



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



DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE CARENCIA DE TILOSINA
EN HUEVOS OBTENIDOS DE GALLINAS DE POSTURA

ALDO EUGENIO MADDALENO TOLEDO

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

PROFESOR GUÍA: BETTY SAN MARTIN NUÑEZ

SANTIAGO, CHILE



2013

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



DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE CARENCIA DE TILOSINA
EN HUEVOS OBTENIDOS DE GALLINAS DE POSTURA

ALDO EUGENIO MADDALENO TOLEDO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : BETTY SAN MARTIN NUÑEZ
PROFESOR CONSEJERO: DANIELA IRAGUEN CONTRERAS
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

SANTIAGO, CHILE

2013

MEMORIA DE TÍTULO

DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE CARENCIA DE TILOSINA EN HUEVOS DE GALLINAS DE POSTURA

WITHDRAWAL PERIOD DETERMINATION OF TYLOSIN IN EGGS FROM LAYING HENS

Aldo Maddaleno Toledo

Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Laboratorio de Farmacología Veterinaria FARMAVET, Facultad de Ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo determinar el periodo de carencia de tilosina en huevos provenientes de gallinas de postura Leghorn, tratadas con éste fármaco. Se consideraron los Límites Máximos Residuales (LMRs) establecidos por la Unión Europea (200 µg/kg). Previo al estudio se validó el método analítico en yema y clara utilizando HPLC-DAD. Se utilizaron 16 gallinas Leghorn de 20 semanas de edad, asignadas a dos grupos experimentales (tratamiento y control). Se administró una dosis de 40 mg/Kg/día, mediante sonda orogástrica por 7 días. Los huevos fueron recolectados finalizada la terapia una vez al día. Las concentraciones residuales de tilosina fueron detectados tanto en clara como en yema, sin embargo en yema las concentraciones persistieron mayor tiempo, por lo que este compartimento fue definido como tejido “*target*”. Concentraciones sobre el LMR se encontraron solo en dos muestras, el día 1 post tratamiento, (377,24 µg/Kg en yema; 223,39 µg/Kg en clara). Según el análisis estadístico de Stange, se determinó un periodo de carencia de 3 días utilizando la yema como tejido “*target*”.

Palabras clave: tilosina, HPLC-DAD, periodo carencia, huevo.

ABSTRACT

This study was conducted to determine the withdrawal period of tylosin in eggs from Leghorn laying hens. The Maximum Residue Levels (MRLs) of the UE was considered (200 µg/kg). The analytic method was previously validated in yolk and white, using a DAD-HPLC detector system. Sixteen 20-week old Leghorn hens were used for the study, and were allocated into two experimental groups (treatment and control). An oral dose of 40 mg/Kg for 7 consecutive days was administered by means of an orogastric tube. The eggs were collected immediately after the therapy was ended. Tylosin residues were detected in yolk and white, however, drug concentrations of this residue persisted a longer time in the yolk, thus being considered as the target tissue. Only two samples showed higher concentrations of tylosin than the MRL were detected at the first day post treatment (377.24 µg/Kg in the yolk; 223.39 µg/Kg in the white). According to Stange stadistical analysis, a 3-day withdrawal time for tylosine was determined when yolk is considered as the target tissue.

Key words: Tylosin, HPLC-DAD, withdrawal time, egg.

INTRODUCCIÓN

El uso de diferentes antimicrobianos en la industria avícola ha contribuido a mejorar la salud y el bienestar de las aves productoras de carne y huevos al disminuir la incidencia de enfermedades infecciosas de origen bacteriano y las mortalidades relacionadas con éstas. Sin embargo, el uso terapéutico de estos fármacos en animales de producción no está exento de riesgos en la salud pública, si no se respetan los periodos de resguardo establecidos por la industria farmacéutica.

Organizaciones intergubernamentales basándose en estudios de toxicidad y en las alteraciones en la microbiótica intestinal humana, han establecido Límites Máximos Residuales (LMRs) para los antimicrobianos en diferentes tejidos. La definición de estos LMRs, facilita el control y monitoreo en los Programas de Control de Residuos de Fármacos en los alimentos de origen animal, asegurando así productos inocuos para la población humana (Unión Europea, 2005). Permiten además definir los periodos de carencia de las fórmulas farmacéuticas, principal medida preventiva que se debe utilizar en los diferentes sistemas productivos, para asegurar alimentos inocuos a la población humana (Periti *et al.* 1993, OMS 2006).

Por otro lado, diversos autores han demostrado que los antimicrobianos cuando son utilizados en las aves de postura con fines profilácticos o terapéuticos, se transfieren al huevo durante su proceso de formación; ya sea a la clara a través de la unión a las proteínas, o bien a yema cuando existe una mayor afinidad de estas moléculas por los lípidos (Donoghue y Myers 2000, Kan 2003, Lolo *et al.* 2005). Es por esta razón que la institución responsable del Registro de Medicamentos Veterinarios en cada país, solo puede autorizar el uso de un fármaco en aves de postura cuando se conoce el periodo de resguardo de estas moléculas.

En Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos (2007), solo ha establecido LMRs en huevos para oxitetraciclina, colistina, bacitracina y espectinomycin. El Registro de Medicamentos Veterinarios tiene autorizado en pollos broilers el uso de tilosina, clortetraciclina, oxitetraciclina, tiamulina, lincomicina, neomicina y colistina, pero no incluye a las gallinas ponedoras; incluso se enfatiza en el registro “no autorizado su uso en aves ponedoras”. Esta no autorización podría deberse a que las industrias farmacéuticas no han establecido los periodos de resguardo de las diferentes fórmulas farmacéuticas de estos antimicrobianos en los huevos provenientes de aves de postura tratadas con estos fármacos.

La tilosina, es un antibiótico macrólido mundialmente aceptado para el tratamiento de diferentes patologías en aves de alta producción y diversos estudios han demostrado su eficacia en cuadros clínicos de enteritis necrótica de las aves (Thomas *et al.* 2001). Aun siendo catalogado como un antibiótico con altos niveles de éxito en los tratamientos de *Mycoplasma gallisepticum* (Ritchie *et al.* 2004), en nuestro país no existe un LMR para los huevos de gallinas de postura; tampoco se encuentran

establecidos en el *Codex Alimentarius*, sin embargo la Unión Europea tiene establecido un LMR de 200 µg/Kg para esta molécula en huevos.

La tilosina puede causar trastornos alérgicos y gastrointestinales en los individuos. La eritromicina puede causar hepatitis colestásica la cual se caracteriza por náuseas, vómitos y cólicos abdominales (Periti *et al.* 1993). Pueden alterar la microbiota intestinal a causa de la presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos de origen animal (Donoghue 2003, Jhonson *et al.* 2004), por cambios en el metabolismo bacteriano, cambio en el número y composición de la población de los microorganismos, selección de bacterias resistentes o alteración del efecto barrera de la flora intestinal. El *Codex Alimentarius* (1995) define el período de carencia 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 alimentos se ajusta al límite máximo de residuo establecido para el medicamento, cuando exista”. Estos períodos son específicos para cada especie animal y se definen considerando el LMR del fármaco. Son dependientes de la dosis, duración de la terapia y de la formulación (Kukanish *et al.* 2005).

Debido a que la formulación afecta los parámetros farmacocinéticos, principalmente la velocidad y magnitud de absorción (biodisponibilidad) y tiempo de eliminación, el Registro de Medicamentos Veterinarios de cada país debe solicitar estos períodos para cada fórmula farmacéutica, antes de que sea autorizado en una especie determinada. Para su determinación se utiliza la fase de depleción terminal del fármaco en el organismo animal, considerando que en esta etapa, la eliminación del fármaco en los diferentes tejidos sigue un modelo monocompartimental descrita por una cinética de eliminación de primer orden (CVMP 1997).

El huevo puede contener residuos de fármacos cuando provienen de gallinas tratadas (Kan y Petz 2000, Furasawa 2001). La llegada de los antimicrobianos al huevo, durante la realización de una terapia o profilaxis en las gallinas de postura, depende de los procesos fisiológicos relacionados con la formación del huevo, la composición y propiedades fisicoquímicas de la yema y la clara y las propiedades fisicoquímicas de los antimicrobianos.

Por otra parte diversos autores han definido los factores que influyen en la farmacocinética de distribución de los residuos de antimicrobianos en la clara y yema:

- **Propiedades fisicoquímicas de las moléculas.** Los antimicrobianos con características liposolubles (tilosina) se acumulan principalmente en la yema, durante la fase de desarrollo de ésta. Los fármacos hidrosolubles se acumulan preferentemente en la clara (Furasawa 1999).
- **Los residuos en clara son un reflejo de los niveles plasmáticos, y aparecen generalmente en tiempos paralelos o cercanos a una terapia o profilaxis.** El tiempo necesario para alcanzar estos niveles es, en promedio, dos a tres días de iniciada la exposición al fármaco. Los

residuos de fármacos en yema, por lo general, reflejan una exposición previa de ocho a diez días (Donoghue y Myers 2000).

- **Aquellos fármacos que son eliminados rápidamente del organismo, desaparecen de la clara dos a tres días después de terminada la exposición.** En el caso de la yema, por lo general, la droga demora aproximadamente diez días en desaparecer (Kan y Petz 2000).

Métodos analíticos para el control de residuos y validación de éstos.

Existen diferentes métodos analíticos para determinar residuos de antimicrobianos en huevos, los cuales han demostrado el traspaso de diferentes fármacos a estos alimentos (Pensabene 1999, Shakh y Chu 2000, McGlinchey *et al.* 2008). El procedimiento de validación de un método analítico, debe incorporarse en todas las investigaciones cuyos resultados dependan de la química analítica, ya que permiten demostrar que el método seleccionado y desarrollado para una sustancia específica, en una muestra específica, produce resultados comparables.

Los parámetros a definir en una validación son: la especificidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, precisión, repetitividad y robustez, tal como se señala en los Procedimientos Analíticos y Validación de Métodos descrita en la *Guidance for Industry N°3* del FDA de los Estados Unidos de América (2000).

