



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

**COMPARACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE OXITETRACICLINA Y
SU EPÍMERO (4EPI-OXITETRACICLINA) EN PLUMAS Y TEJIDO
COMESTIBLE DE POLLOS BROILER.**

Magdalena Paz Krögh Orellana

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

PROFESOR GUÍA: Javiera Cornejo Kelly
Facultad de Medicina Veterinaria y Pecuaria, Universidad de Chile

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: proyecto U-Inicia 2013, proyecto FIV 2013

SANTIAGO, CHILE
2015



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

**COMPARACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE OXITETRACICLINA Y
SU EPÍMERO (4EPI-OXITETRACICLINA) EN PLUMAS Y TEJIDO
COMESTIBLE DE POLLOS BROILER.**

Magdalena Paz Krögh Orellana

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

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA: DRA. JAVIERA CORNEJO

PROFESOR CORRECTOR: DRA. LISETTE LAPIERRE

PROFESOR CORRECTOR: DR. HECTOR HIDALGO

SANTIAGO, CHILE
2015

MEMORIA DE TÍTULO

“COMPARACIÓN DE LA DEPLECIÓN DE OXITETRACICLINA Y SU EPÍMERO (4EPI-OXITETRACICLINA) EN PLUMAS Y TEJIDO COMESTIBLE DE POLLOS BROILER”

“COMPARISON OXYTETRACYCLINE AND ITS EPIMER DEPLETION IN FEATHERS AND EDIBLE TISSUE OF BROILER CHICKEN”

Magdalena Krögh Orellana*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Proyecto U-INICIA VID 2013

“Evaluación de la bioacumulación de residuos de antimicrobianos en subproductos de aves y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

Proyecto FIV 2013

“Bioacumulación de oxitetraciclina, clortetraciclina y sus epímeros en plumas de aves tratadas y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Alexander y María Elena, por absolutamente todo.

A mis hermanos Joaquín, Micaela y Emma, mis amigos involuntarios.

A mis abuelos Hernán y Emilia, por ser mis segundos papás.

A mi tía y mejor amiga, Francisca.

A Joaquín Poblete, por el apoyo y amor.

A Maite y Guadalupe por la alegría de cada día.

A Javiera Cornejo y Ekaterina Pokrant, por guiarme a lo largo de esta etapa.

A Patricio Guerra, Juan Pablo Silva, Etier Nuñez, Claudio Castillo y Peter Nuñez por ayudarme, enseñarme y hacer más alegre el trabajo.

A mis compañeros Simón Araya, Ángeles Barrios, Constanza Cabello y Eduardo Castañeda, que hicieron de la universidad, una etapa maravillosa.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Aves experimentales y tratamiento.....	12
Formulación Farmacéutica	13
Reactivos y estándares	14
Metodologías analíticas	15
Análisis instrumental	17
Cuantificación de los residuos de drogas en muestras experimentales	17
Estudio de depleción	23
Bioseguridad	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXO	46
PLANIFICACIÓN	48

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

- Cuadro 1:	17
carta de fortificación pluma	
- Cuadro 2:	19
carta de fortificación matriz músculo	
- Cuadro 3:	20
concentraciones de fortificación hígado	
- Cuadro 4:	23
carta fortificación estándar interno pluma.	
- Cuadro 5:	23
carta fortificación estándar interno musculo hígado.	
- Cuadro 6:	25
concentracion oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina plumas.	
- Cuadro 7:	27
concentración oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina músculo	
- Cuadro 8:	29
concentración oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina hígado	
- Figura 1:	18
curva de calibración oxitetraciclina pluma	
- Figura 2:	18
curva de calibración 4epi-oxitetraciclina pluma	
- Figura 3:	19
curva de calibración oxitetraciclina músculo	
- Figura 4:	20
curva de calibración 4epi-oxitetraciclina músculo	
- Figura 5:	21
curva de calibración oxitetraciclina hígado	
- Figura 6:	21
curva de calibración 4epi-oxitetraciclina hígado	
- Figura 7:	30
concentraciones vs. tiempo oxitetraciclina plumas	
- Figura 8:	31
concentraciones vs. tiempo 4epi-oxitetraciclina plumas	
- Figura 9:	32
concentraciones vs. tiempo oxitetraciclina musculo	
- Figura 10:	33
concentraciones vs. tiempo 4epi-oxitetraciclina musculo	

- Figura 11:	34
concentraciones vs. tiempo oxitetraciclina hígado	
- Figura 12:	35
concentraciones vs. tiempo 4epi-oxitetraciclina hígado	

RESUMEN

En producción animal, el uso de antimicrobianos es una práctica que tiene como objetivo tratar enfermedades de origen bacteriano. Sin embargo, cuando estas terapias farmacológicas no son realizadas de manera adecuada existe la posibilidad que residuos de fármacos puedan permanecer en los productos y subproductos de origen animal. En particular, el subproducto plumas por su composición estructural presenta afinidad por las tetraciclinas, lo que permite suponer el traspaso de residuos de este antimicrobiano en altas concentraciones y por tiempos más prolongados hacia las plumas en comparación a tejidos comestibles. Estas, al ser transformada en harina de pluma, son utilizadas principalmente como pienso alimenticio en dietas de diversos sistemas productivos, reincorporándose a la cadena alimenticia y llegando de manera indirecta a la población humana, siendo un riesgo para la salud pública. Basándose en los efectos adversos que pueden generar los fármacos, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la organización mundial de la salud (OMS), a través de su comité de expertos (JECFA), establecen los límites máximos residuales para los antibióticos en tejidos comestibles. No obstante, no existe suficiente información científica sobre plumas que permita establecer medidas de control sobre la presencia de residuos de antimicrobianos en esta matriz.

Para evaluar la depleción de oxitetraciclina (OTC) y su metabolito activo (4epi-OTC) en musculo, hígado y plumas, se utilizaron 60 pollos broiler criados bajo condiciones ambientales controladas, a los cuales se les administró un tratamiento con una formulación comercial de oxitetraciclina al 10% oral durante siete días. Las concentraciones del analito y su metabolito en las matrices analizadas fueron calculadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración de matriz fortificada ($r \geq 0.95$). Se estableció el período de resguardo para las tres matrices con un 95% de confianza, dando como resultado 46 días en plumas, 12 días en músculo y 6 días en hígado.

Palabras claves: Residuos antimicrobianos, depleción, plumas, oxitetraciclina, 4epi-oxitetraciclina

ABSTRACT

In animal production, the use of antibiotics is a practice that has as objective the treatment of bacterial diseases. However, when these pharmacologic therapies are not performed in the correct way, there is a chance that pharmacologic residues could stay in the animal products and subproducts. In particular, the feathers subproduct, because of its structural composition, it presents some kind of affinity for tetracyclines, which suggests the transfer of high concentrations and for longer times of this antibiotic to feathers, compared to edible tissues. These feathers, after being transformed into feather meal, are mainly used as animal feed in diets of various food production systems, returning to the food chain and indirectly reaching the human population, becoming a risk for public health.

Based on the adverse effects that drug can generate, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO), through its committee of experts (JEFCA), establish the maximum residue limits for antibiotics in edible tissues. However, there is insufficient scientific information about feathers that allow to establish control measures over the presence of antimicrobial residues in this matrix.

To evaluate oxytetracycline (OTC) and its active metabolite (4epi-OTC) depletion in muscles, liver and feathers, they were used 60 broilers raised under controlled conditions, which were administered a treatment with a commercial formulation of 10% oral oxytetracycline during seven days. The concentrations of analyte and its metabolite in the matrices analyzed were calculated by the equation of linear regression analysis of standard curves of fortified matrix ($r \geq 0.95$). The withdrawal time was established for the three matrices with 95% confidence, resulting 46 days in feathers, 12 days in muscle and 6 days in liver.

Keywords: antimicrobial residues, depletion, feathers, broiler, oxytetracycline, 4epi-oxytetracycline

INTRODUCCIÓN

En la industria avícola, los antimicrobianos son una de las principales herramientas terapéuticas en el control de patologías infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo, su uso a nivel de los sistemas productivos puede derivar en la presencia de residuos de antimicrobianos en los productos o subproductos de origen animal, constituyendo un riesgo para la salud pública. Estos residuos pueden provocar diversos efectos, siendo uno de los más importantes las alteraciones sobre la microbiota intestinal, seleccionando bacterias patógenas resistentes que pueden ser traspasadas a la población humana. En relación a esto, durante la última década, ha aumentado la información científica disponible sobre el riesgo que significa para la salud pública la selección de bacterias resistentes entre los animales de producción, destacándose la importancia de la producción avícola como fuente de estos microorganismos resistentes y enfatizando la necesidad de monitorear y vigilar este problema de forma integral.

Para asegurar el uso correcto de fármacos es fundamental respetar el período de resguardo (PR). Si los PR establecidos para las distintas fórmulas farmacéuticas comerciales no son respetados, residuos de estos antibióticos pueden permanecer en los tejidos comestibles. Sin embargo, existe evidencia que demuestra que a pesar que se respeten los PR, concentraciones de fármacos pueden permanecer en tejidos no comestibles en concentraciones mayores que los tejidos comestibles y por periodos de tiempo más prolongados, pudiendo estos fármacos ser reincorporados a la cadena alimenticia a través de la dieta de animales de producción.

Basándose en los efectos adversos que pueden generar los fármacos, organismos intergubernamentales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la organización mundial de la salud (FAO/OMS), a través de su comité de expertos (JECFA), definen los Límites Máximos Residuales (LMR) para los antibióticos en músculo y otros tejidos comestibles, como hígado de pollo.

En el caso de los tejidos comestibles de pollos broiler, existe suficiente información que demuestra que los antimicrobianos pueden permanecer en los tejidos durante un tiempo determinado, que depende de la cinética de eliminación de cada uno de ellos. En la

actualidad, existen diferentes formulaciones de antimicrobianos aprobados para su uso en pollos broiler, los cuales tienen periodos de resguardo o carencia definidos.

Sin embargo en el caso de las concentraciones de fármacos en los productos no comestibles (plumas, garras y sangre entre otros) que se comercializan para alimentación animal, existe escasa información. Estudios previos determinaron la concentración de residuos de flumequina, enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en plumas de pollo broiler, observando que las concentraciones de estos analitos en tejidos no comestibles eran mayores y persistían por más tiempo, que en tejidos comestibles de estas mismas aves.

Dentro de los antibióticos usados en la industria avícola se encuentran las tetraciclinas. Estos fármacos presentan un amplio espectro de acción frente a diversos microorganismos. A este grupo pertenecen la clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina, como principales integrantes. Actualmente se encuentran autorizadas en el Registro de Medicamentos Veterinarios del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su uso en pollos las formulaciones farmacéuticas de clortetraciclina y la oxitetraciclina.

El objetivo de la presente memoria de título es analizar y cuantificar los residuos de oxitetraciclina y su epímero 4epi-oxitetraciclina presentes en plumas, músculos e hígados de pollos broiler tratados con oxitetraciclina con el fin de determinar las concentraciones de este fármaco y su metabolito en estos tejidos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En Chile, la industria avícola ha adquirido un rol protagónico con el paso de los años, llegando a un 47% de la producción total de carne en vara para el año 2013 (APA, 2013). Dentro de la producción avícola, para el año 2014, la distribución fue de un 95,8% correspondiente a carne de pollo y un 4,2% a carne de pavo (APA, 2014), manteniéndose esta tendencia actualmente.

