}$ C
Flujo:	0,2 mL/min
Fase móvil A:	0.1% ácido fórmico en agua pH 2.7 +/- 0.2.
Fase móvil B:	0.1% ácido fórmico en metanol pH 3.0 +/- 0.3.

Tabla 3: Composición de la fase móvil

Punto	Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
	min	%	%
0	0,0	85	15
1	5,0	85	15
2	5,1	60	40
3	10,0	60	40
4	10,1	10	90
5	15,0	10	90
6	16,0	85	15
7	25,0	85	15

Tabla 4: Composición de la fase móvil

Ionización:	ionización por electro aspersion (ESI)
Temperatura:	550 ° C
Cortina de gas:	30,0 psi
Gas de colisión:	10 psi
Tensión de pulverización iónica:	modo negativo - 3 500 V modo positivo: 3 500 V
Fuente de iones gas 1:	60 psi
Fuente de iones gas 2:	80 psi
Resolución Q1:	Unidad
Resolución Q3:	Unidad

Tabla 5: Condiociones espectrométricas de masas específicas de la sustancia.

Analito	Polaridad	Ion Precursor (m/z)	Ion Product (m/z)	DP (voltios)	EP (voltios)	CE (voltios)	CXP (voltios)
OTC	pos	461.000	426.000	72.000	10.000	28.000	25.000
			381.000			36.000	22.000
4-epi-OTC	pos	461.000	426.000	72.000	10.000	28.000	25.000
			381.000			36.000	22.000
TC-d6	pos	451.000	160.000	34.000	10.000	25.000	30.000

- **Objetivo específico N°2:**

Validar la metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su epímero (4-epi OTC) en deyecciones de pollo Broiler.

- 1. Tiempo de retención del analito:** Se analizó el coeficiente de variación (CV%) de las seis inyecciones de estándar puro, determinando así la variabilidad del tiempo de retención de los analitos. Los tiempos de retención y los correspondientes CV para OTC,4-epi-OTC y el epímero TC-D6, se pueden observar en la tabla n°6. Para la aceptación de este parámetro los CV de las 6 inyecciones de estándar certificada deben tener un valor $\leq 2,5\%$. De acuerdo con los resultados, los análisis para el parámetro del tiempo de retención cumplen con criterio de aceptación según la guía 657/2002/EC.

Tabla 6:Promedio de los tiempos de retención y su CV% a partir de la inyección de seis drogas puras según los analitos de interés

Analito	Tiempo de retención (min)								
	ISS 1	ISS 2	ISS 3	ISS 4	ISS 5	ISS6	Promedio	SD	CV
OTC (461.0/426.0)	11.79	11.79	11.79	11.78	11.78	11.78	11.785	0.0055	0.05%
TC-D6 (451,0/416,0)	9,89	9,77	9,83	9,82	9,83	9,84	9,830	0,0385	0,39%
4-epi OTC (461.0/426.0)	9.74	9.65	9.58	9.56	9.5	9.75	9.630	0.1012	1.05%
ISS	Inyección de solución estándar								
SD	Desviación estándar								
CV	coeficiente de variación								

2. **Especificidad:** Se analizaron 20 muestras blanco, para evaluar la existencia de interferencia en la zona de interés. En la figura n°2 y 3 queda en evidencia que no existe interferencia en los tiempos de retención del analito de interés ni para su activo epímero.