El objetivo del presente estudio es la determinación del periodo de carencia de tilosina en huevos provenientes de gallinas de postura Leghorn tratadas con este fármaco. Para esto previamente se debe validar el método analítico para tilosina en huevos y luego definir el tejido “*target*”. Al no estar registrado el uso de tilosina en gallinas de postura en nuestro país, las dosis y los ritmos horarios utilizados en este estudio son los establecidos para pollos Broilers según las indicaciones de la empresa farmacéutica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

Un total de 16 gallinas Leghorn de 20 semanas de edad fueron utilizadas en este estudio. Los animales se mantuvieron en cubículos con comederos y agua *ad libitum*, en las instalaciones experimentales del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, durante todo el experimento. Las condiciones de crianza de las aves durante el periodo experimental se llevaron a cabo bajo los preceptos establecidos por el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para el manejo de los animales, se usaron medidas de bioseguridad para evitar riesgos físicos y microbiológicos durante todo el desarrollo de la investigación.

Las gallinas fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos, un grupo control (n=4), y un grupo tratamiento (n=12). Para el cálculo del número de animales y huevos, se siguieron las recomendaciones del "Comité de Medicamentos Veterinarios" de la Unión Europea (CVMP 1997).

La alimentación de los animales se realizó siguiendo las recomendaciones establecidas para la línea genética según *la National Research Council* de los Estados Unidos de Norteamérica (NRC 1994) (Tabla 1). La dieta se formuló para cubrir los requerimientos en la etapa de pre postura y para la etapa de postura, en base a maíz, poroto de soya, afrecho de soya, oleína y afrecho de trigo. Estos alimentos fueron analizados previamente para asegurar la existencia o ausencia de tilosina.

1. Tabla 1. Requerimientos para gallinas Leghorn en pre postura y postura.

	Pre postura	Postura
Proteína (%)	17	16.01
Kcal/Kg	2939	2848
Metionina (%)	0.09	0.088
Ca (%)	3.06	3.90
P (%)	0.49	0.47

Fuente: NRC, 1994

Tratamiento y obtención de las muestras.

Se utilizó una formulación farmacéutica de tilosina al 10% en polvo, disponible comercialmente para administración oral en aves. Al grupo tratado se le administró una dosis de 40 mg/kg cada 24 horas por siete días consecutivos, mediante sonda orogástrica, mientras que al grupo control se le administró de igual forma 2 mL de agua no medicada. La dosis se definió según las especificaciones de la etiqueta del antibiótico determinados para pollos Broiler. La recolección de huevos se realizó finalizada la terapia por un periodo de 7 días, manteniendo un horario pre establecido para obtener una cantidad de huevos constante para cada día. Estos se identificaron según la fecha de recolección y grupo experimental del cual provenían y fueron mantenidos a 4°C, hasta su análisis cromatográfico.

Se analizaron las muestras obtenidas los días uno, dos, tres, cinco y siete post tratamiento para evaluar el periodo de carencia.

Proceso de extracción de tilosina desde yema y clara.

Para el proceso de extracción de tilosina se utilizó la técnica descrita por De Liguoro *et al* (1998). Éste se realizó separadamente en clara y yema, siendo identificadas éstas matrices según la fecha y grupo experimental del cual provenían. A $5 \pm 0,5$ grs. de muestra se le agregó 5 mL de *Buffer* Fosfato pH 2.5, 5 mL de metanol y 15 mL de agua HPLC. La muestra se agitó, sonicó y centrifugó. El sobrenadante se pasó por una columna de extracción SCX (*Aromatic Sulfonic Acid*) previamente acondicionada con 5 mL de metanol y 5 mL de *Buffer* Fosfato pH 4.0. La muestra se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno, en un sistema de baño temperado entre 40° y 50°C. Finalmente se reconstituyó e inyectó en el equipo cromatográfico.

Sistema cromatográfico y análisis instrumental:

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alto rendimiento acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) *Elite La Chrom L-2455*. La separación cromatográfica se llevó a cabo usando una columna Chromolit RP 18 con pre columna *Chromolit Guard Cartridge*, y una fase móvil específica para obtener la mejor resolución del *peak* cromatográfico. Se determinó un flujo isocrático de fase móvil de 1 mL/min, una temperatura de 30°C para el horno de columna, y un tiempo de lectura de 60 min. a una longitud de onda de 294 nm (De Liguoro *et al.* 1998).

En cada serie de muestras, se utilizaron controles fortificados con tilosina a una concentración de 100 ppb, y una curva de calibración de 5 puntos con 0,5xLMR, 1xLMR, 2xLMR, 3xLMR y 4xLMR propuesto por la Unión Europea. Además se utilizaron dos muestras blanco provenientes del grupo control. El uso de las curvas se realizó tanto para claras como para yemas, con el objetivo de lograr determinar las concentraciones del fármaco en las muestras.

Validación del Método Analítico:

Se realizó según las recomendaciones de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de la Food and Drug Administration (FDA 2000), las regulaciones de la International Organization for Standardization (ISO) y las recomendaciones del *Codex Alimentarius* (1995). Los parámetros que fueron definidos y el análisis estadístico utilizado fueron los siguientes:

1. Tiempo de retención de la droga: se analizaron soluciones puras de tilosina. Se realizaron seis replicados que se compararon con las muestras blanco.
2. Especificidad: se analizaron 20 muestras de clara y yema, determinando si existía alguna interferencia de la matriz con los tiempos de retención de la droga estudiada.

3. Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC): se analizaron 20 muestras fortificadas bajo el LMR las que debieron tener un CV% menor al 25%, además de cuatro curvas con cinco puntos de fortificación (ISO 11843).
4. Linealidad de la curva. Mediante tres curvas de cuantificación con cinco puntos de fortificación, aceptándolas cuando presentaron un $R^2 > 0,90$.
5. Recuperación: La recuperación se calculó comparando curvas de droga pura con curvas de muestras fortificadas, para establecer el porcentaje de droga que se recupera luego del procedimiento de extracción de la muestra. Se trabajó con tres curvas de droga pura y tres curvas de matriz fortificada a tres niveles de concentración. Se aceptó cuando se logró una recuperación mayor a un 50% respecto a la droga pura.
6. Precisión: Se evaluó mediante el cálculo de la Repetitividad y de la Reproducibilidad Intralaboratorio.
 - a. Repetitividad: seis curvas enriquecidas con tres puntos de la curva de fortificación fueron analizadas. Cumplió su función cuando el CV de cada concentración medida estuvo en rangos de valores correspondientes menores o iguales al CV de la Reproducibilidad Intralaboratorio.
 - b. Reproducibilidad Intralaboratorio: seis curvas con matrices de clara adicionadas a los mismos niveles que la recuperación fueron realizadas por diferentes analistas en diferentes días.
7. Robustez: Fueron seleccionados tres factores críticos, temperatura de secado bajo flujo de Nitrógeno, volumen de elución y volumen de *Buffer* Fosfato Ph 4.0, que podrían influenciar en el resultado final. A través de un análisis de Youden, fue llevado a cabo un diseño factorial fraccional incompleto para detectar interacciones entre los factores seleccionados mediante ocho experimentos.

Determinación del período de carencia

Se siguieron las recomendaciones señaladas por la “European Agency for the Evaluation of Medicinal Products”, (EMA 1997). Se estimaron los promedios y desviaciones estándar de las concentraciones obtenidas para cada tiempo de muestreo (en clara y yema), y estos fueron trazados en una tabla de tiempo vs concentración en una escala semilogarítmica. Se realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza de un 95%, de acuerdo a la ecuación de Stange. Se analizaron seis valores para cada día y para cada matriz, con un total de cuatro días para realizar la regresión lineal y la ecuación de Stange, además de eliminar valores “*outliers*” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados. Finalmente, el período de carencia se determinó utilizando la matriz que presentó mayor afinidad con la molécula de tilosina (tejido “*target*”). Cuando los valores

cuantificados de las muestras se encontraron bajo el LD, éste se reemplazó por un valor igual a la mitad del LD encontrado (50 µg/Kg).

El periodo de carencia fue determinado en el momento en que el límite de tolerancia tuvo un nivel de confianza de un 95% bajo el LMR.

Resultados

Análisis Instrumental

Se determinó que las mejores condiciones cromatográficas para realizar el análisis en ambas matrices fueron mantener un flujo constante de fase móvil a 1 ml/min, una temperatura de horno de 30°C y una longitud de onda de 294 nm. El tiempo de corrida por muestra fue de 60 min, con un programa de lavado entre inyecciones de 10 minutos con acetonitrilo y agua. En la Figura 1 se observa un cromatograma de un fortificado a 100 µg/Kg en la matriz clara.

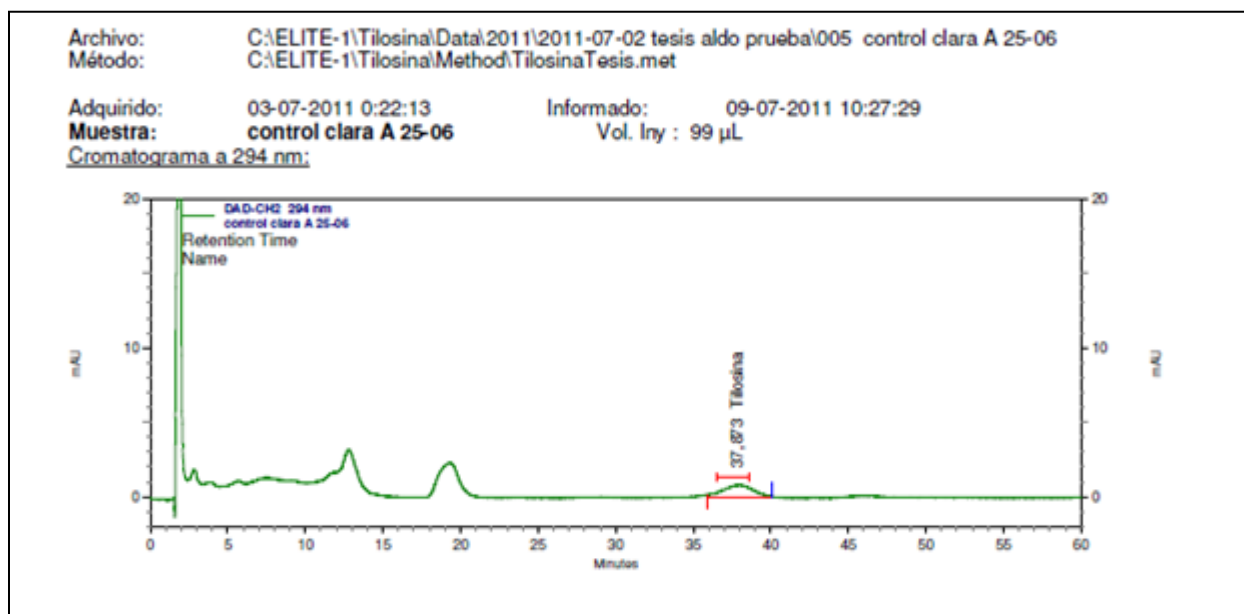


Fig.1 Cromatograma de clara, con fortificado de 100 µg/Kg y lectura a 294 nm. En este se visualiza que a una longitud de onda de 294 nm, la línea base se encuentra plana, no existiendo interferentes al tiempo de retención de tilosina. En la matriz yema, los resultados son similares