El consumo nacional de carne de ave, que dispone del 88% de la producción país, en el año 2014 alcanzó 34,4 kilos de los 74,9 kilos de carne total consumida por persona lo que arroja porcentualmente un 46% del total (APA, 2014). Estos datos reafirman la tendencia de crecimiento en el consumo de aves de un 4,7% como promedio anual durante los últimos 5 años (APA, 2013).

Dentro de la producción avícola, el uso de antibióticos es aceptado para tratar enfermedades que se pudiesen presentar en los planteles. Sin embargo, el no respetar las indicaciones, dosis, y períodos de resguardo de estos fármacos puede derivar en la aparición de efectos adversos tanto en el hombre como en animales. Anadón y Martínez-Larrañaga (2012) describen como efectos que pueden presentarse por la ingesta de residuos farmacológicos en un rango superior a los LMR establecidos en alimentos de origen animal, los siguientes:

a) Efectos toxicológicos directos: como el caso del cloranfenicol ya que ha demostrado que puede producir aplasia medular independientemente de la dosis. Actualmente se encuentra prohibido su uso en producciones animales.

b) Efectos inmunológicos: Las respuestas alérgicas a residuos se presentan con muy baja frecuencia en comparación con el uso directo de antibióticos como tratamiento en la población humana, sin embargo actualmente el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JEFCA) pretende reevaluar el riesgo y desarrollar protocolos experimentales aplicables a este riesgo.

c) Mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis: producido por metabolitos activos, como el grupo de los nitrofuranos, los cuales se unen al ADN, por lo que su uso ha sido prohibido por la Unión Europea.

d) Efectos en flora intestinal: elevando la presencia de bacterias antibiótico-resistentes a través de la selección de poblaciones resistentes. Para que exista la capacidad de generar resistencia por parte de estas poblaciones bacterianas es necesario el encuentro de dos factores, una sustancia con efecto antibiótico y el determinante de resistencia correspondiente.

De acuerdo a lo señalado por la organización mundial de la salud (OMS) en su informe de vigilancia de la resistencia 2014, el mayor problema no es la resistencia bacteriana en sí, si no la pérdida de eficacia de los tratamientos antibióticos tanto en animales como en personas. Por esta razón hace énfasis en la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas y fomentar las buenas prácticas del uso de los fármacos.

Gyles (2008) describe como principales patógenos zoonóticos asociados con la industria avícola a *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* y como bacterias indicadoras de resistencia bacteriana a *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*. Al respecto estudios como el de Chantziaras et al., 2013 y diversos reportes (CIPARS, 2011; MARAN 2012; NETHMAP 2012; Paphitou, 2013) indican que la actual situación de resistencia a antibióticos de estas bacterias es de gran importancia, describiéndose una correlación directa entre los informes de uso de antibióticos y los informes de resistencia microbiana a nivel mundial. Estudios como el de Gyles 2008 en *Salmonella spp.* muestran que un 80% de las cepas aisladas de pollos son resistentes a al menos 1 antibiótico. En el caso de *Campylobacter jejuni* se ha observado un aumento de un 13% de resistencia en el año 1997 a un 25% en el año 2011, contra el antibiótico ciprofloxacino en muestras aisladas desde hospitales (CDC 2013). Estos datos avalan la preocupación internacional que existe en el uso de antibióticos.

Uno de los antibióticos utilizados dentro de los sistemas de producción animal es la oxitetraciclina (OTC), la cual pertenece a la familia de las tetraciclinas. Estas poseen una estructura química tetracíclica básica y actividad biológica común, están formadas por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes. La oxitetraciclina particularmente es sintetizadas por el organismo *Streptomyces rimosus*, es de carácter anfótera, forma cristales de hidrocloreto y sal sódica, y presenta una baja toxicidad en animales (Finlay *et al.*, 1950; Kaji y Ryoji, 1979). Unas de las razones de su uso en la

industria, es su fácil administración vía oral a través del alimento y/o agua y por tener un espectro de acción amplio, el cual incluye a bacterias anaeróbicas y aeróbicas Gram-positivas y Gram-negativas, micoplasmas, clamidias, micobacterias, rickettsias, *Helicobacter spp.*, *Listeria spp.* y parásitos protozoos (Robert, 1996; SAG, 2014□). La acción antibiótica tiene como base, la inhibición de la síntesis proteica de las bacterias a través del impedimento de unión entre el ARN mensajero y su sitio correspondiente en el ribosoma bacteriano (Chopra y Roberts, 2001) Actualmente en Chile existen 8 fórmulas farmacéuticas de oxitetraciclina para uso en aves, autorizadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2014□).

En cuanto a la farmacocinética, se ha descrito una fácil absorción en el sistema gastrointestinal de mamíferos, pero en el caso de las aves, esta se da en menor proporción. El grado de absorción tiene directa relación con la característica lipofílica del compuesto, siendo en general poco lipofílicas destacándose la oxitetraciclina como la menos lipofílica y por ende, la de menor absorción (Botsoglou y Fletouris, 2001). Según Rang *et al.* (2012), la absorción intestinal de la mayoría de las tetraciclinas (exceptuando minociclina y doxiciclina) es irregular e incompleta y disminuye en presencia de leche, algunos antiácidos y preparados de hierro dado que quelan iones metálicos (calcio, magnesio, hierro, aluminio) formando complejos no absorbibles; pero mejora en ausencia de alimentos. Después de ser absorbida la oxitetraciclina, se distribuye ampliamente en el organismo, alcanzando en un corto tiempo niveles terapéuticos en la mayoría de los fluidos corporales y tejidos (Botsoglou y Fletouris, 2001). La vía de excreción de la oxitetraciclina en el caso de aves y mamíferos es a través del sistema renal y biliar (Goetting *et al.*, 2011), describiéndose una reabsorción a nivel intestinal por lo que un pequeño porcentaje del antibiótico persiste en el torrente sanguíneo por un largo tiempo después de la administración debido a la circulación enterohepática, contrastando con la rápida eliminación de otros antibióticos (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Tanto la molécula original como los metabolitos de OTC, tienen el potencial de persistir en forma de residuos en los productos de origen animal, de esta forma, el riesgo para la salud pública estará determinado por las concentraciones de los residuos activos que presenten los productos destinados a consumo (Botsoglou y Fletouris, 2001). Por esto, se han

establecido límites máximos residuales (LMR) para OTC y sus metabolitos en los tejidos comestibles de diferentes especies, de forma tal que se permita proteger la salud de los consumidores. Se define como LMR, el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg/kg sobre la base del peso en fresco) reconocida como admisible en un producto alimenticio (CE, 2009□). Para su determinación se deben evaluar los riesgos toxicológicos, como también efectos farmacológicos y microbiológicos de los residuos. El objetivo de este parámetro es asegurar que los residuos no representen un riesgo para la salud humana y el medio ambiente.

Los LMR permitidos en alimentos de origen animal en Chile, son los establecidos por el *CODEX Alimentarius*, y se rigen por especie animal y tipo de tejido. Para OTC se establecen los siguientes LMR en aves de corral: Músculo 200 µg/kg, hígado 600 µg/kg y riñón 1200 µg/kg. En gallinas de posturas se especifica un LMR de 400 µg/kg para huevo (MINSAL, 2014). Por su parte la Unión Europea, establece LMR más exigentes en aves de corral siendo en músculo de 100 µg/kg, hígado 300 µg/kg y riñón 600 µg/kg. En gallinas de posturas se especifica un LMR de 200 µg/kg para huevo (CE, 2010□).

Considerando los LMR establecidos, diversos autores han estudiado el perfil de depleción de OTC para establecer su periodo de resguardo (PR). Este, se define como el lapso de tiempo entre el término del tratamiento farmacológico con medicamentos de uso veterinario, y la recolección del producto animal destinado a consumo humano (expresado en días). Para su determinación se debe considerar la dosis definida para el fármaco, la duración de la terapia, el LMR y la fórmula farmacéutica. El objetivo del PR es asegurar que no existan residuos del medicamento por sobre los LMR en el momento de la obtención del alimento (San Martín *et al.*, 2014)

La depleción de residuos antibacterianos en tejidos comestibles, ha sido estudiada en distintas especies por diferentes autores (Kukanich *et al.*, 2005; Pavlov *et al.*, 2008; San Martín *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2014). Por el contrario, en el caso de los tejidos no comestibles, como las plumas, existen escasos antecedentes en la literatura. En el año 2007, San Martín *et al.* estudiaron la depleción de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en tejidos comestibles (músculo, hígado y riñón) y plumas de gallinas ponedoras las cuales fueron tratadas con este antibiótico por 3 días y sacrificadas entre 6 y 216 horas después del

tratamiento, resultando ser el hígado el tejido comestible con la depleción farmacológica más lenta. La concentración en plumas permaneció alta a través de todo el periodo de estudio concluyéndose que estas no debiesen ser incorporadas como aditivo en la dieta de animales de producción. Cornejo *et al.* (2010) estudiaron la depleción en 3 formulaciones de flumequina en tejidos comestibles y su transferencia hacia las plumas en pollos tratados por 5 días consecutivos, concluyendo que la concentración de este fármaco en las plumas, es mayor que en los tejidos comestibles durante el periodo de resguardo y que además se mantiene por un tiempo más prolongado. De acuerdo a lo señalado, los periodos de resguardo establecidos en tejidos comestibles no serían adecuados para estimar la depleción de los antimicrobianos en plumas. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Cornejo *et al.* (2012), donde midió concentraciones de enrofloxacino (ENR) y su metabolito ciprofloxacino (CIP) en plumas de pollos broiler tratados por 5 días con enrofloxacino.

Basándose en estos resultados, Love *et al.* (2012) estudiaron la presencia de 59 productos farmacológicos en muestras de harina de plumas extraídas de diversas fuentes, de las cuales todas resultaron positivas a algún fármaco, detectándose 2 a 10 tipos de antimicrobianos en cada muestra (83% sulfonamidas, 75% macrólidos, 67% fluoroquinolonas, 58% tetraciclinas, 33% antagonistas de ácido fólico, 17% estreptograminas). Este estudio confirmó que las harinas de plumas no deben ser incorporadas a las dietas de los animales de producción, y que representan un riesgo para la cadena alimenticia.

Recientemente estudios realizados por otros investigadores como Heinrich *et al.* (2013) en tejidos comestibles (músculo e hígado), y tejidos no comestibles (plumas y fecas), de pollitos de un día; demostraron que si bien no era posible encontrar residuos de antibióticos en tejidos comestibles después del tratamiento, en plumas y fecas si se encontraban presentes. Por otra parte un estudio reciente sobre la bioacumulación de oxitetraciclina en plumas de pollo, evidenció diferencia entre la concentración en plumas y las dos matrices con que se comparó (músculo e hígado), concluyendo que la eliminación de OTC en plumas es muy lenta, por lo que podría considerarse una matriz muy interesante de monitoreo para observar el uso de antibióticos (Berendsen *et al.* 2013).

De acuerdo a estos antecedentes ya descritos es que el presente estudio tiene como objetivo evaluar la depleción de los residuos de oxitetraciclina y su metabolito (4-epímero) en plumas provenientes de aves tratadas y en tejidos comestibles de estas aves, tales como músculo e hígado. Esto, con el fin de evaluar si residuos de fármaco permanecen en plumas por tiempos más prolongados y en mayores concentraciones que en tejidos comestibles. Además, el presente estudio, contribuirá a establecer si la matriz pluma es utilizable como un posible recurso para determinar el uso de antibióticos en la industria avícola.

