



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



**ESTUDIO DE DEPLECIÓN DE OXITETRACICLINA EN HUEVOS OBTENIDOS DE  
GALLINAS DE POSTURA EXPERIMENTALES**

**PABLO A. GONZÁLEZ MOLINA**

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

PROFESOR GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN

**SANTIAGO, CHILE**  
**2013**



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



**ESTUDIO DE DEPLECIÓN DE OXITETRACICLINA EN HUEVOS OBTENIDOS  
DE GALLINAS DE POSTURA EXPERIMENTALES**

**PABLO A. GONZÁLEZ MOLINA**

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

	NOTA	FIRMA
DRA. BETTY SAN MARTÍN	.....	.....
DRA. DANIELA IRAGÜEN	.....	.....
DR. HÉCTOR HIDALGO	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2013**

## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi agradecimiento a mi profesora guía y Directora del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, la Dra Betty SanMartín, por brindarme la oportunidad de trabajar en su unidad académica y junto a su equipo de trabajo científico, los cuales me brindaron el apoyo y la confianza necesaria para llevar acabo mi trabajo de la mejor manera. Al mismo tiempo, me siento afortunado de haber sido parte de este equipo de trabajo durante la realización de mi tesis de pregrado, ya que de alguna manera marcó mi rumbo profesional. Además, deseo agradecer en forma especial a la Dra. Javiera Cornejo, por su colaboración, apoyo y guía. Agradezco la colaboración de la Dra. Lisette Lapierre, Dra. Daniela Iragüen y al Dr. Héctor Hidalgo por apoyo personal y profesional. Adicionalmente estoy muy agradecido por la ayuda recibida por parte del personal técnico del laboratorio, los que claramente facilitaron mis tareas y labores durante la realización de esta tesis.

Gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Resumen.....</b>	<b>Página 1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>Página 3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>Página 5</b>
<b>Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>Página 8</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>Página 31</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>Página 32</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>Página 42</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>Página 52</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>Página 58</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>Página 59</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>Página 65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> .....	<b>Página 9</b>
Principales componentes del grupo de las tetraciclinas	
<b>Tabla 2</b> .....	<b>Página 13</b>
Clasificación de tetraciclinas de acuerdo a sus características farmacocinéticas	
<b>Tabla 3</b> .....	<b>Página 18</b>
Afecciones y cuadros comunes tratables por tetraciclinas de acuerdo a especie animal	
<b>Tabla 4</b> .....	<b>Página 21</b>
LMRs para oxitetraciclina en huevo, establecidos por diferentes organismos nacionales e internacionales	
<b>Tabla 5</b> .....	<b>Página 32</b>
Grupos de aves utilizadas en el estudio.	
<b>Tabla 6</b> .....	<b>Página 35</b>
Condiciones del Sistema Cromatográfico para determinación de oxitetraciclina.	
<b>Tabla 7</b> .....	<b>Página 42</b>
LD para oxitetraciclina en muestras de claras fortificadas a una concentración de 30 µg/kg	
<b>Tabla 8</b> .....	<b>Página 42</b>
LD para oxitetraciclina en muestras de yemas fortificadas a una concentración de 30 µg/kg	
<b>Tabla 9</b> .....	<b>Página 43</b>
LC calculado para clara y yema fortificadas con oxitetraciclina a concentración de 30 µg/kg	
<b>Tabla 10</b> .....	<b>Página 43</b>
Áreas cromatográficas de tres curvas de clara fortificadas con diferentes concentraciones de oxitetraciclina para demostrar linealidad del método analítico.	

<b>Tabla 11</b> .....	<b>Página 44</b>
Áreas cromatográficas de tres curvas de yema fortificadas con diferentes concentraciones de oxitetraciclina para demostrar linealidad del método analítico.	
<b>Tabla 12</b> .....	<b>Página 44</b>
Porcentaje de Recuperación de oxitetraciclina en claras fortificadas.	
<b>Tabla 13</b> .....	<b>Página 45</b>
Porcentaje de Recuperación de oxitetraciclina en yemas fortificadas.	
<b>Tabla 14</b> .....	<b>Página 45</b>
Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de clara a tres concentraciones diferentes para demostrar repetitividad del método analítico.	
<b>Tabla 15</b> .....	<b>Página 45</b>
Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de yema a tres concentraciones diferentes para demostrar repetitividad del método analítico.	
<b>Tabla 16</b> .....	<b>Página 46</b>
Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de clara a tres concentraciones diferentes para demostrar precisión del método analítico.	
<b>Tabla 17</b> .....	<b>Página 46</b>
Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de yema a tres concentraciones diferentes para demostrar precisión del método analítico.	
<b>Tabla 18</b> .....	<b>Página 47</b>
Concentraciones de oxitetraciclina en clara y yema de huevos de gallinas de postura durante los días de tratamiento	

**Tabla 19**..... **Página 49**  
Concentraciones de oxitetraciclina en yemas de huevos de gallinas de postura durante los días de post-tratamiento

**Tabla 20**..... **Página 50**  
Concentraciones de oxitetraciclina en claras de huevos de gallinas de postura durante los días de post-tratamiento

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1**..... **Página 10**

Estructura básica de las tetraciclinas

**Figura 2**..... **Página 48**

Concentraciones promedios de Oxitetraciclina en clara y yema de huevos de gallinas de postura, obtenidas durante los días de tratamiento. Los datos se expresan en escala semi-logarítmica.

**Figura 3**..... **Página 51**

Curva de depleción de concentración versus tiempo (días) para yema, considerando un 95% de confianza y LMR de 200 ug/kg, los datos son presentados en escala semi-logarítmica.



## RESUMEN

La oxitetraciclina es un antimicrobiano perteneciente a la familia de las tetraciclinas ampliamente utilizada en animales productivos debido a sus características farmacológicas y adecuada relación costo/efectividad. Es utilizada en las aves productoras de carne y huevos, disminuyendo la incidencia de enfermedades infecciosas de origen bacteriano y las mortalidades relacionadas con éstas. Sin embargo, el uso terapéutico de este fármaco no está exento de riesgos para la salud pública. Estos riesgos se centran fundamentalmente en la generación de resistencia en bacterias zoonóticas y la presencia de residuos en los productos finales generando efectos adversos en la población humana.

Con la finalidad de proteger la salud de los consumidores al evitar la presencia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos destinados al consumo humano, se han establecido los denominados períodos de resguardo, los cuales se determinan en base a los límites máximos residuales (LMR) definidos para cada principio activo, tejido y especie animal. Los períodos de resguardo son específicos para cada formulación farmacéutica y varían de acuerdo a la dosis administrada, vía de administración y duración de la terapia. En Chile, el Registro Sanitario de los Alimentos ha fijado en 200 µg/kg el LMR para oxitetraciclina en huevos, pero no se ha definido el período de resguardo de este medicamento en gallinas de postura.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el período de resguardo de una formulación de oxitetraciclina en los huevos obtenidos de gallinas de postura tratados con este fármaco considerando el LMR definido para Chile. Para esto, se validó una metodología analítica mediante HPLC-DAD para la determinación de oxitetraciclina según la normativa de la Unión Europea. Posteriormente, se realizó un estudio de depleción utilizando 12 gallinas ponedoras Leghorn, las que fueron tratadas con una dosis de 40 mg/kg día de oxitetraciclina por vía oral durante un periodo de 10 días consecutivos.

Este estudio permitió señalar que la distribución del antimicrobiano se inicia desde el primer día de tratamiento en ambos compartimentos del huevo (clara y yema), sin embargo las concentraciones del antimicrobiano son inferiores en la clara, alcanzando un nivel constante en este compartimiento al tercer de tratamiento. En el caso de la yema, las concentraciones de oxitetraciclina fueron constantes desde el día 10 de tratamiento.

Además, las concentraciones presentes en clara no superaron el LMR establecido, contrario a lo observado en yema, en la cual hacia el final del tratamiento se observaron niveles de hasta 1044 µg/kg. De esta manera, la yema corresponde al tejido a considerar como marcador para evaluar el período de resguardo en este alimento.

El periodo de resguardo para oxitetraciclina en los huevos, fue de nueve días considerando a la yema como tejido marcador. Esto quiere decir, que posterior a este periodo, los huevos obtenidos de gallinas de postura tratados con este fármaco, pueden ser destinados al consumo humano constituyendo de esta forma un alimento seguro para la población.

## ABSTRACT

Oxytetracycline is an antimicrobial drug from the family of the tetracyclines, widely used in animal production due to its pharmacological characteristics and appropriate cost / effectiveness ratio. It is used in poultry, as it reduces the incidence of infectious bacterial diseases and associated mortality. However, the therapeutic use of this drug is not without risk to public health, mainly focused on the generation of resistance in zoonotic bacteria and the presence of residues in foods for human consumption having adverse effects on the population.

In order to avoid the presence of residues of veterinary medicines in foods for human consumption, withdrawal times (WDT) have been established. WDT are determined based on Maximum Residual Limits (MRLs) defined for each active ingredient, tissue and animal species. WDT are specific for each pharmaceutical formulation, and varies according to the dose, route of administration and duration of therapy. In Chile, the Food Sanitary Registration established the MRL of 200 µg/kg for oxytetracycline in eggs. However, WDT in laying hens have not been yet determined.

The goal of this study was to evaluate the WDT of a single formulation of oxytetracycline in eggs from treated laying (40 mg / kg daily for 10 consecutive days) hens considering the MRL established in Chile. A suitable HPLC-DAD analytical method was validated for the detection of oxytetracycline in accordance with the recommendations of the European Union.

Oxytetracycline was detected in white and yolk since day 1, but drug concentrations were lower in the former compartment, reaching a constant level in this compartment on the third day of treatment. In yolk, the drug concentrations were higher than those observed in white, and constant level were reached on day 10<sup>th</sup> of treatment. In addition, drug concentrations in white did not exceed the MRL, contrary to what was observed in yolk (1044 µg/kg at their 10<sup>th</sup> day of treatment). Thus, yolk must be the target tissue to be considered when WDT of oxytetracycline (40 mg / kg daily for 10 consecutive days) is determined in eggs collected from laying hens.

A WDT of 9-day period was calculated for oxytetracycline in yolk. In consequence, this falls

into recommendation if a safe product for human consumption is to be collected from treated laying hens.

## INTRODUCCIÓN

El constante crecimiento de la población humana ha hecho necesario intensificar los sistemas de producción animal para suplir la creciente demanda de alimentos de origen animal. Esta situación expone a los animales a diversas enfermedades, y por ende, a una mayor demanda de las diferentes herramientas terapéuticas entre las que se encuentran los antimicrobianos como las tetraciclinas.

Las tetraciclinas corresponden a un grupo de antimicrobianos de amplio espectro que surgieron partir de la exploración en la búsqueda de otras sustancias que exhibieran actividad antimicrobiana. Fue así como en 1948 se aisló desde el suelo la bacteria *Streptomyces aureofaciens*, microorganismo desde el cual se obtuvo la clortetraciclina, el primer integrante de esta familia. Posteriormente, se logró aislar desde el *S. rimosus* al segundo integrante de esta familia, la oxitetraciclina.

Los antimicrobianos han contribuido en la industria avícola mejorando la salud y bienestar de las aves productoras de carne y huevos, disminuyendo la incidencia de enfermedades infecciosas de origen bacteriano y las mortalidades relacionadas con éstas. Sin embargo, el uso terapéutico de estos fármacos no está exento de riesgos para la salud pública. Estos riesgos se centran fundamentalmente en dos aspectos: la generación de resistencia en bacterias zoonóticas y la presencia de residuos de fármacos en los productos finales (carne, leche, miel y huevos); que pueden causar reacciones nocivas específicas y/o alteración de la microbiótica intestinal humana.

Actualmente está autorizado el uso de oxitetraciclina para prevenir diversas enfermedades en gallinas de corral y ponedoras de reproducción. Sin embargo, no está registrada para ser utilizada en gallinas productoras de huevos destinados al consumo humano, debido a que no se han evaluado los períodos de resguardo en los huevos obtenidos de gallinas tratadas con este fármaco. Por otro lado, hay que considerar que el consumidor actual muestra cada vez mayor interés en conocer el origen e inocuidad de los alimentos que consume, sobre todo en aquéllos de origen animal, siendo su principal preocupación la presencia de residuos de fármacos y contaminantes ambientales en estos productos.

Diversos autores han demostrado que los antimicrobianos utilizados en la industria avícola se transfieren al huevo por vía sanguínea durante su proceso de formación. Este hecho genera el riesgo de alcanzar concentraciones en el alimento que superen los límites máximos permitidos por los diferentes organismos nacionales e internacionales.

Basándose en los efectos adversos que pueden generar estos fármacos, organismos intergubernamentales como el JECFA (Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios) han establecido los Límites Máximos Residuales (LMR) para diferentes compuestos farmacológicos. En el caso de oxitetraciclina en huevos, se ha establecido un límite de 200 µg/kg tanto por la Unión Europea y el Registro Sanitario de los Alimentos de Chile, mientras que el *Codex Alimentarius* lo ha definido en 400 ug/ kg.

Si bien actualmente existen diferencias en los LMR establecidos, la tendencia mundial es a armonizar los criterios de inocuidad alimentaria de las distintas naciones, con el fin de proteger a los ciudadanos y asegurar las prácticas equitativas en el comercio internacional de alimentos. Por otro lado, el *Codex Alimentarius* (Comisión FAO/OMS) señala que el cumplimiento del período de resguardo para cada formulación de fármaco es una de las principales medidas para controlar la presencia de residuos en productos de origen animal destinados al consumo humano.

La utilización de los LMR permite la evaluación de los períodos de resguardo. Estos períodos son específicos para cada especie animal siendo dependientes de la dosis, duración de la terapia y de la formulación utilizada. Esto adquiere significancia, ya que, las diferencias entre formulaciones pueden generar residuos ilegales si en la determinación de los períodos de resguardo no se consideró esta variable, siendo por lo tanto necesario determinar los períodos de resguardo para cada formulación de un medicamento veterinario.