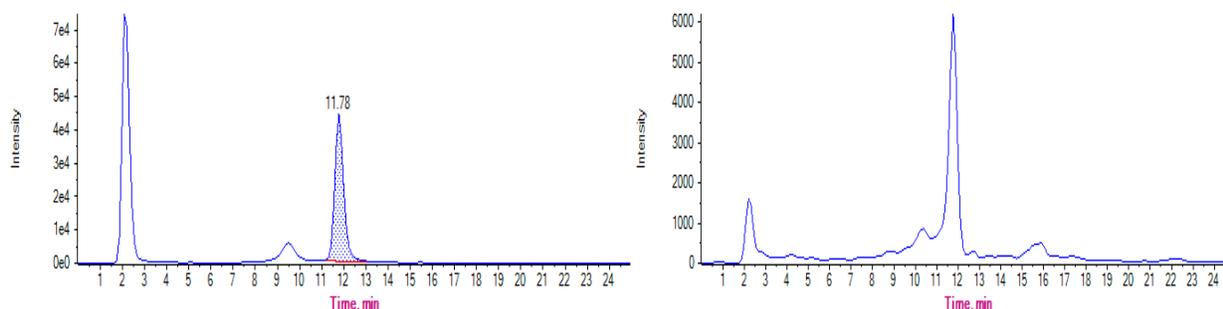


Figura 2: Cromatogramas de la inyección de muestra positiva versus muestras negativa donde no se observan interferentes en el tiempo de retención del analito OTC.

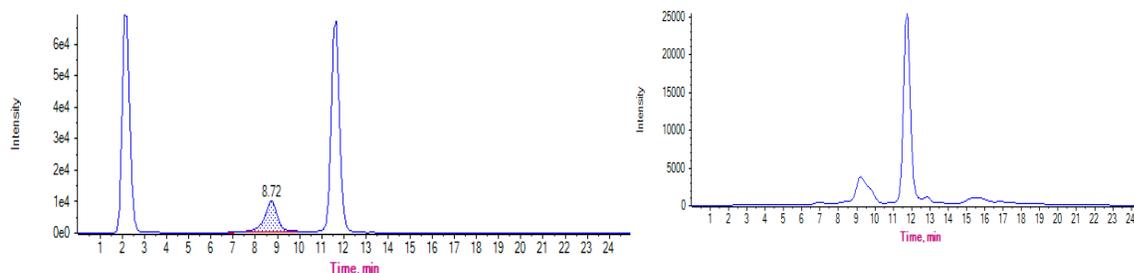


Figura 3: Cromatogramas de la inyección de muestra positiva versus muestras negativa donde no se observan interferentes en el tiempo de retención del metabolito activo 4-epi-OTC.

3. **Limite de Detección(LD) y Cuantificación(LD):** Para la determinación de LD se analizaron 20 repeticiones de concentraciones de matriz fortificada. Se determinaron los parametros que puede ser observados en la tabla n°7. Los resultados obtenidos fueron aceptados, debido a que se acepto un CV menor al 25%, lo cual fue cumplido en las 20 repeticiones analizadas.

En el caso del LC se le sumo 1,64 veces la desviación estadar de la concentracion definida para el LD. Para la acepcación de este parametro la relación con la señal ruido es 10:1.

Dado lo anterior el parametro es aceptado según el criterio establecido. Los resultados pueden ser vistos en la tabla n°7.

Tanto para la determinación de limite de detección como el de cuantificación fue necesario el calculo de estos pero de forma instrumental(LDI y LCI) , lo cual se documenta en la tabla N°7.

Tabla 7: Límite de detección y cuantificación con sus valores instrumentales.

Analito	LDI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LCI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LD	LC
OTC	2,6	8,9	12,13	36,38
4-epi-OTC	2,3	7,7	12,16	36,47

4. **Linealidad de la curva de calibración:** Para la determinación de la linealidad, fueron analizadas 3 curvas fortificadas a 5 niveles(0, 12.5,25,50,100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$). Los parametros obtenidos para el coeficiente de determinación (R^2) en las 3 curvas fue mayor o igual 0,99%, sumado a un coeficiente de variación menor al 25% ambos valores puedes se evidencia en la tabla n°8. Por lo anterior, se confirma la aceptabilidad de este paramatro.

Tabla 8: R^2 y CV% de las tres curvas de calibración a las concentraciones: 0,12, 80, 120 y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$.