HIPÓTESIS

Los residuos de OTC y su metabolito se mantienen en plumas de pollos broiler tratados con este antimicrobiano, en concentraciones mayores y por tiempos más prolongados al período de resguardo definido en los tejidos comestibles de estas aves.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en aves tratadas con oxitetraciclina, las concentraciones de este fármaco y su metabolito durante la fase de depleción, en subproducto (plumas) y en tejidos comestibles (músculo e hígado) de aves tratadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar las concentraciones de OTC y 4-epiOTC en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de oxitetraciclina.
- 2.** Determinar las concentraciones de OTC y 4-epiOTC en tejidos comestibles de aves (músculo e hígado) de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial de oxitetraciclina.
- 3.** Determinar el período de resguardo a través del estudio de depleción de OTC y 4-epiOTC en plumas y tejidos comestibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aves experimentales y tratamiento

Animales experimentales: se utilizaron 60 pollos broiler machos línea Ross 308. Para definir los tamaños de los grupos experimentales se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), a través del documento “Guía: Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo” (EMA, 1996). De esta forma se determinó un número de 8 animales tratados por cada sacrificio para la toma de muestra. Los días en que se comenzaron los tratamientos fueron definidos considerando los siguientes puntos:

- Los pollos broiler no debían vivir más allá de los 55 días de vida, ya que se deteriora su salud por la ganancia de peso excesiva.
- La duración del tratamiento en condiciones terapéuticas es de 7 días.
- La duración del periodo de resguardo para la formulación en músculo es de 7 días.
- Una vez finalizado el periodo de resguardo de la droga en músculo, se consideraron 15 días más para continuar el monitoreo en plumas y observar la depleción de los residuos en esta matriz.

Las aves experimentales fueron mantenidas desde el día 1 de vida hasta el día 24 en baterías de crianza, con condiciones ambientales controladas (30 - 35°C de temperatura, 50-60% de humedad relativa), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado, el cual fue formulado según propósito de la raza y no contó con piensos de origen animal previniendo así un posible traspaso de residuos farmacológicos. Las aves fueron criadas en las dependencias del laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile. Tanto en la crianza como en el sacrificio de los animales experimentales se cumplió con las normas de bienestar animal aprobadas por el Comité de Bioética de FAVET (anexo n°1). El protocolo de manejo y supervisión estuvo basado en la Ley N°20.380 “Sobre Protección de Animales” (MINSAL, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010□). El sacrificio de los individuos se realizó respetando el

Reglamento (CE) N° 1099/2009 relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza (CE, 2009).

Al día 25 de vida las aves se pesaron y se formaron 2 grupos experimentales al azar, grupo A de 48 pollos y un grupo B de 12 pollos. El grupo A fue tratado con la fórmula comercial de OTC al 10%. El grupo B se mantuvo como control no tratado. Se administró diariamente una dosis terapéutica de OTC de 50 mg/kg administrada de forma oral durante 7 días consecutivos, es decir desde el día 25 al 31. Para asegurar la ingestión completa de la dosis, los animales fueron tratados de forma individual administrando el fármaco directamente vía sonda orogástrica. Entre el día 1 al 22 post tratamiento (días 32 a 53 de vida de las aves), se establecieron 6 puntos para la toma de muestra, los cuales fueron los días 3, 5, 7, 13, 19 y 22 post tratamiento en los que se sacrificaron 8 aves del Grupo A y 2 aves del grupo B, teniendo en consideración que los primeros tres puntos de muestreos coincidieron dentro del período de resguardo que es de 7 días para la fórmula farmacéutica utilizada. Las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical (de acuerdo a la normativa de bienestar animal), realizándose posteriormente la disección de los animales para recolectar muestras de músculo (pechuga y pierna) e hígado y la totalidad de las plumas de las aves. Las muestras fueron procesadas y almacenadas a -20°C de forma individual en bolsas plásticas debidamente identificadas hasta su extracción y posterior análisis cromatográfico.

Formulación Farmacéutica

Se utilizó una formulación comercial de Oxitetraciclina al 10% en polvo para administración oral, registrada por el SAG y disponible en el mercado para ser utilizada en aves de corral: “Zanil 10%” (PR 7 días). La formulación farmacéutica de OTC a utilizar fue seleccionada de acuerdo a los fármacos que se encuentran Autorizados de acuerdo al Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del SAG (SAG, 2014) disponibles para ser usados en pollos broiler.

Reactivos y estándares

Para el análisis y cuantificación de OTC en músculos, hígado y plumas se utilizaron estándares de pureza certificada Dr. Ehrenstorfer GmbH, Sigma Aldrich o equivalentes. Para cuantificar los metabolitos 4epi-OTC se utilizó el estándar 4-Epi-Oxitetracycline de Across Organic (Pureza según certificado). Aldrich o equivalentes. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC. Como estándar interno (EI) se utilizó tetraciclina Isotópica de pureza certificada obtenida de Toronto Research Chemicals (Canadá). El uso de un EI proporciona una medida de control para la extracción, inyección de la cromatografía líquida y la variabilidad de ionización. El mejor estándar interno para el análisis es una versión marcada isotópicamente de la molécula que se está cuantificando, debido a la abundancia de hidrógeno en las moléculas orgánicas, se prefiere el uso de deuterio. Por lo cual, en este estudio se utilizó un EI deuterado (TC-D6).

Para la determinación de tetraciclinas en la matriz pluma, se utilizaron los siguientes reactivos y solventes: agua grado HPLC (Millipore o similar), metanol grado HPLC (J.T. Baker o similar), ácido cítrico monohidratado, fosfato de hidrogeno disódico dihidratado, tampón ácido etilendinitrilotetraacetico (EDTA) (J.T. Baker o similar), columnas de extracción en fase solida (SPE) OASISTM HLB.

Para la determinación de tetraciclinas en las matrices músculo e hígado, se utilizaron los siguientes reactivos y solventes: agua grado HPLC (Millipore o similar), acetonitrilo (ACN) grado HPLC (Fisher o similar), metanol grado HPLC (J.T. Baker o similar), ácido oxálico grado P.A. (J.T. Baker o similar), ácido cítrico monohidratado, fosfato de hidrogeno disódico dihidratado, tampón EDTA y columnas de extracción (SPE) Sep-Pak C18.

Como estándar interno se utilizó tetraciclina Isotópica de pureza certificada (E.I. TC-D6). Todos los solventes utilizados eran de grado HPLC, y los reactivos grados Analítico, (Fisher, Merck, o equivalente).

Metodologías analíticas

Para el procesamiento analítico de las muestras, se utilizó un método ya validado para cada una de las matrices. Para la detección de OTC y 4epi-OTC en tejidos comestibles (músculo e hígado) se utilizó el “Método analítico para tetraciclinas en músculo por LC-MS/MS”, el cual se basa en la combinación dos metodologías analíticas publicadas por Reveurs y Díaz (1994) y Khong *et al.* (2005), presentando algunas diferencias en el procedimiento según matriz. Por su parte, para la detección en la matriz plumas se utilizó un método analítico validado, el cual utilizó como referencia una metodología publicada por Berendsen *et al.* (2013).

Las muestras de tejido (músculo e hígado) fueron procesadas en una picadora de alimento, previa eliminación de la piel y grasa. Por otro lado las plumas fueron tratadas con nitrógeno líquido con el objetivo de facilitar la disminución del tamaño de partícula al momento de procesarlas en la picadora de alimento. Se utilizaron dos procesadoras, una para el grupo tratamiento y otra para el grupo control, para evitar la contaminación cruzada entre las matrices.

1. Método de extracción para plumas

Se pesaron $5 \pm 0,05$ gr. en tubos de polipropileno de 50 ml, agregándoles E.I. TC-D6 a las muestras y fortificados. Los tubos fueron tapados y se esperó 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se agregaron 20 ml. de acetona grado HPLC y 20 ml de tampón EDTA/McIlvaine, se homogenizó en agitador por 30 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. Luego se filtró por lana de vidrio y por un filtro de 0.2 μm (Millipore), y se centrifugó el resultado por 5 minutos a 4000 rpm. Después de esto se adicionaron 10 ml de tampón EDTA/McIlvaine y se pasó la totalidad del sobrenadante, con la ayuda de una bomba de vacío, por una columna de extracción en fase sólida (Oasis HLB 6cc, SPE), acondicionada previamente con 4 ml. de metanol grado HPLC, 4 ml de agua HPLC y 4 ml de tampón EDTA/McIlvaine. Se dejó secar la columna por 10 minutos en bomba de vacío y se eluyó con 3 ml de metanol grado HPLC. El resultado se evaporó bajo flujo de nitrógeno suave entre 40 a 50° C, y se reconstituyó con 250 μl de fase móvil (ácido oxálico 0,01M/ACN, 5:1). Se agitó por 5 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por otros 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de

1 ml y se centrifugó por 10 minutos a 13500 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a un vial, filtrando con un filtro de 0,2 μm (millipore).

2. Método de extracción para músculo

Se pesaron $10 \pm 0,1$ gr. en tubos de polipropileno de 50 ml, agregándoles E.I. TC-D6 a las muestras y fortificados. Se agregaron 20 ml de tampón EDTA/McIlvaine. Se homogenizó en agitador por 5 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. Luego se filtró por lana de vidrio y se centrifugó el resultado por 5 minutos a 4000 rpm. Después de esto, se pasó la totalidad del sobrenadante, con la ayuda de una bomba de vacío, por una columna de extracción en fase sólida (sep-pack C18, SPE), acondicionada previamente con 5 ml de agua grado HPLC y 5 ml de ACN grado HPLC. Se dejó secar la columna por 10 minutos en bomba de vacío y se eluyó con 10 ml de ácido oxálico 0,01 M en metanol grado HPLC. El resultado se evaporó bajo flujo de nitrógeno suave entre 40 a 50° C, y se reconstituyó con 250 μl de fase móvil (ácido oxálico 0,01M/ACN, 5:1). Se agitó por 5 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por otros 2 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de 1 ml y se centrifugó por 10 minutos a 13.500 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a un vial, filtrando con un filtro de 0,2 μm (Millipore).

3. Método de extracción para hígado

Se pesaron $10 \pm 0,1$ gr. en tubos de polipropileno de 50 ml, agregándoles E.I. TC-D6 a las muestras y fortificados. Se agregaron 20 ml de tampón EDTA/McIlvaine. Se homogenizó en agitador por 5 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. Luego se filtró por lana de vidrio, se agregaron 15 ml de hexano grado HPLC y se centrifugó el resultado por 5 minutos a 4000 rpm, rescatando la fase inferior. Después de esto, se pasó la totalidad del sobrenadante, con la ayuda de una bomba de vacío, por una columna de extracción en fase sólida (sep-pack C18, SPE), acondicionada previamente con 5 ml de agua grado HPLC y 5 ml de ACN grado HPLC. Se dejó secar la columna por 10 minutos en bomba de vacío y se eluyó con 10 ml de ácido oxálico 0,01 M en metanol grado HPLC. El resultado se evaporó bajo flujo de nitrógeno suave entre 40 a 50° C, y se reconstituyó con 250 μl de fase móvil (ácido oxálico 0,01M/ACN, 5:1). Se agitó por 5 minutos, se sonicó por 5 minutos más y se centrifugó por otros 4 minutos a 2000 rpm. El

sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de 1 ml y se centrifugó por 10 minutos a 13500 rpm. El sobrenadante resultante se pasó a un vial, filtrando con un filtro de 0,2 µm (Millipore).