Nuestro país cuenta con Programas Nacionales de Control de Residuos de Fármacos en productos cárnicos y lácteos. Esto ha permitido conocer los principales fármacos causantes de residuos en estos productos, permitiendo realizar medidas correctivas en los sistemas de producción que aseguren la entrega de productos inocuos para el consumidor. Sin embargo, dentro de estos programas no se incluye el monitoreo de huevos, aun cuando existe el riesgo que estos presenten residuos de fármacos provenientes de gallinas sometidas a tratamiento. Por otro lado, el Registro de Medicamentos Veterinarios no puede

autorizar el uso de oxitetraciclina en gallinas ponedoras si no se han establecido previamente los períodos de resguardo para este fármaco en los huevos provenientes de aves tratadas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las tetraciclinas corresponden a un grupo de antimicrobianos de amplio espectro desarrolladas en 1948. La clortetraciclina y la oxitetraciclina, fueron las primeras moléculas de la familia en ser descritas siendo obtenidas a partir del *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus* respectivamente (Azanza *et al*, 1998). Estos compuestos poseían variadas ventajas sobre la penicilina, como son: un mayor espectro de acción (sobre todo en bacterias gram negativas), y una mejor tolerancia, por parte del individuo, debido a su menor toxicidad (Nelson, 1998).

Posteriormente surgen otras tetraciclinas aumentando la cantidad de integrantes de la familia. De esta forma se descubre la tetraciclina y dimetilclortetraciclina, ambas de origen natural, además de metaciclina, doxiciclina y minociclina, de origen semi-sintético. A pesar del éxito demostrado por estas primeras tetraciclinas, se desarrollaron análogos en los que se buscaba una mejor hidrosolubilidad para permitir su administración parenteral o mejorar su absorción por vía oral. A partir de estas investigaciones surgieron algunos compuestos semi-sintéticos como la rolitetraciclina y limeciclina (Chopra y Roberts, 2001).

Las tetraciclinas de desarrollo más reciente corresponden al grupo de las glicilciclinas y las aminometilciclinas. Las primeras fueron desarrolladas por los laboratorios Lederle siendo su representante la tigeciclina (un derivado semi-sintético de la minociclina) aprobada para su uso recientemente (Jones y Petersen, 2006). Las aminometilciclinas actualmente se encuentran en desarrollo experimental y aún no son sometidas a ensayos clínicos (Agwuh y MacGowman, 2006).

De acuerdo a estos antecedentes, las tetraciclinas pueden clasificarse en tres generaciones (Tabla 1) según el orden de su descubrimiento (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003):



Tabla1: Principales componentes del grupo de las tetraciclinas

Generación	Nombre Genérico	Descripción
Primera (1948-1963)	Clortetraciclina	Producidas por dos especies de <i>Streptomyces aureofaciens</i> (finales de la década de 1940)
	Oxitetraciclina	Obtenida a partir de <i>Streptomyces rimosus</i> en la década de 1950
	Tetraciclina	Derivados semi-sintéticos caracterizados por su hidrosolubilidad
	Demeclociclina	
	Rolitetraciclina	
Limeciclina		
Clomociclina		
Segunda (1965-1972)	Doxiciclina	Derivados semi-sintéticos de las primeras
	Metaciclina	
	Minociclina	
Tercera (1993 – a la fecha)	Glicilciclinas (tigeciclina)	Derivado semi-sintético de minociclina
	Aminometiciclinas (PTK 7906)	En desarrollo experimental

Fuente: Pérez – Trallero e Iglesias, 2003

Otra clasificación es la que realiza Bryskier (2005), el cual divide a la familia en dos grupos: las moléculas bacteriostáticas o del grupo 1, las cuales actúan a nivel ribosomal y son de uso clínico, y las moléculas bactericidas o del grupo 2, que actúan sobre la membrana citoplasmática y que corresponden a agentes aún en etapa de desarrollo experimental.

### Estructura

La denominación de esta familia deriva de su estructura compuesta por cuatro anillos unidos en forma lineal denominados por las letras A,B,C y D (Figura 1). Se caracterizan por la presencia de un esqueleto básico de perhidronaftaceno y varios sustitutos en las posiciones 5, 6 y 7 originando los diversos compuestos (Chambers, 2001; Mella y Muñoz,2009).

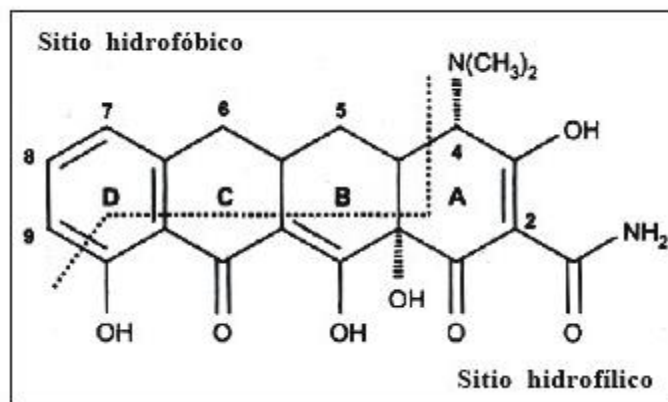


Figura1: Estructura básica de las tetraciclinas (Mella y Muñoz., 2009)

La formación de la estructura tetracíclica tiene su origen en la producción de metabolitos secundarios complejos conocidos como poliquétidos, generados por el microorganismo *Streptomyces* mediante biosíntesis y conjugación enzimática de subunidades de acetato. Las enzimas poliquétido sintetasa y acetil-CoA modifican químicamente estos metabolitos para obtener pre-tetramidas tipo naftaceno (“*napfhtacene-like pre-tetramids*”). A partir de este compuesto, se obtienen las principales tetraciclinas de origen natural (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina). Modificaciones a estos productos naturales, darán origen al resto de los integrantes de la familia (Nelson, 1998).

El requisito estructural mínimo para que las tetraciclinas posean actividad antibacteriana corresponde a mantener una estructura tetracíclica lineal (Nelson, 1998). Además, estos fármacos son poderosos agentes quelantes y tanto sus

propiedades farmacocinéticas como antimicrobianas son influenciadas por la quelación de iones metálicos (Chopra y Roberts, 2001).

Por otro lado, la estabilidad de las tetraciclinas en disolución varía con el pH y el compuesto específico, aunque suelen ser estables frente a pH ácido. En su mayoría se comportan como anfóteros, por tanto pueden actuar como aniones, formando sales de sodio o como cationes obteniéndose los correspondientes clorhidratos, siendo estos últimos los preparados más comunes (Lemos, 2002).

### Espectro de acción

Inicialmente, su espectro antibacteriano se consideró muy amplio. No obstante, la presión prescriptora realizada durante las décadas de los años cincuenta y sesenta generó una merma notable en la sensibilidad de las bacterias a este antimicrobiano, hasta el punto que hoy en día no existe prácticamente especie bacteriana que presente sensibilidad en todas sus cepas (Azanza *et al*, 1998).

Las tetraciclinas actúan contra una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas, tanto aerobias, como anaerobias. Son también eficaces frente a algunos microorganismos intracelulares como es el caso de *Rickettsia*. No presentan acción efectiva frente a organismos de tipo fúngicos (Chambers, 2001).

## **Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de las tetraciclinas**

### Farmacocinética

La principal vía de administración de las tetraciclinas es la forma oral, sin embargo, existen compuestos que además pueden ser administrados por vía intravenosa como la oxitetraciclina, limeciclina, doxiciclina y minociclina, e incluso exclusivamente por esta última vía, como la rolitetraciclina y tigeciclina (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003). La administración intramuscular no es habitual en estos compuestos debido al dolor producido en la administración. Sin embargo; solo se

administran por esta vía la tetraciclina y la oxitetraciclina, ya que el resto de los integrantes de la familia pueden provocar abscesos de tipo estériles (Lemos, 2002).

Debido a su estructura química característica, la absorción vía intestinal puede alterarse en forma notable si se administran junto a los alimentos, sustancias que aumenten el pH estomacal o contengan cationes bivalentes o trivalentes que generen la formación de complejos quelantes como calcio, magnesio, manganeso, aluminio, cinc, hierro, bismuto y fármacos como cimetidina y omeprazol (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Chambers, 2001).

Alcanzan la  $C_{max}$  entre 1-3 hrs en un rango de 1-5 mg/L después de su administración, siendo esta dependiente de la dosis (Agwuh y MacGowan, 2006). La unión a proteínas séricas es variable dependiendo del compuesto, puede encontrarse en rangos de 50% a 95% (Azanza *et. al*, 1998; Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

En animales, el volumen de distribución varía entre los 2,1 lt/Kg para la oxitetraciclina en perros y gatos, hasta los 0,8 lt/Kg en el ganado vacuno (Lemos, 2002).

Su distribución en el organismo es amplia debido a su gran liposolubilidad, penetrando en la mayoría de los tejidos y secreciones en el organismo, incluidos orina, líquido prostático y leche materna. Son capaces de difundir a tejido placentario, alcanzando concentraciones en líquido amniótico y plasma umbilical del orden del 10 a 60% de la concentración plasmática. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) pueden alcanzar niveles que oscilan entre 10% a 26% de los séricos (incluso sin inflamación meníngea), en el esputo del orden del 20% y en el líquido sinovial y mucosa del seno maxilar superior niveles similares a los presentes en el plasma (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003). Además, se acumulan en células retículo endoteliales de hígado, bazo y médula ósea, en huesos, dentina y esmalte de dientes sin brotar (Chambers, 2001).

Las tetraciclinas de primera generación no sufren metabolización, a excepción de la tetraciclina, cuyo metabolito es epitetraciclina. La mayoría se eliminan por excreción renal mediante filtración glomerular (Lemos, 2002; Agwuh y MacGowan 2006). En relación a lo anteriormente descrito, la eliminación por orina varía según el compuesto, siendo de un 6% para minociclina, 18% para clortetraciclina, 42% para doxiciclina y un 60% para tetraciclina (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

Las tetraciclinas eliminadas por bilis son reabsorbidas en intestino mediante recirculación entero-hepática, aumentando la semivida de estos antibióticos en el orden de 6 a 10 hrs. De acuerdo a esto, una disminución de la función hepática u obstrucción del colédoco reduciría la excreción de estos fármacos por la vía biliar, por lo cual su vida media sería más larga y sus concentraciones en plasma mayores (Lemos, 2002). De acuerdo a su perfil farmacocinético, pueden agruparse en tres categorías (Agwuh y MacGowan; 2006) (Tabla 2):

Tabla 2: Clasificación de tetraciclinas de acuerdo a sus características farmacocinéticas

<b>Grupo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Representantes</b>
1	Antiguos agentes de la familia, se caracterizan por su reducida absorción y menor carácter lipofílico, en comparación a las nuevas moléculas.	Tetraciclina Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Demeclociclina Limeciclina Metaciclina Rolitetraciclina
2	Presentan mejor absorción, presentan un carácter lipofílico de tres a cinco veces superior a las del grupo	Doxiciclina Minociclina.

3	Agentes de última generación y en desarrollo como las aminometilciclinas	Tigeciclina BAY 73-6944/PTK 0796
---	--	-------------------------------------

*Fuente: Agwuh y MacGowman, 2006*

### Farmacodinámica

La farmacodinámica corresponde a la relación existente entre las mediciones de la exposición a los antimicrobianos presentes en los fluidos corporales, versus los efectos antibacterianos y toxicológicos de las drogas (Craig, 2002).

El parámetro de mayor importancia en relación a la potencia de la droga, es la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, ml/L) (Levison, 1995). Sin embargo, existen otros parámetros importantes de considerar, como el patrón de muerte bacteriana, la persistencia de los efectos y modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos tanto *in vitro* como en animales (Craig y Ebert, 1999). La farmacodinámica de las tetraciclinas depende del tiempo en que la concentración tisular del antibiótico es superior a la MIC. Siendo el parámetro farmacodinámico más adecuado para predecir la eficacia clínica y microbiológica de las tetraciclinas es el cociente entre el área bajo la curva (AUC) y la MIC (AUC/MIC) (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003; Mella y Muñoz, 2009).

Las tetraciclinas actúan como agentes bacteriostáticos inhibiendo la síntesis proteica de células bacterianas. Atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de proteínas tipo porinas mediante difusión pasiva y llegan al citoplasma mediante un mecanismo activo donde se unen al ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis de proteínas (Chambers, 2001).

La inhibición de la síntesis proteica se logra debido a la capacidad del fármaco de evitar la asociación entre el Aminoacil-ARNt y el ribosoma bacteriano, efecto que se logra mediante la unión específica a la sub-unidad 30S del ribosoma. Sin embargo, esta unión es reversible lo que explicaría su efecto bacteriostático. Como

resultado de esta unión se impide la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en formación inhibiendo su elongación. Por otro lado, pueden generar quelación del magnesio ( $Mg^{++}$ ) necesario para la unión ribosómica e inhibir, de esta forma, sistemas enzimáticos bacterianos (Ej: fosforilación oxidativa) (Lemos, 2002; Pérez-Trallero e iglesias, 2003).

El mecanismo por el cual atraviesan las membranas externas de bacterias gran negativas se basa en el paso a través de las porinas OmpF y OmpC como catión cargado positivamente, probablemente como complejo ( $Mg^{++}$ )-tetraciclina. Este complejo es atraído por el potencial de *Donnan* a través de la membrana externa llevando a su acumulación en el periplasma, una vez en este lugar, el complejo ion-tetraciclina se disocia para liberar al fármaco sin carga, molécula débilmente lipofílica, capaz de difundir a través de la bicapa lipídica de la membrana interna (citoplasmática). Del mismo modo se asume que la forma electroneutral (lipofílica) es la que atraviesa la membrana citoplasmática de las bacterias gran positivas. El paso de las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática es dependiente de energía, y es comandada por el factor  $\Delta$ -pH de la fuerza protón-motriz (Chopra y Roberts, 2001).

### **Resistencia frente a las tetraciclinas**

La resistencia frente a tetraciclinas es frecuentemente encontrada en bacterias zoonóticas, patogénicas e intestinales como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, como consecuencia de la presión de selección resultante del uso intensivo de estos fármacos (Sengelov *et al*, 2002)

Existen diferentes mecanismos de resistencia que pueden limitar el acceso de las tetraciclinas al ribosoma, prevenir la unión al ribosoma, y producir enzimas que las inactiven.

#### Limitar el acceso de las tetraciclinas al ribosoma

En las bacterias, principalmente gran negativas, se alteran las porinas limitando la difusión de las tetraciclinas hacia el periplasma. Las cepas que poseen este tipo de resistencia también presentan resistencia a otros antibióticos como  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas (Goldstein *et al*, 1994).