Analitto	Curva A	Curva B	Curva c	Prom	Des.Est	CV%
OTC	0,995	0,996	0,995	0,995	0,00095	0,096
4-EPI OTC	0,995	0,993	0,998	0,096	0,002	0,025

5. **Recuperación:** A partir de muestras blanco-fortificadas a concentraciones conocidas, se determinó el porcentaje de recuperación de lo analitos posterior al proceso de extracción y análisis cromatográfico. Tal como se observa en la tabla n°9, los porcentajes de

recuperación oscilan entre 98% y 101%. Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación, debido a que el criterio oscila entre 50 y 120% de recuperación.

Tabla 9: Promedio, Des. Est. y CV% de la recuperación de OTC y 4-epi-OTC en matriz de deyecciones de pollo.

Concen $\mu\text{g kg}^{-1}$	Analito	Concen. promedio detectadas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperación promedio (%)	Des. Est.	CV (%)
25	OTC	25.501	101.45	5.31	5.24
	4-epi-OTC	25.331	101.33	2.72	2.68
50	OTC	49.271	98.54	5.31	5.39
	4-epi-OTC	49.341	98.68	2.72	2.75
75	OTC	75.363	100.48	1.77	1.76
	4-epi-OTC	75.331	101.09	0.91	0.90

6. **Precisión:** Este parámetro fue evaluado mediante la repetitividad y la reproducibilidad intralaboratorio. Para el análisis de la repetitividad se analizaron 6 curvas fortificadas a 3 concentraciones diferentes (25, 50 y 75 $\mu\text{g/kg}^{-1}$). Estas muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones en cuanto a analista, día de análisis, los reactivos utilizados, solventes. En la tabla n°10 se puede observar cálculo del promedio, la desviación estándar y el CV para los tres niveles de fortificación para la repetitividad. Para el cálculo de la reproducibilidad se analizaron muestras fortificadas a las mismas concentraciones que en el caso de la repetitividad, con la diferencia que el análisis fue llevado a cabo bajo diferentes condiciones (analista, día de análisis, fuente de la muestra e instrumentos). Los resultados obtenidos para el cálculo de la repetitividad se pueden observar en la tabla n°11.

Analito	Concentración g/kg^{-1}	Promedio	Des.Est.	Coef. Var
OTC	25	23,78	2,35	9,91
	50	51,44	4,77	8,98

	75	73,78	2,35	3,19
4-epi-OTC	25	24,99	2,05	8,23
	50	50,02	4,11	8,22
	75	74,99	2,05	2,74

Tabla 10: Cálculo del promedio, la DS y el CV de la repetibilidad para cada nivel de fortificación de OTC y 4-epi-OTC

Tabla 11: Cálculo del promedio, la DS y el CV de la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de fortificación de OTC Y 4-epi-OTC.

Analito	Concentración g/kg ⁻¹	Promedio	Des.Est.	Coef. Var
OTC	25	21,77	1,93	8,88
	50	56,46	3,96	6,84
	75	71,77	1,93	2,69
4-epi-OTC	25	22,05	2,74	12,43
	50	55,89	5,48	9,81
	75	72,05	2,74	3,80

7. **Estabilidad:** Para evaluar la estabilidad 5 muestras previamente fortificadas fueron almacenadas durante por 1 y 4 semanas a temperatura de -20°. Los resultados obtenidos para la recuperación para OTC y su metabolito activo, en promedio fue de 125,7% y de 39,1% correspondientemente. En la tabla n° 12 se pueden analizar los resultados

obtenidos para promedio de porcentaje de concentración, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 12: Promedio, Des. Est. y CV de la estabilidad para muestras de deyecciones de pollo Broiler.

Analito	Promedio%	Desv.Est.	Coef.Var
OTC	125,770	3,063	4,87
4-Epi-OTC	39,146	1,59	8,12

- **Objetivo específico N°3:**

Verificar la metodología analítica planteada, mediante la cuantificación de los analitos de interés en deyecciones de pollos tratados con dosis terapéutica de una formulación comercial de oxitetraciclina.