Tiempo de Retención y Especificidad

Los tiempos de retención de tilosina se mantuvieron constantes en los análisis, logrando tiempos cercanos a los 35 minutos para cada inyección. Se realizaron 6 repeticiones de drogas puras, y 20 repeticiones de muestras blancos, donde no se encontraron interferentes (Figura 2).

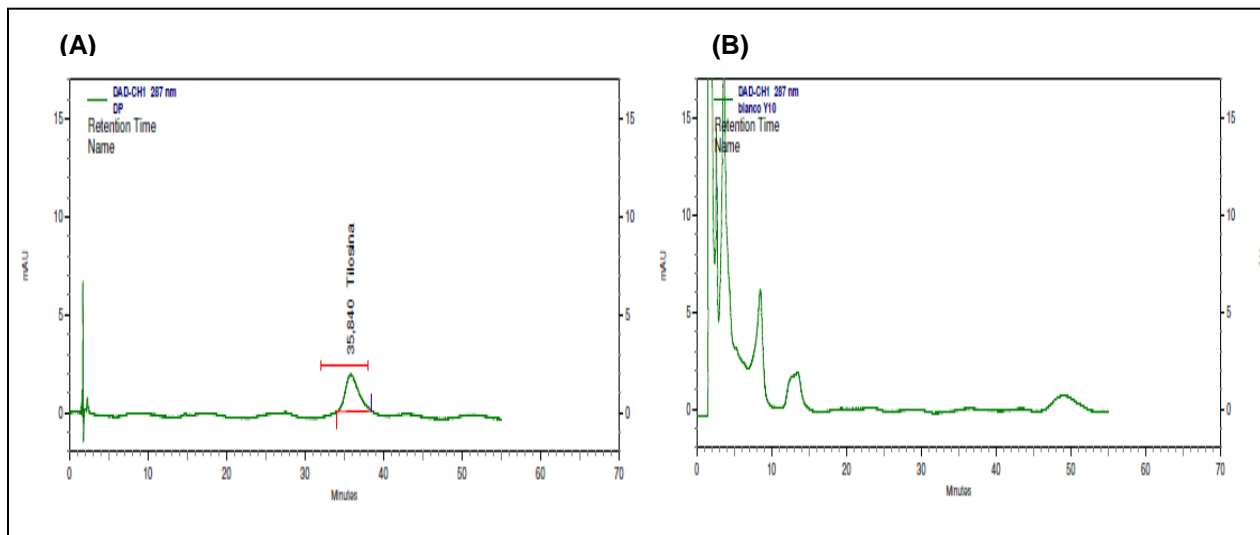


Fig. 2. Cromatograma de droga pura, representativo de 6 inyecciones (A), comparado con muestra blanco (B). Se observa que en los tiempos de retención de la droga no existen interferentes en las muestra

Limite de Detección y de Cuantificación

Se determinó un Límite de Detección de 100 $\mu\text{g/Kg}$ considerando que la relación señal ruido fue mayor a 3:1 en esta concentración. Para el cálculo del Límite de Cuantificación, al LD se le sumó 1,64 veces la Desviación Estándar de la concentración de las muestras, dando un resultado de 120,8 $\mu\text{g/Kg}$.

Linealidad y Recuperación

Todas las curvas presentaron un coeficiente de correlación mayor a 0,90. Los valores para las tres curvas fueron 0,998, 0,984 y 0,988. Para la recuperación se compararon curvas de drogas puras con curvas fortificadas, para establecer cuál es el porcentaje de droga que se recupera luego del procedimiento de extracción de las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de Recuperación. Para cada nivel de fortificación se compararon las áreas de inyecciones de drogas puras en las mismas concentraciones

Fortificado	Curva 1			Curva 2			Curva 3		
	Droga Pura	Fortificado	% Recuperacion	Droga Pura	Fortificado	% Recuperacion	Droga Pura	Fortificado	% Recuperacion
100 $\mu\text{g/Kg}$	478654	404354	84,5	421871	388359	92,1	401341	382685	95,4
200 $\mu\text{g/Kg}$	1023876	991682	96,9	943619	891807	94,5	921098	807659	87,7
800 $\mu\text{g/Kg}$	3892341	3620833	93	4002321	3818169	95,4	3345678	3174683	94,9

Precisión

La precisión, se evaluó mediante la repetitividad y la reproducibilidad Intralaboratorio. Se realizaron seis curvas con tres niveles de fortificación calculando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada nivel de fortificación, y se compararon con seis curvas realizadas por diferentes analistas en diferentes días (Reproducibilidad Intralaboratorio) (Tabla 3). Se observa que para cada nivel de fortificación, el CV% de la Repetitividad es menor que en el caso de la Reproducibilidad Intralaboratorio.