Una segunda forma de limitar el acceso de las tetraciclinas a los ribosomas es reduciendo las concentraciones intracelulares mediante el bombeo del antibiótico fuera de la célula a igual o superior proporción que la absorción del fármaco. En este caso, el gen de resistencia codifica para una proteína de membrana que actúa como un transportador de tetraciclinas dependiente de energía. Estos genes se han encontrado tanto en bacterias gran negativas como gran positivas (Chopra y Roberts, 2001).

#### Prevenir la unión de las tetraciclinas al ribosoma

Las bacterias resistentes pueden prevenir la acción de las tetraciclinas mediante proteínas citoplasmáticas que actúan protegiendo al ribosoma de la acción de las tetraciclinas, generando una alteración en la conformación ribosomal. Esto permite actuar al aminoacil-ARNt en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de proteínas (Speer *et al*, 1992). Este mecanismo de protección ribosomal funciona tanto *in vivo* como *in vitro*, a diferencia de las proteínas de eflujo, las cuales requieren de membranas intactas para ser efectivas (Chopra y Roberts, 2001).

#### Producción de enzimas que inactiven a las tetraciclinas

En forma excepcional se ha observado este mecanismo de resistencia en algunas bacterias de tipo anaeróbicas. El gen que codifica este tipo de resistencia fue descubierto en dos transposones cercanamente relacionados de bacteroides, que además transportaban el gen para la resistencia contra eritromicina. El gen de resistencia a tetraciclina fue primeramente identificado por su habilidad de conferir resistencia a *E.coli*. Este gen produce una proteína citoplasmática de 44-kDa que



modifica químicamente a la tetraciclina mediante una reacción que requiere NADPH y oxígeno (Speere *et al*, 1992).

Algunas de las tetraciclinas de última generación, las glicilciclinas, han demostrado ser activas frente a cepas bacterianas resistentes a las tetraciclinas convencionales, lo que ha permitido revitalizar en los últimos años el uso de este grupo de antibióticos (Lemos, 2002).

### **Aplicaciones de las Tetraciclinas**

En medicina humana, son los compuestos de primera elección en el tratamiento de enfermedades zoonóticas como: brucelosis, cólera, psitacosis, fiebre Q, fiebre botonosa mediterránea y en el tracoma. Se recomiendan para el tratamiento de la enfermedad pélvica inflamatoria, infecciones por espiroquetas, enfermedad de "Lyme" y también como tratamiento alternativo de la sífilis y leptospirosis. Se han utilizado en el tratamiento de la enfermedad de "Whipple" y son útiles en el acné. Como aplicaciones más recientes destacan el tratamiento de la gastritis y úlcera péptica asociadas a *Helicobacter pylori* (Pérez-Trallero e Iglesias, 2003).

En medicina veterinaria, las tetraciclinas están especialmente indicadas para el tratamiento de infecciones causadas por rickettsias, *chlamydias*, *erlichia* y algunos micoplasmas, así como para el tratamiento de brucelosis en combinación con otros antibióticos como rifampicina o estreptomina. En todas estas infecciones causadas por patógenos intracelulares, la doxiciclina y la minociclina suelen ser más efectivas que las tetraciclinas clásicas por su mayor carácter lipófilico (Lemos, 2002). De acuerdo a Lemos (2002), las tetraciclinas son de especial utilidad en el tratamiento y profilaxis de una serie de cuadros e infecciones en diferentes especies animales, estas son presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3: Afecciones y cuadros comunes tratables por tetraciclinas de acuerdo a especie animal

<b>Especie</b>	<b>Cuadro/Infecciones</b>
Bovino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2ª elección mastitis aguda por gram positivas.</li> <li>- Babesiosis</li> <li>- Infecciones por <i>Pasteurellaspp</i></li> <li>- Infecciones por <i>Mycoplasmaspp.</i></li> </ul>
Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecciones por <i>Mycoplasma conjuntivae</i></li> <li>- Abortos por <i>Chlamydia psittaci.</i></li> <li>- Infecciones por <i>Pasteurella spp</i></li> </ul>
Caprinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecciones por <i>Pasteurella spp</i></li> <li>- Infecciones por <i>Mycoplasma spp.</i></li> </ul>
Porcinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rinitis atrófica por:</li> <li>- <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></li> <li>- <i>Mycoplasma ahyopneumoniae</i></li> <li>- <i>Pasteurella multocida</i></li> <li>- Leptospirosis</li> </ul>
Caninos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecciones por <i>Ehrlichia canis</i></li> <li>- Infecciones por <i>Rickettsia rickettsi</i></li> <li>- Cuadros de leptospirosis</li> <li>- Cuadros de Borreliosis</li> </ul>
Felinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infección de tracto urinario por <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> </ul>
Aves	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clamidiosis</li> <li>- Enfermedad respiratoria crónica por <i>Mycoplasma gallisepticum</i></li> <li>- Sinovitis infecciosa por <i>Mycoplasma synoviae</i></li> <li>- Cólera aviar por <i>Pasteurella multocida.</i></li> </ul>

## **Residuos de antimicrobianos en los alimentos de origen animal y su implicancia en salud pública.**

La utilización de fármacos en animales de producción para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades, es una práctica habitual pero cada vez más controlada tanto por parte de los médicos veterinarios como por las autoridades sanitarias correspondientes, debido a que residuos de estos pueden permanecer en los productos alimenticios destinados a la población humana que se originan de animales tratados.

En el caso de las tetraciclinas, debido a su espectro bacteriano y a su relación costo-efectividad, son ampliamente utilizadas en los animales productivos, administrándose junto al alimento para prevenir diversas enfermedades en gallinas de corral y ponedoras de reproducción (Sczesny *et al.*, 2003).

Los efectos adversos generados por las tetraciclinas se centran principalmente en tres aspectos: resistencia en bacterias que puede ser transmitidas al ser humano, reacciones tóxicas específicas y alteración de la microbiota intestinal humana (Hassouan *et al.*, 2007).

Dentro de las reacciones tóxicas específicas se describe irritación de la mucosa gastrointestinal en grado variable relacionado con la presentación de colitis pseudo membranosa causada por proliferación excesiva de *Clostridium difficile*. Además, se depositan en los huesos y dientes debido a sus propiedades quelantes, formando complejos de tetraciclinas-ortofosfato cálcico, lo que provoca hiperpigmentación, hipoplasia dentaria y deformaciones óseas (Chambers, 2001).

En relación a la alteración en la microbiota intestinal, se ha descrito la selección de bacterias aeróbicas y anaeróbicas resistentes, y la alteración del “efecto barrera” de la flora intestinal (Sullivan *et al.*, 2001).

Los huevos destinados al consumo humano pueden contener residuos de oxitetraciclina, o de otros fármacos por tres causas principales, de acuerdo a Donoghue y Hairston (1999):

- Por uso ilegal o “extra- etiqueta” de las drogas.
- Por uso no intencional de alimento contaminado en forma cruzada en la maquina mezcladora.
- Por uso no indicado de alimento para aves broilers en gallinas de postura.

Dentro de éstas causas, la principal corresponde a la contaminación cruzada del alimento en la máquina de mezcla o durante el transporte (Esteve y García, 2005). Por lo tanto, existe el riesgo de que estos residuos farmacológicos lleguen a la población humana a través de la cadena alimentaria produciendo consecuencias negativas para la salud pública.

#### **Límites Máximos Residuales (LMR) y períodos de resguardo.**

El *Codex Alimentarius* (2006) define LMR como: “*La concentración máxima de residuos resultantes del uso de un medicamento, expresada en mg/kg o µg/kg (sobre la base del peso fresco), que se permite legalmente o se reconoce como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo*”. Para el establecimiento de los LMR es necesario, mediante estudios farmacocinéticos, identificar un “tejido marcador”. Este corresponde al tejido en el cual la concentración del residuo de un fármaco, inalterado y/o metabolito, declina más lentamente en función del tiempo (Unión Europea, 1990).

En la actualidad, existen LMR definidos para algunos integrantes de tetraciclinas en huevos. Específicamente el caso de la oxitetraciclina, los valores definidos por diferentes organizaciones son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4: LMRs para oxitetraciclina en huevo (como alimento completo), establecidos por diferentes organismos nacionales e internacionales.

Fármaco	LMR (µg/kg)		
	Unión Europea (1990)	Codex Alimentarius (2006)	Chile (2009)
Oxitetraciclina	200	400	200

Si bien existen diferencias en los LMR establecidos, la tendencia mundial es a armonizar los criterios de las distintas naciones con el fin de proteger a los ciudadanos a través de la entrega de un producto inocuo para el consumo y que esto no repercuta en el comercio internacional de los alimentos. De acuerdo a la OMC (1998), los países deberían considerar los LMR establecidos por el JECFA (Comité mixto FAO/OMS).

La utilización de los LMR permite realizar la evaluación de los períodos de resguardo, estos períodos se definen por el *Codex Alimentarius* como: “el período que transcurre entre la última administración de un medicamento y la recolección de los tejidos comestibles o productos provenientes de un animal tratado, que asegura que el contenido de residuos en los alimento se ajusta al límite máximo de residuo establecido para el medicamento, cuando exista”. La duración de estos períodos está en directa relación con la cinética del fármaco, por lo tanto, puede verse afectada por la vía de administración, la forma farmacéutica(excipientes) y la posología del fármaco en cuestión. La forma farmacéutica en particular, modifica la absorción, distribución y eliminación del fármaco, dando una pauta de depleción diferente y por lo tanto distintos tiempos de resguardo (Arboix y Martín-Jiménez, 2002). Por esta razón, el Registro de Medicamentos Veterinarios de cada país en particular debe solicitar la evaluación de los períodos de resguardo para cada especialidad farmacéutica antes de que ésta sea autorizada en una especie específica (San Martín, 2001).

Para la determinación de estos periodos es necesario realizar estudios de depleción del fármaco en distintos los tejidos destinados al consumo humano. En el caso de las aves de postura, son los huevos los que deben ser sometidos a estudio. Dependiendo de las características fisicoquímicas del fármaco, los residuos pueden alcanzar los ovarios, folículos en crecimiento y oviducto difundiendo a la clara o yema (Lolo *et al.*, 2005).

Los estudios de depleción se deben realizar utilizando una formulación del fármaco disponible en el mercado y el régimen terapéutico recomendado. La Unión Europea a través del Comité para Medicamentos Veterinarios (CVMP) recomienda utilizar entre 3 a 10 animales por tiempo de muestreo (CVMP, 1997), mientras que la FDA recomienda el uso de 5 animales (FDA, 2005).

Como se mencionó anteriormente, los intervalos de tiempo en el muestreo varían según las características farmacocinéticas de la droga. De esta forma, el parámetro farmacocinético considerado para los estudios de depleción corresponde a la fase de eliminación terminal del fármaco. Para llevar a cabo esto, se deben realizar curvas de concentración del fármaco versus tiempo. Se considera que la fase de eliminación terminal sigue un modelo mono-compartimental con una cinética de eliminación de primer orden y se analiza a través de un Análisis de Regresión Lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. De esta forma, el periodo de resguardo se establece cuando las concentraciones obtenidas a partir del análisis de las muestras se encuentran bajo el LMR establecido para el alimento (CVMP, 1997).

El uso racional de antimicrobianos comprende el cumplimiento de las indicaciones y modo de empleo del medicamento, así como el cumplimiento de los periodos de resguardo. El *Codex Alimentarius* señala que el cumplimiento del periodo de resguardo para cada formulación de un fármaco es una de las principales medidas para controlar la presencia de residuos en los tejidos animales que son destinados al consumo humano (FAO/OMS, 1995).

## **Programas de control de residuos**

La Comisión Mixta FAO/OMS (JECFA), el *Codex Alimentarius*, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Internacional de Normalización (ISO), realizaron en conjunto un programa sobre Normas Alimentarias, donde se incluyen los Programas de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios y cuyo objetivo es proteger la salud de los consumidores al asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de los alimentos de origen animal.

Por otra parte, la Organización Mundial de Comercio (OMC, 1998) estableció un Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, relacionadas con la inocuidad de los alimentos y el control sanitario de animales y vegetales. En el Acuerdo, la OMC alienta a los diferentes gobiernos a armonizar sus medidas sanitarias siguiendo las directrices internacionales elaboradas por la Comisión Mixta FAO/OMS (JECFA) y el *Codex Alimentarius*. Además, señala que los países pueden aplicar medidas más rigurosas, siempre y cuando exista una justificación científica sobre la base de una evaluación adecuada del riesgo, para que de esta manera no sean obstáculo en la comercialización internacional de los alimentos.

Con el fin de establecer un programa eficaz de control de residuos de medicamentos veterinarios en los productos alimenticios, el *Codex Alimentarius* recomienda que los países adopten una serie de medidas entre las cuales se pueden destacar (FAO/OMS, 1995):

- Establecer un organismo regulador encargado de ejecutar los programas de inspección y los análisis de laboratorio. Además, este organismo debe poseer la facultad de tomar las medidas necesarias, cuando los residuos superen los límites máximos establecidos a nivel nacional.
- Realizar un adecuado Registro de Medicamentos Veterinarios, incluidos los productos elaborados nacionalmente y los que el país importe.

- El organismo que registra los productos farmacéuticos, debe controlar además que la industria farmacéutica señale en su etiquetado toda la información que permita una correcta aplicación del medicamento (dosis, ritmo de administración, duración de la terapia y especie de destino). Además, se deben señalar el tiempo de espera o período de resguardo, LMR del medicamento y restricciones de uso si es que existen.
- El organismo debe, definir los LMR, para todo medicamento que sea autorizado a nivel nacional.
- Establecer los medicamentos que representen un mayor riesgo para la salud del consumidor.
- Controlar la distribución y venta de los medicamentos. Además de controlar la prescripción y aplicación del medicamento bajo la responsabilidad del Médico Veterinario.
- Ejecutar un programa de garantía de calidad, con el objetivo de garantizar los resultados de los métodos de análisis. Respecto a esto, la OMC recomienda a los países que los laboratorios analíticos trabajen de acuerdo a las directrices ISO.
- Elaborar programas educacionales para productores y veterinarios, en los que se fomente el uso de medidas preventivas para reducir la presencia de residuos en animales destinados a la producción de alimentos.