La concentración de OTC y su epímero 4-epi-OTC en deyecciones de pollo Broiler fueron determinadas a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración. Se consideró un coeficiente de determinación ($R^2 \geq 0,95$). Los resultados obtenidos a partir de las muestras del grupo experimental puede ser visualizados en la tabla N°13.

Tabla 13: Concentración de OTC y 4-epi-OTC en deyecciones de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial para aves de engorda (Oxitetraciclina al 10% suspensión oral)

Días Post-tratamiento	Concentración promedio OTC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentración promedio 4-epi-OTC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
4	641	231
7	206	89
8	1642	377
10	1051	587

DISCUSION

Si bien con anterioridad se han descrito en otros estudios metodologías analíticas para la detección de Oxitetraciclina, como por ejemplo Dieguez *et al* 2002, Aguilera *et al* 2010 y Negrete *et al* 2017 en diferentes matrices, como miel, musculo de diferentes especies como bovinos y camarones, es el única metodología analítica que determina este analito en la matriz de deyecciones de pollo Broiler. El método descrito en la presenta memoria de título, si bien está basada en el método multiresidual de Berendsen *et al* 2015 en este caso se contó con un grupo experimental de pollos, para detectar de manera invio la presencia de oxitetraciclina en pollos tratados previamente, lo cual da paso para la realización de nuevos estudios, como por ejemplo la realización de estudios de depleción, los cuales son la base para la determinación de periodos de resguardo.

Los diferentes laboratorios que realizan metodologías analíticas presentan variación que pueden determinar las diferencias de los resultados de un método. Es por esta razón que cada laboratorio que monta un método debe realizar su propia validación. El método desarrollado en la presenta memoria de título cumplido con todos los parámetros establecidos a partir de guías de validación internaciones, por ende, entrega la seguridad que los resultados obtenidos son precisos y confiables.

La validación de la metodología analítica fue llevada a cabo bajo las condiciones del laboratorio FARMAVET, necesarias para certificación bajo la norma ISO 17025, Of 2005, descritas en dicho documento. Con respecto al tiempo de retención se obtuvo en promedio 11,79 min para OTC y 9,83 min para 4-epi- OTC, con un coeficiente de variación menor al 2,5%, por lo cual cumple con criterio de aceptación determinado en la decisión 657/2002 de la Unión Europea (EC, 2002). Para la especificidad se analizaron 20 muestras blanco y no se evidenciaron en el cromatograma interferencias en la zona de interés.

El límite de detección, el cual corresponde a la mínima cantidad que puede ser detectada del analito fueron en promedio de 12,13 y 12,16 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para el caso de OTC y de 4-epi-OTC correspondientemente. En el caso del límite de cuantificación, por otro lado, corresponde a la

cantidad mínima que puede ser cuantificada, para este parámetro los valores obtenidos fueron de 36,38 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para OTC y 36,47 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ para 4-epi-OTC.

Las curvas de calibración fueron fortificadas a 0, 12.5,25,50,100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, se obtuvo un promedio de $R^2 > 0,99$, superando así lo mínimo establecido de 0,95 como criterio de aceptación. La recuperación del método se encontró entre los rangos establecidos por la decisión 657/2002 de la Unión Europea, donde se fijan rangos de aceptación entre 50 a 120% de recuperación. La recuperación osciló entre 98 y 101%, lo que deja ver la capacidad de la metodología de extraer analitos de interés.