Tabla 3. Cálculo de Repetitividad y Reproducibilidad Intralaboratorio. Se observan los Coeficientes de Variación (CV%) para cada nivel de fortificación.

Repetitividad										
Concentración de enriquecimiento	Concentración cuantificada (curvas)						Promedio	Desv. Est.	CoVar	CV%
	a	b	c	d	e	f				
100 µg/Kg	101,2	91	96,8	96,8	98,7	98,4	97,15	3,42	0,04	3,5
200 µg/Kg	198,6	210,4	203,8	203,7	201,6	201,9	203,33	3,94	0,02	1,9
800 µg/Kg	800,2	798,5	799,5	799,5	799,8	799,7	799,53	0,57	0	0,1

Reproducibilidad Intralaboratorio

Reproducibilidad Intralaboratorio										
Concentración de enriquecimiento	Concentración cuantificada (curvas)						Promedio	Desv. Est.	CoVar	CV%
	a	b	c	d	e	f				
100 µg/Kg	115,2	154,5	86,2	71,1	116,8	115,3	109,85	28,85	0,26	26,3
200 µg/Kg	182,2	136,4	216,1	233,7	180,4	182,1	188,18	33,66	0,18	17,9
800 µg7Kg	802,5	809,1	797,7	795,2	802,8	802,6	801,65	4,81	0,01	0,6

Robustez

Mediante el análisis de *Youden* se determinó que el método de extracción es robusto y que los factores que más influyen en la robustez del método son el secado con nitrógeno bajo baño temperado y el sonicado de muestra en medio líquido. La cuantificación de residuo encontrado para cada experimento se realizó mediante una curva de calibración de 5 puntos. Se realizó una configuración de ocho experimentos con distintas interacciones para realizar el análisis fraccional de *Youden* para finalmente obtener la desviación estándar. Debido a que la desviación estándar de la robustez en el punto más bajo de la curva (0,0018), es significativamente menor que la desviación estándar de la reproducibilidad Intralaboratorio (28,85) (Precisión), se considera que este método analítico es robusto.

Determinación del Periodo de Resguardo

Análisis de Muestras experimentales:

Se calcularon los promedios de las concentraciones de tilosina para cada día en yema y clara, calculando además la desviación estándar para estos valores. Los resultados se ordenaron según matriz y día de recolección post tratamiento. Se analizó un total de 105 muestras, 50 de ellas clara y 55 de ellas yema, teniendo los siguientes factores como criterio de aceptación, en muestras detectadas:

- Tiempo de retención de tilosina en yema o clara igual o similar al tiempo de retención de la inyección de droga pura, con no más de un 5% de coeficiente de variación.
- Espectro de Tilosina en yema o en clara mayor al 95% de similitud comparado con los registros de la librería de espectros del software.

El día 1 post tratamiento, de 11 yemas analizadas, solo en una se encontró una concentración sobre el LMR (377,24 µg/Kg) (Tabla 4); del día 2 al día 7 las concentraciones detectadas fueron menores al LMR. En clara las concentraciones fueron inferiores al LMR durante todo el experimento, no detectándose tilosina a partir del día 3. Yema fue elegida como tejido “*target*”.

Tabla 4. Concentraciones de tilosina en yemas de huevos provenientes de gallinas de postura durante los días post tratamiento. OBS: N/D, muestra no detectada

MUESTRAS	CONCENTRACION µg/Kg				
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 5	DIA 7
Y1	145,3	N/D	112,8	118,1	N/D
Y2	148,2	181,7	104,3	105	N/D
Y3	134,6	N/D	109,9	N/D	101,5
Y4	109,8	N/D	N/D	N/D	N/D
Y5	113,6	108,8	N/D	N/D	N/D
Y6	377,2	110,3	109	N/D	N/D
Y7	169,2	101,5	154,9	N/D	N/D
Y8	124,5	134,2	N/D	N/D	N/D
Y9	N/D	N/D	110,1	N/D	N/D
Y10	132,7	N/D	111,9	N/D	N/D
Y11	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
PROMEDIO	161,7	127,3	116,1	111,6	101,5
DES. EST.	82,9	32,8	17,3	9,3	0
CV%	51,2	25,8	14,9	8,3	0

Periodo de Resguardo:

Se utilizaron los valores encontrados en yema, por ser la matriz que se definió como tejido “*target*”. En aquellos en que existan mediciones bajo el LD, se siguió la recomendación de CVMP (1997) de utilizar la mitad del valor de LD 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 semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el periodo de resguardo considerando un LMR de 200 µg/Kg en yema (Figura 3). De acuerdo a la información entregada por la gráfica, el periodo de resguardo para los huevos destinados al consumo humano, considerando a yema como tejido “*target*”, corresponde a 3 días.