Existen diferentes organizaciones gubernamentales e intergubernamentales que velan por el cumplimiento en el control de residuos y, además, se encargan de sancionar las infracciones. En relación a esto, la FDA de los Estados Unidos de América, a través del "*Center for Veterinary Medicine*" (CVM) se encarga de regular la manufactura y distribución de los aditivos alimenticios y drogas que son administradas a los animales (FDA, 2011).

En el caso de la Unión Europea, la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) se encarga de la protección y la promoción de la salud pública y animal, a través del control sobre el uso de los medicamentos (Unión Europea, 2008). El objetivo de esta



Reglamentación es asegurar un mismo nivel de protección de la salud en el conjunto de la Unión Europea y por otra parte eliminar los obstáculos sanitarios para liberalizar los intercambios de los alimentos de origen animal(Unión Europea, 2002).

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) dependiente del Ministerio de Agricultura, es el encargado de llevar a cabo el Registro de Medicamentos Veterinarios, de realizar el Programa Nacional de Control de Residuos en Productos Pecuarios y de generar la certificación para los productos de exportación. Por su parte, el Ministerio de Salud, a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos, es el encargado de velar por las inocuidad de los alimentos que van a ser consumidos por la población humana del país.

Actualmente los Programas de Control de Residuos presentes en Chile monitorean productos animales como: carnes (de ovino, liebre, pollo, cerdo, pavos, bovino), miel y lácteos, sin embargo no se incluye entre estos el monitoreo de huevos. Por otra parte, los laboratorios nacionales no cuentan con métodos analíticos validados para la detección de residuos de distintos fármacos en este alimento. Los laboratorios deben ser acreditados por el SAG a través del Sistema de Acreditación a Terceros y además por el Instituto Nacional de Normalización (INN), el cual otorga la Acreditación ISO 17025, correspondiente a uno de los requisitos exigidos por instructivo técnico de diagnóstico de residuos (SAG, 2008).

### **Residuos de antimicrobianos en huevos**

El huevo está compuesto principalmente por tres componentes: la yema, paquete nutricional para el embrión, la albúmina o clara, secretada por el aparato reproductor; y la cáscara, que proporciona protección y los minerales necesarios para el desarrollo. Las diferencias individuales en el tamaño, composición del huevo y la velocidad en su producción depende de factores genéticos, ambientales y fisiológicos propios de cada animal (Proudman, 2002).

La yema, se compone principalmente de lipoproteínas formadas en el hígado, las cuales, por vía sanguínea, son transportadas al ovario. Una vez aquí, son depositadas concéntricamente en los folículos ováricos. Este proceso tarda aproximadamente 10 días en ser completado (Donoghue y Myers, 2000; Kan y Petz, 2000).

El oviducto puede dividirse morfológica y funcionalmente en seis regiones: *Infundibulum*, *Magnum*, Istmo, Istmo rojo o glándula tubular de la cáscara, glándula de la cáscara propiamente tal y vagina. Además, al realizar un corte transversal de cualquiera de estas regiones, es posible apreciar siete capas que se pueden agrupar en: tejido secretor, muscular y conectivo. Todos estos segmento, con excepción de la vagina, están involucrados en el proceso de formación del huevo (Fernández y Arias, 2000).

Posterior a la ovulación, la yema ingresa al *Infundibulum*, sitio en el cual ocurre la fecundación antes del depósito de la albúmina. El paso de la yema por este segmento es de pocos minutos (15-20 mins). Posteriormente pasa al *Magnum*, en donde permanece 3-4 horas, en este segmento se sintetiza la totalidad de las proteínas de la albúmina o clara, siendo almacenadas y secretadas alrededor del óvulo (Donoghue y Hairston, 2000).

En el istmo, el huevo en formación permanece aproximadamente 1-2 horas, y es en este lugar en donde ocurre el depósito de las membranas de la cáscara. Posteriormente, el huevo alcanza la glándula de la cáscara en donde permanecerá por aproximadamente 20 horas. En esta región se realiza la hidratación de las proteínas de la clara y la mineralización de la cáscara mediante la precipitación de calcio en asociación con una trama orgánica. Durante las dos últimas horas de la formación de la cáscara, la mineralización es detenida y se inicia el depósito de cutícula. Finalmente la glándula de la cáscara se contrae, expulsando el huevo formado hacia la vagina (Fernández y Arias, 2000).

La distribución de los medicamentos en el huevo depende de diversos factores como son: la fisiología de formación del huevo, la composición de la yema y la clara y las propiedades fisicoquímicas del fármaco. De esta manera, según la liposolubilidad o hidrosolubilidad de la droga, estos tendrán una mayor afinidad por la clara o yema respectivamente (Kan y Petz, 2000).

Los residuos en la yema pueden reflejar los niveles plasmáticos de los 10 días de su fase de crecimiento rápido, por lo tanto, dependiendo del tiempo y momento de la exposición respecto al crecimiento de la yema, los niveles en ésta pueden incrementarse, mantenerse o decaer. Generalmente, la yema requiere de una exposición de 8 - 10 días para encontrar niveles constantes.

En el caso de la clara, los residuos presentes en ésta son un reflejo de los niveles plasmáticos, y por lo tanto mostrará niveles constantes en el tiempo mientras el plasma lo haga. El tiempo necesario para lograr niveles constantes en la clara es por lo general entre 2 - 3 días. Por otro lado, si los niveles del fármaco en el organismo decaen rápidamente, también lo harán en la clara, tomando entre dos a tres días desde el cese de la exposición en desaparecer. En el caso de la yema, este proceso generalmente toma 10 días. Sin embargo, si el nivel de exposición es demasiado alto y el límite de detección en estudio es lo suficientemente bajo, sería posible la detección de drogas en huevos cuyas yemas se encontraban en la fase intermedia del crecimiento folicular. De lo contrario, si la sensibilidad del método analítico no es la adecuada, los residuos presentes en el huevo podrían detectarse sólo por un corto periodo, o no ser detectados (Kan y Petz, 2000). De esta forma, tanto las propiedades farmacocinéticas de la droga, como la fisiología de la gallina y la propia formación del huevo influyen y determinan la magnitud de los residuos que se depositan en cada compartimiento, por lo que se hace difícil predecir a partir de variables medidas "in vitro" lo que ocurrirá "in vivo" (Kan, 2003).

Donoghue y Hairston (1999), señalan que existe traspaso de oxitetraciclina a las partes comestibles del huevo después de cinco días de exposición. Sin embargo, el

realizar este estudio en huevos enteros (clara y yema homogenizadas) puede llevar a error en la cantidad de residuos a evaluar debido a que existe dilución de una matriz en la otra. Este efecto de dilución es marcado en la yema, ya que, la clara es aproximadamente 2/3 de la masa comestible del huevo.

Kan y Petz (2000), recolectaron datos de estudios de diversos fármacos y su distribución en yema y clara. De acuerdo con éstos, la oxitetraciclina presenta mayor distribución en la yema en comparación a la clara. A esta misma conclusión llegó Zurhelle *et al* (2000), al evaluar la distribución de diversos metabolitos de tetraciclinas en clara y yema.

### **Técnicas de análisis y detección de Tetraciclinas en huevos**

En la actualidad, la técnica de análisis más habitual para determinar residuos de medicamentos presentes en los alimentos de origen animal, corresponde a la cromatografía, principalmente la cromatografía líquida con detección ultravioleta, fluorescencia o espectrometría de masas y cromatografía de gases. Estas técnicas se caracterizan por ser específicas, selectivas y muy sensibles, permitiendo determinar pequeñas concentraciones de los fármacos en la matriz o muestra a analizar (Pérez, 2004).

El método de elección para la identificación y cuantificación de residuos de tetraciclinas, incluida oxitetraciclina, es la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con Detector DAD o acoplada a espectrometría de masa (LC MS-MS) (Sczesny *et al.*, 2003). En este último caso, esta tecnología permite mejorar los límites de detección y son aceptadas actualmente como métodos confirmatorios (Alfredsson *et al.*, 2004).

Además de esto, en los últimos años, la espectrometría de masas ha evolucionado y adquirido nuevas herramientas que buscan simplificar y aumentar la exactitud de los resultados. En relación a lo anterior la técnica de ionización

denominada MALDI-TOF , denominada de esta forma por sus siglas en ingles para “*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*” y “*Time-of-Flighth*” por el detector de iones acoplado, ha demostrado ser una técnica simple, sensible, rápida, conveniente y de un alto rendimiento para el estudio de muestras de rutina en el análisis de tetraciclinas posicionándose como el principal futuro reemplazante de las técnicas de detección actuales mediante LC-MS/MS (Junyan *et al*, 2012). Esta técnica hace uso de ionización laser “in situ” en muestras orgánicas, agilizando el proceso y permitiendo saber con total exactitud la caracterización de espectrometría de compuestos complejos que de otra forma requerirían de costosos y lentos procesos de extracción y purificación.

Independientemente del método analítico seleccionado, y con el fin de obtener resultados reproducibles y repetibles, los laboratorios deben previamente validar los métodos analíticos, “aun cuando éstos sean oficiales, de referencia, o hayan sido previamente descritos”. Al respecto, la directiva de las Comunidades Europeas sobre el Funcionamiento de los Métodos Analíticos y la Interpretación de Resultados, señala que el concepto de métodos de rutina y de métodos de referencia se encuentra obsoleto, remplazándose por un planteamiento que establece criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos (Unión Europea, 2002).

El procedimiento de validación de un método analítico debe incorporarse en todas las investigaciones cuyos resultados dependen de la química analítica, ya que permiten al laboratorio demostrar que el método seleccionado y desarrollado para una sustancia específica, en una muestra específica, produce resultados comparables. Esto se logra a través de una serie de pruebas estadísticas que permiten demostrar la confiabilidad de los resultados. Los parámetros a definir en una validación son la especificidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, precisión, repetitividad y robustez (Unión Europea, 2002).

De acuerdo a lo expuesto, es necesario realizar estudios que permitan determinar la magnitud de traspaso de fármacos en los compartimentos del huevo, con el fin de definir el tejido marcador, el cual puede ser monitoreado en Programas de Control de Residuos en el caso de que se incorpore este alimento. Además, y en relación a esto, los laboratorios nacionales no cuentan con métodos analíticos validados para la detección de residuos de distintos fármacos en este tipo de alimento. Por esta razón, y en base a los antecedentes expuestos, es evidente la necesidad a nivel nacional de desarrollar y validar métodos analíticos mediante HPLC que permitan monitorear la detección de residuos de oxitetraciclina en huevos siguiendo las recomendaciones internacionales. Además, al observar el comportamiento de oxitetraciclina en esta matriz, se definirá la cinética de depleción de este fármaco en huevos originados durante el ciclo de postura de las aves, con el fin de evaluar la magnitud con que son transferidos a este alimento y el tiempo que permanecen en ellos. Con estos resultados, adicionalmente, se podrán determinar los periodos de resguardo en huevos en relación al LMR establecido a nivel nacional.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la magnitud del traspaso de oxitetraciclina a los huevos obtenidos de gallinas tratadas con este fármaco durante y después de la terapia.

### **Objetivos Específicos**

- I) Validar un método analítico para la detección de oxitetraciclina en clara y yema
- II) Identificar el compartimiento del huevo (clara o yema) que corresponde al tejido marcador
- III) Determinar el período de resguardo de una formulación de oxitetraciclina en huevos obtenidos de gallinas de postura tratadas con este fármaco.

## MATERIALES y MÉTODOS

### 1. Obtención de las muestras

#### 1.1 *Grupos de aves*

Se utilizaron 12 gallinas Leghorn de 16 semanas de edad, criadas en la Unidad Experimental de Nutrición y Producción Avícola del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las condiciones de manejo de los animales se efectuaron de acuerdo a los preceptos de Bienestar Animal señalados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (anexo 1). Las aves fueron alimentadas con dietas libres de antimicrobianos. El alimento fue elaborado de acuerdo a las recomendaciones del National Research Council (NRC, 1994) para cubrir los requerimientos nutricionales de la línea genética respectiva. A las 20 semanas de edad, las gallinas fueron divididas en forma aleatoria en 2 grupos (Tabla 5).

Tabla 5: Grupos de aves utilizadas en el estudio

Grupo	Nº de aves	Tratamiento
I	2	Sin Tratamiento
II	10	Oxitetraciclina, 40 mg/kg pv, durante 10 días.

A las gallinas del Grupo II, se les administró por vía oral una dosis de 40 mg/kg p.v de oxitetraciclina utilizando una sonda gástrica para asegurar la ingesta completa de la dosis. A los animales del Grupo I se les administró agua como placebo para descartar variaciones experimentales por manejo. El tratamiento se realizó cada 24 horas durante 10 días consecutivos utilizando una formulación comercial de la droga.

#### 1.2 *Recolección de muestras*

Aproximadamente dos semanas previas a la administración del antimicrobiano, se recolectaron huevos de ambos grupos de aves destinados a los estudios de validación del método analítico. Posteriormente, una vez iniciada la administración del antimicrobiano, se recolectaron huevos desde el inicio del tratamiento, hasta 30 días posterior a este.



Diariamente, cada grupo de huevos obtenidos, fue rotulado señalando la fecha y el grupo de estudio al que pertenecían al momento de la recolección. Las muestras se almacenaron bajo refrigeración (entre 4°C y 8°C) en el laboratorio hasta el momento de su análisis.

## 2. Equipamiento

- Refrigerador entre 2° C y 8° C.
- Balanza de pesaje de muestras
- Balanza analítica.
- Tubos de ensayo para centrifuga (Falcón) de 50 ml.
- Matraces volumétricos de 250, y 500 ml (marca)
- Tubos de ensayo de 12 ml.
- Jeringas desechables de 10 y 20 ml.
- Lana de vidrio (MerckKGaA, Darmstadt, Germany)
- Agitador Vortex Multireax (Heidolph Instruments GmbH)
- Centrifuga de 4.000 rpm (Heidolph Instruments GmbH)
- Pipetas automáticas de 10 a 100 ul (Brand GmbH + CO)
- pHmetro (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Columnas Extracción Fase Sólida (SPE) Sep-Pak® C18 (Waters Corporation, Mildford, Ma, USA)
- HPLC con Detector DAD Elite LaChrom módulos: L-2200, L-2300, L-2130, L-2455, (Hitachi High Technologies America, Inc.).
- Columna analítica XTerra RP18 5µm, 4.6x250 mm (Waters Corporation, Mildford, Ma, U.S.A).