Análisis instrumental

Para el análisis de las muestras se requirió el uso de cromatografía líquida acoplada a detector de masa, por lo que el equipo utilizado consistió en un sistema de cromatografía líquida acoplado a un API 4000 Mass Espectrometer de Applied Biosystems Sciex. Este instrumento ha sido empelado para fines similares por San Martin et al., (2007) y Conejo et al., (2010, 2012).

Cuantificación de los residuos de drogas en muestras experimentales

Las concentraciones de OTC y 4epi-OTC en plumas y tejidos (musculo y hígado) de aves tratadas fueron calculadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal, obtenida de las curvas de calibración realizadas para cada matriz con muestras blanco provenientes del grupo control, y fortificadas a diferentes rangos de concentración (cuadro 1, 2 y 3) para evitar extrapolaciones. Solo fueron válidas cuando se tuvo una correlación (r^2) igual o mayor a 0.95.

Las cartas de fortificación para la realización de curvas de calibración, contenían las siguientes concentraciones:

Cuadro 1: Carta de fortificación a muestras de matriz pluma libre de oxitetraciclina.

TETRACICLINAS	2000 ng/ml	50 µl de E.I.	5 gr.	20 µg/kg
oxitetraciclina tetraciclina clortetraciclina doxiciclina	tomar 200 ml de estándar interno (E.I.) y enrazar en un matraz aforado de 100 ml. con FM	100 µl de E.I.	5 gr.	40 µg/kg
		150 µl de E.I.	5 gr.	60 µg/kg
		200 µl de E.I.	5 gr.	80 µg/kg
		250 µl de E.I.	5 gr.	100 µg/kg
		350 µl de E.I.	5 gr.	150 µg/kg
		500 µl de E.I.	5 gr.	200 µg/kg
		1000 µl de E.I.	5 gr.	400 µg/kg
		1500 µl de E.I.	5 gr.	600 µg/kg
		2500 µl de E.I.	5 gr.	1000 µg/kg

Figura 1: Curva de calibración construida para la cuantificación de oxitetraciclina en muestras de pluma.

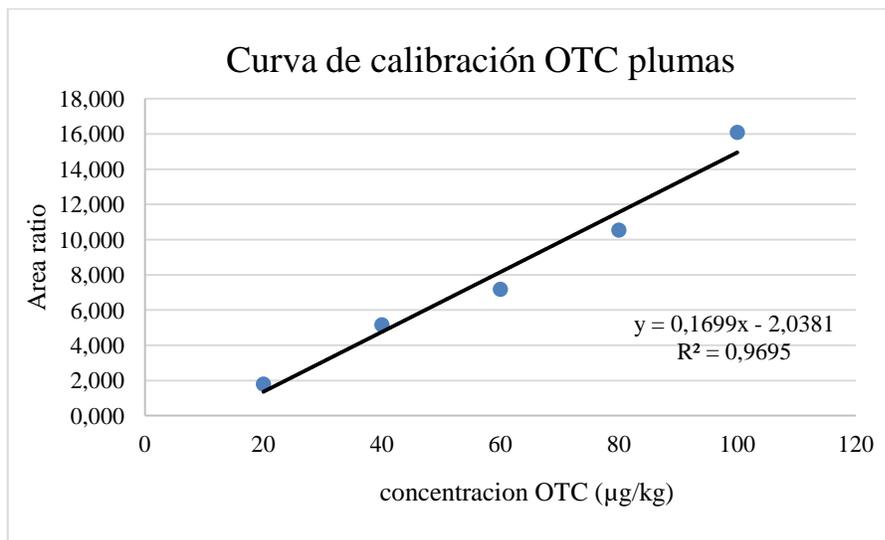
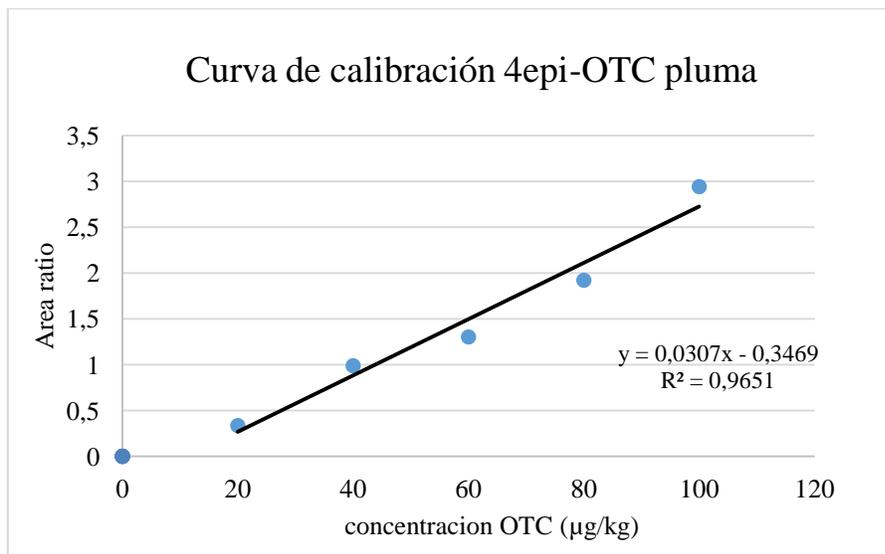


Figura 2: Curva de calibración construida para la cuantificación de 4epi-oxitetraciclina en muestras de pluma.



Cuadro 2: Carta de fortificación a muestras de matriz músculo libre de oxitetraciclina.

TETRACICLINAS	500 ng/ml	200 µl de E.I.	10 gr.	20 µg/kg
oxitetraciclina tetraciclina clortetraciclina doxiciclina	tomar 50 ml de estándar interno (E.I.) y enrazar en un matraz aforado de 100 ml. con FM	400 µl de E.I.	10 gr.	40 µg/kg
		600 µl de E.I.	10 gr.	60 µg/kg
		800 µl de E.I.	10 gr.	80 µg/kg
		1000 µl de E.I.	10 gr.	100 µg/kg
		1400 µl de E.I.	10 gr.	140 µg/kg
		2000 µl de E.I.	10 gr.	200 µg/kg

Figura 3: Curva de calibración construida para la cuantificación de oxitetraciclina en muestras de músculo

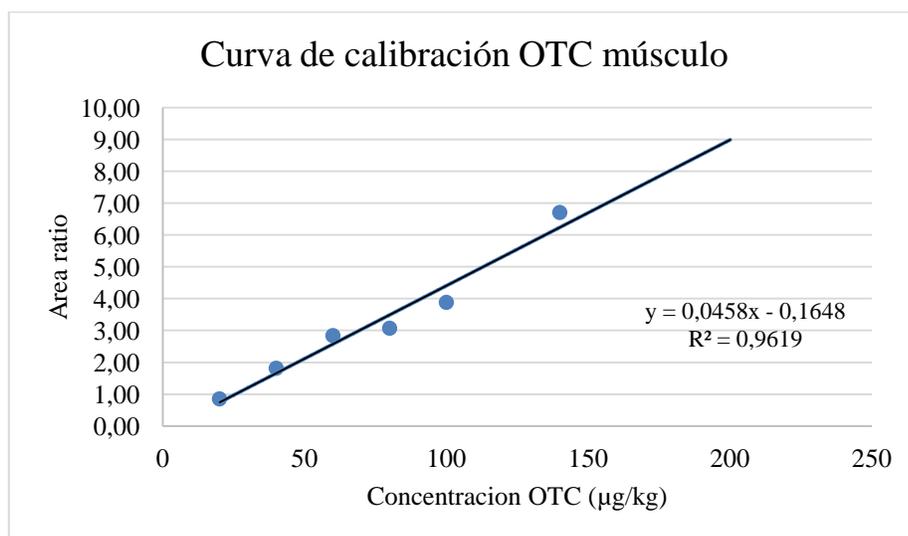
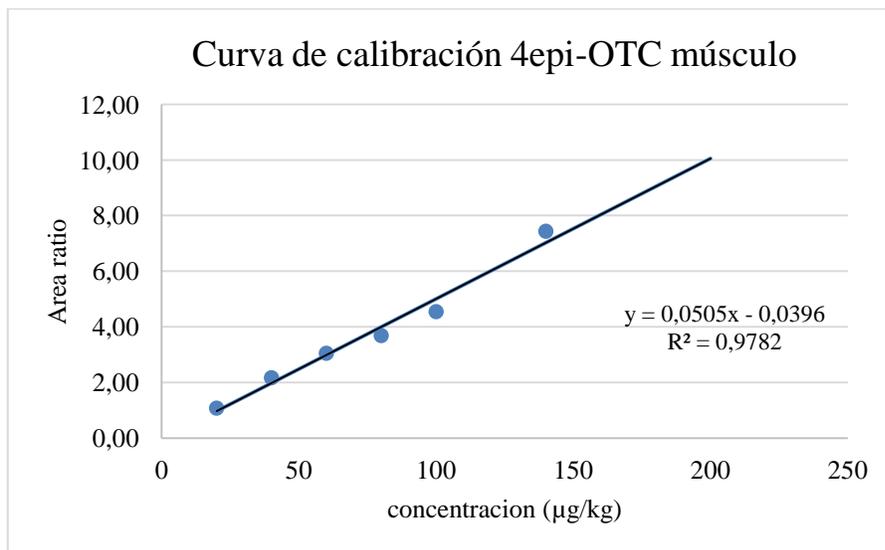


Figura 4: Curva de calibración construida para la cuantificación de 4epi-oxitetraciclina en muestras de músculo, a partir de tejido blanco.



Cuadro 3: Concentraciones de fortificación a muestras de matriz hígado libre de oxitetraciclina.

TETRACICLINAS	2000 ng/ml	100 µl de E.I.	10 gr.	20 µg/kg
oxitetraciclina tetraciclina clortetraciclina doxiciclina	tomar 200 ml de estandar interno (E.I.) y enrazar en un matraz aforado de 100 ml. con FM	200 µl de E.I.	10 gr.	40 µg/kg
		350 µl de E.I.	10 gr.	60 µg/kg
		400 µl de E.I.	10 gr.	80 µg/kg
		500 µl de E.I.	10 gr.	100 µg/kg
		750 µl de E.I.	10 gr.	150 µg/kg
		1000 µl de E.I.	10 gr.	200 µg/kg

Figura 5: Curva de calibración construida para la cuantificación de oxitetraciclina en muestras de hígado, a partir de tejido blanco.