La precisión se compone de dos parámetros, la repetitividad y la reproducibilidad. La repetitividad fue realizada bajo las mismas condiciones analíticas (mismo día, reactivos y analista), en cambio la replicabilidad cuenta con variaciones en sus condiciones analíticas. Se obtuvieron valores de coeficiente de variación que oscilo entre 2,7 a 8,9 % para OTC y 3,8 a 12,4 % en el caso de 4-epi- OTC, mientras que para la reproducibilidad los valores para el coeficiente de variación fueron entre un 3,2 y un 9,9% para OTC y 2,7 a 8,2% para 4-epi-OTC. Dado que la repetitividad fue menor a la reproducibilidad y la repetitividad tuvo un coeficiente de variación menor a un 35%, ambos parámetros cumplen con los criterios de aceptación establecidos por la decisión 657/2002 de la Unión Europea, estableciendo así que la metodología es repetitiva y reproducible, por ende entrega resultados precisos que son invariables bajo diferentes condiciones.

El ultimo parametro establecido correspondió a la estabilidad del analito, donde muestras fortificadas y almacenadas por una y cuatro semanas. Se analizo la recuperación del analito después de ser sometido a condiciones de tiempo y temperatura y se obtuvo en promedio una recuperación de un 126% para OTC y un 39% para 4-epi-OTC.

Reconocer la presencia de residuos de OTC y otros antibióticos en deyecciones de introducidas con diferentes fines. Los resultados obtenidos a partir del muestro del grupo experimental realizado en la presenta memoria de título, deja en evidencia valores de OTC que oscilan entre 206 y 1051 ng/gr como concentración promedio para OTC y de 86 y 587 ng/gr para 4-epi-OTC. Sin embargo, no solo se evidencia la simple presencia del antibiótico de interés y su metabolito activo, sino que también se deja al descubierto que existe un aumento en las concentraciones de estos a medida que transcurren los días post tratamiento. Lo anterior se debe probablemente a que, tras la excreción biliar, las tetraciclinas sufren un proceso de reabsorción, sufriendo así una recirculación enterohepática (El Korchi,2006). Contar con la verificación del método con un grupo experimental, deja en evidencia la realidad que se puede encontrar a nivel productivo, donde existe una conciencia que la administración de antibióticos genera residuos tanto en musculo, subproductos como vísceras, huevos, pero no se considera la cama de pollo como un factor de riesgo para la salud pública.

Cuando se utiliza este subproducto en la alimentación animal genera efectos sobre la salud de estos y contribuye a la selección de genes de resistencia, que pueden ser transmitidos a las personas, a través del consumo de productos de origen animal (Kwon-Rae *et al*, 2010; Andersson y Hughes, 2014). También se describen efectos ambientales como contaminación de aguas subterráneas y en su utilización como fertilizantes tienen efectos fitotóxicos que repercutirán principalmente el crecimiento de los cultivos (Bártíková *et al*, 2016). Debido a los efectos y consecuencias que tienen la presencia de estos residuos en una matriz que no posee un control por parte de los diferentes entes fiscalizadores, la generación de un método de identificación es un paso inicial para establecer parámetros de control como lo son los límites máximo residuales y periodos de resguardo.

CONCLUSIÓN

El método analítico fue validado para la detección de OTC y su epímero 4-epi-OTC en matriz de deyecciones de pollo Broiler bajo los parámetros establecidos por la Unión Europea: decisión de la comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: VICH GL49 *validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011). La validación fue desarrollada en su totalidad en el laboratorio FARMAVET siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 17025, Of 2005.

Para la identificación y cuantificación del analito se utilizó de cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masa, es un método de alta sensibilidad, es decir, permite la detección de analitos en bajas concentraciones. A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que la metodología analítica descrita en la presente memoria de título es específica, lineal, con recuperación adecuada y precisa para la determinación de los analitos estudiados y en la matriz establecida

Se determinó la presencia de residuos antibióticos en las deyecciones de pollos Broiler tratados a dosis terapéuticas, incluso días posteriores al período de resguardo que se establece para otras matrices, específicamente para músculo. Sumado a lo anterior, se vio un aumento considerable de las concentraciones de OTC y 4-epi-OTC a medida que pasaron los días post tratamiento.