## 3. Reactivos, soluciones y otros materiales de laboratorio.

### 3.1 *Reactivos:*

- Acido cítrico, grado PA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Acido oxálico, grado PA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Sulfato de Sodio anhidro, grado PA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Acetonitrilo, grado HPLC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Metanol, grado HPLC (Fisher Scientific, New Jersey, U.S.A)

- Agua, grado HPLC (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### 3.2 Soluciones:

- Tampón McIlvane/EDTA:  
Solución A: 14,2 grs de fosfato di-sódico enrasados a 500 ml con agua HPLC  
Solución B: 10,5 grs de ácido cítrico enrasados con 500 ml de agua HPLC  
Mezcla de 500 ml de solución B más 312,5 ml de solución A, la solución final posee un pH de  $4,0 \pm 0,1$
- Solución Ácido Oxálico 0,01 M en metanol:  
0,63 gr de ácido oxálico dihidratado enrasado a 500 ml con metanol.
- Fase móvil (B) utilizada en el sistema cromatográfico:  
Acido Oxálico 0,001 M (1,26gr de Acido Oxálico Dihidratado en 1000mL de H<sub>2</sub>O grado HPLC)/ Acetonitrilo 200mL, la solución final posee un pH  $2,2 \pm 0,2$ .

## 4. Estándares

### 4.1. Validación del método analítico:

Se utilizó estándar de pureza certificada de oxitetraciclina suministrados por Dr. Ehrnestorfer GmbH® (Augsburg, Alemania), desde la cual se prepararon diferentes diluciones de trabajo para enriquecer las muestras blanco que fueron utilizadas en la validación del método analítico.

### 4.2 Tratamiento de las aves:

Para el tratamiento de las aves, se utilizó una presentación comercial de antimicrobiano correspondiente Oxitetraciclina clorhidrato 80%, polvo oral, equivalente a 74,2 g de oxitetraciclina base por 100 grs de producto comercial.

## 5. Preparación de las muestras y procedimiento analítico

El método para la extracción de la droga en estudio se realizó de acuerdo a lo descrito por Reveurs y Díaz (1994) y Cristofanie, et al (2009) para músculo, adaptando el método

de extracción para la matriz en estudio. Se separó clara y yema, siendo analizadas en forma independiente con el fin de determinar el componente más indicado para el monitoreo del fármaco (tejido marcador).

Debido a que las tetraciclinas presentan foto-degradación frente la luz ultra-violeta (UV), todo el trabajo de extracción se realizó con material de laboratorio protegido de la luz envuelto con papel aluminio.

A 10 grs de muestra previamente homogenizada (clara o yema), se le agregaron 20mL de tampón *Mcllvane*/EDTA (pH 4±0.1). Posteriormente la muestra fue agitada, sonicada y centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm.

El sobrenadante, se filtró a través de lana de vidrio. Para la limpieza de la muestra se utilizó una columna de extracción de fase sólida (SPE) C18 y la elución se realizó con ácido oxálico 0,01 M en metanol. El eluido fue concentrado en baño maría a 40°C±0.5 bajo flujo de nitrógeno y luego reconstituido con 500µl de fase móvil. Luego se traspasó a un tubo de centrifuga de 1.5 ml y se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante, se traspasó a un vial de lectura para HPLC.

#### 6. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas utilizadas en el equipo HPLD-DAD son presentadas en la Tabla 6:

Tabla 6: Condiciones del Sistema Cromatográfico para determinación de Oxitetraciclina

Columna Analítica	Waters, modelo XTerra RP18
Proporción de Fase móvil A (Acetonitrilo)	13%
Proporción de Fase móvil B (Ácido Oxálico 0,001 M)	87%
Flujo utilizado para fase móvil	0.7 ml/minuto
Temperatura de la columna analítica	35°C
Longitud de onda de Detección	360 nm

Para el registro de la información se utilizó el software EZ Chrom Elite Ver. 3.1.7. bajo el sistema operativo Microsoft Windows XP SP2.

**Objetivo 1: Validar un método analítico para la detección de oxitetraciclina en clara y yema.**

El método analítico fue validado de acuerdo a las recomendaciones de la Directiva 657/2002/CE de la Comunidad Europea, del *Codex Alimentarius* y regulaciones ISON<sup>o</sup> 17.025 (2005). Para esto se utilizaron huevos libres de antimicrobianos (obtenidos de las aves experimentales previo al inicio del tratamiento), a los cuales se les adicionaron diferentes concentraciones del analito de interés. Se evaluaron los siguientes parámetros:

*1. Tiempo de retención del analito*

Corresponde al tiempo (en minutos) en el que el analito de interés pasa a través de la columna cromatográfica. Es medido a partir del punto de inyección de la muestra al sistema HPLC, hasta el momento en que aparece la altura máxima del pico cromatográfico (señal gráfica entregada por el equipo al detectar el analito).

*2. Especificidad:*

Corresponde a la capacidad del método para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias presentes en la matriz. Para evaluar este parámetro, se analizaron 20 muestras blancos (10 de yema y 10 de clara) con el fin de verificar posibles interferencias en el tiempo de retención específico de oxitetraciclina.

*3. Límite de Detección (LD):*

Corresponde al límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error  $\alpha$  (1%) que una muestra no es conforme o positiva (Unión Europea, 2002).

Para su determinación, se fortificaron muestras de clara y yema con diferentes concentraciones de oxitetraciclina (10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), seleccionándose la concentración en la cual la relación señal ruido (S/N) entregada por el pico cromatográfico fuera a lo menos 3:1. Esta relación fue observada al emplear una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Para confirmar el LD, se fortificaron 20 muestras blanco(10 de clara y 10 de yema) con la concentración definida (30 µg/kg), siendo aceptado el LD si el coeficiente de variación (C.V % ) de los resultados de las repeticiones no sobrepasan el 25%.

#### 4. Límite de Cuantificación (LC):

Corresponde a la concentración mínima en la que se puede detectar muestras contaminadas con una certeza estadística de  $1 - \beta$ , donde el valor obtenido para el LC es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error  $\beta$  (5%) (Unión Europea, 2002)

Se calculó considerando la desviación estándar (d.s) del LD de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{LC área} = \text{LD} + 1,64 \text{ veces la d.s del LD.}$$

#### 5. Linealidad (curva de calibración):

Para evaluar este parámetro, se realizaron tres curvas en replicado a diferentes concentraciones (30, 50, 90, 120, 150 µg/kg), siendo el punto más bajo la concentración definida como el LD.

Se acepta el cumplimiento de las condiciones de linealidad de las curvas cuando el factor de determinación ( $R^2$ ) calculado, presenta un valor superior a 0,95. El cumplimiento de estas condiciones permite la cuantificación de una muestra que presente concentraciones mayores al LD(30 µg/kg) utilizando las curvas de calibración y aplicando la siguiente fórmula:

$$y = a + bx$$

Donde: y = Área cromatográfica, a = Intercepto de la curva en el eje y, b = Pendiente,  
x = Concentración

#### 6. Recuperación:

Corresponde a la eficacia del método de extracción en el rescate del analito de interés desde la matriz en estudio.

La evaluación de este parámetro se realizó mediante la confección de curvas de droga pura con determinadas concentraciones (inyectadas directamente al sistema HPLC) y curvas de muestras fortificadas en el mismo nivel de concentraciones. La respuesta instrumental observada en cada nivel de concentración de las curvas de droga pura (área cromatográfica), es comparada con aquella entregada por las curvas de muestras fortificadas. De esta manera, es posible calcular el porcentaje del analito que fue recuperado utilizando el procedimiento de extracción en estudio.

Para el cálculo de la recuperación, se realizaron tres curvas de droga pura y tres curvas de muestras fortificadas, tanto para clara como para yema, considerando los siguientes niveles de concentración: 30,50, 90, 120 y 150 µg/kg.

El porcentaje de recuperación fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = 100 * \frac{\text{Área Cromatográfica de la muestra}}{\text{Área Cromatográfica de la droga Pura}}$$

La recuperación del método de extracción es aceptada cuando los valores obtenidos del cálculo superen el 50%.

#### 7. *Repetitividad:*

Es evaluada realizando una serie de análisis sobre una misma muestra en condiciones operativas (equipamiento, reactivos, analistas) en el mismo laboratorio y en un breve período de tiempo.

Se determinó realizando un análisis de seis curvas de clara y yema fortificadas con tres niveles de concentración (30, 90, 150 µg/kg).

Posteriormente se realizó el cálculo de:

- La concentración detectada en cada muestra.
- Concentración media, d.s y C.V (%) para cada concentración.

Se aceptó la repetitividad cuando el C.V (%) de cada concentración medida, estuvo en rango de valores correspondientes a la mitad o igual al C.V (%) obtenido en la reproducibilidad intra-laboratorio.

#### 8. *Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):*

Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumentos, entre otros).

Se determinó realizando un análisis de seis curvas de muestras fortificadas tanto para clara como yema), a los mismos niveles que en el caso de la repetibilidad, pero realizadas por diferentes analistas y en diferentes días.

Se calcularon los mismos parámetros que en el caso anterior y fueron comparados. Se aceptó la precisión cuando el C.V (%) de cada concentración medida presentó un valor inferior al 25%

#### 9. *Robustez:*

Corresponde a la susceptibilidad que presenta un método analítico frente a los cambios de las condiciones experimentales. Se seleccionaron tres factores que pueden influir en el resultado final, estos corresponden a:

- pH 4.0 del tampón *MCIlvine*/EDTA
- Realización de sonicación de la muestra una vez homogenizada con el tampón *MCIlvine*/EDTA.
- Secado de la muestra en baño maría a  $40^{\circ}\text{C}\pm 0.5$  bajo flujo de nitrógeno.

La robustez fue calculada de la siguiente manera:

- Mediante Método de *Youden* se realizó un diseño factorial fraccional incompleto para detectar las interacciones entre los factores seleccionados.
- Se realizó el experimento de acuerdo a la configuración señalada por el método de *Youden* al nivel de concentración definido como LD (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).
- Junto con el experimento se realizó una curva de calibración a cinco niveles, para realizar la cuantificación de los experimentos.

Se confeccionaron diferentes cartas de trabajo en base a las modificaciones indicadas por el Método de *Youden*:

- Carta A: No ajuste de pH, No sonicar, Secado incompleto
- Carta B: Ajuste de pH, No sonicar, Secado incompleto
- Carta C: No ajuste de pH, Sonicar 5 min, Secado incompleto
- Carta D: Ajuste de pH, Sonicar 5 min, Secado incompleto
- Carta E: No ajustar pH, No sonicar, Secado completo
- Carta F: Ajuste de pH, No sonicar, Secado completo
- Carta G: No ajustar pH, Sonicar 5 min, Secado completo
- Carta H: Ajuste de pH, Sonicar 5 min, Secado completo

Mediante la comparación de las medias de cada ensayo se identificará el factor que afecta mayoritariamente a la robustez del método, considerándose este como medida precautoria. Se aceptará que el método es robusto, si la d.s calculada en el estudio de robustez es significativamente inferior que la d.s obtenida en la precisión (considerando la concentración a nivel del LD).

## **Objetivo 2: Identificar el compartimiento del huevo (clara o yema) que corresponde al tejido marcador**

### Análisis de las muestras

Los huevos recolectados desde el inicio del tratamiento fueron separados en claras y yemas y analizados mediante el método analítico previamente validado. Para realizar la cuantificación de oxitetraciclina, presentes en ambas matrices (clara y yema), se realizaron curvas fortificadas en forma paralela al lote de muestras. Estas curvas fueron preparadas utilizando claras y yemas provenientes de huevos blanco (sin antimicrobianos), recolectados previo al inicio del tratamiento. Desde estos huevos, se separaron claras y yemas y se realizó un compósito de cada matriz. Posteriormente, desde este se tomó la cantidad (10 gr) y el número de replicados necesarios (cinco por curva) para la confección de las mismas. Los replicados de ambas matrices fueron rotulados de manera individual para cinco puntos y enriquecidos con oxitetraciclina a una concentración de 30, 50, 90, 120, 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente. El punto inferior de enriquecimiento corresponde al LD calculado en la etapa de validación (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Las



curvas fueron aceptadas para su uso en cuantificación cuando el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) calculado en el análisis de regresión lineal fue igual o superior a 0.95.

Para identificar si la clara o la yema corresponde el tejido marcador, se analizaron los huevos obtenidos desde el inicio del tratamiento (día 1) hasta el final del mismo (día 10). Una vez obtenidas las concentraciones de cada componente, se construyeron gráficas, en escala semi-logarítmica, para definir en cual compartimento se alcanza una mayor concentración. Para corroborar si la diferencia existente entre los compartimentos es estadísticamente significativa, se realizó una prueba de significancia (t test) entre las medias aritméticas al decimo día de tratamiento

**Objetivo 3: Determinar el período de resguardo de una formulación de oxitetraciclina en huevos obtenidos desde gallinas de postura tratadas con este fármaco.**

#### *Determinación del período de Resguardo*

Para definir el período de resguardo de oxitetraciclina se evaluaron las concentraciones de este fármaco en función del tiempo, desde el primer día post-tratamiento, hasta un periodo de 30 días posterior. Con los datos obtenidos, se realizó un Análisis de Regresión Lineal a partir de una curva, en escala semi-logarítmica, de concentración de oxitetraciclina versus tiempo. Se utilizó la ecuación de K.Stange (CVMP, 1997) para determinar el 95% de confianza.

El periodo de resguardo fue determinado cuando todas las concentraciones del grupo en tratamiento se encontraron bajo el LRM establecido para oxitetraciclina en huevo (Reglamento Sanitario de Los Alimentos, 2009). En el caso de que este momento coincida con la fracción de un día, se considerará el día completo (Arboix y Martín-Jiménez, 2002).

## RESULTADOS

**Objetivo 1: Validar un método analítico para la detección de oxitetraciclina en clara y yema.**

Los resultados de los parámetros de la validación del método analítico utilizado para la determinación de oxitetraciclina en clara y yema de huevos obtenidos de gallinas de postura fueron los siguientes:

*1. Tiempo de retención del analito:*

El promedio de tiempo de retención para oxitetraciclina fue de  $10,508 \pm 0,331$  (minutos, milésimas de minuto).