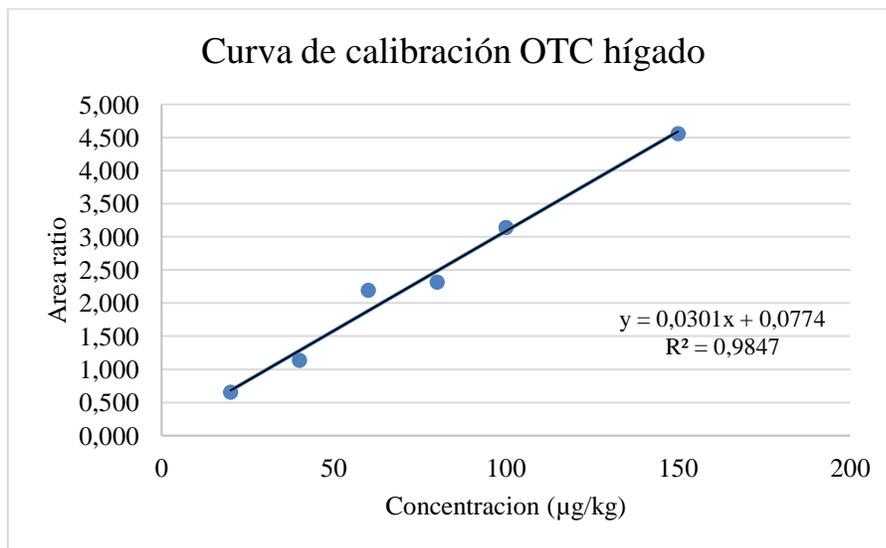
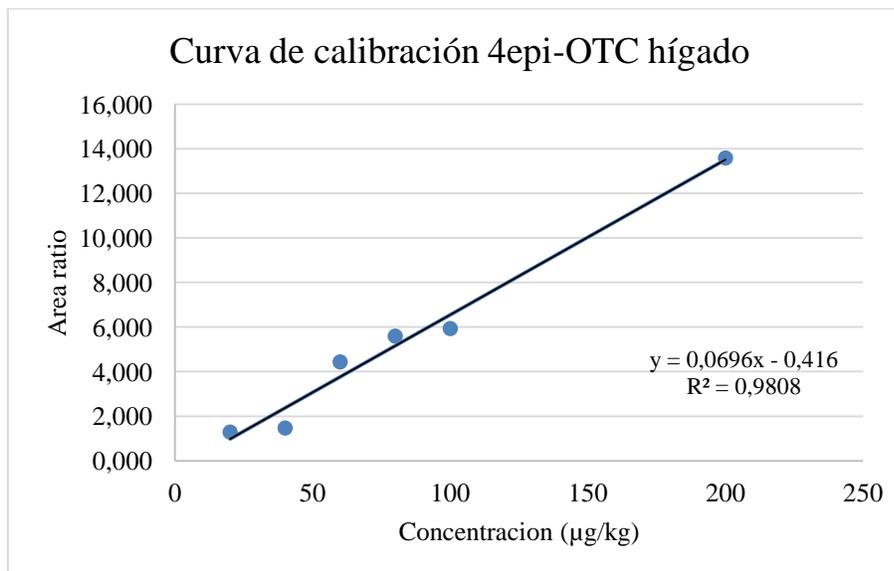
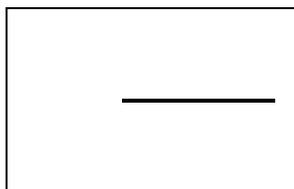


Figura 6: Curva de calibración construida para la cuantificación de 4epi-oxitetraciclina en muestras de hígado, a partir de tejido blanco.



A partir de la ecuación de las curvas de calibración se cuantificaron las muestras de estudio. La ecuación utilizada para éste cálculo fue la siguiente:



Dónde:

y: área

n: intercepto

m: pendiente

x: concentración

Se utilizó también un estándar interno, una sustancia diferente del analito pero que presenta propiedades similares, tal que ambos sean afectados similarmente durante el análisis; y su uso tiene como objetivo corregir errores en las etapas de extracción, inyección en el cromatógrafo líquido, y corregir la variabilidad de ionización. Esto, dado que la concentración del estándar interno es conocida, se puede establecer una proporción en el caso de que existan errores aleatorios como por ejemplo pérdidas de muestra, y/o errores sistemáticos como por ejemplo interferencias no espectrales de componentes de la matriz, fluctuaciones debidas del método y errores instrumentales (principalmente variación de la velocidad de nebulización y del tamaño de gota).

El mejor estándar interno para el análisis es una versión marcada isotópicamente de la molécula que se está cuantificando, y debido a la abundancia de hidrógeno en las moléculas orgánicas, se prefiere el uso de deuterio. Por lo cual, en este estudio se utilizó un estándar interno deuterado.

Las cartas de fortificación con estándar interno deuterado, contenían las siguientes concentraciones:

Cuadro 4: Carta de fortificación con estándar interno en matriz pluma.

tetraciclinas	1000 ng/ml	250 µl de E.I.	5 gr.	50 µg/kg
estandar interno deuterado (TC-D6)	tomar 20 ml de E.I. y enrazar en un matraz aforado de 10 ml con metanol HPLC			

Cuadro 5: Carta de fortificación con estándar interno en matriz músculo e hígado.

tetraciclinas	1000 ng/ml	500 µl de E.I.	10 gr.	50 µg/kg
estandar interno deuterado (TC-D6)	tomar 20 ml de E.I. y enrazar en un matraz aforado de 10 ml con metanol HPLC			

Estudio de depleción

Se siguieron las indicaciones de EMA (1997) para realizar el análisis de los datos y establecer el periodo de resguardo. Se evaluaron las concentraciones de OTC y 4-epi-OTC en las plumas y tejidos de aves tratadas, mediante la cuantificación de los residuos presentes en cada matriz durante los diferentes momentos escogidos para el muestreo, a través de curvas de calibración fortificadas. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Se llevaron a una gráfica en escala semilogarítmica de concentración versus tiempo. Se realizó un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica se definió el momento (días) en el cual las concentraciones son iguales o menores al Límite de detección (LD) (20 µg/kg) establecido para la técnica en el caso de las plumas, e igual o menos al LMR establecido para cada matriz, en el caso de músculo e hígado. El período de resguardo se determinó cuando todas las observaciones se encontraron bajo el LD en plumas y bajo los

LMR en tejidos comestibles. En caso que esto coincidiera con una fracción de 1 día, se considera el período incluyendo un día completo.

Bioseguridad

La extracción y análisis cromatográfico de las muestras se realizaron en las dependencias del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FARMAVET) de la Universidad de Chile. FARMAVET se encuentra acreditado bajo la norma ISO 17025:2005 (ISO, 2005), por lo que se trabajó acorde a las normas de bioseguridad y de calidad establecidas en sus procedimientos estandarizados. Se consideraron las medidas de bioseguridad para el trabajo con animales experimentales y el manejo de agentes químicos de riesgo sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad versión 2008 de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnología (CONICYT) (Anexo N° 2).

RESULTADOS

1. Determinar las concentraciones de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina en plumas de aves tratadas con una formulación farmacéutica comercial de oxitetraciclina.

Las concentraciones de oxitetraciclina y su epímero 4epi-oxitetraciclina obtenidas en cada una de las aves experimentales sacrificadas con sus respectivos promedios, en los puntos de muestreo 1, 2, 3, 4, 5 y 6 post tratamiento en matriz pluma, se presentan en el cuadro 6:

Cuadro 6.

Días de muestreo	Días post tratamiento	Edad pollos (días)	Oxitetraciclina		4epi-oxitetraciclina	
			Concentración (µg/kg)	Promedio	Concentración (µg/kg)	Promedio
1	3	34	1364,89	2947,71	2083,79	2662,02
			5314,97		5038,71	
			2940,41		3687,22	
			4458,38		2863,95	
			1469,21		1356,14	
			3220,82		2161,91	
			1415,11		1436,07	
			3397,89		2668,41	
2	5	36	588,22	556,63	624,56	492,80
			659,57		541,82	
			851,53		712,51	
			495,11		418,13	
			419,96		455,76	
			503,00		399,40	
			499,24		388,09	
			436,44		402,23	
3	7	38	659,94	451,79	939,28	675,45
			593,31		1027,61	
			192,26		551,52	
			163,97		280,40	
			224,77		208,44	
			252,98		366,66	
			269,95		916,40	
			1257,17		1113,28	

Cuadro 6: continuación

4	13	44	31,55 693,07 291,75 216,95 276,88 168,39 337,84 194,31	276,34	152,46 628,53 230,95 132,84 176,81 115,82 195,72 187,04	227,52
5	19	50	64,94 260,87 68,61 101,25 69,54 81,67 59,36	100,87	49,86 246,96 63,95 81,05 63,06 62,78 59,85	89,65
6	22	53	31,15 20,78 27,12 31,05 29,32 22,99 26,3	26,96	15,60 15,00 15,66 17,99 16,73 14,62 15,32	15,85

2. Determinar las concentraciones de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina en tejidos comestibles de aves (músculo e hígado) de pollos broiler tratados con una formulación farmacéutica comercial de oxitetraciclina.

Las concentraciones de oxitetraciclina y su epímero 4epi-oxitetraciclina obtenidas en cada una de las aves experimentales sacrificadas con sus respectivos promedios en los puntos de muestreo 1, 2,3 y 4 post tratamiento en matriz musculo, se presentan en el cuadro 7:

Cuadro 7.

Días de muestreo	Días post tratamiento	Edad pollos (días)	Oxitetraciclina		4epi-oxitetraciclina	
			Concentración (µg/kg)	Promedio	Concentración (µg/kg)	Promedio
1	3	34	14,78	8,82	11,23	11,04
			10,63		9,758	
			12,55		11,81	
			10,98		11,33	
			4,03		7,76	
			8,38		7,47	
			8,59		7,94	
			0,64		20,99	
2	5	36	8,31	4,12	4,20	3,67
			11,47		5,32	
			7,42		4,70	
			1,45		3,19	
			1,41		3,13	
			2,89		3,35	
			0		2,59	
			0		2,88	
3	7	38	4,96	9,68	3,53	4,69
			4,86		2,75	
			5,65		4,62	
			10,11		3,66	
			6,02		3,13	
			4,96		3,44	
			21,03		6,25	
			19,87		10,13	

Cuadro 7: continuación

4	13	44	2,57	0,66	3,53	3,17
			0,81		5,01	
			0		3,04	
			0		2,80	
			1,89		3,86	
			0		2,59	
			0		2,84	
			0		1,66	

Las concentraciones de oxitetraciclina y su epímero 4epi-oxitetraciclina obtenidas en cada una de las aves experimentales sacrificadas con sus respectivos promedios en los puntos de muestreo 1, 2 y 3 post tratamiento en matriz hígado, se presentan en el cuadro 8:

Cuadro 8.

Días de muestreo	Días post tratamiento	Edad pollos (días)	Oxitetraciclina		4epi-oxitetraciclina	
			Concentración (µg/kg)	Promedio	Concentración (µg/kg)	Promedio
1	3	34	12,5	22,4	8,842	10,5
			19,4		10,187	
			25,7		15,478	
			35,4		12,481	
			12,1		8,217	
			24,7		9,484	
			18,6		10,876	
			30,5		8,637	
2	5	36	10,3	10,2	5,885	7,2
			12,6		8,930	
			11,5		9,714	
			11,6		7,411	
			14,8		5,899	
			13,1		6,478	
			4,9		5,874	
			3,0		7,576	
3	7	38	0,8	4,7	4,986	6,3
			2,5		5,033	
			5,8		7,472	
			1,8		5,616	
			9,7		8,427	
			4,5		5,795	
			2,8		5,445	
			9,5		7,801	

3. Determinar el período de resguardo a través del estudio de depleción de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina en plumas y tejidos comestibles.

Para la determinación del período de resguardo de oxitetraciclina, en el caso de las plumas se consideraron los días 3, 5, 7, 13, 19 y 22 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el límite de detección de la técnica de 20 µg/kg (figura N° 7).