Dado que la utilización de deyección a través de la cama de pollo Broiler en sectores productivos como la ganadería y la agricultura es un hecho y en la presente memoria queda en evidencia que existen residuos de antibióticos en esta matriz post tratamiento a dosis terapéuticas, se debe tener en cuenta como un riesgo para la salud pública, debido a que no existe un monitoreo constante de esta matriz, ni se han establecidos límites permitidos para la presencia de estos analitos, dejando así abierta la posibilidad de nuevos estudios que contribuyan a salvaguardar la salud humana, animal y el medio ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGUILERA, C.; HERRERA, C; PONCER, J.** 2010. Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonídeos. *Latin american journal of aquatic reseach.* 38(2).227-233
- **ANDERSSON, D.; HUGHES, D.**2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 465
- **ASPROCER** (s. f) Análisis sectorial Recuperado septiembre 25,2020, a partir de <http://www.asprocer.cl/industria/analisis-sectorial/>
- **BÁRTÍKOVÁ, H.; PODLIPNÁ, R.; SKÁLOVÁ, L.** 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290-2301.
- **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.
- **CARVALHO, I;SANTOS, L.** 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736-757.
- **CE, COMISIÓN EUROPEA.** 2002. Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2009a. Reglamento (CE) N° 1099/2009 del consejo de 24 de septiembre de 2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2010. Directiva 2010/63/UE. Diario oficial de la Unión Europea. L 276: 33-79. F
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009
- **CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232.
-
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; KROGH, M.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; MARTÍN, B.** 2017. Determination of Oxytetracycline and 4-Epi-Oxytetracycline Residues in Feathers and Edible Tissues of Broiler Chickens Using

Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. Journal of Food Protection, 80(4), 619-625

- **CORNEJO, J.; YEVENES, K.; AVELLO, C.; POKRANT, E.; MADDALENO, A.; MARTIN, B.; LAPIERRE, L.** 2018. Determination of Chlortetracycline Residues, Antimicrobial Activity and Presence of Resistance Genes in Droppings of Experimentally Treated Broiler Chickens. *Molecules*, 23(6).
- **CX/MRL.** 2018. Límites máximos de residuos (lmr) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (rgr) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.
- **DIAZ, C.; CASTRO, E.; SIBAJA, M.; CAUSIL, J.** 2017. Identificación de Residuales Químicos de Oxitetraciclina, OTC, en la Carne Fresca Bovina obtenida en Plantas de Beneficio Categorías Nacional y Autoconsumo, destinada para consumo humano en el Departamento de Córdoba. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 4(1), 59-68.
- **DIEGUEZ, S.; SORACI, A.; BEDASCARRASBURE, E.; LIBONATTI, C.** 2002. Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1), 159-166.
- **EL KORCHI, G.** 2006. Farmacocinética y eficacia de oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovino. Depleción tisular (Ph.D. Thesis). Universitat Autònoma de Barcelona. Recuperado septiembre 25, 2020, a partir de <http://www.tdx.cat/handle/10803/5389>
- **EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 2015. VICH topic GL48: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: marker residue depletion studies to establish product withdrawal periods.
- **FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION .**2015. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics.
- **FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22p.
- **GADBERRY, S.** 2014. Feeding Broiler Litter to Beef Cattle. Obtenido de <https://www.uaex.edu/publications/pdf/FSA-3016.pdf>.
- **GIACOMIZZI, J.** 2015. Actualización del mercado avícola. Obtenido de ODEPA: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2015/04/Aves2015.pdf>
- **JANSEN, L.; VAN DE SCHANS, M.; DE BOER, D.; BONGERS, I.; SCHMITT, H.; HOEKSMAN, P.; BERENDSEN, B.** 2019. A new extraction procedure to abate the burden of non-extractable antibiotic residues in manure. *Chemosphere*, 224, 544-553.