*2. Especificidad:*

En 10 muestras blanco de clara y yema no se detectaron interferencias en las zonas de elución esperada del analito para ambas matrices.

*3. Límite de Decisión o Detección (LD):*

El Límite de Detección (LD) fue establecido en  $30 \mu\text{g/kg}$  en ambas matrices, este es aceptado si el C.V (%), considerando 20 replicados fortificados a este nivel, resulta ser inferior a un 25%. Los resultados, considerando 20 replicados fortificados a este nivel en cada matriz, se muestran en las Tablas 7 y 8:

Tabla 7: LD para oxitetraciclina en muestras de clara fortificadas a una concentración de  $30 \mu\text{g/kg}$

n	$\bar{X}$ calculado ( $\mu\text{g/kg}$ )	d.s	C.V (%)
20	31,45	3,28	10,28

Tabla 8: LD para oxitetraciclina en muestras de yemas fortificadas a una concentración de  $30 \mu\text{g/kg}$

n	$\bar{X}$ calculado ( $\mu\text{g/kg}$ )	d.s	C.V (%)
20	29,41	1,08	3,67

#### 4. Límite de Cuantificación (LC):

El valor calculado para el LC a partir del LD obtenido para ambas matrices se presenta en la Tabla 9:

Tabla 9: LC calculado para clara y yema fortificadas con oxitetraciclina a concentración de 30 µg/kg

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>LD</b>		<b>LC Calculado (µg/kg)</b>
		<b>Obtenido (µg/kg)</b>	<b>d.s de LD obtenido</b>	
Oxitetraciclina	Clara	31,45	3.28	35,90
Oxitetraciclina	Yema	29,41	1,08	31,77

#### 1.1 Linealidad de la Curva:

En las Tablas 10 y 11 se presentan las aéreas cromatográficas obtenidas instrumentalmente para 3 curvas de clara y yema fortificadas con diferentes concentraciones (5 puntos). Un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) superior a 0.95 en tres curvas demuestra la linealidad del método analítico.

Tabla 10: Áreas cromatográficas de tres curvas de clara fortificadas con diferentes concentraciones de oxitetraciclina para demostrar linealidad del método analítico.

Concentración en clara (µg/kg)	Áreas cromatográficas (cps)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
30	183429	129852	166038
50	322546	294158	353391
90	498598	423888	613076
120	760973	695288	767686
150	851229	804001	875951
Intercepto	21274	-23614	36665
Pendiente	5705,5	5602,9	5892,8
$R^2$	0,98	0,97	0,97

**Tabla 11:** Áreas cromatográficas de tres curvas de yema fortificadas con diferentes concentraciones de oxitetraciclina para demostrar linealidad del método analítico.

Concentración en yema (µg/kg)	Áreas cromatográficas (cps)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
30	119536	85844	140729
50	155924	175244	185805
90	329507	364551	284784
120	461187	477981	441746
150	677241	555837	581467
Intercepto	-56300	-21274	3874,2
Pendiente	4602	4013,2	3670,8
R <sup>2</sup>	0,97	0,98	0,97

#### 5. Recuperación:

Los datos de recuperación obtenidos para oxitetraciclina en clara y yema se presentan en las Tablas 12 y 13, estos valores son aceptados si son superiores a un 50%.

**Tabla 12:** Porcentaje de Recuperación de oxitetraciclina en claras fortificadas.

Concentración en clara ( µg/kg )	% de Recuperación			Rangos (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
30	103,9	81,7	97,1	81,7-103,9
50	95,3	84,4	101,1	84,4-101,1
90	85,6	80,4	107,0	80,4-107,0
120	107,7	99,3	109,0	99,3-109,0
150	97,7	92,5	100,5	92,5-100,5

**Tabla 13:** Porcentaje de Recuperación de oxitetraciclina en yemas fortificadas.

Concentración en yema ( µg/kg )	% de Recuperación			Rangos (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
30	83,4	106,0	80,8	80,8-106,0
50	90,6	109,7	100,3	90,6-109,7
90	94,1	83,5	102,1	83,5-102,1
120	87,7	83,9	90,0	83,9-90,0
150	97,1	83,0	80,5	80,5-91,7

**6. Repetitividad:**

La repetitividad es aceptada si el CV (%) de cada concentración medida, se encuentra en los rangos de valores correspondientes a la mitad o igual al CV (%) de aquellos obtenidos en la precisión. Los datos obtenidos se muestran a continuación en las Tablas 14 y 15.

**Tabla 14:** Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de clara a tres concentraciones diferentes para demostrar repetitividad del método analítico.

Clara	Concentración obtenida ( µg/kg )						X̄	d.s	C.V (%)
	Concentración teórica (µg/kg)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5			
30	31,1	28,3	36,2	37,8	29,9	31	32,38	3,75	11,6
90	87,8	93,4	77,7	74,4	90,1	88,1	85,25	7,47	8,8
150	151,1	148,3	156,2	157,8	149,9	151,0	152,38	3,75	2,5

**Tabla 15:** Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de yema a tres concentraciones diferentes para demostrar repetitividad del método analítico.

Yema	Concentración obtenida ( µg/kg )						X̄	d.s	C.V (%)
	Concentración teórica (µg/kg)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5			
30	26,3	32,8	31,9	34,9	36,9	34,6	32,90	3,67	11,2
90	97,4	84,4	86,2	80,1	76,1	80,8	84,17	7,38	8,8
150	146,3	152,8	151,9	154,9	156,9	154,6	152,56	4,00	2,6

### 7. Precisión (Reproducibilidad Intralaboratorio):

El método analítico es considerado preciso si el CV (%) obtenido es menor a un 25%. Los resultados obtenidos para ambas matrices se muestran en las Tablas 16 y 17:

Tabla 16: Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de clara a tres concentraciones diferentes para demostrar precisión del método analítico.

Clara	Concentración obtenida ( µg/kg )								C.V (%)
	Concentración teórica ( µg/kg )	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	̄X	
30	36,2	28,3	31,1	32,6	27,8	24,8	30,13	4,03	<b>13,4</b>
90	77,7	93,4	87,8	84,9	94,4	100	89,77	8,01	<b>8,9</b>
150	156,2	148,3	151,1	152,6	147,8	145	150,13	4,03	<b>2,7</b>

Tabla 17: Concentraciones calculadas para seis curvas fortificadas de yema a tres concentraciones diferentes para demostrar precisión del método analítico.

Yema	Concentración obtenida ( µg/kg )								C.V (%)
	Concentración teórica ( µg/kg )	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	̄X	
30	26,3	32,8	33,5	23,5	23,2	24,7	27,33	4,64	<b>17,0</b>
90	97,4	84,4	83,0	103,0	103,5	100,6	95,32	9,26	<b>9,7</b>
150	146,3	152,8	153,5	143,5	143,2	144,7	147,33	4,64	<b>3,1</b>

#### 1.2 Robustez:

El método analítico seleccionado es robusto para oxitetraciclina si los valores de las d.s calculadas para clara y yema, luego de introducidas las modificaciones (de acuerdo al método de *Youden*), son inferiores a las d.s. obtenidas en la precisión.

La d.s obtenida para oxitetraciclina en clara fue de 2,7 µg/kg, siendo menor que la d.s. calculada en la precisión para esta matriz, la cual fue de 4,03 µg/kg. En el caso de la yema, se obtuvo una d.s de 2,9 µg/kg, siendo inferior a la obtenida en la precisión, la cual fue de 4,64 µg/kg.

El factor que más afectó la robustez del método analítico en ambas matrices, corresponde al ajuste de pH del buffer *Mcllvine*/EDTA a 4.0, siendo considerado este factor como medida precautoria.

Con los resultados de este objetivo se concluye que de acuerdo a los parámetros ensayados y calculados, el método analítico para HPLC-DAD seleccionado para la

determinación de oxitetraciclina en clara y yema de huevos, cumple con las condiciones de validación según las recomendaciones de la Decisión 2002/657/CE de las Comunidades Europeas como método cuantitativo.

**Objetivo 2: Identificar cual compartimiento del huevo (clara o yema) corresponde al tejido marcador**

Las concentraciones obtenidas de oxitetraciclina en clara y yema de huevos de gallinas de postura por cada día de tratamiento se presentan en la Tabla 18:

Tabla 18: Concentraciones de oxitetraciclina en clara y yema de huevos de gallinas de postura durante los días de tratamiento.

Día de Tratamiento	Concentración (µg/kg)			
	Clara		Yema	
1	61	37	104	47
	19	33	45	66
	144	32	59	117
3	132	59	71	83
	66	60	116	77
	102	169	174	123
5	96	90	195	381
	112	124	188	179
	108	116	157	195
7	132	116	184	137
	22	145	106	81
	173	107	514	288
9	101	144	237	383
	114	124	633	738
	139	109	467	788
10	155	147	577	909
	138	195	357	934
	105	114	830	451

La expresión gráfica de los promedios diarios de concentraciones de oxitetraciclina en clara y yema obtenidas de huevos de gallinas de postura, es presentada en escala semi-logarítmica en la Figura 2:

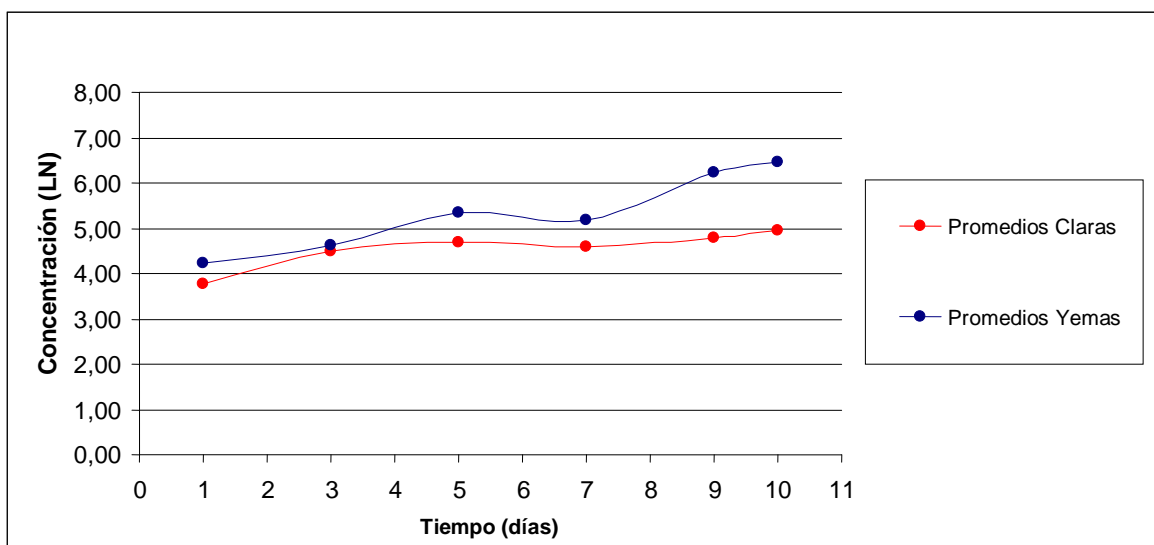


Figura 2: Concentraciones promedios de Oxitetraciclina en clara y yema de huevos de gallinas de postura, obtenidas durante los días de tratamiento. Los datos se expresan en escala semi-logarítmica.

Para evaluar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles determinados en ambos compartimentos (clara y yema), se realizó una prueba de significancia (t test) entre las medias aritméticas al decimo día de tratamiento. La formulación de las hipótesis para la prueba de t fueron las siguientes:

- **H<sub>0</sub> (hipótesis nula):** No existe diferencia significativa entre las medias de concentraciones de oxitetraciclina en los compartimentos al decimo día de tratamiento.
- **H<sub>1</sub> (hipótesis alternativa):** Existe diferencia significativa entre las medias de concentraciones de oxitetraciclina en los compartimentos al decimo día de tratamiento.

Para la prueba se seleccionó un nivel de significancia (probabilidad) de un 95% ( $\alpha = 0.05$ ), con un valor calculado de 10 para los grados de libertad, un valor de  $|t|$  crítico para la determinación de la zona de rechazo  $\geq 2.228$ , el valor calculado para  $|t|$  observado corresponde a 4,757. Por lo tanto,  $|t|$  crítico  $< |t|$  observado, se acepta H<sub>1</sub>.



**Objetivo 3: Determinar el período de resguardo de una formulación de oxitetraciclina en huevos obtenidos de gallinas de postura tratadas con este fármaco.**

En las Tablas 19 y 20, se presentan las concentraciones detectadas de oxitetraciclina en yemas y claras de huevos obtenidos de gallinas de postura por cada día de muestreo post-tratamiento.

Tabla 19:Concentraciones de oxitetraciclina en yemas de huevos de gallinas de postura tratadas con este fármaco durante los días post-tratamiento.

<b>Oxitetraciclina Yema</b>								
Día Post Tratamiento	Concentración (µg/kg)		Día Post Tratamiento	Concentración (µg/kg)		Día Post Tratamiento	Concentración (µg/kg)	
1	708,13	1044,97	6	205,55	103,74	10	61,14	52,12
	847,64	284,77		158,89	104,75		37,02	58,82
	407,13	318,43		108,9	109,46		53,66	55,78
2	189,98	829,09	7	172,84	85,89	11	ND	67,72
	133,15	197,35		61,29	59,53		ND	37,73
	447,1	640,48		85,68	304,17		47,67	70,33
3	276,22	577,77	8	55,6	56,73	12	58,28	34,16
	556,05	517,76		64,4	89,68		43,11	ND
	180,65	207,95		139,14	65,39		41,16	30,02
5	122,8	130,26	9	95,37	50,18	13	73	ND
	237,36	175,56		47,06	52,4		35,63	ND
	119,32	572,69		55,03	48,67		ND	ND
						14	ND	ND
							ND	ND
							ND	ND

ND = Menor al Límite de Detección.

Tabla 20: Concentraciones de oxitetraciclina en claras de huevos de gallinas de postura tratadas con este fármaco durante los días post-tratamiento.