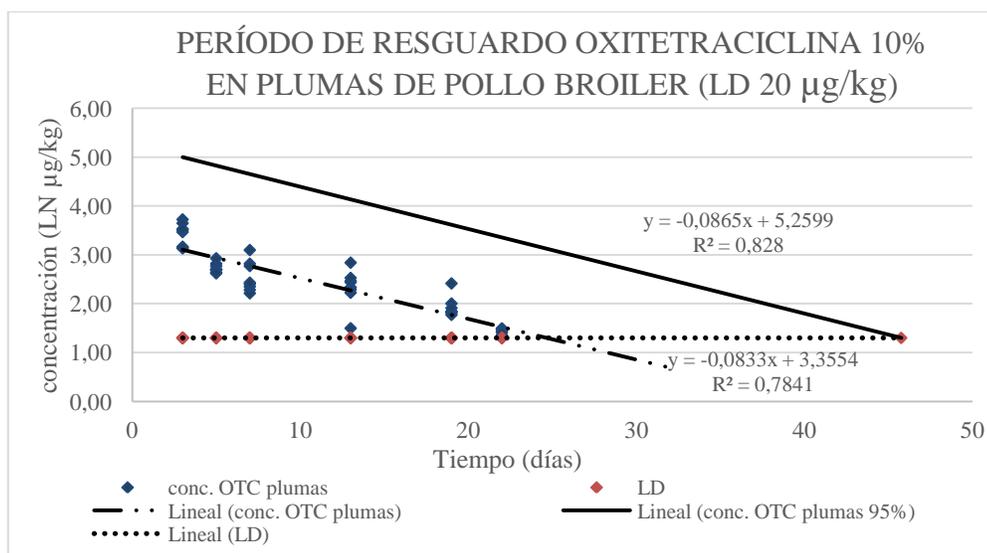


Figura N° 7: concentraciones versus tiempo. Concentración de oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el límite de detección (20 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para oxitetraciclina en plumas de pollo broiler, corresponde a cuarenta y seis días.

Para la determinación del período de resguardo de 4epi-oxitetraciclina, en el caso de las plumas se consideró los días 3, 5, 7, 13, 19 y 22 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el límite de detección de la técnica de 20 µg/kg (figura N° 8).

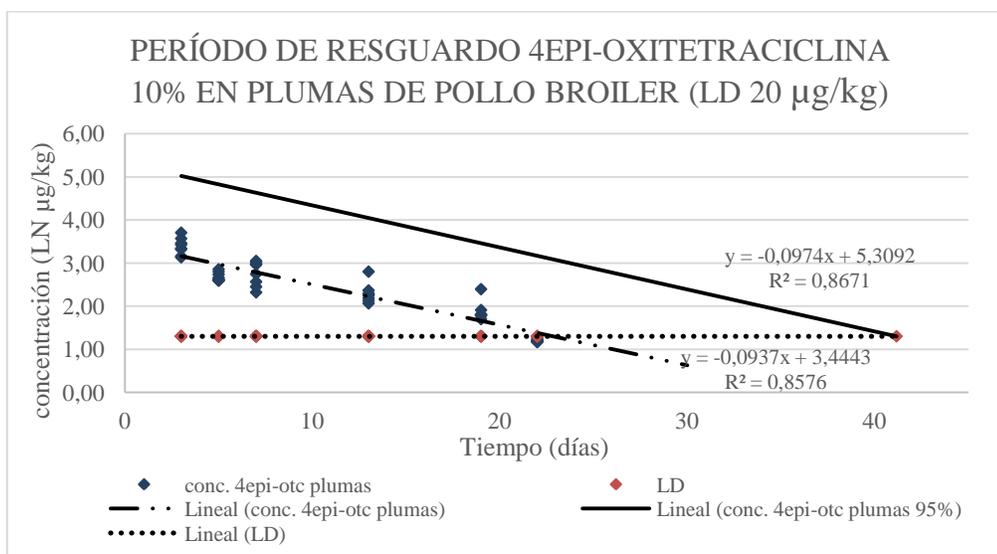


Figura N° 8: concentraciones versus tiempo. Concentración de 4epi-oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el límite de detección (20 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para 4epi-oxitetraciclina en plumas de pollo broiler, corresponde a cuarenta y dos días.

Para la determinación del período de resguardo de oxitetraciclina, en el caso de músculo se consideró los días 3, 5,7 y 13 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el LMR establecido para músculo que es de 200 µg/kg (figura N° 9).

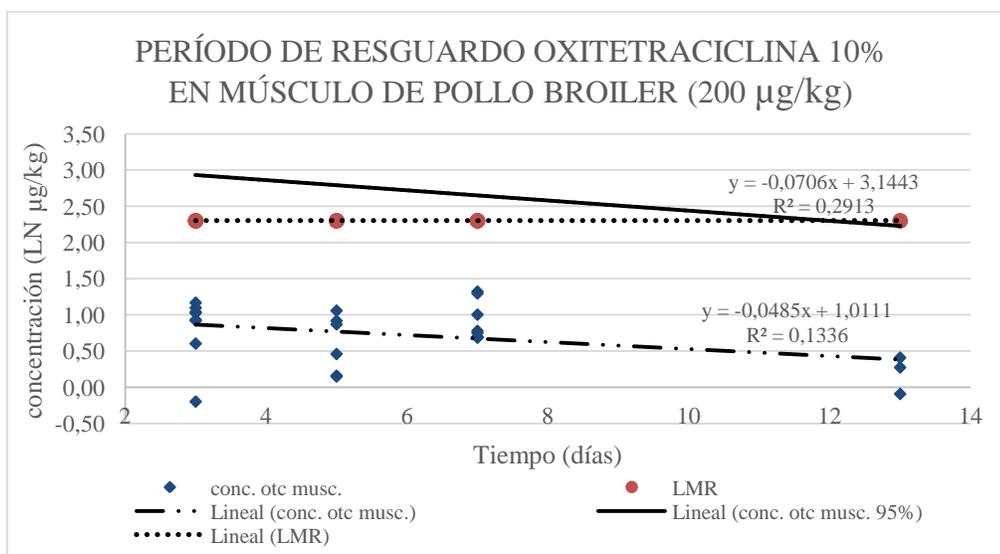


Figura N° 9: concentraciones versus tiempo. Concentración de oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el LMR (200 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para oxitetraciclina en músculo de pollo broiler, corresponde a doce días.

Para la determinación del período de resguardo de 4epi-oxitetraciclina, en el caso de músculo se consideró los días 3, 5, 7 y 13 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el LMR establecido para músculo que es de 200 µg/kg (figura N° 10).

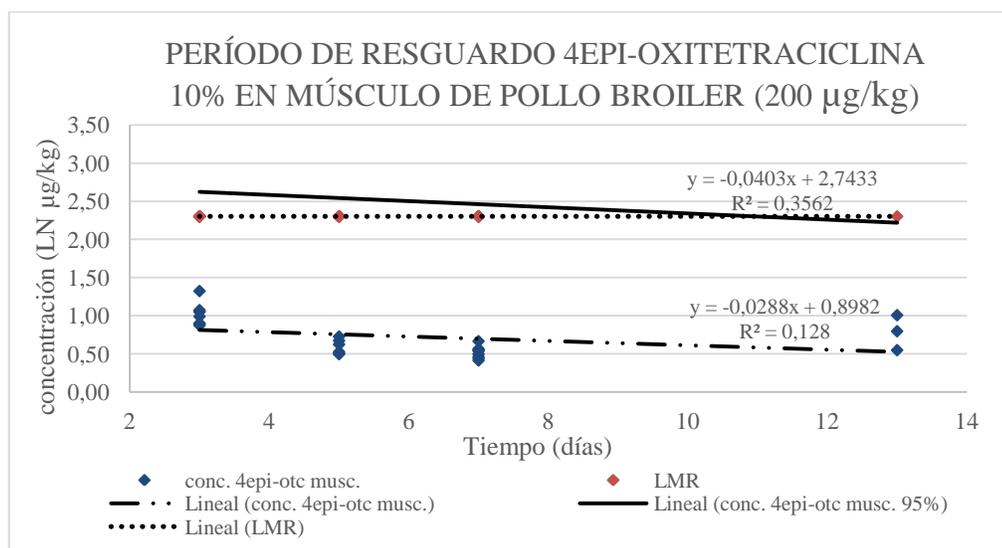


Figura N° 10: concentraciones versus tiempo. Concentración de 4epi-oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el LMR (200 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para 4epi-oxitetraciclina en músculo de pollo broiler, corresponde a once días.

Para la determinación del período de resguardo de oxitetraciclina, en el caso de hígado se consideró los días 3, 5 y 7 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el LMR establecido para hígado que es de 600 µg/kg (figura N° 11).

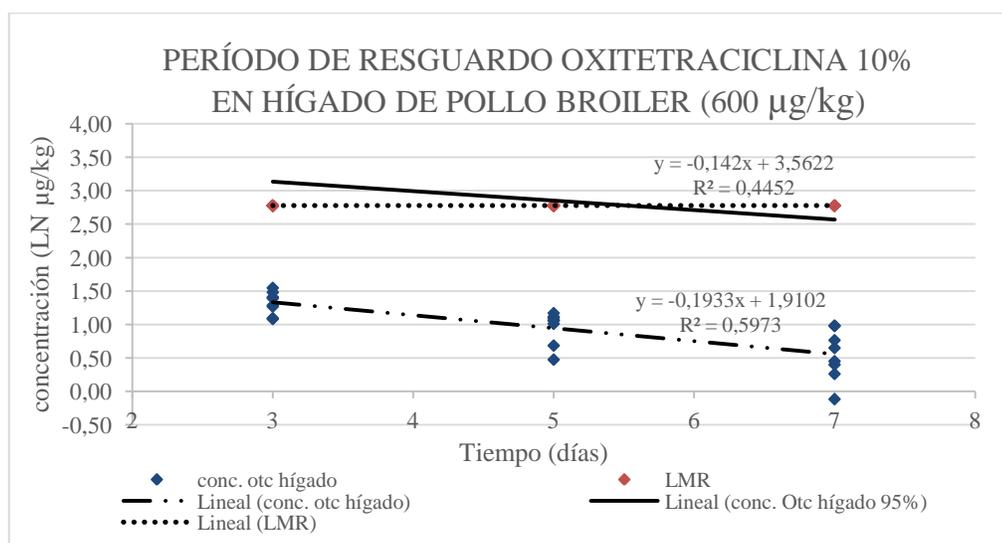


Figura N° 11: concentraciones versus tiempo. Concentración de oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el LMR (600 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para oxitetraciclina en hígado de pollo broiler, corresponde a seis días.

Para la determinación del período de resguardo de 4epi-oxitetraciclina, en el caso de hígado se consideró los días 3, 5 y 7 post tratamiento. Para eliminar los valores “outliers” que pudieran interferir con la correcta interpretación y análisis de resultados, se determinaron rangos intercuartiles con los resultados de las muestras expresados en logaritmo natural (LN), para cada analito, en cada matriz, excluyendo los valores que no perteneciesen al rango estimado. Con las concentraciones obtenidas en cada tiempo de muestreo, se realizó un análisis de regresión lineal con la cual posteriormente se utilizó la ecuación de K. Stange (EMA, 1997), para construir la gráfica en donde se presenta la curva de depleción (en escala semilogarítmica) considerando un 95% de confianza para determinar el período de resguardo considerando como corte el LMR establecido para hígado que es de 600 µg/kg (figura N° 12).