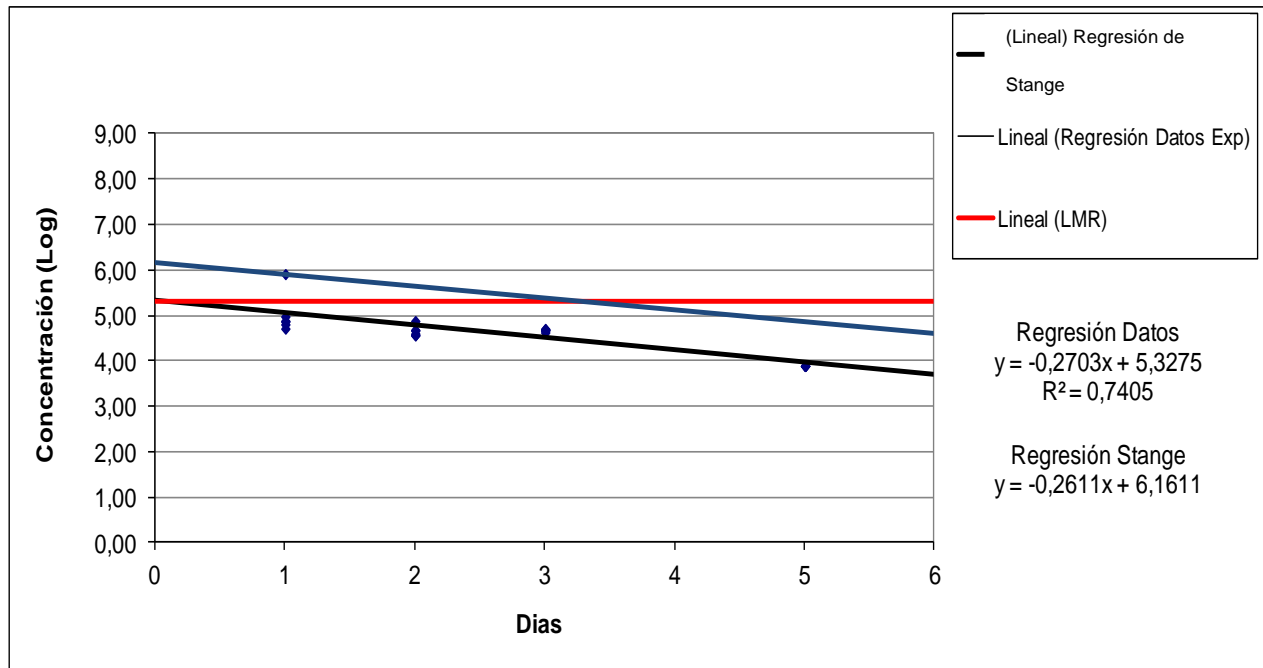


Figura 3. Curva de depleción de las concentraciones de tilosina versus tiempo (días) en yema, considerando un 95% de confianza y un LMR de 200 µg/Kg, (los datos son presentados en escala semilogarítmica.)

Discusión

Cuando se administró tilosina en gallinas de postura Leghorn en concentraciones terapéuticas por un periodo de siete días, finalizado el tratamiento se observaron mayores concentraciones en yema en relación a la clara, permaneciendo además en este tejido por un mayor tiempo. Por esta razón, la yema fue seleccionada como tejido “*target*” para definir el periodo de carencia de este antimicrobiano. Estos resultados se pueden explicar por la condición lipofílica de la molécula de tilosina, y por los altos niveles de lípidos de la yema (McGlinchey *et al* 2008).

La Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos Veterinarios, EMEA (1997), describe un trabajo realizado en huevos provenientes de gallinas de postura tratadas con tilosina vía oral a través del agua de bebida (500 mg/L). En dicho estudio, finalizado el tratamiento se recolectaron los huevos por un periodo de tres días. Por otro lado el análisis se realizó sin separación de clara y yema, encontrándose durante el periodo de estudio concentraciones de tilosina menores a 80 µg/Kg hasta el día 2 post tratamiento. En este trabajo se señaló que no era necesario definir un periodo de resguardo finalizada la terapia.

Otro estudio (Hamscher *et al.* 2006), realizado para detectar concentraciones de tilosina en huevos provenientes de gallinas tratadas vía oral con este fármaco a través de agua y en alimento a una concentración de 1,5 g/Kg y 0,5 g/L respectivamente, por un periodo de 5 días, no encontró concentraciones de tilosina por encima del LMR propuesto por la Unión Europea durante los días posteriores al tratamiento, obteniendo concentraciones menores a 60,1 µg/Kg durante el periodo de estudio.

Los resultados señalados por estos investigadores difieren a los encontrados en este trabajo, en el cual se detectó tilosina a concentraciones sobre los LMR durante el primer día post tratamiento, definiéndose un periodo de carencia de tres días. Estas diferencias podrían atribuirse a diferentes causas:

1.- Forma de administración del fármaco: En los trabajos de los autores señalados el fármaco fue administrado mediante el agua de bebida o el alimento. En este trabajo se utilizaron sondas orogástricas con el fin de entregar la dosis recomendada por las empresas farmacéuticas en su totalidad para cada animal según su peso vivo en Kg.

2.- Análisis por separado de Clara y Yema: En los estudios señalados, se cuantificó tilosina sin separar yema de clara por lo que podría existir un factor de dilución obteniéndose concentraciones menores que cuando se realice individualmente. En este trabajo se cuantificó tilosina en yema y clara por separado, por lo que no existiría un factor de dilución asociado a las muestras.