<b>Oxitetraciclina Clara</b>					
Días Post Tratamiento	Concentración (µg/kg)		Días Post Tratamiento	Concentración (µg/kg)	
1	-	-	6	52,51	35,58
	-	-		44,72	35,44
	-	-		47,37	ND
2	99,09	101,27	7	ND	ND
	104,77	121,06		ND	ND
	131,88	101,04		ND	ND
3	36,77	161,02	8	ND	ND
	160,95	35,83		ND	ND
	136,57	40,17		ND	ND
5	72,62	38,78	9	ND	ND
	ND	ND		ND	ND
	ND	82,81		ND	ND

ND = Menor al Límite de Detección.

Para la determinación del periodo de resguardo de oxitetraciclina, en el caso de las yemas, se consideró a los días 1,3,5,7,9 y 11 (impares) respectivamente.

En el caso de claras, la falta de mediciones en el día 1 se debe a problemas relacionados con la matriz en estudio, los cuales impidieron su lectura apropiada. Por otro lado, no se realizó la determinación del periodo de resguardo para este compartimento, debido a que en ningún momento del estudio, ya sea durante el tratamiento o posterior a este, los niveles encontrados superaron el LMR establecido (200 ng/kg) para el alimento. Debido a este hallazgo, se considera a yema como el tejido marcador para la determinación del periodo de resguardo

En aquellos días en que existen mediciones bajo el LD, se siguió la recomendación de CVMP (1997) de utilizar un ½ del valor de LD (15 µg/kg) para realizar la estimación del periodo de resguardo. De esta manera, con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo para yemas, se realizó un Análisis de Regresión

Lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K.Stange (CVMP, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogaritmica) considerando un 95% de confianza para determinar el periodo de resguardo considerando un LMR de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en yema (Figura 3).

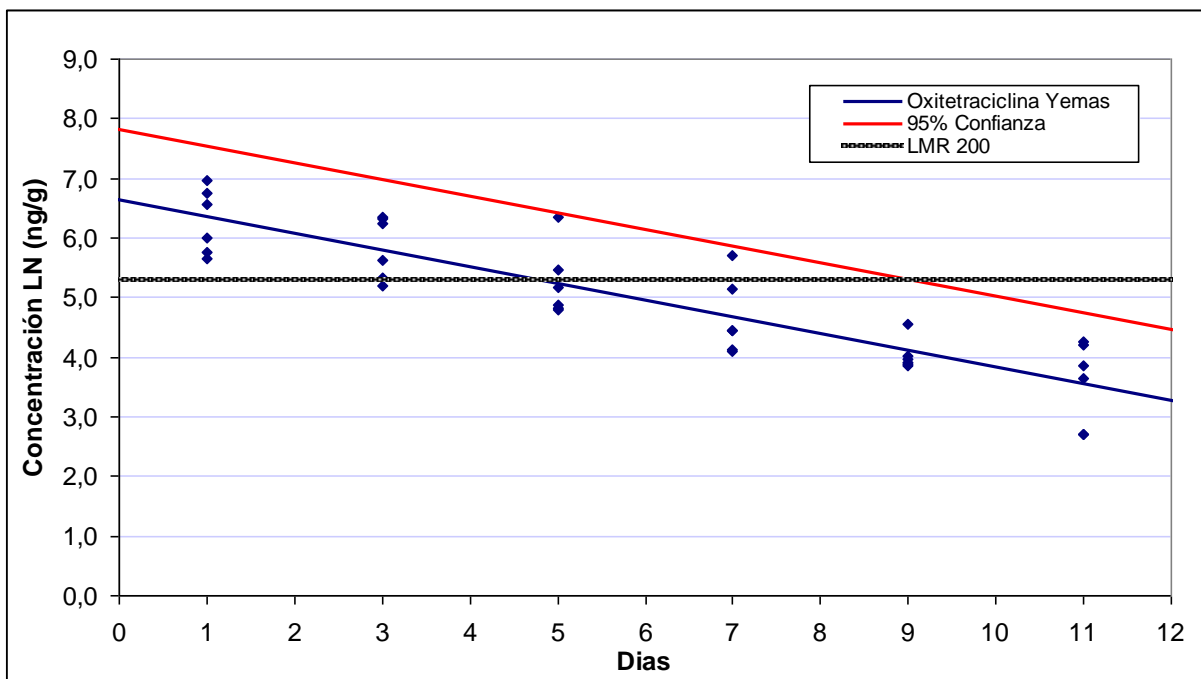


Figura 3: Curva de depleción de concentración versus tiempo (días) para yema, considerando un 95% de confianza y LMR de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , los datos son presentados en escala semi-logaritmica.

De acuerdo a la información entregada por la grafica anterior, el período de resguardo para los huevos destinados al consumo humano, considerando a yema como tejido marcador, corresponde a nueve días

## DISCUSIÓN

Las tetraciclinas son antimicrobianos ampliamente utilizados en la medicina veterinaria para el tratamiento y profilaxis de enfermedades en animales de producción. Sin embargo, al igual que otros antimicrobianos, la utilización de estos merece especial preocupación por la potencial capacidad de generar residuos farmacológicos en productos de origen animal destinados al consumo humano.

Con el fin de asegurar el consumo de productos alimenticios inocuos para la salud de la población, diversas organizaciones han definidos los Límites Máximos Residuales (LMR) para los diferentes fármacos utilizados en animales de producción. Por otro lado el Registro de Medicamentos Veterinarios de cada país debe solicitar la definición de los períodos de resguardo de cada fórmula farmacéutica antes de autorizar su comercialización y uso. El cumplimiento de los períodos de resguardo es una medida esencial para asegurar que las concentraciones de antimicrobianos utilizados en animales de producción alcancen niveles bajo los LMR establecidos (*Codex alimentarius*, 2005).

En Chile existen Programas de Control de Residuos para diversos productos de origen animal, sin embargo no se incluye el monitoreo de huevos. De acuerdo a esto, surge la necesidad de establecer un punto inicial respecto a la urgencia de aplicar medidas de prevención y control, para de esta manera, evitar la presencia de residuos antimicrobianos en este alimento.

Antes de iniciar la evaluación de período de resguardo, el método analítico relacionado debió ser validado, ya que esta etapa corresponde una exigencia en los Programas de Aseguramiento de Calidad de los laboratorio analíticos que trabajan en la inocuidad de los alimentos (*Codex Alimentarius*, 2009). Se utilizó un protocolo de extracción basado en el método analítico descrito por *Reveurs y Díaz (1994)* y *Cristofanie, et al (2009)*, siendo ajustado a las condiciones analíticas del Laboratorio de farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Universidad de Chile y validado según las normas de la Comunidad Europea, decisión 657 del año 2002. Los parámetros considerados en la validación fueron el tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, repetibilidad, precisión, linealidad (curvas de calibración), LD, LC y robustez.

El tiempo de retención obtenido en nuestro estudio fue de  $10,508 \pm 0,331$  (minutos, milésimas de minuto) para oxitetraciclina. Este parámetro debería mantenerse estable o con leves variaciones de respetarse las condiciones analíticas cromatográficas aquí expuestas, aún cuando la matriz a evaluar presente otro origen. Sin embargo, y si bien el tiempo de retención puede permanecer y trascender a pesar de la naturaleza de las muestras en cuestión, pueden existir interferentes propios de cada matriz los cuales debe ser identificados y evaluados a fin de seleccionar las mejores condiciones analíticas para lograr, fuera de toda duda, la correcta identificación del analito de interés.

En relación a la especificidad del método, al analizar veinte muestras blanco (10 de clara y 10 de yema), se corroboró que la matrices no presentas interferencias en el tiempo de elución de oxitetraciclina, esto indica que el método aplicado es lo suficientemente específico para distinguir el analito de interés de otras sustancias presentes en las muestras a analizar.

Los valores obtenidos para el parámetro de la recuperación fueron superiores a un 80% en ambas matrices, difiriendo con el estudio realizado por Geertsen y Madsen (2000) quienes desarrollaron un método analítico para la determinación de tetraciclinas en huevos mediante HPLC-UV, obteniendo valores de recuperación promedio de 70% para oxitetraciclina en huevos homogenizados. Lo contrario ocurre si se compara con el estudio de Vargas *et al* (2009) quienes desarrollaron un método de determinación multiresidual para tetraciclinas, sulfonamidas y cloranfenicol en leche utilizando HPLC-DAD. En el estudio, los autores obtuvieron recuperaciones para oxitetraciclina de 92% siendo levemente superiores a las obtenidas con nuestro método. Estas diferencias pueden estar dadas por los métodos de extracción utilizados y la naturaleza de las matrices sometidas a extracción. Sin embargo, nuestros porcentajes de recuperación estuvieron dentro de lo aceptado en la Directiva 657/2002/CE de la Comunidad Europea (Unión Europea, 2002).

La repetibilidad del método fue aceptada, ya que el coeficiente de variación obtenido para cada concentración evaluada es igual o inferior al obtenido en la precisión, cumpliendo con lo establecido por la Directiva 2002/657/CE de la Comunidad Europea (Unión Europea, 2002).

En relación a la linealidad (curvas de calibración), en las tres curvas seleccionadas para cada matriz se obtuvo una coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior a 0,95, quedando demostrada la linealidad del método analítico y permitiendo la cuantificación de los datos obtenidos durante el estudio.

El método analítico utilizado en nuestro estudio demostró ser lo suficientemente robusto, ya que la desviación estándar obtenida fue menor a la presente en la precisión. El ajuste de pH del buffer MClvine/EDTA a 4.0 corresponde al factor que afectó en forma mayoritaria la robustez del método, por lo tanto, se recomienda no modificar este factor en el caso de utilizar esta metodología analítica en estudios futuros (medida precautoria).

Respecto al LD y LC obtenidos (30 ug/kg, 35,9 ug/kg y 31,77 ug/kg; LD, LC clara y yema respectivamente), y al ser estos comparados con aquellos obtenidos por Geertsen y Madsen (2000) (8 ug/kg y 17 ug/kg, LD y LC respectivamente en huevos homogenizados), difieren a los obtenidos en nuestro estudio siendo menores. Sin embargo, esta diferencia sería irrelevante, puesto que a pesar de obtener un LD y LC mayor, al considerar el LMR para huevos (200  $\mu$ g/kg), el método analítico aquí expuesto es lo suficientemente sensible para ser utilizado en el control de los niveles de oxitetraciclina en huevos de gallinas de postura.

Todos los parámetros de validación considerados en este estudio, fueron concordantes con los valores y rangos establecidos por la Decisión 657 del año 2002 de la Comunidad Europea (Unión Europea, 2002). Por lo tanto, el método utilizado se considera apto para la determinación de oxitetraciclina en huevos, pudiendo ser utilizada en futuros estudios de depleción en formulaciones de oxitetraciclina.

Es importante destacar que la técnica analítica utilizada en este estudio, si bien es adecuada, aún presenta ciertas limitaciones técnicas propias relacionadas con la tecnología empleada. Según Junyan *et al* (2012), las técnicas analíticas actuales ven su próximo paso en el denominado MALDI-TOF, esta técnica analítica se ha probado con éxito en el análisis de múltiples tetraciclinas en lácteos, demostrando ser simple, sensible, rápida, conveniente y de alto rendimiento en cuanto al pre-análisis de rutina de muestras orgánicas. En el caso de este estudio, resulta interesante la comparación, ya que la técnica MALDO-TOF, permite detectar de forma directa sobre el tejido la presencia de moléculas complejas, como son los antimicrobianos, evitando los engorrosos pasos de

extracción y purificación de muestras. De esta manera, sería beneficioso para los estudios de depleción y evaluación de tejido marcador, contar con esta herramienta, la cual significaría un gran avance para lograr observar la distribución de moléculas farmacológicas en organismos animales.

Por otro lado, el estudio permite señalar que oxitetraciclina una vez absorbida vía intestinal, llega a clara y yema vía sanguínea, sin embargo, esto lo hace en diferentes magnitudes. Al observar los promedios por día de tratamiento, es posible apreciar que la distribución se inicia desde el primer día de administración en ambos compartimentos, sin embargo las concentraciones del antimicrobiano son inferiores en la clara, alcanzando un nivel constante en este compartimiento al día tres de tratamiento. Además de esto, los niveles alcanzados en clara, en ningún momento logran superar el LMR definido para el alimento (200 ug/kg), lo cual indicaría que este compartimiento en particular no sería el adecuado para ser considerado como tejido marcador en el estudio de depleción.

En el caso de la yema, los niveles de oxitetraciclina son superiores a los observados en clara, alcanzándose un nivel constante al día 10 de tratamiento, siendo además, superiores al LMR definido para el alimento. Las diferencias existentes entre las concentraciones alcanzadas en ambos compartimentos fueron corroboradas por la prueba de t, la cual demostró diferencia significativa entre las medias de ambos compartimentos al decimo día de tratamiento.

Estos hechos concuerdan con lo descrito por Kan y Petz (2000), quienes también evaluaron la distribución de los antimicrobianos en los diferentes compartimentos del huevo, señalando que los niveles de estos fármacos en la clara llegan a su nivel máximo después de dos a tres días de iniciado el tratamiento manteniéndose estable hasta el fin del tratamiento.

A una conclusión similar llegaron Zurhelle *et al* (1999), quienes describieron la distribución de metabolitos de tetraciclinas en clara, yema y plasma de gallinas de postura. Señalando que la yema es el compartimiento que presenta una mayor concentración de estos antibióticos.

De acuerdo a nuestros resultados podemos confirmar que oxitetraciclina administrada por vía oral, alcanza los compartimentos del huevo (clara y yema), existiendo siempre una

mayor concentración en yema. Sin embargo, es la clara el compartimiento que alcanza primero un nivel constante de oxitetraciclina, aunque en menor concentración; en la yema se logran mayores concentraciones algunos días más tarde. Esto se podría explicar, ya que en la clara, las proteínas presentes en la fracción soluble son formadas y secretadas por una porción específica del oviducto llamada magnum. La formación de estas proteínas toma de dos a tres días y el depósito de la clara alrededor de la yema toma de dos a tres horas. Por esta razón, los niveles presentes en la clara son un reflejo de los niveles presentes en el plasma del individuo. De acuerdo a Kan y Petz (2000) el tiempo necesario para alcanzar niveles constantes en este compartimiento es de dos a tres días, situación similar a lo obtenido en nuestro estudio. Por otro lado, de acuerdo a los mismos investigadores, los residuos presentes en la yema son reflejo de los niveles del plasma durante los 10 días de crecimiento rápido de los folículos que darán origen a la yema. De esta misma forma, afirman que se alcanzan niveles constantes en este compartimiento entre los ocho a diez días, situación observada también en nuestro estudio.