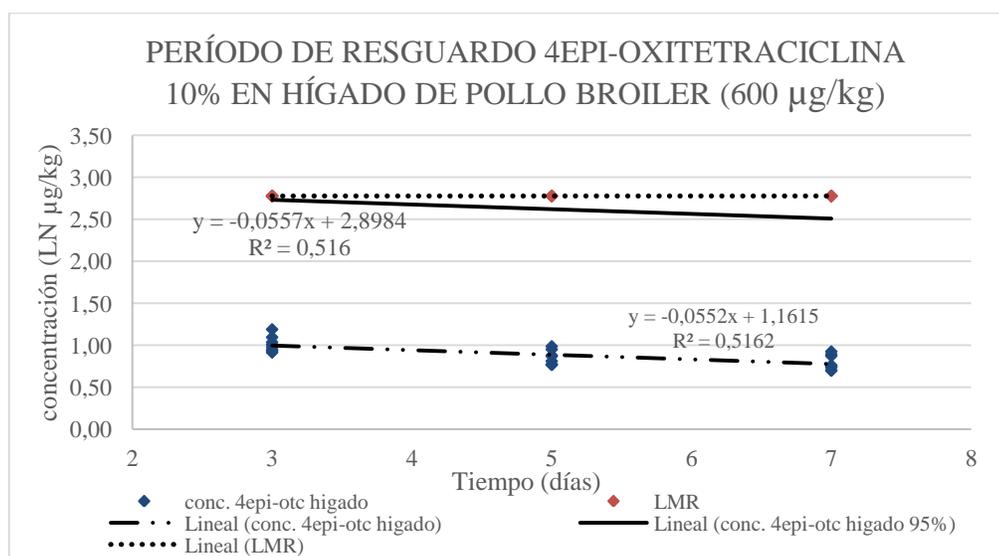


Figura N° 12: concentraciones versus tiempo. Concentración de 4epi-oxitetraciclina expresada en LN y en LN considerando un 95% de confianza, y el LMR (600 µg/kg) expresado en LN, con sus líneas de tendencias respectivas.

De acuerdo a la información entregada por la gráfica anterior, el período de resguardo calculado para 4epi-oxitetraciclina en hígado de pollo broiler, corresponde a tres días.

DISCUSIÓN

Las tetraciclinas son antimicrobianos ampliamente usados en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades en animales de producción tales como aves, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y salmónidos, especies productivas para las cuales se encuentran autorizadas formulaciones farmacéuticas de esta familia de antimicrobianos por el servicio agrícola y ganadero (SAG, 2014□).

Actualmente, Chile cuenta con un programa de control de residuos de fármacos en diferentes alimentos de origen animal, como leche, miel, músculo e hígado; sin embargo, dentro de estos programas no están considerados los subproductos, tales como plumas, piel, huesos, cartílagos, sangre y cualquier otro tejido que no sea destinado a consumo humano (SAG, 2015). A la fecha tampoco se han establecido LMR para estos subproductos, comenzando hace pocos años la necesidad de realizar estudios sobre la depleción en estas matrices, de los antimicrobianos más utilizados en la industria de producción animal. En la industria animal es habitual el uso de los subproductos como parte de la dieta animal, debido a que son una buena fuente de aminoácidos de bajo costo (Cheng et al., 2002; Bertsch y Coello, 2005). Por lo tanto, surge la necesidad de conocer y discutir sobre la presencia de residuos de antimicrobianos en estas matrices, para así establecer un punto de partida respecto a aplicar medidas de prevención y control pertinentes.

En el presente estudio fue posible observar que en los días posteriores al tratamiento, en pluma los niveles de oxitetraciclina y 4epí-oxitetraciclina se mantuvieron altos, por sobre los 2500 µg/kg los primeros 3 días post tratamiento, y fueron disminuyendo gradualmente durante los siguientes 10 días, sin alcanzar el LMR de 200 µg/kg establecido para músculo. Al día 19 post tratamiento, las concentraciones en esta matriz se encontraron bajo este LMR, alcanzando de manera aproximada al día 22 post tratamiento, el LD de la técnica de 20 µg/kg. Esto se puede atribuir a la distribución de la droga por el torrente sanguíneo, alcanzando las plumas de pollo broiler y depositándose en altas concentraciones por la afinidad y quelación de la oxitetraciclina a iones metálicos presentes en la queratina de las plumas. En un estudio similar, San Martín *et al.* (2007) estudió la depleción de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en tejidos comestibles y plumas de gallinas ponedoras, las cuales fueron tratadas con este antibiótico por 3 días y sacrificadas post

tratamiento entre 6 y 216 horas después. Como conclusión a este estudio, se determinó que ambos analitos estaban presentes en plumas, y que su concentración permaneció elevada a lo largo de todo el periodo de estudio. Por otro lado, Love *et al.* (2012) también llevó a cabo un estudio, determinando la presencia de residuos antimicrobianos en plumas, específicamente en el subproducto harina de pluma, el cual es principalmente destinado a alimentación animal, encontrando efectivamente la presencia de residuos de diversas familias antimicrobianas. Berendsen *et al.*, (2013) analizó las concentraciones de oxitetraciclina en plumas, concluyendo que posterior al período de resguardo, la concentración de este fármaco en el subproducto mencionado anteriormente, fue mucho más alta que los niveles hallados en tejidos comestible (músculo e hígado).

En contraste a lo sucedido en la matriz plumas, en músculo e hígado, desde el primer punto de muestreo correspondiente al día 3 post tratamiento, las concentraciones de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina se encontraron bajo los LMR establecidos para ambas matrices, igualando o siendo inferior al LD de la técnica (20 µg/kg). A partir del día 5 post tratamiento, en el caso de músculo, y del día 7 post tratamiento en el caso de hígado, los valores se encuentran bajo el LD en promedio. Adicionalmente, se observa una leve diferencia en los promedios de concentración entre matrices, siendo mayor la acumulación de estos analitos en hígado. Esto coincide con los resultados expuestos por San Martín *et al.* (2009), el cual al comparar 4 formulaciones de enrofloxacino en músculo e hígado, observó una rápida depleción de la droga en ambas matrices y una mayor concentración en hígado, indicando que hígado sería una matriz más adecuada que músculo para el monitoreo de terapias antimicrobianas.

La rápida depleción del fármaco demostraría que los niveles de antimicrobiano en estos tejidos, son un reflejo de la alta metabolización que ocurre en las matrices mencionadas. De esta manera, esto concuerda con lo establecido por la literatura en el caso de músculo e hígado, y el período de resguardo determinado para la formulación farmacéutica utilizada que considera 7 días.

En relación a la concentración de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina alcanzada por plumas en comparación a la de tejidos comestibles, esta supera las concentraciones establecidas como permitidas en matrices comestibles (muscuro e hígado), y además

permanece por un mayor tiempo que lo establecido en los periodos de resguardo calculados para las formulaciones utilizadas. Resultados similares obtuvo Cornejo *et al.* (2010), donde se analizó la depleción en 3 formulaciones de flumequina en tejidos comestibles y su transferencia hacia las plumas en pollos tratados por 5 días consecutivos, concluyendo que la concentración de este fármaco en plumas, es mayor que en tejidos comestibles durante el periodo de resguardo, y que además se mantiene por un tiempo más prolongado. Otro estudio reciente sobre la bioacumulación de oxitetraciclina en plumas de pollo, evidenció también diferencias entre la concentración determinada en plumas y la determinada en las dos matrices con que se comparó (músculo e hígado), concluyendo que la eliminación de oxitetraciclina en plumas es muy lenta, por lo que podría considerarse como una matriz interesante de monitoreo para observar el uso de antibióticos (Berendsen *et al.* 2013).

Otro resultado a destacar de este estudio, es que en las tres matrices estudiadas, los niveles de oxitetraciclina fueron en general más altos que los alcanzados por la 4epi-oxitetraciclina, lo cual es esperable ya que esta última corresponde a un metabolito de la oxitetraciclina, es decir un producto obtenido de la biotransformación en hígado del fármaco administrado, el cual tiene como destino su eliminación a través de los riñones como vía principal.

A partir del estudio de depleción en el cual se trabajó, en el caso del período de resguardo calculado con un 95% de confianza en plumas para oxitetraciclina y su epímero, arroja que a partir del día 46 post tratamiento, los valores de la oxitetraciclina y su metabolito se hallan igual o bajo los 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que es el LD de la técnica utilizada. Como observación, los punto de muestreo 5 y 6 poseen un dato menos por analito, ya que en la crianza de los animales experimentales ,murieron dos pollos broiler del grupo tratado, debido a un síndrome de hipertensión arterial pulmonar (PAH), lo cual es un cuadro de presentación frecuente en esta raza de aves de corral (Wideman, 2012).

En el caso de músculo, el período de resguardo calculado a partir del estudio de depleción utilizando un 95% de confianza, arroja que a partir del día 12 post tratamiento, la concentración de oxitetraciclina y su epímero se hallan igual o bajo los 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Este valor calculado es superior a los 7 días de período de resguardo que tiene establecida la fórmula farmacéutica comercial utilizada, teniendo como posible explicación, la variación de los vehículos farmacéuticos utilizados en la producción del fármaco, lo cual repercutiría

directamente en la farmacocinética, es decir en la absorción, distribución, metabolización y eliminación de la droga en el organismo (Lorenzo *et al.*, 2008).

En los puntos de muestreo 5 y 6, correspondiente a los días 19 y 22 post tratamiento, no se determinaron las concentraciones de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina para ser incluidas en el estudio ya que se consideró el hecho de que las concentraciones desde el punto de muestreo 1 se encontraron bajo el LMR (200 µg/kg) y bajo el LD de la técnica (20 µg/kg). También se contaba con suficientes datos según las indicaciones de EMA (1997), la cual establece un mínimo de tres puntos de muestreo para considerar válido un estudio de depleción, con un mínimo de 3 observaciones en cada punto de muestreo.

En el caso de hígado, el período de resguardo calculado a partir del estudio de depleción utilizando un 95% de confianza, arroja que a partir del día 6 post tratamiento, la concentración de oxitetraciclina y su epímero se hallan igual o bajo los 600 µg/kg. En los puntos de muestreo 4, 5 y 6, correspondiente a los días 13, 19 y 22 post tratamiento, no se determinaron las concentraciones de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina para ser incluidas en el estudio ya que se consideró el hecho de que las concentraciones desde el punto de muestreo 1 se encontraron bajo el LMR (600 µg/kg) y se aproximaban al LD de la técnica (20 µg/kg). También se contaba con suficientes datos según las indicaciones de EMA (1997), la cual establece un mínimo de tres puntos de muestreo para considerar válido un estudio de depleción, con un mínimo de 3 observaciones en cada punto de muestreo.

Al realizar la comparación de los periodos de resguardo obtenidos en cada matriz, el tiempo calculado para plumas es el más alto correspondiendo a 46 días, lo que indica una alta acumulación y una lenta depleción de la droga en esta matriz. En el caso de músculo e hígado los períodos de resguardo obtenidos corresponden 12 y 6 días respectivamente, lo cual indica una baja acumulación y una rápida depleción de la droga en estas matrices.