Se decidió analizar yema y clara por separado ya que el huevo por sus propiedades nutricionales y morfológicas, puede tener diferentes tipos de preparaciones y comercializaciones. Para la industria sería importante conocer las propiedades farmacocinéticas de tilosina y su capacidad de unirse a estas dos matrices, ya que así, durante la duración del periodo de resguardo el producto no necesariamente podría ser eliminado en su totalidad. Por ejemplo, la clara podría ser destinada en forma líquida pasteurizada para consumo humano.

De acuerdo a lo señalado sería interesante realizar un experimento, administrando el fármaco en alimento y en el agua de bebida, en vez de dosificar mediante sonda orogástrica, pero manteniendo el análisis de yema y de clara por separado con el fin de poder aprovechar uno de los componentes del huevo y no eliminarlo en su totalidad durante el periodo de resguardo.

Se concluye con los resultados expuestos, que el método analítico utilizado para extraer tilosina es válido para ambas matrices (clara y yema) con un Límite de Detección de 100 µg/Kg, concentración que es inferior al LMR establecido para este fármaco. Además considerando a la yema como tejido "*target*", el periodo de carencia de tres días, hace que este antibiótico sea una adecuada opción terapéutica, comparándolo con otros antimicrobianos cuyos periodos de carencia en huevos son mayores a diez días.

Además, el método analítico validado en este trabajo, podría ser utilizado por los laboratorios analíticos que realizan los Programas de Control de Residuos de Fármacos, en la medida que los huevos sean incorporados a éstos.

BIBLIOGRAFÍA Y LECTURA RECOMENDADA

1. **Comisión del Codex Alimentarius.** 1995. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos, Sección 4: 80-82.
2. **Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP).** 1997. The European Agency for the evaluation of Medicinal Products (EMA). Note of guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods.
3. **De Liguoro, M; Montesissa, C; Anfoss, P; Angeletti, R.** 1998. Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 123, 1279-1282.
4. **Donoghue D, Myers K.** 2000. Imaging residue transfer into egg yolks. *J Agric Food Chem*; 48: 6428-6430.
5. **Donoghue DJ.** 2003. Antibiotic Residues in Poultry Tissues and Eggs: Human Health Concerns. *Poult Sci.* 82:618-621.
6. **EMA.** European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1997. EMA/CVMP/039/95, Approach towards harmonization of withdrawal periods.
7. **EMA.** European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1997. EMA/MRL/829/02, Tylosin Summary Report.
8. **FDA (Food and Drug Administration). Guidance for Industry.** 2000. Nº3. FDA de Estados Unidos de América.
9. **Furasawa N.** 1999. Spiramicyn, Oxytetracycline and Sulphamonomethoxine Contents of Eggs and Egg. *Journal of Veterinary Medicine* 46:599–603.
10. **Furasawa N.** 2001 Transference of dietary veterinary drugs into eggs. *Vet Res Commun*, 25: 651-662
11. **Hamscher, G; Limsuwan, S; Tansakul, N; Kietzmann, M.** 2006. "Quantitative analysis of Tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: Residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in Laying Hens". Institute for Food Toxicology, University of Veterinary Medicine, Hannover.
12. **Jhonson, S, Nicolson, S., Jackson, S.** 2004. The effect of different oral antibiotics on the gastrointestinal microflora of a wild rodent (*Aethomys namaquensis*). *Compar Biochemistry Phys.* 138: 475-83
13. **Kan C** 2003. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and White. Universidad Wuppertal, Alemania;80 p
14. **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

15. **Kukanish, B., Gehring, R., Webb, A.I., Craigmill, A.L., Riviere, J.E.** 2005. Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. *J Am Vet Med Assoc.* 227(10):1574-1577.
16. **Lolo M, Pedreira S, Fente C, Vaazquez, B, Franco C, Cepeda A.** 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.
17. **McGlinchey, T., Rafter, P., Regan, F., McMahon, G.** 2008. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal Chim Acta.* 624: 1-15
18. **National Research Council.** 1994. *Nutrients of Poultry.* Ninth Revised Edition. 2: 19-34.
19. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** 2006. Technical report series: 939. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Sixty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
20. **Pensabene, J. Fiddler, W. Donoghue, D.** 1999. Isolation of Chloramphenicol from whole eggs by supercritical fluid extraction with inline collection. *JAOAC.* 82 (6): 1334-1398.
21. **Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A.** 1993. Adverse effect of macrolide antibacterials. *Drug Saf.;* 5:346-64.
22. **Reglamento Sanitario de los Alimentos.** 2007. Ediciones Publiley 318p.
23. **Ritchie B., Harrison G., Harrison L.** 2004. *Avian Medicine, Principles and application,* 38: 1-12.
24. **Shakh, B; Chu, P.** 2000. Distribution of total C-14 residue in egg yolk albumen, and tissues following oral C-14 sulfamethazine administration to hens. *J. Agric Food Chem.* 48(12):6404-6481.
25. **Thomas, W; Moore, S; Moore, C.** 2001. Tylosine tartrate for the control of necrotic enteritis mortality in Broilers Chickens.
26. **Unión Europea.** 2005. Reglamento (CEE) N° 2377/90, 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. 110p