En relación al tejido marcador, las concentraciones presentes en clara, en ningún momento superaron el LMR establecido para el alimento (200 µg/kg), ya sea durante la etapa de tratamiento o posterior a este. Esto no fue observado en el caso de la yema, en la cual hacia el final del tratamiento ya se observaban niveles de 1044 ug/kg, muy por encima del LMR establecido. Este hecho, señala que es la yema el tejido que debe ser considerado como marcador con el fin de evaluar el periodo de resguardo en los huevos para este antimicrobiano en particular, principalmente debido a la naturaleza lipofílica del analito. Este hecho concuerda con lo descrito por Hafez (1991), quien obtuvo resultados similares al encontrado en este estudio, señalando a la yema como el compartimiento para evaluar la presencia de residuos de antimicrobianos. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por Furusawa (1999), quien describe en su estudio que los niveles de oxitetraciclina, tanto en clara como en yema, nunca superan el LMR establecido para este alimento.

En la clara, los niveles de antimicrobiano decayeron con rapidez para dejar de ser detectables al día 7 de post tratamiento. Lo contrario ocurre en la yema, en donde las concentraciones se mantuvieron hasta el día 13 post tratamiento, presentando concentraciones bajo el LMR al día nueve. En relación a esto, el periodo de resguardo determinado por este estudio para oxitetraciclina en huevos de gallinas de postura, correspondería a nueve días. Esto quiere decir, que posterior a este periodo de tiempo,



existe la seguridad de que los huevos destinados al consumo humano no contengan concentraciones de este antimicrobiano sobre los LMR establecidos para el alimento.

## CONCLUSIONES

1.- El método expuesto para la determinación de oxitetraciclina en huevos de gallinas de postura, cumple con los criterios de validación establecidos por la Directiva 2002/657 de la comunidad Europea, por lo que se considera validado y posible de ser utilizado en estudios futuros.

2.- En la evaluación de los períodos de resguardo de oxitetraciclina se debe considerar a yema como tejido marcador, ya que los niveles de antimicrobiano presentes en este compartimiento superan el LMR definido para el alimento, y además decaen más lentamente.

3.- Los huevos provenientes de gallinas ponedoras tratadas con oxitetraciclina no deberían ser enviados a consumo humano durante nueve días después de la finalización del tratamiento. Esto considerando a yema como tejido marcador y un LMR de 200 µg/kg.

## BIBLIOGRAFIA

- ALFREDSSON, G.; BRANZELL, K.; LUNDSTRÖM, Å.** 2004. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by dispstick test and LC-MS/MS. *Anal. Chim. Acta.* 529:47-51.
- AGWUH, K.; MacGOWAN, A.** 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 65-256.
- ARBOIX, M.; MARTÍN-JIMÉNEZ, T.**2002. Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. In: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* L. Botana, M. Landoni, T. Martín-Jiménez (Eds.). McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España. pp. 681 – 689
- AZANZA, J.; HONORATO, J.; MEDIAVILLA, A.** 1998. Tetraciclina, cloranfenicol y otros antibióticos. In: *Farmacología Humana.*3ª ed. J. Azanza, J. Honorato, A.. Mediavilla (Eds). Masson. Barcelona, España. Pp. 1131-1144.
- BRYSKIER, A.** 2005. Tetracyclines under investigation. In: *Antimicrobial Agents. Antibacterials and antifungals.* Bryskier, A (Ed). ASM Press. Washington, DC – Estados Unidos. Pp. 40
- CHAMBERS, H.** 2001. Capítulo 47 Antimicrobianos: Inhibidores de la síntesis de proteína y otros antibacterianos. In: *Goodman&Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.*10ª ed.J. Hardman, L. Limbird, A. Gilman, P. Molinoff, R. Ruddon (Eds). McGraw-Hill/Interamericana. México D.F -México pp. 1258-1288.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS.** Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. 2006. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los alimentos. 32p.
- CRAIG, W.; EBERT, S.** 1999. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand. J. Infect. Dis.* 74:63-70.

- CRAIG, W.** 2002. Pharmacodynamics and antimicrobials: general concepts and applications. In: Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice. CH. Nightingale, T. Murakawa, P. Ambrose (Eds). Oxford: Marcel Dekker, 1-22 pp.
- CRISTOFANIE, E.; ANTONINI, C.; TOVO, G.; FIORONI, L.; PIERSANTI, A.; GALARINI, R.** 2009. A confirmatory methods for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Anal. Chim. Acta.* 637:40-6.
- CVMP. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.** 1997. Approach towards harmonization of withdrawal periods. The European Agency for evaluation of Medicinal Products (EMA).EMA/CVMP/036/95 FINAL. Note for guidance.37 p.
- DONOGHUE, D.; HAIRSTON, H.** 1999. Oxytetracycline Transfer into Chicken Egg Yolk or Albumen. *Poult. Sci.* 78:343-345.
- DONOGHUE, D.; HAIRSTON, H.** 2000. Food safety implication: certain antibiotics may rapidly contaminate egg albumen during the process of its formation. *Br. Poult. Sci.* 41:174-177.
- DONOGHUE, D; MYERS, K.** 2000. Imaging residue transfer into egg yolks. *J. Agric. Food. Chem.* 48:4012-4015.
- ESTEVE, E.; GARCIA, J.** 2005. Egg quality: Chemical residues in respect to food safety. In: XI<sup>th</sup> European Symposium on the Quality of Eggs and Eggs Products. Doorwerth, The Netherlands. 23-26 Mayo 2005. 10p.
- FAO/OMS.** 1995. Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. Sección 4:80-82.
- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2005. Guideline for establishing a withdrawal period. [en línea]. <<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/1732.htm>> [consulta 18-01-2009].

- FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. [en línea].  
<<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CVM/default.htm>>  
[consulta 29-07-2011].
- FERNÁNDEZ, M.; ARIAS, J.** 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. Monografías de Medicina Veterinaria. [en línea]  
<<http://www.revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/5017/4901>> [consulta 23-09-2009].
- FURUSAWA, N.** 1999. Spiramycin, Oxytetracycline and Sulphamonomethoxine Contents of Eggs and Egg-Forming Tissues of Laying Hens. *J. Vet. Med. A.* 46:599-603.
- GEERTSEN, G.; MADSEN, A.** 2000. Determination of Residual Tetracyclines in Eggs By HPLC-UV. Danish Veterinary and Food Administration. Denmark. 5 pp.
- GOLDSTEIN, F.; KITZIS, M.; ACAR, J.** 1994. N,N-Dimethylglycyl-amino derivative of minocycline and 6-demethyl-6-deoxytetracycline, two new glycylicyclines highly effective against tetracycline-resistant gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38:2218-2220.
- HAFEZ, H.** 1991. Factors influencing Drug Residues in Poultry Products: A Review. *Arch. Gefluegelk.* 55:193-195. (citado por KAN, C.; PETZ, M. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J. Agric. Food. Chem.* 48:6397-6403.
- HASSOUAN, M.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHES, J.; CABRERA-AGUILERA, M.; NAVALÓN, A.** 2007. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of Laying hens by liquid chromatography with fluorescent detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 852: 625-630.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2005. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 28p.

- JONES, C.; PETERSEN, J.** 2006. Tigecyclines: First class glycylicline a new choice for empiric therapy. *Drug Discov. Today: Therapeutic Strategies*. 3(2): 137-144.
- JUNYAN, L.; YANG, L.; MINGXIA, G.; XIANGMING, Z.** 2012. High Throughput Detection of Tetracycline Residues in Milk Using Graphene or Graphene Oxide as MALDI-TOF MS Matrix. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 23:1424-7
- KAN, C.** 2003. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. Wuppertal University, Alemania. 80p.
- KAN, C.; PETZ, M.** 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J. Agric. Food. Chem.* 48:6397-6403.
- LEMONS, M.** 2002. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. *In: Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. L, Botana, M. Landoni, T. Martín-Jiménez(Eds.). McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España. 468-483p.
- LEVISION, M.** 1995. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and post antibiotic effects. *Infect. Dis. Clin. North.* 9:95-483.
- LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C.; VÁZQUEZ, B.I., FRANCO, C.M.**2005. Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. *J. Agric. Food. Chem.* 53:2849-2852.
- MELLA, M.; MUÑOZ, Q.** 2009. Tigeciclina: Aspectos estructurales, farmacocinéticos y farmacodinámicos. *Rev. Chil. Infect.* 26(Supl 1): 10-12.
- NELSON, M.** 1998. Chemical and Biological Dynamics of Tetracyclines. *Adv. Dent. Res.* 12:5-11.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. National Academy Press. Washington D.C.
- OMC, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE COMERCIO.** 1998. Acuerdo sobre la aplicación de las medidas sanitarias y fitosanitarias. 16p.

- PÉREZ-TRALLERO, E.; IGLESIAS, I.** 2003. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:520-9
- PÉREZ, B.** 2004. La detección de residuos farmacológicos en los alimentos. [en línea]. <<http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2004/07/20/13468.php>> [consulta 30-03-2009].
- PROUDMAN, J.** 2002. Reproducción de las aves de corral: macho y hembra. In: Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. E. Hafez, B. Hafez, (Eds.) McGraw-Hill Interamericana. Kiawah Island, South Carolina, USA. 243-265 pp.
- REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS.** 2009. Chile, Ministerio de Salud. [en línea] <[http://www.minsal.cl/ici/S\\_1/salud\\_ambiental/Ds977.pdf](http://www.minsal.cl/ici/S_1/salud_ambiental/Ds977.pdf)> [consulta 26-03-2009].
- REVEURS, T.; DÍAZ, R.** 1994. Método de determinación de tetraciclinas en tejidos por HPLC-Diode- Array. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III, Madrid. España. 10 pp.
- SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2008. Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios Año 2008. [en línea]. <[http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg\\_sag\\_biblioteca/bibl\\_exportaciones/biblio\\_exp\\_pec/biblio\\_exp\\_pec\\_manuales/programa\\_control\\_residuos.pdf](http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf)> [consulta 28-10-2008].
- SAN MARTÍN, B.** 2001. Residuos químicos en los alimentos de origen animal: un análisis global de la situación mundial y nacional. [en línea]. <[http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9590%2526ISID%253D467,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9590%2526ISID%253D467,00.html)> [consulta 26-03-2009].
- SCZESNY, S.; NAU, H.; HAMSCHER, G.** 2003. Residue Analysis of Tetracyclines and Their Metabolites in Eggs and the Enviroment by HPLC Coupled with a Microbiological Assay and Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 51:697-703.
- SENGELOV, G.; HALLING-SORENSEN, B.; AARESTRUP, F.** 2002. Suceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens

to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E.coli* from food animals. *Vet. Microbiol.* 95:91-101.

**SPEER, B.; SHOEMAKER, N.; SLAYERS, A.** 1992. Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. *Clin. Microb. Rev.* 5: 387-399.

**SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C.** 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* 1: 101-114.

**UNIÓN EUROPEA.** 1990. Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. 113 p.

**UNIÓN EUROPEA.** 2002. Directiva 2002/657/CE: Establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos para determinados residuos en alimentos de origen animal. 29p.

**UNIÓN EUROPEA.** 2008. European Medicines Agency. EMEA. About EMEA - Structure. [en línea]. <<http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/emeaoverview.htm>> [consulta: 18-01-2009].

**VARGAS, M.; REYES, F.; RATH, S.** 2009. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem.* 117:545-552.

**ZURHELLE, G.; PETZ, M.; MUELLER-SEITZ, E.; SIEWERT, E.** 2000. Metabolites of Oxitetracycline, Tetracycline, and Chlortetracycline and their Distribution in Egg White, Egg Yolk, and Hen Plasma. *J. Agric. Food. Chem.* 48:6392-6396.





## Anexo

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

Santiago, 10 de Julio 2009

### CERTIFICADO N° 17

#### FUNDAMENTACIÓN DE LA CERTIFICACIÓN ÉTICA INSTITUCIONAL.

El comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se reunió con esta fecha para revisar el Proyecto de Memoria de Título, del alumno: **Sr. Pablo González M.** denominado **“Estudio de depleción de oxitetraciclina en huevos de gallinas de postura”**, Profesor Guía Responsable: **Dra. Betty San Martín.**

Este proyecto contempla la utilización de 12 gallinas Leghorn de 16 semanas de edad puesto que, actualmente no existe otro método de sustitución para este modelo experimental. Además, los animales seleccionados son los adecuados tanto en el número mínimo y la especie utilizada (según recomendaciones del “comité for Veterinary Medicinal Products de la U.E., 1997) para lograr obtener resultados científicamente válidos y cumplir con los objetivos planteados satisfactoriamente. La mantención de los animales durante la duración del proyecto se realizará en el galpón experimental del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad, que cuenta con los dispositivos para el manejo de la temperatura, ventilación e iluminación. Al finalizar los ensayos experimentales que se plantean, se describen los procedimientos de eutanasia de acuerdo a las regulaciones internacionales de bienestar animal (European Directive 93/119/CE) lo cual no afecta el bienestar de los individuos y son aceptados internacionalmente. Las condiciones de manejo y manipulación de las aves se efectuarán durante todo el transcurso del proyecto, de acuerdo a los preceptos de bienestar animal.

En relación a lo expuesto por los investigadores, esta comisión da fe que se realizarán los protocolos necesarios para evitar el dolor y sufrimiento animal. La mantención de los animales durante la duración del proyecto se realizará en galpones adecuados para la especie y número de individuos utilizados, que cumple con los parámetros aceptados por el comité de bioética Médico Veterinario.

El comité estima que el proyecto que se propone, se ajusta convenientemente a los Marcos Normativos en Ética de la Investigación Científica con Seres Vivos y no contiene elementos que pudieran transgredir las normas bioéticas vigentes en nuestra institución.

Dr. Gustavo A. Farías R.  
Presidente  
Comisión de Bioética Animal

Dr. Héctor Alcaino C.  
Decano



Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, CHILE - Teléfono (56-2) 978 5501 - Fax (56-2) 978 5659