- **Jl, S.; JIANG, T.; YAN, H.; GUO, C.; LIU, J.; SU, H.;LI, S.** 2018. Ecological Restoration of Antibiotic-Disturbed Gastrointestinal Microbiota in Foregut and Hindgut of Cows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 79.
- **KWON-RAE,K.; OWENS, G.**2011. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214(1), 163-174.
- **LA ROSA, P.**2016. Uso de técnicas cromatográficas en la identificación de residuos de antibióticos veterinarios. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
- **MADDALENO, A.;POKRANT, E.; YANTEN, F.; SAN MARTIN, B.;CORNEJO, J.** 2019. Implementation and Validation of an Analytical Method for Lincomycin Determination in Feathers and Edible Tissues of Broiler Chickens by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of analytical methods in chemistry*.
- **MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU1, G.; PETCULESCU, L.; MARCU, A.; NICULA, M.; PEȚI, I.; DRONCAI, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C.** 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chickens growth. *Anim. Sci. Biotechnol.* 46 (2): 330-346
- **ODORE, R.;DE MARCO, M.;GASCO, L.; ROTOLO, L.;MEUCCI, V.; PALATUCCI, A.; SCHIAVONE, A.** 2015. Cytotoxic effects of oxytetracycline residues in the bones of broiler chickens following therapeutic oral administration of a water formulation. *Poultry Science*, 94(8), 1979-1985.
- **OLIVEIRA, E.;MULLER, E.; ABAD, F.; DALLAROSA, J.; ADRIANO, C.**2010. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Química Nova*, 33(4), 984-987.
- **POKRANT, E.; MADDALENO, A.; E. ARAYA, C.; V. SAN MARTÍN, B.;CORNEJO, J.** 201). In-House Validation of HPLC-MS/MS Methods for Detection and Quantification of Tetracyclines in Edible Tissues and Feathers of Broiler Chickens. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29.
- **RODRIGUES, S.; ANTUNES, S.; CORREIA, A.;NUNES, B.** 2016. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pro-oxidant and genotoxic responses following acute and chronic exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Ecotoxicology*, 26.
- **SAG.SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO** .2019. Sistema de medicamento veterinarios. Obtenido de https://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp
- **SAG.SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2011. Producción, faena y hallazgos patológicos en plantas nacionales faenadoras de aves. *Boletín Veterinario Oficial*
- **SEIDAVI, A.; ZAKER-ESTEGHAMATI, H.; SCANES, C.**2018. Chicken processing: impact, co-products and potential. *World's Poultry Science Journal*, 75(1), 1-13.

- **SILVA, T.; MENEZES, J.; SIMON, G.; ASSIS, R.; SANTOS, C.; GOMES, G.** 2011. Cultivo do milho e disponibilidade de P sob adubação com cama-de-frango. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 15(9), 903-910.
- **SLANA, M.; PAHOR, V.; CVITKOVIČ MARIČIČ, L.; DOLENC, M.** 2014. Excretion pattern of enrofloxacin after oral treatment of chicken broilers. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 37.
- **VICENTE, D.; PÉREZ-TRALLERO, E.** 2010. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28(2), 122-130.

-

YÉVENES, K.; POKRANT, E.; PÉREZ, F.; RIQUELME, R.; AVELLO, C.; MADDALENO, A.; CORNEJO, J. 2018. Assessment of Three Antimicrobial Residue Concentrations in Broiler Chicken Droppings as a Potential Risk Factor for Public Health and Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(1), 24.

- **ZILLER, C.** 2006. Niveles de inclusión de cama de broiler en la alimentación de vaquillas en engorda a confinamiento. Universidad Austral De Chile .

Anexo 1: Certificado del comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile



CERTIFICADO N° 124

Santiago, 04, septiembre, 2018

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de tesis para optar al grado de Doctor de la alumna Srta. Ekaterina Pokrant Huerta, titulado: "Evaluación de la transferencia de residuos de oxitetraciclina desde deyecciones de pollos tratados hacia el ambiente y animales centinelas, su actividad antimicrobiana y la relación con la abundancia relativa genes de resistencia", cuya profesora guía es la Dra. Javiera Cornejo, académico de FAVET

El proyecto cumple las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

DRA. LISETTE LAPIÈRE A.

Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET



Anexo 2: Certificado del comité de bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile



Santiago, 8 de octubre de 2018

Certificado n°: 18187-VET-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo número **12 - 2018** del Proyecto de Investigación titulado: **“Evaluación de la transferencia de residuos de oxitetraciclina desde deyecciones de pollos tratados hacia el ambiente y animales centinelas, su actividad antimicrobiana y la relación con la abundancia relativa de genes de resistencia”**, de la Srta. **Ekaterina Pokrant**, Tesista del Programa de Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, y cuya Investigadora Patrocinante y Responsable es la **Dra. Javiera Cornejo Kelly**, Profesora Asistente, del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Ambas Investigadoras se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **70 Pollos Broiler Ross 308**, provenientes de la Avícola Chorombo S.A., desde enero de 2019 hasta el noviembre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **IAEA (International Atomic Energy Agency), Proyecto coordinado D52041. Título Proyecto: “Development, Validation and Implementation of Isotopic Analytical Methods for Multi-Class Contaminants in Animal Waste and Related Matrices: A Potentially Valuable Tool for Monitoring Mixed Contaminants in Food Producing Animals” (RC 22180).**

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente CICUA - VID
Universidad de Chile



Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo 3: Carta Gantt

Objetivos Específicos	Actividades	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Objetivo 1: Implementar una metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su metabolito activo (4-epi OTC) en matriz de deyecciones de pollo	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 heces en base a carta de trabajo establecida	■					
	Análisis de resultados		■				
	Ajustes de condiciones cromatografías		■				
Objetivo 2: Validar la metodología analítica para detectar Oxitetraciclina y su metabolito activo (4-epi OTC) en deyecciones de pollo	Desarrollar protocolo de validación interna y establecer criterios y parámetros de análisis			■			
	Análisis de las muestras				■		
	Análisis de resultados				■		
Objetivo 3: Verificación de la metodología analítica en deyecciones de pollos tratados con dosis terapéutica de oxitetraciclina.	Crianza y acondicionamiento de animales experimentales					■	
	Tratamiento con OTC de pollos broiler o aves experimentales					■	
	Obtención de muestras						■
	Análisis de muestras incurridas						■

Anexo 4: Metodología analítica para extracción de Oxitetraciclina a partir de matriz de deyecciones de pollo broiler.

Analito	Matriz	POE
OTC y 4-epi-OTC	Deyecciones	N° 01

1. Homogeneizar la muestra con una varilla de madera.
2. Pesar 1 gr en un tubo falcon de 50ml.
3. Fortificar y agregar estándar interno TC-d6.
4. Añadir 8ml de buffer EDTA- McIlvain y 2ml de acetonitrilo.
5. Agitar la muestra en vórtex durante 10 minutos.
6. Sonicar 5 minutos
7. Centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
8. Pasar sobrenadante por una jeringa de 10ml acondicionada con lana de vidrio.
9. Transferir extracto a un tubo falcon y diluir por adición de 13ml de buffer EDTA-McIlvain.
10. Agitar 2 minutos
11. Centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
12. Acondicionar columna de extracción de fase sólida (SPE) OASIS™ HLB (6cc) con 5ml de metanol y 5ml de agua MilliQ.
13. Aplicar completamente el extracto en la columna.
14. Lavar la columna con 5ml de agua MilliQ.
15. Secar al vacío por 5 minutos.
16. Eluir con 10 ml de metanol.
17. Evaporar bajo flujo de N₂, a 40-50°C.
18. Reconstituir con 200µl de metanol y 300µl de agua MilliQ.
19. Agitar y sonicar por 5 minutos
20. Centrifugar a 1700 rpm durante 5min.
21. Pasar extracto a tubo eppendorf y centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
22. Traspasar a vial utilizando una jeringa de 1ml, filtrando por millipore.