De todo esto, es posible desprender que las plumas de animales tratados con oxitetraciclina no debiesen ser incorporadas sin ser analizadas previamente como aditivo en la dieta de animales de producción, ya que presentarían residuos de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina en concentraciones aproximadas de hasta 450 a 675 µg/kg, superando ampliamente los LMR establecidos para tejidos comestibles de músculo e hígado, de 200

$\mu\text{g}/\text{kg}$ y $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente, después de transcurrido los 7 días como período de resguardo establecido para la fórmula farmacéutica comercial. Además, los residuos de estos antimicrobianos en esta matriz persistirían por periodos mucho más prolongados, alrededor de 46 días post tratamiento, hasta alcanzar los $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ definidos como límite de detección de la técnica utilizada para este estudio. Por ende, las concentraciones determinadas de estos residuos podrían reintegrarse de manera indirecta a la cadena alimenticia representando un riesgo para la salud pública, provocando la selección de bacterianas resistentes presentes en la población humana.

De manera adicional, los resultados obtenidos en la presente memoria de título también permiten considerar a las plumas como un tejido de monitoreo y control de las terapias antimicrobianas realizadas en planteles animales, destinados a consumo por parte de la población. Esto permitiría a futuro implementar el análisis de antimicrobianos en plumas como una forma de control menos invasiva, eficaz y precisa para detectar el uso de antimicrobianos en aves de producción.

CONCLUSIÓN

- La concentración de oxitetraciclina y 4epi-oxitetraciclina persisten en plumas de aves tratadas en mayores concentraciones que los límites máximos residuales establecidos para tejidos comestibles y por periodos de tiempos más prolongados, una vez transcurrido el período de resguardo determinado para la formulación farmacéutica.
- De acuerdo a los resultados obtenidos las plumas de pollos broiler tratados con una formulación de oxitetraciclina al 10%, no debiese utilizarse como subproducto destinado a alimentación animal sin ser debidamente monitoreadas y controladas, hasta pasado 46 días de finalizado el tratamiento.
- Se deberían estudiar los límites admisibles de antimicrobianos para los subproductos de origen animal que sean destinados a consumo directo o bien cuyo ingreso a la cadena alimentaria sea indirecto, con el fin de evitar los posibles efectos adversos y repercusiones en la salud pública.
- La matriz plumas podría ser utilizada como un posible tejido de monitoreo para la detección de residuos de oxitetraciclina en aves de producción.

BIBLIOGRAFÍA

- **ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2012. Capítulo 21 Residuos de medicamentos de uso veterinario. **In:** Toxicología alimentaria. 5ª ed. Díaz de Santos. pp. 394-412
- **APA.** 2014. SECTOR AVICOLA / Análisis Sectorial 2014. [en línea]. <<http://www.apa.cl/industria/11/anlisis-sectorial>> [consultado: 12-08-2015].
- **APA.** 2013. SECTOR AVICOLA / Análisis Sectorial 2013. [en línea] <http://www.apa.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=8> [consultado: 14-04-2014]
- **BERENDSEN, B.J.; BOR, G.; GERRITSEN, H.W.; JANSEN, L.J.; ZUIDEMA, T.** 2013. The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment. *Food Addit. Contam.* 30(12):2102–2107.
- **BERTSCH, A.; COELLO, N.** 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresour Technol.* 96 (15):1703-1708.
- **BOTSOGLOU, N.A.; FLETOURIS, D.J.** 2001. *Drug Residues in Food.* Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2009□. Regulation (EC) No 470/2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin. 16 de junio de 2009.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2009□. Reglamento (CE) N° 1099/2009. Protección de los animales en el momento de la matanza. 24 de septiembre de 2009.1
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2010□. Commission regulation NO 37/2010 pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, off. J. Eur. Communities. 22 de diciembre de 2010. 15:1-7.
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2010□. Directiva 2010/63/UE. Diario oficial de la Unión Europea. 22 de septiembre de 2010. 276:33-79.
- **CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. [en línea]. <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>> [consultado: 28-06-2014].
- **CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J.** 2013. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(3):827-834
- **CHENG, Z., BEHNKE, K.; DOMINY, W.** 2002. Effect of feather meal on growth and body composition of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl. Aquacult.* 12:57-69.

- **CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- **CIPARS. CANADIAN INTEGRATED PROGRAM FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE.** 2011. Antimicrobial resistance short report. [en línea]. <http://publications.gc.ca/collections/collection_2013/aspc-phac/HP2-4-2-2011-eng.pdf> [consultado: 10-09-2014].
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile.
- **CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTÍN, B.** 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 34(2):168-175.
- **CORNEJO, J.; GONZÁLEZ, P.; ARAYA, C.; MADDALENO, A.; SAN MARTIN, B.** 2012. Transfer and depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in feathers of treated broiler chickens. Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue VII Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands. Volume 1, 2 and 3: pp. 683-688
- **EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 1996. Note for guidance: approach towards harmonization of withdrawal periods. . EMEA/CVMP/036/95-FINAL.
- **FINLAY, A.C.; HOBBY, C.L.; PAN, S.Y.; REGNA, P.P.; ROUTIEN J.B.; SEELEY, G.M.; SHULL, G.M.; SOBIN, B.A.; SOLOMONS, I.A.; VINSON, J.W.; KANE, J.H.** 1950. Terramycin, a new antibiotic. *Science.* 111: 85.
- **GOETTING, V.; LEE, K. A.; TELL, L. A.** 2011, Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 34:521–556.
- **GYLES, C.L.** 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews.* 9:149-158.
- **HEINRICH, K.; CHAN, D.; FUSSELL, R.; KAY, J.; SHARMAN, M.** 2013. Can the unauthorised use of ceftiofur be detected in poultry?. *Food Addit. Contam. Part A.* 30(10):1733-1738.
- **ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2005. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- **KAJI, A; RYOJI, M.** 1979. Tetracycline. In: FE Hahn: Antibiotics. Springer, Berlin. pp. 304–328.

- **KUKANICH, B.; GEHRING, R.; WEBB, A.; CRAIGMILL, A.; RIVIERE, J.** 2005. Effect of formulation and route of administration on tissue residues and withdrawal times. *JAVMA*. 227 (10):1574-1577.
- **LORENZO, P.; MORENO, A.; LEZA, C.J., LIZASOAIN, I.; MORO, M.A., PORTOLES, A.** 2008. Farmacología clínica I. variabilidad de la respuesta farmacológica. In: Velazques Farmacología básica y clínica. 18^o ed. Editorial Panamericana. Buenos aires, Argentina. pp. 1078- 1083
- **LOVE D.; HALDEN, R.; DAVIS, M.; NACHMAN, K.** 2012. Feather meal: a previously unrecognized route for reentry into the food supply of multiple pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). *Environ Sci Technol*. 46(7):3795-3802.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD, CHILE.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 de octubre de 2009.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD, CHILE.** 2014. Resolución Exenta N° 551 de 2014 del Ministerio de Salud que fija los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano. 19 de agosto de 2014.
- **MARAN.** 2012. Food and Consumer Product Safety Authority, National Institute for Public Health and the Environment, Central Veterinary Institute, LEI and Universiteit Utrecht. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2010/2011. [en línea] <http://www.uu.nl/SiteCollectionImages/Fac_DGK/Nieuwsplaatjes/Nieuws/2012/NethmapMaran_Web.pdf> [consultado: 27-09-2014]
- **MUÑOZ, R.; CORNEJO, J.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; SAN MARTÍN, B.** 2014. Withdrawal Times of Oxytetracycline and Tylosin in Eggs of NLaying Hens after Oral Administration. *J. Food Protect*. 77(6):1017-1021.
- **NETHMAP.** 2012. National Institute for Public Health and the Environment. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands. [en línea] <http://www.uu.nl/SiteCollectionImages/Fac_DGK/Nieuwsplaatjes/Nieuws/2012/NethmapMaran_Web.pdf> [consultado: 29-09-2014]
- **PAPHITOU, N.** 2013. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 42: 25-28.
- **PAVLOV, AL.; LASHEV, L.; VACHIN, I.; RUSEV, V.** 2008. Residues of antimicrobial drugs in chicken meat and offals. *Trakia J. of Sci*. 6(1):23-25.
- **RANG, H. P.; DALE, M. M; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G.** 2012. Sección 5: antibióticos. In: Farmacología. 7^a ed. Elsevier. pp. 629-630.
- **ROBERTS, M.C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol*. 19:1-24.

- **SAG.** 2014□. [en línea] < http://medicamentos.sag.gob.cl/_CARGAS/ETIQUETAS/325-B.pdf> [consultado: 02-09-2014]
- **SAG.** 2014□. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. Ver en http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp
- **SAG.** 2015. programa de control de residuos en productos pecuarios año 2015. [en línea] http://www.sag.cl/sites/default/files/programa_control_residuos_2015.pdf [consultado: 10-09-2015]
- **SAN MARTÍN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A.** 2007. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. food protection.* 70(8):1952-1957.
- **SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGUËN, D.; PÉREZ, F.; HIDALGO, H.; ANDRE, F.** 2009. Withdrawal time of four pharmaceutical formulations of enrofloxacin in poultry according to different maximum residues limits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 33:246-251.
- **SAN MARTÍN; B.; GALLARDO, A.; MEDINA, P.** 2014. Manual de buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. 2° edición. FARMAVET – SERNAPESCA.
- **WIDEMAN, R.; RHOADS, D.; ERF, G.; ANTHONY, N.** 2012. Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poult. Sci.* 92:64–83.

ANEXO

Anexo n°1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 11 de Noviembre de 2013

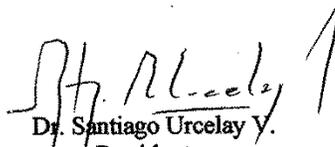
CERTIFICADO N° 03-2013

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Bioacumulación de Oxitetraciclina, clortetraciclina y sus efímeros en plumas de aves tratadas y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”** presentado al concurso FIV-2013, cuyo investigador principal es la **Dra. Javiera Cornejo**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable tiene la idoneidad necesaria para el manejo de las aves que serán sujeto de estudio, y cuenta con un recinto apto para la mantención y supervisión de éstas durante el transcurso de la investigación dentro de la unidad de Patología Aviar de FAVET.


Dra. Tamara Tadich G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo N° 2



CERTIFICADO N° 31

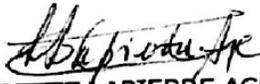
Santiago 28 de Octubre de 2013

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, revisó el proyecto titulado: "Bioacumulación de Oxitetraciclina, Clortetraciclina y sus epimeros en plumas de aves tratadas y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles" el cual será presentado para su exanimación en el concurso FIV 2013 de FAVET, y cuyo Investigador Responsable es la Dra. Javiera Cornejo K.

En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad.
- 2.- Uso de vestimenta adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio.
- 3.- Uso de campanas de extracción para trabajo con reactivos que lo necesiten.
- 4.- Los desechos de estándares serán eliminados por empresa externa y los desechos biológicos serán incinerados.
- 5.- Agujas, jeringas y bránulas se eliminarán en cajas para de elementos cortopunzantes.

Con relación a lo expuesto, este comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y previenen el riesgo para las personas, los animales y el medioambiente.


LISETTE LAPIÈRE ACEVEDO
Coordinadora
Comité de Bioseguridad



PLANIFICACIÓN

Actividades	Dic	Enero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept	Oct
- Capacitación	X									
- Compra de animales experimentales e insumos necesarios para su mantención. - Inicio del experimento, llegada del grupo experimental OTC - Inicio del tratamiento y recolección de muestras para OTC	X	X								
- Análisis de laboratorio de las muestras obtenidas - Análisis instrumental de las muestras		X	X	X	X					
- Cuantificación de datos					X	X	X			
- Análisis de los resultados obtenidos - Preparación de informes						X	X	X	X	
- Avance						X				
- Presentación final										X